

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790221

研究課題名(和文) 求心性迷走神経を介した末梢ホルモン受容 中枢伝達 摂食行動連関の解明

研究課題名(英文) Vagal afferent-mediated coupling of peripheral factor sensing to brain transmission and feeding regulation

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：求心性迷走神経は末梢情報を受容し、それを脳に伝達して摂食行動を調節する。しかし、求心性迷走神経がどのような末梢因子を直接感受し、投射先である延髄孤束核にどの神経伝達物質を放出することで摂食を調節しているかは不明である。

本研究では、インスリン、膵ポリペプチド、Peptide YY3-36、oxytocinが求心性迷走神経に直接作用し、摂食を抑制することを明らかにした。また、摂食抑制に関連する求心性迷走神経から延髄孤束核への神経伝達物質候補としてCARTが考えられた。さらに、空腹 vs. 満腹時の求心性迷走神経内で発現変動する遺伝子を12個同定した。これら遺伝子の摂食調節への関与は今後検討する。

研究成果の概要(英文)：Vagal afferents sense the peripheral factors, convey this neural information to the brain, thereby regulating feeding. However, it is not clear that what kinds of factors act on the vagal afferents directly and what kinds of neurotransmitters which are released from the vagus terminals to the nucleus tractus solitaries (NTS) contribute to regulate food intake.

The present study demonstrates that insulin, pancreatic polypeptide, peptide YY3-36, and oxytocin directly act on the isolated vagal afferent neurons, and these effects are participated in decreasing food intake.

CART peptide is putative neurotransmitter to decrease food intake, which is released from vagus terminals to NTS. Moreover, 12 genes in the NG changed the expression level more than twice between fasting and satiety, but it remains to be determined whether these gene-related molecules regulate food intake.

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：求心性迷走神経 nodose ganglion 摂食 insulin pancreatic polypeptide peptide YY oxytocin  
DNA microarray

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 求心性迷走神経は末梢の情報を感じし、それを脳へ伝達する重要な内臓感覚神経であり、食欲やエネルギー代謝を調節している事が知られている。

(2) 求心性迷走神経は支配する末梢臓器や、保有する神経伝達物質が異なり、一つ一つ機能が異なるヘテロな神経であることが推察される。

(3) 支配臓器・保有神経伝達物質の異なる様々な種類の求心性迷走神経にどのような末梢因子が直接作用しているのか、どのニューロン群が摂食を亢進、もしくは抑制を調節しているのか、さらに、求心性迷走神経から脳への神経伝達機構は不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 食前後で分泌が変動する胃腸膵ホルモンの求心性迷走神経への直接作用、及び摂食行動への連関を解析し、求心性迷走神経を介して摂食調節をする新たな末梢因子を同定する。

(2) 求心性迷走神経終末からその中枢側の投射先である延髄孤束核へ伝達される神経伝達物質を明らかにするために、摂食亢進系ホルモンもしくは摂食抑制性ホルモン選択的に活性化させるニューロン群の存在を明らかにし、空腹時と満腹時での変動する求心性迷走神経内神経伝達物質を DNA マイクロアレーで解析することで探索する。これら解析は、本研究の最終的ゴールである「求心性迷走神経終末から延髄孤束核への伝達機構」を解明するための基盤研究となる。

## 3. 研究の方法

(1) 単一 nodose ganglion ニューロン・単一弓状核ニューロンを用いた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定法とパッチクランプ法

Nodose ganglion (NG) は左右の頸静脈孔直下にそれぞれ存在し、求心性迷走神経の細胞体が集合する。マウスから NG を単離し、酵素処理により単一 NG ニューロンを調製し、一晚培養した。Fura-2 蛍光画像解析法及びパッチクランプ法を用いて細胞内  $Ca^{2+}$  濃度と膜電位変化を測定した。マウスの視床下部弓状核を単離し、上記と同様単一ニューロンを調製し、実験に用いた。

(2) 単離ニューロンの免疫染色

(1) の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定後、神経伝達物質に対する免疫染色をし、 $Ca^{2+}$  応答性ニューロンに対する神経伝達物質の発現解析をした。

(3) 摂食行動解析

マウスに試験サンプルを腹腔内投与し、その後の摂食量を解析した。

(4) 延髄での c-fos 発現解析

マウスに試験サンプルを腹腔内投与し、その後 90 分に心灌流固定し、免疫染色解析用の脳サンプルを調製した。延髄を対象に、神経活性化マーカーである c-fos の発現を免疫染色法にて解析した。

(5) 迷走神経機能障害モデルマウスの作成 (迷走神経切断術、カプサイシン処理)

麻醉下において、マウスの横隔膜下の両側迷走神経を切断した。術後は液体食にて飼育し、1 週間の回復期間をとり、実験 (摂食実験・免疫染色) に用いた。麻醉下マウスにカプサイシンを皮下に投与し、カプサイシン感受性感覚神経の除神経を行った。

(6) 満腹 vs. 空腹マウスの Nodose ganglion を用いた DNA マイクロアレー解析

自由摂食 (満腹) と一晚絶食 (空腹) のマウスを明期開始 3 時間後に屠殺し、Nodose ganglion を摘出した。これを用いて DNA マイクロアレー解析した。

## 4. 研究成果

(1) 求心性迷走神経は膵臓周辺の高濃度インスリンを効率よく感知する

末梢ホルモンは「血液脳関門を通過して脳に作用」、「求心性迷走神経に作用して脳へ神経伝達」の 2 つの経路により中枢作用を発揮する。インスリンは食欲、記憶、神経保護などの脳機能に関与するが、求心性迷走神経に作用するかは不明であった。本研究では、インスリンが直接求心性迷走神経に作用する事を明らかとし、インスリンの中枢作用の新経路を発見した (Iwasaki Y., *PLOS ONE*, 8(6), e67198, 2013)。

マウスから単離した NG ニューロンにインスリンを投与すると細胞外  $Ca^{2+}$  濃度上昇・脱分極を誘導し、活性化させることを発見した。インスリンに反応する NG ニューロンの 70% が求心性迷走神経を介して満腹感を誘導することで知られるコレシストキニン (CCK) によって活性化され、56% が神経伝達物質の CART (コカイン・アンフェタミン調節転写産物) を含有していた。インスリンは血中レベル ( $10^{-10}$  M レベル) より高濃度 ( $10^{-8}$  M 以上) で多くの求心性迷走神経に作用する事が分かった。生体内で高濃度にインスリンが存在する部位は、産生臓器である膵臓と予測した。膵静脈 (脾静脈) 中のインスリン濃度は  $10^{-8}$  M であり、血中濃度の  $10^{-10}$  M の約 100 倍高濃度であった。膵ラ氏島周囲・内部にはインスリン受容体を発現する神経が存在した。膵臓に逆行性トレーサーを投与することで膵臓を支配する求心性迷走神経をマーキングすると、膵臓を支配する NG ニューロンは高頻度にインスリンに反応した。また、インスリン分泌促進薬である SU 剤をマウス腹腔内に投与すると、速やかにインスリンが分泌され、求心性迷走神経内の AKT のリン酸化が促進され、活性化された。これら結果より、膵臓を支配する求心性迷走神経はインスリン分泌を局所的に感知して脳に伝える役割があることが示唆されました。

さらに、IRS2 遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた実験から、このマウスが過食・肥満を呈すと共に、インスリンの求心性迷走神経作用 (細胞内  $Ca^{2+}$  上昇) が障害されていることが

わかった。インスリンは視床下部弓状核の摂食亢進系 NPY ニューロンの活動を抑制することが知られているが、IRS2 KO マウスの弓状核 NPY ニューロンへの作用は正常であった。以上より、インスリンの「神経を介した経路（求心性迷走神経経路）」による脳への作用は、過食・肥満を防御する働きがあると推察された。

(2) 膵ホルモンの膵ポリペプチドと消化管ホルモンの Peptide YY<sub>3-36</sub> は直接求心性迷走神経に作用する

食後に分泌される膵ポリペプチド (PP) と Peptide YY<sub>3-36</sub> (PYY) が求心性迷走神経に直接作用し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させることを発見した (Iwasaki Y., *Neuropeptides*, 47, 19-23, 2013)。両ホルモン共に約 10% の NG ニューロンを活性化した。従って、これらホルモンの応答した約 10% の求心性迷走神経の活動は強力に摂食量を調節することが示唆された。

(3) 下垂体後葉ホルモンのオキシトシン投与は求心性迷走神経を直接活性化して摂食量を抑制する

下垂体後葉ホルモンのオキシトシン (OXT) は、脳内神経伝達物質としても機能し、摂食・代謝の調節を担っていること、さらには社会行動・信頼度にも関わることが分かってきた。近年、オキシトシン投与による摂食障害、肥満への治療開発が進められている。

本研究では、OXT 末梢投与が直接迷走神経求心路を活性化することで摂食量が抑制されることを明らかにした。

マウスへの OXT 腹腔内投与は、摂食量を減少させ、求心性迷走神経の投射先である延髄孤束核 (NTS) にでの c-fos タンパク質の発現量を増加させた。これら OXT による作用は、横隔膜下迷走神経切断もしくはカプサイシン処理によって完全にキャンセルされた。OXT は単離 NG ニューロンの細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させ、活動電位発火頻度を上昇させた。NG ニューロンには OXT 受容体が発現し、OXT による Ca 応答は OXT 受容体阻害剤によって抑制された。OXT に応答する NG ニューロンの 90% 以上が CCK によって活性化され、約 80% が神経伝達物質の CART を含有していた。これら結果より、末梢 OXT は CART を含有する CCK 応答求心性迷走神経にオキシトシン受容体を介して直接作用・活性化し、その神経情報は NTS に伝達され、最終的に摂食量を低下させることを明らかにした。

(4) 満腹系ホルモンと空腹系ホルモンは異なる求心性迷走神経を活性化する

胃ホルモンのグレリンは空腹時に高値となり、求心性迷走神経を介して摂食量を亢進させることが知られている。しかし、グレリン

の求心性迷走神経への直接作用は不明である。本研究では、グレリンがマウス由来の単一 NG ニューロンの細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度を上昇させることを見出した。さらに、グレリン応答ニューロンは、満腹系ホルモン (CCK, OXT) には応答しなかった。従って、空腹ホルモン (グレリン) と満腹ホルモン (CCK, OXT) は異なる求心性迷走神経が感知していることが分かった。

(5) 空腹時と満腹時で発現変動する求心性迷走神経内遺伝子の解析：摂食調節を担う神経伝達物質スクリーニング

摂食行動を調節する求心性迷走神経内神経伝達物質を同定するために、満腹時 (自由給餌条件で明期前半) と空腹時 (一晩絶食後の明期前半) におけるマウス NG 内で発現変動する mRNA を、DNA マイクロアレーを用いて解析した。絶食によって発現変動比が 2 倍以上に減少した遺伝子を 6 個、上昇した遺伝子を 6 個、同定した。今後、これら遺伝子関連物質が延髄孤束核を介して摂食量を調節しているのかを検討する予定である。

## 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 6 件)

- 1 Iwasaki, Y., Shimomura, K., Kohno, D., Dezaki, K., Ayush, EA., Nakabayashi, H., Kubota, N., Kadowaki, T., Kakei, M., Nakata, M., and Yada, T.: Insulin activates vagal afferent neurons including those innervating pancreas via insulin cascade and Ca<sup>2+</sup> influx: Its dysfunction in IRS2-KO mice with hyperphagic obesity. *PLoS One*, 8(6), e67198 (2013), 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0067198
- 2 Iwasaki, Y., Kakei, M., Nakabayashi, H., Ayush, EA., Hirano-Kodaira, M., Maejima, Y. and Yada, T.: Pancreatic polypeptide and peptide YY<sub>3-36</sub> induce Ca<sup>2+</sup> signaling in nodose ganglion neurons. *Neuropeptides*, 47, 19-23 (2013), 査読有, DOI: 10.1016/j.npep.2012.07.006.
- 3 岩崎有作、矢田俊彦：迷走神経による消化管情報の中枢伝達と摂食制御、G.I. Research, 21 (1), 18-24 (2013)、査読無
- 4 矢田俊彦、岩崎有作：膵臓のインスリンを脳が感知する機序、日本医事新報、4677, 63-65 (2013)、査読無
- 5 Iwasaki, Y. and Yada, T.: Vagal afferents sense meal-associated gastrointestinal and pancreatic hormones: mechanism and physiological role. *Neuropeptides*, 46(6), 291-297 (2012), 査読有, DOI: 10.1016/j.npep.2012.08.009.
- 6 中田正範、岩崎有作、矢田俊彦：消化管

ホルモンの新機軸：インスリン分泌抑制因子、臓器連関の伝令、DPP-4 阻害薬標的の視点から、Journal of Diabetes Strategy, Vol.2 No.1、24-30 (2012)、査読無

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1 Iwasaki, Y., Vagal afferent neurons sense pancreatic and plasma insulin: its impairment in hyperphasic obese mice, The 15<sup>th</sup> International Group on Insulin Secretion Symposia, 2014 年 3 月 27-29 日, Nice, France
- 2 岩崎有作、矢田俊彦：膵ホルモンは求心性迷走神経を介して脳に作用し、食欲を調節する、第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16-18 日、鹿児島
- 3 岩崎有作、膵臓を支配する求心性迷走神経は膵臓から分泌されるインスリンを効率良く受容する、第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月 11~12 日、東京
- 4 Iwasaki Y., Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons and thereby decreases food intake, The 36<sup>th</sup> Naito Conference, 2013 年 9 月 10~13 日、北海道
- 5 岩崎有作、インスリンはインスリンカスケードを介して求心性迷走神経を活性化し、過食・肥満を呈する IRS2 欠損マウスではこの作用が障害される、第 12 回自治医科大学シンポジウム、2013 年 9 月 5 日、栃木
- 6 Iwasaki, Y., Insulin directly activates vagal afferent neurons through insulin signaling pathway and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> influx, Neuro2013、2013 年 6 月 20~23 日、京都
- 7 岩崎有作、単離求心性迷走神経細胞に対する膵ポリペプチドとペプチド YY<sub>3-36</sub> の直接作用、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 24~26 日、愛知
- 8 岩崎有作、膵ポリペプチドとペプチド YY<sub>3-36</sub> は求心性迷走神経細胞を直接活性化する、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27-29 日、東京
- 9 Iwasaki Y., Ghrelin attenuates insulin-induced activation of vagal afferent neurons of mice. Society for Neuroscience, 2012 年 10 月 13~17 日、ポスター発表、New Orleans, USA
- 10 岩崎有作、膵ポリペプチドとペプチド YY<sub>3-36</sub> の求心性迷走神経への直接作用、第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 11~12 日、京都
- 11 岩崎有作、インスリンの求心性迷走神経

への直截作用、その GLP-1 による増強とグレリンによる抑制、第 66 回日本栄養・食糧学会大会、2012 年 5 月 18~20 日、宮城

〔図書〕(計 1 件)

- 1 前島裕子、Sedbazar Udval、岩崎有作、矢田俊彦：ホルモンと神経ペプチドによる摂食調節、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2012、寺内康夫、伊藤裕、石橋俊編集、中外医学社、東京、2012 年、pp.91-97

〔その他〕

ホームページ等  
研究室ホームページにおける情報公開  
[http://www.jichi.ac.jp/physio2/physiol\\_new\\_HP2008/index.htm](http://www.jichi.ac.jp/physio2/physiol_new_HP2008/index.htm)

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