

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590970

研究課題名（和文）視床下部の KATP チャンネル／インスリンシグナルによる糖代謝制御

研究課題名（英文）Roles of KATP channel/insulin signaling in the hypothalamus on the regulation of glucose homeostasis

研究代表者

三木 隆司 (MIKI TAKASHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50302568

研究成果の概要（和文）：K<sub>ATP</sub> チャンネルは代謝センサー分子として、様々な細胞の興奮性を制御している。特に、代謝制御中枢である視床下部の K<sub>ATP</sub> チャンネルは、インスリン標的臓器の代謝制御に関与すると考えられている。本研究では K<sub>ATP</sub> チャンネル欠損マウスの解析により、脳の K<sub>ATP</sub> チャンネルが脂肪組織のインスリンシグナルを制御していることと、視床下部と脳幹の特定の神経核で K<sub>ATP</sub> チャンネル依存性に糖が感知されていることを解明した。

研究成果の概要（英文）：

K<sub>ATP</sub> channel is suggested to regulate cellular excitability of various cell types by acting as a metabolic sensor. Especially, the channel in the hypothalamus, the metabolic center in the body, plays an important role in metabolic regulation of insulin targeted tissues. In the present study, we found that insulin signaling in the adipose tissues is modulated exogenously by the brain K<sub>ATP</sub> channel and that K<sub>ATP</sub> channel is involved in the glucose sensing in several nuclei in the brain stem as well as the hypothalamus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：エネルギー・糖質代謝異常

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生体の糖代謝制御に複数の臓器が関わるネットワークが関与していることが明らかになってきた。この中で、脳と、骨格筋・脂肪組織・肝臓などのインスリン標的組織の間の神経性制御の重要性が次第に解明されつつある。

生体細胞の代謝感知機構は複雑であり、ま

だその分子メカニズムは多くが不明である。この中で K<sub>ATP</sub> チャンネルは、脳をはじめとする興奮性細胞に発現しており、インスリンを分泌する膵β細胞では細胞内の ATP 濃度を感知するセンサーとして機能する (Miki et al., PNAS, 1998)。K<sub>ATP</sub> チャンネルは、生体の代謝制御の最高中枢である視床下部にも発現し、脳内でのグルコース感知に必須の役割を果た

している (Miki et al., Nat Neurosci 2001) ことから、脳による全身の糖代謝制御にも重要な役割を果たしていることが考えられる。しかしながら、視床下部の  $K_{ATP}$  チャンネルによる、全身の代謝制御機構はほとんど不明であった。

## 2. 研究の目的

興味深いことに、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスでは、 $K_{ATP}$  チャンネルが発現する骨格筋のみならず、発現のない脂肪組織でもインスリン依存性グルコース取り込みが亢進し、脂肪組織外の器官に制御されていることが考えられた。しかしながら、脂肪組織のインスリンシグナルと視床下部での  $K_{ATP}$  チャンネルシグナルが協調機構は全く不明である。そこで本研究では、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスを用いて、視床下部の  $K_{ATP}$  チャンネルによる脂肪組織などのインスリン標的組織の糖代謝制御の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、 $K_{ATP}$  チャンネルのポアサブユニットを構成する Kir6.2 を遺伝子破壊した  $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスを用いて、 $K_{ATP}$  チャンネルのインスリンシグナルへの関与を検討した。まず脂肪組織のインスリンシグナルを、*in vivo* 条件下で検討した。その結果、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスでインスリンシグナルの異常が認められたため、次に  $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスと野生型マウスから脂肪前駆細胞を単離し、*in vitro* の条件下で成熟脂肪細胞に分化させ、再びインスリンシグナルを検討した。さらに脂肪組織のインスリンシグナルが液性制御されているのか、あるいは神経性制御されているかを明らかにする目的で、神経性制御の影響を除外する目的で、皮下脂肪組織を別のマウスの皮下に移植する実験系を樹立した。

さらに、脳の  $K_{ATP}$  チャンネルが脂肪組織でのインスリンシグナルを調節している可能性が考えられたため、脳の  $K_{ATP}$  チャンネルの糖感知機構について解析した。この目的で、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスと野生型マウスの側脳室内にインスリン、グルコース、2-デオキシグルコース (2DG) を投与し、摂食量の変化、インスリンシグナル、BDNF の発現量の変化、神経の活性化などを解析した。

## 4. 研究成果

### 1) 脂肪組織におけるインスリンシグナルの

#### *in vivo* 解析

我々は以前、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスでは白色脂肪組織でのインスリン依存性のグルコース取り込みが、野生型マウスと比較し有意に増加していることを報告した (Miki et al, Am

J Physiol 2002)。しかしながら、白色脂肪組織には  $K_{ATP}$  チャンネルを構成する Kir6.2 や SUR1 が発現しておらず、電気生理学的解析からも白色脂肪細胞には  $K_{ATP}$  チャンネルは存在しないと考えられている。このことから、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスの白色脂肪組織におけるグルコース取り込み亢進には、白色脂肪細胞以外に存在する  $K_{ATP}$  チャンネルが関与していることが考えられた。

そこでまず、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスを用いて *in vivo* 条件下でインスリンシグナルを解析した。具体的には、少量のインスリンを投与し、Akt1 のリン酸化を指標にインスリンシグナルを解析した。しかしながら、様々なインスリン量で刺激しても  $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスで Akt1 リン酸化が亢進していることを示す結果は得られなかった。しかしながら、大変興味深いことに、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスの脂肪組織ではリン酸化 Akt1 のアクリルアミドゲルでの泳動度が野生型と異なることから、リン酸化 Akt1 蛋白に何らかの生化学的な修飾が加わっていることが示唆された。 現在も質量分析研究などにより、この分子実態を解析中である。

### 2) *in vitro* 分化させた成熟脂肪細胞におけるインスリンシグナルの解析

リン酸化 Akt1 の生化学的な変化が、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスの脂肪細胞において cell autonomous な機序で生じているのかを検証した。この目的で、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスと野生型マウスから *in vitro* の培養条件下で分化させた成熟脂肪細胞で、リン酸化 Akt1 の生化学的特性を検討した。その結果、*in vitro* の条件下の実験では、リン酸化 Akt1 の泳動度の異常が全く見られず、この変化には白色脂肪組織以外の組織からの  $K_{ATP}$  チャンネル依存性のシグナル入力が寄与していることが明らかになった。

### 3) 脂肪組織のインスリンシグナル制御における神経制御の関与

そこで次に、リン酸化 Akt1 の生化学的な変化が、脂肪組織外の神経入力により制御されているのか、液性因子により制御されているのかを検証する目的で、神経制御を除外できる異所性脂肪組織移植の実験系を確立した。 すなわち、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスの大腿部より単離した皮下脂肪組織を別の  $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスの背部皮下に移植し、移植した脂肪組織におけるリン酸化 Akt1 の生化学的特性を検討することとした。この目的で、同種脂肪移植の実験系を樹立した。ようやく、移植後の栄養状況などを均等にする実験系が整い、現在、移植脂肪組織のインスリンシグナルを解析しているところである。

#### 4) 脳の $K_{ATP}$ チャンネルの栄養感知における役割の解明

我々は既に代謝制御の中核である視床下部に、膵β細胞の  $K_{ATP}$  チャンネルと同じ分子構造（即ち Kir6.2+SUR1）を有する  $K_{ATP}$  チャンネルが発現し、視床下部腹内側核（VMH）のグルコース応答性ニューロンにおけるグルコース感知に  $K_{ATP}$  チャンネルが必須の役割を果たしていることを見いだした。しかしながら、視床下部の他の神経核、あるいは視床下部以外の核における栄養感知における  $K_{ATP}$  チャンネルの役割は全く不明であった。

#### ① 視床下部のインスリンシグナルにおける視床下部 $K_{ATP}$ チャンネルの役割の解析

Pocai らは視床下部におけるインスリンシグナルによる肝臓の糖代謝制御に視床下部の  $K_{ATP}$  チャンネルが極めて重要であることを報告した (Pocai, Nature 2005)。そこで、我々は視床下部におけるインスリンと  $K_{ATP}$  チャンネルのシグナルクロストークを解析した。

この目的で、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスと野生型マウスにインスリン脳室内投与し、摂食抑制とインスリンシグナルを解析した。しかしながら、既報の論文通りの条件、あるいは様々な実験条件で実験を行ったにもかかわらず、野生型マウスですら、インスリンによる摂食抑制は全く見られなかった。陽性対照実験として摂食亢進ペプチドである NPY や、摂食を亢進させる代謝阻害剤である 2DG を脳室内投与した際には、安定して摂食亢進応答が観察されることから、脳室内薬物投与の実験系には問題がないことは示された。したがって、少なくとも我々の実験系では、外因性のインスリンの脳室内投与による摂食抑制応答は観察できないと結論付けた。さらに、インスリンの脳室内投与による視床下部でのインスリンシグナルを Akt1 のリン酸化を指標に解析したが、視床下部の Akt1 は絶食状態で既に強くリン酸化されており、インスリンの脳室内投与によるリン酸化の上乗せ効果は全く見られなかった。近年、複数の研究者から既報の条件 d のインスリン脳室内投与では摂食が制されないとの情報を得ており、本研究では視床下部内のインスリンシグナルの解析よりも、視床下部  $K_{ATP}$  チャンネルと末梢組織におけるインスリンシグナルの関連について優先して解析することとした。

#### ② 視床下部のグルコース感知の分子メカニズムの解析

一方後者の検証のために、野生型マウスと  $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスの脳における血糖感知機構をグルコースに対する BDNF の発現、および 2デオキシグルコースに対する c-Fos の誘導で検証した。

まず、視床下部内の高血糖感知の分子メカニズムを解明する目的で、グルコース投与時の脳内の応答を分子生物学的指標でとらえることを目指した。

既に、Unger らはグルコースを全身投与した際、VMH 視床下部内の BDNF の遺伝子発現が

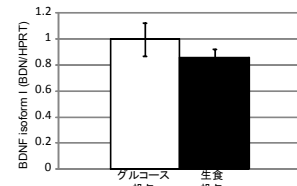


図1 グルコース投与時のVMH内BDNF発現の変化

増加することを報告していた (Unger et al. J Neurosci, 2007)。BDNF 遺伝子は 5' UT 部分が異なる多数のスプライシングアイソフォームが存在し、そのうちいくつかのアイソフォームがグルコース依存性に発現誘導されることが報告されていた。そこで、まず、グルコースにより VMH での発現が誘導されるとの報告があったアイソフォーム 1 (図 1) アイソフォーム 4 の発現変化を野生型マウスで検証した。しかしながら、既報の結果と異なり、どちらのアイソフォームもグルコース依存性の発現増加は全く観察できなかった。VMH 以外の脳部分の混入が BDNF 発現の定量解析の支障となっている可能性を考え、我々は

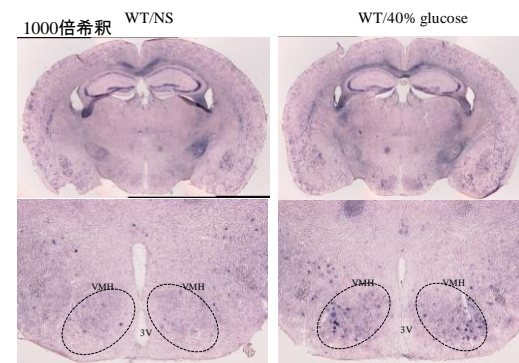


図2 グルコース投与時のVMH内BDNF発現の変化 (in situハイブリダイゼーション)

VMH での BDNF の発現を正確に解析することを目指し、in situ ハイブリダイゼーション法による BDNF の発現解析を行った。BDNF のアミノ酸コード領域をプローブとすることにより全てのアイソフォームの発現量を解析したところ、野生型の VMH では、グルコースにより明らかな BDNF の発現誘導が観察された (図 2)。そこで、 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスで同様の解析を行ったところ、グルコースによる応答は減弱していた。しかしながら、客観性のある定量的な評価が必要であると考えられたため、現在 in situ ハイブリダイゼーションの結果を量的に評価するための条件設定を検討中である。

次に我々は、グルコース投与とは逆に、糖が不足する状況を誘導し、野生型マウスと  $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスの脳における低血糖感知の機序を解析した。 $K_{ATP}$  チャンネル欠損マウスはインスリン感受性が亢進しているた

め、野生型マウスと同量のインスリンを投与

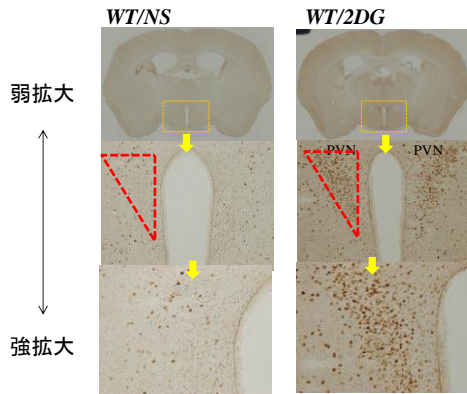


図3 2DG投与時のPVH内c-Fos発現の変化 (免疫染色)

すると誘導される血糖値が大きく異なるため、インスリンによる低血糖の誘発の代わりに、神経細胞にグルコース欠乏状況を誘導できる2DGを全身的に投与し、神経活動の変化をc-Fosの発現誘導で解析した。当初、BDNFの解析と同様、in situハイブリダイゼーションによる解析では、上記のBDNFの解析と同様、客観的な定量が困難であったため、c-Fosの発現は免疫染色で同定し定量化した。その結果、野生型マウスでもVMHでは2DGによるc-Fosの発現はほとんど見られなかった。一方、野生型マウスでは視床下部内の室傍核(PVH)で、明らかなc-Fosの発現誘導が観察された(図3)。大変興味深いことに、 $K_{ATP}$ チャンネル欠損マウスではPVHでのc-Fosの発現誘導は全く認められなかった(図4)。

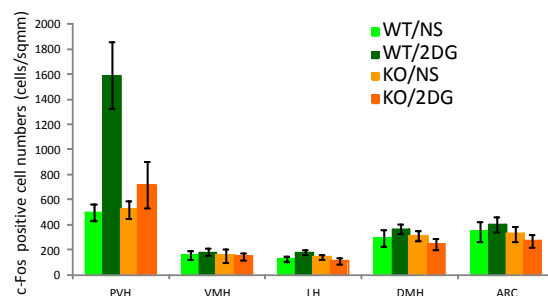


図4 視床下部の各神経核での2DGによるc-Fos発現誘導

これらの結果から、脳の $K_{ATP}$ チャンネルは低血糖時のPVHでのc-Fosの発現誘導に必須の役割を果たしていることが明らかになった。

これまで、視床下部のグルコース感知については部位特異的な解析がほとんどされておらず、本研究で初めて $K_{ATP}$ チャンネル依存性のグルコース感知に関与する部位が同定された。視床下部の各神経核における $K_{ATP}$ チャンネルの役割については全く解明されておらず、本研究により脳の $K_{ATP}$ チャンネルがどの部位の低血糖感知に関与しているかを明らかにできた点は特筆すべき点であると考えて

いる。

以上の結果から、①脳内の $K_{ATP}$ チャンネルが脂肪組織のインスリンシグナルを制御している可能性。②脳内の高血糖感知に $K_{ATP}$ チャンネルが関与し、VMHでのグルコース依存性のBDNFの発現誘導に寄与していること。③脳内の低血糖感知に、 $K_{ATP}$ チャンネルが関与し、視床下部の中でもPVHの活性化に必要であることが明らかになった。現在、論文投稿準備中である。

## 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 10 件)

1. Kitamoto, T., Sakurai, K., Tachibana K., Yokoh H., Ishikawa, K., Miki, T., Yokote K. A case of Type 1 diabetes with nocturnal hypoglycemia after desensitization therapy for insulin allergy. *Diabetes Care* 2013 in press  
DOI:未 (査読有)

2. Oarada M, Miki T, Kohno S, Sakai K, Nikawa T, Yoneyama M, Gono T. Refeeding with a standard diet after a 48-h fast elicits an inflammatory response in the mouse liver. *J Nutr Biochem*. 2013 in press  
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2012.10.006. (査読有)

3. Ogata, S., Miki, T., Seino, S., Tamai, S., Kasai, H., Nemoto, T. (2012) A novel function of Noc2 in agonist-induced intracellular  $Ca^{2+}$  increase during zymogen-granule exocytosis in pancreatic acinar cells. *PLoS ONE* 12;7(5):e37048.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0037048 (査読有)

4. Sakurai, K., Lee, EY., Morita, A., Kimura, S., Kawamura, H., Kasamatsu, A., Shiiba, M., Yabe, D., Yokote, K., Miki, T. (2012) Glucagon-like peptide-1 secretion by direct stimulation of L cells with luminal sugar versus non-nutritive sweetener. *J Diabetes Invest* 3:156-63.  
DOI: 10.1111/j.2040-1124.2011.00163.x  
(査読有)

5. Lee, EY., Inoue, S., Senoo, A., Shimizu, H., Suzuki Y., Ishizuka, N., Imazeki, N., Sasaki, K., Kako, M., Osaka, T., Miki, T. (2011) Beneficial effects of ventromedial hypothalamus (VMH) lesioning on function

and morphology of the liver after hepatectomy in rats. *Brain Res* 1421:82-9. Doi:10.1016/j.brainres.2011.09.012. Epub 2011 Sep 14. (査読有)

6. Nakamura, K., Minami, K., Tamura, K., Iemoto, K., Miki, T., Seino, S. (2011) Pancreatic  $\beta$ -cells are generated by neogenesis from non- $\beta$ -cells after birth. *Biomed Res* 3:167-74. Doi 無

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551953> (査読有)

7. Nishida, A., Takizawa, T., Matsumoto, A., Miki, T., Seino, S., Nakaya, H. (2011) Inhibition of ATP-Sensitive K(+) Channels and L-Type Ca(2+) Channels by Amiodarone Elicits Contradictory Effect on Insulin Secretion in MIN6 Cells. *J Pharmacol Sci* 116(1):73-80. Doi 無

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512308> (査読有)

8. Iwanaga, T., Miki, T., Takahashi-Iwanaga, H. (2011) Restricted expression of somatostatin receptor 3 to primary cilia in the pancreatic islets and adenophysis of mice. *Biomed Res* 32:73-81. DOI:10.2220/biomedres.32.73 (査読有)

9. Iwasaki, M., Minami K., Shibasaki, T., Miki, T., Jun-ichi Miyazaki, J-I., Seino, S. (2010) Establishment of new clonal pancreatic  $\beta$ -cell lines (MIN6-K) useful for study of incretin/cAMP signaling. *J Diabetes Invest* 4, 137-142

DOI: 10.1111/j.2040-1124.2010.00026.x (査読有)

10. Yasuda, T., Shibasaki, T., Minami, K., Takahashi, H., Mizoguchi, A., Uriu, Y., Mori, Y., Miyazaki, J-I, Miki, T., Seino, S. (2010) Rim2 $\alpha$  determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metab* 12(2):117-129.

DOI : 10.1016/j.cmet.2010.05.017 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. Takashi Miki (2013) 腸管内分泌L細胞からの糖によるGLP-1分泌メカニズム第90回日本生理学会 (3/27-29、東京)

2. Mukai, E., Ohta, T., Kawamura, H., Lee, E.Y., Morita, A., Inagaki, N., Iwanaga, T., Miki, T. (2012) Enhanced VEGF signaling in islets contributes to  $\beta$ -cell injury and consequential diabetes in SDT rats. 9th IDF-WPR Congress & 4th AASD Scientific Meeting (Nov 24 - 27, Kyoto, Japan)

3. Lee, EY., Sakurai, K., Toda, C., Yokote, K., Minokoshi, Y., Miki, T. (2012) Increased gluconeogenesis from glycerol plays a critical role in developing diabetes under high fat diet. the 9th IDF-WPR Congress & 4th AASD Scientific Meeting (Nov 24 - 27, Kyoto, Japan)

4. Sakurai, K., Lee, EY, Morita, A., Yabe, D., Yokote, K., Miki, T. (2011) Effect of an alpha-glucosidase inhibitor acarbose on glucagon-like peptide-1 secretion and postprandial lipid profile. AASD2011 3rd Annual Meeting (Jul 22-24, Beijing, China)

5. Takashi Miki, Susumu Seino (2010) Cellular mechanism for GLP-1 specific insulinotropic action in pancreatic  $\beta$ -cells 第53回日本糖尿病学会年次学術集会。(糖尿病53, S37, 2010) (5/28、岡山)

[図書] (計 6 件)

1. 三木隆司 (2013) GLP-1分泌に関する最新の知見. Progress in Medicine 33, 95-99, 2013 (全頁222ページ).

2. 三木隆司 (2012) 各栄養素による膵 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌と代謝制御. 内分泌糖尿病代謝内科 34, 290-297, 2012 (全頁384ページ).

3. 三木隆司 (2011) 細胞内外のATPセンサーであるATP感受性K<sup>+</sup>チャネルとATP受容体トランスポーターの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—, 京都廣川書店、86-95. 全471ページ

4. 三木隆司 (2011) 肝臓の輸送機能と代謝機能. ギャノン生理学 原書23版, 岡田泰伸監訳 (全838ページ), 丸善, 562-572.

5. 李恩瑛, 三木隆司 (2011) 転写因子Dmbx1欠損マウスのやせの病態解析. Adipo

science 7, 225-231(全頁 288 ページ).

6. 三木隆司 (2010) GLP-1 の血糖降下作用のメカニズムは？肥満と糖尿病 9, 530-532 (全頁 144 ページ).

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/physiol/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三木 隆司 (MIKI TAKASHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50302568

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし