

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670429

研究課題名(和文) 食欲と代謝調節に関わるGLP-1反応性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Determining GLP-1 responsive genes involved in the regulation of appetite and energy metabolism

研究代表者

野々垣 勝則 (Nonogaki, Katsunori)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：60370988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：GLP-1受容体刺激薬であるLiraglutideを肥満2型糖尿病モデルマウスに腹腔内投与すると、摂食量と体重の減少、高血糖の低下、肝臓でのFibroblast growth factor 21(FGF21)の産生増加を呈した。一方、内因性にGLP-1濃度を高めるDPP-4阻害薬を混餌投与して血中GLP-1濃度を高めても、摂食量、体重、血糖値、血中FGF21濃度の変化はなかった。これらの所見より、GLP-1受容体刺激薬はGLP-1濃度とは無関係に過食・肥満・糖尿病を改善する作用を有する事が示唆された。更にこの作用は視床下部のGLP-1受容体を介した反応であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here we show that systemic administration of liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog, significantly decreased food intake, body weight, and blood glucose levels at 24 h after its administration in individually housed KKAY mice. In addition, the systemic administration of liraglutide significantly increased plasma fibroblast growth factor (Fgf) 21 levels associated with increases in the expression of hepatic Fgf21, while having no effects on the expression of Fgf21 in white adipose tissue. Despite remarkably increased plasma active GLP-1 levels, the ingestion of alogliptin, a selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, had no effects on food intake, body weight, blood glucose levels, and plasma Fgf21 levels. These findings suggest that systemic administration of liraglutide induces hepatic Fgf21 production and suppresses the social isolation-induced obesity and diabetes independently of insulin, glucagon, and active GLP-1 in KKAY mice.

研究分野：代謝学

キーワード：GLP-1受容体 FGF21

1. 研究の背景

肥満症や2型糖尿病の中には、食事指導だけでは過食が抑制できないタイプがある。このタイプの糖尿病には従来の治療薬の組み合わせだけでは血糖のコントロールが困難な場合が多い。それ故、食欲調節薬の開発が望まれる。これまでの肥満症や2型糖尿病に対する食欲抑制薬は、末梢にも作用する為、肺高血圧症や心血管系への副作用により市場から撤収されている。

Glucagon-like peptide-1(GLP-1)受容体作動薬である Liraglutide や Exenatide は、体内で GLP-1 の分解酵素による影響を受けないように遺伝子組み換えをした GLP-1 アナログであり、その皮下注射により膵臓細胞からインスリン分泌を刺激して血糖降下作用を發揮する糖尿病治療薬である。この GLP-1 受容体作動薬は GLP-1 受容体が膵臓以外にもあることから膵外作用として心血管保護作用が報告されている。また、求心性迷走神経末端や中枢神経系にも GLP-1 受容体が存在するので、GLP-1 受容体作動薬は神経系にも作用して食欲を低下させ、体重を減らす効果が海外で認められている。しかし、その中枢性作用機序は未だ不明である。

申請者は食欲抑制薬の標的とされてきたセロトニン 5-HT_{2C} 受容体とメラノコルチン 4 受容体 (MC4 受容体) 各々のノックアウトマウスを用いた研究から、GLP-1 受容体作動薬である Liraglutide の食欲抑制 体重減少効果は、5-HT_{2C} 受容体や MC4 受容体を介さず、別の神経経路を介して生じることを発見した (Nonogaki et al., BBRC, 2011)。

更に、申請者は Liraglutide の末梢投与により視床下部で変動する遺伝子を DNA チップで網羅的解析を行った結果、生食水コントロールと薬物投与 1 時間後の比較 4 ペアで、

1.5 倍以上の変化を来した遺伝子群 (増加した 15 遺伝子、低下した 6 遺伝子) 2 倍以上増加した Kcnk16 と 2 倍以上低下した SH3/ankyrin domain gene 1 を見出した。

2. 研究の目的

肥満や2型糖尿病における過食は指導だけでは容易に是正できないことが多い。食後に小腸から分泌されるインクレチンである GLP-1 の結合する受容体は、求心性迷走神経末端や脳にも存在し、食欲抑制系に関与することが報告されているが、そのシグナル伝達系は未だ不明である。そのシグナル伝達系の解明は、肥満や2型糖尿病に潜在している病態の解明や新たな治療の開発につながる可能性がある。そこで GLP-1 受容体刺激によって視床下部と肝臓で変動する新たな遺伝子を探索し、その遺伝子群の食欲とエネルギー代謝調節における役割を同定することを研究目的とした。

3. 研究の方法

実験 1) C57BL6J マウスに Liraglutide (150 µg/kg) を腹腔内投与にした際の食欲抑制効果は投与 1 時間後に生じる。従って、投与 1 時間後に発現が変化する視床下部の遺伝子を同定する目的で、初回の DNA チップによる網羅的解析で視床下部で 2 倍以上の変化を来した遺伝子 Kcnk16 と SH3/ankyrin domain gene 1 の視床下部における発現量を qRT-PCR で定量した。また、同時に従来から食欲調節で知られている主要なペプチド (POMC, CART, AgRP) の遺伝子発現量も qRT-PCR で定量した。更に、再度、C57BL6J マウスに Liraglutide (150 µg/kg) の腹腔内投与 1 時間後に視床下部を摘出して再度、別のライブラリーの DNA チップで遺伝子発現の網羅的解析を試みた。

実験 2) メラノコルチン 4 受容体シグナル伝

達の異常を持つ肥満・2型糖尿病モデルマウス(KK_Yマウス)にLiraglutide(150 µg/kg)を腹腔内投与し、摂食量、体重、血糖値、血中インスリン、グルカゴン、Fibroblast growth factor 21(FGF21)、活性型GLP-1濃度の変化や、肝臓における遺伝子発現の変化を測定した。また、Liraglutideの作用との比較のために、DPP-4阻害薬であるAlogliptinを混餌(0.03%)で同マウスに3日間与えた後に、同様の指標について測定した。実験3)GLP-1受容体は肝臓にはほとんど存在しないとされているため、Liraglutideの末梢投与による作用が、中枢神経系を介しているか否かを同定する目的で、C57BL6JマウスにLiraglutideを第三脳室内へ投与し、24時間後の摂食量、体重、血中FGF21濃度の変化をC57BL6Jマウスを用いて検討した。

4. 研究成果

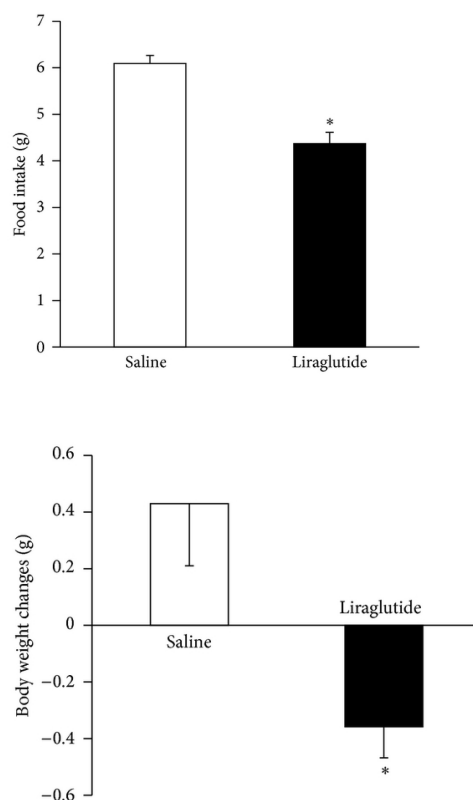
成果1)Liraglutideの末梢投与1時間後に視床下部で変化する遺伝子を探索した結果、Kcnk16とSH3/ankyrin domain gene 1の遺伝子発現は変化が認められなかった。従来から食欲調節で知られている主要なペプチド(POMC, CART, AgRP)はDNAチップでもqRT-PCRでも変化が認められなかった。更に、別のライブラリーのDNAチップで視床下部で変化している遺伝子を再検した結果、未知の遺伝子群の有意な変化が見つかった。これらの遺伝子の機能を同定するために、これらの遺伝子のsiRNAをマウスの第三脳室に注入し、摂食量と体重の変化を観察する実験を企てた。その結果、Spink8とAdora2aのノックダウンでは、摂食量の増加所見を得られた。これらのGLP-1反応性遺伝子は新たな食欲調節関連遺伝子となる可能性が示唆された。

成果2)GLP-1受容体刺激薬であるLiraglutideをメラノコルチン4受容体シグナル伝達の異常を持つ肥満・2型糖尿病モデ

ルマウス(KK_Yマウス)に腹腔内投与すると、摂食量と体重の減少、高血糖の低下、血中Fibroblast growth factor 21(FGF21)濃度の増加を生じたが、肝臓のG6Paseの遺伝子発現や血中インスリンやグルカゴン濃度は変化がなかった(図1)。これらの所見からLiraglutideはインスリンやグルカゴンとは無関係に食欲抑制、体重減少作用、FGF21産生増加作用等から肥満・2型糖尿病の高血糖を改善させる作用があることが示唆された。また、この時、肝臓ではPPAR γ とFGF21の遺伝子発現の増加を伴い、G6Pase、FoxO1、PPAR α の遺伝子発現は変化が認められなかった。更に白色脂肪細胞ではFGF21の遺伝子発現の変化は認められなかった(図2)。

これらの所見からLiraglutideによる血中FGF21の増加は肝臓におけるFGF21産生の亢進によると考えられ、Liraglutideは肝臓における糖産生系の抑制よりもインスリン感受性を高める可能性が示唆された。

図1)



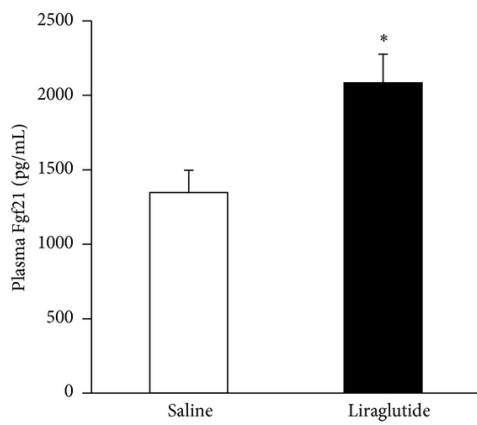
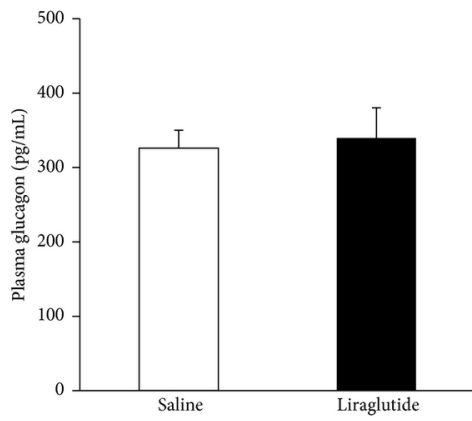
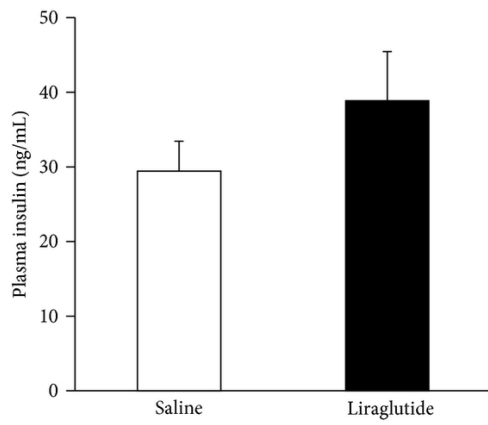
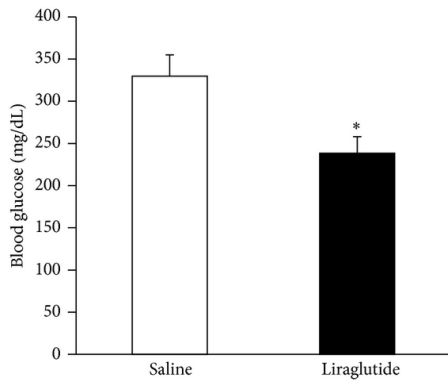


Figure 2)

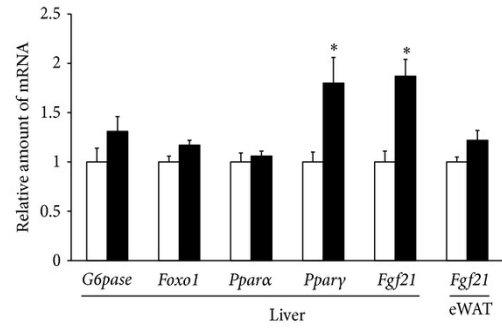
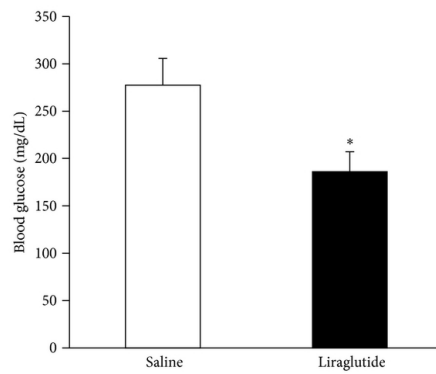
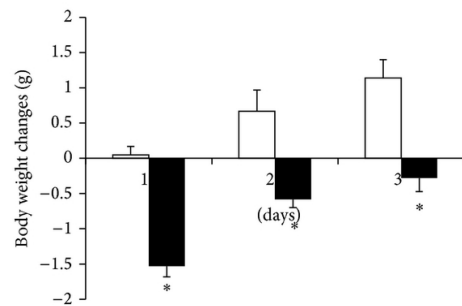
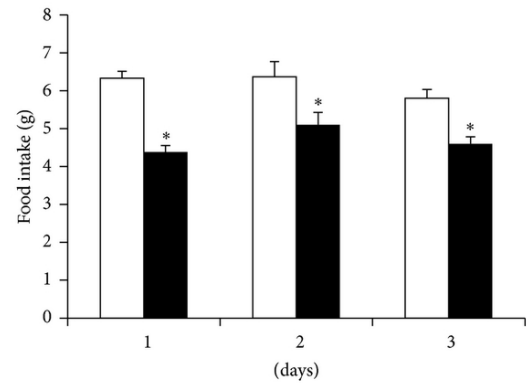
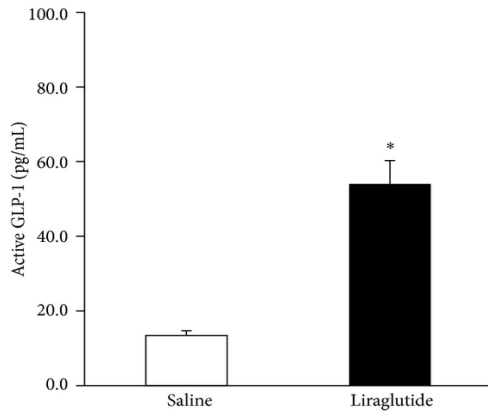


Figure 3)

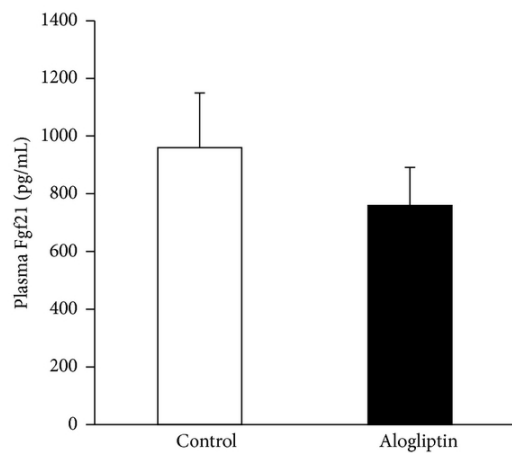
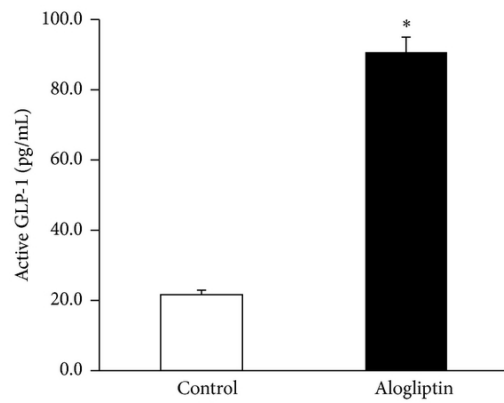
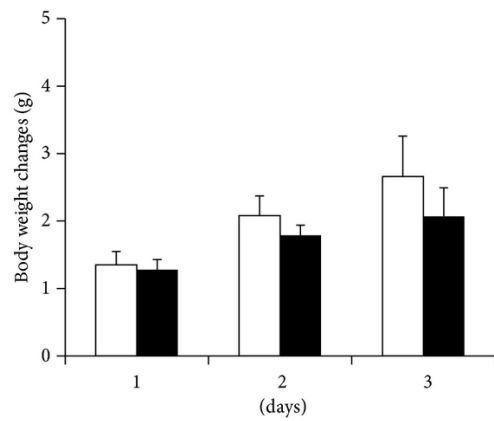
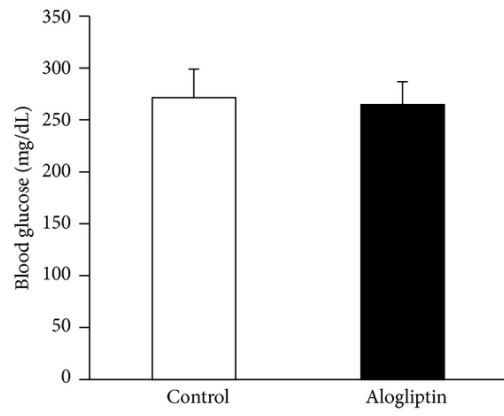
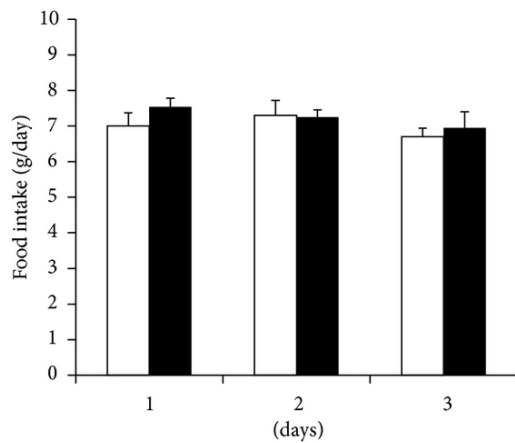




次に、Liraglutide(150 μ g/kg)を1日1回腹腔内へ3日間投与して、1日の摂食量と体重の変化、血糖値、血中活性型 GLP-1 濃度を測定したところ、摂食量の低下と体重減少を伴い3日目の血糖値の降下作用が確認された。この時、血中活性型 GLP-1 濃度は生食投与コントロール群に対して増加していた(図3)。

一方、内因性の活性型 GLP-1 濃度を高める DPP-4 阻害薬である Alogliptin を混餌で3日間投与すると、血中活性型 GLP-1 濃度は Liraglutide 投与時よりも高くなったにも関わらず、摂食量、体重、血糖値、血中 FGF21 濃度の変化は生じなかった(図4)。

図4)



これらの所見より、GLP-1 受容体刺激薬である Liraglutide は血中活性型 GLP-1 濃度とは無関係に過食・肥満・糖尿病を改善する作用を有する事が示唆された。

成果 3) Liraglutide の末梢投与による血中 FGF21 濃度の増加作用は C57BL6J マウスでも同様に認められた。そこで、Liraglutide の作用が中枢神経系を介しているか否かを検討する目的で、C57BL6J マウスの第三脳室内に Liraglutide を注入すると用量依存性に摂食量と体重の減少が認められ、肝臓から FGF21 分泌の増加が認められた。

以上の所見から、GLP-1 受容体刺激薬は脳内の GLP-1 受容体に直接的に作用して食欲抑制、体重減少と肝臓から FGF21 産生を促す。その中枢性機序には従来から知られている食欲調節ペプチド (POMC、CART、AgRP) やメラノコルチン 4 受容体経路は寄与していない。視床下部の Spink8 と Adora2a 等がその刺激伝達の 1 部に寄与するかもしれない。肥満・2 型糖尿病モデルマウスに対する GLP-1 受容体作動薬の血糖降下作用には、インスリンやグルカゴンの分泌や活性型 GLP-1 濃度とは無関係に、過食の抑制や体重減少や血中 FGF21 増加による血糖降下作用があることが示唆される。

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 1 件)

Nonogaki K, Hazama M, Satoh N.
Liraglutide suppresses obesity and hyperglycemia associated with increases in plasma fibroblast growth factor 21 production in KKAY mice. Biomed Research International 2014;ID751930-751930, 2014.
doi: 10.1155/2014/751930 査読有
<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/751930/>

〔学会発表〕(計 1 件)

Nonogaki K
Mosapride, a serotonin 5-HT4 receptor agonist, and alogliptin, a selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, exert additive effects on plasma active

GLP-1 levels in mice. 74th Scientific session in American Diabetes Association, June 13-17, San Francisco, CA, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 超音波照射装置と診断システム
発明者 : 野々垣 勝則
権利者 : 東北大学
種類 : 特許
番号 : 特願 2014-117704
出願年月日 : 2014 年 6 月 6 日
国内外の別 : 国内

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
野々垣 勝則 (Katsunori, Nonogaki)
東北大学医工学研究科・教授
研究者番号 : 60370988

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :