

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 1日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792405

研究課題名（和文） 発達期の摂食調節に関与する分子の組織学的解析

研究課題名（英文） Histological analysis of molecules participating in eating adjustment for the development period

研究代表者

高崎 千尋（TAKASAKI CHIHIRO）

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60451449

研究成果の概要（和文）：野生型マウスの脳で食べる機能の調節に関わる分子について解析した。脳の満腹中枢で、摂食促進ペプチドのセレベリン1（Cbln1）の mRNA とグルタミン酸トランスポーターVGluT2 の mRNA、脳内マリファナとも言われる内因性カンナビノイドの受容体のひとつである CB1 の mRNA がそれぞれ一部共発現していることがわかった。よって、Cbln1 と CB1 がグルタミン酸作動性の同じニューロンに発現し、摂食の調整に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed molecules that adjust eating function in the wild-type mice brain. We found that cerebellin 1 (Cbln1) mRNA, glutamate transporter VGluT2 mRNA and CB1 mRNA were coexpressed in the satiety center of the brain partly each. Therefore, it was suggested that Cbln1 and CB1 were distributed in the glutamatergic neuron, and participated in the adjustment of the eating function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：摂食 マウス

1. 研究開始当初の背景

摂食は全ての動物に共通する、生命維持に必要な栄養素を摂取する行為であり、その機能は生きる上で非常に重要である。摂食機能に障害を持つ人は、発達障害児、高齢者など少なくない。本研究では、生命機能の維持に重要な視床下部に存在する、摂食調節機構に着目した。摂食機能は摂食中枢と満腹中枢により調節されている。摂食中枢には、さまざまな神経ペプチドが存在し、その中でもオレキシンは摂食促進ペプチドとして知られ、視床下部外側野に広く分布している（Sakurai *et al.*, *Cell*, 92:573-85, 1998）。一方、脳内マリファナとも言われる内因性カンナビノイドの受容体の一つである CB1 は、満腹中枢といわれている視床下部腹内側核に強く

発現し（Uchigashima *et al.*, *J Neurosci*, 27:3663-3676, 2007）、CB1 阻害剤を投与すると摂食は減少することが知られている（Kano *et al.*, *Physiol Rev*, 89:309-380, 2009）。また、摂食抑制作用を有するペプチドホルモンのレプチンは肥満を特徴とする *ob/ob* マウスの原因遺伝子として同定された（Trayhurn *et al.*, *FEBS Lett*, 368:488-490, 1995; Pelleymounter *et al.*, *Science*, 269:540-543, 1995）。レプチンの血中濃度が増えると食欲が低下し、エネルギー消費が増加してやせる。レプチン伝達が欠損している *ob/ob* マウスや *db/db* マウス（肥満マウス）では、内因性カンナビノイドの 2-AG やアナンダミドの視床下部含量が増加し、摂食も増えるが、野生型動物にレプチンを投与すると、

内在性カンナビノイド含量は減少し、摂食量は減少する (Di Marz *et al.*, Nature, 410:822-825, 2001)。このことから、レプチンは内在性カンナビノイドの合成を抑制して視床下部ニューロンによる摂食行動を抑制していることが示唆されている。このほか、摂食促進ペプチドであるオレキシンの受容体 OX1R は、CB1 受容体と同様に、満腹中枢の視床下部腹内側核に高レベルで発現し、この2つの受容体がヘテロ二量体を形成して、受容体の発現部位や機能を制御していることが判明してきた (Ellis *et al.*, J Biol Chem, 281:38812-38824, 2006)。また、カンナビノイド受容体 CB1 のアンタゴニストを出生日に投与すると、母乳を吸綴できないという報告がある (Fride *et al.*, Exp Biol Med, 230:225-34, 2005)。一方、小脳プルキンエ細胞に特異的な 16 アミノ酸からなるペプチドで、小脳の神経細胞の結合にとって重要な役割を果たすセレベリン 1 (Cbln1) は近年、摂食促進ペプチドとして機能することも知られるようになった (Gardiner *et al.*, Diabetes, Obesity and Metabolism, 12:883-890, 2010)。しかし、満腹中枢といわれる腹内側核には神経ペプチドが少なくこの核でどんな摂食調節作用があるのかについては、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、野生型マウスを用いて、視床下部における、CB1 と摂食促進ペプチドあるいは摂食抑制ペプチドの発現部位と発現細胞、またどんな神経伝達物質をもつニューロンと局在しているのか、細胞シグナル分子や酵素と共存しているのかを免疫多重染色と fluorescent *in situ* hybridization にて明らかにし、機能的役割を検討することと、満腹中枢といわれている腹内側核での摂食抑制機構には未だ不明な点が多いため、さまざまな受容体やトランスポーターなどの細胞発現や局在も免疫組織学的手法で解明することを目的とした。

3. 研究の方法

麻醉下にて発達期あるいは成体野生型マウスを 4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定後、脳を摘出して、さらに後固定する。切片は、マイクロスライサーで作製、あるいは 30%スクロース溶液に浸漬後、クライオスタットで作製する。CB1 の細胞発現を調べるため、蛍光抗体法を行う。作製した切片を用いて、CB1 とマーカー抗体との免疫二重染色を行い、腹内側核に相当する部位を共焦点レーザー顕微鏡で観察する。マーカー抗体には、neurofilament160 を軸索のマーカーとして、MAP2 を樹状突起のマーカーとして、VGluT1、VGluT2 をグルタミン酸作動性神経終末のマ

ーカーとして、GAD67 を GABA 作動性神経終末のマーカーとして、GLAST を発達から成熟までのグリアのマーカーとして用いる。また、摂食促進ペプチド Cbln1 の発現についても解析を行う。

以上の解析を mRNA レベルでも確認するため、fluorescent *in situ* hybridization を行う。麻醉下で脳を取り出し、粉末ドライアイスで凍結し、 -80°C で保存する。クライオスタットで新鮮凍結切片を作製し、ジゴキジゲン標識あるいはフルオレセイン標識した個々の cRNA プロブとハイブリダイゼーションを行う。それぞれの二次抗体と TSA で反応させた後、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

(1) CB1 mRNA 発現解析

はじめに成体野生型マウスにおいて、fluorescent *in situ* hybridization により、CB1 の mRNA とグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである VGluT2 の mRNA の発現について調べた。CB1 と VGluT2 の mRNA はいずれも視床下部腹内側核 (VMH) に強く発現していた (図 1, 図 2)。視床下部腹内側核を拡大すると、CB1 と VGluT2 の mRNA が一部共陽性を示していた (図 3)。しかし、同じ小胞膜型グルタミン酸トランスポーターの VGluT1 の mRNA と CB1 の mRNA は陰性だった (date not shown)。

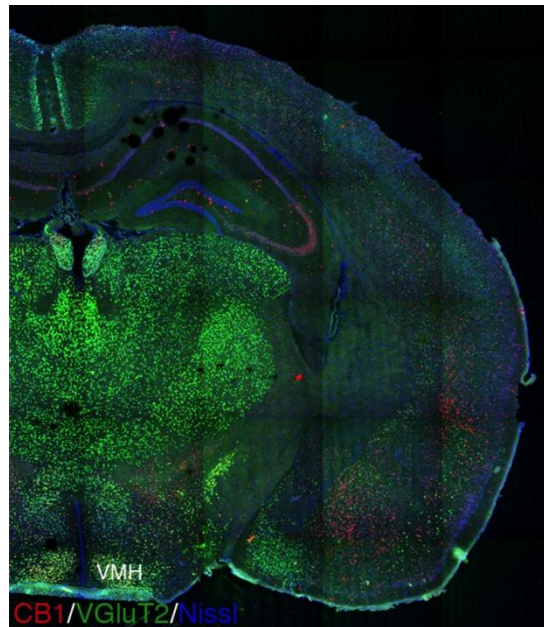


図 1 成体マウスにおける CB1 mRNA (赤) と VGluT2 mRNA (緑) の発現
VMH: 視床下部腹内側核
青は Nissl 染色

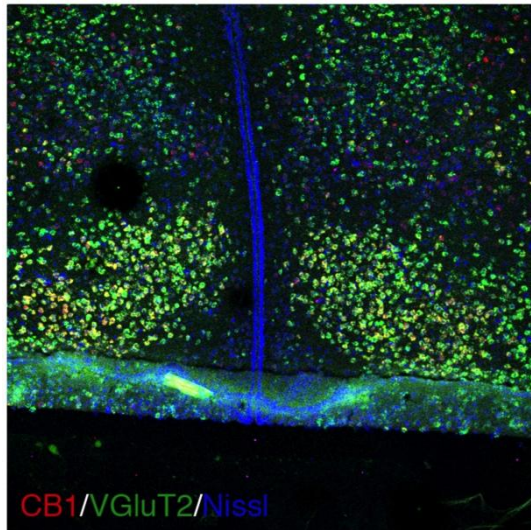


図2 図1の視床下部腹内側核の拡大像
CB1とVGluT2のmRNAが腹内側核に
発現している。

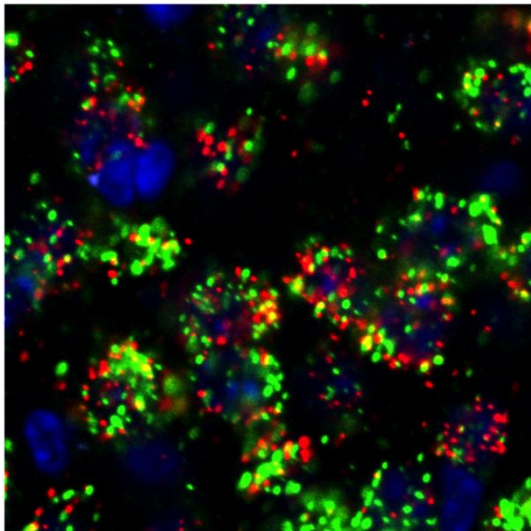


図3 図2の視床下部腹内側核の拡大像
CB1とVGluT2のmRNAが一部共陽性を
示す。

一方、腹内側核において、CB1のmRNAは抑制性ニューロンのマーカーであるGAD67のmRNAとは陰性だった(図4, 図5)。また摂食抑制ペプチドのCCKのmRNAともCB1は陰性を示した(図6)。

よって、CB1のmRNAはグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーVGluT2と一部共発現することが判明した。

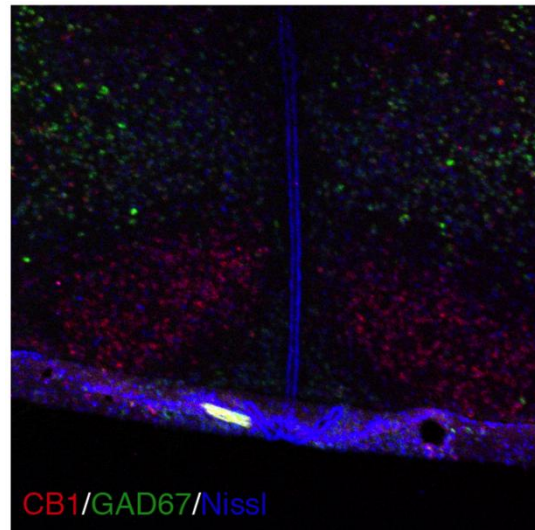


図4 腹内側核にGAD67 mRNA(緑)はほとんど
発現していない。

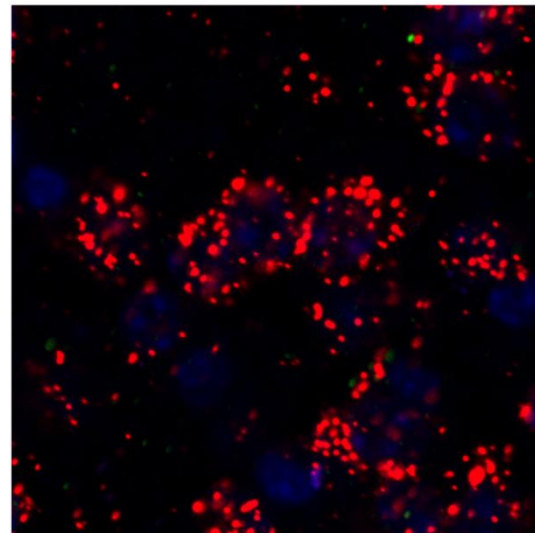


図5 図4の拡大像
CB1とGAD67のmRNAは陰性を示す。

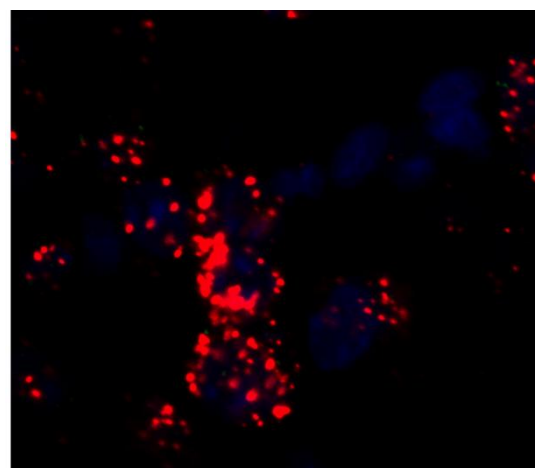


図6 腹内側核においてCB1 mRNA(赤)と
CCK mRNA(緑)は陰性を示す。

(2) Cbln1 mRNA 発現解析

同様に視床下部腹内側核における Cbln1 mRNA 発現細胞について fluorescent *in situ* hybridization により解析を行った。

Cbln1 の mRNA は視床下部腹内側核に発現し、グルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである VGluT2 の mRNA と一部共発現を示した (図 7, 図 8)。しかし、同じの小胞膜型グルタミン酸トランスポーター-VGluT1 の mRNA とは陰性だった (Data not shown)。

一方、抑制性ニューロンのマーカーである GAD67 の mRNA と Cbln1 の mRNA は陰性を示した (data not shown)。

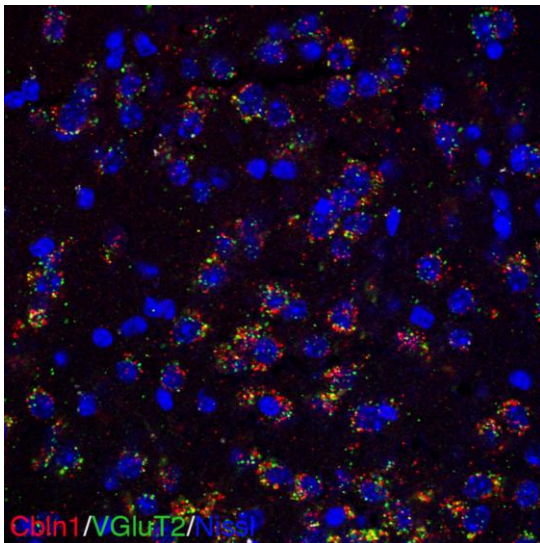


図 7 腹内側核における Cbln1 mRNA (赤) と VGluT2 mRNA (緑) の発現

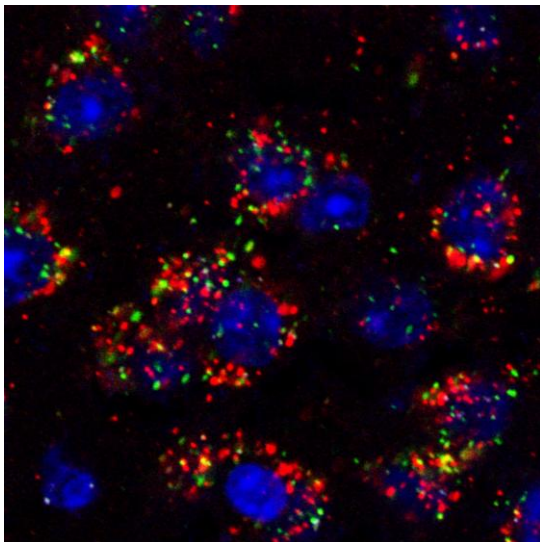


図 8 図 7 の拡大像
Cbln1 と VGluT2 の mRNA は一部共陽性を示す。

また、Cbln1 の mRNA と CB1 の mRNA は一部共陽性を示すことが判明した (図 9, 図 10)。

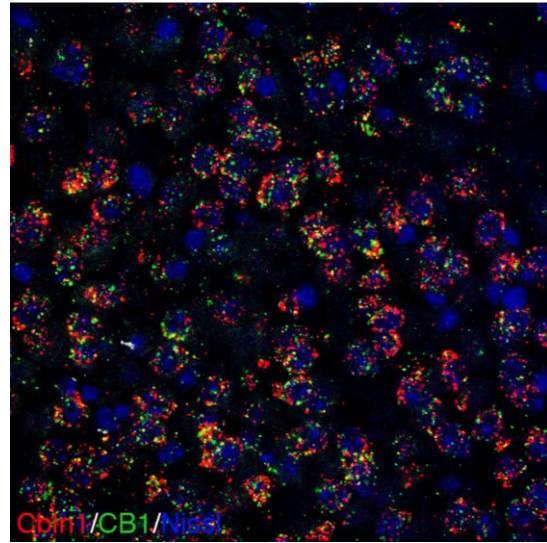


図 9 腹内側核における Cbln1 mRNA (赤) と CB1 mRNA (緑) の発現

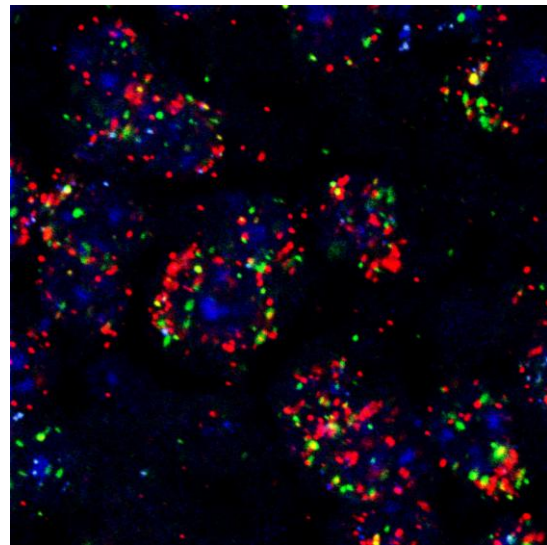


図 10 図 9 の拡大像
Cbln1 と CB1 の mRNA は一部共陽性を示す。

(3) 蛍光抗体法を用いた解析

抗 CB1 抗体を用いて腹内側核での CB1 発現を検証したが、腹内側核において CB1 はほとんど発現していなかった。発達期 (P10) でも行ったが、CB1 の発現を認めなかった。腹内側核では CB1 の mRNA は発現しているが、CB1 タンパクはほとんど発現していないことが判明した。

以上の結果より、野生型マウスにおいて、満腹中枢の視床下部腹内側核で、摂食促進ペプチド Cbln1 の mRNA とグルタミン酸トランスporter-VGluT2 の mRNA、内因性カンナビノイドの受容体 CB1 の mRNA がそれぞれ一部共発現していることが判明した。よって、Cbln1 と CB1 がグルタミン酸作動性の同じニューロンに発現し、摂食の調整に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高崎 千尋 (TAKASAKI CHIHIRO)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60451449

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし