

## 希少糖アルロースの摂食抑制作用を担う脳神経の同定

京都府立大学大学院生命環境科学研究科動物機能学研究室

岩崎 有作

### 【目的、背景】

世界規模で増加し続けている肥満は、糖尿病、高脂血症、心・血管系疾患の強力な危険因子である。肥満の主たる成因は「過食」であるが、現在、過食に対する有効な治療薬はない。これまでの摂食抑制薬の開発の歴史を振り返ると、血液脳関門を通過して脳（食欲中枢）に直接作用する製剤が開発されてきたが、これらは主作用以外の副作用が強く、ことごとく開発中止・使用中止となった。脳は食欲以外の多くの生理機能を統合する臓器であるため、脳に直接作用する製剤では副作用の少ない安全な製剤を開発することは困難であるかもしれない。

申請者は、腸ホルモンの GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) を強力に分泌させるゼロカロリーの希少糖“アルロース (Allulose, 別名 Psicose)”を発見した。そして、アルロースによって分泌亢進される GLP-1 は局所ホルモンとして腸・肝門脈に分布する求心性迷走神経を活性化し、過食、肥満、糖尿病を改善することを見出した (Y. Iwasaki et al. *Nat Commun* 2018)。現在、臨床で使用されている GLP-1 受容体アゴニスト製剤は、血中で安定な化合物である故に脳に直接作用して摂食量を低下させるが、一方、強い副作用（悪心・嘔吐の嫌悪）も惹起する。申請者が見出した GLP-1 の局所ホルモンとしての求心性迷走神経活性化作用は、神経情報経路を介して一部の脳領域のみを選択的に活性化するため、嫌悪行動は誘導しない。従って、求心性迷走神経を作用点とした摂食抑制作用こそが、安全で優れた過食治療薬開発のブレイクスルーになると期待される。

本研究では、申請者が見出したアルロースによる内因性 GLP-1 と求心性迷走神経活性化を介した摂食抑制作用における脳内機構を明らかとすることを目的とし、具体的には摂食抑制に関与する視床下部ニューロンの同定を試みた。

### 【方法】

#### 実験動物

C57BL/6J マウス及び GLP-1 受容体欠損マウスは、個別ケージにて、温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル（明期 7:30~19:30）、自由摂取飲水環境下（動物飼料 CE-2、日本クレア）で飼育した。少なくとも実験開始 1 週間前より当大学の動物飼育室環境下で順化飼育した。動物実験は京都府立大学の動物実験委員会のガイドラインに従い、承認を得て実施した。

#### 免疫染色

実験前日の 18:00 よりマウスを絶食させ、翌日 9:45 よりアルロース (1 or 3 g/kg)、コントロールとして生理食塩水 (10 ml/kg) を経口投与した。90 分後、麻酔下にて灌流固定をした (20 units/ml ヘパリン化生理食塩水で 2 分、4% パラホルムアルデヒド(PFA)溶液で 15

分)。速やかに脳を摘出し、PFA 溶液にて一晚、後固定をした。その後、30% sucrose/0.1 M phosphate buffer に浸し、4°C で 2 晩放置した。脳の凍結切片標本 (厚さ : 40  $\mu$ m) を作成し、目的分子の抗体を用いて免疫染色をした。

### 視床下部の遺伝子発現解析

実験前日の 18:00 よりマウスを絶食させ、翌日 9:45 よりアルロース (1 or 3 g/kg)、コントロールとして生理食塩水 (10 ml/kg) を経口投与した。120 分後、麻酔下にて脳を摘出し、顕微鏡下で視床下部をサンプリングした。視床下部サンプルの Total RNA を抽出し、Oligo dT Primer を用いて cDNA を合成し、Real-time PCR 法により目的遺伝子の発現量を定量した。

### 横隔膜下迷走神経切断術、及びカプサイシンを用いた感覚神経脱感作法

麻酔下にてマウスを正中切開し、食道と並走する腹側及び背側の迷走神経束を露出させた。横隔膜の直下に位置する腹側及び背側迷走神経束をマイクロ剪刀にて切断し、閉腹した。偽手術の場合は、迷走神経束の露出まで行い、閉腹した。術後は育児用粉ミルクにて飼育した。1 週間の回復期間をとり、その後の実験を実施した。

麻酔下のマウスに 50 mg/kg のカプサイシン (5 ml/kg, 溶液組成: 10% ethanol、10% Tween 80、80% 生理食塩水) を皮下投与した。2 日後に、同様に麻酔下でカプサイシンを 75 mg/kg、皮下投与した。さらに 2 日後、5 mg/kg のカプサイシンを無麻酔下で腹腔内投与した。1 週間の回復期間をとり、その後の実験を実施した。

### 摂食行動実験

実験前日の 18:00 よりマウスを絶食させた (16 時間絶食)。翌日 9:45 よりアルロース (1 or 3 g/kg)、または生理食塩水 (10 ml/kg) を、経口投与した。10:00 に動物飼料 (CE-2 もしくは液体食) を与えた。経時的に給餌器の重量を測定し、摂食量を算出した。

## 【結果】

### アルロース経口投与による GLP-1 分泌は、求心性迷走神経を介して視床下部 Xニューロンを活性化する

アルロース (3 g/kg, po) は、視床下部のある亜核において c-Fos 発現を有意に上昇させた。c-Fos 発現が上昇したこの亜核に存在する摂食関連ペプチドと c-Fos との二重免疫染色の結果、ペプチド X を発現する Xニューロンに多くの c-Fos 発現が認められた。アルロース (3 g/kg, po) は、視床下部のペプチド X mRNA 発現を 1.3 倍に有意に増加させた。

アルロースの経口投与は、強く GLP-1 分泌を誘導し、GLP-1 受容体を介して摂食量を低下させることを申請者は明らかとしている (Y. Iwasaki et al. *Nat Commun* 2018)。そこで、アルロースの視床下部 Xニューロン活性化作用に GLP-1 受容体が関与するか、GLP-1 受容体全身欠損マウス (GLP-1R KO マウス) を用いて検証した。野生型マウスへのアルロース (3 g/kg) は視床下部ペプチド X の mRNA 発現量を有意に増加させたが、GLP-1R KO マウスでは変化がみられなかった。従って、アルロースによる視床下部 Xニューロン活性化に GLP-1R が関与していることが示された。

アルロースの視床下部 Xニューロン活性化作用に求心性迷走神経が関与しているか、外科的及び化学的な求心性迷走神経障害モデルマウスを用いて検証した。アルロース (3 g/kg, po) による視床下部ペプチド X mRNA の発現上昇作用は、横隔膜下迷走神経切断術、もし

くはカプサイシンによる求心性迷走神経の脱感作によって完全に消失した。従って、アルロースによる GLP-1 分泌促進は、求心性迷走神経を介して視床下部 Xニューロンを活性化していることが示唆された。

### **アルロース経口投与による摂食抑制作用はペプチド X受容体阻害剤の脳室内投与で阻害される**

上記成果より、アルロースが視床下部 Xニューロンを活性化することが分かった。ペプチド Xの受容体である受容体 Xは既に明らかで、加えて、受容体 Xの選択的阻害剤も存在する。そこで、アルロースの摂食抑制作用における受容体 Xの関与を調べた。アルロース (3 g/kg, po)は投与後 6 時間までの摂食量を有意に抑制するが、受容体 X阻害剤を脳室内投与するとこの摂食抑制作用は消失した。従って、アルロースは、中枢の受容体 Xシグナリングを介して摂食量を抑制していることが分かった。

### **【結語】**

申請者はこれまでに、希少糖アルロースによる腸 GLP-1 放出が、求心性迷走神経を介して中枢神経へ作用し、摂食量を低下させることを見出していた。しかし、本作用における中枢機序は全く不明であった。本研究では、視床下部の Xニューロン及び X受容体がアルロースの摂食抑制作用に強く関与していることを明らかとした。

### **【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。