

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16347

研究課題名（和文）中枢を介した成長や老化、糖代謝制御の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of growth, aging, and glucose metabolism control by the central nervous system

研究代表者

林 高則（Hayashi, Takanori）

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：50749257

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）：中枢神経系のインスリン・IGF-1シグナルが糖代謝や成長・寿命に関与することが報告されているが、その分子機構、特に両シグナルの主要な細胞内基質であるIrs1の役割は不明である。本研究では脳特異的Irs1欠損マウスを作成、解析を行い、本マウスが視床下部GRHRの発現が低下し成長障害を呈すること及び骨格筋において良好なインスリン感受性を示すことを明らかとした。またIrs1発現を低下させた視床下部神経細胞株ではIGF-1刺激による神経突起の伸長が抑制された。脳のIrs1は視床下部GHRHニューロンにおけるIGF-1誘導性の神経突起伸長に関与し、成長や糖代謝に重要な役割を担っているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では2系統の異なる脳特異的Irs1欠損マウスを独自に作成しその解析を行っており、類似の研究結果は国内外を含め発表されていない。今回の研究で我々は中枢のIrs1が神経の伸長や糖代謝に関与することを明らかとした。今後さらに中枢のIrs1の病態生理学的役割の解明へと研究を進展させることで、脳虚血や脳外傷、神経変性疾患、糖尿病等の疾患の病態解明や治療につながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Although insulin and IGF-1 signaling in the central nervous system have been reported to be involved in glucose metabolism, growth, and lifespan, the molecular mechanisms of these signals, especially the role of Irs1, a major intracellular substrate of both signals, in the central nervous system is unknown. In this study, we generated brain-specific Irs1-deficient mice. These mice showed growth retardation with reduced expression of GRHR in hypothalamus. Moreover, these mice exhibited increased insulin sensitivity and glucose utilization in the skeletal muscle. In vitro, neurite elongation after IGF-1 stimulation was significantly impaired by Irs1 downregulation in the cultured hypothalamic neurons. These data suggest that Irs1 plays important roles in the regulation of neurite outgrowth of GHRH neurons, somatic growth, and glucose homeostasis.

研究分野：糖尿病

キーワード：インスリン受容体基質-1 成長 中枢神経

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インスリン受容体基質 (Insulin receptor substrate: Irs) はインスリン及び IGF (Insulin-like growth factor) -1 シグナルにおける主要な細胞内基質である。我々はこれまでに、Irs1 が成長や糖代謝に関与する重要な分子であることを全身 Irs1 欠損マウスの解析から明らかとしてきたが (Nature. 372:182, 1994)、その責任臓器や詳細なメカニズムは分かっていない。2000 年代に入り脳特異的インスリン受容体 (IR) 欠損マウス等の研究から、中枢におけるインスリンシグナルが摂食調節や糖代謝に関与している事が報告され (Science. 289:2122, 2000, J Clin Invest. 115:940, 2005)、中枢神経系が肝臓や骨格筋、脂肪細胞と同様にインスリン作用臓器として重要な役割を担っていることが認識されてきた。一方非常に興味深いことに、中枢の IGF-1 シグナルはインスリンシグナルとは異なり、主に成長や寿命に関与し、また摂食調節とは独立して糖代謝に影響を及ぼすことが脳特異的 IGF-1 受容体欠損マウスの解析から明らかとなった (PLoS Biol. 6:e254, 2008)。これらの報告は中枢においてインスリンシグナルと IGF-1 シグナルが異なるメカニズムによって成長、寿命、摂食、糖代謝を制御している可能性を示唆している。しかし今なお、中枢のインスリン・IGF-1 シグナルがそれぞれどのような分子機序で糖代謝や成長・寿命を調節しているかについては十分に解明されておらず、特に両シグナルの下流に位置する Irs1 の中枢神経系での役割は不明である。

### 2. 研究の目的

中枢のインスリン・IGF-1 シグナルを介した成長や寿命、代謝制御機構を明らかにするために、我々はこれまでに Nestin-Cre マウスと Irs1 flox マウスから脳特異的 Irs1 欠損マウスを作成しその解析をおこなった。その結果これまでに、この脳特異的 Irs1 欠損マウスが摂食調節とは独立して成長障害をきたし、また良好なインスリン感受性をきたすことを見出した。本研究ではさらに Synapsin-Cre マウスからもう一系統の脳特異的 Irs1 欠損マウスの作成しその解析を行うことで、その表現型を確認するとともに、これらの脳特異的 Irs1 欠損マウスを用いて、第一に中枢の Irs1 による成長、寿命、老化の制御機構を、第二に中枢の Irs1 による糖代謝の制御機構を明らかとする。さらに第三に中枢のどのニューロンにおける Irs1 がどのようなメカニズムで成長や糖代謝制御の役割を担うかについて、神経細胞レベルでの Irs1 の役割を解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

神経に選択性の高い発現を誘導する Nestin 遺伝子の制御下に Cre 蛋白を発現する Nestin-Cre マウスと Irs1 flox マウスから脳特異的 Irs1 欠損マウス (NIrs1KO マウス) を作成し、成長や糖代謝に関する解析を行った。さらに Synapsin のプロモーターから Cre 蛋白を発現する Synapsin-Cre マウスからもう一系統の脳特異的 Irs1 欠損マウス (Syn-Irs1KO マウス) の作成しその表現型の解析を行った。さらに GHRH 産生視床下部神経細胞株を用い、Irs1 発現を低下させたときのインスリン・IGF-1 シグナルの変化やその時の神経細胞の増殖や形態的变化を解析した。

### 4. 研究成果

NIrs1KO マウスの表現型の解析を行ったところ、このマウスは対照マウスと比べ全長が有意に短く、また体重も小さかった。一方、体重に対する脳や心臓、肝臓、腎臓、骨格筋、褐色脂肪組織の重量比には差を認めず、また体脂肪率や内臓脂肪と皮下脂肪の比率にも差を認めなかった。CT を用いた骨の解析では、NIrs1KO マウスは大腿骨長や脛骨長が有意に短く、骨体積や骨塩量、骨密度も有意に低かった。また Syn-Irs1KO マウスにおいても NIrs1KO マウスと同様の表現型を認めた。一方、脳特異的 IR 欠損マウスや IRS-2 欠損マウスで認められた摂食量の亢進は NIrs1KO マウスでは認められず、視床下部における proopiomelanocortin (POMC)、agouti-related protein (AgRP)、neuropeptide Y (NPY) といった摂食関連ペプチドの発現量も対照マウスと差を認めなかった。これらの結果から脳における Irs1 の欠損は骨形成障害を伴う均整の取れた成長障害を引き起こすことが明らかとなった。

次にこの成長障害のメカニズムを明らかにするために、成長において重要な役割を担っている GH 及び IGF-1 の検討を行った。血中 GH 濃度や下垂体での GH の mRNA 発現量は NIrs1KO マウスにおいて有意に低く、血中 IGF-1 濃度や肝臓での IGF-1 の mRNA 発現量も同様に低値であった。一方で GH の強力な分泌刺激因子である成長ホルモン放出ペプチド-2 の投与を行ったところ、NIrs1KO マウスにおいても血中 GH 濃度は上昇を認めたことから、下垂体での GH 分泌能は保たれていることが示唆された。そこで次に、NIrs1KO マウスの視床下部において GH 分泌を正に制御する GHRH 及び負に制御するソマトスタチンの発現量を検討した結果、ソマトスタチンの発現量

に差を認めなかった一方、GHRH の発現量は Nlrs1KO マウスにおいて有意に低下していた。また GHRH の免疫染色を行った結果、Nlrs1KO マウスでは蛋白レベルでその発現が低下していることが確認された。以上の結果から、脳における Irs1 の欠損は視床下部 GHRH の発現を低下させ、その結果下垂体での GH、さらには肝臓での IGF-1 の産生低下を引き起こす可能性が示唆された。野生型マウスの視床下部連続切片において Irs1 及び GHRH の免疫染色を行った結果、GHRH 染色陽性部位にほぼ一致して、視床下部正中隆起において IRS-1 染色陽性部位が確認された。そこで次に視床下部 GHRH ニューロンにおける Irs1 の役割を明らかにすべく、GHRH 産生視床下部神経細胞株を用いた *in vitro* の検討を行った。これまでに IGF-1 刺激が PI3K/Akt シグナルを介して GHRH ニューロンの神経突起の伸長を促進することが報告されており (PLoS One. 12:e0170083, 2017)、本研究においても Irs1 をノックダウンしていない対照ニューロンでは IGF-1 刺激により神経突起は有意に伸長し、この時の Akt リン酸化も有意に亢進していたが、Irs1 をノックダウンしたニューロンでは IGF-1 刺激によるこれらの変化が有意に抑制された。この結果と同様に、対照ニューロンでは IGF-1 刺激により GHRH の mRNA 発現量が増加したが、Irs1 のノックダウンではこの増加が有意に抑制された。一方でニューロンの増殖に関しては Irs1 のノックダウンにより変化を認めなかった。以上の結果から、視床下部 GHRH ニューロンにおいて、Irs1 はニューロンの増殖ではなく IGF-1 誘導性の神経突起伸長に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

成長障害が認められた Nlrs1KO マウスにおいて、糖代謝の検討を行った。インスリン負荷試験において、インスリン投与の血糖値は Nlrs1KO マウスで有意に低く、また経口ブドウ糖負荷試験では糖負荷後の血中インスリン値には差を認めなかったものの、糖負荷後の血糖値は Nlrs1KO マウスで有意に低値であった。以上の結果より本マウスはインスリン感受性が亢進しており耐糖能が良好であることが明らかとなった。さらに下大静脈からのインスリン投与後の各臓器における Akt のリン酸化を検討した結果、Nlrs1KO マウスでは肝臓や白色脂肪組織におけるインスリン投与後の Akt のリン酸化は対照マウスと同程度であった一方、骨格筋ではインスリン投与後の Akt のリン酸化は対照マウスと比べ有意に亢進していた。また、Nlrs1KO マウスは活動量には差を認めなかった一方、呼吸代謝測定により経時的に呼吸商を測定すると暗期において呼吸商が高値であった。以上の結果から、Nlrs1KO マウスでは骨格筋でのインスリン感受性が亢進しており、活動期において糖利用が増えている可能性が示唆された。

以上の結果から、脳の Irs1 は視床下部 GHRH ニューロンにおける IGF-1 誘導性の神経突起伸長に関与し、成長や糖代謝に重要な役割を担っているものと考えられた。ニューロンの増殖や伸長は胎生期や出生後早期のみならず、虚血や外傷、神経変性疾患などの病態においても生じることが知られている。脳における Irs1 の病態生理学的役割に関しては今後の検討課題であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 林高則、窪田直人	4. 巻 85
2. 論文標題 脳におけるインスリン・IGF-1シグナルの役割について；インスリン受容体基質（IRS）-1の役割を中心に	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本体質医学会誌	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Hatamoto Yoichi, Tanoue Yukiya, Yoshimura Eiichi, Matsumoto Mai, Hayashi Takanori, Ogata Hitomi, Tanaka Shigeho, Tanaka Hiroaki, Higaki Yasuki	4. 巻 153
2. 論文標題 Delayed Eating Schedule Raises Mean Glucose Levels in Young Adult Males: a Randomized Controlled Cross-Over Trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tjnut.2022.12.024	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 Hayashi Takanori, Wada Nobuhiro, Kubota Tetsuya, Koizumi Chie, Sakurai Yoshitaka, Aihara Masakazu, Usami Satoshi, Yamauchi Toshimasa, Kubota Naoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Associations of sleep quality with the skeletal muscle strength in patients with type 2 diabetes with poor glycemic control	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 801 ~ 810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.14007	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 Aihara Masakazu, Jinnouchi Hideaki, Yoshida Akira, Ijima Hiroko, Sakurai Yoshitaka, Hayashi Takanori, Koizumi Chie, Kubota Tetsuya, Usami Satoshi, Yamauchi Toshimasa, Sakata Toshiya, Kadowaki Takashi, Kubota Naoto	4. 巻 199
2. 論文標題 Evaluation of glycated albumin levels in tears and saliva as a marker in patients with diabetes mellitus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diabetes Research and Clinical Practice	6. 最初と最後の頁 110637 ~ 110637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.diabres.2023.110637	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 -

1. 著者名 Aihara Masakazu, Hayashi Takanori, Koizumi Chie, Sakurai Yoshitaka, Sawada Mika, Kubota Tetsuya, Kadowaki Takashi, Yamauchi Toshimasa, Kubota Naoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Bi-weekly Glycated Albumin Measurement was Useful to Encourage Behavioral Changes in People with Type 2 Diabetes Mellitus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diabetes Therapy	6. 最初と最後の頁 1711 ~ 1721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13300-023-01452-y	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 Yoshimura Eiichi, Hamada Yuka, Hatamoto Yoichi, Nakagata Takashi, Nanri Hinako, Nakayama Yui, Hayashi Takanori, Suzuki Ippei, Ando Takafumi, Ishikawa Takata Kazuko, Tanaka Shigeo, Ono Rei, Park Jonguk, Hosomi Koji, Mizuguchi Kenji, Kunisawa Jun, Miyachi Motohiko	4. 巻 32
2. 論文標題 Effects of energy loads on energy and nutrient absorption rates and gut microbiome in humans: A randomized crossover trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Obesity	6. 最初と最後の頁 262 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/oby.23935	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 -

1. 著者名 Sakurai Yoshitaka, Kubota Naoto, Takamoto Iseki, Wada Nobuhiro, Aihara Masakazu, Hayashi Takanori, Kubota Tetsuya, Hiraike Yuta, Sasako Takayoshi, Nakao Harumi, Aiba Atsu, Chikaoka Yoko, Kawamura Takeshi, Kadowaki Takashi, Yamauchi Toshimasa	4. 巻 73
2. 論文標題 Overexpression of UBE2E2 in Mouse Pancreatic $\beta$ -Cells Leads to Glucose Intolerance via Reduction of $\beta$ -Cell Mass	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 474 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db23-0150	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林高則、窪田直人、窪田哲也、桜井賛孝、相原允一、門脇孝、山内敏正
2. 発表標題 インスリン受容体基質の脳・視床下部神経細胞における役割の検討
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林高則、和田亘弘、窪田哲也、小泉千恵、山内敏正、窪田直人
2. 発表標題 2型糖尿病患者における睡眠と筋力・骨格筋量の関連の解析
3. 学会等名 第37回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林高則、和田亘弘、窪田哲也、小泉千恵、山内敏正、窪田直人
2. 発表標題 2型糖尿病患者における睡眠と筋力・骨格筋量・食事内容の関連の解析
3. 学会等名 第43回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林高則、小泉千恵、窪田直人
2. 発表標題 糖尿病患者における睡眠とサルコペニアの関連の解析
3. 学会等名 第118回日本内科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林高則、窪田直人、窪田哲也、和田亘弘、相原允一、山内敏正
2. 発表標題 中枢におけるインスリン受容体基質(Irs)1の成長や代謝に対する役割の解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林高則, 和田亘弘, 窪田哲也, 小泉千恵, 窪田直人
2. 発表標題 2型糖尿病患者における睡眠と筋力・体組成の関連の解析
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林高則, 小泉千恵, 和田亘弘, 窪田哲也, 窪田直人
2. 発表標題 2型糖尿病患者における使用薬剤と睡眠、食品摂取内容の関連の解析
3. 学会等名 第24回・25回日本病態栄養学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林高則、和田亘弘、小泉千恵、窪田哲也、山内敏正、窪田直人
2. 発表標題 「2型糖尿病患者における睡眠が筋力・骨格筋量・食事内容及ばす影響の検討
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林高則、飯降直男、沖杉真理、福島崇夫
2. 発表標題 パシレオチド開始後に著明なインスリン分泌低下を伴う糖尿病を発症し、少量のSU薬が著効した先端巨大症の1例
3. 学会等名 第692回日本内科学会関東地方会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 林高則、窪田哲也、門脇孝、窪田直人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 9
3. 書名 糖尿病学2022	

1. 著者名 林高則、窪田哲也、門脇孝、窪田直人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 8
3. 書名 糖尿病・内分泌代謝科	

1. 著者名 林高則、窪田直人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカ出版	5. 総ページ数 8
3. 書名 Nutrition Care	

1. 著者名 林高則、窪田直人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 毎日新聞出版	5. 総ページ数 1
3. 書名 The Mainichi Medical Journal	



1. 著者名 林高則、窪田直人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 7
3. 書名 Medical Practice	

1. 著者名 林高則、窪田直人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 3
3. 書名 糖尿病プラクティス	

1. 著者名 林高則、窪田直人	4. 発行年 2023年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 6
3. 書名 Heart View	

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------