

新規の脳内タンパク質による抗糖尿病作用機序の解明

北海道大学大学院獣医学研究院生化学教室

戸田 知得

【研究の背景と目的】

世界保健機関の試算では年間160万人が糖尿病で死亡しており、世界的に糖尿病・高血糖の予防と治療が必要とされている。日本では運動を取り入れた生活やカロリーに気を付けた食事など、様々な対策が取られているにもかかわらず糖尿病患者数が減らない。これまでに末梢組織の代謝やホルモン分泌に関する研究が数多く行われてきたが、脳の研究は十分に進んでいない。インスリンが発見される前までは脳が血糖値を調節すると考えられていたほど脳は全身糖代謝に重要であり、脳による血糖値調節メカニズムを解明することは糖尿病の理解および治療法開発に必須である。

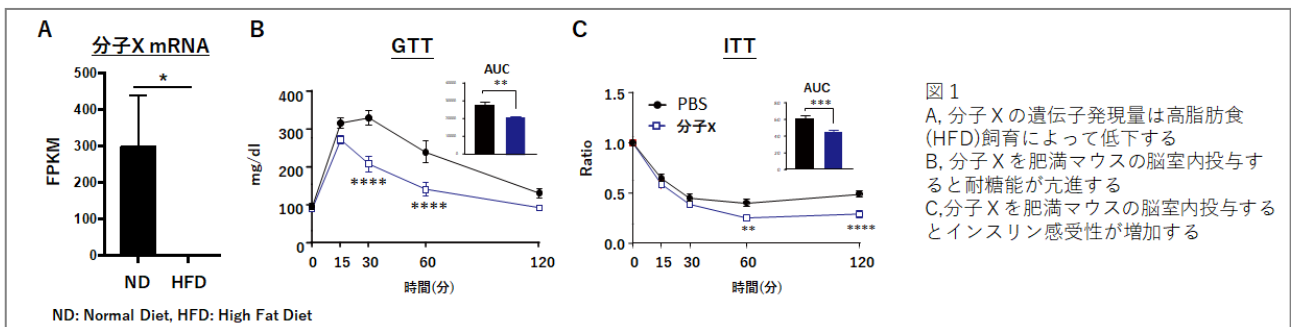
脳には血糖値の増減を感知するグルコースセンシング神経があり、骨格筋や肝臓の糖代謝を調節して血糖値を一定に保つ(Toda C, *Cell*, 2016)。肥満はグルコースセンシング神経の働きを弱め、糖尿病の発症に寄与する。しかし、グルコースセンシング神経のバイオマーカーとなる遺伝子が発見されおらず、グルコースセンシング神経の研究が進まなかった。申請者は活性化した神経細胞を蛍光タンパク質で標識しsingle cell RNA sequenceを行うことで、グルコースセンシング神経から分泌され、糖尿病の原因および治療ターゲットとなり得る分子Xを発見した。分子Xは肥満モデルマウスのグルコースセンシング神経では発現量が低下し、この組換えタンパク質を肥満マウスの脳内に投与すると肥満による糖代謝の悪化が改善した。分子Xは神経ネットワークの増強に関与する可能性があるが、その詳細は不明である。本研究は、グルコースセンシング神経の神経可塑性に着目し、分子Xの糖尿病改善作用機序を解明することを目的とする。また、視床下部におけるグルコースセンシングは全く別のメカニズムでも調節されている可能性がある。そこで本研究ではイメージング質量分析器を用いた細胞膜リン脂質解析や絶食後に餌を食べさせた時の活性化神経探索についても研究を行った。

【結果と考察】

1. 分子Xの糖尿病改善メカニズム

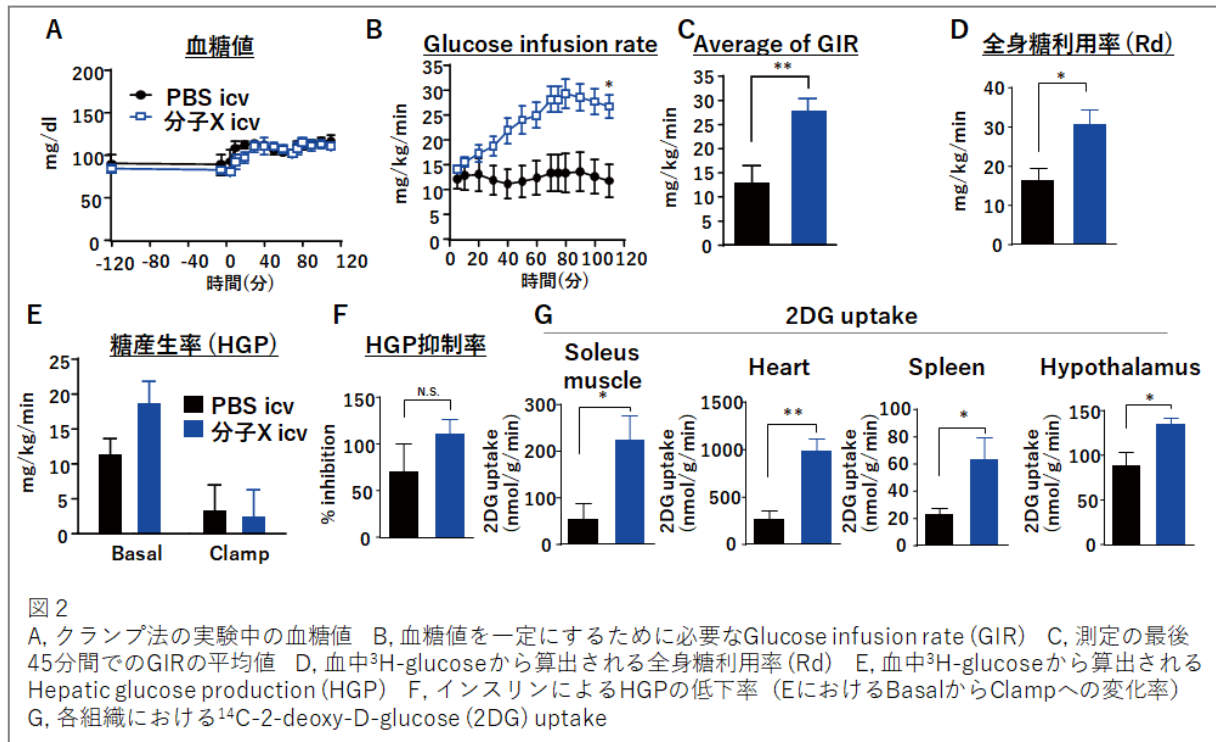
(1-1) 分子Xを肥満マウスの脳室内に投与すると耐糖能およびインスリン感受性が回復する

神経活動の増加の指標として知られるactivity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc)を用いてタモキシフェン誘導性にCre-recombinase (Cre)を活性化するArc-Cre/ER^{T2}マウスを用い、グルコースによって活性化した神経細胞にのみtdTomato等を発現させた。視床下部腹内側核のtdTomato陽性細胞は約70%がグルコースの濃度変化に応答する神経であった。この神経は血糖値を低下する能力があり、高脂肪食飼育によってグルコースセンシング機能が消失した。すなわち、肥満すると脳による血糖値増加を感知する機構が弱まり糖尿病を発症するモデルとして有用であることが分かった。この神経をラベルした後、通常食または高脂肪食で2ヶ月間飼育したマウスからtdTomato陽性細胞を採取し、single cell RNA sequenceを行った。その結果、視床下部・腹内側核だけに発現し、肥満によって発現量が低下する分子Xを見いだした(図1A)。この分子の組換えタンパク質を高脂肪食で飼育した肥満マウスの脳内に投与すると肥満によって悪化した耐糖能およびインスリン感受性が改善した(図1B, C)。



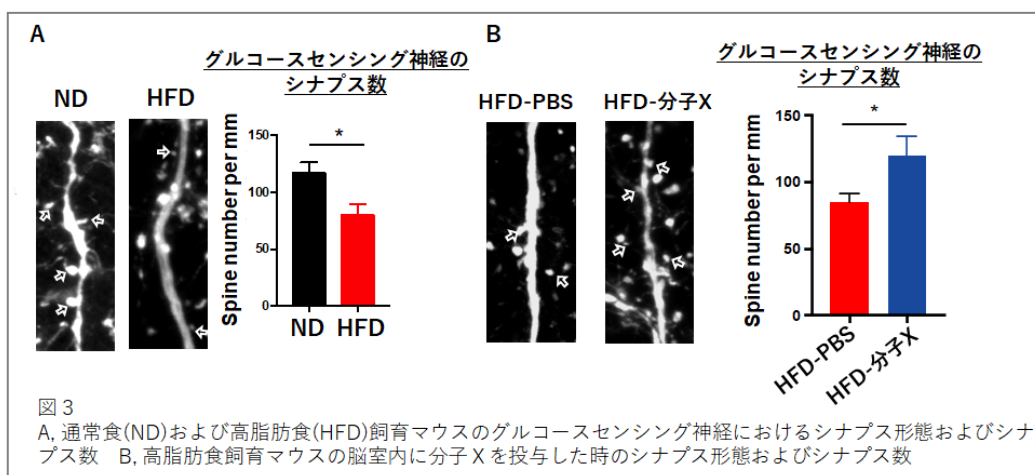
(1-2) 分子Xを肥満マウスの脳室内に投与すると骨格筋のインスリン感受性が回復する

次に、分子Xがどのように全身糖代謝を改善したかを明らかにするために、Hyperinsulinemic euglycemic clamp (クランプ法)を行った。分子Xの脳室内投与はglucose infusion rateおよび全身糖利用率を増加した(図2A-D)。しかし、糖産生や肝臓のインスリン感受性は変化しなかった(図2E, F)。末梢組織におけるグルコース取り込みを測定すると、骨格筋の赤筋部分(Soleus)、心臓、脾臓および視床下部において2DG uptakeが増加した。従って、分子Xは骨格筋および心臓のインスリン感受性を増加させることが示唆された。

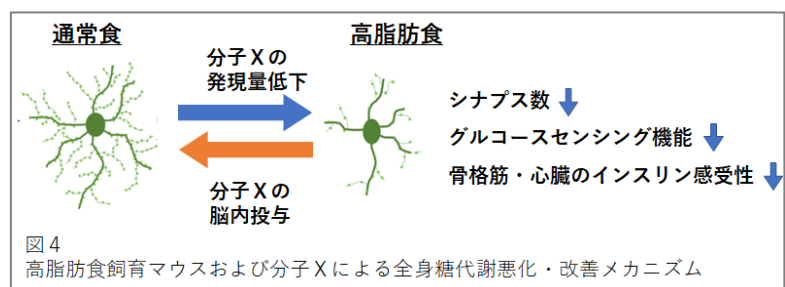


(1-3) 分子Xを肥満マウスの脳室内に投与するとグルコースセンシング神経のシナプス数が回復する

どのようなメカニズムで骨格筋のインスリン感受性が改善するかを調べるために、single cell RNA sequenceの結果をgene ontology解析すると、最も変化していた遺伝子群はシナプスに関するものあることが分かった。そこで脳の透明化を行い、グルコースセンシング神経においてシナプスの数を測定すると、通常食よりも高脂肪食飼育マウスにおいてシナプスの数が有意に低下した(図3A)。また、高脂肪食飼育マウスの脳内に分子Xを投与するとシナプスの数がほぼ通常食マウスと同じ程度まで回復した。従って、肥満はグルコースセンシング神経と他の神経の連絡を低下し、分子Xを投与すると神経連絡が改善して糖尿病の症状が回復することが示唆された。



以上の結果から、高脂肪食飼育マウスの視床下部ではグルコースセンシング神経において分子Xの発現が低下し、シナプス数が低下して骨格筋および心臓のインスリン感受性が低下する。分子Xの脳内投与がこれらを改善することが明らかとなった(図4、論文作成中)。



2. 視床下部のプロスタグランジン生成がグルコースセンシング神経の機能に重要である

これまでに視床下部の脂肪酸酸化が食欲やエネルギー消費の調節に重要であることが報告されている。しかし、脳内の細胞膜リン脂質代謝と全身エネルギー代謝の関係は十分に分かっていない。本研究では、グルコースを投与し血糖値を増加させたときに、視床下部で脂質組成がどのように変化するかを、イメージング質量分析器を用いて測定した。グルコースを投与すると、マウス視床下部においてアラキドン酸含有phosphatidylethanolamineおよびphosphatidylinositolの量が減少した。アラキドン酸の遊離およびエイコサノイドの生成に関わる酵素であるホスホリパーゼA2およびシクロオキシゲナーゼに対する阻害剤をそれぞれ視床下部に投与し、グルコース負荷試験を行ったところ、それぞれの阻害剤投与群は溶媒投与コントロール群よりも耐糖能が低下した。従って、視床下部におけるアラキドン酸含有リン脂質代謝およびエイコサノイドの生成が、全身の糖代謝に関与することが示唆された。また、高脂肪食飼育マウスにおいても同様の実験を行ったところ、肥満マウスの視床下部においてアラキドン酸含有リン脂質の量が通常食マウスよりも減少していた。同時に、肥満は視床下部でアラキドン酸の遊離に重要な細胞質型ホスホリパーゼA2 (cPLA2)の活性を増加し、数種類のエイコサノイドの量を増加した。cPLA2に対するshRNAを視床下部の神経に発現すると、コントロールマウスよりも食事誘導性肥満によるアストロサイトおよびマイクログリア数の増加が抑制され、肝臓のインスリン感受性の悪化が改善した。しかし、体重に変化はなかった。従って、肥満は視床下部においてcPLA2を活性化し、アラキドン酸含有リン脂質からのエイコサノイドの生成および炎症の増加を介して、肝臓の糖代謝を悪化することが示唆された (Lee ML, *Nature Communications*, 2021)。

3. 絶食後の再摂食は視床下部背内側核の神経を活性化し摂食量を抑制する

グルコースセンシング神経を標識するためにグルコースの投与ではなく、絶食後の再摂食実験を試した。上記のArc-Cre/ER^{T2}マウスを用いて、絶食後再び餌を与えたときに活性化する神経を標識した。その結果、視床下部で摂食後に活性化神経が増加していたのは、これまで満腹中枢と言われていた腹内側核や弓状核ではなく背内側核であった。背内側核の再摂食応答性神経を人為的に活性化すると摂食量を有意に低下させ、人為的な抑制は摂食量を増加した。しかし、人為的活性化および抑制は糖代謝に影響は与えなかった。背内側核の再摂食応答性神経が室傍核に投射していることも明らかとなり、背内側核から室傍核への経路が摂食応答に重要であることが示唆された。またConditioned place preference testにおいて背内側核神経の活性化は場所嗜好性を変化させ、感情にも正の影響を与えることが示唆された。single cell RNA sequence解析の結果、背内側核の再摂食応答性神経はプロダイノルフィンおよびCCKを発現するグルタミン酸作動性神経であることが明らかとなった。以上をまとめると、視床下部背内側核のプロダイノルフィンおよびCCKを発現する神経は摂食に応答して活性化し、室傍核を介して摂食量を低下させることが示唆された (Imoto D, *Molecular Metabolism*, accepted)。

【参考文献】

Lee ML, Matsunaga H, Sugiura Y, Hayasaka T, Yamamoto I, Imoto D, Suematsu M, Iijima N, Kimura K, Diano S, **Toda C***: Prostaglandin in the ventromedial hypothalamus regulates peripheral glucose metabolism. *corresponding author
Nature Communications, 12, 2330, 2021

Imoto D, Yamamoto I, Matsunaga H, Yonekura T, Lee ML, Kato KX, Yamasaki T, Xu S, Ishimoto T, Yamagata S, Otsuguro K, Horiuchi M, Iijima N, Kimura K, **Toda C***: Refeeding activates neurons in the dorsomedial hypothalamus to inhibit food intake and promote positive valence. *corresponding author
Molecular Metabolism, Accepted, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101366>

【謝辞】

本研究を遂行するにあたりまして、公益財団法人アステラス病態代謝研究会にご支援を賜りましたことを深く感謝申し上げます。