

氏 名	あゆしゅ えんふーあまる Ayush Enkh-Amar
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 489 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	求心性迷走神経のグルカゴン受容に関する研究
論文審査委員	(委員長) 教授 石 橋 俊 (委 員) 教授 尾 仲 達 史 教授 黒 尾 誠 (委 員) 准教授 佐々木 努

論文内容の要旨

1 研究目的

Glucagon is a peptide hormone composed of 29 amino acids, and is produced in α -cells of the pancreatic islets and in the intestine and stomach. Glucagon is released under postprandial, hypoglycemic and cold conditions, and regulates feeding, glucose metabolism and heat production. These functions are partly controlled by the brain. Peripheral glucagon could signal to the brain either by crossing the blood-brain barrier and directly acting on the central neurons or by interacting with the vagal afferents that innervate the brain. Intraperitoneal (ip) injection of glucagon reduces feeding, and this effect is attenuated by subdiaphragmatic vagotomy, suggesting the involvement of the vagal afferent nerves. However, whether glucagon directly regulates vagal afferents is unknown. The aim of present study is to clarify whether glucagon directly interacts with and activates the vagal afferent nodose ganglion (NG) neurons, and if so, to explore the underlying mechanisms.

2 研究方法

Animals

Male C57BL/6J mice aged 1-3 months were purchased from Japan SLC (Shizuoka, Japan), and were housed in individual or group cages under a 12 h light/dark cycle and controlled temperature (23 ± 1 °C) and humidity ($55 \pm 5\%$).

Immunohistochemical detection of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) in nodose ganglia

At 15 min after ip injection of saline (10 ml/kg) or glucagon (100 nmol/kg), the mice were transcardially perfused using 4% paraformaldehyde (PFA) under anesthesia, and then the nodose ganglia were isolated. After making the slice sections with 8 μ m thickness, immunohistochemistry were performed using antiserum against phosphorylated ERK1/2.

Measurement of cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in single nodose ganglion neurons

Single NG neurons derived from C57BL/6J male mice were prepared by treatment with

dispase II/collagenase/DNase II for 20 min at 37 °C. The single neurons were cultured for 12~24 hours, and $[Ca^{2+}]_i$ was measured using fura-2 ratiometric analysis.

Reverse transcriptase (RT)-PCR

Total RNA of NGs was isolated and the first-strand cDNA was synthesized from 100 ng RNA. Glucagon receptor mRNA expression was detected using by PCR methods. The PCR products were electrophoresed on 2% agarose gel for the validation of proper product sizes.

3 研究成果

Ip injection of glucagon induced prompt phosphorylation of ERK1/2 in the NG neurons.

Phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) is recognized as a cellular activating marker, therefore we examined whether ip glucagon injection activates vagal afferents as assessed by expression of pERK1/2 in NG neurons. Glucagon (100 nmol/kg) injection significantly induced pERK1/2 expression as compared with saline injection, and the incidence of pERK1/2-positive NG neurons was approximately 8%. Additionally, blood glucose levels were not different before and 15 min after injection of glucagon.

Glucagon directly interacted with isolated single NG neurons via glucagon receptor.

In fura-2 microfluorometric studies, glucagon at $10^{-9} \sim 10^{-7}$ M, but not 10^{-10} M, increased $[Ca^{2+}]_i$ in single NG neurons. The incidence of $[Ca^{2+}]_i$ responsive neurons increased in a dose-dependent manner, and its maximal value was approximately 8% with glucagon at $10^{-8} \sim 10^{-7}$ M. The amplitudes of $[Ca^{2+}]_i$ responses to glucagon took plateau at $10^{-9} \sim 10^{-7}$ M.

Glucagon-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases were attenuated by a glucagon receptor antagonist, des-His¹-[Glu⁹]-Glucagon (1–29) amide. Furthermore, the glucagon receptor mRNA was expressed in NG neurons. These results show that glucagon directly interacts with NG neurons via the glucagon receptor to induce $[Ca^{2+}]_i$ signaling.

Glucagon-responsive NG neurons overlapped with insulin- and cholecystokinin-8 (CCK-8)-responsive neurons.

It is known that insulin and CCK are released postprandially and suppress food intake via interacting with vagal afferents. In the glucagon-responsive NG neurons, 74% of the neurons responded to insulin, and all of the neurons responded to CCK-8. Therefore, the glucagon-responsive NG neurons overlapped with insulin- and CCK-responsive neurons.

4 考察

Ip glucagon injection induced pERK1/2 in NGs as early as 15 min after injection, when blood glucose was not yet elevated by glucagon. The result suggests that glucagon activates vagal afferents directly but not secondarily to the change of blood glucose and consequent change of hormones such as insulin. Glucagon receptor mRNA is expressed in NGs and glucagon directly interacts with single NG neurons via glucagon receptor to increase $[Ca^{2+}]_i$. Moreover, the incidence of the NG neurons with pERK1/2 *in vivo* and that of single NG neurons with $[Ca^{2+}]_i$ increases *in vitro* are comparable (around 8%). These data suggest that

activation of NG neurons by glucagon, observed in vitro experiments, could take place *in vivo* situation.

Glucagon, insulin and CCK are transiently secreted on meal intake and contribute to induction of satiety. It is well known that CCK inhibits feeding by activating vagal afferent nerves. Insulin directly activates NG neurons and this interaction is impaired in insulin receptor substrate-2 knockout mice with hyperphagic obesity, indicating that insulin action on vagal afferents might be involved in the anorexigenic action. In this study, glucagon also activates vagal afferent neurons and majority of glucagon-responsive NG neurons responded to insulin and CCK-8. It is suggested that the direct action of glucagon on vagal afferents is linked to suppression of food intake, and that glucagon, insulin and CCK partly share the common target of vagal afferent neurons implicated in the anorectic pathway.

Glucagon increases blood glucose via glycogenolysis and gluconeogenesis and increases heat production via activation of brown adipose tissue. Both blood glucose and heat production are regulated by the mechanisms involving the brain. Glucagon may partly regulate these functions via interacting with vagal afferent neurons, since they project to the nucleus tractus solitaries (NTS), the site that regulates glucose metabolism. However, further study is definitely required to clarify the physiological/pathophysiological role of the activation of vagal afferents by glucagon.

5 結論

The present study has clarified that glucagon receptor is expressed in vagal afferents, and glucagon directly interacts with and increases $[Ca^{2+}]_i$ in single NG neurons. In parallel with these *in vitro* results, peripheral administration of glucagon activates vagal afferents with elevated pERK1/2 *in vivo*. The activation of vagal afferents by glucagon may underlie the effects of glucagon such as feeding regulation, glucose metabolism and heat production.

論文審査の結果の要旨

膵 α 細胞によって産生される消化管ホルモンのひとつであるグルカゴンは、食後・低血糖・寒冷などの刺激によって分泌が促進され、摂食・ブドウ糖代謝・熱産生を調節する。これらの作用の一部は脳を介する事が知られているが、グルカゴンが血液脳関門を越えて直接脳に働くのか、迷走神経求心路を介して働くかは不明である。そこで申請者は、迷走神経求心路の節状神経節のニューロンにグルカゴンが直接作用するか否かを検証した上で、その機序の解明を目指した。

1) グルカゴン腹腔内投与後 15 分後に採取した節状神経節では、蛍光免疫染色で同定されるリン酸化 ERK1/2 陽性細胞数が増加し、その数は全細胞数の 8 %に達した。この時に血糖値は増加しておらず、血糖変動に従属する現象ではないと考えられた。2) 節状神経節ニューロンを単離し、細胞外から細胞内へ流入する $[Ca^{2+}]$ を、fura-2 を標識に定量化すると、 10^{-9} ~ 10^{-7} M のグルカゴン添加に対して $[Ca^{2+}]$ 流入が増加反応を示すニューロンが全体の 8%存在し、その反応は用量依存的であった。一方、 10^{-10} M のグルカゴン濃度には反応を示さなかった。3) この反応はグ

ルカゴン受容体拮抗薬、des-His¹-[Glu⁹]-グルカゴン(1-29)アミドの添加によって減弱した。また、肝臓に比較すると少量ながら、節状神経節はグルカゴン受容体 mRNA を発現することを確認した。

4) 上記方法で同定されたグルカゴン反応ニューロンの内 74%はインスリン添加時にも[Ca²⁺]流入を示し、全てのグルカゴン反応ニューロンはコレシストキニン 8 (CCK-8)添加にも反応した。

食後に血中濃度が増加するインスリンと CCK-8 とは、中枢神経に作用して満腹感を形成する。グルカゴンもこれらのホルモンと協調して満腹中枢を刺激する可能性があり、迷走神経求心路の節状神経節を介する経路の存在が示唆された。グルカゴンの血糖調節作用や熱産生作用も脳を介する経路の存在が推定されており、これらの作用も迷走神経求心路の節状神経節を介する可能性があり、今後の検討課題としている。

迷走神経求心路を介するグルカゴン作用の存在を示した研究である。基本的には細胞レベルでの結果なので、生体での生理的意義等の解決すべき課題が残されている。しかし、インスリン・CCK-8 などの消化管ホルモンでは報告されてきた節状神経節に対する作用は、グルカゴンではまだ報告されておらず、その意味で新規性が高く、博士論文に値すると全員一致で判断した。

最終試験の結果の要旨

Enkh-Amar Ayush 氏から、研究の背景と研究成果が英語でわかりやすく報告された。審査員から以下の諸点が質問あるいは指摘された。それらの意味が十分理解されたかどうか不明な場合も少なくなかったが、英語力の問題に起因すると思われる。発表や受け答えの態度は真摯であった。

1) 食後にグルカゴン分泌が促進する生理的意義（作用はインスリンと拮抗するのに、分泌刺激が共通なのが奇異）、2) グルカゴン投与 15 分後に血糖上昇が観察されなかった理由、3) ERK1/2 の発現を比較する際に、ウェスタンブロットなど定量性に優れた方法を用いなかった理由、4) 神経細胞の活性化指標として一般的な c-fos を用いなかった理由、5) グルカゴン受容体ノックアウトマウスを用いなかった理由、6) 節状神経節ニューロンの中で脾臓を神経支配しているニューロンの割合、7) グルカゴン刺激後[Ca²⁺]流入が惹起されるまでの潜時のばらつきの原因、8) グルカゴン受容体の存在証明のためには、節状神経節全体の RT-PCR よりも、single cell RT-PCR が好ましい、9) グルカゴン受容体活性化から、ERK1/2 リン酸化と[Ca²⁺]流入促進に至る経路の詳細、などに関する質問があった。

審査員から指摘を受けた諸点に従って、論文も丁寧に改訂された。

研究内容は博士号に相応しい優れた研究と全員一致で判断した。