

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09529

研究課題名(和文) ストレスに伴う摂食行動異常の分子神経機構

研究課題名(英文) Neural mechanism of stress-related feeding behavior disorders

研究代表者

近藤 真啓 (KONDO, Masahiro)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：50312294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス状況下での摂食異常の神経機構を明らかにするために、ショウジョウバエを用いたストレス実験モデルを確立し解析を行った。野生型バエにおいて、空腹に伴う糖質摂取量の増加は絶食16時間後から観察された。脳内におけるドーパミン作動性ニューロンの興奮が、この糖質の摂取行動を誘導することを明らかにした。また、狭小空間内での飼育により行動抑圧ストレスを負荷するとショウジョウバエの糖質摂取量が増加し、この際に脳内で活動するニューロンのパターンは空腹時と類似していることを見出した。以上の結果は、ストレス依存性に生じる摂食障害に関わる神経機構の理解の一助となることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレス社会と言われる現代において、ストレス依存的に発症する種々の身体的または精神的障害は人々に関心の高いテーマである。なかでも、過食症や拒食症などの摂食障害は発症頻度が高く、症状に苦しむ患者は日本に留まらず世界各国に多数存在する。また、昨今のコロナ禍による行動規制(ストレス)により、身体的不調を訴える人が急増した。ストレス依存性に生じる摂食障害の神経機構の解明は、創薬のための基礎情報にもなり、医療の進歩にも貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the neural mechanism of abnormal feeding under stress conditions, we established an experimental stress model using *Drosophila*. In wild-type flies, an increase in carbohydrate intake associated with hunger was observed from 16 hours after fasting. We found that the carbohydrate intake is mediated by a subset of dopaminergic neurons in the brain. It was also revealed that the carbohydrate intake of flies increases when the flies are subjected to behavioral suppression stress by rearing in a confined space, and the pattern of neural activities in the brain in the process is similar to that during fasting. The results are expected to contribute to our understanding of the neural mechanisms involved in stress-dependent feeding disorders.

研究分野：神経生物学

キーワード：ストレス 神経回路 糖質摂取

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

適切な食物の選択と摂食量の調節は生命維持の根幹である。哺乳類では、視床下部に存在するニューロン群が摂食行動の調節を行っており、そこで産生される種々の生理活性物質が同定され、摂食を制御する神経システムが明らかにされつつあった。これと同時期に、ショウジョウバエの摂食行動を制御する生理活性物質の探索が始まり、脂質動員ホルモン(AKH)、ニューロペプチドF、インスリン様ペプチド、ドパミン、オクトパミン等が候補分子として注目されていた。また、ハエの味覚情報の中継部位である食道下神経節において、糖類と水の消費を調整するニューロン群が同定され、摂食行動に関わる神経回路の一端が明らかになり始めていた。

種々のストレスが継続的に負荷されると、正常な摂食制御システムが破綻し、神経性食思不振症などの摂食障害が発症する。このほかにも、睡眠障害、疲労・倦怠感、さらに各種の感覚異常などのいわゆる鬱症状が現れる。sexual deprivationの状態にある雄ハエの脳内でニューロペプチドFの産生が促進し、アルコール摂取量が増加すること、また、ハエに振動刺激を与え続けると鬱様症状(運動性低下)が現れ、その発症にはセロトニンが関与することなど、ストレス依存的な行動異常発症の解明に向け、ショウジョウバエを用いて様々な実験モデルが考案され研究が進められていたが、ストレス負荷により生じる摂食障害に関する研究はいまだ行われていなかった。

2. 研究の目的

ショウジョウバエをモデル動物として、摂食行動(糖質の摂取量)の定量法およびストレス負荷実験モデルを確立し、糖質摂取の制御に関与する神経システムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 糖質摂取量の定量

ブリリアントブルーFCF [BB-FCF] で着色した 20mM スクロース溶液をマイクロプレートに準備し、25~35 匹のハエを放ち 1 時間摂食させた後、実体顕微鏡下において腹部の着色を指標に個体ごとの摂食量を 4 段階に分類し、これをもとに Feeding Index (FI) を算出した。

$$FI = ([\# \text{ of } (B++)] + 2/3 \times [\# \text{ of } (B+)] + 1/3 \times [\# \text{ of } (B+/-)]) / \# \text{ of total}$$

B++ : 着色が腹部の 2/3 以上 B+ : 着色が腹部の 1/3~2/3 B+/- : 着色が腹部の 1/3 以下

ハエの断頭を行い、腹部を回収してエタノール/PBS 混合液内でホモジナイズし、分光光度計を用いて BB-FCF 色素の量を計測した。

(2) 絶食(飢餓)条件下における糖質摂取量の経時的変化

温度 25、湿度 60%の環境において、絶食・絶水または絶食させた際にみられる野生型ハエの糖質摂取量の経時的変化を、(1)で示した手法を用いて解析した。

(3) 糖質摂取を誘導するニューロンの探索

UAS-GAL4 (または Split-GAL4) 遺伝子発現システムを利用し、脳内における一部のニューロンにおいて温熱感受性受容体 dTrpA1 または CD8:GFP を異所性発現させたトランスジェニックフライを作成した。そして、温熱刺激(30)を 15 分行い、ニューロンを人工的に活性化した際に生じる糖質摂取量を解析した。

(4) ストレス負荷モデルの作成

光、電気、熱刺激または振動などの物理化学的ストレスの負荷、あるいは行動抑制ストレス(高密度環境下での飼育)を1日または3日間継続した後、各ストレス群における糖質摂取量の変化を解析した。

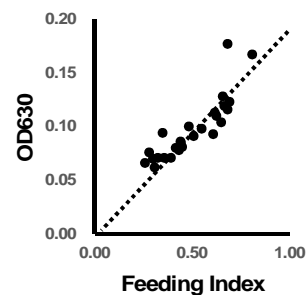
(5) 飢餓または各種ストレス条件下で活動する脳内ニューロン群の免疫組織化学的解析

飢餓による空腹状態のショウジョウバエまたは行動抑制ストレスを負荷したショウジョウバエの脳を単離し、4%PFAで固定後、pERK、pp38に対する特異抗体を用いて、蛍光免疫組織化学を行った。そして、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、pERK陽性細胞の脳内分布を解析した。

4. 研究成果

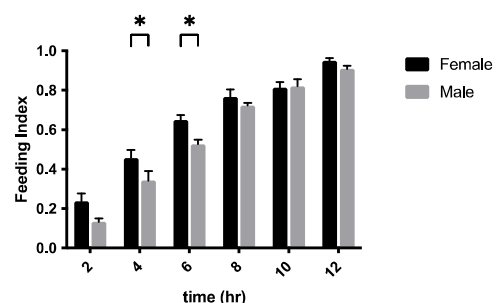
(1) 糖質摂取量の定量法の確立

ショウジョウバエの糖質摂取量を定量化するために、始めに野生バエを用いた予備実験を行った。BB-FCFで着色したスクロース溶液を摂取させた後、腹部の色調をもとに4段階に分類し、これをもとにFeeding Index (FI)を算出した。その後、ハエの腹部をホモジナイズし、分光光度計を用いて色素量を定量した。FIおよび吸光度(OD値)は強い正の相関を示した($R^2 = 0.65$)ことから、以降の実験はFIを糖質摂取量の指標とした。



(2) 飢餓条件下による糖質摂取量の経時変化

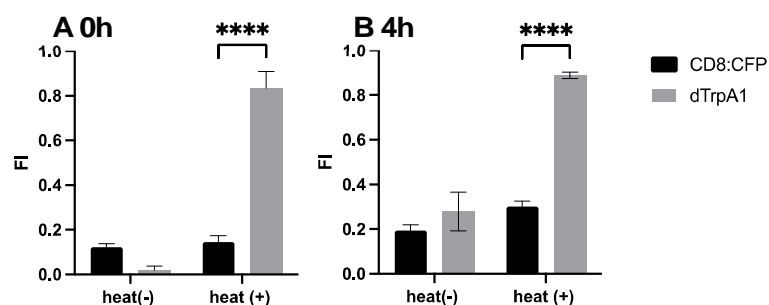
野生型ハエにおいて、絶食・絶水開始後、時間とともにFIが上昇し、およそ8時間後にピークとなった。一方、絶食条件下では16時間後よりFIが上昇し始め、24時間後にピークとなった。また、絶食開始4および6時間後のFIは、雄と比較して雌で有意により高値を示した。



(3) 糖質摂取を誘導するニューロンの探索

汎ドパミン作動性ニューロンドライバー (ple-Gal4)を用いてdTrpA1を異所性に発現させたトランスジェニック動物に温熱刺激を与えてドパミン作動性ニューロンを人工的に興奮させると、非絶食条件下でも野生型ハエの空腹群と同等のFIを示した。

そこで、糖質摂取に関与する脳内ドパミン作動性ニューロンを特定するため、25種類のsplit-GAL4ラインを用いてドパミン作動性ニューロンの異なるサブグループでdTrpA1を発現させたトランスジ

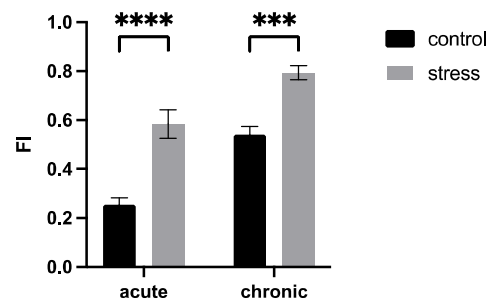


ェニック動物を作成し、糖質摂取量を定量した。25ラインのうち7ラインで、非刺激群と比較

して温熱刺激群で有意に FI 値が上昇した。各ラインにおいて活性化されるドーパミン作動性ニューロンの組み合わせの比較解析から、PAM または PPL1 のサブセット、特に、PAM- 1、PAM- 1、PPL1- 1 ニューロン群の興奮が糖の摂食誘導に与与することが示唆された。

(4) ストレス負荷モデルの作成

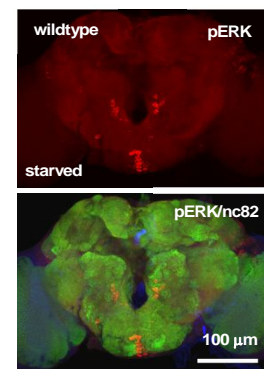
物理・化学的刺激、または行動抑制ストレス環境下でハエを飼育した際にみられる糖質摂取量の変化について解析を行った。その結果、狭空間で1日(16時間)または3日間(16時間×3)飼育し、行動抑圧ストレスを負荷した群で、対照群と比較して糖質摂食量が有意に上昇した。



(5) 空腹または行動抑制ストレス条件下で活動するニューロン

絶食16時間後(空腹状態)のショウジョウバエから脳を摘出し、活動状態にあるニューロンを免疫組織化学的に解析した。食道下神経節およびその周辺領域で pERK 陽性細胞が散在性に観察された。

ドーパミン作動性ニューロンを人工的に活性化したトランスジェニック動物および狭空間で3日間飼育したショウジョウバエにおいても類似のパターンで pERK 陽性細胞が散在性に観察された。一方、ストレス負荷に伴う脳内 p38 の活性化 (pp38 免疫活性) についても検討したが、有意な変化は観察されなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kondo M, Shibuta I	4. 巻 62
2. 論文標題 Extraceellular Signal-Regulated Kinases (ERK) 1 and 2 as a Key Molecule in Pain Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 147-149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.19-0470	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 Suzuki T, Kondo M, Shibuta I, Nagashima H, Sugano N, Sato S, Iwata K.	4. 巻 60
2. 論文標題 Medullary neural circuit regeneration after trigeminal nerve transection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Oral Sci.	6. 最初と最後の頁 500-506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0457	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤真啓
2. 発表標題 ストレスに伴う摂食行動異常の分子神経基盤—ドパミン作動性ニューロンの役割
3. 学会等名 第12回分子高次機能研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠井政行、近藤真啓
2. 発表標題 ショウジョウバエの糖質摂食調節に関わるニューロン群の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤真啓
2. 発表標題 ストレスに伴う摂食行動異常の分子神経基盤—ショウジョウバエをモデル動物として
3. 学会等名 第11回分子高次機能研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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