

令和元年5月23日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01815

研究課題名(和文) 自律神経を介した代謝調節の加齢・肥満による変化の解析

研究課題名(英文) changing role of vagal nerve by aging and obesity

研究代表者

木村 久美 (Kimura, Kumi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：60409472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、迷走神経活動を合成リガンドで制御するマウスモデル(DMV-hM3Dq/DMV-hM4Diマウス)を作成し、研究に用いた。特異的リガンドCNOの投与により、DMV-hM3Dqマウスは迷走神経活動が活性化し、DMV-hM4Diマウスは迷走神経活動が減弱した。これらのマウスにおいて、CNOに反応した血糖値とインスリン分泌について検討した結果、DMV-hM3DqマウスはCNO投与によりインスリン分泌が促進し、DMV-hM4DiマウスはCNO投与によりインスリン分泌が抑制した。しかし、いずれも血糖値が上昇したことから、インスリン以外のホルモンの関与の検討も行う必要があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自律神経を介した肝臓代謝調節の加齢・肥満による変化を解明することは、加齢・肥満における生活習慣病の病態理解を深め、多様な疾患が合併する生活習慣病の新たな予防法の開発を可能にすると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used DMV-hM3Dq / DMV-hM4Di mice and examined effects of aging and obesity on changing role of vagal nerve. In DMV-hM3Dq mice, CNO administration activated vagus nerve activity and induced insulin secretion, immediately. In DMV-hM4Di mice, CNO administration suppressed vagus nerve activity and inhibited insulin secretion, transiently. However, these mice (both DMV-hM3Dq and DMV-hM4Di) exhibited elevation of blood glucose levels by treatment with ligand. These data suggested a need for analysis of other hormones except for insulin.

研究分野：生活習慣病

キーワード：自律神経 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

食事・運動など健康に直結する生活様式の変化に伴い、糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病が増加している。また、加齢に従い、生活習慣病の罹患率が増えることが知られており、世界有数の長寿国である我が国において、加齢は生活習慣病増加の原因となっている。生活習慣病の誘因として、肥満・加齢に伴う肝臓のインスリン作用の障害(インスリン抵抗性)の重要性が指摘されている。近年、古典的インスリン標的臓器である肝臓への直接的インスリン作用だけでなく、視床下部を中心とした中枢神経でのインスリン作用も肝臓の糖・エネルギー代謝に重要な役割を担うことが明らかにされている。視床下部は、インスリンを始めとしたホルモンや、グルコース・アミノ酸などの栄養素の変化を感知し、自律神経活動を調節することで、肝臓での糖産生、脂肪分解合成などの糖・エネルギー代謝を調節する。しかし、自律神経を介する肝臓糖・エネルギー代謝制御機構が、中枢神経インスリン抵抗性を引き起こす肥満や加齢において、生活習慣病発症にどのような役割を担うかは、必ずしも十分に解明されていない。

申請者は、これまでに、インスリンやヒスチジンの脳室内投与によって、肝臓交感神経活動が増加する一方で、肝臓副交感(迷走)神経活動が減少することを見出し(Cell reports, 2016)、中枢神経性の自律神経活動調節の肝臓への作用メカニズムの解明を行ってきた。

2. 研究の目的

中枢神経(視床下部)が、自律神経を介して、肝臓の糖・エネルギー代謝を調節する仕組みの解明が進められている。研究代表者も、中枢神経インスリン作用による自律神経性の肝臓糖代謝調節のメカニズムの解明を行ってきた(Diabetes, 2012/2013)。肥満や加齢では生活習慣病が増加するが、その病因として、中枢神経インスリン抵抗性の関与が指摘されている。しかし、肥満や加齢によって、自律神経性の肝臓糖・エネルギー代謝調節がどのような影響を受け、その結果、生活習慣病(糖尿病・脂質異常症)の病態にどのように作用するかについては、解明されていない。加齢・肥満における生活習慣病の病態理解を深め、新規予防法の開発へと繋げるために、本研究課題では、自律神経を介した肝臓代謝調節の加齢・肥満による変化の解明を行った。

3. 研究の方法

申請者は、DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drug) 技術を用い、迷走神経活動を合成リガンドで制御しうるマウスモデルを確立した。DREADD には、ニューロンを活性化する hM3Dq、不活性化する hM4Di があり、それぞれを迷走神経起始核である迷走神経背側運動核 (DMV) に発現するマウスを用いることで、遠心性の迷走神経の神経活動を合成リガンドの投与によって制御することが可能である。合成リガンド clozapine-N-oxidase (CNO) 依存的に迷走神経活動が増強するマウスとして DMV 特異的 hM3Dq 発現 (DMV-hM3Dq) マウス、CNO 依存的に迷走神経活動が减弱するマウスとして DMV 特異的 hM4Di 発現マウス (DMV-hM4Di) マウスを作出している。本研究課題では、主に DMV-hM3Dq/ -hM4Di マウスを用いて、生活習慣病病態における迷走神経の役割を解析した。

4. 研究成果

最初に、DMV-hM3Dq マウスと DMV-hM4Di マウスに対する、CNO 量の最適化を行った。DMV-hM3Dq マウスへの、高容量 (5mg/kg) の CNO 投与は、迷走神経だけでなく、交感神経活動も活性化したが、低用量 (0.16mg/kg) では、迷走神経活動のみ活性化した (図 1)。DMV-hM4Di マウスでは高

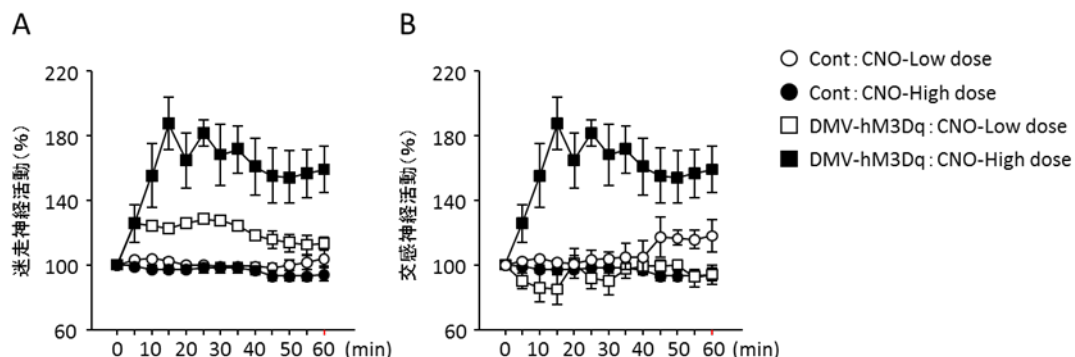


図1 DMV-hM3DqマウスにおけるCNO量の検討

高容量のCNO投与(5mg/kg)は、迷走神経だけでなく、交感神経活動までも活性化するが、低用量(0.16mg/kg)では、迷走神経活動のみ活性化する。

容量 (5mg/kg) の CNO 投与で迷走神経活動の抑制が見られ、交感神経活動は変化がなかった (図 2)。そこで以降の実験では、DMV-hM3Dq マウスへの CNO 投与量は 0.16mg/mg、DMV-hM4Di マウスへの CNO 投与量は 5mg/kg で行うことにした。

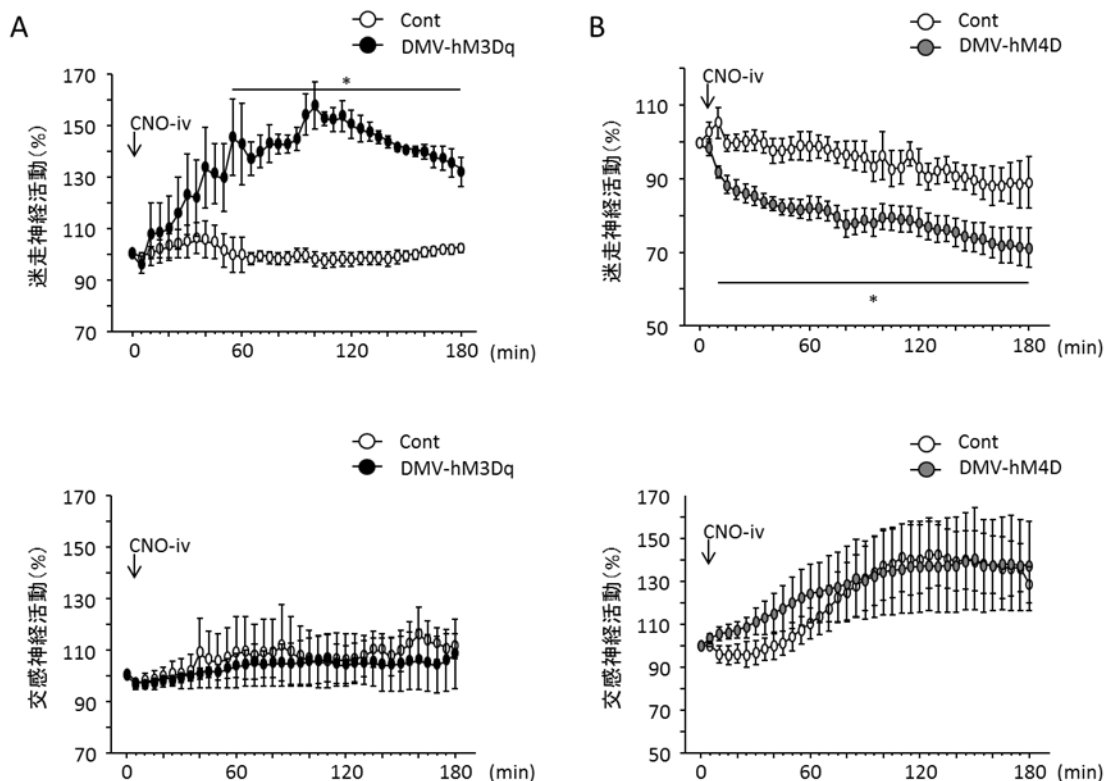


図2 DMV-hM3Dqマウス(A)、DMV-hM4Diマウス(B)における、CNO投与後の迷走神経活動と交感神経活動の変化

申請者は、迷走神経活動がニコチン性 $\alpha 7$ 受容体を介して、肝臓クッパー細胞における炎症を抑制することを見出している (Cell reports, 2016)。そこで、DMV-hM3Dq マウス、DMV-hM4Di マウスの両者を用いて、迷走神経活動の減弱/増強による、炎症作用に対する効果を検証した。まず、リポポリサッカライド LPS による炎症惹起に対し、ニコチン受容体作動薬 (ニコチン) $\alpha 7$ 型ニコチン受容体作動薬 (PNU-282987) の投与により炎症が抑制されるかを検証した。その結果、LPS 単独の投与に比して、ニコチンや PNU の投与は血中および肝臓での炎症マーカーの減弱した (図 3)。

次に、CNO 依存的に迷走神経活動を増強/減弱させ、LPS 誘導性の炎症に対する迷走神経活動の

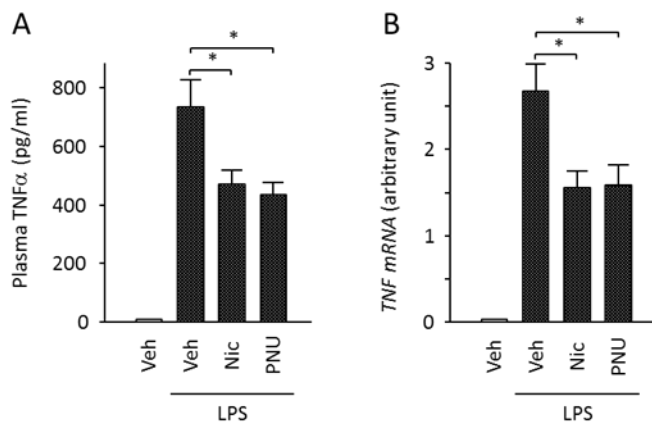


図3 LPS投与によるTNF α 誘導に及ぼすニコチン受容体作動薬の炎症抑制効果

ニコチン受容体作動薬 (Nic, 0.6mg/kg、皮下投与)、あるいは $\alpha 7$ 型ニコチン受容体作動薬 (PNU-282987, 30mg/kg、皮下投与) の投与30分後に、LPS (10 μ g/kg) を腹腔内投与し、1時間後に血液と肝臓を採取した。Aは血中TNF α 濃度、Bは肝臓中TNF mRNA発現を示す (P<0.05)。

効果を検証した。その結果、迷走神経活動の活性化は、LPS 誘導性の炎症を減弱する一方、迷走神経活動の抑制は LPS 誘導性の炎症に変化を及ぼさなかった（図 4）。この実験により、迷走神経活動の活性化は抗炎症作用を示すことが確認された一方、迷走神経活動の抑制が、炎症誘導を示さなかったのは、LPS により炎症が上限に達した、あるいは迷走神経活動を抑制してから、炎症を誘導するまでの時間のずれが生じたことが関係していることが考えられる。

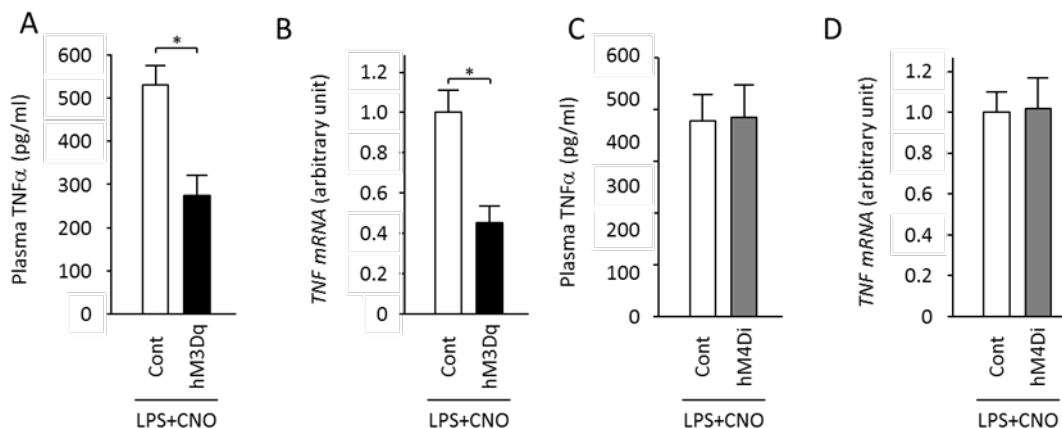


図4 LPS投与によるTNFα誘導に及ぼす迷走神経活動の増強・抑制の効果

CNO依存的に迷走神経活動が増強するDMV-hM3Dqマウス (A、B)と、迷走神経活動が減弱するDMV-hM4Diマウス (C、D)に、CNOとLPS (10μg/kg、腹腔内投与)を同時に投与し、1時間後に血液と肝臓を採取した。A、Cは血中TNFα濃度、B、Dは肝臓中TNF mRNA発現を示す (P<0.05)。

次に、DMV-hM3Dq マウスと DMV-hM4Di マウスにおいて、CNO に応答した血糖値と膵内分泌について検討した結果、DMV-hM3Dq マウスは、CNO 投与後に血糖値の上昇・インスリンおよびグルカゴン分泌の促進が見られた。グルカゴン値は1時間後にピークに達し、グルカゴン分泌の低下に伴い、血糖値も低下した。DMV-hM4Di マウスは、CNO 投与後に血糖値の上昇・インスリン分泌の抑制が見られた。グルカゴン分泌には変化がなかった。DMV-hM3Dq マウスと DMV-hM4Di マウスのいずれも血糖値が上昇したが、インスリン・グルカゴン分泌だけでは説明がつかないことから、それら以外のホルモンが血糖上昇に関与していると考え、現在解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Kumi Kimura, Yuka Inaba, Hitoshi Watanabe, Toshiya Matsukawa, Michihiro Matsumoto, Hiroshi Inoue. Nicotinic alpha-7 acetylcholine receptor deficiency exacerbates hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Diabetes Investigation* 査読有 Vol.10, No. 3, 2019, p659 - 666, doi: 10.1111/jdi.12964.

Hitoshi Watanabe, Yuka Inaba, Kumi Kimura, Michihiro Matsumoto, Shuichi Kaneko, Masato Kasuga, and Hiroshi Inoue. Sirt2 facilitates hepatic glucose uptake by deacetylating glucokinase regulatory protein. *Nat Communications* 査読有 2018, doi: 10.1038/s41467-017-02537-6

Yasuhiro Onogi, Tsutomu Wada, Chie Kamiya, Kento Inata, Takatoshi Matsuzawa, Yuka Inaba, Kumi Kimura, Hiroshi Inoue, Seiji Yamamoto, Yoko Ishii, Daisuke Koya, Hiroshi Tsuneki, Masakiyo Sasahara, Toshiyasu Sasaoka. PDGFR Regulates Adipose Tissue Expansion and Glucose Metabolism via Vascular Remodeling in Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 査読有 Vol.66, No.4 2017, p1008 - 1021, doi: 10.2337/db16-0881

〔学会発表〕(計1件)

木村久美、渡邊一史、稲葉有香、井上啓、橘伸彦、本山貴康、河野光登「分離大豆タンパク質と分離緑豆タンパク質の肝糖脂質代謝への作用とそのメカニズムの比較検討」第71回 日本栄養・食糧学会大会、2017年開催

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。