

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05059

研究課題名（和文）視床下部グルコース感受性神経における新たな調節因子と抗糖尿病薬の探索

研究課題名（英文）Finding a factor to regulate glucose sensing in the hypothalamus to treat diabetes

研究代表者

戸田 知得 (Toda, Chitoku)

北海道大学・獣医学研究院・助教

研究者番号：70571199

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,600,000円

研究成果の概要（和文）：脳には血糖値の増減をモニターして、血糖値が上がったら下げるよう指令を出す神経細胞があります。この神経細胞をグルコースセンシング神経と呼びます。肥満するとグルコースセンシング神経の働きが弱まり、糖尿病の発症に関与します。本研究はなぜ肥満がグルコースセンシングの機能を低下するかを研究しました。その結果、肥満がグルコースセンシング低下させる原因となるタンパク質を発見し、そのタンパク質の脳内投与が肥満による血糖値の上昇を抑制することを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は糖尿病の原因としてよく知られています。現在までに様々な研究が行われ、なぜ肥満が糖尿病の発症に関与するか調べられてきました。しかし、その多くは筋肉、肝臓、脂肪組織などの末梢臓器に着目して研究が進んできました。一方で、脳の研究は末梢臓器ほど進んでいません。この研究成果は脳による血糖値のモニタリングという特殊な機能について、その分子メカニズムを明らかにしたものです。今回発見したタンパク質を利用して糖尿病の治療薬を開発することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Brain can monitor an increase or a decrease in blood glucose levels, by neurons called glucose sensing neurons. Glucose sensing neurons regulate glucose metabolisms in peripheral tissues to maintain normal glucose levels. Obesity attenuates the function of glucose sensing neurons and increases blood glucose levels. This project tried to find its molecular mechanism. We found a molecule, which can improve the function of glucose sensing neurons in obese mice. The molecule has a therapeutic effect on the diabetic hyperglycemia.

研究分野：代謝学

キーワード：糖代謝 視床下部 グルコースセンシング 糖尿病 骨格筋

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

視床下部は摂食・飲水・末梢組織のエネルギー代謝など、生命維持に関わる重要な器官である。特に全身のエネルギー蓄積量を検知するエネルギーセンサーとして働き、体内のエネルギー蓄積状況に応じて摂食量やエネルギー消費量を調節することで、体内エネルギーの恒常性を維持する。視床下部腹内側核にはグルコースセンシング神経が存在し、血糖値の維持に必須の役割を果たす。すなわち、高血糖を検知して全身の糖代謝を調節し、血糖値を低下させる。肥満するとグルコースセンシング神経の機能が低下し、血糖値が高くなる。グルコースセンシングの破綻は糖尿病の発症に関わるだけでなく、インスリン治療時の低血糖症の発生にも重大な影響を及ぼす。しかし、グルコースセンシングの詳細な細胞内分子メカニズムは十分に解明されていない。

我々は、腹内側核が血糖値の変化を感受する際、ミトコンドリア脱共役タンパク質 2 (Uncoupling protein 2: UCP2) がミトコンドリアの形態を変化させることで神経活動を調節し、全身の糖代謝に重要な役割を営むことを明らかにした (Toda C, *Cell*, 2016)。特に UCP2 によってミトコンドリアが分裂し小さくなることがグルコースセンシングの機能を高めることを明らかにした。また、脂肪含量の高い餌 (高脂肪食) でマウスを肥満させると、腹内側核のミトコンドリア同士が結合し、形態的に肥大することを見出した。これまでの自身の研究結果から考えると、ミトコンドリアの肥大はグルコースセンシングを低下し、全身の糖代謝を悪化すると予想される。しかし、その詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はグルコースセンシング神経におけるミトコンドリア形態変化に着目し、生活習慣病において、どのような分子が脳のグルコースセンシングを低下し糖尿病発症に関与するかを明らかにすると共に、その分子が糖尿病治療のターゲット分子となり得るかを明らかにすることである。そのため、本研究では以下の3点について明らかにする。

グルコースセンシング神経をラベルする方法を確立する。

食餌誘導性肥満によるグルコースセンシングおよび全身糖代謝の悪化を回復させる分子を発見する。

糖代謝調節および食欲に関与する脳内メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

これまでのグルコースセンシング神経に関する研究の問題点は、グルコースセンシング神経選択的に Cre-recombinase を発現するマウスがいなかったことである。本研究では神経活動の増加の指標として知られる activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) を

用いてタモキシフェン誘導性に Cre-recombinase (Cre)を活性化する Arc-Cre/ER<sup>T2</sup> マウスを用いることでグルコースセンシング神経だけを抽出することを試みた。実際には Arc-Cre/ER<sup>T2</sup> マウスにグルコースおよびタモキシフェンを投与し、グルコースによって活性化した神経細胞にのみ蛍光タンパク質の tdTomato を発現させた。また、マウスを一晩絶食させた後にエサを与え、食後に活性化する神経に tdTomato を発現させた。グルコースセンシング神経をラベルした後、通常食または高脂肪食で飼育し、脳をパパインで処理し tdTomato 発現神経細胞を単離した。この細胞から抽出した RNA を RNA シークエンスによって解析し、どのような遺伝子発現に変化があるかを明らかにした。遺伝子発現の結果によって、ミトコンドリアの肥大やグルコースセンシングの低下に関与すると予想される候補分子を探した。次に、候補分子の組み換えタンパク質や阻害剤などを肥満マウスの脳内に投与し、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験、hyperinsulinemic-euglycemic clamp などを行い、全身糖代謝の変化を測定した。また、イメージング質量によって視床下部内で何が最も変化するかを測定した。

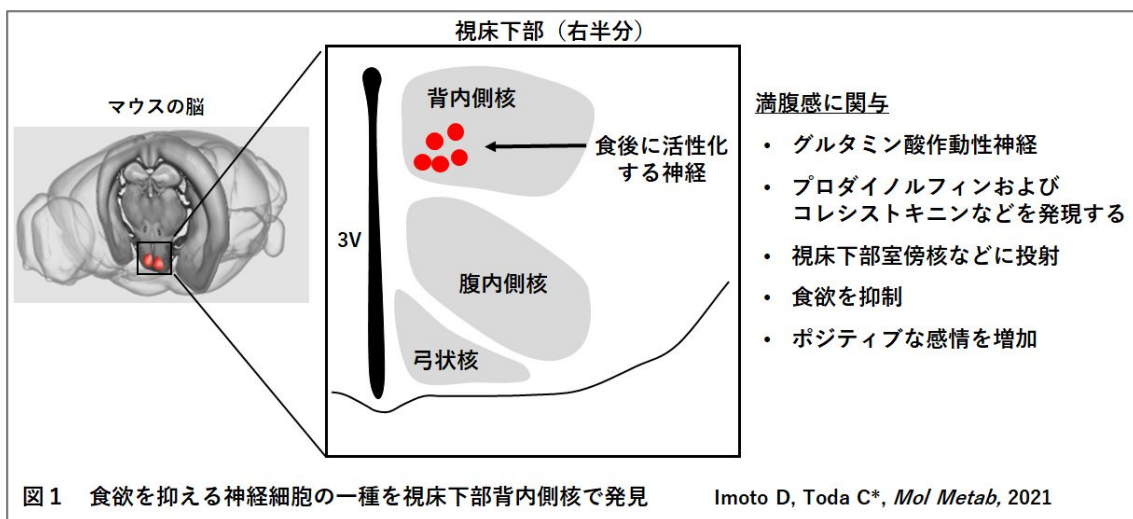
#### 4 . 研究成果

上記の方法によりグルコースによって活性化する細胞に細胞内カルシウムインディケーターの GCaMP を発現させ、脳スライス標本を用いてグルコース濃度に応じた神経活動の変化を調べると、tdTomato 陽性細胞の約 70%がグルコースセンシング神経であった。マウスを高脂肪食飼育によって肥満させた後に tdTomato 陽性細胞のグルコースセンシング神経の数を調べると約 10%に減少しており、肥満によってグルコースセンシング神経の機能が低下するメカニズムを研究するために良いモデルとなることが分かった。

正常体重マウスおよび肥満マウスから tdTomato 陽性細胞を単離し、single cell RNA sequence を行って、グルコースセンシング神経の遺伝子発現が肥満によってどのように変化するかを Gene ontology 解析などによって調べた。様々な遺伝子群が変化する中で、最も大きな変化をする上位 10 個のシグナル経路から代表的な分子の組み換えタンパク質および阻害剤を購入し、肥満マウスの脳内に投与した後、グルコース負荷試験を行った。その結果、肥満マウスの耐糖能悪化を改善する分子 X を発見した。分子 X の組み換えタンパク質を肥満マウスの脳内に投与すると、骨格筋のインスリン感受性が増加し全身の糖代謝が改善した。分子 X の阻害剤を脳内に投与すると糖代謝が低下した。さらに、分子 X を投与すると肥満によるグルコースセンシング神経のグルコース濃度感知機能が改善した。

また別の方法でグルコースセンシング神経をラベルするために、マウスのエサを一晩抜き、次の日に餌を与え、様々なタイムコースで活性化している神経細胞を tdTomato でラベルした。これまで視床下部弓状核にある Agouti-related protein 神経や Proopiomelanocortin 神経が食欲を調節することがよく知られている。しかし、弓状核には全く tdTomato が発現せず、エサを与えて 1 時間後および 2 時間後に視床下部の背内側核において活性化する神経

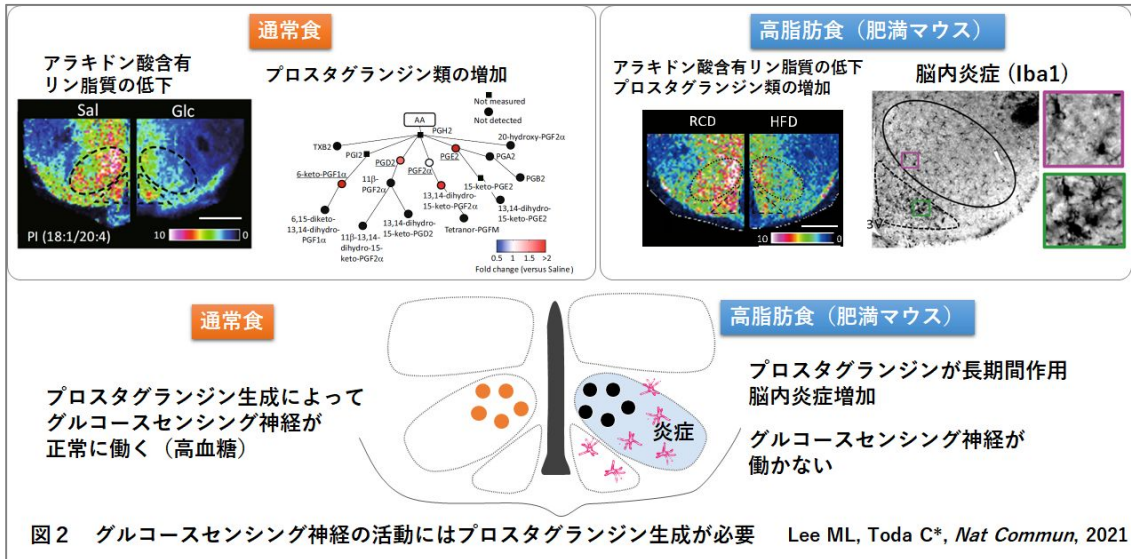
細胞が増加した。近年、designer receptor exclusively activated by designer drugs (DREADD) と呼ばれる実験方法によって特定の神経細胞を人工的に活性化または抑制することができる。背内側核の tdTomato 陽性細胞を人工的に活性化するとマウスの食事量が低下した。反対に、人為的に抑制すると食事量が増加した。また、この神経細胞を活性化させると場所嗜好性が変化したことから、心地よさ・幸せ感・興奮など(どの感情かは不明)ポジティブな感情にも影響を与えることが示唆された。tdTomato で標識された神経細胞を1つずつ採取し、細胞内に発現する遺伝子を RNA sequence によって網羅的に測定したところプロダイノルフィンおよびコレシストキニンを発現するグルタミン酸作動性神経であることがわかった。以上の結果から、食事をして1時間後には視床下部背内側核においてプロダイノルフィンおよびコレシストキニンを発現する神経細胞が活性化し、満腹感や心地よさなどを増加させていることがわかった。以上の結果を論文として代謝栄養学の国際科学雑誌の *Molecular Metabolism* 誌 (Impact Factor 7.4) に掲載した (図1)。



さらに脳内の脂質分布が血糖値の増加や肥満によってどのように変化するかをイメージング質量分析器によって解析した。マウスにグルコースを投与して血糖値を上げると、視床下部のアラキドン酸を含む細胞膜リン脂質が低下し、プロスタグランジン類の生成が増加した。つまり、高血糖は細胞膜リン脂質からアラキドン酸を遊離し、プロスタグランジン類の生成を促進したと考えられる。この生成経路に重要な酵素を阻害剤や遺伝子組み換えによって視床下部内で働かなくすると、グルコースを投与したときの視床下部内の神経活動が低下するとともに血糖値の増加が持続し、血糖値が低下しにくくなった。したがって、視床下部でプロスタグランジン類が生成されるとグルコースセンシング神経の活動を増加し、血糖値を低下する作用があると考えられる。

脂肪含量の高い餌(高脂肪食)をマウスに与えると、肥満するとともに血糖値が高くなる。肥満マウスの視床下部をイメージング質量分析器で解析すると通常体重マウスよりオレイン酸やパルミチン酸などの脂肪酸が蓄積していた。しかし予想に反して、アラキドン酸を含むリン脂質は低下しており、プロスタグランジン類の生成が増加した。リン脂質代

謝に重要な酵素を視床下部において働かなくすると、高脂肪食によるインスリン抵抗性が改善した。また、高脂肪食は脳の炎症を増加するとともにグルコースセンシング神経の機能を低下するが、プロスタグランジン類を生成できなくすると炎症増加および血糖値センサーの機能低下が改善した。したがって、肥満すると視床下部でプロスタグランジン類が生成され、正常体重のときとは違って脳内炎症およびグルコースセンシング神経の機能低下に作用すると考えられる。以上の結果を論文として国際科学雑誌の Nature Communications (Impact Factor 14.9) に発表した。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shiki Okamoto, Tatsuya Sato, Michihiro Tateyama, Haruaki Kageyama, Yuko Maejima, Masanori Nakata, Satoshi Hirako, Takashi Matsuo, Sanda Kyaw, Tetsuya Shiuchi, Chitoku Toda, その他, Yasuhiko Minokoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Activation of AMPK-Regulated CRH Neurons in the PVH is Sufficient and Necessary to Induce Dietary Preference for Carbohydrate over Fat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 706 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.11.102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kim Jung Dae, Toda Chitoku, Ramirez Cristina M., Fernandez-Hernando Carlos, Diano Sabrina	4. 巻 66
2. 論文標題 Hypothalamic Ventromedial Lin28a Enhances Glucose Metabolism in Diet-Induced Obesity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 2102 ~ 2111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db16-1558	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Saito Natsuko, Kimura Shunsuke, Miyamoto Tomomi, Fukushima Sanae, Amagasa Misato, Shimamoto Yoshinori, Nishioka Chieko, Okamoto Shiki, Toda Chitoku, Washio Kohei, Asano Atsushi, Miyoshi Ichiro, Takahashi Eiki, Kitamura Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Macrophage ubiquitin-specific protease 2 modifies insulin sensitivity in obese mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 322 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2017.01.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiuchi Tetsuya, Toda Chitoku, Okamoto Shiki, Coutinho Eulalia A., Saito Kumiko, Miura Shinji, Ezaki Osamu, Minokoshi Yasuhiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Induction of glucose uptake in skeletal muscle by central leptin is mediated by muscle 2-adrenergic receptor but not by AMPK	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-15548-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imoto Daigo, Yamamoto Izumi, Matsunaga Hirokazu, Yonekura Toya, Lee Ming-Liang, Kato Kan X., Yamasaki Takeshi, Xu Shucheng, Ishimoto Taiga, Yamagata Satoshi, Otsuguro Ken-ichi, Horiuchi Motohiro, Iijima Norifumi, Kimura Kazuhiro, Toda Chitoku	4. 巻 54
2. 論文標題 Refeeding activates neurons in the dorsomedial hypothalamus to inhibit food intake and promote positive valence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101366 ~ 101366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee Ming-Liang, Matsunaga Hirokazu, Sugiura Yuki, Hayasaka Takahiro, Yamamoto Izumi, Ishimoto Taiga, Imoto Daigo, Suematsu Makoto, Iijima Norifumi, Kimura Kazuhiro, Diano Sabrina, Toda Chitoku	4. 巻 12
2. 論文標題 Prostaglandin in the ventromedial hypothalamus regulates peripheral glucose metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22431-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Ming Liang Lee, Hirokazu Matsunaga, Takahiro Hayasaka, Yuko Okamatsu, Kazuhiro Kimura, Chitoku Toda
2. 発表標題 Cytosolic phospholipase A2 in the hypothalamus modulates systemic glucose metabolism differently by meal
3. 学会等名 日本分子イメージング学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井本大瑚、松永洋和、北沢泉、岡松優子、木村和弘、戸田知得
2. 発表標題 絶食後の再摂食時に活性化する視床下部背内側核神経の網羅的遺伝子解析
3. 学会等名 アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井本大瑚、松永洋和、北沢泉、岡松優子、木村和弘、戸田知得
2. 発表標題 絶食後の再摂食時に活性化する神経の同定とその機能に関する研究
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸田知得、Lee Ming Liang、松永洋和、杉浦悠毅、早坂孝宏、北沢泉、岡松優子、木村和弘
2. 発表標題 肥満における視床下部の細胞膜リン脂質代謝と全身糖代謝の関係
3. 学会等名 日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ming Liang Lee, Kazuhiro Kimura, Chitoku Toda
2. 発表標題 In vivo labelling glucose excited neurons in ventromedial hypothalamus unveils its role in the regulation of systemic glucose metabolism
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kan Kato, Kazuhiro Kimura, Chitoku Toda
2. 発表標題 Impaired systemic glucose metabolism is a delayed onset response of social defeat stress in mice
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Chitoku Toda, Ming Liang Lee, Hirokazu Matsunaga, Takahiro Hayasaka
2. 発表標題 New mechanism of glucose sensing by the hypothalamus to control systemic glucose metabolism
3. 学会等名 International Conference on Biology and Medical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ming Liang Lee, Hirokazu Matsunaga, Takahiro Hayasaka, Yuko Okamatsu, Kazuhiro Kimura, Chitoku Toda
2. 発表標題 Cytosolic phospholipase A2 in the hypothalamus modulates systemic glucose metabolism differently by meal
3. 学会等名 International Conference on Biology and Medical Sciences
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ming Liang Lee, Takahiro Hayasaka, Yuko Okamatsu, Kazuhiro Kimura, Chitoku Toda
2. 発表標題 高血糖が視床下部のリン脂質分布に及ぼす影響
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸田知得、Lee Ming Liang、松永洋和、早坂孝宏、北沢泉、岡松優子、木村和弘
2. 発表標題 視床下部エイコサノイドは血糖値の調節に関与する
3. 学会等名 日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松永洋和、李明亮、早坂孝宏、北沢泉、岡松優子、木村和弘、戸田知得
2. 発表標題 視床下部アストロサイトの細胞質型ホスホリパーゼA2が全身の糖代謝に及ぼす役割
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松永洋和、李明亮、早坂孝宏、北沢泉、岡松優子、木村和弘、戸田知得
2. 発表標題 視床下部におけるアラキドン酸代謝が全身の糖代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chitoku Toda, Sungho Jin, Sabrina Diano
2. 発表標題 Mitochondrial fission in VMH neurons regulates whole body glucose metabolism
3. 学会等名 KEYSTONE SYMPOSIA (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chitoku Toda, Sabrina Diano
2. 発表標題 UCP2-dependent mitochondrial fission in the hypothalamic ventromedial nucleus controls glucose homeostasis
3. 学会等名 The 44th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 戸田知得
2. 発表標題 視床下部腹内側核のUCP2は高血糖時の全身の糖代謝調節に必須である
3. 学会等名 第160回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 戸田知得
2. 発表標題 視床下部の血糖値感知ニューロンにおけるミトコンドリアの形態変化と全身の糖代謝調節
3. 学会等名 第54回日本生化学会北海道支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北沢泉、李明亮、井本大湖、加藤完、米倉透矢、岡松優子、木村和弘、戸田知得
2. 発表標題 報酬損失が全身糖代謝に与える影響
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二川瑛実、岡松優子、土生優妃、高橋菜摘、坪田あゆみ、戸田知得、園山慶、木村和弘
2. 発表標題 母マウスへの高脂肪食給餌が仔の腸内細菌叢の構成に与える影響とページ脂肪細胞誘導との関連
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡慎也、鈴木宏欣、戸田知得、岡松優子、木村和弘
2. 発表標題 マウス乳腺導管形成における転写因子Grainyhead-like2の発現と機能
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田知得、Lee Ming Liang、松永洋和、杉浦悠毅、早坂孝宏、北沢泉、岡松優子、木村和弘
2. 発表標題 視床下部のプロスタグランジン生成と全身糖代謝の関係
3. 学会等名 第6回 北大・部局横断シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田知得、Lee Ming Liang、松永洋和、杉浦悠毅、早坂孝宏、北沢泉、岡松優子、木村和弘
2. 発表標題 視床下部のプロスタグランジン生成と全身糖代謝の関係
3. 学会等名 生理学研究所 研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田知得
2. 発表標題 Refeedingにより活性化する視床下部背内側核神経の特徴と摂食調節における役割
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー 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 戸田知得
2. 発表標題 グルコース感受性ニューロンによる全身糖代謝調節とその機構
3. 学会等名 グルコース感受性ニューロンによる全身糖代謝調節とその機構（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 糖代謝異常改善剤	発明者 戸田知得、李明亮、 北沢泉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-128383	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究協力者	李 明亮  (Lee Ming-Liang)		
研究協力者	松永 洋和  (Matsunaga Hirokazu)		
研究協力者	井本 大瑚  (Imoto Daigo)		
研究協力者	加藤 完  (Kato Kan)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	米倉 透矢  (Yonekura Toya)		
研究協力者	北沢 泉  (Kitazawa Izumi)		

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