

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860693

研究課題名(和文) 中枢神経インスリン作用による肝糖代謝制御における迷走神経の役割の解明

研究課題名(英文) Understanding of vagus nerve in hepatic glucose metabolism by a central insulin action

研究代表者

木村 久美(Kimura, Kumi)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・特任助教

研究者番号：60409472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝糖代謝調節において、中枢神経から迷走神経を介した制御メカニズムの重要性が指摘されている。中枢神経インスリン作用による肝糖代謝制御に、迷走神経とクッパー細胞が関与することが報告されているものの、その分子メカニズムは十分に明らかにされていない。代表者は、1) 視床下部がインスリンを感知すると、肝臓へ分布する迷走神経の活動が低下すること、2) 視床下部のインスリン作用による肝臓IL-6発現の増加は、 $\gamma$ -ニコチン性アセチルコリン受容体( $\gamma$ -nAChR)を介したクッパー細胞活性抑制の減弱により誘導されること、3) 肥満では視床下部のインスリン作用での迷走神経の活動変化が消失することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Central insulin action suppresses the gene expression of hepatic gluconeogenic enzymes. The vagus nerve plays an important role in this centrally mediated hepatic response; however, the precise mechanism underlying this brain-liver interaction is unclear. Here, we present our findings that the vagus nerve suppresses hepatic gluconeogenesis via  $\gamma$ -nicotinic acetylcholine receptors ( $\gamma$ -nAChR) on Kupffer cells, and that central insulin action activates hepatic IL-6 release by suppressing vagal activity. In high-fat diet-induced obese and insulin-resistant mice, control of the vagus nerve by central insulin action was disturbed, inducing a persistent increase of inflammatory cytokines. These findings suggest that dysregulation of the  $\gamma$ -nAChR-mediated control of Kupffer cells by central insulin action may affect the pathogenesis of chronic hepatic inflammation in obesity.

研究分野：肝糖代謝制御

キーワード：肝糖代謝 中枢神経インスリン作用 迷走神経 クッパー細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は、体内でブドウ糖を産生する(糖産生)唯一の臓器である。肝臓での糖産生が、空腹時に増加し、食事を食べると減少することで、血糖値を一定レベルに維持している。肝臓糖産生の制御は、膵臓から分泌されるインスリンにより行われている。インスリン作用が障害される糖尿病では、肝臓での糖産生の増加が血糖値の増加の原因となることが知られている。

インスリンは、肝臓に直接作用して、糖産生を抑制する一方、同時に、脳の視床下部に作用し、間接的に肝臓の糖産生を抑制する。視床下部でのインスリン作用による肝臓の糖産生の調節メカニズムに関しては、迷走神経が関与することが明らかにされている。これまでに私たちの研究室では、視床下部でのインスリン作用が、肝臓のクッパー細胞からのインターロイキン 6 (IL-6)分泌を増加させ、肝臓の糖産生を抑制することを見出し、報告している。しかし、脳の視床下部がどのように迷走神経を制御し、クッパー細胞からの IL-6 分泌を調節するか、という分子メカニズムは不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) 中枢神経インスリン作用による迷走神経制御と、2) 迷走神経によるクッパー細胞制御の、分子メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

実験には野生型マウス、 $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体欠損マウス、食餌誘発性肥満マウスを用いる。脳室内インスリン投与後の迷走神経の活動は電気生理学的手法により検討する。迷走神経の活動は自律神経節遮断

モデルとして、ニコチン性アセチルコリン受容体阻害剤である Chlorisondamine 投与マウスおよび肝臓副交感神経切除マウスを用いる。血中のパラメータとして、血糖値、血中インスリン値、血中 IL-6 濃度を測定した。クッパー細胞の除去は、リポソーム封入クロドロネートを投与することで行う。クッパー細胞の置換は、クロドロネートリポソーム処理後に放射線照射を行い、骨髄移植を行う。6 週間の回復期間を置き、同様に中枢インスリン応答を試験する。クッパー細胞の置換効率、GFP 過剰発現マウス由来の骨髄を GFP を持たないマウスに移植し、クッパー細胞のマーカである MAC2 陽性における GFP 陽性細胞の割合で算出する。脳室内インスリン投与に伴う肝臓応答は、肝臓 IL-6 発現と糖新生酵素 G6pc 発現を定量的 PCR にて、肝臓 STAT3 のリン酸化は Western blotting にて、それぞれ評価する。単離クッパー細胞は、コラゲナーゼなどの消化酵素による肝灌流と細胞分散を経て得られた細胞懸濁液を低速度で遠心し、肝実質細胞を取り除き、上清中の非実質肝細胞を用いる。

## 4. 研究成果

まず脳インスリン作用による迷走神経の制御について解析した。迷走神経を切除すると、インスリン脳室内投与に伴う肝臓 STAT3 リン酸化が減弱した(図1)。

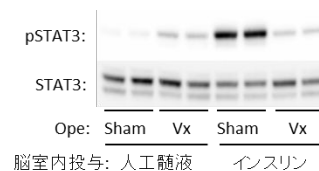


図1: 迷走神経切除により、肝臓STAT3リン酸化が減弱する。対照群(Sham)では、脳室内インスリン投与に伴い、肝臓STAT3がリン酸化する。しかし、迷走神経切除群(Vx)では、脳室内にインスリンを投与しても肝臓STAT3のリン酸化が増強しない。

脳室内インスリン投与による肝臓応答に、迷走神経が関与することが明らかとなったので、視床下部がインスリンの刺激を受けた時

の迷走神経の活動を検討した。その結果、脳室内インスリン投与に伴い、迷走神経の活動が低下することを見出した(図2)。

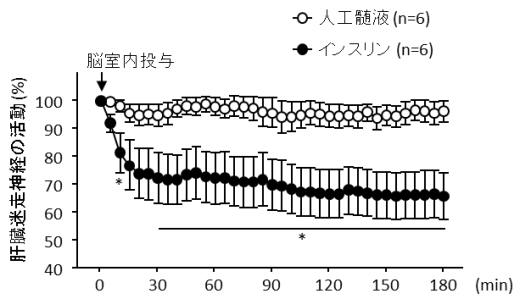


図2; 視床下部がインスリンを感知した後での、迷走神経の神経活動の変化  
人工髄液投与群、あるいはインスリン投与群において、迷走神経の活動を測定した。インスリン投与群では、迷走神経の活動が低下した。

次に、迷走神経による IL-6/STAT3 シグナルの制御について検討した。迷走神経は神経伝達物質であるアセチルコリンを介してマクロファージからのサイトカインの分泌を抑制することが知られている。実際に、マウスの肝臓から取り出したクッパー細胞にアセチルコリンを処理すると、IL-6 分泌は抑制された。アセチルコリンは、アセチルコリン受容体を介して作用を発現するが、このアセチルコリン作用はニコチン受容体を介すること(図3)なかでも  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体を介することを明らかにした(図4)。

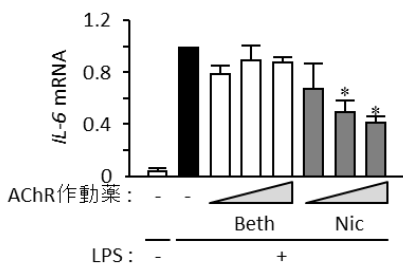


図3; ニコチン受容体を活性化するとIL-6発現が抑制される  
単離クッパー細胞をLPSで刺激し、IL-6発現を亢進させた。アセチルコリン受容体のニコチン受容体をニコチンで活性化すると、IL-6発現が減弱した。一方で、ムスカリン受容体をベタネコールで活性化しても、IL-6発現に変化は見られなかった。

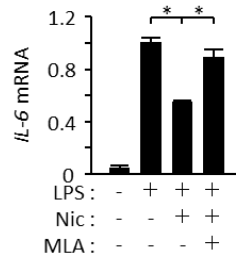


図4; ニコチンによるIL-6発現抑制作用は、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体を介するニコチンはLPS誘導性IL-6発現を抑制するが、 $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体拮抗剤(MLA)により、その作用は消失した。

マウス個体における  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体の役割を解析する為、 $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体を欠損したマウス ( $\alpha 7$ KO マウス) を用いて検討した。その結果、野生型マウスでは、脳室内インスリン投与に伴い、肝臓 STAT3 活性化や肝糖産生の抑制が見られたが、 $\alpha 7$ KO マウスでは、中枢インスリン作用が消失していた(図5)。

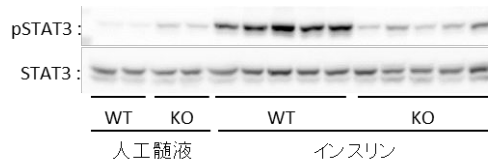


図5;  $\alpha 7$ 受容体欠損マウスでは、視床下部がインスリン刺激を受けても肝臓応答が起こらない  
野生型マウス(WT)では、脳室内インスリン投与に伴い、肝臓STAT3がリン酸化されるが、 $\alpha 7$ 受容体欠損マウス(KO)では、その応答が消失している。

中枢インスリン作用におけるクッパー細胞の  $\alpha 7$  ニコチン性アセチルコリン受容体の重要性を明らかにするため、 $\alpha 7$ KO マウスに野生型マウスのクッパー細胞を移植し、中枢インスリン作用を解析した。 $\alpha 7$ KO マウスのクッパー細胞を野生型マウスのクッパー細胞と置き換えたところ、脳室内インスリン投与に伴う肝臓応答が回復した(図6)。

肥満や糖尿病では、脳を介した肝臓での糖代謝調節が破綻することが指摘されている。実際に肥満マウスでは、視床下部でインスリンを感知しても、迷走神経の活動に全く変化が

起こらなかった。アセチルコリン阻害剤などを用いた解析から、肥満マウスでは、迷走神経の活動が既に低下しており(図7)、さらに肝臓での IL-6 による肝糖産生の抑制作用も障害されている可能性を見出した。

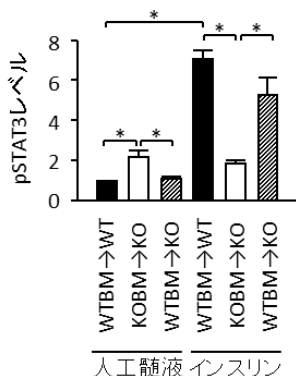


図6:  $\alpha 7$  受容体欠損マウスのクッパー細胞を野生型に置き換えると、視床下部が中枢インスリン作用が回復する

$\alpha 7$  受容体欠損マウス(KO)では、脳室内インスリン投与に伴う肝臓STAT3がリン酸化されるが、 $\alpha 7$  KOマウスにWTのクッパー細胞を移植すると、中枢インスリン応答が回復する。

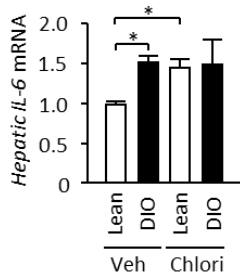


図7: 肥満マウスでは、自律神経節を遮断してもIL-6分泌の亢進が起こらない

Leanマウスに自律神経節遮断剤であるクロリゾンダミンを投与すると、肝臓局所でIL-6発現が亢進する。しかし、肥満マウス(DIO)では、基礎的なIL-6発現が亢進しており、クロリゾンダミンを投与してもIL-6発現亢進が起こらない。このことは、肥満マウスではすでに迷走神経の活動が低下している可能性を示唆する。

視床下部のインスリン作用が肝臓糖産生を制御する分子メカニズムが解明されたことは、肥満における脳を介した肝臓糖代謝調節の破綻、さらには肝糖産生の増加に対する新たな予防法・治療法の開発に繋がるものと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kumi Kimura, Mamoru Tanida, Naoto Nagata, Yuka Inaba, Hitoshi Watanabe, Mayumi Nagashimada, Tsuguhito Ota, Shun-ichiro Asahara, Yoshiaki Kido, Michihiro Matsumoto, Koji Toshinai, Masamitsu Nakazato, Toshishige Shibamoto, Shuichi Kaneko, Masato Kasuga, Hiroshi Inoue. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. **Cell Reports**. 査読有. 14(10), 2362–2374, 2016

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://inoue.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 久美 (KUMI KIMURA)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・特任助教

研究者番号: 60409472

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし