

迷走神経活動の肝糖代謝における役割の解明

金沢大学 新学術創成研究機構 栄養・代謝研究ユニット

井上 啓

1. 目的

肝臓は、エネルギー状態に応じて、糖取り込み・糖産生を調節することによって、個体レベルでの糖代謝恒常性維持に中心的な役割を果たしている (Watanabe et al., in press)。特に、肝糖産生の増加は、2型糖尿病における血糖値上昇と密接に関連することから、その制御メカニズムの解明が進められている。肝糖産生の制御は、インスリンに依存すると言っても過言ではなく、インスリンは肝糖産生を強力に抑制する。インスリンは、肝臓に直接作用し、肝糖産生を抑制するとともに、視床下部を中心とした中枢神経を介した間接作用によっても肝糖産生を抑制する。中枢神経インスリン作用による肝糖産生抑制の障害が、個体レベルでのインスリン抵抗性を惹起することが報告されており、中枢神経性肝糖産生制御の重要性を示唆している (Gelling et al., 2006; Inoue et al., 2006; Obici et al., 2002)。

中枢神経インスリン作用が、肝糖産生を抑制するメカニズムとして、迷走神経が重要な役割を果たしている。実際に、迷走神経肝枝を切除すると、中枢神経インスリン作用による肝糖産生抑制が減弱する (Kimura et al., 2016; Pocai et al., 2005a)。しかし、実際に、中枢神経インスリン作用が、迷走神経活動をどのように制御し、肝糖産生を抑制するか、という疑問は解明されていない。

中枢神経インスリン作用による肝糖産生の抑制は、肝糖産生に関連するPhosphoenolpyruvate carboxykinaseやglucose-6-phosphatase (G6Pase)といった糖新生系酵素の遺伝子発現の減弱に起因することが知られている (Obici et al., 2002)。我々は、中枢神経インスリン作用の糖新生系酵素の遺伝子発現制御の作用分子として、転写因子signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が重要な役割を果たす事を見出している (Inoue et al., 2006)。中枢神経インスリン作用は、迷走神経を介して、肝臓クッパー細胞からのinterleukin-6 (IL-6)分泌を増加させ、肝細胞でSTAT3を活性化する。活性化されたSTAT3は、糖新生系酵素のプロモーター領域に結合し、その遺伝子転写を抑制する (Inoue et al., 2004)。実際に、肝臓STAT3欠損マウスでは、中枢神経インスリン作用による肝糖産生抑制が障害され、インスリン抵抗性・耐糖能異常を呈する。

迷走神経活動の増強が、肝臓での炎症性サイトカインの発現誘導を抑制することが報告されている (Borovikova et al., 2000)。また、腹腔内マクロファージを用いた検討から、迷走神経の主要な神経伝達物質であるアセチルコリンが、 $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体 ($A7$ -nAChR)を介し、TNF α やIL-6分泌を抑制することが報告されている (Wang et al., 2003)。一方で、中枢神経インスリン作用が肝臓クッパー細胞を制御するメカニズム、また、中枢神経インスリン作用による肝糖産生抑制における $A7$ -nAChRの役割は解明されていない。本研究において、中枢神経インスリン作用による迷走神経活動の変化、さらには、迷走神経および $A7$ -nAChRを介した肝糖産生制御の仕組みを明らかにした。

2. 方法

①マウス脳室内インスリン投与、および、迷走神経肝臓枝切除または神経活動測定

動物は、金沢大学動物実験委員会による審査、金沢大学長からの承認を得て実施した。8-10週齢のC57Bl/6Jの雄マウスに対し、側脳室にカニューレを留置し、留置後7-10日後に、脳室内インスリン投与を行った。具体的には、インスリン(40 μ U)を含有する人工髄液2 μ Lを、2 μ L/10分間かけて、投与した。迷走神経肝臓枝は、横隔膜下で前迷走神経幹から分枝する。肝臓枝の切除は、目視下において、電気メスを用いて行った。神経活動は、36ゲージステンレス電極をシリコンゲルにより肝臓枝に固定し、測定した (Tanida et al., 2015)。

② $\alpha 7$ 型ニコチン性アセチルコリン受容体欠損マウス ($A7K0$) へのクッパー細胞除去および骨髄移植

$A7K0$ は、Jackson laboratory より購入した。クッパー細胞除去は、リポソーム封入クロドロネートの尾静脈からの投与により、行った。骨髄移植は、クッパー細胞除去を行った後、2-3日後に行った。具体的には、放射線は4.8Gyの線量で2回照射し、その後、野生型または $A7K0$ マウス由来の骨髄細胞 (1×10^8 個)を尾静脈から投与することで実施した。これらのマウスは、骨髄移植後6週間で、実験に供した。

3. 結果

①脳室内インスリン投与による迷走神経肝臓枝の活動制御の検討

中枢神経インスリ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、脳室内イ

ンスリ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、脳室内インスリン投与群において、迷走神経肝臓枝の神経活動が有意に減弱することを見出した。

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。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。さらに、ニコチン性アセチルコリン受容体阻害剤、Chlorisondamineを用いた検討を行った。低用量のChlorisondamineは血液脳関門を越えず、末梢でのニコチン性アセチルコリン作用を遮断する。Chlorisondamine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。Chlorisondamine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、Chlorisondamine投与は、肝臓におけるIL-6・TNF α の遺伝子発現も増加させたが、クッパー細胞除去により、肝臓IL-6・TNF α 発現も著しく減少した。これらの結果は、中枢神経インスリ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活性化を誘導することを示唆している。

②中枢神経インスリン作用が、迷走神経を介して、肝糖産生を制御する仕組みの検討

A7KOにおける、脳室内インスリン投与による肝臓IL-6/STAT3活性化及び肝糖新生系酵素遺伝子発現を検討した。A7KOでは、脳室内インスリン投与において、野生型と同様に迷走神経活動の抑制を呈したが、肝臓IL-6発現増加・STAT3活性化は減弱し、G6Pase遺伝子発現抑制が障害されていた。これらの結果は、中枢神経インスリン作用による肝臓IL-6/STAT3シグナル活性化およびG6Pase遺伝子発現抑制に、A7-nAChRが重要な役割を果たす事を示唆している。

A7-nAChRは、マクロファージとともに、中枢神経や自律神経節などに発現している。中枢神経インスリン作用による肝糖産生抑制における、クッパー細胞A7-nAChRの重要性を解明する為に、骨髄移植によるクッパー細胞置換下で、脳室内インスリン投与による肝臓応答を検討した。A7KOに、enhanced Green fluorescent proteinトランスジェニックマウス由来骨髄移植を行ったところ、A7KO肝臓でのA7-nAChR発現が部分的に回復し、91.4 \pm 3.3%のクッパー細胞がGFP陽性となった。A7KOにおいて、野生型マウス由来骨髄を移植し、クッパー細胞を野生型に置換したところ、脳室内インスリン投与に伴う肝臓IL-6発現増加・STAT3活性化・G6Pase遺伝子発現抑制が回復した。これらの結果は、クッパー細胞におけるA7-nAChRが、中枢神経インスリン作用による肝臓応答に重要な役割を果たす事を示唆している。

4. 考察 まとめ

神経切除による検討から、中枢神経インスリン作用により肝臓糖産生抑制には、迷走神経の重要性が指摘されてきた(Pocai et al., 2005b)。また、我々は、中枢神経インスリン作用が、肝臓IL-6/STAT3シグナルの活性化を介して、肝糖産生を抑制することを明らかにしてきた(Inoue et al., 2006)。本研究から、我々は、中枢神経インスリン作用が迷走神経活動を抑制することで、肝臓のIL-6/STAT3シグナルの活性化、糖新生系酵素の遺伝子発現抑制を引き起こすことを明らかにした。実際に、脳室内インスリン投与により迷走神経肝臓枝の神経活動は減弱した。さらに、Chlorisondamine投与による迷走神経遮断によって、肝臓におけるIL-6/STAT3シグナル活性化の増強・G6Pase遺伝子発現抑制が起こり、Chlorisondamine投与・迷走神経肝臓枝切除によって、脳室内インスリン投与による肝臓応答が消失した。

中枢神経インスリン作用が、迷走神経活動を抑制するメカニズムについては、明らかではない。視床下部のpro-opiomelanocortin(POMC)ニューロンによる代謝調節メカニズムとしてmelanocyte stimulating hormone (MSH)が知られているが、MSHの受容体であるmelanocortin 4 receptor (MC4R)の活性化が、迷走神経背側核の神経活動を抑制することが明らかにされている(Sohn et al., 2013b)。しかし、インスリンが、POMCニューロンの活動を抑制すること(Sohn et al., 2013a)、また、中枢神経インスリン作用による肝糖産生抑制が、MC4R阻害剤で障害されない事などから(Obici et al., 2002)、脳室内インスリン投与による迷走神経肝臓枝の活動抑制を、説明できない。中枢神経におけるインスリンの迷走神経調節メカニズムの解明は今後の課題である。

本研究において、我々は、中枢神経インスリン作用による肝臓応答に、迷走神経A7-nAChR作用が重要な役割を果たす事を見出した。A7KOでは、脳室内インスリン投与による肝臓STAT3活性化・G6Pase遺伝子発現抑制が障害される。迷走神経は、肝臓内の神経節で、節後線維とシナプスを形成し、肝臓への情報伝達を行っており、A7-nAChRはクッパー細胞ともに、神経節にも発現している。しかし、A7KOでのクッパー細胞の野生型への置換によって、脳室内インスリン投与による肝臓IL-6/STAT3活性化・G6Pase遺伝子発現抑制が回復する。このことは、中枢神経インスリン作用による肝臓応答における、クッパー細胞A7-nAChRの重要性を示している。

今回、我々は、迷走神経が、クッパー細胞A7-nAChRを介したコリン作用により肝臓IL-6/STAT3シグナルの活性化を抑制すること、また、中枢神経インスリン作用は、迷走神経肝臓枝の神経活動の低下により、肝臓IL-6/STAT3活性を増強するというメカニズムを明らかにした。中枢神経インスリン作用の障害が、肥満・インスリン抵抗性の病態に関与することが知られる中で、我々が見出した知見は、A7-nAChRを介したクッパー細胞の制御メカニズムが、肥満・インスリン抵抗性の新規な治療標的となる可能性を示唆している。

5. 発表論文、参考文献

- Borovikova, L. V., Ivanova, S., Zhang, M., Yang, H., Botchkina, G. I., Watkins, L. R., Wang, H., Abumrad, N., Eaton, J. W., and Tracey, K. J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458-462.
- Gelling, R. W., Morton, G. J., Morrison, C. D., Niswender, K. D., Myers, M. G., Jr., Rhodes, C. J., and Schwartz, M. W. (2006). Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. *Cell Metab* 3, 67-73.
- Inoue, H., Ogawa, W., Asakawa, A., Okamoto, Y., Nishizawa, A., Matsumoto, M., Teshigawara, K., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., et al. (2006). Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab* 3, 267-275.
- Inoue, H., Ogawa, W., Ozaki, M., Haga, S., Matsumoto, M., Furukawa, K., Hashimoto, N., Kido, Y., Mori, T., Sakaue, H., et al. (2004). Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat Med* 10, 168-174.
- Kimura, K., Tanida, M., Nagata, N., Inaba, Y., Watanabe, H., Nagashimada, M., Ota, T., Asahara, S., Kido, Y., Matsumoto, M., et al. (2016). Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. *Cell Rep* 14, 2362-2374.
- Obici, S., Zhang, B. B., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002). Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8, 1376-1382.
- Pocai, A., Lam, T. K., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Schwartz, G. J., Bryan, J., Aguilar-Bryan, L., and Rossetti, L. (2005a). Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434, 1026-1031.
- Pocai, A., Obici, S., Schwartz, G. J., and Rossetti, L. (2005b). A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 1, 53-61.
- Sohn, J. W., Elmquist, J. K., and Williams, K. W. (2013a). Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends in neurosciences* 36, 504-512.
- Sohn, J. W., Harris, L. E., Berglund, E. D., Liu, T., Vong, L., Lowell, B. B., Balthasar, N., Williams, K. W., and Elmquist, J. K. (2013b). Melanocortin 4 receptors reciprocally regulate sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons. *Cell* 152, 612-619.
- Tanida, M., Yamamoto, N., Morgan, D. A., Kurata, Y., Shibamoto, T., and Rahmouni, K. (2015). Leptin receptor signaling in the hypothalamus regulates hepatic autonomic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase and AMP-activated protein kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35, 474-484.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., et al. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421, 384-388.
- Watanabe, H., Inaba, Y., Kimura, K., Matsumoto, M., Kaneko, S., Kasuga, M., and Inoue, H. Sirt2 facilitates hepatic glucose uptake by deacetylating glucokinase regulatory protein. *Nat Commun*, *in press*.