

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15599

研究課題名(和文) エストロゲンとオレキシンの連係による雌性の情動と糖脂質代謝の包括的防御機構の解明

研究課題名(英文) Impact of the cooperative effect of estrogen and orexin on abnormalities with emotion and metabolism in menopausal mice

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：閉経期の情動と糖代謝調節の異常におけるエストロゲンとオレキシンの意義を検討した。雌性マウスでは、雄性とは異なり、高脂肪食負荷による代謝異常から防御された。雌性ではオレキシンが欠損したときのみ糖代謝異常を呈した。高脂肪食負荷した卵巣摘出-オレキシン欠損マウスはさらに過度の体重増加および耐糖能異常を呈した。そこで、高脂肪食負荷した卵巣摘出マウスにエストロゲンを脳室内投与すると耐糖能は改善した。しかし、高脂肪食負荷した卵巣摘出-オレキシン欠損マウスではエストロゲンによる耐糖能改善作用は消失した。以上より、雌性マウスの糖・エネルギー恒常性はエストロゲンとオレキシンの両者により維持されることを示した。

研究成果の概要(英文)：We examined the cooperative protective role of estrogen and orexin in abnormalities with emotion and metabolism in menopausal mice. Female, but not male mice, were protected against metabolic abnormalities fed high-fat diet. The additional orexin deficiency induced the metabolic abnormalities in the female mice. Ovariectomized orexin knockout mice fed high-fat diet presented excessive weight gain and impaired glucose tolerance. The impaired glucose tolerance was ameliorated when estrogen was administered intracerebroventricularly to the ovariectomized high-fat fed mice. However, the beneficial effect of estrogen was disappeared in the ovariectomized mice lacking orexin. These results indicate that estrogen and orexin cooperatively regulate glucose and energy homeostasis in female mice.

研究分野：糖尿病・内分泌

キーワード：オレキシン エストロゲン 閉経期 糖代謝 インスリン抵抗性 日内リズム ストレス うつ

## 1. 研究開始当初の背景

閉経期ではエストロゲン欠乏により、不安・うつなどの情動異常や、睡眠障害、肥満に伴う糖脂質代謝異常、ほてり・のぼせなどの血管運動神経症状など、多くの症状が全身性に生じる。そのため従来、脳、肝、脂肪など各臓器におけるエストロゲン作用の低下が各症状を独立に誘発すると考えられてきた。一方、最近、うつと糖尿病の発症に関連性があることや、エネルギー・糖脂質代謝の調節には末梢性のホルモン作用に加え視床下部-自律神経系が関与することが示された。また、卵巣摘出マウス(閉経肥満モデル動物)を用いてエストロゲンによる中枢性および末梢性のエネルギー・糖脂質代謝制御作用を検討し、両者の相補的作用の重要性を見出した。したがって、閉経期ではエストロゲン補充により情動異常と代謝異常を同時に改善できると考えられる。しかし、全身性のエストロゲン補充療法は癌や血栓症のリスクを増大させることが、臨床上の大きな制約となる。そこで、エストロゲンの有益作用を仲介する可能性のある視床下部オレキシン系に着目した。視床下部神経ペプチドのオレキシンは覚醒・睡眠を制御し、しかも中枢での快・不快などの情動とエネルギー代謝の両者に関わる。オレキシンの発現は体内時計や食事性リズムに加え性周期によって変動しており、生体リズムに即したオレキシン作用は著明な抗糖尿病効果を発揮する。そこで閉経期の新たな治療方策を見出すため、「中枢のエストロゲンとオレキシンの動的作用が精神機能とエネルギー・糖脂質代謝機能を連動的に調節する機構」の実証を目指した。

## 2. 研究の目的

閉経期ではエストロゲンの欠乏により情動の変化やエネルギー代謝機能の低下など全身性に異常が生じる。しかし、脳と末梢組織におけるこれらの異常が共通のメカニズムを介して誘発されるかは不明である。そこで本研究では、情動系と糖代謝を包括的に調節する視床下部オレキシン神経系に着目し、エストロゲンとオレキシンの連係プレイの生理的意義を検討する。そのため、卵巣摘出したオレキシン欠損マウスを用い、『閉経期の情動と中枢性糖代謝調節の異常がエストロゲンとオレキシンの両作用の破綻に依存する』ことを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

筑波大学医学部の桜井武博士より分与されたオレキシンヘテロ欠損マウスを富山大学生命科学先端研究支援ユニット・動物実験施設内で交配し、系統維持した。実験には、オレキシン欠損マウス同士の交配による *Orexin*<sup>-/-</sup>マウスおよび野生型 (WT) マウス同士の交配による *Orexin*<sup>+/+</sup>マウスを用いた。実験動物は1ケージあたり2-5匹で飼育し、飼

育環境は、温度20-26℃、照明は12時間明暗周期(7時-19時を明期、19-7時を暗期)で調節されている。明期の開始時刻7時をZeitgeber Time (ZT) 0、暗期の開始時刻19時をZT12とした。食餌は通常食にはRI照射済みのPicoLab Rodent Diet 20を使用した。高脂肪食としてRodent diet with 60 kcal % fat diet with blue dyeを使用した。食餌および水は自由に摂取させた。なお、本研究は富山大学動物実験取扱い規定に則り、必要以上の苦痛を動物に与えないよう十分に配慮した上で実施した。

### (2) 糖負荷試験とインスリン負荷試験

糖負荷試験では、マウスを6時間絶食させ、ブドウ糖を腹腔内投与し、0、15、30、60および120分後に尾から採血し、Freestyle Freedom glucose meterを用いて血糖値を測定した。インスリン負荷試験では、マウスを直前絶食させ、インスリン(0.5 U/kg)を腹腔内投与し、0、15、30、60および120分後に尾から採血し、Freestyle Freedom glucose meterを用いて血糖値を測定した。

### (3) MRIによる体脂肪量の測定

マウスを麻酔した後、MRmini SA (DS Pharma Biomedical, Osaka)を用いてマウス冠状切片T1強調画像を断続的に取得した。取得した切片画像から内臓脂肪および皮下脂肪部位を判別し、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積、除脂肪面積をImage Jを用いて測定した。膀胱から腎臓までの間の各画像切片における内臓脂肪面積、皮下脂肪面積および除脂肪面積の値を累計することで1個体の体脂肪量を算出した。

### (4) 全身のエネルギー代謝測定

小動物代謝測定システム(MK-5000RQ, Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)を用いて酸素消費量( $VO_2$ )、二酸化炭素排出量( $VCO_2$ )、エネルギー消費量(Energy Expenditure)、呼吸商(RQ)および運動量(Locomotor Activity)を測定した。

### (5) 卵巣摘出手術

マウスを麻酔した後、背部に切れ込みを入れ、卵巣機能を欠損させるため卵巣およびその周囲の脂肪組織をはんだごとにより焼却し、皮膚を縫合した。1週間の回復期間の後、実験に使用した。

### (6) 脳室内投与

マウスを麻酔した後、脳定位固定装置SR-6 (Narishige, Tokyo)に固定した。代替脳脊髄液(ACSF)を充填した浸透圧ポンプを *Orexin*<sup>-/-</sup>およびWTマウスの背部皮下に留置し、浸透圧ポンプに接続した脳室内投与用カニューレを側脳室に挿入した。2週間の回復後、エストロゲンまたはACSFを充填した浸透圧ポンプと交換し、4週間持続投与した。

#### 4. 研究成果

(1) 雌性オレキシン欠損マウスに対する高脂肪食負荷が体重および体組成に与える影響

通常食下において、WT および *Orexin*<sup>-/-</sup> マウス間での体重に差異は認めなかった。高脂肪食負荷 WT マウスは軽度な肥満を呈し、高脂肪食負荷 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスは高度な肥満を呈した。MRI を用いて除脂肪量および体脂肪量を測定した結果、通常食条件下において、WT および *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスの除脂肪組織、皮下脂肪組織および内臓脂肪組織体積に差異を認めなかったが、高脂肪食負荷条件下では、*Orexin*<sup>-/-</sup> マウスは WT マウスと比較して除脂肪組織、皮下脂肪組織および内臓脂肪組織体積が有意に増加していた。

(2) 雌性オレキシン欠損マウスに対する高脂肪食負荷が耐糖能およびインスリン感受性に与える影響

高脂肪食を負荷した雌性 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスでの耐糖能およびインスリン感受性の変化を調べた。糖負荷試験およびインスリン負荷試験による検討では、高脂肪食を負荷した WT マウスは、通常食給餌 WT マウスと比較して耐糖能の悪化およびインスリン感受性の低下を呈した。高脂肪食負荷 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスはさらに顕著な耐糖能の悪化およびインスリン感受性の低下を呈した。

(3) エストロゲンとオレキシン作用の欠損が体重および耐糖能に与える影響

8週間の高脂肪食負荷により、偽手術 WT マウスと比較して、卵巣摘出 WT マウスは有意な体重増加を呈した。また、偽手術 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスでは、卵巣摘出 WT マウスよりも有意に体重が増加した。さらに、卵巣摘出 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスは、偽手術 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスよりも著明な体重増加を示した。次に、エストロゲンとオレキシン作用の欠損が耐糖能に与える影響を検討するため、糖負荷試験を行った結果、体重と同様に、偽手術 WT マウスと比較して卵巣摘出 WT マウスは耐糖能の悪化を呈した。また、偽手術 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスは、卵巣摘出 WT マウスよりも耐糖能が悪化した。さらに、卵巣摘出 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスは偽手術 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスと比較して耐糖能の悪化を呈した。

(4) 卵巣摘出した雌性オレキシン欠損マウスに対するエストロゲンの脳室内持続投与が糖代謝に与える影響

糖負荷試験による検討において、高脂肪食負荷した卵巣摘出 WT マウスに中枢性にエストロゲンを投与すると、耐糖能が改善した。しかし、高脂肪食負荷した卵巣摘出 *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスにエストロゲンの中枢投与を行っても耐糖能の改善は認められなかった。また、インスリン負荷試験において、高脂肪食負荷

した卵巣摘出 WT あるいは *Orexin*<sup>-/-</sup> マウスへのエストロゲンの中枢投与により、インスリン感受性には変化を認めなかった。

以上より、雌性マウスの糖・エネルギー恒常性はエストロゲンとオレキシンの両者によって維持されることが示された。その機構として、エストロゲンとオレキシンは相乗的に肥満を防止した。一方、中枢投与したエストロゲンによる耐糖能の改善効果はオレキシン依存性であった。したがって、中枢性糖代謝調節において、エストロゲンはオレキシンを介して機能すると考えられた。

#### 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4件)

1. 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*. 157: 4149-4157, 2016. 査読有.
2. Tsuneki H, Sasaoka T, Sakurai T. Sleep Control, GPCRs, and Glucose Metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 27: 633-642, 2016. 査読有.
3. 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*. 157: 95-206, 2016. 査読有.
4. Tsuneki H, Wada T, Sasaoka T. Orexin regulates glucose homeodynamics with daily rhythm. *Orexin and Sleep*. Springer International Publishing Switzerland. 2015: 381-394, 2015. 査読有.

[学会発表](計22件)

1. 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年5月18-20日. 名古屋.
2. 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 年 5 月 18-20 日 .名古屋 .
3. 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 年 5 月 18-20 日 . 名古屋 .
  4. 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 年 4 月 20-22 日, Nice, France.
  5. 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 年 11 月 27 日 . 金沢 .
  6. 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 年 10 月 27-29 日, Asahikawa.
  7. 笹岡利安 . オレキシンによる睡眠・覚醒と糖代謝調節 .第 43 回日本神経内分泌学会学術集会 . 2016 年 10 月 14-15 日 . 浜松 .
  8. 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 年 9 月 12-16 日, Munich, Germany.
  9. 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 年 7 月 16 日 . 金沢 .
  10. 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 年 7 月 7-8 日 . 東京 .
  11. 笹岡利安 . 糖尿病と睡眠 . 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月 19-21 日 . 京都 .
  12. 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 年 5 月 19-21 日 . 京都 .
  13. 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 年 5 月 19-21 日 . 京都 .
  14. 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 年 3 月 26-29 日 . 横浜 .
  15. 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 . 2016 年 3 月 9-11 日 . 横浜 .
  16. 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 88 回日本生化学会大会 . 2015 年 12 月 1-4 日 . 神戸 .
  17. 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 年 11 月 15 日 . 富山 .
  18. 伊藤哲生, 和田 努, 櫻村彩香, 王生美沙, 恒枝宏史, 鮫島 梓, 齋藤 滋, 笹岡利安 . 制御性 T 細胞の性特異的な脂肪組織局在が肥満に伴う慢性炎症と糖代謝に及ぼす影響 .日本薬学会北陸支部第 127 回例会 . 2015 年 11 月 15 日 . 富山 .
  19. 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 年 6 月 5-9 日, Boston, MA, U.S.A.
  20. 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 年 5 月 21-24

日・下関。

21. 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年5月21-24日. 下関.
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年5月21-24日. 下関.

〔図書〕(計2件)

1. 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. 11: 35-42, 2017.
2. 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. 87-93, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

富山大学 大学院医学薬学研究部(薬学系)

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

和田 努 (WADA, Tsutomu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)

講師

研究者番号: 00419334