

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00889

研究課題名(和文) 視床下部に発現するオリゴデンドロサイト前駆細胞の摂食調節における役割

研究課題名(英文) Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor alpha-mediated signal transduction is involved in controlling feeding behavior by the hypothalamus in male mice

研究代表者

福島 篤 (Fukushima, Atsushi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：10442716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系においてPDGFR を発現する細胞はオリゴデンドロサイト前駆細胞である。オリゴデンドロサイトはニューロンの周りを取り囲んでいるが機能はよくわかっていない。そこで摂食の調節にオリゴデンドロサイト前駆細胞が関与しているのかを検討した。その結果、視床下部のPDGFR を発現している細胞が行動量を低下させ、酸素消費量を低下させることにより体重を増加してことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は現代社会において、克服しなければいけない重要な課題である。脳は様々な行動を司っているが、摂食行動もそのひとつである。従って、摂食行動を支配する脳の様式がわかれば肥満を克服するひとつの方法となり得る。脳の細胞として、ニューロン、グリア、アストロサイトが有名であるがオリゴデンドロサイトの、ましてその前駆細胞の摂食行動における役割はわかっていなかった。その意味でも本研究は意義のあると考えている。

研究成果の概要(英文)：In the central nervous system, platelet-derived growth factor (PDGF) receptor -expressing cells are known to be oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). Many OPCs are present, but their functions in the brain are not well understood. We have been studying whether or not OPCs are involved in the regulation of feeding. AS the results, we revealed that OPCs in the hypothalamus reduced the locomotion, inhibited O2 consumption and in turn decreased body weights.

研究分野：生理学

キーワード：血小板由来成長因子受容体 PDGFR- 視床下部

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血小板由来成長因子 (Platelet-Derived Growth Factor: PDGF) は、ニューロンやグリア細胞などの増殖・分化に関与する因子であり、受容体は、 α と β の2種類が区別される (PDGFR α ・PDGFR β)。末梢において PDGF は、炎症反応が肥満を引き起こし、それによるインスリン抵抗性の病態基盤に関与することが示唆されているが、PDGF および受容体の欠損マウスは胎生致死のため詳細は不明で、特に、中枢神経系を研究した *in vivo* の報告はない。従って、中枢神経系による摂食行動調節メカニズムに PDGF が関与するか等、意義を含めて役割等は全く不明である。一方、肥満は、脳内で炎症、もしくは、それに類似した反応が惹起され、脳内の代謝調節系の恒常性が破綻することもあると考えられているが、詳しいメカニズムはいまだに明らかではない。

研究代表者らは空腹により視床下部で発現が変化する遺伝子を検索していて、PDGFR 遺伝子の発現が変化することを見いだした。蛋白レベルでも同様であり、重要なことに高脂肪食にて惹起される肥満が、PDGFR 発現調節の破綻に関与している可能性が示唆されたことである。中枢神経系で PDGFR を発現する細胞は NG2 にも陽性で、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) であることがわかっている。しかし、OPC が摂食の調節に関与しているのか否かほとんど報告はなかった。そこで研究代表者は、脳内で PDGF もしくは PDGFR 発現細胞が摂食調節系に関与するのか否か興味を持った。

2. 研究の目的

本研究では、中枢性摂食行動調節メカニズムに視床下部の PDGFR を発現するオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の介したシグナル伝達系が関与することを明らかにする。この仮説を、1) 様々な摂食状態でオリゴデンドロサイト前駆細胞の変化を観察する、2) 視床下部のオリゴデンドロサイト前駆細胞の機能のみを変化させて、代謝機能に対する影響を観察する、3) 視床下部のオリゴデンドロサイト前駆細胞をノックダウンして代謝機能に対する影響を観察する、ことから検証する。

3. 研究の方法

C57BL/6J 雄マウス (7-8 週齢) を、通常食もしくは高脂肪食で飼育し、給餌 4~12 週間後に実験を開始する。遺伝子改変マウスは B6.Cg-Pdgfra^{tm1.1}(EGFP/cre/ERT2)Hyma を用いる。遺伝子改変マウスの確認は、マウス尻尾より DNA を抽出し PCR を行う。

(1) 組織化学的検討

絶食の有無で、免疫染色法および *in situ* Hybridization 法にて PDGFR を発現している NG2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞の変化を調べる。また、24 時間絶食してその後再び摂食させ、1~48 時間後のオリゴデンドロサイト前駆細胞の変化を調べる。NG2 抗体、Fos 抗体、リン酸化 CREB 抗体、リン酸化 PDGFR 抗体等を使った二重免疫組織化学も用いる。

(2) 脳室内投与

脳室内にイマチニブ (選択的 PDGFR の阻害剤) を (0.1-10 μ g/ μ l) 浸透圧ポンプを用いて (流量 0.1 μ l/h) 投与する。4 週間後、(1)(4)(5)(6) の解析を行う。

(3) 遺伝子改変マウスを用いた実験

B6.Cg-Pdgfra^{tm1.1}(EGFP/cre/ERT2)Hyma と CMV プロモーター AAV 9 -mCherry-FLEX-dtA (Dr. Naoshige Uchida) を合わせて使用する。遺伝子改変マウスの確認は、マウス尻尾より DNA 抽出し PCR を行う。

(4) インスリン感受性および耐糖能解析

グルコース負荷試験 (GTT)・インスリン負荷試験 (ITT) を行う。GTT は、6 時間絶食したマウスにグルコースを腹腔内に投与する。ITT は、4 時間絶食したマウスにインスリンを腹腔内に投与する。マウス尾静脈より経時的 (0・15・30・60・120 分後) に採血して血糖値の変化を観察する。

(5) 遺伝子・タンパク質解析

リアルタイム PCR 法

動物をイソフルレン麻酔して脳を摘出し、厚さ 1 mm のスライスを作成する。実態顕微鏡下で視床下部を切り出し凍結する。RNA を抽出、cDNA を合成後、まずマイクロアレイにて網羅的に関連遺伝子をスクリーニングし、変化のあった遺伝子をリアルタイム PCR で定量する。

ウエスタンブロット法

動物をイソフルレン麻酔して脳を摘出し、実態顕微鏡下で目的の領域を切り出し、液体窒素で凍結する。タンパク質を抽出、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法を用いて、泳動を行い、メンブレン (PVDF 膜) に転写する。転写後、ブロッキング処理を行い、目的のタンパク質の 1 次抗体、2 次抗体 (HRP 標識抗体) にて反応させ、化学発光法にて検出する。

(6) 酸素消費量解析

小動物用代謝測定システム MK5000RQ (室町機械 (株)) を用いて安静時代謝測定を行い、酸素消費量 (VO₂)、二酸化炭素生成量 (VCO₂)、呼吸商 (RQ) を測定する。VO₂ 値は体重 (kg) で除した値を用い、VO₂[ml/min/kg] 値と RQ 値から消費エネルギー量を算出し、代謝動態を解析する。

4. 研究成果

中枢神経系において PDGFR を発現する細胞は確かにオリゴデンドロサイト前駆細胞であった。研究代表者らが既に明らかにしたが、1-5 週の通常の餌で飼育すると、絶食により PDGFR を発現する細胞は遺伝子レベルでも蛋白質レベルでも増加する一方、1-5 週間、高脂肪食を与えるとこれらの給餌状態による視床下部の PDGFR の発現調節が障害されることが推測された(図1)。次いで半定量的な免疫組織化学で検討を行った。8 週齢 C57BL/6 雄性マウスに 48 時間の絶食を行い、対照群には、42 時間絶食後、6 時間の再給餌を行った。その結果、絶食により、視床下部の PDGFR 発現は、摂食行動調節に関与すると考えられている弓状核において、対照群の約 15 倍、背内側核では約 8 倍、腹内側核では約 6 倍の発現増加を示した(図2)。この結果は、ウエスタンブロットにより定量的に確認した。次に、PDGFR の選択的阻害剤の一つであるイマチニブを用いて PDGFR シグナル系を阻害し、体重の変化を検討した。その結果、中枢投与においてイマチニブは体重増加作用を示した。すなわち PDGFR を介したシグナル系が摂食調節に関与していることが推測された。そして PDGFRa のリガンドの一つである PDGF-AA を浸透圧ポンプを用いて持続的に脳室内に投与し、行動様式を解析した。その結果、摂食量は変化しないが体重増加をきたす事が明らかとなった。そこで PDGF-AA を持続的に脳室内に投与して、nano tag を用いて運動量、および、代謝ケージを用いた酸素消費量などの行動の変化を測定した。その結果、PDGF-AA は、暗期の運動量を有意に減少させ、同時に酸素消費量を有意に減少させることが明らかとなった(図3)。そこで、PDGF-AA のこの作用を仲介する物質を同定する目的で、この暗期の時間に焦点をあて、視床下部の組織を用いて、マイクロアレイによる網羅的な検討を行った。いくつかの遺伝子の変動したが、PDGF-AA は、視床下部において転写制御因子ファミリーの一つである Myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) の発現を減少させることがわかった。一方、熱ショック蛋白質 70 は増加した。蛋白質レベルでは、Fos 蛋白質や熱ショック蛋白質 70 の発現に変化は見られなかったが、MEF2C の

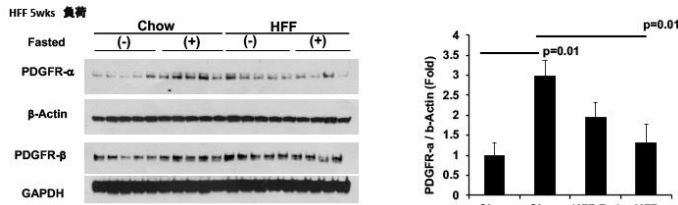


図1 視床下部におけるTCPTP及びPDGFR-α発現の高脂肪食長期負荷による影響

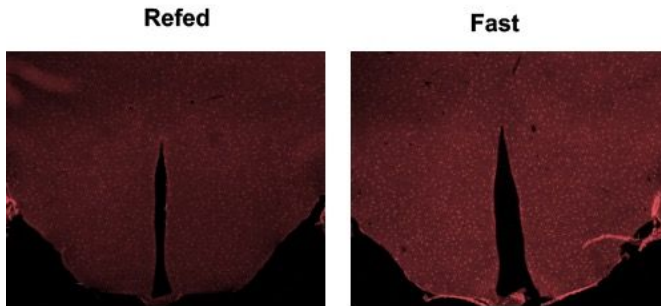


図2 視床下部のPDGFRα発現細胞の絶食による発現変化

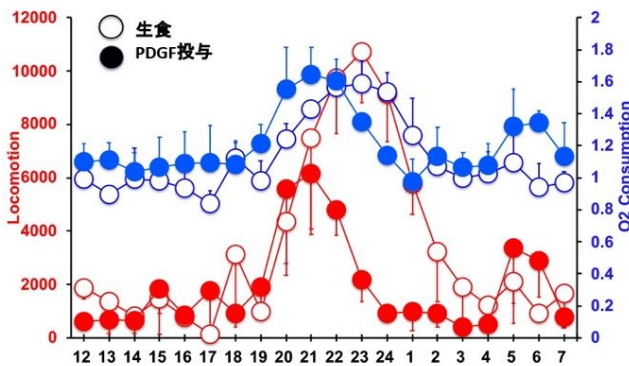


図3 PDGF脳室内投与による運動量と酸素消費量の変化

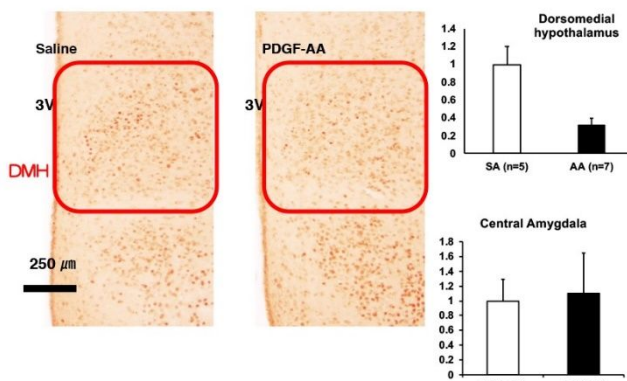


図4 PDGFによる視床下部背内側核のMEF2Cの発現変化

発現は有意に減少していた。MEF2C の変化する部位を同定する目的で免疫組織化学を行った。そして、視床下部背内側核で MEF2C の発現が有意に減少していることが明らかとなった(図4)。以上の結果より、PDGFR を発現しているオリゴデンドロサイト前駆細胞は、視床下部背内側核の MEF2C を介して摂食調節メカニズムに関与している可能性があることがわかった。そして、さらなる検討を詳細に行った。PDGFR のリガンドが本当に PDGF-AA であるのかを確認するために PDGF-AA、PDGF-BB および PDGF-CC をこれまでと同様の方法を用いて脳室内に持続投与した。コ

ントロール群として、生理食塩水を投与した。その結果、すべての PDGF 投与群 (PDGF-AA, BB, CC) において生理食塩水投与群と比較し、暗期の行動量が低下して、暗期の酸素消費量が低下した。特に PDGF-AA および PDGF-CC 投与群において、暗期の行動量低下および暗期の酸素消費量減少が生理食塩水投与群と比較して有意であった。PDGF 受容体は、 $\text{PDGFR}\alpha$ と $\text{PDGFR}\beta$ の 2 種類が存在し (PDGFR \cdot), 既報によると、PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC は、PDGFR に結合し、特に PDGF-AA および PDGF-CC は選択的に PDGFR に結合することが報告されている。以上の結果より、視床下部の PDGFR 発現は、視床下部に存在する摂食調節機構に関与している可能性があることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takafumi Kubota, Atsushi Fukushima, Hiroko Hagiwara, Yoshinori Kamiya, Miyako Furuta, Tomoyuki Miyazaki, Hitomi Fujioka, Sei-Etsu Fujiwara, Toshiya Funabashi and Tatsuo Akema	4. 巻 671
2. 論文標題 Short-term fasting decreases excitatory synaptic inputs to ventromedial tuberoinfundibular dopaminergic neurons and attenuates their activity in male mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 70 ~ 75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.02.017	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Atsushi Fukushima, Miyako Furuta, Hitomi Fujioka, Toshiya Funabashi
2. 発表標題 Effects of Omega-3 fatty acids feeding on high-fat induced impairment of glucose tolerance and behavioral performances.
3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Fukushima, Toshiya Funabashi
2. 発表標題 Intracerebroventricular infusion of PDGF-AA induces weight gain by reducing locomotor activity and decreases MEF2C expression in the dorsomedial hypothalamus.
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Fujioka, Atsushi, Fukushima, Toshiya Funabashi, Tatsuo Akema
2. 発表標題 Involvement of kiss-1 neurons in the suppression of LH surge by LPS and amelioration of this suppression by minocycline pretreatment in ovarian steroid-primed ovariectomized rats
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島篤、明間立雄、船橋利也
2. 発表標題 血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) を介した細胞内シグナルは行動量を変化させることによりマウス視床下部による摂食の調節に関与する
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Fukushima, Hiroko Hagiwara, Tatsuo Akema, Toshiya Funabashi
2. 発表標題 Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor -mediated signal transduction is involved in controlling feeding behavior by the hypothalamus in male mice
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyako Furuta, Atsushi Fukushima, Tatsuo Akema, Tosiya Funabashi
2. 発表標題 The effect of maternal experiences on spatial learning and hippocampal neural plasticity
3. 学会等名 The 48th Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Fukushima, Hiroko Hagiwara, Toshiya Funabashi
2. 発表標題 Expression of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)-immunoreactivity (ir) is suppressed by refeeding after 48-h fasting in the hypothalamus of male mice
3. 学会等名 The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2018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	萩原 裕子 (Hagiwara Hiroko) (90468207)	聖マリアンナ医科大学・医学部・助教 (32713)	