

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00918

研究課題名(和文) 摂食障害における弓状核アストロサイトの機能的解析

研究課題名(英文) Functional analysis of arcuate nucleus astrocytes with feeding disorders

研究代表者

武藤 弘樹 (Mutoh, Hiroki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60443040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：発達不良などを伴う神経疾患患者の遺伝子解析よりCNPY3やCaMK2 が同定され、その疾患モデルマウスを作製し機能解析を行った。

CNPY3欠損は、明らかな発育不良と統合失調症や自閉症などの神経疾患を併発する疾患モデルマウスであった。CNPY3は、脳における発現または機能が全く明らかにされていないため、摂食行動に関わる新規分子として現在さらなる研究を行っている。

CaMK2 変異も発育不良を示し、また神経細胞特異的に発現するため、CaMK2 の患者変異が摂食行動を制御するAgRPやPOMC神経の活動をどのように変化させているのか、電気生理学的な研究を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

摂食障害はメタボリックシンドロームを引き起こすだけでなく、様々な精神疾患を誘発する大きな健康問題である。これまでの研究により、神経細胞やグリア細胞、さらにホルモンなど摂食行動に関わるメカニズムは少しずつ解明されているが、摂食障害・発育不良などを引き起こす詳細な研究、または障害により神経疾患が誘発されるメカニズムは明らかにされていない。

本研究課題において、摂食行動に関与する新規の分子を詳しく機能解析することにより、摂食障害を治療する新たな薬剤開発や治療法につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：CNPY3 and CaMK2 were identified through genetic analysis of patients with neurological diseases and growth failure, and then their functional analysis was performed by generating the mouse models as a feeding disorder.

CNPY3 KO mice have been found to be a mouse model of disease with growth failure and neurological disorders such as schizophrenia and autism. CNPY3 is further investigated as a novel molecule involved in feeding behaviour, because its expression or function in the brain is completely unknown.

CaMK2 mutation mice are also found to be growth failure. As CaMK2 is specifically expressed in neurons, we are conducting electrophysiological studies to understand how patient mutations in CaMK2 alter the activity of AgRP and POMC neurons that control feeding behaviour.

研究分野：神経科学

キーワード：摂食障害 発育不良 神経細胞 アストロサイト CaMK2

1. 研究開始当初の背景

摂食障害は近年増え続けている大きな健康問題である。過食による肥満は糖尿病や高脂血症などのメタボリックシンドロームの原因となり、拒食症は深刻な栄養素不足を招き腎機能障害や心機能の低下などを引き起こす。その他にも摂食障害による体重の増減は、ホルモンや自律神経バランスの乱れ・身体の抵抗力の低下など健康面に大きな影響を及ぼすだけでなく、うつ病などの精神疾患を併発することも報告されている。この様な原因として摂食行動を制御する視床下部を中心とする中枢神経系に異常があるのではないかと考えられている。その摂食行動を司る視床下部は生体の恒常性を維持し外部環境へ適応する統合中枢であり、摂食一次中枢の弓状核ではホルモンなどの多くの身体情報を感知することで摂食調節が行われる。主要神経細胞と知られ内側弓状核に存在する **neuropeptide Y (NPY)** と **agouti-related neuropeptide (AgRP)** の合成・放出をする **NPY/AgRP** ニューロンはホルモンなどにより活動が抑制されると摂食行動を亢進し、一方で外側弓状核に存在する **proopiomelanocortin (POMC)** と **amphetamine-regulated transcript (CART)** の合成・放出をする **POMC** ニューロンの活動が亢進されると摂食行動が抑制される^① (図1)。さらに、最近の研究では遺伝子改変マウスと **DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs)** 技術を組み合わせ視床下部弓状核に存在するアストロサイトだけを人為的に制御すると、過食を促進させたり食欲抑えられることが報告され^②、グリア細胞が摂食調節に重要な役割を持つことも示唆された。遺伝子改変マウス技術の発達やレプチン・グレリンなどホルモンの発見により摂食や代謝調節に関わる神経回路網が細胞レベルで明らかになってきた。しかしながら、摂食障害に至る分子機構はほとんど解明されていない。

そこで本研究において、他の脳部位に比べてもまだ機能的解析が行われていない視床下部の神経細胞とアストロサイトが摂食障害に関与するメカニズムの解明を目指した。

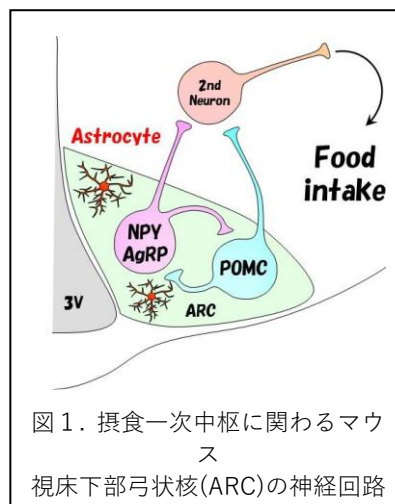


図1. 摂食一次中枢に関わるマウス視床下部弓状核(ARC)の神経回路

2. 研究の目的

視床下部弓状核に存在する **Neuropeptide Y** および **Agouti-related peptide** を生産する神経細胞と **pro-opiomelanocortin** を生産する神経細胞の活動状態に依存して摂食行動が制御されていることが知られている。さらに、これら神経細胞の周囲に存在するアストロサイト活動を遺伝子操作することでも摂食行動がコントロール出来ることが近年の研究により判明し、摂食行動におけるアストロサイトの重要性も示唆されている。しかしながら、摂食障害によるアストロサイトの活動変化などはこれまで報告されていない。

- ① そこで、本研究において視床下部弓状核のアストロサイトの活動をカルシウムイメージングにより解析することで、摂食行動における新たなアストロサイトの役割を解明する。
- ② また、発育不良を示すヒト疾患モデル動物を作製し、視床下部弓状核における神経細胞とアストロサイトの異常や摂食行動に関与する新たな分子の発見を目指す。

3. 研究の方法

- ① 摂食行動に関与するアストロサイトの新たな役割を解明するため、発育不良または肥満を示すモデルマウスを作製し、その時のアストロサイトの活動をカルシウムイメージングで解析する。弓状核は脳低部に存在するため、急性脳スライス標本を用いて実験を行った。
- ② 発育不良などを伴う神経疾患患者の遺伝子解析により、いくつかの発育不良モデルマウスを作製し、これらを用い摂食行動に関与する新規分子の役割を明らかにする。

4. 研究成果

- ① 視床下部弓状核のアストロサイトの活動を調べるため、いくつかのカルシウムセンサーを組み込んだ発現ベクターを作製したが、発現効率が十分に得られなかったため、蛍光指示薬をアストロサイト特異的に取り込ませアストロサイトの活動を観察した。食事制限を行ったマウスなどでアストロサイトの活動を比較したが、急性脳スライス標本による実験のためか、活動の変化を見つけることができなかった。今後、AAVにセンサーを組み込んだセンサーを作製し、さらに *in vivo* 条件下でイメージングすることで摂食行動に関わるアストロサイトの活動変化を直接比較検討する。

② 神経疾患患者の遺伝子解析の中で発育不良も示す遺伝子変異として CNPY3、CaMK2 に変異を導入または欠損させた遺伝子改変マウスを作製し、摂食行動に関与する新たな分子として機能解析を行った。

③ CNPY3 は、免疫機能に重要なタンパク質であることが知られている。しかしながら、脳における発現パターンや機能について全く明らかにされていないため、摂食行動に関わる新規の分子と考えられる。患者同様に CNPY3 を欠損させたマウスは、明らかな発育不良と代謝低下と思われる体温低下を示した(図 2A, B)。さらに統合失調症(図 2C, D) や自閉症(図 2E, F) の神経疾患症状を示し、摂食行動と神経疾患の関係性を調べるモデルマウスであったが、生後 3 週で死亡してしまうため、さらなる実験が困難であった^③。また、免疫染色で使用可能な CNPY3 特異的抗体がないため、現在 CNPY3 に HA タグを付加した遺伝子改変マウスを作製し、視床下部などにおける発現パターンを解析している。

④ CaMK2 β 変異マウスは、発育不良と運動機能障害などを示し、また致死性ではなかった。CaMK2 β は、神経細胞特異的な発現であることが知られているため、AgRP または POMC 神経細胞の活動を変化させることで、摂食行動に関与していると考えられる。現在、CaMK2 β が発現する神経細胞の特定と電気生理学的な機能解析を行っている。

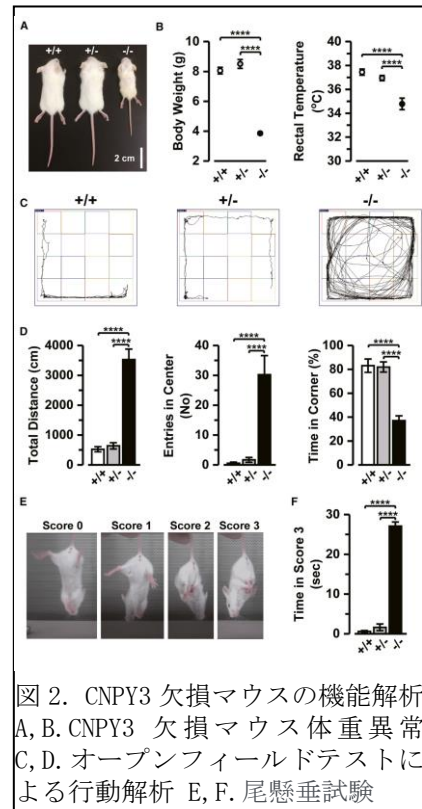


図 2. CNPY3 欠損マウスの機能解析 A, B. CNPY3 欠損マウス体重異常 C, D. オープンフィールドテストによる行動解析 E, F. 尾懸垂試験

〈引用文献〉

- ① Xu et al., Nat Rev Neurosci. 17(5), 282-292, 2016.
- ② Yang et al., Cell Reports. 11, 798 - 809, 2015.
- ③ Mutoh et al., Am J Hum Genet. 102(2), 321 - 329, 2018.

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akita Tenpei, Aoto Kazushi, Kato Mitsuhiro, Shiina Masaaki, Mutoh Hiroki, Nakashima Mitsuko, Kuki Ichiro, Okazaki Shin, Magara Shinichi, Shiihara Takashi, Yokochi Kenji, Aiba Kaori, Tohyama Jun, Ohba Chihiro, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Ogata Kazuhiro, Fukuda Atsuo, Matsumoto Naomichi, Saitsu Hiroto	4. 巻 5
2. 論文標題 De novo variants in CAMK2A and CAMK2B cause neurodevelopmental disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 280 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/acn3.528	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 Mutoh Hiroki, Kato Mitsuhiro, Akita Tenpei, Shibata Takuma, Wakamoto Hiroyuki, Ikeda Hiroko, Kitaura Hiroki, Aoto Kazushi, Nakashima Mitsuko, Wang Tianying, Ohba Chihiro, Miyatake Satoko, Miyake Noriko, Kakita Akiyoshi, Miyake Kensuke, Fukuda Atsuo, Matsumoto Naomichi, Saitsu Hiroto	4. 巻 102
2. 論文標題 Biallelic Variants in CNPY3, Encoding an Endoplasmic Reticulum Chaperone, Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 321 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2018.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoto K, Kato M, Akita T, Nakashima M, Mutoh H, Akasaka N, Tohyama J, Nomura Y, Hoshino K, Ago Y, Tanaka R, Epstein O, Ben-Haim R, Heyman E, Miyazaki T, Belal H, Takabayashi S, Ohba C, Takata A, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H.	4. 巻 12
2. 論文標題 ATP6V0A1 encoding the a1-subunit of the V0 domain of vacuolar H+-ATPases is essential for brain development in humans and mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22389-5	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Kato M, Mutoh H, Akita T, Shibata T, Wakamoto H, Ikeda H, Kitaura H, Aoto K, Nakashima M, Wang T, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Kakita A, Miyake K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H.
2. 発表標題 Biallelic variants in CNPY3 cause West syndrome with hippocampal malrotation and characteristic fast waves.
3. 学会等名 13th European Congress on Epileptology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mutoh Hiroki
2. 発表標題 免疫応答を制御する小胞体シャペロンCNPY3タンパク質異常はWest症候群を引き起こす
3. 学会等名 日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋田天平
2. 発表標題 神経発達障害を引き起こすCaMKII / 新生突然変異体はA型電位依存性K電流を増大させる
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋田天平
2. 発表標題 神経発達障害を引き起こすCaMKII / 新生突然変異体はA型電位依存性K電流を増大させる
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sinha Saran Adya
2. 発表標題 WNK3 kinase regulates inwardly rectifying potassium current in layer V pyramidal neurons of the mouse prefrontal cortex
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武藤弘樹
2. 発表標題 The role of GABAergic interneuron - astrocyte interaction in epileptic seizures
3. 学会等名 第1回山梨大学先端脳科学特別教育プログラム国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sinha Saran Adya
2. 発表標題 Regulation of inwardly rectifying potassium current by WNK3 kinase in layer V pyramidal neurons of the mouse prefrontal cortex
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武藤弘樹
2. 発表標題 The Role of GABAergic Interneuron-Astrocyte Interaction in Epileptic Seizures
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武藤弘樹
2. 発表標題 てんかん原性獲得過程における抑制性神経とグリア細胞の相互作用
3. 学会等名 第64回中部日本生理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mutoh H, Akemann W, Knopfel T.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 CRC Press	5. 総ページ数 511
3. 書名 Optical Probes in Biology	

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関