

令和元年5月30日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08526

研究課題名(和文) 神経経路選択的な遺伝子発現を用いた視床下部摂食調節回路の解明

研究課題名(英文) Study on the neural circuits that regulate feeding behavior by pathway-specific gene expression

研究代表者

堀尾 修平 (Horio, Shuhei)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特別協力研究員

研究者番号：80145010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：摂食調節で重要な役割を果たしている視床下部室傍核で、Corticotropin-releasing hormone (CRH) ニューロンに注目した。神経経路選択的な遺伝子発現を用いてCRHニューロンの投射先を調べ、神経内分泌ニューロンとしての投射に加えて、孤束核、結合腕傍核、青斑核、縫線核、視床下部外側野などの脳部位へも投射していることを明らかにした。また、CRHニューロンがそれぞれの投射部位に従って特徴的な分布をしていることを示した。さらにそれらの個々のニューロンの生理機能を調べるために、ニューロン機能を抑制するテタヌス毒素を発現する実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部は、摂食調節に中心的な働きをしている。本研究で得られた結果は、視床下部の摂食抑制ニューロンの機能を調べると同時に、その投射先ニューロンをも明らかにできるという点で、今後、神経回路の研究の非常に有力な手段となりうる。肥満は様々な健康障害の原因となるため、効果的な摂食抑制薬の登場が望まれるが、現状では、副作用等の問題で有効に使用できる薬はほとんど皆無である。本研究で示すように、摂食抑制に關するニューロンのタイプとその神経回路を明らかにすることは、特異的で副作用のない薬の開発に際してきわめて有効な情報を提供できると考える。

研究成果の概要(英文)：Corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH) are involved in many physiological functions. To study the role of CRH neurons, we classified PVH CRH neurons according to their differential projections to brain regions. First, we expressed GFP and wheat germ agglutinin(WGA) in CRH neurons; GFP was used for tracking neural pathways and WGA for the target neurons. Potential target regions were found to be the solitary nucleus, locus ceruleus, parabrachial nucleus, dorsal raphe, and lateral hypothalamus. Secondly, we used retrograde viral vector to selectively express GFP in the CRH neurons projecting to each site. The CRH neurons were distributed differently in the PVH according to their projection sites. Thirdly, we expressed tetanus toxin selectively in each CRH neuron to find physiological functions. This strategy is effective in classifying CRH neurons, tracking each neural pathway, and finding their role in feeding behavior.

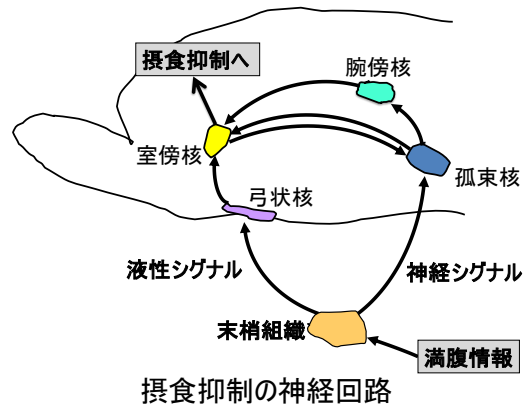
研究分野：環境生理学

キーワード：摂食調節 視床下部 室傍核 CRF CRH 孤束核 結合腕傍核 神経経路

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

視床下部の室傍核 (PVH) は種々の摂食に関する情報が集積する1つの摂食調節センターである (右図)。この部位には、従来、何種類かの摂食抑制ニューロンが存在することが報告されている。すなわち、CRH、オキシトシン (OXT)、TRH などのニューロンである。報告者も、PVH に存在するヒスタミン H1 受容体 (H1R) 発現ニューロンが摂食抑制に関与することを示す結果を得た。すなわち、遺伝子改変マウスを用い、イムノトキシンを利用した細胞標的により PVH に特異的に存在する H1R ニューロンを選択的に死滅させたところ、摂食量、体重が明らかに増加した。すなわち H1R ニューロンが摂食抑制作用を持っていることが分かった。そこで、H1R ニューロンと、CRH、OXT、AVP (バソプレシニン)、TRH 各ニューロンとの関係を調べたところ、PVH のニューロン群は、「H1R/CRH」系と「OXT/AVP/TRH」系に大別されることが判った。すなわち、H1R ニューロンは CRH ニューロンをその一部に含むが、OXT、AVP、TRH ニューロンとはほとんど重ならない。また、H1R ニューロンが死滅したとき、CRH ニューロンもかなり死滅するのに対し、OXT、AVP、TRH ニューロンは全く影響を受けなかった。すなわち、PVH の摂食抑制経路には、「H1R/CRH」系と「OXT/AVP」系の別個の経路があると考えられる。本研究ではこれらの摂食抑制ニューロンのうち、まだ研究が進んでいない CRH ニューロンを対象を絞った。ここで指摘したいのは、PVH の CRH ニューロンと言っても均一ではなく、幾つかのタイプから構成されていて、摂食調節ニューロンはその内の1つに過ぎないという点である。そのニューロンをきちんと見分ける必要があるが、従来そのような方法は皆無であった。そこで、本研究ではニューロンのタイプを従来のような伝達物質あるいは受容体のみで分類するのではなく、投射先脳部位の違いにより分類するという新しい方法を提唱する。



2. 研究の目的

本研究では、神経経路選択的に特定の遺伝子を発現させる手法 (逆行性ウイルスベクターを用いる) と特定の細胞選択的に遺伝子を発現させる方法 (Cre recombinase を用いる) を組み合わせることで、摂食調節に関わる神経細胞を詳細に特定すると同時に、その神経経路を正確に辿ることにより、摂食調節回路を明らかにすることを旨とする。

(1) まず、摂食調節に関与する神経細胞として PVH の CRH ニューロンに着目し、その投射脳部位を明らかにする。このために、神経経路を追跡するための目印となるタンパク質を PVH の CRH ニューロンに特異的に発現させる。CRH ニューロンに特異的に Cre recombinase (Cre) を発現する遺伝子改変マウス (CRH-Cre マウス) と、Cre 依存性に標的蛋白を発現するウイルスベクターを用いる。

(2) PVH の CRH ニューロンを、その投射部位に従って分類する。(1)で明らかにした各々の投射脳部位に、神経終末から取り込まれて逆行性に運ばれるウイルスベクターを投与する。このウイルスベクターに、Cre 依存性に GFP を発現するように工夫しておけば、その脳部位に投射する CRH ニューロンのみが GFP を発現するので、容易に識別可能となる。

(3) タイプ分けした個々の CRH ニューロンの生理機能、とくに摂食調節への関与を明らかにする。この目的のために、神経活動を抑制するテタヌトキシンを、各々の CRH ニューロンに特異的に発現させ、生理機能への効果を調べる。

3. 研究の方法

(1) PVH の CRH ニューロンの投射部位の特定

以下の実験では、CRH ニューロン特異的に Cre recombinase を発現する CRH-Cre 遺伝子改変マウス (共同研究者の井樋博士作製) を使用した。このマウスの視床下部室傍核 (PVH) に GFP と小麦胚芽レクチン (WGA) を Cre 依存性に発現するウイルスベクター (AAV) を注入した。この操作により、PVH の CRH ニューロン特異的に GFP と WGA を発現させた。脳組織の切片を作成し免疫抗体法により、GFP と WGA を検出した。GFP によって CRH ニューロン線維の走行を追跡できる。また WGA は順行性にシナプスを超えて投射先二次ニューロン細胞体まで運ばれる。従って、CRH ニューロンと投射先ニューロンの識別が可能であり、この方法により、CRH ニューロンの投射部位を確定した。

(2) CRH ニューロンのタイプ分け

CRH ニューロンを、どの脳部位に投射するかによりタイプ分けした。CRH-Cre マウス及び、

逆行性ウイルスベクター（HiRet ベクター、研究協力者の小林博士開発）を用いた。HiRet ベクターは神経終末部で取り込まれ、逆行性に神経細胞体に達し種々の遺伝子を発現する。本研究では、その遺伝子発現が Cre 依存性となる工夫をしたベクターを作製し、発現させる遺伝子として、GFP を用いた（HiRet-GFP ベクター）。(1)で明らかにした各々の脳部位に HiRet-GFP ベクターを注入し、逆行性に CRH ニューロンに達して産生される GFP を抗体により検出した。CRH ニューロンは、そのタイプ毎に PVH 内での分布が異なると考えられ、その分布の違いを調べた。また、脳内各部位に投射する CRH ニューロンと CRH 神経内分泌ニューロンとを区別するため、フルオロゴールドを腹腔内投与し血流を通して、神経内分泌ニューロンに逆行性に取り込ませ、抗体染色により神経内分泌ニューロンとして検出した。

(3) CRH ニューロンの機能の測定

各タイプの CRH ニューロンの生理機能を調べる目的で、CRH ニューロンの神経活動を特異的に抑制するため、テタヌストキシン軽鎖（eTeNT）を発現させた。CRH-Cre マウス及び、逆行性に運ばれて eTeNT を Cre 依存性に発現する Hires-eTeNT ベクターを用いた。方針は以下の通りである。まず、PVH の CRH ニューロンのそれぞれの投射脳部位に HiRet-eTeNT ベクターを注入する。その結果、CRH ニューロン選択的に eTeNT が発現する。ただし、このままでは PVH 以外の脳部位に存在する CRH ニューロンからの投射があった場合、そのニューロンにも eTeNT が発現してしまう（実際に本研究の結果は、そのような可能性を示した）。そこで、抗生物質ドキシサイクリンを用いる Tet-On システムを導入した。すなわち、eTeNT の発現をテトラサイクリン応答因子（TRE）依存性とし、リバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子（rtTAV）を AAV ベクターにより PVH 部位の細胞に局限して発現させる。そうすることで、PVH の CRH ニューロンのみで、ドキシサイクリン存在下で TRE が働き、eTeNT が産生される。そこでこの方針に従い、投射部位に HiRet-TRE-EGFP-eTeNT ベクターを（EGFP は eTeNT 発現の検出のため）、PVH に、AAV（rtTAV）ベクターを注入した。その後、ドキシサイクリンを飲水により投与し、eTeNT の目的のニューロンでの発現を、EGFP の検出により調べた。次に、ドキシサイクリン存在下と非存在下でマウスの摂食量、体重を測定し、摂食調節への関与を調べた。

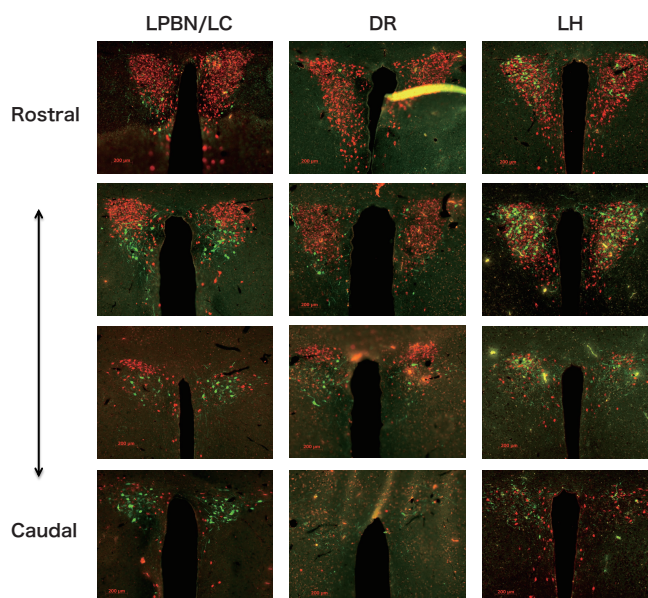
4. 研究成果

(1) PVH の CRH ニューロンの脳内投射部位

PVH の CRH ニューロン特異的に、GFP 及び WGA を発現させた。その結果、GFP により CRH ニューロン線維の走行がはっきりと観察され、とくにその投射部位と考えられる部位には、神経線維の密集する様子が観察された。そこで、それらの部位を主な対象として、WGA 陽性の細胞を調べた。その結果、PVH の CRH ニューロンの投射部位として、孤束核、結合腕傍核、青斑核、背側縫線核、視床下部外側核が明らかとなった。

(2) CRH ニューロンのタイプ分け

PVH の CRH ニューロンをその脳内投射部位に従ってタイプ分けした。(1)で明らかになった投射部位、すなわち孤束核、結合腕傍核、青斑核、背側縫線核、視床下部外側核のそれぞれの部位に逆行性ウイルスベクターを注入し、その部位に投射する CRH ニューロンのみ GFP を発現させた。右図にその結果の一例を示した。LH: 視床下部外側核、DR: 背側縫線核、LPBN: 結合腕傍核、LC: 青斑核。それぞれの部位に投射する CRH ニューロンが緑色で表示されている。また、赤色で表示されているニューロンは、フルオロゴールドを逆行性に取り込ませることにより検出した神経内分泌ニューロンを表している。この結果からわかるように、各部位に投射する CRH ニューロンの分布は明らかに異なっており、それぞれ別のタイプのニューロンとして区別できる。また、神経内分泌ニューロンとの重なりはほとんど観察されないことから、これらの脳内各部位に投射する CRH ニューロンは神経内分泌ニューロンとは別であることがわかる。



一方、本研究に付随して得られた結果について述べる。この実験を行う際に脳内の各部位に逆行性ウイルスベクターを投与したが、CRH ニューロンは、PVH 以外の脳部位にも存在するので、そこからの投射があればそのニューロンが GFP により検出されるはずである。実際に、

この手法により、PVH以外の脳部位の CRH ニューロンからも、各投射部位に入力があることが判った。すなわち、孤束核には扁桃体中心核の CRH ニューロンから、結合腕傍核と青斑核には扁桃体中心核、分界条状核の CRH ニューロンから、背側縫線核には扁桃体中心核、分界条状核の CRH ニューロンから、それぞれ投射があることがわかった。

(3) CRH ニューロンの機能

各タイプの CRH ニューロンの生理機能を調べる目的で、各 CRH ニューロンにテタヌストキシン軽鎖 (eTeNT) を発現させた。研究方法の項目で述べたように Tet-On システムを用い、ドキシサイクリン存在下でのみ eTeNT が産生されるようにした。まず、培養細胞を用いてこの Tet-On システムが働いていることを確認した。次いでマウスを用いて上述の実験を行い、ドキシサイクリン投与時、各 CRH ニューロンに (2) の結果で示したのと同程度の eTeNT が発現することを確認した。しかし、結論としては、摂食行動に影響を及ぼす CRH ニューロンの同定には至らなかった。その理由としては、用いたドキシサイクリンが比較的高濃度であったため、摂食に影響を与えてしまったことが考えられる。摂食に影響しない比較的低濃度では、十分な量の eTeNT の発現が見られなかった。今後のことになるが、この問題は Tet-Off システムを用いれば解決可能である。このシステムでは、eTeNT の産生にドキシサイクリンを必要としないからである。

(4) 今後の展望

摂食調節に CRH が関与するとの報告はあっても、実際に CRH ニューロンが関与するとの報告は未だに見られない。ニューロンを介さず、脳室内 CRH 濃度の増減で調節されるとの考えもある。本研究を進めることによりこの問題が解決されることが期待される。

CRH ニューロンは、PVHに限らず、扁桃体中心核、分界条状核にも存在し、それらも孤束核、結合腕傍核といった生理機能に重要な神経核に神経線維を送っている。それらの機能に関しても本研究の手法を用いて解明することが可能である。

CRH がストレス反応を担っていることは広く認められている。一方、ストレスの種類によって摂食が増進したり減弱したりすることもよく知られている。この場合、それぞれが異なるタイプの CRH ニューロンを介していることが予想され、それらの研究に対して本研究の手法は有力な研究手段となりうる。

従来は、ある脳部位に存在するニューロンをその伝達物質で分類し、そのニューロン機能を包括的に調べるという方法がとられていた。従って、そのニューロンは様々な機能に関与することになり、場合によっては混乱を招くこともあった。しかし、ここで述べたようにニューロンをその投射経路に従って細分類すれば、それぞれが個々の神経経路を介してただ1つの機能に関わることを明らかにできるはずである。そのような研究方法が、今や可能な状況になったことを本研究の結果は示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kono J, Konno K, Talukder AH, Fuse T, Abe M, Uchida K, Horio S, Sakimura K, Watanabe M, Itoi K. Distribution of corticotropin-releasing factor neurons in the mouse brain: a study using corticotropin-releasing factor-modified yellow fluorescent protein knock-in mouse. *Brain Struct Funct.* 222(4):1705-1732, 2017、査読有、DOI 10.1007/s00429-016-1303-0

[学会発表] (計 11 件)

- ① Shuhei Horio, Satoshi Yamagata, Kenta Kobayashi, Shigeki Kato, Kenji Sakimura, Kazuto Kobayashi, Yasuhiko Minokoshi, Keiichi Itoi, CRF circuit involved in the regulation of food intake. The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, 2019
- ② 堀尾修平、山形聡、小林憲太、加藤成樹、内田克也、崎村建司、上山敬司、箕越靖彦、小林和人、井樋慶一 Corticotropin-releasing factor (CRF) ニューロンによる摂食調節、第 36 回内分泌代謝学サマーセミナー、2018
- ③ 堀尾修平、山形 聡、小林憲太、加藤成樹、崎村建司、上山敬司、小林和人、箕越靖彦、井樋慶一、CRF ニューロンと摂食調節、第 3 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会、2018
- ④ 堀尾修平、山形聡、小林憲太、加藤成樹、崎村建司、上山敬司、小林和人、井樋慶一 CRF-Cre マウスを利用した視床下部室傍核 CRF ニューロン群のタイプ分け、平成 29 年度新学術領域研究学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会、2018
- ⑤ 堀尾修平、山形聡、小林憲太、加藤成樹、崎村建司、上山敬司、小林和人、井樋慶一、視床下部室傍核の CRF ニューロンの脳内投射部位による細分類とその神経経路の機能、第 94 回日本生理学会大会、2018
- ⑥ 堀尾修平、視床下部室傍核 CRF ニューロンを脳内投射部位によりタイプ分けしその機能を調べる、第 2 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会、2017

- ⑦ 堀尾修平、山形聡、小林憲太、加藤成樹、崎村建司、上山敬司、小林和人、井樋慶一、視床下部室傍核の CRF ニューロンを投射部位により分類する、第 40 回日本神経科学大会、2017
- ⑧ 堀尾修平、山形聡、小林憲太、加藤成樹、崎村建司、上山敬司、小林和人、井樋慶一、視床下部室傍核の CRF ニューロンの細分類とその機能、第 44 回日本神経内分泌学会学術集会、2017
- ⑨ 堀尾修平、視床下部室傍核の CRF ニューロンの脳内投射部位の特定とその機能、第 69 回日本生理学会中国四国地方会、2017
- ⑩ 井樋慶一、河野順子、今野幸太郎、Ashraf H. Talukder、内田克哉、布施俊光、阿部学、夏目里恵、堀尾修平、崎村建司、渡辺雅彦、マウス脳内コルチコトロピン放出因子ニューロンの分布：強化型黄色蛍光タンパク質ノックインマウスを用いた検討、第 39 回日本神経科学大会、2016
- ⑪ 堀尾修平、視床下部室傍核のヒスタミン H1 受容体発現ニューロンと CRH ニューロンと食欲、第 1 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会、2016

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：井樋慶一
ローマ字氏名：(ITOI, keiichi)
所属研究機関名：東北大学
部局名：情報科学研究科
職名：教授
研究者番号：60232427

研究分担者氏名：上山敬司
ローマ字氏名：(UEYAMA, takashi)
所属研究機関名：和歌山県立医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号：50264875

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：小林和人
ローマ字氏名：(KOBAYASHI, kazuto)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。