

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282022

研究課題名(和文)生活習慣病予防におけるアミノ酸の中枢性肝糖産生抑制作用の有用性の解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanism of how central action of amino acids suppresses hepatic glucose production

研究代表者

井上 啓 (Inoue, Hiroshi)

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：50397832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表者らは、ヒスチジンが中枢神経ヒスタミン作用に依存して肝糖産生を抑制し、血糖減少作用を発揮する事を見出している。ヒスチジンの耐糖能異常改善食材としての有用性が期待されるが、中枢神経ヒスチジン作用の肝臓での分子メカニズムは明らかではない。本研究では、中枢神経ヒスチジン作用は、迷走神経を介し、肝臓STAT3シグナルを活性化し、肝糖新生系酵素の遺伝子発現を抑制することを明らかにした。迷走神経は、クッパー細胞 7型ニコチン性アセチルコリン受容体を介して、肝臓STAT3シグナルを抑制しており、中枢神経ヒスチジン作用が、迷走神経活動を抑制することにより、肝臓STAT3シグナルを活性化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have reported that histidine administration reduced blood glucose levels in mice, by suppressing hepatic glucose production via central histamine action. Although histidine is expected to be a candidate for blood glucose-lowering nutrient, the precise mechanism of how central histidine suppresses hepatic glucose production remains unclear. Here, we found that central action of histidine and histamine decreased hepatic gluconeogenic genes by activating hepatic STAT3 signaling via the vagus nerve. Moreover, we found that the vagus nerve suppressed hepatic IL-6/STAT3 signaling via the 7-nicotinic acetylcholine receptors, and that central insulin action activated hepatic IL-6/STAT3 signaling by suppressing vagal activity.

研究分野：食生活学

キーワード：アミノ酸 糖産生 中枢神経 迷走神経 肝臓

1. 研究開始当初の背景

血中のアラニン・分枝鎖アミノ酸濃度の増加や血中ヒスチジン濃度の低下といったアミノ酸の血中レベルの変化が、2型糖尿病での血糖値の上昇と相関することが報告され (Nat Med, 17;448, 2011/ Diabetes, 61;1895, 2012)、個体糖代謝の恒常性維持における血中アミノ酸の重要性が指摘されている。糖産生基質であるアラニンは、糖新生の基質であり、分枝鎖アミノ酸はインスリン細胞内情報伝達経路を阻害物質であることから、血糖値上昇に関与するものと考えられる。また、ヒスチジンは、ヒスタミンの基質であり、中枢神経ヒスタミン作用を介して摂食抑制を誘導することが明らかにされている。

研究代表者らも、ヒスチジン投与により血糖値が減少することを見出し、そのメカニズムが肝糖産生の抑制であることを明らかにしている (Diabetes, 62;2266, 2013)。肝糖産生は、血糖値と密接に関連しており、その増加が2型糖尿病・インスリン抵抗性の誘因に、その減少が耐糖能異常を改善することが知られている。肝糖産生は、肝臓へのホルモン(インスリン・グルカゴンなど)の直接作用により調節されるとともに、中枢神経作用によっても抑制される。研究代表者らは、ヒスチジンによる肝糖産生抑制作用が、中枢神経におけるヒスタミン作用、特にヒスタミン H1 受容体依存性のメカニズムを介することを見出している (Diabetes, 62;2266, 2013)。

食生活の西洋化・過栄養に伴う耐糖能異常・インスリン抵抗性が社会問題となる中で、ヒスチジンのような摂食抑制系アミノ酸の耐糖能改善作用は、食生活改善の標的となりうる可能性を有している。そのためには、ヒスチジンの耐糖能異常の改善効果、特に肝糖産生抑制作用についての、より一層の詳細な解明が必要である。ヒスチジンが中枢神経性に肝糖産生を調節するメカニズムについて、迷走神経系が関与する可能性を見出しているが、その詳細な分子作用メカニズムなど全く解明がなされていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、ヒスチジンによる中枢神経性肝糖産生抑制作用の、生活習慣病、特に糖尿病の発症予防における有用性を解明することを目的とした。具体的には、ヒスチジンによる中枢神経性肝糖代謝メカニズムの解明を実施した。

3. 研究の方法

研究代表者は、血中ヒスチジン増加が、ヒスタミン H1 受容体依存性の中枢神経ヒスタミン作用を介し、肝臓クッパー細胞でのインターロイキン-6 (IL-6) 発現増強、さらには IL-6 の細胞内シグナル伝達物質である STAT3 の肝細胞での活性化を引き起こすことを見出している。しかし、中枢神経ヒスタミン作用が、クッパー細胞および肝細胞 STAT3 シグ

ナルを調節する分子メカニズムは解明できていない。中枢神経作用による肝臓機能調節に、迷走神経の重要性が指摘されている。そこで、脳室内ヒスチジン投与後に、迷走神経肝枝の神経活動を測定した。さらに、迷走神経切除・自律神経節遮断薬を行い、迷走神経の肝臓への影響を検討した。迷走神経の神経伝達物質であるアセチルコリン作用(ニコチン、または 7 ニコチン性アセチルコリン受容体アゴニスト処理)によりマクロファージにおける IL-6 分泌が抑制されることが明らかにされている (Nature 421:384, 2003)。そこで、7 ニコチン性アセチルコリン受容体欠損マウス (7KO) を用い、中枢神経ヒスチジン作用による肝臓 STAT3 活性化を検討した。

4. 研究成果

中枢神経ヒスチジン作用による肝糖産生制御における迷走神経の役割を検討するために、脳室内ヒスチジン投与下での迷走神経肝臓枝の電気生理活性を測定した。投与後 30 分から、脳室内ヒスチジン投与群において、迷走神経肝臓枝の神経活動が有意に減弱した。そこで、迷走神経活動の減弱が、肝臓 IL-6/STAT3 に及ぼす作用を検討するために、迷走神経肝臓枝切除による検討を行った。迷走神経切除により、肝臓での STAT3 活性化および IL-6 発現が亢進した。リポソーム封入クロドロネートの経静脈投与によって、IL-6 の肝臓における主要産生細胞であるクッパー細胞を除去することが可能である。実際に、リポソーム封入クロドロネート処理により、クッパー細胞マーカーである Emr1 とともに、肝臓 IL-6 および TNF の発現も減少した。肝臓クッパー細胞除去による肝臓 IL-6 発現減少に伴い、迷走神経切除による肝臓 STAT3 経路の活性化は、減弱した。次に、神経節遮断薬、ニコチン性アセチルコリン受容体阻害剤、クロリゾンダミンを用いた検討を行った。クロリゾンダミン投与3時間後より、肝臓 STAT3 活性化の増強傾向を認め、投与後4時間からは有意な活性亢進を認めた。クロリゾンダミン投与により増強された肝臓 STAT3 活性は、クッパー細胞除去に伴い減弱した。また、クロリゾンダミン投与は、肝臓における IL-6・TNF の遺伝子発現も増加させたが、リポソーム封入クロドロネート投与によるクッパー細胞除去により、Emr1 の発現とともに、肝臓 IL-6・TNF 発現も著しく減少した。これらの結果は、中枢神経ヒスチジン作用が迷走神経活動を抑制する事、さらに迷走神経作用の低下がクッパー細胞 IL-6 発現増加、肝臓 STAT3 活性化を誘導する事を、示唆している。

7KO は高脂肪食負荷に伴い、耐糖能障害・インスリン抵抗性を示すことが報告されているが (Endocrinology 152:836, 2011)、通常食飼育下では、随時摂食における体重と血糖値、糖負荷試験時の血糖値および血中インスリン値は対照と比較し、明らかな差を示

さなかった。7K0は、中枢神経ヒスチジン投与による肝臓IL-6発現の増加およびSTAT3活性化は減弱していた。これらの結果は、中枢神経作用による肝臓IL-6/STAT3シグナル活性化に、末梢組織における7ニコチン性アセチルコリン受容体が重要な役割を果たす事を示唆している。

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14件)

- 1) Watanabe H, Inaba Y, Kimura K, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Motoyama T, Tachibana N, Kaneko S, Kohno M, Inoue H*. Dietary Mung Bean Protein Reduces Hepatic Steatosis, Fibrosis, and Inflammation in Male Mice with Diet-Induced, Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Nutr.*, 147(1):52-60, 2017, doi: 10.3945/jn.116.231662, 査読有
- 2) Sakai M, Tujimura-Hayakawa T, Yagi T, Yano H, Mitsushima M, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Inoue H, Kido Y, Kasuga M, Matsumoto M. The GCN5-CITED2-PKA signalling module controls hepatic glucose metabolism through a cAMP-induced substrate switch. *Nat Commun.*, 7:13147, 2016, doi: 10.1038/ncomms13147, 査読有
- 3) Morimoto M, Lee EY, Zhang X, Inaba Y, Inoue H, Ogawa M, Shirasawa T, Yokosuka O, Miki T. Eicosapentaenoic acid ameliorates hyperglycemia in high-fat diet-sensitive diabetes mice in conjunction with restoration of hypoadiponectinemia. *Nutr Diabetes*, 27;6:e213, 2016, doi: 10.1038/nutd.2016.21, 査読有.
- 4) Kimura K, Tanida M, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T,

Kaneko S, Kasuga M, Inoue H*. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. *Cell Rep.*, 14(10):2362-74, 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.032, 査読有

- 5) Kobayashi K, Tanaka T, Okada S, Morimoto Y, Matsumura S, Manio MC, Inoue K, Kimura K, Yagi T, Saito Y, Fushiki T, Inoue H, Matsumoto M, Nabeshima Y. Hepatocyte Klotho regulates lipid homeostasis but not body weight in mice. *FASEB J.*, 30(2):849-62, 2016, doi: 10.1096/fj.15-274449, 査読有
- 6) Inoue H. Central insulin-mediated regulation of hepatic glucose production. *Endocr J.* 63(1):1-7, 2016, doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0540, 査読有
- 7) Asahara S, Etoh H, Inoue H, Teruyama K, Shibutani Y, Ihara Y, Kawada Y, Bartolome A, Hashimoto N, Matsuda T, Koyanagi-Kimura M, Kanno A, Hirota Y, Hosooka T, Nagashima K, Nishimura W, Inoue H, Matsumoto M, Higgins MJ, Yasuda K, Inagaki N, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Paternal allelic mutation at the Kcnq1 locus reduces pancreatic β -cell mass by epigenetic modification of Cdkn1c. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 112(27):8332-7, 2015, doi: 10.1073/pnas.1422104112, 査読有
- 8) Matsuda T, Takahashi H, Mieda Y, Shimizu S, Kawamoto T, Matsuura Y, Takai T, Suzuki E, Kanno A, Koyanagi-Kimura M, Asahara S, Bartolome A, Yokoi N, Inoue H, Ogawa

- W, Seino S, Kido Y. Regulation of Pancreatic Cell Mass by Cross-Interaction between CCAAT Enhancer Binding Protein Induced by Endoplasmic Reticulum Stress and AMP-Activated Protein Kinase Activity. *PLoS One*. 10(6):e0130757, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0130757, 査読有
- 9) Inaba Y, Furutani T, Kimura K, Watanabe H, Haga S, Kido Y, Matsumoto M, Yamamoto Y, Harada K, Kaneko S, Oyadomari S, Ozaki M, Kasuga M, **Inoue H***. Growth arrest and DNA damage-inducible 34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 61(4):1343-56, 2015, doi: 10.1002/hep.27619, 査読有
- 10) **Inoue H**. Molecular basis of brain-mediated regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetol Int.*, 5:158-164, 2014, doi: 10.1007/s13340-014-0185-8, 査読有
- 11) Tsuneki H, Tokai E, Nakamura Y, Takahashi K, Fujita M, Asaoka T, Kon K, Anzawa Y, Wada T, Takasaki I, Kimura K, **Inoue H**, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance via daily bidirectional regulation of autonomic nervous system in mice. *Diabetes*. 64(2):459-70, 2015, doi: 10.2337/db14-0695, 査読有
- 12) Haga S, Ozawa T, Yamada Y, Morita N, Nagashima I, **Inoue H**, Inaba Y, Noda N, Abe R, Umezawa K, Ozaki M. p62/SQSTM1 Plays a Protective Role in Oxidative Injury of Steatotic Liver in a Mouse Hepatectomy Model. *Antioxid Redox Signal.*, 21(18):2515-30, 2014, doi: 10.1089/ars.2013.5391, 査読有
- 13) Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, **Inoue H**, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun.*, 19;5:4982, 2014, doi: 10.1038/ncomms5982, 査読有
- 14) Harada K, Kakuda Y, Sato Y, Ikeda H, Shimoda S, Yamamoto Y, **Inoue H**, Ohta H, Kasashima S, Kawashima A, Nakanuma Y. Alteration of energy metabolism in the pathogenesis of bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol.*, 67(5):396-402, 2014, doi: 10.1136/jclinpath-2013-201815, 査読有
- 〔学会発表〕(計9件)
- 1) **井上啓**: 第37回日本肥満学会、「中枢神経性肝糖産生調節における迷走神経の役割」、2016年10月7日(東京ファッションタウンビル(東京))
- 2) **井上啓**: 第26回日本病態生理学会、「中枢神経による肝糖代謝調節とその破綻」、2016年8月6日(金沢医科大学(金沢))
- 3) **井上啓**: 第93回日本生理学会大会、「迷走神経を介した中枢神経性肝糖代謝制御メカニズム」、2016年3月24日(札幌コンベンションセンター(札幌))
- 4) **井上啓**: 第38回日本分子生物学会、「視床下部を介した栄養素による肝糖代謝調節」、2015年12月2日(神戸ポートアイランド(神戸))

- 5) **井上啓**：第 36 回日本肥満学会、「中枢神経・肝臓クロストークと肥満症におけるその破綻の解明」、2015 年 10 月 3 日（名古屋国際会議場（名古屋））
- 6) **井上啓**：第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、「迷走神経による肝糖産生制御」、2015 年 5 月 23 日（シーモールパレス（下関））
- 7) **井上啓**：第 88 回日本内分泌学会学術総会、「中枢神経インスリン作用による肝糖代謝調節メカニズムの解明」、2015 年 4 月 25 日（ホテルニューオータニ東京（東京））
- 8) **井上啓**：日本薬学会第 135 年会、「中枢神経による肝臓糖産生の制御」、2015 年 3 月 27 日（神戸学院大学（神戸））
- 9) **井上啓**：第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、「中枢神経による肝糖代謝制御の分子基盤の解明」、2014 年 5 月 22 日（大阪国際会議場（大阪））

〔図書〕（計 2 件）

- 1) **井上啓**. 羊土社、実験医学、「予防医学の扉を開く 食品に秘められたサイエンス - 栄養の視床下部での感知と糖代謝への作用 - 」、35; 630-633, 2017
- 2) **井上啓**. 科学評論社、内分泌・糖尿病・代謝内科、「中枢神経性肝糖産生制御における迷走神経・クッパー細胞の役割」、41 (1);26-30,2015

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：肝臓脂肪蓄積抑制剤
 発明者：**井上啓**
 権利者：国立大学法人金沢大学
 種類：特許権
 番号：特願 2015-088118
 出願年月日：2015 年 4 月 23 日
 国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ

<http://inoue.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 啓 (INOUE HIROSHI)

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：50397832

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし