

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860702

研究課題名(和文) 中枢のIRS-2を介した摂食・代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) IRS-2 in the CNS regulates food intake and glucose homeostasis

研究代表者

井上 真理子 (INOUE, MARIKO)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・臨床栄養研究部・室長

研究者番号：80511477

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)：脳特異的にインスリン受容体基質(IRS)-2を欠損させたマウスでは、摂食量増加に伴って肥満を呈し、肝臓と骨格筋でインスリン抵抗性を認めた。しかし、摂餌量をそろえることでこのマウスの体重をコントロールマウスと同等に維持して肥満の影響を除外しても、摂食亢進と肝臓のインスリン抵抗性を認め、これらは肥満とは独立であることが示唆された。肝臓では、IL-6の上昇によるStat3のリン酸化を介して糖産生調節遺伝子の発現が抑制されるが、これは脳のIRS-2を介していることが示唆された。また、細胞株を用いた解析から、インスリンとレプチンは一部IRS-2を介して摂食量を調節していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Brain-specific insulin receptor substrate (Irs)-2 knockout mice (Nlrs2KO mice) displayed obesity, hyperphagia and insulin resistance both in the liver and the skeletal muscle. Since those phenotypes are augmented by obesity, we adopted pair-feeding to maintain body weights of Nlrs2KO mice equal to control mice. Even in pair-fed Nlrs2KO mice, hepatic glucose production was impaired and a food intake was accelerated, suggesting that hepatic insulin resistance and hyperphagia observed in Nlrs2KO mice were independent of obesity.

It has been shown that insulin signal in the CNS increased IL-6 expression and subsequently induced phosphorylation of Stat3 associated with decreased expression levels of gluconeogenic genes in the liver, we found that Irs2 in the CNS might contribute to this pathway. We also found that Irs2 in the CNS might play an important role in the regulation of food intake by insulin and leptin.

研究分野：糖尿病

キーワード：インスリン受容体基質2 摂食調節 糖産生

1. 研究開始当初の背景

インスリンとレプチンは摂食を抑制するが、肥満の状態では血中のインスリン、レプチンが増加しているにも関わらず、中枢におけるインスリン抵抗性、レプチン抵抗性のため、摂食が亢進し肥満が増悪するといった悪循環を形成している。このとき、インスリンとレプチンのシグナル伝達基質の1つであるインスリン受容体基質(IRS)-2のリン酸化が低下していることが知られているが、これらのホルモンが中枢のIRS-2を介してどの程度、どのように摂食を調節しているのかは明らかになっていない。

また、近年、中枢のインスリンシグナルが迷走神経を介して肝臓に作用し、肝臓での糖産生を抑制することで糖代謝を調節していることが明らかとなってきたが、この経路における中枢のIRS-2の果たす役割についての報告はなされていない。

2. 研究の目的

(1)インスリンやレプチンによるIRS-2を介した摂食調節メカニズムについて明らかにする。(2)中枢のIRS-2を介した肝臓の糖代謝調節メカニズムについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1)脳特異的IRS-2欠損マウス(NIRS-2欠損マウス)にpair-feedingを行い肥満の影響を除外した状態で、弓状核における摂食調節ペプチドの発現を検討する。また、視床下部由来の培養細胞株にsiRNAを用いてIRS-2をdownregulationさせ、摂食調節ペプチドの発現を検討する。さらにこの細胞で、インスリンやレプチン刺激によって摂食調節ペプチドの発現がどの程度調節されるのか、mRNAレベルで検討する。

(2)NIRS-2欠損マウスにpair-feedingを行い肥満の影響を除外した状態で、肝臓のインスリン抵抗性について検討する。具体的には、

グルコースを腹腔内投与し、このときの血中のインスリン値や、肝臓におけるIL-6の発現、Stat3のリン酸化、G6PaseやPEPCKといった肝臓の糖産生に関わる遺伝子の発現を検討する。さらに、このときの変化が中枢のインスリンシグナルを介したものであるのかを検討するために、脳室内にインスリンを投与し、その下流のシグナルに関してWestern Blotなどを用いて検討する。

4. 研究成果

(1)NIRS-2欠損マウスでは、摂食量の増加に伴い肥満を呈し、高レプチン血症を呈していた。レプチン感受性試験を行うと、NIRS-2欠損マウスでは、レプチンによる摂食抑制、体重減少の効果がコントロールマウスに比して減弱しており、レプチン抵抗性を認めた。そこで、肥満の影響を除外するためにpair-feedingを行いNIRS-2欠損マウスの体重をコントロールマウスと同等に維持し検討を行った。肥満のない状態においても、NIRS-2欠損マウスではレプチン抵抗性を認め、このマウスでは肥満とは独立にレプチン抵抗性を呈することを見出した。

肥満のないNIRS-2欠損マウスでも、食欲の亢進を認めたため、脳における摂食調節ペプチドの遺伝子発現を検討した。すると、NIRS-2欠損マウスの脳では、摂食亢進ペプチドであるAgRP、NPYの発現上昇と、摂食抑制ペプチドであるPOMCの発現低下を認めたことから、これが摂食亢進の原因の一部を説明し得るものと考えた。これらの摂食調節ペプチドの発現は、レプチンのみならず、インスリンによっても調節されることが知られているため、次に、弓状核でのレプチンシグナル、インスリンシグナルを検討した。レプチンもしくはインスリンを脳室内に投与すると、コントロールマウスでは弓状核でAktのリン酸化を認めたが、NIRS-2欠損マウスではどちらを投与した場合においてもコントロ

ールマウスに比してリン酸化が減弱しており、レプチンとインスリン両方のシグナルの障害が示唆された。そこで、インスリンとレプチンが IRS-2 を介してどの程度、摂食調節に寄与しているのかを明らかにする目的で、視床下部の培養細胞株 N38 を用い、摂食亢進ペプチドの 1 つである AgRP の発現を解析した。siRNA を用いて、N38 で IRS-2 を knockdown すると AgRP の発現が有意に上昇し、この培養細胞においても IRS-2 は AgRP の発現調節に関与していると考えられた。さらに、10nM のレプチンで 3 時間刺激を行ったところ AgRP の発現は有意に抑制されたが、20nM のインスリンによる 3 時間刺激では発現抑制傾向のみを認めた。一方で、IRS-2 を knockdown した細胞ではどちらの刺激でも発現抑制作用は認められなかった。これらのことから、レプチン、インスリンによる AgRP 発現調節は IRS-2 を介しており、インスリンよりもレプチンの方が、摂食抑制への寄与度が大きい可能性が示唆された。しかしながら、培養細胞系におけるインスリンやレプチンの刺激の濃度や時間については、レプチンとインスリン両方のシグナルの下流にある Akt のリン酸化を検討することにより、この条件が最適であるかどうか、さらなる検討が必要と考える。また、インスリンとレプチンの寄与の程度の違いだけでなく、作用するタイミングに関しても違いがあるのかどうか、明確にしていきたいと考えている。

(2)肥満のある NIRS-2 欠損マウスでは、肝臓と骨格筋の両方でインスリン抵抗性を認めしたが、pair-feeding にて肥満の影響を除外すると、肝臓での糖産生亢進のみを認め、このマウスでは肥満とは独立に肝臓のインスリン抵抗性を呈することを見出した。また、肥満のある NIRS-2 欠損マウスで認めた骨格筋のインスリン抵抗性は肥満に伴う二次的なものと考えられた。

これがどのような経路によって調節されているのかを明らかにするため、NIRS-2 欠損マウスにグルコースを腹腔内投与し、肝臓の糖産生について検討した。グルコース投与 3 時間後の血中のインスリン濃度は約 2 倍に上昇しており、このとき、コントロールマウスの肝臓では IL-6 の上昇と Stat3 のリン酸化を認め、G6Pase、PEPCK といった肝臓の糖産生に関わる遺伝子の発現は有意に抑制されていた。しかしながら、NIRS-2 欠損マウスでは、肝臓での IL-6 の上昇も Stat3 のリン酸化もコントロールマウスに比して減弱しており、さらに、これに一致して、G6Pase、PEPCK といった肝臓の糖産生に関わる遺伝子の発現抑制は認められなかった。

次に、これが中枢のインスリン作用によるものかどうか確認するために、脳室内にインスリンを投与したところ、NIRS-2 欠損マウスの弓状核において、IRS-2 とそのリン酸化は認められず、その下流分子として知られている Akt のリン酸化も減弱していた。さらにこのとき、肝臓では Stat3 のリン酸化がコントロールマウスに比べて減弱していた。以上より、中枢の IRS-2 が欠損すると、肝臓の IL-6 の上昇が減弱し、Stat3 のリン酸化が低下することにより、糖産生が亢進し、肝臓のインスリン抵抗性が惹起される可能性が示唆された。これらのことから、中枢の IRS-2 が肝臓の糖産生抑制に寄与していることを明らかに出来たと考えている。しかしながら、肝臓の糖産生抑制のメカニズムとしては、インスリンの肝臓への直接作用もよく知られており、この経路と中枢を介した間接作用との相違についても解明していきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Takamoto I, Kubota N, Nakaya K, Kumagai K, Hashimoto S, Kubota T, Inoue M, Kajiwara E, Katsuyama H, Obata A, Sakurai Y, Iwamoto M, Kitamura T, Ueki K, Kadowaki T; TCF7L2 in mouse pancreatic beta cells plays a crucial role in glucose homeostasis by regulating beta cell mass: Diabetologia: 査読有 57(3):2014, 542-553 (doi:10.1007/s00125-013-3131-6)

〔学会発表〕(計30件)

Mariko Inoue, Insulin and leptin in the CNS regulate food intake and glucose homeostasis, Keystone Symposia 2015.10.26 Westin Miyako Kyoto

井上真理子, チアゾリジン誘導体はアディポネクチン依存性・非依存性に動脈硬化を抑制する, 第58回日本糖尿病学会年次学術集会, 2015.5.23 山口県下関市シーモールパレス

井上真理子, 中枢の IRS-2 を介した糖代謝・摂食調節, 第29回日本糖尿病合併症学会, 2014.10.4 東京シェーンパッハ・サポー

Mariko Inoue, IRS-2 in the brain regulates hepatic glucose production and food intake, 第19回アディポサイエンス・シンポジウム, 2014.8.23 千里ライフサイエンスセンター

井上真理子, 中枢の IRS-2 を介した糖代謝・摂食調節, 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014.5.23 大阪国際会議場

〔図書〕(計4件)

井上真理子, 窪田哲也, 窪田直人: (株)先端医学社: Diabetes Strategy: チアゾリジン誘導体発見と開発の歴史: 2016: 34-40

井上真理子, 窪田哲也, 窪田直人, 門脇孝: (株)協和企画: Diabetes Journal 糖尿病と代謝: 経鼻インスリンによる認知症

の治療 43(1): 2015: 47-48

窪田直人, 井上真理子, 門脇 孝: ライフサイエンス社: Progress in Medicine: 【糖尿病と認知症-成因、病態、治療の update-】糖尿病による認知症発症のメカニズムと病態 メタボリックシンドロームと認知症: 2015: 1417-1420

井上真理子: 日本糖尿病協会: 月刊糖尿病ライフ「さかえ」: 【熱中症予防と紫外線対策】-暑い季節に備えよう-: 2014: 17-21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上真理子 (Mariko Inoue)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所

国立健康・栄養研究所・臨床栄養研究部 栄養療法研究室 室長

研究者番号: 80511477

(2) 研究協力者

窪田直人 (Naoto Kubota)

東京大学大学院医学系研究科・医学部 病態栄養治療部 部長/国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所・臨床栄養研究部 部長/理化学研究所 統合生命医科学研究センター代謝恒常性研究チーム チームリーダー

研究者番号: 50396719

(3) 研究協力者

窪田哲也 (Tetsuya Kubota)

理化学研究所 統合生命医科学研究センター代謝恒常性研究チーム 上級研究員/ 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所・臨床栄養研究部 メタボリックシンドローム研究室 室長

研究者番号: 60385698