

令和 4 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11738

研究課題名(和文) SIRT1による糖質嗜好性制御の脳内メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the brain mechanisms of sugar preference by SIRT1

研究代表者

松居 翔 (Matsui, Sho)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：80739673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスにFGF21を腹腔内注射すると、PVH Oxtニューロンの約13%にc-Fosが誘導された。従って、PVH Oxtニューロンは視床下部におけるFGF21の標的の一つであることが明らかになった。次に、Cre誘導型SIRT1(野生型またはH355Y変異体) AAVベクターをOxt-ires Creマウスに注入し、PVH OxtニューロンにおけるSIRT1の発現レベルを操作した。PVH OxtニューロンでSIRT1-WTを過剰発現させると、糖質嗜好性が有意に抑制された。従って、SIRT1はマウスのPVH Oxtニューロンを介して糖質嗜好性を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖質は食行動の引き金として強力に作用し、必要以上のエネルギー摂取をもたらすことで、肥満発症の要因になる。肥満症に用いられる治療薬は、中枢・末梢神経系や心臓に対する重篤な副作用が多く認められる。本研究の成果から、オキシトシンニューロンのタイプや投射先の脳領域を特定することができれば、糖質嗜好性が原因となる肥満症に対して、より特異性が高く副作用の少ない抗肥満薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Oxytocin (Oxt) neurons are mainly located in two places within the brain, the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH) and supraoptic nucleus of the hypothalamus (SON). Therefore, we asked which Oxt neurons are responsible for regulating simple sugar preference and the effect of SIRT1 on diet selection in mice.

Intraperitoneal injection of the recombinant murine FGF21 to mice induced c-Fos in approximately 13% of PVH Oxt, but no significant activation was detected in SON Oxt neurons. Therefore, PVH Oxt neurons are one of the target of FGF21 in the hypothalamus.

We next manipulated the SIRT1 expression levels in PVH vs. SON Oxt neurons by injecting Cre-inducible SIRT1 (WT or enzyme-dead H355Y mutant) AAV vector to Oxt-ires Cre mice. The overexpression of SIRT1-WT in PVH Oxt neurons significantly suppressed simple sugar preference, but no significant effect was observed in the SON-injected group. Therefore, SIRT1 suppresses simple sugar preference through PVH Oxt neurons in mice.

研究分野：分子栄養学

キーワード：Oxytocin FGF21 糖

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界保健機関が各種の疾病負荷の指標として採用する障害調整生命年によれば、2013年の危険因子トップ25のうち13項目が食や肥満に関連する項目である<sup>1</sup>。また、2015年の疫学調査によれば、世界の健康リスクトップ10のうち、肥満は4番目の危険因子にあげられる<sup>2</sup>。

肥満症治療に食事療法と運動療法は欠かせないが、患者のアドヒアランスが低いことが課題である。食餌療法を必要とする患者のアドヒアランスを下げる要因の一つが糖質である。糖質は、高嗜好性かつ行動強化力が高く、肥満症患者の多くの特徴であるエネルギーの過剰摂取や間食の習慣化などの食行動の乱れを引き起こす。そのため、糖質嗜好性制御の脳内メカニズムの解明は、肥満症の治療に大きく貢献することが期待される。

### 2. 研究の目的

Fibroblast growth factor (FGF) 21は、主に肝臓で合成され、その作用発現にはFGF21受容体(-Klotho/FGFR1複合体)が必要である<sup>3</sup>。FGF21は、視床下部室傍核に作用し糖質嗜好性を抑制することが報告されていたが、その作用を担うFGF21の標的ニューロンは未解明だった<sup>4</sup>。申請者は、糖質の摂取により肝臓から分泌されたFGF21が、視床下部にあるOxytocin (OXT)ニューロンに作用し、糖質に対する嗜好性や摂取を抑制する「ネガティブ・フィードバック機構」が存在することを明らかにした(FGF21-OXTシグナル)<sup>5</sup>。他方、FGF21-OXTシグナルの脳内メカニズムについては未解明である。そこで、FGF21の標的となるOXTニューロンの一部について、その部位と投射先の解析を行い、糖質嗜好性の調節を担うFGF21-OXTシグナルの脳内メカニズムの解明を試みる。

糖尿病や肥満症では、末梢組織でのFGF21受容体の発現低下によるFGF21作用不全が報告されている<sup>6</sup>。既報と申請者の知見から、中枢のFGF21作用不全は糖尿病や肥満症における食行動異常の一因であることが予想されが、中枢におけるFGF21抵抗性を検証した報告はない。そこで、糖尿病・肥満症におけるFGF21-OXTシグナルの変容についての検証を行い、糖尿病や肥満症における食行動異常は、FGF21-OXTシグナルの作用不全を伴うのかを明らかにする。そして、FGF21-OXTシグナルの作用不全が糖尿病や肥満症における食行動異常をもたらす原因となるかを、OXTニューロン特異的FGF21受容体欠損マウスを用いて検証する。さらに、糖尿病や肥満症における食行動異常への介入手段として、FGF21-OXTシグナルが分子標的となりうるかを検証するために、OXTニューロン特異的にFGF21受容体発現が増加するマウスの食行動を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖質嗜好性を担うOXTニューロンの局在

OXTニューロンは、視床下部室傍核(PVN)と視索上核(SON)に局在する。そこで、FGF21を腹腔内投与した後に、PVNとSONのどちらでOXTニューロンの活性化が認められるのかを、神経活性マーカーであるc-Fosの発現量で検証した。

#### (2) SIRT1による糖質嗜好性を制御するOXTニューロンの局在

OXTニューロンは、PVNとSONに存在する。そこで、Cre依存的にSIRT1(WT or 不活性型)の発現を増加できるアデノ随伴ウイルス(AAV)を用い、定位脳手術により、OXT-CreマウスのPVN or SON特異的にSIRT1(WT or 不活性型)AAVウイルスを感染させ、PVN or SON OXTニューロン特異的SIRT1(WT or 不活性型)過剰発現マウスを作製する。作製したマウスを用い、2ポトルテスト(水 vs. グルコース、フルクトース、スクロース、サッカリン)を行い、PVNとSONのどちらにSIRT1による糖質嗜好性抑制効果を担うOXTニューロンが局在するのかを検証した。

#### (3) 糖質嗜好性を制御するOXTニューロンの投射先

OXTニューロンは脳内の様々な部位に投射するが、糖質嗜好性を担う投射先は未解明である。そこで、Cre依存的にDREADD(hM4Di-mCherry)を発現する逆行性ウイルスベクターを用い、投射先ごとにOXT-CreマウスのOXTニューロンの活性抑制操作を行った。本研究では、まず、OXTニューロンの投射先として知られている腹側被蓋野(VTA)に逆行性のAAVを感染させた。そして、AAV感染から4週間後のマウスにDREADDのリガンドであるクロザピンを腹腔内投与し、処置後のマウスの糖質嗜好性を検証した。

#### (4) 糖尿病・肥満症におけるFGF21-Oxt系の重要性

既報より糖尿病・肥満病態では、血中FGF21量の増加が報告されている。他方、糖尿病・肥満病態における糖質誘導性の血中FGF21量に対する影響についてはよくわかっていない。そこで、野生型マウスに普通食(ND群)または高脂肪高シヨ糖食(HFHSD群)を、OXT神経特異的-Klotho欠損マウス(OXT-Klb cKO群)とKlb-floxマウス(Klb-flox群)に高脂肪高シヨ糖食を8週間にわたり自由に摂取させ、週に1回体重を測定した。食餌負荷開始から4週と8週の時点でグルコースを経口投与し、投与前および投与後の血中FGF21濃度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 糖質嗜好性を担う OXT ニューロンの局在 (図 1)

PVN の OXT ニューロン上では、FGF21 の投与によって、c-Fos の発現の増加が認められた。他方、SON の OXT ニューロン上では、c-Fos の発現の増加は認められなかった。このことから、視床下部 OXT ニューロンに対する FGF21 の作用は、PVN であることが予想された。

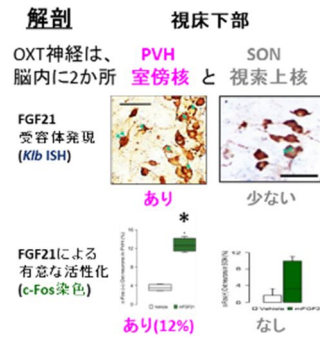


図1. FGF21の投与によりPVH OXTニューロンは活性化される

##### (2) SIRT1 による糖質嗜好性を制御する OXT ニューロンの局在 (図 2)

PVN OXT ニューロン特異的 SIRT1 過剰発現マウスは、単純糖質であるグルコース、フルクトース、スクロースに対する嗜好性が抑制され、人口甘味料であるサッカリンに対する嗜好性は変化は認められなかった。他方、SON OXT ニューロン特異的 SIRT1 過剰発現マウスでは、単純糖質、サッカリンの両方の嗜好性に変化が認められなかった。このことから、糖質嗜好性制御に重要な OXT ニューロンは、PVN に存在することが明らかになった。

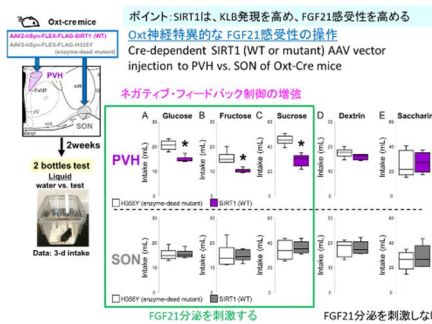


図2. FGF21による単純糖質嗜好性制御に重要なOXTニューロンはPVNに存在する

##### (3) 糖質嗜好性を制御する OXT ニューロンの投射先 (図 3)

脳内 VTA に hM4Di (活性抑制) を発現する逆行性ウイルスを感染させた Oxt-Cre マウスにクロザピンを投与すると、Vehicle を投与した群と比較して、スクロース溶液に対する嗜好性の有意な増加が認められた。このことから、糖質嗜好性を制御する OXT ニューロンは、VTA に投射することが明らかになった。今後は、OXT ニューロンの投射先として知られている側坐核、海馬などについても検証を行っていく。また、糖質嗜好性が増加するマウスの OXT (+); hM4Di (+) ニューロンは、FGF21 を腹腔内投与した後にみられる OXT (+); c-Fos (+) ニューロンと重なるのかについても検証する予定である [Oxt (+); hM4Di (+); c-Fos (+) ニューロン]。

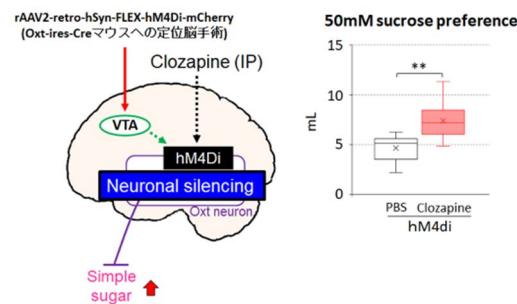


図3. VTAに投射しているPVN Oxtニューロンは単純糖質嗜好性を制御している

##### (4) 糖尿病・肥満症における FGF21-Oxt 系の重要性

HFHSD 群は ND 群と比較して体重が有意に増加した (図 4. A)。ND 群で認められた糖反応性の血中 FGF21 濃度の増加は、HFHSD 群では認められなかった (図 4. B)。OXT-Klb cKO 群は、Klb-flox 群と比較して高脂肪高シヨ糖食負荷開始後 4 週の時点で体重の有意な増加が認められたが、8 週の時点で体重差は消失した (図 5. A)。OXT-Klb cKO 群および Klb-flox 群では、

糖反応性の血中 FGF21 の分泌が認められなかった (図 5. B)。これらのことから、糖質誘導性の FGF21 の発現・分泌の増加は、糖尿病・肥満病態で抑制されることが明らかになった。また、FGF21-OXT 系の破綻は肥満を助長することも明らかになった。

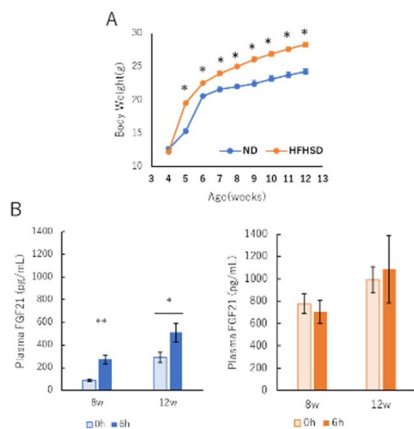


図5. (A) HFHSD摂食により肥満が誘導される  
(B) HFHSD摂取により糖応答性のFGF21の分泌が消失する

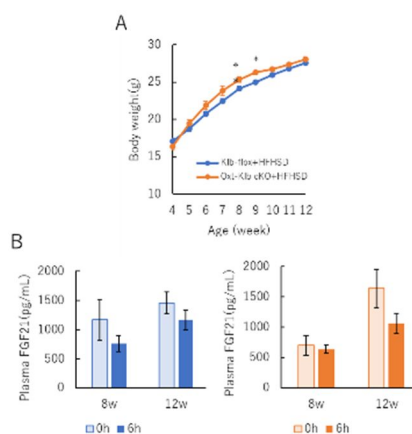


図6. (A) OXTニューロンにおけるKlbの欠損は肥満を助長する  
(B) HFHSD摂取 (Klb-floxとOxt-Klb cKO) により糖応答性のFGF21の分泌が消失する

### <引用文献>

1. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;386(10010):2287-2323. doi:10.1016/S0140-6736(15)00128-2
2. GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1659-1724. doi:10.1016/S0140-6736(16)31679-8
3. Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. A Dozen Years of Discovery: Insights into the Physiology and Pharmacology of FGF21. *Cell Metab*. 2019;29(2):246-253. doi:10.1016/j.cmet.2019.01.004
4. von Holstein-Rathlou S, BonDurant LD, Peltekian L, et al. FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metab*. 2016;23(2):335-343. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.003
5. Matsui S, Sasaki T, Kohno D, et al. Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice. *Nat Commun*. 2018;9(1):4604. doi:10.1038/s41467-018-07033-z
6. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes*. 2010;59(11):2781-2789. doi:10.2337/db10-0193

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松居 翔	4. 巻 26巻
2. 論文標題 うま味と味覚嗜好性 SIRT1による糖質嗜好性制御メカニズムの解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本味と匂学会誌	6. 最初と最後の頁 89-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 松居 翔
2. 発表標題 単純糖質に対する嗜好性制御機構
3. 学会等名 蛋白研セミナー：食行動の脳内基盤と分子機構（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsui S, Sasaki T, Kohno D, Yokota-Hashimoto H, Kobayashi M, Kitamura T.
2. 発表標題 Oxytocin neuron in the paraventricular nucleus of the hypothalamus regulates FGF21- and SIRT1-based simple sugar preference in mice.
3. 学会等名 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Functional Neurocircuitry of Feeding and Feeding Disorders) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sasaki T, Matsui S, Kohno D, Kitamura T.
2. 発表標題 Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice.
3. 学会等名 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology (Functional Neurocircuitry of Feeding and Feeding Disorders) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松居 翔
2. 発表標題 Elucidation of the regulatory mechanisms of carbohydrate preference by SIRT1
3. 学会等名 アディポサイエンス・シンポジウム - 日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松居 翔
2. 発表標題 Elucidation of the regulatory mechanisms of sugar preference by SIRT1
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松居 翔
2. 発表標題 Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice
3. 学会等名 日本生理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松居 翔、井上 可南子、岡 和來、岩間 大貴、Oulan Efendi、小栗 靖生、都築 巧、佐々木 努
2. 発表標題 糖質欲求を制御する生体シグナルの解明
3. 学会等名 日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松居 翔、佐々木 努	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 368
3. 書名 循環器内科	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------