

主論文の要旨

**Reactive oxygen species mediate insulin signal  
transduction in mouse hypothalamus**

〔 マウス視床下部において活性酸素種は  
インスリンシグナルを制御する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

(指導：有馬 寛 教授)

尾上 剛史

## 【緒言】

過酸化水素や超酸化物等の活性酸素種(ROS)は従来インスリン抵抗性を惹起し2型糖尿病等の代謝異常の発症・進展に寄与していると考えられてきた。一方で、肝臓や脂肪組織などの末梢組織ではインスリン刺激により NADPH 酸化酵素(Nox)から産生された ROS がインスリンシグナルを増強することが報告されている。

中枢においてもインスリンは摂食抑制、交感神経を介した褐色脂肪組織の活性化、肝糖新生の制御などの多様な作用を示すが、近年インスリン脳室内投与は視床下部組織内 ROS を増加させ、抗酸化剤もしくは Nox 阻害薬の脳室内投与はインスリンによる摂食抑制作用を減弱させることが報告された。このことから中枢におけるインスリンの摂食抑制作用に ROS の関与が示唆されている。

今回我々は ROS の視床下部におけるインスリンシグナルへの関与の分子生物学的機序を検討することで、視床下部での摂食制御における ROS の役割を解明し、肥満症治療における ROS の意義を明らかにすることを目的として研究を開始した。

## 【対象および方法】

16 日齢 C57BL6/J マウスの脳を摘出し視床下部を 350 $\mu$ m 厚に冠状断し、Millicell-CM フィルター上にて視床下部器官培養を行った。インスリン、過酸化水素、抗酸化剤(N-Acetyl-L-cysteine, NAC)、Nox 阻害薬(diphenyleneiodonium chloride, DPI)もしくはミトコンドリア複合体阻害薬(thenoyltrifluoroacetone, TTFA)を回収 3 時間前に培養液に加え、培養開始後 72 時間で切片を回収し、IR6 自己リン酸化サイトである Tyr 1150/1151 のリン酸化および Akt リン酸化(Ser 473)を Western blotting 法にて評価した。

また視床下部器官培養および上記切片由来の分散培養を用いてインスリンによる細胞内 ROS 産生を ROS 検出試薬(CM-H<sub>2</sub>DCFDA および CellROX orange)を用いて評価した。

統計学的処理については、各数値は mean $\pm$ SE で表し、多群間の比較には one-way ANOVA および Dunnett's test または Bonferroni's test を用いて解析した。また、危険率 5%未満をもって有意差ありとした。

## 【結果】

ROS 検出試薬 CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用いた視床下部器官培養細胞内 ROS 測定においてインスリン刺激(10<sup>-7</sup> M)は過酸化水素(10<sup>-4</sup> M)同様にコントロールと比較し蛍光増強を認め細胞内 ROS 産生を誘導した(Fig. 1)。蛍光増強は投与 15 分後において最も顕著であった。

続いて定量的な評価の為、視床下部分散培養にて ROS 検出試薬 CellROX orange を用いた細胞内 ROS 濃度測定を施行した(Fig. 2)。インスリン(10<sup>-7</sup> M)は過酸化水素(10<sup>-4</sup> M)同様にコントロールと比較し有意な細胞内 ROS 上昇を認めた。

Western blotting 法による IR6 および Akt リン酸化を指標とした検討では、インス

リンは濃度依存的に IR $\beta$  および Akt リン酸化を増強し、 $10^{-7}$  M から有意差を認めた (Fig. 3A, B)。インスリンは投与 1 時間後より IR $\beta$  および Akt リン酸化を増強し、この作用は IR $\beta$  では 6 時間まで、Akt では 3 時間まで同様に見られた (Fig. 3C, D)。過酸化水素は単独で IR $\beta$  および Akt リン酸化を増強した (Fig. 3E, F)。この増加は IR $\beta$  では過酸化水素濃度  $10^{-4}$  M から有意に認め、Akt では過酸化水素濃度  $10^{-5}$  M から有意に認めた。また過酸化水素 ( $10^{-4}$  M) は投与 1 時間後より IR $\beta$  および Akt リン酸化を増強し、この上昇は 6 時間まで有意であった (Fig. 3G, H)。インスリンおよび過酸化水素単独投与同時投与において IR $\beta$  および Akt リン酸化に相加効果は認めなかった (Fig. 4)。

インスリン刺激 ( $10^{-7}$  M) による IR $\beta$  および Akt リン酸化の増強は、抗酸化剤 NAC ( $5 \times 10^{-3}$  M) もしくは Nox 阻害薬 DPI ( $10^{-6}$  M) 存在下で抑制された (Fig. 5A-D)。一方ミトコンドリア複合体阻害薬 TTFA は十分な濃度刺激 ( $10^{-4}$  M) を与えてもインスリンによる IR $\beta$  および Akt リン酸化増強を抑制しなかった (Fig. 5E, F)。

ROS 検出試薬 CellROX orange を用いた細胞内 ROS 濃度測定においても、インスリン刺激 ( $10^{-7}$  M) による細胞内 ROS 産生は、DPI ( $10^{-6}$  M) 存在下では消失したが、TTFA ( $10^{-4}$  M) 存在下では抑制されなかった (Fig. 6)。

#### 【考察】

マウス視床下部器官培養においてインスリン投与は細胞内 ROS 産生および IR $\beta$ ・Akt リン酸化を誘導し、一方で、Nox 阻害薬投与はそれらを抑制することが示された。今回の結果はインスリンが視床下部切片に直接作用し ROS 産生を誘導し、ROS が直接視床下部切片のインスリンシグナルを増強させることができることを明らかにした。

細胞内 ROS 産生の場合としては従来 Nox およびミトコンドリア複合体が知られている。我々の示した結果では、Nox 阻害薬投与がインスリンによる細胞内 ROS 産生および IR $\beta$ ・Akt リン酸化増強を抑制する一方で、ミトコンドリア複合体阻害薬ではそれらの抑制効果を認めなかった。このことは視床下部において、インスリンにより誘導され産生される ROS は Nox 由来であることを支持する。

酸化ストレスは従来、糖尿病や肥満状態で増加していると考えられていたが、抗酸化剤投与による糖尿病予防については一定の結論が出ていない。本研究は中枢においても適切な濃度の ROS が存在することが視床下部におけるインスリンの生理作用に必要な可能性を示唆する。一方で、慢性的な酸化ストレスは細胞内の抗酸化防御系の活性化を介して、インスリンの生理的な作用を阻害している可能性がある。糖尿病や肥満などの病的状態における、視床下部での ROS のインスリンシグナル伝達分子としての役割についてはさらなる検討が必要である。

#### 【結語】

マウス視床下部においてインスリンは Nox 由来と考えられる ROS 産生を介して IR $\beta$  および Akt リン酸化を促進する。