

令和元年6月17日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09767

研究課題名(和文) 摂食調節因子nesfatin-1による脂肪組織交感神経活性化機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of nesfatin-1-induced stimulation of sympathetic nerve in white adipose tissue

研究代表者

谷田 守 (TANIDA, Mamoru)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70512309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肥満、高血圧、糖尿病などの生活習慣病発症の対策と治療法に貢献する為に、本研究は摂食後に脳で産生されるホルモンであるnesfatin-1が脂肪組織交感神経を興奮させて代謝亢進に寄与する脳内機構の解析を行った。その結果、nesfatin-1が視床下部弓状核ERKシグナルと延髄のカテコラミン神経系を介して脂肪組織交感神経を活性化させる新たな仕組みを本研究で見出した。本研究で新たに得られた研究成果は、過食とエネルギー代謝低下による肥満発症の新たな予防・治療戦略に応用できる可能性を含んでいる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で新たに得られた成果は、自律神経を介する摂食とエネルギー代謝に関する脳内調節機構を新たに見出していることである。このことから、本研究の成果は、自律神経系調節に関する基礎医学系分野への貢献のみならず、生活習慣病の新規創薬開発や抗肥満戦略におけるnesfatin-1作用の有効性を追求する研究分野にも大きな影響をもたらす、健康寿命の遅延を招く生活習慣病予防・治療に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：It is well known that metabolic syndrome such as obesity, hypertension or diabetes, is major health issue in the world. To contribute to establishment of new treatment to the metabolic syndrome, we focus to nesfatin-1, appetite suppressor in the brain, and examined central mechanism of nesfatin-1 actions on sympathetic outflow to the adipose tissue. Here, we newly found central pathway that nesfatin-1 caused sympathetic activation in the white adipose tissue through the hypothalamic ERK signal and the medullary catecholaminergic signal. Thus, it seems that present new data may contribute to new preventive method and treatment to the obesity.

研究分野：生理学

キーワード：自律神経 視床下部 延髄 エネルギー代謝 脂肪組織 摂食調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満は、糖尿病、高血圧、心筋梗塞などの生活習慣病を始めとして様々な疾患の原因になり、男性で肥満者の割合が増加している為(平成 25 年度国民健康・栄養調査)、その治療法や予防法の確立が重要になっている。近年同定された摂食調節物質で、視床下部ニューロン由来の nesfatin-1 は、nesfatin/NUCB2 が変換酵素によるプロセッシングを受けた生理活性を示す摂食抑制性の神経ペプチドで、抗肥満ホルモンとして報告された(Nature, 2006 12:709-12)。研究代表者は最近、nesfatin-1 による自律神経調節作用と脳内メカニズムについて解析したところ、脳室内 nesfatin-1 投与が交感神経腎臓枝の増大と血圧の上昇を惹起することを見出し、この作用に、視床下部室傍核の CRH ニューロンでの ERK シグナルが関与していることを見出した(Diabetes 2015)。従って、摂食抑制因子である nesfatin-1 は視床下部に作用して自律神経系を介して循環調節に関与する可能性が考えられる。

一方、nesfatin-1 は摂食や循環調節のみならず、エネルギー代謝調節に関与する白色脂肪交感神経系を活性化させる。しかしながら、nesfatin-1 による脂肪組織交感神経作用が視床下部のどの神経核を経由しているか、さらに視床下部-延髄路といった中枢神経系でどのような神経回路を経由しているかについてはよくわかっていない。そこで、研究代表者は nesfatin-1 による自律神経を介する抗肥満作用の脳内メカニズムを明らかにする為に、脂肪組織交感神経を興奮させる視床下部内の神経回路及び視床下部-延髄神経経路を明確にすることを目的とした。nesfatin-1 による自律神経調節機構を明確にすることは、肥満抑制に関する新たな中枢神経系機構を見出して、抗肥満戦略に応用する可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、nesfatin-1 の脂肪組織交感神経系調節作用における視床下部 ERK シグナルの局在及び視床下部-延髄経路の詳細について明らかにすることである。これまでの研究から視床下部 ERK シグナルは nesfatin-1 投与で室傍核と弓状核で促進されることがわかっており、これらの神経核の役割と延髄の神経核との神経回路の構築に関する解析を行う。具体的には、

(1) nesfatin-1 が視床下部に作用して脂肪組織交感神経活動を促進させる際の標的神経核を明確にする。

(2) 視床下部標的神経核-延髄神経核での経路を同定し、視床下部-延髄の神経回路を明確にする。これらの実験について、in vivo 電気生理学実験、生化学及び組織化学実験を中心に進める。

3. 研究の方法

(1) nesfatin-1 投与による脂肪組織交感神経作用に関わる視床下部標的神経核の同定

nesfatin-1 脳室内投与でラット視床下部の神経核(室傍核又は弓状核)における ERK リン酸化陽性細胞数が増大することを研究代表者は報告していることから(Diabetes 2015)、麻酔下ラット及びマウスに nesfatin-1 を視床下部室傍核又は弓状核に微量投与した際の遠心性白色脂肪交感神経活動の変化を in vivo 電気生理学実験で解析する。

(2) nesfatin-1 による脂肪組織交感神経制御に関与する視床下部神経核の解析

実験 1-(1)で明確にする nesfatin-1 による白色脂肪交感神経調節に関与する視床下部神経核(室傍核又は弓状核)で、ERK 活性化がどのタイプの神経細胞に起因するかについて、研究代表者の先行研究で用いた二重免疫組織染色法及び in situ ハイブリダイゼーション法で解析する。具体的には、視床下部室傍核では CRH ニューロン又はオキシトシンニューロン、いずれかのニューロンと共局在する ERK リン酸化陽性細胞を明らかにする。一方、視床下部弓状核では、POMC ニューロン又は NPY ニューロンのうち、いずれかのニューロンと共局在する ERK リン酸化陽性細胞を明らかにする。

(3) 延髄及び視床下部 - 延髄神経回路に関する解析

実験(1)で明らかにする nesfatin-1 が視床下部で作用する神経核から神経投射を受け、遠心性交感神経枝を脂肪組織に供給している延髄での神経核を明らかにする。具体的には、

nesfatin-1 脳室内投与で活性化ニューロンのマーカーである c-Fos 陽性細胞が増大する延髄の神経核(縫線核や吻側延髄腹外側野)を明らかにする。さらに、延髄の神経核でのカテコラミンニューロンの役割を解析するために、合成酵素である tyrosine hydroxylase 陽性細胞との二重免疫組織染色法で解析を行う。さらにカテコラミンニューロン除去ラットを薬理的方法により作製して、nesfatin-1 による脂肪組織交感神経反応を観察する。

逆行性神経トレーサーである Fluoro-Gold を c-fos が活性化される延髄の神経核に注入し、この部位へ軸索投射するニューロンを標識したラットに nesfatin-1 を脳室内投与して、視床下部神経核(室傍核又は弓状核)の ERK リン酸化陽性細胞と共局在する神経核を二重染色で同定する。

(4) nesfatin-1 慢性投与による脂肪組織交感神経へ及ぼす効果

nesfatin-1 を脳室内へ 7 日間投与した時の無麻酔ラットの白色脂肪交感神経活動、血圧及び心拍数の変化を確認する。無麻酔下ラットの自律神経活動計測は、有線電極の埋めこみによる測定システムを用いて行い、動脈圧は腹腔動脈から計測する。

4. 研究成果

(1) nesfatin-1 投与による脂肪組織交感神経作用に関わる視床下部標的神経核の同定

麻酔下ラットの白色脂肪交感神経活動は、脳室内 nesfat in-1 投与により濃度依存的に活性化した。さらに麻酔下マウスへの脳室内 nesfat in-1 投与も白色脂肪交感神経活動を増大させた。従って、nesfat in-1 による脂肪組織交感神経活動の動物種差は確認されなかった。次に nesfat in-1 の視床下部神経核への微量投与実験を行ったところ、室傍核ではなく、弓状核への投与によって白色脂肪交感神経活動が増大した。このことから、nesfat in-1 は視床下部弓状核に作用して、脂肪組織交感神経活動を促進させることがわかった。

(2) nesfat in-1 による脂肪組織交感神経制御に関する視床下部神経核の解析

Nesfat in-1 によって ERK が活性化される弓状核においてどの神経細胞が活性化されるか、組織学的に解析を行ったところ、POMC ニューロンではなくて、NPY ニューロンと ERK リン酸化陽性細胞が共同存在していた。また、視床下部弓状核での POMC ニューロン由来の α -MSH 受容体の MC-4 受容体の阻害剤を投与したラットでは、nesfat in-1 による脂肪組織交感促進作用は残存していた。従って、nesfat in-1 は視床下部弓状核の NPY ニューロンに作用して脂肪組織交感神経活動を促進させることがわかった。

(3) 延髄及び視床下部 - 延髄神経回路に関する解析

覚醒下ラット脳室内への nesfat in-1 投与は延髄の孤束核(NTS)、尾側延髄腹外側野(CVLM)、吻側延髄腹外側野(RVLM)における c-fos 陽性細胞数を増大させた。次に、これらの神経核におけるカテコラミンニューロンの役割を解析する目的で合成酵素陽性細胞染色の組織学的解析を行ったところ、Nesfat in-1 の脳室内投与は RVLM 及び CVLM の c-fos 陽性細胞とカテコラミン陽性細胞の共同存在が確認された。さらにカテコラミンニューロンの阻害剤であるチロシン代謝酵素を標識したサポリン毒素を延髄腹外側野の両側に微量注入して、部位特異的にカテコラミンニューロン破壊ラットの作製を試みたが、破壊ラット作製の成功率は低かった(3匹/16匹中)。得られた破壊ラットに nesfat in-1 を脳室内投与して、腎臓又は脂肪組織交感神経活動を測定した。カテコラミンニューロン破壊ラットで Nesfat in-1 による脂肪組織交感神経活動促進作用は観察されたが、腎臓交感神経促進作用は減弱されていた。

次に、視床下部弓状核と延髄神経核との神経連絡を確認するために、ラット延髄内へ逆行性神経トレーサーを微量注入する実験を行った。しかしながら NTS, RVLM, CVLM、各神経核について、両側に存在する標的神経核にトレーサーを的確に注入できなかった。従って、標的となる神経核へ正確に微量注入する方法を新たに確立することが今後必要となる。

(4) nesfat in-1 慢性投与による脂肪組織交感神経へ及ぼす効果

本研究では、覚醒下ラットへの慢性 nesfat in-1 投与による脂肪組織交感神経活動反応を解析した。この解析のためには、10 - 14 日間連続で覚醒下ラットの交感神経活動測定を行う必要があった。有線の金属電極を腹内に埋め込む方法で検討したところ、埋め込み後 24 時間までの計測は確認できたものの、24 時間以降、摂食量減少や物理的電極接触などの影響により神経活動の消失が頻繁に観察された。今後は無線電極を用いて長期間の交感神経活動計測を行う必要がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1. Kuda Y#, **Tanida M#**, Chen F, Kurata Y, Shibamoto T.
Anaphylaxis stimulates afferent vagal nerve activity and efferent sympathetic nerve activity in the stomach of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2019 *in press* #equal contribution 査読有
2. Kuda Y, Shibamoto T, Zhang T, Yang W, **Tanida M**, Kurata Y.
Gastric vascular and motor responses to anaphylactic hypotension in anesthetized rats, in comparison to those with hemorrhagic or vasodilator-induced hypotension. *J Physiological Sciences* 68: 253-260, 2018 査読有
3. Yang W, Shibamoto T, Kuda Y, Zhang T, **Tanida M**, Kurata Y.
 α -Adrenoceptor Blockade Deteriorates Systemic Anaphylaxis by Enhancing Hyperpermeability in Anesthetized Mice. *Allergy Asthma Immunol Res*.10: 52-61, 2018 査読有
4. **Tanida M**, Zhang T, Sun L, Song J, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Shibamoto T.
Anaphylactic hypotension causes renal and adrenal sympathoexcitation and induces c-fos in the hypothalamus and medulla oblongata. *Experimental Physiology* 103(6):790-806, 2018 査読有
5. Yamamoto N, Ishikuro R, **Tanida M**, Suzuki K, Ikeda-Matsuo Y, Sobue K.
Insulin-signaling Pathway Regulates the Degradation of Amyloid β -protein via Astrocytes. *Neuroscience* 385:227-236, 2018 査読有
6. Mukai K, Kuda Y, Shibamoto T, **Tanida M**, Kurata Y, Yokoyama H.
Renal response to anaphylaxis in anesthetized rats and isolated perfused rat kidneys: roles of nitric oxide. *J Physiological Sciences* 68(5):689-697, 2018 査読有
7. Kurata Y, Tsumoto K, Hayashi K, Hisatome I, **Tanida M**, Kuda Y, Shibamoto T.
Dynamical mechanisms of phase-2 early afterdepolarizations in human ventricular myocytes: insights from bifurcation analyses of two mathematical models. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017 Jan

- 1;312(1):H106-H127. 査読有
8. Zhang T#, **Tanida M**#, Uchida K, Suzuki Y, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Tominaga M, Shibamoto T. Biphasic renal sympathetic response to hemorrhagic hypotension in mice. *Shock* 48: 576-58, 2017 #equal contribution 査読有
9. Zhang T, **Tanida M**, Uchida K, Suzuki Y, Yang W, Kuda Y, Kurata Y, Tominaga M, Shibamoto T. Mouse anaphylactic hypotension is characterized by initial baroreflex independent renal sympathoinhibition followed by sustained renal sympathoexcitation. *Frontier Physiology* 8: 669, 2017 査読有
10. Kuda Y, Shibamoto T, Yang W, Zhang T, **Tanida M**, Kurata Y. Blockade of β 2-adrenoceptor, rather than β 1-adrenoceptor, deteriorates cardiac anaphylaxis in isolated blood-perfused rat hearts. *Cardiol J* 24: 403-408, 2017 査読有
11. Ho YY, Nakato J, Mizushige T, Kanamoto R, **Tanida M**, Akiduki S, Ohinata K. l-Ornithine stimulates growth hormone release in a manner dependent on the ghrelin system. *Food Function* 8: 2110-2114, 2017 査読有
12. Yamamoto N, Shibata M, Ishikuro R, **Tanida M**, Taniguchi Y, Ikeda-Matsuo Y, Sobue K. Epigallocatechin gallate induces extracellular degradation of amyloid β -protein by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of ERK and PI3K pathways. *Neuroscience* 362: 70-78, 2017 査読有
13. Wang M, Shibamoto T, Kuda Y, **Tanida M**, Zhang T, Song J, Kurata Y. The responses of pulmonary and systemic circulation and airway to anaphylactic mediators in anesthetized BALB/c mice. *Life Sci.* 2016 Feb 15;147:77-84. 査読有
14. Yamamoto N, Fujii Y, Kasahara R, **Tanida M**, Ohora K, Ono Y, Suzuki K, Sobue K. Simvastatin and atorvastatin facilitates amyloid β -protein degradation in extracellular spaces by increasing neprilysin secretion from astrocytes through activation of MAPK/Erk1/2 pathways. *Glia.* 2016 Jun;64(6):952-62. 査読有
15. Kimura K#, **Tanida M**#, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. *Cell Rep.* 2016 Mar 15;14(10):2362-74. #equal contribution 査読有
16. **Tanida M**, Takada M, Kato-Kataoka A, Kawai M, Miyazaki K, Shibamoto T. Intra-gastric injection of Lactobacillus casei strain Shirota suppressed spleen sympathetic activation by central corticotrophin-releasing factor or peripheral 2-deoxy-d-glucose in anesthetized rats. *Neurosci Lett.* 2016 Apr 21;619:114-20. 査読有
17. Song J#, **Tanida M**#, Shibamoto T, Zhang T, Wang M, Kuda Y, Kurata Y. The Role of Lumbar Sympathetic Nerves in Regulation of Blood Flow to Skeletal Muscle during Anaphylactic Hypotension in Anesthetized Rats. *PLoS One.* 2016 Mar 21;11(3):e0150882. #equal contribution 査読有
18. Wang M, Shibamoto T, Kuda Y, **Tanida M**, Zhang T, Song J, Mukai K, Kurata Y. The Responses of Pulmonary and Systemic Circulation and Airway to Allergic Mediators in Anesthetized Rats. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(4):556-63. 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

1. **Tanida M**. Sympathetic regulation in anaphylactic shock or feeding suppression 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress, 2019.03. Kobe, Japan
2. **谷田 守**, 芝本 利重, 倉田 康孝. コレシストキニン又はレプチンの静脈内投与によるマウス消化管迷走神経求心路及び交感神経遠心路反応. 第 65 回中部日本生理学会, 2018 年 11 月, 愛知県名古屋
3. **谷田 守**, 九田 裕一, 倉田 康孝, 芝本 利重. 骨格筋ホルモンによる自律神経調節. 第 28 回日本病態生理学会. 2018 年 8 月, 神奈川県横浜市
4. **谷田 守**. アナフィラキシーショック時の交感神経調節機構. 第 33 回日本 shock 学会. 2018 年 6 月, 東京都
5. **谷田 守**. 摂食調節因子による自律神経調節機構と生活習慣病予防への応用. 第 39 回日本循環制御医学会. 2018 年 6 月, 宮崎県宮崎市
6. **Tanida M**, Shibamoto T. Hypothalamic GLP-1 acts on the hypothalamic paraventricular nucleus and causes neural activation of the catecholamine neurons in the medulla and renal sympathoexcitation. The 95rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2018.03. Kagawa, Japan
7. **谷田 守**. 大豆イソフラボンによる胃迷走神経遠心路の抑制と摂食調節. 第 38 回日本肥満学会 2017 年 10 月, 大阪府大阪市
8. **谷田 守**, 張 涛, 芝本 利重. TRPV1 は出血性ショックによる腎臓交感神経活動抑制反応に

関与する。第 38 回日本循環制御医学会・学術集会 2017 年 6 月，大阪府大阪市

9. **谷田 守**。摂食調節因子による自律神経調節と生理的意義。第 94 回日本生理学会大会 2017 年 3 月，浜松県浜松市

10. **谷田 守**，芝本 利重。アナフィラキシー低血圧は視床下部室傍核と延髄孤束核及び吻側腹外側野での c-fos 発現を増大させ、交感神経活動を臓器特異的に亢進させる。第 32 回日本 Shock 学会総会 2017 年 9 月，岐阜県岐阜市

11. **谷田 守**，芝本 利重。GLP-1 による視床下部室傍核への作用と交感神経調節。第 27 回日本病態生理学会大会 2017 年 8 月，東京都小平市

12. **Tanida M**，Shibamoto T. Biphasic response of renal sympathetic nerve to hemorrhagic shock in anesthetized mice. The 40th Annual Conference on Shock, 2017.06. Fort Lauderdale, USA

13. **谷田 守**，摂食調節物質による自律神経調節機構に関する病態生理学研究，第 26 回日本病態生理学会大会，2016 年 8 月，石川県内灘町

14. **Tanida M**，Zhang T，Shibamoto T. Renal sympathetic response to hemorrhagic shock in anesthetized mice, 38th Annual Conference on Shock, 2016.10. Tokyo, Japan

15. **Tanida M**，Shibamoto T. Effects of intracerebroventricular injection of nesfatin-1 on autonomic nerve activities in rats and mice, Experimental Biology 2016, 2016.04. San Diego, USA

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 後藤 仁志

ローマ字氏名： (GOTOH, Hitoshi)

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。