

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791035

研究課題名（和文）脳幹における食欲調節ペプチド、GLP-1 分泌細胞の分子生物学的解析

研究課題名（英文）Molecular biological analysis of GLP-1 releasing neurons in the brainstem.

研究代表者

久留 和成 (HISADOME KAZUNARI)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：00592081

研究成果の概要（和文）：GLP-1 分泌神経細胞は食欲調節因子 GLP-1、ペプチド YY およびグレリンにおいて神経応答は観察されなかったが、レプチンに対しては興奮性の神経応答を示した。またコレシストキニンに対してはグルタミン酸作動性シナプス入力を介した間接的な神経応答観察され、そのシナプス入力を介した間接的な神経応答はアドレナリン作動性神経を介しているが明らかになった。さらに救心性迷走神経線維を電気刺激することにて、GLP-1 分泌神経細胞に対するシナプス入力の増加が認められ、中枢神経系の GLP-1 分泌に救心性迷走神経を介した末梢臓器由来の神経入力に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：GLP-1 releasing neurons show no response when gut peptides (such as GLP-1, Peptide YY and ghrelin) were applied, whereas GLP-1 releasing neurons were depolarized by leptin. CCK increased the frequency of glutamatergic synaptic inputs onto GLP-1 releasing neurons. The effects of CCK on GLP-1 releasing neurons were prevented by the pretreatment of yohimbine. Moreover, phenylephrine, a selective  $\alpha 1$ -receptor agonist, mimicked the effects of CCK on GLP-1 releasing neurons. Electrical stimulation of solitary tract showed that GLP-1 releasing neurons received direct synaptic input from vagal afferent fibers.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：中枢神経、薬理学、メタボリックシンドローム、GLP-1

## 1. 研究開始当初の背景

glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は高血糖時のみにインスリン分泌を促進する作用を有することから、GLP-1 関連物質が 2 型糖尿病に対して、低血糖を引き起こさない糖尿病治療薬として現在広く臨床的に使用されている。GLP-1 そのものは、血中半減期が極めて短いことから、糖尿病治療薬として用いられる GLP-1 関連物質は、GLP-1 そのものではなく、血中にて不活化されない構造を有する GLP-1 受容体作動薬と GLP-1 分解酵素阻害薬に大別される。これら GLP-1 関連物質のうち、中枢神経系にも生理作用を有する GLP-1 受容体

作動薬のみにて食欲抑制作用が報告されたことから、今後 GLP-1 関連物質は中枢神経系に作用する新たな“抗肥満薬”として臨床応用が期待されている。しかしながら中枢神経系における GLP-1 の分泌機序および作用機序はまだほとんど明らかにされていない。近年、GLP-1 分泌細胞特異的に YFP タンパク質を発現するトランスジェニックマウスが作成され、蛍光顕微鏡下にて生細胞の状態で GLP-1 分泌神経細胞が同定可能になった。また研究代表者は、GFP や YFP にて蛍光標識された神経細胞を含む脳スライス標本を用い、特定の神経細胞のみを対象とした分子

生物学的および電気生理学的機能解析を行った経験を有することから、同法を適用し GLP-1 分泌神経細胞の機能解析が可能と考え、本研究を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

本申請研究は GLP-1 分泌細胞のみ“特異的”に YFP タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを用い、その急性脳切片を作成し、スライスパッチクランプ法、RT-PCR 法および免疫組織化学染色法を用い、多面的観点から中枢神経における GLP-1 分泌細胞の特性を明らかにし、GLP-1 による食欲抑制機序を解明することを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) YFP 陽性細胞が GLP-1 分泌能を有しているのか、否かを確認する目的で、GLP-1 の前駆体ポリペプチドであるプレプログルカゴン遺伝子発現の有無について単一細胞 RT-PCR 法を用い、遺伝子レベルで解析を行った。また孤束核に存在する他の神経細胞(コリン作動性神経細胞、カテコールアミン作動性神経細胞等)に対して特異的に反応する抗体(1次抗体)を作用させ、1次抗体に特異的な蛍光標識2次抗体を反応させた免疫組織化学染色法を行い、GLP-1 分泌細胞(=YFP 陽性細胞)と既に同定されている他の神経細胞との組織学的な分布について評価を行った。

(2) パッチクランプ法の様々な実験手法(穿孔パッチクランプ法および膜電位固定法等)にて YFP 陽性細胞(=GLP-1 分泌細胞)の静止時における電気生理学的特性および発現チャネルの同定を行った。また YFP 陽性細胞の周辺に存在する YFP 陰性細胞に対して上記と同様の実験を行い、YFP 陽性細胞と YFP 陰性細胞の電気応答を比較し、電気生理学的特性の違いにて GLP-1 分泌細胞と他細胞との識別が可能か、否かについて検証した。

(3) 中枢神経系において食欲に関連物質としてペプチド YY、グレリン、コレシストキニンおよびレプチンを微量投与し、いずれの物質にて GLP-1 分泌細胞が修飾されるか、否かについてスライスパッチクランプ法を適用し、神経応答を解析し GLP-1 の引き起こす食欲抑制作用がどのような食欲制御物質と関連性を有するのかについて電気生理学的手法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) YFP 陽性細胞および YFP 陰性細胞を用いた単一神経細胞 RT-PCR 法にて、実験に用いた全ての YFP 陽性細胞にて GLP-1 前駆体ポリペプチドであるプレプログルカゴン mRNA の発現が確認され、GLP-1 分泌能を有している

ことを明らかにした(YFP 陰性細胞において、プレプログルカゴン mRNA の発現は一切観察されなかった)。これらの結果から、本実験で用いたトランスジェニックマウスが GLP-1 分泌細胞の同定および研究に有用であることが明らかになった。また免疫組織化学染色を用いた YFP 陽性神経細胞(=GLP-1 分泌神経細胞)の組織学的な分布を解析し、GLP-1 分泌神経細胞と他の神経細胞(コリン作動性神経細胞およびカテコールアミン作動性神経細胞)間に共局在性は観察されなかった(下図をご参照下さい)。

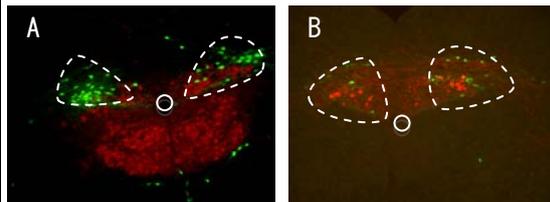


図 1 GLP-1 分泌神経細胞の組織学的局在  
脳幹 孤束各領域における A GLP-1 分泌神経細胞とコリン作動性神経細胞の組織学的局在。B GLP-1 分泌神経細胞とカテコールアミン作動性神経細胞の組織学的局在。緑は YFP 陽性神経細胞(=GLP-1 分泌細胞)赤はそれぞれ、コリン作動性およびカテコールアミン作動性神経細胞を示している。実線の丸は中心管を破線領域は孤束核領域を示す。

(2) 電気生理学的手法を適用した全胞中(n=135)およそ7割の細胞は静止時において自発性活動電位を有し(n=99、静止膜電位=-51 mV)、およそ1割の細胞は自発性活動電位を有さず比較的深い静止膜電位(n=11、静止膜電位=-55 mV)を示したが、この2群における自発性活動電位の有無は単に静止膜電位の違いから生じており、自発性活動電位を有しない細胞群においても脱分極刺激にて活動電位が観察され、活動電位の発火機序そのものに有意な差は見受けられなかった。また、残りの2割の細胞においては静止膜電位が不規則な振幅(oscillation)を示し、静止膜電位が閾値に達したときのみ、活動電位の発火が引き起こされる(図2をご参照下さい)電気生理学的特性を示した。この静止膜電位の不規則な振幅は、電位依存性ナトリウムチャネル阻害薬テトロドトキシン存在下でも消失しないことから、他の神経細胞を介したものでは無く、GLP-1 分泌神経細胞自身の電気生理学特性であることが明らかになった。さらに YFP 陽性細胞と YFP 陰性神経細胞間の電気生理学的特性の比較を行ったが、膜電位、活動電位の発火頻度、膜抵抗および膜容量において有意な差は見られず、電気生理学的特性にて GLP-1 分泌神経細胞と他細胞の識別は極めて困難であることが明らかになった。

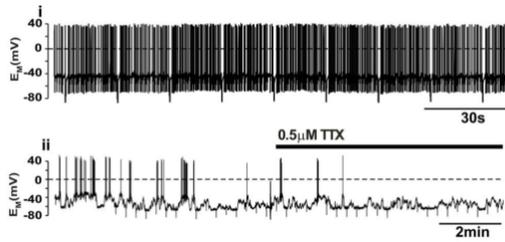


図2 GLP-1 分泌神経細胞の静止膜電位の測定 (i)は記録細胞中もっとも多い割合を占めた、静止状態にて自発性活動電位を有する細胞からの電気記録。(ii)は静止膜電位が不規則な振幅を示す細胞からの記録。テトロドトキシン (TTX) 存在下でも膜電位の振幅は消失しなかった。共に電氣的無刺激状態におけるカレントクランプ法による電気記録

(3) GLP-1 分泌神経細胞は、GLP-1 そのものおよび GLP-1 受容体作動薬投与にて神経応答は観察されず、末梢臓器由来の血中 GLP-1 が直接、中枢神経系における GLP-1 分泌に関与していないことが明らかになった。本申請研究において使用した内因性食欲調節因子 (ペプチド YY、グレリン、コレシストキニンおよびレプチン) において、摂食抑制因子であるレプチンのみ GLP-1 分泌神経細胞に直接作用し、興奮性の神経応答が観察された。これらの結果から、レプチンの有する食抑制作用の一部は GLP-1 の有する食抑制作用にて生じている可能性が示唆された。

(4) 脳スライス標本中に残存する求心性迷走神経に対する電気刺激にて、GLP-1 分泌神経細胞はシナプス入力を介した間接的な神経応答が観察された。またこれらのシナプス入力にはグルタミン酸受容体の阻害薬 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) およびキヌレン酸存在下では有意に抑制され、グルタミン酸作動性シナプス入力であることが明らかになった。これらの結果から脳幹における GLP-1 分泌神経細胞は、末梢臓器由来の神経信号が救心性迷走神経を介して伝達され、GLP-1 分泌を促している可能性が示唆された。

(5) GLP-1 分泌神経細胞は、本研究にて使用したカテコールアミンのうち、アドレナリンおよびノルアドレナリンにてシナプス入力を介した興奮性の神経応答を示したが、ドーパミンに対しては全く神経応答が観察されなかった。さらにこのアドレナリン・ノルアドレナリン応答に関与するアドレナリン受容体のサブタイプを同定する目的で、 $\alpha_1$  受容体作動薬フェニレフリンおよび  $\alpha_2$  受容体作動薬クロニジンを投与し、神経応答を解析した。

フェニレフリン投与にてカテコールアミン同様の神経修飾が観察されたが、クロニジン投与では神経応答が観察されないことから、アドレナリンおよびノルアドレナリンに対する GLP-1 分泌神経細胞の神経応答に  $\alpha_1$  受容体に関与していることが明らかになった。また、アドレナリン投与にて生じる GLP-1 分泌神経細胞に対するシナプス入力はキヌレン酸の前処置および存在下にて有意に抑制されることから、これらの応答にグルタミン酸作動性神経細胞が関与していることが明らかになった (図3をご参照下さい)。

(5) GLP-1 分泌神経細胞は内因性食欲調節因子コレシストキニン投与にて、シナプス入力を介した興奮性の間接的な神経応答が観察された。コレシストキニンに対するシナプス入力はカテコールアミン投与にて観察された神経応答と関連性を有しているのか、否かを確認する目的で、アドレナリン受容体阻害薬のヨヒンビン前処置および存在下にて同様の実験を行った結果、コレシストキニン応答は有意に抑制された。これらの結果から、GLP-1 分泌神経細胞におけるコレシストキニン応答はカテコールアミン作動性神経細胞を介した神経応答であることが明らかになった (下図をご参照下さい)。

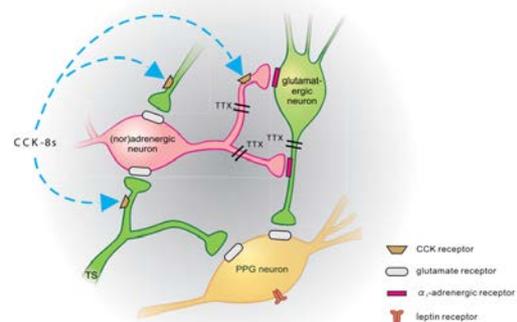


図3 GLP-1 分泌神経細胞の修飾因子

本申請研究成果にて明らかになった GLP-1 分泌神経細胞に対する修飾因子。直接的な修飾因子としてはレプチンが、間接的な修飾因子としては、グルタミン酸、アドレナリンおよびコレシストキニンが同定された。

## 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)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Hisadome K, Reiman F, Gribble FM, Trapp S. CCK stimulation of GLP-1 neurons involves  $\alpha_1$ -adrenoceptor-mediated increase in glutamatergic synaptic

inputs. Diabetes. 60 (11), 2701-2709, 2011.  
DOI:10.2337/db11-0489. 査読有

(2) Trapp S, Hisadome K. Glucagon-like peptide 1 and the brain: central actions - central sources? Autonomic Neuroscience. 161(1-2), 14-19, 2011.  
DOI:10.1016/j.autneu.2010.09.008. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

- ① 久留 和成, Excitatory effects of CCK on GLP-1 releasing neurons are mediated via adrenergic neurons. 第86回日本薬理学会年会, 2013.03.21-23, 福岡
- ② 久留 和成, GLP-1 分泌神経細胞のグルコース応答に関する解析, 第65回日本薬理学会西南部会, 熊本, 2012.11.23
- ③ 久留 和成, Neuromodulatory effects of feeding peptides in GLP-1 releasing neurons of mouse brainstem. 第85回日本薬理学会年会, 2012.03.14-16, 京都
- ④ 久留 和成, 脳幹 GLP-1 分泌細胞におけるアドレナリン受容体を介した興奮性シナプス入力の解析, 第64回日本薬理学会西南部会, 2011.11.20, 福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

特記事項はありません

〔その他〕

ホームページ等

所属研究室ホームページ

[http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top\\_Page.html](http://www.pharmacology.med.saga-u.ac.jp/YAKURIHP/Top_Page.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久留 和成 (HISADOME KAZUNARI)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号: 00592081

### (2) 研究分担者

該当者無し