

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24年5月31日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790218

研究課題名（和文）迷走神経求心路によるホルモン感受の細胞分子機構と摂食行動への連関

研究課題名（英文）Cellular and molecular mechanism of hormone sensing on vagal afferents and its linking to the feeding

研究代表者

岩崎 有作（IWASAKI YUSAKU）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60528420

研究成果の概要（和文）：

迷走神経求心路は末梢因子を感受し、それを神経情報に変換して脳に伝達し、摂食を調節する。しかし、迷走神経と末梢因子の直接的な受容機構・中枢伝達機構は不明である。本研究では、初代培養した単一の求心性迷走神経細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定し、食後分泌変動する数種の膵・消化管ホルモンがそれぞれ直接求心性迷走神経を活性化することを見出した。インスリンの迷走神経への作用はグレリンにより抑制され、GLP-1 によって増強することを発見した。

研究成果の概要（英文）：

Vagal afferents sense the peripheral factors and convey these signals to the brain to regulate food intake. In present study, I measured cytosolic Ca^{2+} concentration in the primary cultured neurons of vagal afferents to investigate whether peripheral factor directly act on the vagal afferents. We have found that some of pancreatic and gastrointestinal hormones activate vagal afferents neurons directly. Moreover, the insulin action to vagal afferent neurons was suppressed by ghrelin and potentiated by GLP-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：迷走神経求心路、nodose ganglion、摂食、ホルモン、インスリン、グレリン、GLP-1

1. 研究開始当初の背景

(1) 迷走神経求心路は、ホルモン・栄養素・代謝物質等を感じ、その情報を脳に伝達して摂食や代謝等を調節すると考えられている。

(2) 求心性迷走神経へ直接作用する分子、その作用機構、さらには脳への神経伝達機構は不明

である。

(3) 迷走神経求心路が末梢因子による摂食調節のための重要な作用点であることを明らかとし、末梢因子受容機構や脳への伝達機構を理解することで、現代問題となる過食・肥満・代謝疾患等の予防・治療法の開発に有効となる。

2. 研究の目的

- (1) 食前後で分泌変動する、または摂食量を調節する胃腸腸ホルモン迷走神経求心路への直接作用、作用機序を調べる。
- (2) 上記ホルモンに反応する迷走神経細胞に含有する神経伝達物質を同定する。
- (3) ホルモンによって刺激された迷走神経の終末から延髄孤束核へ伝達される神経伝達物質の摂食行動への連関を解析する。

3. 研究の方法

- (1) マウス (ICR, C57B6J, IRS2-KO) から nodose ganglion (NG) を摘出し、酵素消化により単一ニューロンを調製、一晚培養した。カルシウム感受性蛍光色素 Fura-2 を細胞に取り込ませ、灌流チャンバーを装着させた蛍光顕微鏡を用いた蛍光画像解析法によりホルモン処置前後の単一ニューロンの細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化を測定した。
- (2) (1) の細胞内 Ca^{2+} 測定後、免疫細胞化学法により神経伝達物質の免疫染色を行い、 Ca^{2+} 応答と免疫染色結果を重複させ、 Ca^{2+} 応答ニューロンに対する神経伝達物質の陽性・陰性反応を検討した。
- (3) (1) の実験 3 週間前に、マウス膵臓に逆行性トレーサー DiI を投与し、膵臓を支配する NG ニューロンをマーキングした。

4. 研究成果

- (1) インスリンの迷走神経求心路への直接作用
インスリン ($10^{-12} \sim 10^{-7}$ M) が単一 nodose ganglion neurons (NGN) の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ (図 1)、 10^{-7} M で約 10% の NGN が応答することを見出した。インスリン受容体の免疫染色の結果、NGN の約 13% が免疫陽性反応を示した。NGN に対するインスリン作用は IRS-2 KO マウスの NGN で減弱し、PI3 キナーゼ阻害剤で抑制され、L 型及び N 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤で抑制された。従って、インスリンは NGN に発現するインスリン受容体に作用し、IRS2、PI3 キナーゼを介し神経を脱分極させ、L 型及び N 型 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入によって $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させることが示唆された (図 2)。

インスリンに反応するニューロンの 2/3 はコレシストキニン (CCK) に反応した。CCK は消化管から分泌され、迷走神経求心路の CCK1 受容体に作用し、最終的に摂食を低下させる。CCK1 受容体の発現する NGN の多くは神経伝達物質 cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) を含有していることが報告されている。 $[Ca^{2+}]_i$ 測定後に CART の免疫染色を行った結果、インスリン応答ニューロンの 55% が CART 陽性反応を示した。従って、インスリンによって活性化された求心性迷走神経は、その先の投射先である延髄孤束核へ CART を放出し、情報を伝達している可能性が示唆された。

インスリンの血中濃度は約 $10^{-10} \sim 10^{-9}$ M で変動する。一方、 10^{-9} M インスリンは約 3%、 10^{-7} M では約 10% の NGN の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる。インスリンが多く迷走神経を活性化させる濃度は 10^{-7} M 周辺の濃度であることから、インスリンの求心性迷走神経への作用方式は、ホルモン様作用ではなく局所的なパラクリン様作用の可能性が高いと考えた。インスリンの産生・分泌臓器は膵臓である。求心性迷走神経は膵臓にも分布しているためこの神経が局所的にインスリンを感知している可能性を考えた。膵臓に分布する求心性迷走神経を逆行性トレーサーでマークし、インスリンの作用を調べた。インスリン (10^{-7} M) に応答した DiI 陽性細胞と DiI 陰性細胞はそれぞれ 20% と 6.8% であり、その差は約 3 倍で統計学的に有意であった。従って、インスリンは膵臓を支配している求心性迷走神経で高頻度を受容されることが明らかとなった。

本研究では、インスリンが求心性迷走神経に直接作用することを世界で初めて発見した。その作用機序は、インスリンが NGN に発現するインスリン受容体、インスリン受容体シグナリング、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介して $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる。今後は、インスリンの求心性迷走神経の作用がどのような中枢作用・生理機能とリンクするのか明らかとし、この生理機能と疾患との関連、新たな疾患治療法開発などの展望が期待される。

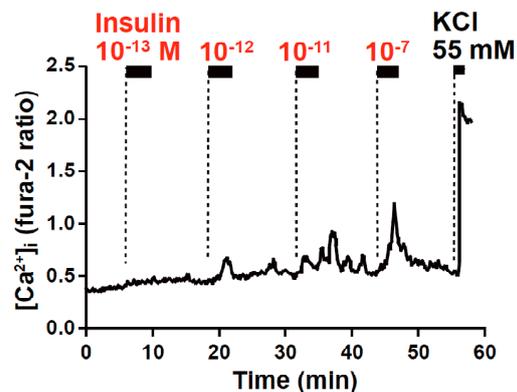


図1 単一 NG ニューロンに対するインスリンの作用 ($[Ca^{2+}]_i$ トレース)

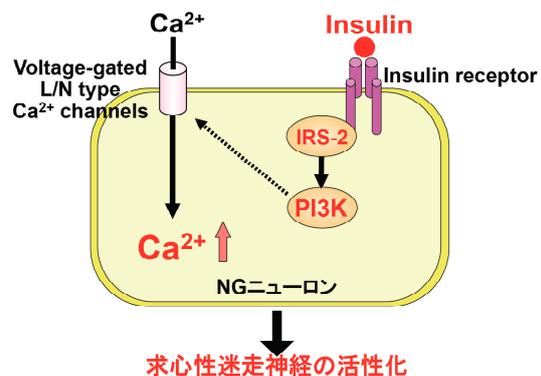


図2 NGN におけるインスリン誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇機構

(2) 迷走神経求心路へのインスリン作用に対するグレリンの抑制作用と GLP-1 の増強作用

インスリンは食後に分泌されるが、一方、グレリンは食前に分泌される消化管ホルモンである。また、グレリンは膵β細胞に直接作用し、インスリン分泌を抑制する。そこで、インスリンとは分泌動態が逆であるグレリンは、インスリン分泌を抑制するだけでなく、インスリンの求心性迷走神経への作用も抑制するのか調べた。

NGN に対するインスリン (10^{-7} M) 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇はグレリン (10^{-8} M) によって強く抑制された (図 3)。この抑制作用はグレリン受容体 (growth hormone secretagogue receptor: GHSR) のアンタゴニスト [D-Lys³]-GHRP-6 で解除された。さらに、GHSR 低親和性グレリンアナログのデアシルグレリンは、NGN に対するインスリン作用を抑制しなかった。従って、グレリンは、NGN に対するインスリン作用を、グレリン受容体を介して抑制することを世界で初めて明らかとした。

インスリンと glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は共に食後に分泌が亢進する。さらに、GLP-1 は膵β細胞に作用し、インスリン分泌を増強させる。そこで、GLP-1 はインスリンの分泌を増強させるだけでなく、インスリンの求心性迷走神経への作用も増強させるか調べた。

GLP-1 は NGN に直接作用し、 $[Ca^{2+}]_i$ や膜電流値を変化させることは、2002 年に研究代表者所属研究室が報告している [Auton. Neurosci. 102(1-2), 39-44, 2002]。NGN に対する GLP-1 の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用における濃度依存性を検討した。GLP-1 (10^{-8} M) は約 11% の NGN の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、そのうちの 93% がインスリン (10^{-7} M) に応答した。そこで、NGN に対して作用が弱い低濃度の GLP-1 (10^{-9} M) とインスリン (10^{-9} M) を NGN に同時に作用させた時の $[Ca^{2+}]_i$ を測定した。GLP-1 (10^{-9} M)、インスリン (10^{-9} M) 単独では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こさなかった NGN に対して、GLP-1 とインスリン (共に 10^{-9} M) を同時に投与すること $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、このようなニューロンは全体の 3.3% であった (図 4 上)。また、GLP-1 (10^{-9} M)、インスリン (10^{-9} M) 単独でも共に $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した NGN に対して、GLP-1 とインスリン (共に 10^{-9} M) を同時に投与すると、さらに大きく $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し、このようなニューロンは全体の 4.0% であった (図 4 下)。従って、GLP-1 は NGN に対するインスリン作用を相加・相乗的に増強することが明らかとなった。

本研究では、インスリンの求心性迷走神経への直接作用を、インスリン分泌と相反するグレリンが抑制し、インスリン分泌と同調する GLP-1 が増強することを発見した。インスリンの迷走神経への作用及びそれを介した生理機能は、インスリンだけでなく、グレリンや GLP-1 などの他のホルモンと相互的に作用し、調節されていることが推測された。今後は、インスリン・グレリン・GLP-1 の求心性迷走神経への

相互作用がどのような中枢・生理機能にリンクするかを検討する。

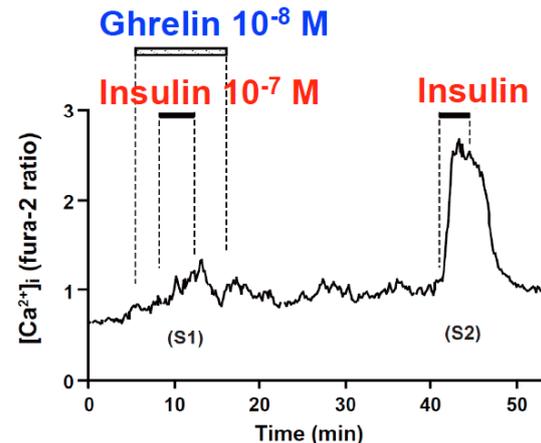


図3 単一 NGN におけるインスリン誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用に対するグレリンの抑制作用

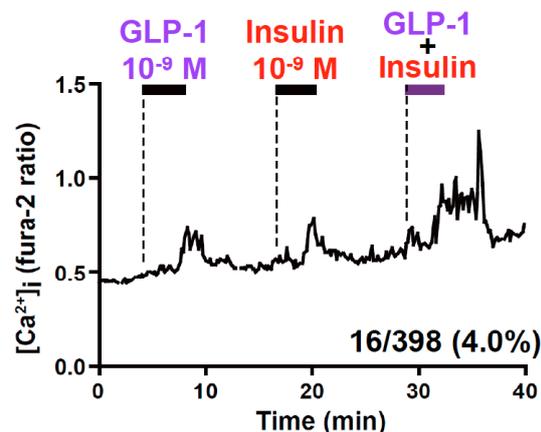
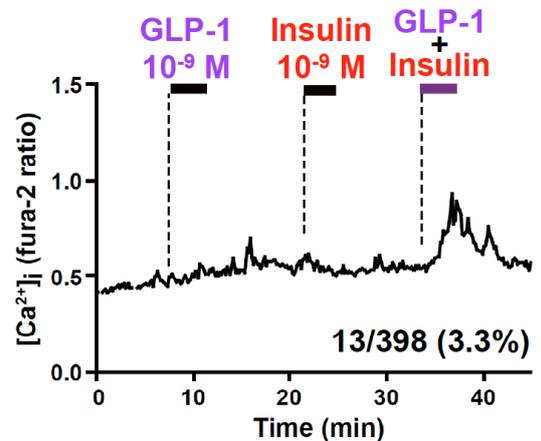


図4 単一 NGN の $[Ca^{2+}]_i$ に対するインスリンと GLP-1 の相乗・相加作用

(3) 食後分泌亢進される NPY ファミリーペプチドの膵ポリペプチド、PY₃₋₃₆ の迷走神経求心路への直接作用

膵ポリペプチド (PP)、peptide YY₃₋₃₆ (PY₃₋₃₆) は食後に分泌が亢進する。PP、PY₃₋₃₆ の末梢投与は摂食を抑制する。迷走神経を傷害させた実

験動物ではこれら摂食抑制効果が消失することから、PP、PYY₃₋₃₆ は迷走神経求心路を介して摂食を抑制していることが示唆されている。しかし、PP、PYY₃₋₃₆ の求心性迷走神経への直接作用は報告されていない。

PP ($10^{-11} \sim 10^{-8}$ M)、PYY₃₋₃₆ ($10^{-10} \sim 10^{-7}$ M)、それぞれに、NGN の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。血液中の濃度に近い 10^{-10} M において、PP は 7.9%、PYY₃₋₃₆ は 2.1% の NGN の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた。PP に応答するニューロンは満腹ホルモンの CCK にも応答した。従って、共通の神経伝達物質を介して中枢に上昇を伝達している可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 岩崎有作、インスリンの求心性迷走神経への直接作用とグレリン、GLP-1 との相互作用、第 32 回日本肥満学会、2011 年 9 月 23-24 日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)
- 2) 岩崎有作、インスリンによる求心性迷走神経細胞活性化とシグナル伝達、第 31 回日本肥満学会、2010 年 10 月 1-2 日、前橋プラザ元気 21 (群馬県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 有作 (IWASAKI YUSAKU)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 60528420