

氏 名 とう かい え み
東 海 絵 美

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 富医薬博甲第114号

学位授与年月日 平成25年6月5日

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 薬学領域 博士課程
生命薬科学専攻

学位論文題目 **視床下部オレキシン系が加齢、肥満およびうつに伴う肝糖代謝の調節異常を防御する機序の解明**

論文審査委員

(主査) 教授 笹岡利安(指導教員)

(副査) 教授 櫻井宏明

(副査) 教授 藤秀人

論文内容の要旨

生体のグルコース恒常性を維持するためには、インスリンなどのホルモンによる末梢組織での糖代謝調節が必須であるが、最近、中枢神経系および自律神経系を介した臓器連関による糖代謝調節機構の存在が明らかにされた。これらの神経系を介する糖代謝調節機構は加齢、肥満およびストレスに脆弱であり、本機構の破綻はインスリン抵抗性の増大に深く関与していると考えられている。実際、本邦では今日、高齢化、食生活の欧米化、社会構造の急速な変化に伴う精神的ストレスなどの影響で、糖尿病を含むインスリン抵抗性疾患の罹患率が增大している。また、うつとインスリン抵抗性の関連性を明らかにした疫学調査の結果からも、中枢性の糖代謝調節機構の重要性が示唆されている。視床下部は、グルコース恒常性の維持において中心的な役割を果たしており、末梢のエネルギー状態を感知し、覚醒レベル、摂食量および自律神経バランスを調節する。特に視床下部オレキシン神経はこれらのいずれの生理機能にも関与することが知られている。しかも、オレキシンは中枢性に肝臓や骨格筋における糖代謝を調節することが報告されており、中枢性の糖代謝調節機構を統合する生理的役割を果たしていると考えられる。しかし、視床下部におけるオレキシンの発現は加齢、高血糖およびうつ病態で低下するので、これらの病態においてオレキシン神経が糖代謝を維持するために必要な機能を維持しているかは不明である。そこで本研究では、加齢、肥満またはうつモデルマウスにおいてオレキシンの脳室内投与、オレキシン神経の賦活化およびオレキシンの欠損の影響を検討し、脳-肝連関による糖代謝調節の変化を指標に、オレキシンがこれらの要因を基盤とした代謝異常を防御する可能性を追究した。

加齢に伴う肝インスリン抵抗性に対する視床下部オレキシン系の防御機構の検討^{1,2)}

空腹時血糖は肝臓の糖新生により調節されており、その機構はインスリンにより負に制

御されている。本機構は加齢に伴う肝インスリン抵抗性の増大により異常を来すが、この異常の急速な進展を防御する生体機構は不明である。オレキシン神経系は自律神経を介して肝糖新生の調節に重要な役割を果たしていることが知られているので、本研究では、オレキシン欠損 (*Orexin*^{-/-}) マウスを用いて、加齢時の肝インスリン感受性の維持におけるオレキシンの存在意義を検討した。野生型 (WT) マウスでは血糖値に日内変動が認められるのに対し、*Orexin*^{-/-}マウスではその変動が消失し、特に明期において高血糖と高レプチン血症が認められた。また、ピルビン酸負荷試験により肝臓の糖新生活性を評価したところ、*Orexin*^{-/-}マウスは6ヶ月齢以上に加齢すると、異常な糖新生活性の亢進を呈した。その機序を検討した結果、6ヶ月齢の *Orexin*^{-/-}マウスの肝臓では insulin receptor substrate 1 (IRS1) および IRS2 のタンパク発現が低下し、インスリンによる Akt リン酸化が肝特異的に低下した。また、糖新生律速酵素である phosphoenolpyruvate carboxy kinase (Pepck) の mRNA 発現の増加が認められた。さらに、オレキシンの欠損が加齢に伴うインスリン抵抗性を増大させる機序を明らかにするため、肝臓の小胞体ストレスの関与を検討した。その結果、6ヶ月齢の *Orexin*^{-/-}マウスでは、小胞体ストレスの軽減に関わる X-box binding protein 1s (Xbp1s) の mRNA 発現の低下を認めた。また、24 h 絶食後に 1 h 再摂食させることで小胞体ストレスを負荷したところ、*Orexin*^{-/-}マウスの肝臓において小胞体タンパク inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) の過剰な活性亢進と、それに伴うインスリン抵抗性促進因子の Jun N-terminal kinase (JNK) の過剰なリン酸化 (活性化) を認めた。このように、オレキシンが欠損すると、加齢に伴い肝臓における小胞体の恒常性が破綻し、インスリン抵抗性が増大することで、糖新生活性の異常亢進が誘発されることが示された。

肥満に伴う肝臓の糖代謝調節異常に対するオレキシンの防御機構の検討¹⁻³⁾

2型糖尿病患者や2型糖尿病モデル db/db マウスでは、交感神経が恒常的かつ過剰に活性

化しており、自律神経のバランスの異常が認められる。また、db/db マウスの視床下部ではオレキシンの発現が低下していることが報告されている。そこで、db/db マウスに対するオレキシンの投与が中枢性に肝臓の糖新生制御機構を改善する可能性を検討した。正常マウスの脳脊髄液中でオレキシンの濃度が増加する暗期において、オレキシン A を db/db マウスの脳室内に 3 日間連続投与したところ、明期において肝臓の糖新生律速酵素である *Pepck* および *glucose-6-phosphatase* の mRNA 発現の低下や血糖値の著明な低下が認められた。また、高脂肪食負荷した C57BL/6J マウスに対し同様に処置した場合でも、これらの糖新生律速酵素の発現減少と血糖値の低下が認められた。高脂肪食を負荷した *Orexin*^{-/-} マウスでは、体重の著明な増加と耐糖能異常およびインスリン抵抗性の悪化が認められた。したがって、オレキシンは自律神経のバランス調節を介して糖尿病病態下での肝糖新生の異常を軽減し、高血糖を改善することが示された。

交感神経が異常に亢進する原因の一つとして、脳内の *angiotensin II* による活性酸素種 (ROS) 産生が関与しており、糖尿病病態においてオレキシンの生理作用の低下に寄与している可能性がある。しかし、*angiotensin II* による酸化ストレスを防御する生理機構は不明である。そこで本研究では、酸化ストレスモデルとして *angiotensin II* 処置した培養ヒト内皮細胞を用い、視床下部に比較的多く存在する *coenzyme Q₁₀* (CoQ₁₀) の抗酸化作用を検討した。その結果、*angiotensin II* による ROS 産生の増加は CoQ₁₀ の前処置および後処置により抑制された。したがって、CoQ₁₀ による過剰な ROS 産生の抑制は、オレキシンによる中枢性の糖新生改善作用を補助できる可能性が示唆された。

慢性的なうつに伴う肝インスリン抵抗性に対するオレキシンの防御機構の検討⁴⁾

うつ病患者の脳脊髄液中ではオレキシン濃度が減少していることが報告されている。また、うつはインスリン抵抗性を増大させる要因であることが示唆されている。しかし、う

つ状態においてオレキシンの糖代謝調節作用がどのように変化するかは不明である。そこで、本研究では WT および $Orexin^{-/-}$ マウスを攻撃性の高い ICR マウスと同居させることで社会性敗北ストレスを負荷して慢性的なうつ状態とし、うつとインスリン抵抗性が連関して増悪するメカニズムにオレキシンの関与する可能性を追究した。その結果、ストレス負荷した $Orexin^{-/-}$ マウスでは WT マウスと比較して、空腹時の血糖値、血清インスリン濃度およびインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR の増加を認めた。また、ピルビン酸負荷試験により肝臓の糖新生活性を評価したところ、ストレス負荷した $Orexin^{-/-}$ マウスは WT マウスに比べ糖新生活性の異常な亢進を示した。さらに、肝臓のインスリンシグナルを解析した結果、WT マウスではインスリンによる Akt リン酸化の増加はストレス負荷により変化しなかったが、 $Orexin^{-/-}$ マウスではストレス負荷群でインスリン反応性が消失した。したがって、通常食餌下では社会性敗北ストレスによりうつが誘発されるが、内因性のオレキシンが存在することにより肝臓の糖新生調節機能が正常に維持されることが示された。一方、オレキシン系の活性化を誘発するカロリー制限を行うと、WT マウスにおいてうつと耐糖能異常の両者が改善するのに対し、 $Orexin^{-/-}$ マウスではこれらの効果は認められなかった。したがって、カロリー制限によりオレキシン神経の活性化を促進することでうつ形成自体が抑制され、ストレス下でもインスリン感受性が維持されることが示された。

結論

本研究では、加齢、肥満およびうつ病態におけるオレキシンの作用を検討し、これらの要因で増大するインスリン抵抗性を防御することを明らかにした。その機構として、オレキシンは交感神経を介して 1) 摂食時に肝臓における糖の制御機構を賦活化することで糖代謝機能を最適化することに加え、2) 小胞体内の環境を改善することで、過剰な小胞体ストレス応答によるインスリン抵抗性を防御することを見出した。これらの機構はうつ病態で

も有効に機能し、肝臓の糖新生調節機能を正常に維持することを明らかにした。さらに、カロリー制限により視床下部オレキシン系を賦活化させると、ストレスによるうつ発症が抑制され、糖代謝異常の発症も防止されることが示された。

以上のように本研究では、視床下部オレキシン系は肝臓の糖新生の制御に重要な役割を果たしており、加齢、肥満およびうつに伴う肝インスリン抵抗性に対する生体防御因子として機能するという新しい概念を提起した。

参考文献

- 1) Tsuneki H, Murata S, Anzawa Y, Soeda Y, Tokai E, Wada T, Kimura I, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice. *Diabetologia* 51: 657-67 (2008)
- 2) Tsuneki H, Tokai E, Nakamura Y, Takahashi K, Fujita M, Anzawa Y, Wada T, Takasaki I, Kimura K, Inoue H, Yanagisawa M, Sakurai T, Sasaoka T. Circadian time-keeping action of orexin to accentuate rhythmic glucose regulation via autonomic control of liver function in mice. (in preparation)
- 3) Tsuneki H, Tokai E, Suzuki T, Seki T, Okubo K, Wada T, Okamoto T, Koya S, Kimura I, Sasaoka T. Protective effects of coenzyme Q₁₀ against angiotensin II-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 701: 218-27 (2013)

- 4) Tsuneki H, Tokai E, Sugawara T, Wada T, Sasaoka T. Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance induced by social defeat stress in mice.

Neuropeptides 47: 213-9 (2013)

学位論文審査の要旨

本邦では、高齢化、食生活の欧米化、社会構造の急速な変化に伴う精神的ストレスなどの影響で、糖尿病を含むインスリン抵抗性疾患の罹患率が增大している。また、うつとインスリン抵抗性の関連性を明らかにした疫学調査の結果から、中枢性の糖代謝調節機構の重要性が示唆されている。視床下部は、グルコース恒常性の維持において中心的な役割を果たしており、末梢のエネルギー状態を感知し、覚醒、摂食および自律神経バランスを調節する。視床下部オレキシン系はこれらのいずれの生理機能にも関与しており、さらに中枢性の糖代謝調節機構を統合する生理的役割を果たしている可能性も示唆されている。しかし、加齢、肥満およびうつ病態においてオレキシンが糖代謝の異常を防御する作用を有するかは不明である。

申請者の東海絵美氏は、加齢、肥満またはうつモデルマウスにおいてオレキシンの脳室内投与、オレキシン神経の賦活化およびオレキシン欠損の影響を検討し、脳-肝連関による糖代謝調節の変化を指標に、オレキシンがこれらの要因を基盤とした代謝異常を防御する可能性を追究した。本研究の要旨は以下の通りである。

1) 加齢に伴う肝インスリン抵抗性に対する視床下部オレキシン系の防御機構の検討

加齢時の肝インスリン感受性の維持におけるオレキシンの意義を検討した。オレキシン欠損マウスでは、血糖値の日内変動が消失し、特に明期において高血糖が認められ、6ヶ月齢以上に加齢すると、異常な糖新生活性の亢進を呈した。その機序として、肝臓でのインスリン受容体基質1および2蛋白の発現低下によりインスリン作用が肝特異的に低下し、糖新生律速酵素 PEPCK の mRNA 発現増加が認められた。さらに、小胞体ストレス負荷により、肝臓において小胞体タンパク IRE1 α の過剰な活性亢進と、それに伴うインスリン抵抗性促進因子 JNK の過剰なリン酸化（活性化）を認めた。以上より、オレキシンが欠損すると、加齢に伴い肝臓における小胞体の恒常性が破綻し、インスリ

ン抵抗性が増大することで、糖新生活性の異常亢進が誘発されることが示された。

2) 肥満に伴う肝臓の糖代謝調節異常に対するオレキシンの防御機構の検討

2型糖尿病モデルマウス db/db では、交感神経の恒常的かつ過剰な活性化と、自律神経バランスの異常が認められ、視床下部ではオレキシンの発現が低下している。そこで、db/db へのオレキシンの投与が中枢性に肝臓の糖新生制御機構を改善する可能性を検討した。対照マウスの脳脊髄液中でオレキシン濃度が増加する暗期において、オレキシン A を db/db の脳室内に 3 日間連続投与したところ、明期において肝臓の糖新生律速酵素である PEPCCK および G6Pase の mRNA 発現の低下や血糖値の降下が認められた。したがって、オレキシンは自律神経のバランス調節を介して糖尿病病態下での肝糖新生の異常を軽減し、高血糖を改善することが示された。

3) 慢性的なうつに伴う肝インスリン抵抗性に対するオレキシンの防御機構の検討

うつ病患者の脳脊髄液中ではオレキシン濃度が減少し、また、うつはインスリン抵抗性を増大させることが知られている。そこで、マウスに社会性敗北ストレスを負荷して慢性的なうつ状態とし、うつでのインスリン抵抗性にオレキシンが関与する可能性を検討した。ストレス負荷したオレキシン欠損マウスでは、空腹時の血糖値、インスリン値およびインスリン抵抗性指標 HOMA-IR が増加し、その原因として糖新生活性の異常な亢進が認められた。一方、オレキシン系の活性化を誘発するカロリー制限を行うと、対照マウスで認められるうつ状態の改善効果が、オレキシン欠損マウスでは消失した。また、ストレス負荷したオレキシン欠損マウスは、対照マウスに比し、耐糖能異常およびインスリン感受性の低下を示した。以上より、通常食餌下での慢性的ストレス負荷時には、内因性のオレキシンが存在することにより肝臓の糖新生調節機能が正常に維持されること、また、カロリー制限によりオレキシン神経の活性化が促進されると、うつ形成自体が抑制され、ストレス下でもインスリン感受性が維持されることが示された。

このように申請者は、オレキシンが、加齢、肥満およびうつ病態で増大するインスリン抵抗性を防御することを明らかにした。その機序として、オレキシンは交感神経を介して、肝臓におけるインスリンによる糖の制御機構を賦活化することで糖代謝機能を最適化することに加え、過剰な小胞体ストレス応答によるインスリン抵抗性を防御することを見出した。これらの機構はうつ病態でも有効に機能し、肝臓の糖新生調節機能を適切に維持することを解明した。

以上、視床下部オレキシン系は肝臓の糖新生の制御に重要な役割を果たしており、加齢、肥満およびうつに伴う肝インスリン抵抗性に対する生体防御因子として機能するという新しい概念を提起した。主査および副査は、申請者東海絵美氏の論文内容について審査した結果、博士（薬学）の学位を授与するに値すると判断した。