

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13101
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：17H04372
研究課題名（和文）食欲中枢の制御機構と破綻の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of appetite center

研究代表者

照沼 美穂 (Terunuma, Miho)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50615739

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：肥満や糖尿病を代表とするメタボリックシンドロームは、食欲の中枢である間脳の視床下部に炎症反応を引き起こし、食欲制御機構を破綻させる。原因として脳機能の安定化に不可欠なアストロサイトの変性と、付随する神経機能障害が挙げられるが、その分子機序は解明されていない。研究代表者はアストロサイトに特異的に発現するグルタミン合成酵素の調節を担う分子を同定したことから、視床下部アストロサイトにおいても重要な役割を果たしているか、さらにはこれらが食欲制御破綻の改善に役立つかを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部のアストロサイトの食欲における役割についてはまだ明らかになっていない。本研究により、視床下部のアストロサイトと大脳皮質のアストロサイトでは、その特異的マーカーの発現調節機構が異なることが示唆された。このことは、視床下部には特有の分子による発現制御機構が存在していることを意味しており、視床下部のアストロサイトのみを標的とした副作用の少ない薬剤の開発が将来可能になるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Metabolic syndrome is a conditions that is associated with diabetes and obesity. It is known that people with metabolic syndrome have altered hypothalamic function due to the dysfunction of astrocytes. This is known to lead to neuroinflammation which can be the cause of various neurodegenerative disorders.

We have recently identified a molecule which regulate the expression of glutamine synthetase, a well known marker for astrocytes, that regulate the amount of glutamate, a major excitatory neurotransmitter in the brain. In this proposal, we examined if our molecule is involved in the regulation of glutamine synthetase expression in hypothalamic astrocytes by using cultured astrocytes and mice.

研究分野：神経化学、生化学

キーワード：アストロサイト 視床下部 神経炎症

1. 研究開始当初の背景

飽食の時代と言われる現代、日本の糖尿病人口は実に世界第9位の720万人であり、メタボリックシンドローム該当者は予備軍と合わせて約2000万人といわれる。糖尿病やメタボリックシンドロームは、脳の摂食制御やエネルギー代謝調節に異常をもたらす。その原因として、食欲・エネルギー恒常性維持の中枢である視床下部の炎症が注目されている。この炎症に深く関わっているのが脳細胞の一種のアストロサイトである。アストロサイトは血管内皮細胞と接着し、脳内に透過した栄養を貯蔵したり神経細胞に供給したりして脳活動の円滑化に寄与している。一方、アストロサイトが過剰な炎症反応を起こすと、神経変性や神経細胞死に至らしめる。アストロサイトの機能として特に注目すべきなのは、神経毒性を持つ興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を細胞内に取り込んでグルタミンに変換し、神経細胞障害を防ぐという働きである。この働きを担うグルタミン合成酵素 (GS) は、脳ではアストロサイトにのみ発現しているが、その機能調節の仕組みはわかっていない。

研究代表者は10年以上にわたり、アストロサイトの機能やGABA_B受容体の役割について研究を続け、多くの研究成果を報告してきた。その過程で、アストロサイトに発現するGABA_B受容体はGSと結合して細胞内のGS量の維持に関わっていることを見出した (Huyghe, Terunuma et al, *J Biol Chem*, 2014)。アストロサイトのGABA_B受容体は、脳内でGSと結合する事が確認されている唯一の分子である。さらに、アストロサイトのGABA_B受容体が、脳の神経伝達や脳血流の調節等のアストロサイトの機能発現に重要であり、アストロサイト活性化の指標である細胞内のカルシウム濃度上昇にも関わることを明らかにした (Terunuma et al, *Neuropharmacology*, 2015)。このアストロサイトの機能は、細胞のエネルギーセンサーであるAMPキナーゼ (AMPK) によるGABA_B受容体のリン酸化によって調節されることも分かった。

糖尿病患者の脳では神経炎症に加え、GSの減少やグルタミン酸の上昇などが報告されており、アストロサイトのグルタミン酸代謝障害が、糖尿病における神経炎症を重篤化させていると考えられる。このため、アストロサイトのGABA_B受容体の発現や機能を回復させれば、グルタミン酸代謝機構を含むアストロサイトの機能が改善され、視床下部の炎症を含む脳の病態が回復するとの仮説に至り、本研究を提案することにした。

2. 研究の目的

肥満や糖尿病が誘発する、摂食の中枢である視床下部の神経炎症に、アストロサイトに発現するGABA_B受容体がどのように関わっているかを明らかにし、アストロサイトのGABA_B受容体の発現や機能の回復が神経炎症を緩和するかどうかを調べる。

3. 研究の方法

肥満や糖尿病に起因する視床下部の神経炎症のメカニズムについて、アストロサイトのGABA_B受容体とグルタミン合成酵素 (GS) に注目し、初代培養アストロサイトから病態モデルマウスまでを用いて明らかにすることを目指した。本研究の目的を達成するために、中枢神経系の研究者に加えて、肥満や糖尿病が引き起こす全身的な病態についても調べるために、糖尿病や生活習慣病の研究者や摂食・嚥下の研究者とチームを組織し、階層的かつ統合的に研究を進めた。具体的には下記の3点を明らかにするための研究を進めた。

- (1) 高グルコース環境による視床下部アストロサイトのGABA_B受容体シグナリングの破綻機構を明らかにし、さらにGABA_B受容体シグナリングの破綻が誘導する神経炎症の仕組みを明らかにする。
- (2) アストロサイトのGABA_B受容体の機能回復が糖尿病や肥満による視床下部の神経炎症を緩和し、食欲や糖代謝能を改善するという仮説を検証し、明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 細胞外の高グルコース環境がGSやGABA_B受容体にもたらす影響：

視床下部培養アストロサイトを、通常の培地 (5.5mM グルコース) もしくは高グルコース培地 (25mM グルコース) で培養した時のGSとGABA_B受容体の発現をウエスタンブロッティング法にて検討した。その結果、GSの発現は高グルコース培地による培養3日目に有意に上昇した。この時のGABA_B受容体の発現量についても解析したが、GABAが結合するR1サブユニットとGタンパク質シグナリングを担うR2サブユニットのどちらも変化はなかった。さらに培養

期間を2週間にまで延長してGSとGABA_B受容体の発現を解析した。その結果、GSの発現量は有意に上昇したままであったが、GABA_B受容体のR1サブユニットで変化は見られず、もう一方のR2サブユニットでは、その発現が有意に減少していた(図2)。この結果は、視床下部のアストロサイトでは、GSとGABA_B受容体のカップリングは起きていないことを示唆するものである。実際、大脳皮質から調整したアストロサイトを高グルコース培地で培養したところ、GS、GABA_B受容体共に発現が上昇していた(図3)。

図1 3日間高グルコース培地にて培養した視床下部アストロサイトのGSとGABA_B受容体の発現変化

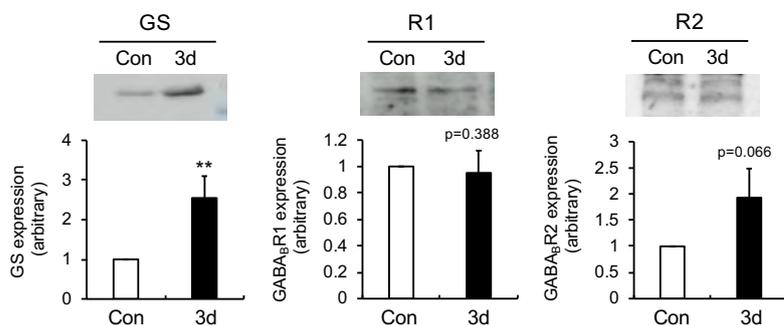


図2 2週間高グルコース培地にて培養した視床下部アストロサイトのGSとGABA_B受容体の発現変化

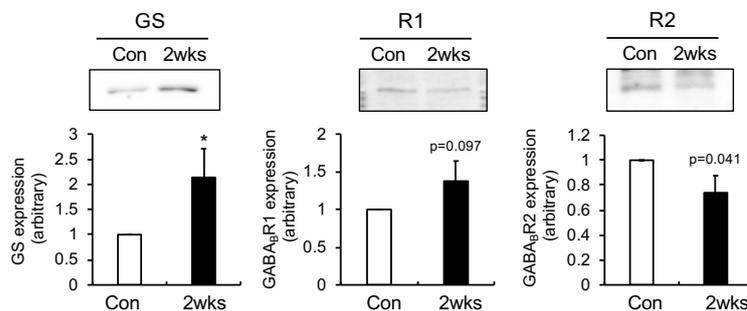
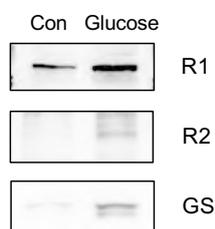


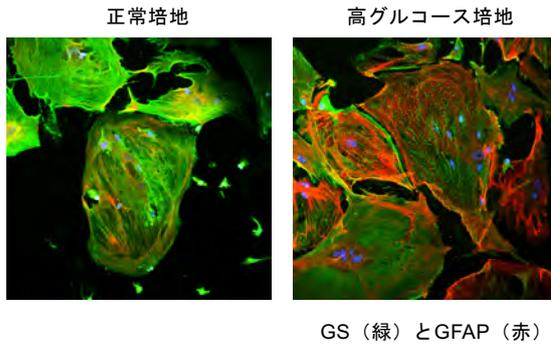
図3 高グルコース培地にて培養した大脳皮質アストロサイトのGSとGABA_B受容体の発現変化



(2) 高グルコース刺激によるアストロサイトの機能変化の解析:

大脳皮質のアストロサイトを高グルコース環境下で培養すると、経時的にアストロサイトの形態変化とアストロサイト特異的な分子マーカーの発現変化が見られ、様々な炎症性サイトカインの発現や分泌も報告されている。このため視床下部培養アストロサイトにおいても同じ現象が認められるかを検討した。その結果、多くの細胞でGFAPの発現上昇が観察された(図4)。しかし、明確な形態変化は観察されなかった。細胞によってはGSの顆粒状の局在が認められたことから、八量体で機能するGSに何らかの機能変化をもたらしている可能性が高い。

図4 培養視床下部アストロサイトの免疫染色



(3) 肥満マウスの視床下部におけるアストロサイトと神経細胞の解析：

視床下部のアストロサイトでは $GABA_B$ 受容体が GS の発現を調節していないことが明らかとなったため、研究の焦点をアストロサイトそのものに変更して研究を続けることにした。高脂肪食摂取肥満マウスの視床下部の GFAP 発現を免疫染色法にて確認したところ、視床下部でアストロサイトの数が上昇し、さらに GS と共局在する細胞が多いことがわかった (図5)。さらにこの時の神経細胞の数を、NeuN を用いて検討したところ、肥満マウスで神経細胞が減少している所見が得られた (図6)。そこで現在、GS の発現上昇が神経細胞死を誘導しているのかについて検討している。

図5 視床下部におけるアストロサイトの免疫染色

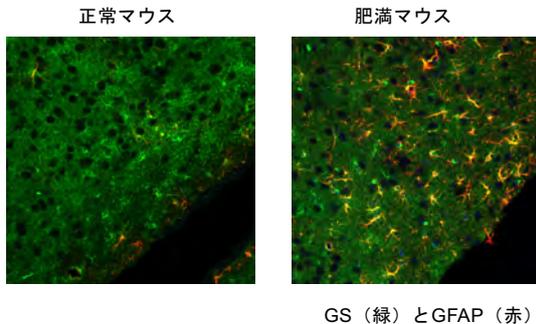
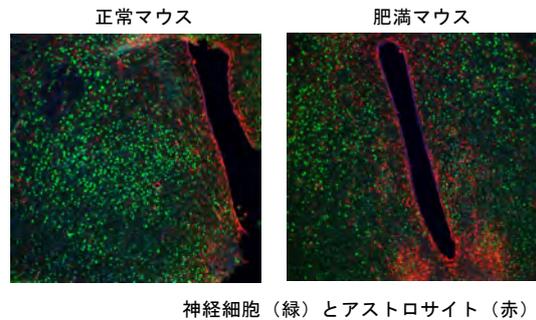


図6 視床下部における神経細胞とアストロサイトの免疫染色



本研究では、大脳皮質では GS の脳内での唯一の結合タンパク質と知られている $GABA_B$ 受容体が、視床下部では GS とカップリングしていないことが明らかとなった。脳内の GS の発現制御機構はまだ明らかになっていないが、研究代表者はいくつかのシグナリングを現在同定している。今後詳しい解析を続け、視床下部のアストロサイトの生理的役割について明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 TERUNUMA Miho	4. 巻 94
2. 論文標題 Diversity of structure and function of GABA _B receptors: a complexity of GABA _B -mediated signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 390 ~ 411
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.94.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Newman EL, Terunuma M, Wang TL, Hewage N, Bicakci MB, Moss SJ, DeBold JF, Miczek KA.	4. 巻 43(6)
2. 論文標題 A Role for Prefrontal Cortical NMDA Receptors in Murine Alcohol-Heightened Aggression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 1224-1234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/npp.2017.253.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Li X, Terunuma M, Deeb TG, Wiseman S, Pangalos MN, Nairn AC, Moss SJ, Slesinger PA.	4. 巻 40(14)
2. 論文標題 Direct Interaction of PP2A Phosphatase with GABAB Receptors Alters Functional Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2808-2816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2654-19.2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Miho Terunuma
2. 発表標題 Neuroprotective role of GABAB receptors against hypoxia.
3. 学会等名 2018 GABAB Receptor Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 照沼美穂
2. 発表標題 脳の健康と食生活
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岸川咲史, 照沼美穂
2. 発表標題 アストロサイトのアンモニア代謝調節機構の解明
3. 学会等名 新潟生化学懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田和泉, 夏目里恵, 阿部学, 照沼美穂, 崎村健司
2. 発表標題 カイン酸型グルタミン酸受容体サブユニットGluK3は細胞種特異的に不安行動を調節する
3. 学会等名 新潟生化学懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sari Kishikawa, Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonium-induced GS degradation undergo proteasome independent pathways
3. 学会等名 WCP2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayaka Komatsu, Miho Terunuma
2. 発表標題 The effect of hyperglycemia on brain cells.
3. 学会等名 International Niigata-Taiwan Universities Collaborative Dental Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miho Terunuma and Stephen J Moss
2. 発表標題 Neuroprotective role of GABAB receptors against hypoxia
3. 学会等名 GABAB receptor conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 照沼 美穂
2. 発表標題 脳のお掃除屋さん：アストロサイトの様々な機能
3. 学会等名 N-Hybrid Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miho Terunuma
2. 発表標題 Identification of novel molecule which involves in glutamine synthetase-mediated ammonium metabolism
3. 学会等名 2017年度 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miho Terunuma
2. 発表標題 Blockade of GABAB receptor endocytosis enhances neuroprotection
3. 学会等名 ISN-ESN Biennial Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 照沼 美穂
2. 発表標題 抑制性神経伝達物質の新たな機能
3. 学会等名 歯科基礎医学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ayaka Komatsu, Sari Kishikawa, Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonia induces Alzheimer ' s disease pathology in astrocytes.
3. 学会等名 ISN-ASN (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayaka Komatsu, Sari Kishikawa, Genki Ito, Izumi Iida and Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonia-mediated induction of Alzheimer's disease pathology in astrocytes.
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miho Terunuma
2. 発表標題 Formation and detoxification of ammonia in the human body.
3. 学会等名 International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井上 誠 (Inoue Makoto) (00303131)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	竹林 浩秀 (Takebayashi Hirohide) (60353439)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	南野 徹 (Minamino Toru) (90328063)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	