

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：24302

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20745

研究課題名（和文）視床下部バソプレシン神経を介した腸GLP-1による食後熱産生経路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Diet-induced Thermogenesis Pathways Mediated by Intestinal GLP-1 via Hypothalamic Vasopressin Neurons.

研究代表者

増田 雄太（Masuda, Yuta）

京都府立大学・生命環境科学研究科・特任助教

研究者番号：10965750

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：食後の体熱産生（食事誘発性熱産生）は健康維持において重要な役割を担うと考えられているが、この作用の中枢機序は不明な点が多い。本研究では、腸から分泌される食後ホルモン glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が脳視床下部の一部のバソプレシン神経を介して、食事誘発性熱産生を誘導していることを化学遺伝学的手法で明らかにした。本研究は食事誘発性熱産生のメカニズムの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食後の体熱産生は、過剰なエネルギーの放出や体温維持などの観点で健康維持に重要な生理応答と考えられている。本研究は、食後に分泌されるGLP-1が体熱産生を誘導することを見出し、この作用を調節する視床下部神経を同定した。食事誘発性熱産生のメカニズムの解明は、食事と代謝によるエネルギー収支の恒常性を生理学的に理解するために重要であり、代謝疾患の新規治療法開発にも役立つ基盤研究となる。

研究成果の概要（英文）：Postprandial thermogenesis, or diet-induced thermogenesis, is important for maintaining health, but the exact brain mechanisms were not known. Using a Chemogenetic approach, our research showed that the postprandial hormone GLP-1, which is released from the intestine, triggers diet-induced thermogenesis through vasopressin neurons in the hypothalamus. This study explains a part of how the brain controls heat production after eating.

研究分野：生理学

キーワード：GLP-1 体温調節 バソプレシン神経 Fiber Photometry 化学遺伝学

1. 研究開始当初の背景

恒温動物において、体温の恒常性は生命活動に必須である。食事は熱産生に必要なエネルギーを供給するための唯一の手段である。さらに、食事は食事誘発性熱産生 (Diet induced thermogenesis; DIT) を駆動させる。これは安静状態においても代謝量を一時的に増大させて、その結果、深部体温を上昇させる。DIT は、栄養素の消化・吸収・代謝による熱産生：特異的的作用と、味覚・嗅覚・辛味刺激などの非栄養素による熱産生に大別される。非栄養素による熱産生は神経系を介した作用が報告されており、他方、体温中枢は視床下部である。しかし、DIT における中枢神経機構の多くが不明である (LeBlanc and Brondel 1985; Westerterp 2004)。

研究代表者が所属する研究室では、非代謝性の希少糖 D-Allulose (Allu) が消化管ホルモンの glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) のみを選択的に分泌促進することを、マウスを用いた実験にて明らかにした (Iwasaki et al. 2018)。GLP-1 の薬理量の静脈内投与は麻酔下ラットの深部体温を上昇させる (Osaka et al. 2005)。しかし、この作用機序の解明には至っていなかった。GLP-1 は体内で不安定なペプチドであるため、過去の多くの論文は薬理量の GLP-1 を投与することで効果を検証している。一方、内因性 GLP-1 の効果を検証するために、GLP-1 分泌を促進させることで有名な栄養素を用いると、栄養素による効果であるのか GLP-1 の効果であるのか区別して評価することが難しかった。このような背景の中、非代謝性の GLP-1 分泌促進因子 Allu の発見により、内因性 GLP-1 による体熱産生作用のメカニズムの検討が可能となった。

研究代表者らは、Allu による腸 GLP-1 分泌促進が体熱産生を誘導することを予備的に見出している (未発表)。さらに、Allu/GLP-1 放出は視床下部の AVP 神経が局在する複数の神経核を活性化することを、神経活性化マーカー c-Fos を指標とした組織学的解析にて予備的に見出している (未発表)。他方、視床下部 AVP 神経を介した体熱産生作用については今までに報告がない。以上を背景に、Allu/GLP-1 放出による体熱産生作用とその中枢機序を明らかにすることは、食事誘発性熱産生の原理を明らかにするだけでなく、新しい体温調節機構をも明らかにできる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、腸 GLP-1 の体熱産生作用における視床下部 AVP 神経の関与を検証し、食事誘発性熱産生の駆動原理を生理学・神経科学的に理解することを目的とした。本研究では、(1) GLP-1 の選択的リリーサーである希少糖 Allu の経口投与による視床下部 AVP 神経の活動動態を明らかにする。(2) 視床下部 AVP 神経が局在する領域毎に化学遺伝学手法を用いて人為的に神経活動を抑制した際に GLP-1 の体熱産生作用を測定し、<GLP-1 体熱産生作用>における視床下部責任神経の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 動物

雄性の AVP-Cre マウス (金沢大学三枝教授より分与) を実験に用いた。動物は 12 時間の明暗サイクル (明期 7:30~19:30) 条件下で、室温 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$)、相対湿度 ($55 \pm 10\%$) に管理された飼養保管施設で飼育した。通常飼料 (CE-2、3.4 kcal/g、日本クレア) と水は自由摂取とした。

(2) 脳内へのウイルスマイクロインジェクション法

麻酔下マウスを脳定位固定装置 (SR-5M-HT, ナリシゲ) に固定し、AAV ベクター (AAV9-Flex-GCaMP6s; AAV2-Syn-DIO-hM4Di-mCherry; いずれも Addgene より購入) を AVP-Cre マウスの目的領域へマイクロインジェクションした。挿入用のガラスキャピラリー (G-1, ナリシゲ) を用いて、必要量の AAV 溶液を投与した。Fiber Photometry 実験においては AAV 投与直後に光ファイバーを留置し、歯科用セメントで頭部に固定した。AAV 感染のために 3 週間回復期間を設けて実験に供した。

(3) Fiber Photometry

Fiber Photometry における励起光には 473 nm の青色レーザー (473FN100, Dragon Lasers) を用いた。励起光はパッチコードを介して対象のマウスに埋め込んだフェルルから脳内へ照射された。蛍光は 430-490 nm のフィルタを内蔵した蛍光測定用キューブ (FMC3_E 460-490)_F (500-550)_S, Doric) を介してアナログ信号を取得し Power Lab (4/26, AD instrument) を用いてデジタル記録した。

Photometry のシグナルはダウンサンプリング処理をした。また、蛍光量の変化率を下記の式で求め、 $\Delta F/F$, % で示した。

$$\Delta F/F = (F_t - F_0) / F_0 \times 100$$

F_t , ある時間 t における蛍光量 F (V)

F0, ベースラインの蛍光量 F の平均値 (V)

(4) 深部体温測定

明期に 5 時間絶食したマウスに Allu (3 g/kg) または Saline を 10 ml/kg 経口投与し、その後 1, 2, 3 時間後の直腸温を測定した。また、経口投与 1 時間前に hM4Di の人工リガンドである Clozapine N-oxide (CNO, 3 mg/kg) を腹腔内投与した。

4. 研究成果

(1) 腸 GLP-1 分泌促進が視床下部 AVP 神経の神経活動に与える影響

Allu による腸 GLP-1 分泌促進が、どのタイミングで視床下部 AVP 神経活動に影響を与えるのかを検討した。マウスの視床下部 AVP 神経を覚醒下かつリアルタイムで長時間記録するために、Fiber Photometry 法を用いた。Allu 経口投与による腸 GLP-1 分泌は、視床下部 X 領域の AVP 神経の細胞内 Ca^{2+} 濃度を投与直後から上昇させた。この神経活性化のピークは投与後約 10 分で、そして、投与後 60 から 90 分までこの神経活性化は有意に高値であった。Allu/GLP-1 放出による視床下部 X 領域 AVP 神経の活性化は、GLP-1 受容体阻害剤の腹腔内投与でほぼ完全に抑制された。他方、Allu 経口投与後の血中 GLP-1 濃度の上昇は、投与後 60-120 分程度でピークに達した。これら結果を比較すると、Allu による視床下部 X 領域 AVP 神経の活性化の経時的変化パターンは、血中 GLP-1 濃度上昇の経時的な変化と相関せず、血中 GLP-1 が AVP 神経の活動に影響を与えている可能性は否定的に考えられた。研究代表者らは、内因性 GLP-1 の脳作用として、求心性迷走神経が重要な役割を果たしていることを見出してきた。従って、Allu/GLP-1 放出による視床下部 X 領域 AVP 神経の活性化は、GLP-1 受容体求心性迷走神経が関与することが示唆された。

(2) 腸 GLP-1 の体熱産生作用における視床下部 AVP 神経の役割

Allu 経口投与による腸 GLP-1 放出が求心性迷走神経を介した脳作用にて体熱産生を誘導することを研究代表者らは見出していたが、その中枢機構の多くは不明であった。研究代表者らは、Allu が視床下部内の複数の AVP 神経核を同時に活性化することを予備的に見出している。しかし、どの AVP 神経核が体熱産生に関与しているかは不明であった。そこで本研究では、AAV の局所投与による投与部位特異的な遺伝子発現誘導技術と化学遺伝学手法を融合させて、標的とする 1 つの神経核の AVP 神経のみに抑制型 DREADD 受容体を発現させ、その AVP 神経のみ人工的に活動制御することを試みた。この手法を用いて Allu の体熱産生作用を検証し、作用が消失する AVP 神経核を探索した。その結果、視床下部 X 領域における AVP 神経を特異的に抑制した場合のみ、Allu 経口投与後の体温上昇が抑制された。したがって、Allu による腸 GLP-1 放出は視床下部の X 領域における AVP 神経を介して体熱産生作用を発揮することが明らかとなった。

本研究は、腸 GLP-1 分泌による体熱産生作用において、その視床下部メカニズムの一端を解明した。今後は求心性迷走神経から視床下部 X 領域までの求心路および、視床下部 X 領域から体熱産生効果器に至るまでの遠心路の神経回路を明らかにすることで、GLP-1 による食事誘発性熱産生の詳細なメカニズムが明らかとなる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 増田雄太
2 . 発表標題 Measurement of hypothalamic neuron activity triggered by the rare sugar D-allulose using fiber photometry technique.
3 . 学会等名 第101回日本生理学会大会
4 . 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------