

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591039
 研究課題名（和文） 視床下部のオレキシン系がインスリン抵抗性を防御する機構の解明
 研究課題名（英文） Central role of orexin in the regulation of insulin-mediated glucose metabolism
 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・准教授
 研究者番号：20332661

研究成果の概要：糖代謝調節に関わる末梢組織でのインスリン作用は視床下部性制御を受けているが、その詳細は不明である。そこで生体のエネルギーバランス調節に関与する視床下部ペプチドのオレキシンに注目し、糖代謝調節機構における役割を検討した。その結果、オレキシン欠損マウスでは加齢に伴い、視床下部および末梢組織のインスリン作用が破綻し、耐糖能異常およびインスリン抵抗性が惹起されることを見出した。従ってオレキシンは、インスリン感受性の調節に必須な脳と末梢組織の臓器連関を統合する役割を果たしており、加齢に伴うインスリン抵抗性の増大に対する防御因子であると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病学、インスリン抵抗性、オレキシン

1. 研究開始当初の背景

今日、生活習慣の急速な欧米化に伴い、2型糖尿病患者が世界的規模で増加している。2型糖尿病の発症および進展にはインスリン抵抗性が深く関与しており、有用なインスリン抵抗性改善薬の開発に注目が集まっている。インスリン抵抗性の分子機構は主に骨格筋、脂肪および肝臓などの末梢標的組織において検討されているが、最近、脳のインスリン作用も血糖コントロールに重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

特に、視床下部におけるインスリン作用は、摂食の抑制に加えて、膵インスリン分泌の促進、肝のグルコース産生の抑制、血中グルコース濃度の低下を引き起こす (Nature 434:1026, 2005)。そのため、脳特異的インスリン受容体ノックアウトマウスでは、脳内のインスリンシグナル伝達の減弱と摂食の亢進が認められ、さらに加齢に伴い末梢標的組織でのインスリン抵抗性が認められる (Science 289:2122, 2000)。このように、脳のインスリン作用は末梢組織のインスリン

感受性の調節において重要な役割を果たしている。そのメカニズムの詳細は明らかではないが、近年、迷走神経の介在が明らかになり (Endocrinology, 147:2664, 2006)、糖代謝調節における中枢と末梢組織の連係機構が解明されつつある。

視床下部は生体のエネルギーバランス調節の中枢であり、その中でも中心的な役割を果たしているのが最近発見された神経ペプチドのオレキシン (別称: ヒポクレチン) である。オレキシンは血糖値が低下した際に発現し、覚醒レベルや自発運動量 (探索行動) を増加させ、摂食に導く役割を果たしている (Sleep Med Rev 9:231, 2005)。そのため、オレキシンを欠損したヒトではナルコレプシー症状 (睡眠障害) が現れ、しかもその多くは肥満を呈する (Lancet, 355:1274, 2000)。同様に、オレキシン神経除去マウスやオレキシン欠損マウスもナルコレプシー様の睡眠障害を示し、高脂肪食負荷により過度の肥満を呈する。このように、オレキシンが欠損すると摂食量がわずかに減少するものの、それを上回る程度に生体内のエネルギー消費が減少し、肥満を誘発すると考えられている。

このように、オレキシンは全身のエネルギーバランスの維持に不可欠な因子である。しかし、最も重要な生体のエネルギー源である糖 (グルコース) の代謝調節におけるオレキシンの役割は不明であった。また視床下部において、オレキシン神経系がインスリン作用に影響するかどうかは全く検討されていなかった。

2. 研究の目的

視床下部のインスリン作用は末梢組織のインスリン感受性を増大させ、糖代謝を促進する役割を果たしている。しかし視床下部のインスリン作用を正常に維持するための機構は明らかにされていない。我々はこれまでにオレキシンの血糖値に及ぼす影響を検討し、マウスの腹腔内にオレキシンを投与すると空腹時血糖が低下することを見出した。この作用はオレキシンAとオレキシンBの両タイプに共通であり、特に、ストレプトゾトシン糖尿病モデルマウスで顕著な血糖降下作用を認めた。しかもオレキシンを脳室内に投与しても同様の血糖降下作用が誘発されたので、オレキシンは中枢性に空腹時血糖を低下させることが示された (Eur J Pharmacol 448:245, 2002)。したがって、オレキシンが糖代謝調節に重要な役割を果たしており、その機構には視床下部でのオレキシンとインスリンの機能的連係が関与していると想定された。そこで本研究では、オレキシン神経系を創薬標的としたインスリン抵抗性疾患に対する新しい治療戦略の創出を目指し、オ

レキシン欠損マウスを用いて、視床下部でのオレキシンとインスリンのホルモンネットワークの存在意義を検討した。特に、膵臓から分泌されるインスリンは肝などの末梢標的組織に直接作用して血糖降下を引き起こすだけでなく、オレキシンの発現を介して視床下部のインスリン作用を促進し、末梢組織のインスリン感受性を増加させる役割を果たしていることを実証する。その結果、糖代謝調節において、これまで独立した機構と考えられていた視床下部と末梢組織のインスリン作用が、実際にはオレキシンを介して連動する機構であることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) オレキシン欠損マウスにおける耐糖能およびインスリン感受性の変化の解析

オレキシン欠損マウス (筑波大学・桜井武博士より分与) に通常食または高脂肪食を摂取させ、経口糖負荷試験とインスリン負荷試験を行った。

(2) オレキシン欠損マウスの脳内におけるインスリンシグナルの解析

若齢 (3 ヶ月齢) および加齢 (9 ヶ月齢) のオレキシン欠損マウスの尾静脈内にインスリン (4 U/kg) を投与した後、15 分後に視床下部、肝臓および骨格筋を摘出した。またインスリンの脳室内投与実験においては、麻酔下で同マウスの側脳室内にガイドカニューレを挿入、固定し、1 週間の回復期間の後にインスリン (10 mU) を注入して、5 分後に視床下部を摘出した。さらにこれらの組織よりタンパクを抽出して、インスリンシグナルに関わるインスリン受容体、Akt/プロテインキナーゼ B、グリコーゲン合成酵素キナーゼ β (GSK3 β) および ERK-MAP キナーゼのリン酸化の変化をウエスタンブロット法で解析した。また、インスリンシグナルの変化がオレキシンの投与により可逆的に回復するかどうかを明らかにするため、オレキシン欠損マウスの脳室内にオレキシンを投与し、Akt リン酸化レベルを解析した。これらの検討により、オレキシンによる中枢と末梢のインスリン作用の制御機構を明らかにする。

(3) オレキシン欠損マウスの肝臓における遺伝子発現および血清蛋白レベルの解析

オレキシン欠損マウスの耐糖能異常に関与する因子を明らかにするため、加齢したオレキシン欠損マウスより肝臓を摘出して、RNA を抽出し、遺伝子発現の変化をジーンチップ解析システム (アフィメトリクス社) を用いて網羅的に解析した。また、血清中のインスリン濃度や脂肪細胞から分泌されるレプチンなどのアディポカイン量を ELISA 法を用いて検討した。

(4) 加齢したオレキシン欠損マウスにおけるエネルギーバランスの変化の解析

9-12 ヶ月齢のオレキシン欠損マウスの自発運動量および摂食量を野生型マウスと比較した。マウスの運動量は行動解析装置 SCANET を用いて計測した。

4. 研究成果

雄性オレキシン欠損マウスは9ヶ月齢まで加齢すると、正常体重であるにも関わらず、耐糖能異常、インスリン感受性の低下に加え、高インスリン血症を示した。そこでオレキシンの欠損が生体内でインスリンシグナルに及ぼす影響を検討したところ、野生型マウスの視床下部ではインスリン投与に伴い Akt(Ser473)のリン酸化が増大するのに対し、2-3 および9ヶ月齢のオレキシン欠損マウスの視床下部では Akt(Ser473)のリン酸化レベルの基礎値が上昇しており、インスリンによるリン酸化促進作用は消失することが示された。オレキシン欠損マウスの脳室内にインスリンを投与した場合にも、同様の異常が認められた。浸透圧ポンプを用いてオレキシン欠損マウスの脳室内にオレキシンを2週間連続投与したがシグナルの異常は改善されず、より長期的なオレキシン欠損の影響であることが示された。さらに、9ヶ月齢の雄性マウスにおいて、インスリンシグナル (Akt 経路) の下流に位置する GSK-3 β のリン酸化を解析したところ、オレキシン欠損マウスの視床下部では、Akt と同様に、リン酸化の基礎値の上昇とインスリン反応不全が認められた。さらに、インスリンシグナル (Akt 経路) の上流に位置するインスリン受容体のチロシンリン酸化レベルを解析した結果、野生型マウスと比較して、オレキシン欠損マウスの視床下部においてインスリン刺激によるリン酸化の有意な低下がみられた。また摂食の制御に関わる視床下部の AMP キナーゼ活性はオレキシン欠損により減少した。

一方、末梢組織 (骨格筋および肝臓) では、若齢のオレキシン欠損マウス (2-3 ヶ月齢) においては Akt/GSK3 β シグナルに明らかな異常は認められなかったが、加齢したオレキシン欠損マウス (9 ヶ月齢) ではインスリンによる Akt および GSK3 β のリン酸化が著明に低下した。ERK-MAP キナーゼのリン酸化には異常は認められなかった。以上の結果から、長期間に及ぶオレキシンの欠損は視床下部でのインスリン作用不全を引き起こし、さらに末梢組織のインスリン抵抗性を増大させると考えられる。その機構の詳細は不明であるが、インスリン受容体の活性は、Akt (Ser473) の持続的なリン酸化によりネガティブフィードバック調節を受けて抑制されることが知られていることから (Circ Res 96:180, 2005)、オレキシン欠損マウスの視床下部では、インスリン受容体レベルにおいてもインスリン感受性の低下が引き起こされ、インスリン抵

抗性の一因になっていると考えられる (図 1)。

雌性オレキシン欠損マウスも雄性オレキシン欠損マウスと同様のインスリンシグナルの異常を示す一方、加齢に伴い軽度の肥満を呈した。実際、雌性オレキシン欠損マウスの内臓脂肪重量は12ヶ月齢において野生型マウスよりも有意に増加した。また雌性オレキシン欠損マウスは、加齢に伴い、高インスリン血症に加え高レプチン血症を呈した。しかも、6ヶ月間の高脂肪食 (30% fat) 負荷により雌性オレキシン欠損マウスのみ著明に肥満し、著しい耐糖能異常およびインスリン抵抗性を示した。なお、9ヶ月齢のオレキシン欠損マウスの自発運動量および摂食量は、雌雄ともに野生型マウスより低下しており、加齢に伴うエネルギー代謝異常の性差には直接関与していなかった。

雌性オレキシン欠損マウスに選択的に認められるエネルギー恒常性の異常の原因をさらに追究するため、高脂肪食 (60% fat) 負荷時の体重およびインスリンシグナルの性差について検討した。2-3 ヶ月齢の雄性マウスでは体重増加においてオレキシン欠損の影響は認められなかったが、雌性オレキシン欠損マウスでは野生型マウスと比べ有意に体重が増加した。この状態において、4 U/kg のインスリンを尾静脈内投与し、15 min 後の骨格筋および肝臓における Akt (Ser473) のリン酸化をウェスタンブロット法により検討した結果、雄性野生型マウスと雌性オレキシン欠損マウスでは骨格筋、肝臓のいずれにおいても、Akt のリン酸化が同程度まで上昇し、明らかな異常は見られなかった。同様の結果が雌性マウスにおいても得られた。したがって、加齢に伴う雌性オレキシン欠損マウスの肥満には Akt シグナル以外の異常の関与が示唆された。

雌性オレキシン欠損マウスではレプチン濃度の上昇が認められたので、レプチン抵抗性である可能性が考えられた。そこで、9ヶ月齢の雌性オレキシン欠損マウスの腹腔内にレプチンを投与し、細胞内シグナルを解析した結果、肝臓における STAT3 リン酸化の有意な減弱が認められた。従ってオレキシン欠損に伴うレプチン感受性の低下が、肝臓でのインスリン感受性の低下を誘発することが示唆された。

加齢したオレキシン欠損マウスの肝臓における遺伝子発現を GeneChip を用いて網羅的に解析した結果、糖新生に関わる Foxa2 やグリコーゲン合成・分解に必須な glycogenin、glycogen debranching enzyme の発現量に異常が認められた。またインスリンシグナルに関わるインスリン受容体、インスリン受容体基質および protein kinase C ξ の発現量にも低下が見られた。その他、オレキシン欠損マウスの肝臓では、apoptosis-associated

tyrosine kinase や MyD118 などのアポトーシス関連遺伝子の増大や、Jun B および early growth response 1 のような肝の再生に関わる遺伝子の減少が見られ、オレキシン欠損による耐糖能異常およびインスリン感受性の低下に一部寄与する可能性が考えられた。

以上の結果から、末梢インスリン抵抗性の増加とそれに伴う血糖値の上昇によりオレキシンの発現が持続的に低下すると、視床下部と末梢組織のインスリンネットワークが破綻し、末梢のインスリン抵抗性がさらに増大するという悪循環が想定された(図1)。雌性ではさらにレプチン抵抗性の関与も示唆された。このようにオレキシンは、インスリン作用を調節するための視床下部と末梢組織の臓器連関における統合中枢としての役割を果たしており、加齢依存的なインスリン抵抗性に対する防御因子であると考えられる。

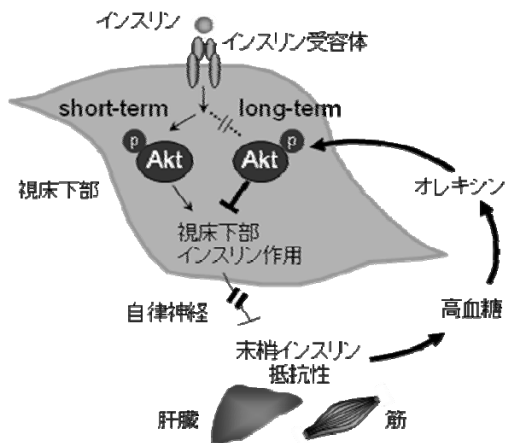


図1. オレキシンの欠乏による視床下部インスリンシグナルの破綻とそれに伴うインスリン抵抗性増大の悪循環

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 1 件)

Tsuneki H., Murata S., Anzawa Y., Soeda Y., Tokai E., Wada T., Kimura I., Yanagisawa M., Sakurai T., and Sasaoka T. Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice. *Diabetologia*, 51, 657-667 (2008)、査読有り

[学会発表] (計 7 件)

(1) 恒枝宏史, 安澤雄生, 添田義行, 東海絵美, 村田直, 和田努, 笹岡利安. 視床

下部オレキシン神経系によるインスリンおよびレプチン感受性調節機構. 第20回分子糖尿病学シンポジウム, 2008, 12, 13, 東京.

- (2) 安澤雄生, 恒枝宏史, 添田義行, 東海絵美, 和田努, 笹岡利安. マウス視床下部のインスリン作用に与えるオレキシンの影響の解析. 第8回日本内分泌学会北陸支部学術集会, 2008, 11, 15, 金沢.
- (3) 恒枝宏史, 安澤雄生, 添田義行, 東海絵美, 村田直, 和田努, 笹岡利安. 加齢依存的な末梢のインスリン抵抗性を防御する視床下部性制御機構におけるオレキシンの役割. 第51回日本糖尿病学会年次学術集会, 2008, 5, 22-24, 東京.
- (4) Tsuneki H., Murata S., Anzawa Y., Soeda Y., Tokai E., Wada T., Kimura I., and Sasaoka T. Orexin deficiency impairs glucose tolerance and insulin sensitivity in mice. *Keystone Symposia on Neuronal Mechanisms Controlling Food Intake, Glucose Metabolism and Body Weight*, 2008, 2, 19-24, Banff, Canada.
- (5) Tsuneki H., Murata S., Anzawa Y., Soeda Y., Wada T., Kimura I., and Sasaoka T. Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice. *American Diabetes Association (ADA) 67th Scientific Session*, 2007, 6, 22-26, Chicago, U.S.A.
- (6) 恒枝宏史, 安澤雄生, 村田直, 添田義行, 和田努, 笹岡利安. オレキシン欠損マウスにおける視床下部および末梢組織での加齢によるインスリン抵抗性の増大. 第50回日本糖尿病学会年次学術集会, 2007, 5, 24-26, 仙台.
- (7) Sasaoka T., Wada T., Soeda Y., Anzawa Y., and Tsuneki H. Impact of lipid phosphatase and orexin on brain metabolic insulin signaling in age related insulin resistance. 第50回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム), 2007, 5, 24-26, 仙台.

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・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・教授
研究者番号：00272906