

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08568

研究課題名(和文) 感染による食欲不振の中枢神経メカニズム

研究課題名(英文) Central circuit mechanisms underlying infection-induced food intake inhibition

研究代表者

中村 佳子 (Nakamura, Yoshiko)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60548543

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)：感染時に起こる摂食抑制の中枢神経機構は不明である。感染時に脳で産生されるプロスタグランジンE2がEP3受容体発現ニューロン(EP3ニューロン)に作用し摂食抑制が生じると考えられる。そこで、感染時の摂食抑制に関わるEP3ニューロンを同定し、その神経活動特性、軸索投射先、神経伝達物質などを解析するとともに、EP3ニューロン特異的に活動操作を行うことで、感染時の摂食抑制を起こす中枢神経回路機構を解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロスタグランジンE2の受容体であるEP3を発現する視床下部の視索前野ニューロンは発熱のスイッチとなることが知られている。しかしながら視索前野のEP3発現ニューロンの神経生理学的特性や、発熱以外の生理反応に関わることは知られていない。本研究によって、視索前野のEP3発現ニューロンが発熱のみならず、その他の感染症状や生理反応にも関わることで生命の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Infection elicits a variety of central symptoms, such as fever, decreased appetite. However, the neural mechanism underlying the infection-induced food intake inhibition is unknown. In this study, I focused on preoptic area neurons that express prostaglandin EP3 receptors, which receive the pyrogenic mediator, prostaglandin E2, produced in response to infections. By using a technique to express reporter genes specifically in EP3 receptor-expressing neurons in the preoptic area, I revealed the brain sites to which EP3 receptor-expressing preoptic neurons project their axons, and also electrophysiologically recorded activities of these neurons. Based on the data obtained from these analyses, I hypothesized that the medullary reticular neurons are involved in the infection-induced suppression of appetite. I am currently testing this hypothesis to further elucidate the central neural circuit mechanisms of infection-induced symptoms.

研究分野：環境生理学

キーワード：プロスタグランジン 体温調節 恒常性

1. 研究開始当初の背景

感染が起こると脳でプロスタグランジン E_2 (PGE_2) が産生され、それが PGE_2 の受容体サブタイプの一つである EP3 を発現する脳内のニューロン (EP3 ニューロン) に作用すると、それが引き金となり発熱や食欲不振などの感染症状が起こると考えられている。発熱の神経回路はこれまで研究代表者らが明らかにしてきたが、感染時の食欲不振 (摂食抑制) の発症メカニズムはまだ研究されていない。私達は、これまでに、視索前野の EP3 ニューロンの投射を調べるためには、投射先の候補となる脳領域に逆行性神経トレーサーを注入し、視索前野の EP3 ニューロンの細胞体が、逆行性トレーサーで標識されるかどうかを解析することで、投射の有無を調べた。この方法で、視索前野の EP3 ニューロンは、熱産生や皮膚血管の交感神経制御を担う視床下部背内側部や延髄縫線核に直接投射することが明らかになった。この知見から、視索前野の EP3 ニューロンを起点とするこれらの下行性神経路が発熱を惹起する重要な役割を果たしていることが示唆された。こうした知見をもとに、視索前野 EP3 ニューロンを起点とした発熱の神経回路メカニズムのモデルも提唱されつつある。また、視索前野 EP3 ニューロンは視床下部背内側部と延髄縫線核に直接投射しているのだが、同一のニューロンが視床下部背内側部と延髄縫線核の両方に投射するのではなく、別々の EP3 ニューロンのサブグループがそれぞれの脳領域に投射し、異なる末梢の器官を制御することが示唆された。このように、視索前野 EP3 ニューロンは多様な末梢器官の制御を通じて様々な生体反応を担うのではないかと考えられるが、発熱以外の生理反応、特に感染時の摂食抑制を担う視索前野 EP3 ニューロンからの神経路は不明である。このニューロン群が担う生理反応とその神経回路メカニズムを網羅的に明らかにするためには、従来のような逆行性神経トレーサーを用いた手法ではなく、視索前野 EP3 ニューロンを起点とした神経路の全貌を可視化し、すべての投射先を明らかにする必要がある。一方で、EP3 受容体は脳の広範な領域に存在するため、EP3 ニューロンを脳部位選択的に可視化あるいは活動制御する技術が必要である。

研究代表者はこれまでに、新規の遺伝子組み換えラットを作製し、その視索前野へウイルスベクターを注入することによって様々な任意のレポーター遺伝子を視索前野の EP3 ニューロン選択的に発現させる技術を開発した。この技術を用いることで、視索前野の EP3 ニューロンの形態を選択的に可視化することが可能となり、軸索投射先を同定する解剖学的解析や、EP3 ニューロンの活動を計測する電気生理学的解析が可能となった。また研究代表者は視床下部由来の摂食調節信号が外側腕傍核で中継され、延髄の網様体ニューロンに入力することで咀嚼、唾液分泌、摂食、代謝の調節が行われることを見出した。感染時の摂食抑制を惹起するために PGE_2 が作用する部位は、視索前野あるいは外側腕傍核のいずれかの EP3 ニューロンであろうと推測される。研究代表者の開発した遺伝子組み換えラットを用いれば、感染時に摂食抑制を引き起こす神経科学的メカニズムが明らかにでき、それによって、感染症治療の臨床に役立つ知見がもたらされると考えた。

2. 研究の目的

感染が起こると発熱とともに、食欲不振 (摂食抑制) が起こることは知られているが、その中枢神経機構は不明である。感染時に脳の血管内皮細胞で産生される PGE_2 が、脳実質に存在し、EP3 受容体を発現するニューロン (EP3 ニューロン) に作用して発熱を惹起するが、それだけではなく、この EP3 受容体が摂食抑制も起こす起点となるのではないかと考えた。そこで、研究代表者が開発した、特定の脳領域の EP3 ニューロン特異的に任意のレポーター遺伝子を発現できる遺伝子組み換えラットを用いて、感染時の摂食抑制に関わる EP3 ニューロン群を同定し、その神経活動特性、軸索投射先、神経伝達物質などを解析するとともに、DREADD 技術などを用いた EP3 ニューロン群の活動操作を行うことで、感染時の摂食抑制を起こす中枢神経回路機構を解明する。

3. 研究の方法

視索前野 EP3 ニューロンの神経特性の解析

(1) 視索前野 EP3 ニューロンの細胞生理学的特性の電気生理解析

研究代表者が開発した遺伝子改変ラットを用いた技術によって、視索前野の EP3 ニューロン特異的に mCherry を発現させて、このニューロン群を標識した。この脳組織スライスを用いて、視索前野の EP3 ニューロンを標的としたスライスパッチクランプ記録を行い、このニューロン群の神経活動や細胞生理学的特性を、単一細胞レベルで解析した。また、脳組織の温度や PGE_2 が視索前野 EP3 ニューロン群に影響を与える可能性が考えられたため、脳組織の温度を変えて、あるいは、 PGE_2 を添加して単一細胞レベルの応答を解析した。このような解析から得られた活動パターンによって、視索前野の EP3 ニューロン群を分類することを引き続き検討している。

(2) 視索前野 EP3 ニューロンの投射先解析

研究代表者が作製した遺伝子改変ラットの視索前野に膜移行性 GFP をコードしたアデノ随伴

ウイルス (AAV) を注入し、視索前野の EP3 ニューロン特異的に膜移行性 GFP を発現させて細胞体から軸索終末に至るまでの細胞構造を可視化した。このようにして視索前野 EP3 ニューロンの投射先を可視化することで、摂食に関係ある領域への投射を探索した。また、摂食に関連がありそうな領域に関しては、軸索終末が含有する神経伝達物質の種類を同定すべく、免疫組織学的手法を用いて検証を続けている。

(3) 視索前野 EP3 ニューロンの活動操作

前述の遺伝子改変ラットを用いて、視索前野 EP3 ニューロン特異的に人工受容体 (DREADD) として知られる hm3Dq や hm4Di をコードした AAV を注入した後、これらの DREADDs を十分に発現させ、動物を手術から回復するために 1 週間以上自由行動下で飼育した。その後、hm3Dq ならびに hm4Di のアゴニストである CNO や Compound 21 (C21) を脳室内に投与することによって、視索前野 EP3 ニューロンの活性化あるいは、抑制を行い、計時的に無麻酔下で動物の行動を観察した。このことによって、視索前野 EP3 ニューロンが発熱以外にどのように動物の行動や、生理現象に関わっているのかを検証すべく、引き続き研究を行っている。

4. 研究成果

発熱に伴う食欲不振の中枢神経回路メカニズムを解明するためには、食欲を起こすメカニズムだけではなく、視索前野の EP3 ニューロンの性質を知る必要がある。視索前野の EP3 ニューロンは発熱を起こす鍵となることは知られているが、EP3 ニューロン群の生理学的、組織学的性質は不明であり、発熱以外の生体反応に関わっているのかも不明であった。そこで、本研究では、まず視索前野の EP3 ニューロンの性質を明らかにする必要があった。

(1) 視索前野の EP3 ニューロンの細胞生理学的特性の電気生理解析

研究代表者が作製した遺伝子組み換えラットを用いて、視索前野の EP3 ニューロン特異的に赤色蛍光タンパク質である mCherry を発現させた。mCherry によって赤色に光る細胞を標的としてパッチクランプ記録を行い、EP3 ニューロンの神経活動を計測した。なお、この神経細胞は非常に脆いため、神経活動を測定する際の温度や、スライス作製時に用いるバッファー溶液の組成なども詳細に調整する必要があり、検討を繰り返した。また、発現させる蛍光タンパク質についても、蛍光を強く発するタンパク質は細胞体を明るく標識するため、標的細胞を同定しやすいのだが、細胞の活きを悪くする傾向にあった。そのため、発現させる蛍光タンパク質に関しても複数の種類の検討を行い、mCherry を選択するに至った。ある程度細胞が耐えうる活動記録条件を揃えることができたが、細胞が脆いため神経活動測定時も計測環境を細かくコントロールしておく必要があり、例数を集めるのに時間がかかっている。そのような中で、視索前野の EP3 ニューロンは環境温度によって反応性の異なる細胞がいるようであるということがわかってきた。そこで環境温度を変えて細胞の神経活動を計測した。その結果、温度変化によって活動が変わらない EP3 ニューロンや、温度上昇に応じて活動が上昇する EP3 ニューロンが見つかった。また、発熱物質である PGE₂ を添加するなど、刺激を与えることによって生じる細胞応答も合わせて指標とし、分類を行っている。本実験によって、視索前野 EP3 ニューロン群は多様な性質を持つ神経細胞群であることがわかってきた。本実験は例数を増やし、より詳細な分類を行うべく、引き続き解析を行っている。

(2) 視索前野 EP3 ニューロンの投射先解析

研究代表者が作製した遺伝子組み換えラットを用いて、視索前野に膜移行性 GFP を発現する AAV を注入し、視索前野の EP3 ニューロン特異的に可視化を行った。GFP に膜移行シグナルをつけることで視索前野 EP3 ニューロンの神経終末まで可視化することに成功した。この実験によって視索前野の EP3 ニューロンの投射先を同定することができた。その中には、摂食に関与すると考えられる脳領域も含まれていた。可視化することができた視索前野 EP3 ニューロンの神経終末の神経伝達物質を調べるために、GABA やグルタミン酸作動性ニューロンの神経終末のマーカータンパク質やその他の神経伝達物質の抗体を用いて脳組織切片を免疫組織染色し、検討を行った。神経終末にどのような神経伝達物質が含まれているのか、視索前野 EP3 ニューロンの軸索終末を 1 つずつ観察し、分類を行った結果、視索前野 EP3 ニューロンの終末には様々な神経伝達物質が含まれており、単一の性質を持つニューロン群ではなく、多様な性質を持つ集団であることがわかってきている。この組織化学解析に関しては複数の投射先について解析を進めるとともに、神経伝達物質の候補をいくつか試し、抗体染色のための条件も検討する必要がある。また、神経終末を一つずつ確認していくという時間のかかる作業であるため、引き続き実験を行っている。

(3) 視索前野 EP3 ニューロンの活動操作

まず、人工受容体の発現効率や、特異性を上げるために人工受容体の種類の検討やウイルスベクターの種類、注入方法などの検討を行った。このことで、特異性の高い状態で安定して人工受容体である hm3Dq や hm4Di を発現させることができるようになった。また、人工受容体のアゴニストについても CNO や C21 など複数の試薬を試して、動物に対する影響がないもので、アゴニストとしての役割も十分に果たす試薬を選定した。

その上で、研究代表者が作製した遺伝子組み換えラットを用いて、視索前野に人工受容体 DEADD である hm3Dq あるいは hm4Di を発現させる AAV を用いて、視索前野の EP3 ニューロン特異的にこの人工受容体を発現させた。AAV 注入後、人工受容体タンパク質を発現させるとともに、動物を手術から回復させるために 1 週間以上、動物を自由行動下で飼育した後、人工受容体のアゴニストである CNO や C21 を注入して動物の行動を計時的に観察した。この実験によって、視索前野の EP3 ニューロンは発熱を惹起するだけでなく、そのほかの様々な生理反応に関係していることがわかった。引き続き、この実験を継続して解析を進めている。

本研究により、視索前野 EP3 ニューロンは単一のニューロン群ではなく多様な性質を持つニューロン群であることがわかってきた。このように多様な性質を持つことで、視索前野の EP3 ニューロンは発熱を惹起するだけでなく、様々な生理反応に関与していることがわかってきた。それぞれの実験はとてもの時間のかかる仕事であるが、引き続き研究を行っていくことで、さらに詳しく視索前野の EP3 ニューロンの役割がわかって来ると考えており、本研究で得られた知見は発熱に付随する食欲抑制のメカニズムの解明につながると考えている。

< 引用文献 >

- Nakamura K, Matsumura K, Kaneko T, Kobayashi S, Katoh H, Negishi M. The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *J. Neurosci.* 22:4600-4610, 2002.
- Nakamura Y, Nakamura K, Matsumura K, Kobayashi S, Kaneko T, Morrison SF. Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 22:3137-46, 2005
- Nakamura Y, Nakamura K, Morrison SF. Different populations of prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons project to two fever-mediating sympathoexcitatory brain regions. *Neuroscience* 161:614-20,2009
- Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301:R1207-R1228, 2011
- Nakamura K, Nakamura Y, Kataoka N. A hypothalamomedullary network for physiological responses to environmental stresses. *Nat. Rev. Neurosci.* 23:35-52, 2022
- Nakamura K, Kaneko T, Yamashita Y, Hasegawa H, Katoh H, Negishi M. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *J. Comp. Neurol.* 421:543-569, 2000.
- Nakamura Y, Yanagawa Y, Morrison SF, Nakamura K. Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication. *Cell Metab.* 25:322-334, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kazuhiro Nakamura, Yoshiko Nakamura, Naoya Kataoka	4. 巻 23
2. 論文標題 A hypothalamomedullary network for physiological responses to environmental stresses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Reviews Neuroscience	6. 最初と最後の頁 35 ~ 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41583-021-00532-x	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 中村佳子	4. 巻 56
2. 論文標題 飢餓を生きぬく脳の仕組み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 自律神経	6. 最初と最後の頁 257-263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 中村和弘、中村佳子	4. 巻 90
2. 論文標題 飢餓から生命を守るための脳の仕組み	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 618-626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kazuhiro Nakamura and Yoshiko Nakamura	4. 巻 40
2. 論文標題 Hunger and satiety signaling: Modeling two hypothalamomedullary pathways for energy homeostasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 1700252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bies.201700252	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 Yoshiko Nakamura & Kazuhiro Nakamura	4. 巻 470
2. 論文標題 Central regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.	6. 最初と最後の頁 823-837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-017-2090-z.	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 Takaki Yahiro, Naoya Kataoka, Yoshiko Nakamura & Kazuhiro Nakamura	4. 巻 7
2. 論文標題 The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 5031, 5041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05327-8	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 中村和弘、中村佳子	4. 巻 23
2. 論文標題 飢餓反応の中樞神経回路メカニズム.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 肥満研究	6. 最初と最後の頁 161,168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中村佳子 中村和弘
2. 発表標題 飢餓反応中樞神経メカニズム
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー、食行動の脳内基盤と分子機構 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshiko Nakamura, Kazuhiro Nakamura
2. 発表標題 Prostaglandin EP3 receptor-expressing neurons in the preoptic area are activated by ambient heat exposure
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiko Nakamura
2. 発表標題 Glutamatergic and GABAergic populations of prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons are heat-responsive
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiko Nakamura and Kazuhiro Nakamura
2. 発表標題 Heat exposure of rats activates prostaglandin EP3 receptor-expressing neurons in the preoptic area
3. 学会等名 PPTR2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村佳子
2. 発表標題 ニューロペプチドYによる熱産生抑制と摂食亢進の神経メカニズム
3. 学会等名 日本自律神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takaki Yahiro, Naoya Kataoka, Yoshiko Nakamura, Kazuhiro Nakamura
2. 発表標題 Lateral parabrachial nucleus mediates thermosensory signaling for behavioral thermoregulation
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八尋貴樹、片岡直也、中村佳子、中村和弘
2. 発表標題 外側腕傍核を介した神経伝達が駆動する体温調節行動
3. 学会等名 温熱生理研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshiko Nakamura, Yuchio Yanagawa, Shaun F. Morrison and Kazuhiro Nakamura
2. 発表標題 Medullary reticular nuclei control metabolism and food intake during starvation
3. 学会等名 国際自律神経学会 (ISAN2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村佳子、中村和弘
2. 発表標題 ニューロペプチドYによる熱産生抑制と摂食亢進の神経メカニズム
3. 学会等名 生命科学系合同年次大会 (ConBio2017) (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八尋貴樹、片岡直也、中村佳子、中村和弘
2. 発表標題 行動性体温調節を駆動する外側腕傍核を介した温度上行路の探索
3. 学会等名 自律神経研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村和弘、八尋貴樹、片岡直也、中村佳子
2. 発表標題 温度知覚と体温調節行動は異なる温度感覚伝達路で駆動される
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中村佳子編（中村佳子：飢えからからだを守る脳の神経回路）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 新曜社	5. 総ページ数 209
3. 書名 生命誌年刊号「和－なごむ・やわらく・あえる・のどまる」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科統合生理学 https://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2/
--

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
---------	---------