

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09380

研究課題名(和文) 視床下部オレキシンによる代謝恒常性の「動的」制御が肥満を防止する機序の解明

研究課題名(英文) Significance of homeodynamic regulation by hypothalamic orexin in preventing obesity and type 2 diabetes

研究代表者

恒枝 宏史 (TSUNEKI, Hiroshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：20332661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肥満防止に重要な中枢性エネルギー代謝の調節機序を解明するため、睡眠・覚醒や自律神経バランスの日内変動を調節する視床下部オレキシン系の意義を検証した。肥満マウスにおいて日周性のオレキシン作用を増幅すると代謝異常が改善し、オレキシン作用を欠損させると代謝異常が増悪することを見出した。また、オレキシンは女性の性周期制御因子エストロゲンとの連係作用により肥満による代謝異常を防止した。したがって、オレキシン系によるエネルギー恒常性の「動的」制御は、肥満に伴う糖尿病や代謝異常を防御する鍵因子であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Brain plays a major role in maintenance of energy homeostasis by coordinating daily rhythms in biological clock, sleep/wake, and metabolism. To reveal the mechanism, the present study investigated the functional significance of hypothalamic orexin system. In obese mice, amplification of the daily action of orexin by using orexin agonist in awake period or orexin antagonist in resting period improved glucose metabolism, whereas orexin deficiency caused severe obesity and metabolic abnormalities in the adipose tissue and the liver. Furthermore, orexin and estrogen synergistically prevented obesity-associated metabolic disorders. Thus, homeodynamic regulation of glucose and energy metabolism by hypothalamic orexin system appears to be a key factor for preventing metabolic disorders, including obesity and type 2 diabetes.

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病 エネルギー・糖質代謝異常 生物時計 インスリン抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は2型糖尿病や非アルコール性脂肪性肝疾患 / 肝炎(NAFLD/NASH)などの代謝疾患を誘発する。これらの代謝疾患の患者数は世界的規模で増加しているが、有効な治療法は存在せず、新しい治療概念の創出が求められている。近年、代謝機能の最適化には、脳を含めた全身の臓器間ネットワークが介在しており、その基盤として生体リズムに即したエネルギー代謝の「動的」恒常性の維持の重要性が指摘されている。特に、脳(視床下部) - 自律神経系は睡眠・覚醒リズムや摂食リズムを基に末梢組織の代謝機能を日周性に調節し、栄養状態の変化に対し事前に適応させ、エネルギー恒常性の維持に寄与する機構として重要である。

視床下部ペプチドのオレキシンは脳内で日周性に増減を繰り返すことで、睡眠・覚醒リズムだけでなくエネルギー代謝や自律神経系の調節に寄与する。そのため、オレキシンは睡眠・覚醒リズムと糖・脂質・エネルギー代謝機能を同調させ、肥満や2型糖尿病の発症を防止する役割を果たしている可能性が高い。しかし、肥満病態におけるオレキシン作用の意義は不明であった。

## 2. 研究の目的

現代社会では、24時間社会化の拡大により生活リズムが攪乱される頻度が高く、エネルギー代謝の動的制御が障害され、肥満や2型糖尿病の発症要因となっている。したがって、自律神経系、ホルモン系および免疫系の体内リズムを同調させ、代謝異常を防止する時間治療の創出が必要である。そこで本研究では、日周性の視床下部オレキシン作用に着目し、オレキシンによる動的な中枢性制御が全身の臓器連関を改善することでエネルギー代謝機能を亢進し、肥満に伴う代謝異常を防止する可能性を追究した。

## 3. 研究の方法

本研究では、視床下部オレキシン系による動的な糖・エネルギー代謝調節が代謝異常の防止に寄与するかを明らかにするため、生体リズムとして重要な睡眠・覚醒や性周期と、代謝調節系との関係に焦点を当て、オレキシンの機能的役割の解明を目指した。そこで、高脂肪食負荷したオレキシン欠損マウスまたはオレキシン発現の低下が報告されている2型糖尿病 db/db マウスを用い、以下の検討を実施した。まず、オレキシン系の抑制による睡眠・覚醒の変化が代謝機能に及ぼす影響を明らかにするため、オレキシン受容体拮抗薬スボレキサントを投与し、睡眠・覚醒状態、耐糖能、インスリン感受性、肝糖産生活性、ホルモン濃度の変化をそれぞれ脳波筋電図解析、糖・インスリン負荷試験、および生

化学的解析法(RT-PCR法、ELISA法など)で解析した。また、オレキシン系の活性化が代謝機能に及ぼす影響を明らかにするため、オレキシン系活性化作用を有するニコチンをマウスに投与し、同様の手法で解析した。さらに、雌性における性周期の制御因子であるエストロゲンによる代謝調節にオレキシンが関与する可能性を検証するため、野生型およびオレキシン欠損マウスに対して卵巣摘出または偽手術を行い、性周期の破綻に伴う肥満、代謝機能変化、および脂肪組織や肝臓での慢性炎症を指標に内因性のオレキシンとエストロゲンの連係機序を解析した。またエストロゲン( $\beta$ -エストラジオール)を脳室内または腹腔内に投与し、上記と同様の手法でエストロゲン補充効果におけるオレキシンの関与を解析した。

## 4. 研究成果

睡眠・覚醒リズムを変化させる処置が糖脂質代謝に及ぼす影響とその機構におけるオレキシンの関与を検証した。まず、2型糖尿病 db/db マウスおよび対照(非糖尿病) db/m+ マウスの睡眠・覚醒状態を脳波測定により比較した。その結果、db/db マウスにおいて休息期(明期)の覚醒時間の増加に伴う睡眠障害を認めた。不眠症治療薬であるオレキシン受容体拮抗薬スボレキサントを休息期の開始時に投与すると db/db マウスの睡眠障害が改善し、さらに長期間投与すると耐糖能が改善した。その改善機序を検討した結果、インスリンなどの血清ホルモン濃度は変化しなかったが、休息期中期における肝臓の時計制御遺伝子 DBP や肝糖産生促進因子 PEPCK の低下を認めた。一方、スボレキサントを覚醒期の開始時に投与すると db/db マウスの耐糖能障害は改善しなかった。したがって、スボレキサントによる代謝改善効果は投与時刻依存的事であることが示された。

次に、2型糖尿病 db/db マウスおよび食餌性肥満マウスに対し、視床下部オレキシン系を賦活化するニコチンを(腹腔内注射または自由飲水負荷により)覚醒期に投与した結果、休息期の血糖値が低下した。その機序は、血清ホルモン濃度非依存かつ迷走神経活性依存的な肝臓の STAT3 経路を介する糖産生の抑制であった。脂質代謝には変化を認めなかった。一方、ニコチンを休息期に投与すると、db/db マウスの耐糖能障害は改善しなかった。したがって、ニコチンによる代謝改善効果も投与時刻依存的事であることが示された。高脂肪食負荷したオレキシン欠損マウスでは覚醒期のニコチン投与による血糖降下作用は消失した。また、明暗サイクルを恒明状態に変更し睡眠・覚醒リズムを攪乱させると、正常マウスの休息期の血糖値が上昇した。これらの結果より、視床下部オレキシン系を休息期に抑制する、または覚醒期に活性化させると、オレキシンによる睡眠・覚醒リズム調節

が強化され、肝糖産生の日周性調節が改善することを見出した。本機構は休息期の高血糖を防止するため、2型糖尿病の発症・進展の防御に重要と考えられる。

褐色脂肪組織(BAT)は熱産生機構の主要臓器である。そこでBATの生体リズムや熱産生調節機能に対するオレキシンの影響を明らかにするため、オレキシン欠損マウスのBATにおける遺伝子発現様式を野生型マウスと比較した。その結果、休息期においてオレキシン欠損に伴う時計遺伝子 *Period 2* および *Rev-erb* mRNA 発現量の異常を認めた。しかし、熱産生促進因子 *Ucp1* mRNA は低下せず、むしろ覚醒期に増加傾向を示した。このように室温条件下では、オレキシンのエネルギー代謝促進作用におけるBAT熱産生の寄与は軽度であった。

エストロゲンは中枢性および末梢性の両機構を介してエネルギー代謝を促進し、その枯渇は閉経後肥満の主要原因となる。そこで、エストロゲンとオレキシンが連係する可能性を検証した。まず、エストロゲンとオレキシンの両作用の消失の影響を検証するため、雌性の野生型マウスおよびオレキシン欠損マウスの卵巣を摘出し、高脂肪食を負荷した。その結果、いずれのマウスも卵巣摘出により早期に肥満を呈した。長期間の高脂肪食負荷後では体重差はなかったが、野生型マウスでは卵巣摘出に伴う耐糖能の悪化を認めた。これに対し、オレキシン欠損マウスでは卵巣摘出の有無にかかわらず、内因性エストロゲンが枯渇した卵巣摘出-野生型マウスと同程度の耐糖能異常を呈した。したがって、内因性エストロゲンがオレキシン系を介して耐糖能を保持すると想定された。そこで、体重やエネルギー消費量に影響しない低用量のエストロゲンを脳室内に投与すると、卵巣摘出-野生型マウスでは耐糖能が改善したが、卵巣摘出-オレキシン欠損マウスでは改善効果は認められなかった。したがって、エストロゲンは脳のオレキシン作用依存的に糖代謝を改善することが示された。

さらに長期間の高脂肪食負荷後において白色脂肪組織における慢性炎症関連遺伝子の発現量を解析したところ、卵巣摘出-野生型マウスでは軽度な異常であったが、オレキシン欠損マウス(偽手術群)では著明な発現増加が認められ、卵巣切除によりエストロゲンを枯渇させるとさらに重度な発現上昇を認めた。肝臓においては、高脂肪食負荷による中性脂肪蓄積は卵巣摘出の影響を受けなかったが、オレキシン欠損により過度の脂肪蓄積が認められた。また、オレキシン欠損マウスの肝臓ではNAFLD/NASH病態様の肝線維化が生じた。卵巣摘出-オレキシン欠損マウスでは肝線維化はさらに顕在化した。このように、オレキシンとエストロゲンは協調的に作用し、肥満に伴う慢性炎症や代謝疾患の発症を防止することが示された。

そこで、雌性に比べて内因性エストロゲン

濃度が低い雄性でのオレキシン欠損の影響を解析した。高脂肪食を負荷すると、野生型マウスに比べ、オレキシン欠損マウスは著明な体重増加や耐糖能異常を呈し、脂肪組織や肝臓における慢性炎症関連遺伝子の発現が増加した。長期間の高脂肪食負荷時では、雌性オレキシン欠損マウスよりも早期に肝線維化の進展が認められた。

以上の結果より、肥満に伴う代謝異常を防御する機構においてはオレキシン系が中心的な役割を果たし、雌性ではエストロゲンがその機能を補強することが示された。また、日周性のオレキシン作用を増幅させる薬物処置は、高度肥満病態(インスリン抵抗性病態)においても肝糖産生制御の向上により代謝機能を改善することを見出し、インスリン抵抗性病態の時間治療の可能性を示した。このように、視床下部オレキシン系を標的とした生体リズムの改善は、全身の臓器連関を介したエネルギー恒常性の「動的」制御を促進し、肥満に伴う糖尿病などの代謝疾患の発症や進展を防御する新規治療法の基盤となると考えられる。

## 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 5 件)

- (1) Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Chronopathophysiological implications of orexin in sleep disturbances and lifestyle-related disorders. *Pharmacol Ther*. 2018;186:25-44. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.12.010. 査読有 .
- (2) Tsuneki H, Sasaoka T, Sakurai T. Sleep control, GPCRs, and glucose metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2016; 27: 633-42. doi: 10.1016/j.tem.2016.06.011. 査読有 .
- (3) Tsuneki H, Kon K, Ito H, Yamazaki M, Takahara S, Toyooka N, Ishii Y, Sasahara M, Wada T, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Timed inhibition of orexin system by suvorexant improved sleep and glucose metabolism in type 2 diabetic db/db mice. *Endocrinology*. 2016; 157: 4146-57. doi: 10.1210/en.2016-1404. 査読有 .
- (4) Tsuneki H, Nagata T, Fujita M, Kon K, Wu N, Takatsuki M, Yamaguchi K, Wada T, Nishijo H, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Nighttime administration of nicotine improves hepatic glucose metabolism via the hypothalamic orexin system in mice. *Endocrinology*. 2016; 157: 195-206. doi: 10.1210/en.2015-1488. 査読有 .
- (5) Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Orexin regulates glucose homeodynamics with daily

rhythm. *Orexin and Sleep*. Springer International Publishing Switzerland. 2015; p. 381-94. 査読有.

〔学会発表〕(計 24 件)

(1) 恒枝宏史, 今 寛太, 和田 努, 笹岡利安. 睡眠と糖代謝の連係調節における視床下部オレキシンの役割. 日本薬学会第 138 年会シンポジウム; 2018 Mar 25-28; 石川.

(2) 今 寛太, 恒枝宏史, 高田慎治郎, 越田千晶, 大西兼悟, 小野木康弘, 石川明香里, 渡邊愛理, 王生美沙, 長谷川 颯, 松澤崇俊, 和田 努, 笹岡利安. エストロゲンによる糖・エネルギー代謝調節における視床下部オレキシン系の役割. 第 29 回分子糖尿病学シンポジウム; 2017 Dec 2; 大阪.

(3) 大西兼悟, 恒枝宏史, 松岡幸奈, 松田大樹, 和田 努, 笹岡利安. 嗅覚の刺激および破壊がマウスの糖代謝に及ぼす影響の解析. 日本薬学会北陸支部第 129 回例会; 2017 Nov 26; 金沢.

(4) Kon K, Tsuneki H, Takata S, Koshida C, Wada T, Sasaoka T. Hypothalamic orexin and estrogen synergistically improved glucose metabolism in diet-induced obese mice. The 16th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar; 2017 Oct 19-21, Ulsan, Korea.

(5) 笹岡利安. オレキシンによる睡眠・覚醒と糖代謝調節. 第 39 回日本臨床栄養学会総会 第 38 回日本臨床栄養協会総会 第 15 回大連合大会; 2017 Oct 14; 千葉.

(6) 笹岡利安. 糖尿病における不眠の病態と対策. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2017 May 18-20; 名古屋.

(7) 恒枝宏史, 大西兼悟, 松岡幸奈, 和田 努, 笹岡利安. 嗅覚系を起点とした視床下部オレキシン系を介する中枢性糖代謝調節機構の解析. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2017 May 18-20; 名古屋.

(8) 今 寛太, 恒枝宏史, 越田千晶, 東海絵美, 和田 努, 笹岡利安. 肥満マウスにおいて視床下部オレキシン系は白色脂肪組織の慢性炎症を防止する. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2017 May 18-20; 名古屋.

(9) Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Timed administration of orexin receptor modulators improved glucose metabolism in type 2 diabetic mice. 13th International Symposium on Insulin Receptor and Insulin Action; 2017 Apr 20-22; Nice, France.

(10) 越田千晶, 恒枝宏史, 浅岡健広, 和田 努, 笹岡利安. 雌性オレキシン欠損マウスが高度肥満および脂肪組織の慢性炎症を呈する機序の解析. 日本薬学会北陸支部第 128 回例

会; 2016 Nov 27; 金沢.

(11) Kon K, Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Dual orexin receptor antagonist ameliorates impaired sleep/wake cycle and glucose metabolism in diabetic db/db mice in a treatment-time dependent manner. The 15th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar; 2016 Oct 27-29; Asahikawa.

(12) Tsuneki H, Kon K, Wada T, Sasaoka T. The ameliorating effect of suvorexant, a dual orexin receptor antagonist, on glucose metabolism in type 2 diabetic db/db mice. 52nd EASD Annual Meeting; 2016 Sep 12-16; Munich, Germany.

(13) 恒枝宏史, 今 寛太, 和田 努, 笹岡利安. オレキシン受容体拮抗薬による 2 型糖尿病マウスの睡眠と肝糖代謝の改善効果. 第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会; 2016 Jul 16; 金沢.

(14) 笹岡利安, 恒枝宏史. 概日リズムに基づいたオレキシン系の活性化による糖代謝異常治療戦略. 日本睡眠学会第 41 回定期学術集会; 2016 Jul 7-8; 東京.

(15) 恒枝宏史, 東海絵美, 高月真由美, 大西兼悟, 今 寛太, 和田 努, 笹岡利安. 中枢性糖代謝調節機構におけるドパミン D2 受容体系の機能的意義の解析. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2016 May 19-21; 京都.

(16) 今 寛太, 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安. 不眠症治療薬スボレキサントによる視床下部オレキシン系を介した糖代謝改善効果. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2016 May 19-21; 京都.

(17) 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンによる睡眠と糖代謝の連係調節の意義. 日本薬学会第 136 年会; 2016 Mar 26-29; 横浜.

(18) 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンの「動的」血糖制御を標的とした糖尿病治療の新戦略. 第 89 回日本薬理学会年会シンポジウム; 2016 Mar 9-11; 横浜.

(19) 笹岡利安, 和田 努, 恒枝宏史. 視床下部オレキシンによる自律神経系と小胞体ストレス応答を介したマウス肝糖産生の調節機構. 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会, 合同大会; 2015 Dec 1-4; 神戸.

(20) 今 寛太, 恒枝宏史, 東海絵美, 永田貴嗣, 和田 努, 笹岡利安. オレキシン系を標的とした生体リズム制御による 2 型糖尿病マウスの糖代謝改善効果. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会; 2015 Nov 15; 富山.

(21) Tsuneki H, Nagata T, Kon K, Wada T,

Sasaoka T. Hypothalamic orexin as a chronotherapeutic target for type 2 diabetes. American Diabetes Association (ADA) 75th Scientific Sessions; 2015 Jun 5-9; Boston, U.S.A.

(22) 恒枝宏史, 永田貴嗣, 藤田樹生, 和田 努, 笹岡利安. ニコチン作用から見た視床下部オレキシン系の日内リズム調節が高血糖に及ぼすインパクト. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2015 May 21-24; 下関.

(23) 今 寛太, 恒枝宏史, 和田 努, 笹岡利安. 新規不眠症治療薬スボレキサントの時間治療による 2 型糖尿病マウスの糖代謝改善効果. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2015 May 21-24; 下関.

(24) 東海絵美, 恒枝宏史, 浅岡健広, 今 寛太, 高橋佳佑, 越田千晶, 布目幸久, 和田 努, 笹岡利安. 視床下部オレキシンによる加齢および肥満病態での脂肪組織機能の防御効果の解析. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会; 2015 May 21-24; 下関.

〔図書〕(計 5 件)

(1) 笹岡利安, 恒枝宏史. オレキシン受容体拮抗薬が糖代謝に及ぼす影響. 特集: 糖尿病と睡眠障害. 睡眠医療. ライフ・サイエンス社; 2018; 12: 65-72.

(2) 笹岡利安, 恒枝宏史. オレキシンによる睡眠の制御と代謝機能. 睡眠・覚醒制御機構研究の新展開. 医学のあゆみ. 医歯薬出版株式会社; 2017; 263: 783-9.

(3) 笹岡利安, 恒枝宏史. 診断と治療の ABC 124. 糖尿病合併症. 糖尿病と睡眠障害 (うつ病を含む). 最新医学社; 2017; 181-9.

(4) 笹岡利安, 恒枝宏史. オレキシンと糖代謝. 睡眠医療. ライフ・サイエンス社; 2017; 11: 35-42.

(5) 笹岡利安, 恒枝宏史. 自律神経系の概日リズムとオレキシン. Annual Review 2016 糖尿病・代謝・内分泌. 中外医学社; 2016; 87-93.

〔その他〕

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・病態制御薬理学研究室ホームページ:  
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

恒枝 宏史 (TSUNEKI Hiroshi)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・  
准教授  
研究者番号: 20332661

### (2) 研究分担者

笹岡 利安 (SASAOKA Toshiyasu)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・  
教授  
研究者番号: 00272906