

葉山高等研究センター研究プロジェクト研究報告書

研究プロジェクト
人間生命科学

研究課題名
生活習慣病の分子機構解明に挑む

研究課題代表者
富永真琴・箕越靖彦（生命科学研究科生理科学専攻）

1. 研究の背景と目的

今日、肥満・糖尿病・心疾患などいわゆる生活習慣病が大きな社会問題となっており、その分子メカニズムの解明とそのメカニズムをもとにした新たな予防あるいは治療戦略の推進は生活習慣病対策の根幹となる。これら生活習慣病は食生活と関連し、また、それぞれが独立した疾患ではなく互いに関連し、その「元」への対策を講じることに全てを回避できる可能性がある。生活習慣病中でも、糖尿病は、多くの日本人が罹患する可能性の高い疾患としてその対策急務とされる疾患である。

糖尿病発症に関わる原因を大きく分類すると、「膵β細胞からのインスリン分泌」と「インスリンなどのホルモンによる代謝調節」に大きく分類することができる。提案者の富永真琴は、温度感受性 TRP チャンネル研究を進める過程でインスリンを分泌する膵臓β細胞に発現してインスリン分泌に関与する新たな TRP チャンネル TRPM2 を見いだした。この TRPM2 を通って流入する Ca^{2+} がインスリン放出をもたらすものと思われ、膵臓β細胞でのインスリン分泌機構のセントラルドグマ「ATP 感受性 K^+ チャンネル閉鎖による脱分極によって電位作動性 Ca^{2+} チャンネルが開口して流入する Ca^{2+} によってインスリンが放出される」が塗り替えられる可能性がある。また、チームの箕越靖彦は、グルコース並びに脂肪酸の利用機構について研究を進め、レプチンが視床下部—交感神経を介して骨格筋での脂肪酸の酸化分解とグルコース利用を選択的に促進することを世界で初めて明らかにした。さらに、レプチンなどのホルモンの作用に AMP キナーゼが必須であることを明らかにした。以上のこれまでの研究背景に基づき、本研究課題では、富永が「インスリンなどのホルモンによる代謝調節」を、箕越が「インスリンなどのホルモンによる代謝調節」を各々担当し、チームとして共同研究を進めることになった。以下に、各研究課題の具体的背景、研究方法、成果を述べる。

（富永）膵臓からのインスリン分泌の分子機構の解析

環境温度は生体の糖代謝・脂質代謝に大きな影響を及ぼす。これまで、冷刺激（4 度前後）が糖代謝に及ぼす影響は解析されてきたが、極小さな環境温度の変化の影響はほとんど検討されてこなかった。その主な原因は、環境温度を厳密にコントロールすることができなかつたからである。私たちは、環境温度を 1 度内外で正確にコントロールできる動物飼育装置を開発して、5 度という小さな環境温度の変化がマウスの糖代謝・脂質代謝に及ぼす影響を検討することにした。加えて、私たちは以前に TRPM2 チャンネルが体温近傍の温度によって活性化する温度感受性 TRP チャンネルであり、膵臓のβ細胞に発現してインスリン放出に関与することを報告した。そこで、TRPM2 欠損マウスを用いて、TRPM2 のインスリン放出、糖代謝への影響を個体レベルで解析することにした。

（箕越）レプチン並びにオレキシンによる骨格筋でのグルコース代謝調節機構

哺乳動物における最大のグルコース利用器官は骨格筋であり、この組織でのインスリン作用は全身の糖代謝調節に大きな影響を及ぼす。申請者らはこれまでの研究によって骨格筋でのグルコース利用がインスリンと視床下部—交感神経系の両作用によって制御されることを見出した。インスリンは骨格筋のみならず、脂肪細胞においてもグルコースの取り込みを促進するが、視床下部—交感神経系は、骨格筋でのグルコースの利用を促進する。骨格筋に取り込まれたグルコースは、グリコーゲンとして貯蔵され、運動あるいは骨格筋でのエネルギー消費（熱産生）に利用されることから、インスリンのように肥満を引き起こすことはない。レプチンは、脂肪細胞で産生され脳、とりわけ視床下部に作用を及ぼして摂食行動を調節する。しかし、近年、グルコース代謝にも調節作用を営むことが明らかとなり、臨床にも治療薬として利用されている。またその作用には交感神経が関与することが我々のこれまでの研究によって明らかとなった。しかし、レ

プチンが視床下部のどの神経回路を介してその作用を惹起するかは現在も不明である。また、オレキシンは、睡眠・覚醒レベル及び動機付け行動の調節に関与するとともに、遺伝子改変動物の解析からグルコース代謝への調節作用が示唆される。そこで箕越は、レプチン並びに神経ペプチド・オレキシンの調節作用を調べた。

2. 研究方法

（富永）C57BL/6 マウスを温度 20 度と 25 度環境下で 10 日間飼育し、体重・食餌量・飲水量・血糖・血漿インスリン・血清 NEFA レベルを測定した。経口および腹腔内グルコース投与による耐糖能を解析した。インスリンを投与し、血糖変化を検討した。膵島を単離し、各濃度のグルコース負荷に対するインスリン分泌能を解析した。1 日の体温変化・行動量を解析した。皮膚温・血漿カテコールアミン濃度を測定した。脂肪組織および筋肉における UCP1, UCP2, UCP3, GLUT4, Dok1, Cd35, Lpl, Pparg2, Cebpa, Tnf, Il6 mRNA 発現量を解析した。脂肪組織における Dok1 蛋白量を測定した。脂肪組織における脂肪酸合成を解析した。7 週間の温度曝露における体重変化・脂肪量変化を解析した。

野生型マウスと TRPM2 欠損マウスで体重・食餌量・血糖・血漿インスリン量・体温・活動量を計測した。経口および腹腔内グルコース投与による耐糖能を解析した。インスリンを投与し、血糖変化を検討した。単離膵β細胞での温度依存性細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。さらに、グルコース刺激に対する Ca^{2+} 濃度のオシレーションを解析した。膵島からの各濃度のグルコース負荷に対するインスリン分泌能を解析した。さらに、インクレチンの効果を検討した。

（箕越）インスリン作用機構を解明するため、 $[^3H]2$ -deoxyglucose を無麻酔・無拘束のマウス、ラットに投与し、組織内に取り込まれた放射活性より各末梢組織におけるグルコース取り込み速度を算出した。また、血糖を一定に維持しながらインスリンを投与し、各組織におけるインスリンによるグルコース取り込み促進効果を調べた。さらに、中枢神経系が末梢組織でのグルコースの利用にどのような調節作用を営んでいるかを明らかにするため、レプチンあるいは神経ペプチド・オレキシンを視床下部に直接投与して末梢組織のグルコース取り込み速度への効果を調べた。同時に、各組織におけるインスリンシグナルの変化を、特異抗体を用いて調べた。交感神経の活動は、ノルエピネフリン合成を薬物で阻害した時の各組織におけるノルエピネフリン含量の変化速度から算出した。さらに、組織内に取り込まれたグルコースがグリコーゲン合成にどの程度利用されるのかを明らかにするために、 $3\text{-}[^3H]$ glucose をマウスに投与して組織中のグリコーゲンに取り込まれた放射活性を測定し、グルコースからのグリコーゲン合成速度を算出した。

3. 研究成果

（富永）20 度飼育群で食餌量・飲水量は優位に多く、血清脂質 NEFA は有意に少なかった。体重・血糖・血漿インスリン量に差はなかった。グルコース負荷試験では、経口・腹腔内投与とも 20 度飼育群で 25 度飼育群に比べて有意に血糖の上昇が大きく、正常化が遅かった。それに平行して、20 度飼育群では分泌インスリン量が 25 度飼育群に比べて有意に少なかった。20 度で 10 日間飼育した後、25 度環境に戻すと、悪化した耐糖能は経口・腹腔内投与とも回復した。しかし、インスリン耐性は認められなかった。これは、4-10 度の冷刺激負荷と大きく異なる。冷刺激負荷では、インスリン分泌はすくないものの糖利用が亢進して、むしろ血糖は下がる。低濃度グルコース (3.3-11.2 m

M) では、豚島からのインスリン分泌に差はみられなかったが、16.7 mM のグルコース負荷では、20 度飼育群で有意にインスリン分泌が低下していた。体温・行動量に差はなかった。皮膚温度は 20 度飼育群で軽度ではあるが、25 度飼育群と比べて有意に低下し、血漿ノルアドレナリンは有意に高かった。皮膚温度低下によって交感神経活動が亢進しているものと考えられた。UCP の mRNA 発現に差はなかったが、そけい部白色皮下脂肪でのみ糖の取り込みを担う GLUT4 mRNA 発現が有意に増大していた。同様に、そけい部白色皮下脂肪でのみ脂質代謝に関連する Dok1, Cd36 mRNA の発現が増大していた。Dok1 の発現増加は蛋白質レベルでも確認できた。脂肪酸合成はそけい部白色皮下脂肪でのみ有意に増加し、7 週の長期飼育では、そけい部白色脂肪重量の有意な増大が観察された。

TRPM2 欠損マウスでは、体重・食餌量・飲水量・血漿インスリン量・体温・活動量については野生型と差がなかったが、血糖がわずかではあるが野生型マウスと比較して有意に高かった。単離膵臓細胞において、TRPM2 蛋白質発現が消失していることを免疫細胞化学法を用いて確認した。また、25 度から 40 度の温度刺激によって野生型膵臓細胞で観察される細胞内 Ca^{2+} 濃度は TRPM2 欠損膵臓細胞では全く見られなかった。グルコース負荷試験では、経口・腹腔内投与とも TRPM2 欠損マウスで野生型マウスと比較して有意に血糖の上昇が大きく、正常化が遅かった。それに平行して、分泌インスリン量、特に経口グルコース負荷での早期のインスリン分泌量が有意に少なかった。しかし、インスリン耐性は認められなかった。単離膵 β 細胞からのグルコース (16.7 mM, 22.4 mM) 刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度増加 (オシレーション) は、TRPM2 欠損マウスで野生型マウスに比べて意に小さかった。トルブタミド刺激に対する応答性は野生型マウスからの単離膵 β 細胞と TRPM2 欠損マウスからの単離膵 β 細胞で差はなかったことから、ATP 依存性 K^+ チャンネルを介したインスリン分泌は TRPM2 欠損マウスで傷害されていないものと考えられた。低濃度グルコース (3.3-8.3 mM) では、豚島からのインスリン分泌に差はみられなかったが、11.2, 16.7 mM のグルコース負荷では、TRPM2 欠損マウスで野生型マウスと比べて有意にインスリン分泌が低下していた。GLP-1, Ex-4 によるグルコース依存性インスリン分泌の増強作用も TRPM2 欠損マウスで有意に減弱していた。

(箕越) 視床下部においてレプチン受容体は視床下部腹内側核 (VMH)、弓状核 (ARC)、背内側核 (DMH)、室傍核 (PVH) に豊富に発現する。そこでマウスのこれらの神経核に微小カニューレを留置し、レプチンを投与した。その結果、レプチンを VMH に投与した時にのみ、骨格筋、心臓、褐色脂肪組織においてグルコース取り込み速度が亢進した。白色脂肪組織では変化しなかった。ARC、DMH、PVH にレプチンを投与してもグルコースの取り込み速度はほとんど変化しなかった。レプチンによる摂食抑制作用は視床下部 α -MSH 発現ニューロンを介することが示唆されている。そこで、 α -MSH 受容体であるメラノコルチン受容体の拮抗薬を脳室内に投与してグルコース取り込み速度への効果を調べた。その結果、レプチンを VMH に投与した時のグルコースの取り込み促進作用は完全に抑制された。さらに、メラノコルチン受容体作動薬である MT-II を脳室内に投与すると、レプチンと同様に骨格筋、心臓、褐色脂肪組織においてグルコース取り込み速度が亢進した。この実験結果から、レプチンは、 α -MSH 発現ニューロンとメラノコルチン受容体を介して骨格筋など末梢組織におけるグルコースの取り込みを促進することが明らかとなった。次に、視床下部のどの神経核のメラノコルチン受容体が MT-II によるグルコース取り込みを促進するかを明らかにするために、メラノコルチン受容体を発現する上記視床下部神経核に MT-II を投与し、末梢組織でのグルコースの取り込みを調べた。その結果、VMH に MT-II を投与すると、レプチンと同様に骨格筋、心臓、褐色脂肪組織でのグルコース取り込み速度が高まった。PVH に

MT-II を投与すると、褐色脂肪において選択的にグルコースの取り込みが亢進した。これに対して、DMH、ARC に MT-II を投与しても、グルコースの取り込みはいずれの組織においても変化しなかった。この実験結果から、レプチンは VMH ニューロンを介して α -MSH 発現ニューロンを活性化すること、 α -MSH 発現ニューロンは VMH ニューロンに発現するメラノコルチン受容体を活性化することによって骨格筋、心臓、褐色脂肪組織においてグルコース取り込みを促進することが示唆される。また、一部の α -MSH 発現ニューロンは、PVH のメラノコルチン受容体を介して褐色脂肪組織のグルコース取り込みを促進することが明らかとなった。

次に、オレキシン受容体を豊富に発現する VMH にオレキシンを投与して、グルコースの取り込み速度に及ぼす効果を調べた。その結果、マウス及びラット共に、骨格筋、心臓においてグルコース取り込み速度が亢進した。褐色脂肪組織、白色脂肪組織では変化しなかった。さらに、オレキシンを VMH に投与すると、骨格筋と心臓において選択的に交感神経活動が亢進した。また、オレキシンによる骨格筋や心臓へのグルコースの取り込み促進作用は、アドレナリン β 2 受容体阻害剤によって抑制された。また、 β 受容体のノックアウトマウスにおいてもオレキシンの効果は抑制された。さらに、 β 受容体ノックアウトマウスの骨格筋に β 2 受容体（骨格筋では主に β 2 受容体を発現する）を回復させると、オレキシンによる骨格筋でのグルコースの取り込み促進作用が回復した。この実験結果から、オレキシンは、交感神経とアドレナリン β 2 受容体を介して骨格筋でのグルコース取り込みを促進することが明らかとなった。オレキシンが、インスリンによる骨格筋でのグルコース取り込み促進作用にどのような調節作用を営むかを明らかにするため、オレキシンをマウス VMH に投与するとともに、インスリンを静脈内に投与して骨格筋でのグルコース取り込み速度、グリコーゲン合成速度に及ぼす効果、インスリンシグナルを調べた。その結果、オレキシンはインスリンによるグルコース取り込み、グリコーゲン合成を共に高めることが分かった。インスリンシグナル（PI3 キナーゼ、Akt、AS160、GSK3 及びグリコーゲン合成酵素）も亢進した。オレキシンニューロンは、恒常的に血中に分泌されるレプチンとは異なり、動機付け行動の発現時にその活動が高まる。また、最近の研究により、味覚刺激によって活性化することが報告されている。そこで、グルコース及び人工甘味料であるサッカリンが、骨格筋でのグルコース代謝にどのような効果を及ぼすのかを調べた。また、その効果にオレキシンがどのような調節作用を営んでいるかを調べた。サッカリンをマウスに与えると自発的にサッカリンを速やかに飲むようになる。このようにトレーニングしたマウスにサッカリンを飲ませると、オレキシンニューロンが活性化すると共に、直ちにインスリンによる骨格筋でのグルコース取り込み速度、グリコーゲン合成速度が亢進した。白色脂肪組織では変化しなかった。この促進効果は、トレーニングしたマウスに顕著であった。このことから、味覚刺激とともに甘味刺激に対する期待感が、オレキシンニューロンの活性化に関与すると考えられる。さらに、味覚刺激による骨格筋への作用は、VMH にオレキシン受容体阻害剤を投与、あるいは β 2 受容体の全身投与によって抑制された。また、VMH にオレキシン受容体阻害剤を投与すると、グルコースを経口摂取させた時の血糖値の上昇がより高まった。この実験結果から、グルコースによる味覚刺激とその期待感によってオレキシンニューロンは活性化され、VMH のオレキシン受容体を活性化する。その結果、骨格筋を支配する交感神経を活性化し、骨格筋でのグルコースの利用を促進すると考えられる。

4. 考察

（富永）20 度という通常の 25 度から 5 度の僅かな飼育温度低下は皮膚温度低下による交感神経活動の増加からインスリン分泌が低下して耐糖能の異常をもたらした。しか

し、産熱反応は起きていなかった。軽度の温度低下では産熱は必要ないのであろう。GLUT4 発現増加によって白色脂肪への糖の取り込みが増大しているものと考えられる。これは、Dok1, Cd36 発現増大、脂肪酸合成促進によっても裏付けられる。白色脂肪においてのみ脂肪蓄積を増大させて、さらなる温度低下に備えているものと推測される。また、TRPM2 が膵臓からのグルコース依存性、インクレチン依存性のインスリン分泌に関わっていることが個体レベルで確かめられた。TRPM2 の機能制御は糖尿病治療に役立つものと期待される。

- 1) Uchida K, Shiuchi T, Inada H, Minokoshi Y, Tominaga M. Metabolic adaptation of mice in a cool environment. *Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol.* (2010, in press)
- 2) Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M. Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. (submitted)

（箕越）以上の実験結果から、視床下部—交感神経は、レプチン及びオレキシンによって骨格筋でのグルコースの利用、インスリンによるグルコース代謝促進作用を増強することが明らかとなった。レプチンは、恒常的な骨格筋でのグルコースの取り込みに関与し、これに対して視床下部オレキシンニューロンは、摂食時の味覚刺激によって活性化して摂食後のグルコースの取り込みに関与すると考えられる。本研究成果は、*Diabetes*¹⁾ と *Cell Metabolism*²⁾ に発表した。

- 1) Toda C, Shiuchi T, Lee S, Yamato-Esaki M, Fujino Y, Suzuki A, Okamoto S, Minokoshi Y. Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues. *Diabetes* 58: 2757-2765, 2009.
- 2) Shiuchi T, Haque MS, Okamoto S, Inoue T, Kageyama H, Lee S, Toda C, Suzuki A, Bachman ES, Kim YB, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S, Imoto K, Minokoshi Y. Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab* 10: 466-480, 2009.