

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19591082
 研究課題名（和文） 視床下部ヒスタミンH1受容体を介する生体リズムとエネルギー代謝調節のクロストーク
 研究課題名（英文） Neuronal histamine and H1 receptors regulate biological rhythm and energy metabolism
 研究代表者
 吉松 博信（YOSHIMATSU HIRONOBU）
 大分大学・医学部・教授
 研究者番号：00166993

研究成果の概要：メタボリックシンドロームや肥満症の発症メカニズムと治療法を明らかにするために、神経ヒスタミンH1受容体を介する生体リズム調節とエネルギー代謝調節のクロストーク機構を解析した。その結果、神経ヒスタミンおよびH1受容体はオレキシンやエストロゲンなど他の神経性・液性情報によって駆動され、生物時計が存在する視交叉上核への神経連絡あるいは前頭前野機能などと連動することで食行動や情動行動のリズム調節に関与していることが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,900,000	870,000	3,770,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：内分泌学

キーワード：内分泌学

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームや肥満症の発症要因として、食生活やライフスタイルのリズム異常が注目されている。事実、現代社会において朝食の欠食や間食など食行動のリズムは大きく障害されている。また夜型の生活様式などもリズム異常を助長している。リズム異常によって生じるエネルギー収支のアンバランスと、それにもとづく脂肪蓄積が代謝異常を引き起こす主要因と考えられるが、その生物学的メカニズムはまだ不明である。特に本調節系における視床下部の役割に

ついては明らかにすべき研究課題が多い。我々はこれまで視床下部に存在する神経ヒスタミンによる肥満やエネルギー代謝調節機構について研究してきた。その結果、神経ヒスタミンは食行動抑制および末梢エネルギー消費亢進作用を介して抗肥満作用を発揮することを明らかにした。さらに、過剰なエネルギー摂取とは独立して肥満を増悪させる要因があり、それには神経ヒスタミンおよびそのH1受容体で調節される生体リズムと末梢エネルギー消費機構の関連が重要であることも判明した。すなわち神経ヒスタミ

ンは食行動調節、生体リズム調節、末梢エネルギー代謝の中核性調節に関与しており、この協調的調節系の破綻が肥満症やメタボリックシンドロームの発症に深く関わっていることが示唆される。

2. 研究の目的

(1) 神経ヒスタミンは生体リズム調節と食行動を含むエネルギー代謝調節の両者に関与している。しかし神経ヒスタミンによる両調節系のクロストークが脳でどのように行われるかについては、まだ不明な点が多い。本研究はこれらのメカニズムの解明を目的としている。

(2) 本研究はメタボリックシンドロームなど、ライフスタイルの変容がその予防や治療に重要である生活習慣病に焦点をあて、その病態生理をリズム調節とエネルギー代謝調節の連携から解析するというものである。最終的にはライフスタイルのリズムと生活習慣病の関係を明らかにし、その成果を疾患の治療や予防へと臨床応用することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) オレキシン、ニューロメジンU (NMU) による神経ヒスタミンの制御

動物はWistarラット (male, 10wks, 300g)、c57b16 マウス および同系統の orexin/ataxin-3 マウス (male, 12wks, 20-25g) を用いた。照明条件を朝7時から19時とする 12 時間明暗周期および室温 21±1 度、湿度 55±5% の恒温恒湿防音環境下で実験を行った。手術としてラット第3脳室またはマウス側脳室内へ慢性に23Gまたは29Gのステンレス製カテーテルを留置した。実験は術後7日後術前の体重の回復を待って行った。すべての実験は National Insutitute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals を元に作成した Oita Medical University Guideline に沿って行われた (以下各実験とも同様)。

前処置薬として MAO-B 阻害剤である pargylin hydrochloride、実験試薬としてオレキシンA、オレキシンB、NMU を用いた。実験進行はオレキシンの視床下部ヒスタミン代謝回転への修飾作用を検討するために、pargylin (0.33mmol/kg) を腹腔内投与し、その 10 分後に PBS またはオレキシンA (0.1nmol/ μ l, 10 μ l)、オレキシンB (0.1nmol/ μ l, 10 μ l) を、それぞれラット第3脳室に投与した (n=5 for each)。また NMU (1nmol/ μ l, 1 μ l) をマウス側脳室に投与した (n=5)。試薬投与 60 分後にラットまたはマウス視床下部を取り出し、ヒスタミン (HA) およびヒスタミン代謝産物である tele-methyl histamine (tMH) 含有量を測定

した。また、飢餓時のオレキシンと HA の関係を検討するために、オレキシン神経変性モデルである orexin/ataxin-3 マウスおよび同系の c57b16 マウスを用いて、自由給餌群、24 時間の絶食負荷群に分け視床下部 HA および tMH 含有量を測定した (n=5 for each)。アミン類の測定は HPLC である ECD300 を用いて行った。結果の有意差検定は分散分析を用い、群間の有意差検定には Fisher の PLSD による多重比較法を用いた。

(2) 視交叉上核 (SCN) 神経活動および BMAL1 遺伝子に対する神経ヒスタミンの作用

動物は雄性 10-48 週齢の c57b16 マウスおよび同系統のヒスタミン H1 受容体欠損マウスを用いた。飼育条件は (1) と同様である。手術としてマウス側脳室内へ慢性に 29G のステンレス製カテーテルを留置した。実験は術後7日後術前の体重の回復を待って行った。実験試薬としてヒスタミン (1 μ mol/ μ l, 1 μ l) をマウス側脳室へ投与した。視床下部諸核の神経活動について、ヘパリン加 PBS および 4%ホルマリンにて還流固定した後、マウス脳を c-fos 抗体を用いて染色し評価した。また H1 受容体欠損 (H1KO) マウスにおける視床下部内 BMAL-1 の発現変化を western blotting 法にて解析した。結果の有意差検定は分散分析を用い、群間の有意差検定には Fisher の PLSD による多重比較法を用い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

(3) 摂食行動およびリズム調節におけるエストロゲンと神経ヒスタミンの機能関連

① エストロゲンの摂食抑制作用と神経ヒスタミン

動物は Wistar ラット、H1KO マウスおよびその野生型マウスを用いた。飼育条件、脳室内カテーテル留置術は前述したものと同様である。

24 時間食事制限ラットを PBS 前処置 (ip) + 17Estradiol (E2) 投与 (25 μ g/kg, ip) 群、ヒスタミン合成酵素阻害薬である α -fluoromethylhistidine (FMH) 投与 (50mg/kg, ip) + E2 群、FMH + DSMO 対照投与群、CRH 阻害薬である α -helical CRH 前処置 (10 μ g, icv) + E2 群、 α -helical CRH (α -hCRH) + DSMO 群、PBS + DSMO 群の 6 群に分類した (n=6 for each)。前処置は 2 時間前に行い、実験試薬処置後 30 分から 1 時間 30 分における摂食量を測定した。

② 卵巣摘出マウスの摂食行動、リズム異常、体重変化と神経ヒスタミン

H1KO マウスおよび野生型マウスに卵巣摘出術と sham operation を施し、4 群 (n=6 for each) に分類した。21 日間にわたり摂食量、摂食リズム、体重などを観察記録した後、7 日間 E2 (2.5 μ g/kg) または DSMO の投与を行い卵巣摘出後のエストロゲン補充の効果を解析した。

③神経ヒスタミンおよびCRHに対するエストロゲンおよび卵巣摘出の効果

E2 投与および卵巣摘出の神経ヒスタミン代謝回転に与える効果を pargyline 前処置後の tMH 測定によって検討した。また同反応に対する α -hCRH 前処置の影響を調べることで、CRH の関与について解析した。E2 投与による視床下部 CRH 含有量の変化も解析した。対照群には PBS+DSMO 群を用いた (n=6 for each)。

④ヒスタミン神経細胞体におけるエストロゲン受容体の発現
ヒスタミン神経細胞体が存在する結節乳頭核 (TMN) において抗 HDC 抗体、抗エストロゲン受容体 α 抗体、抗エストロゲン受容体 β 抗体を用いた 2 重染色を行い、ヒスタミン神経細胞体におけるエストロゲン受容体の局在について解析した。

(4)リズム調節における前頭前野・扁桃体機能と神経ヒスタミン

①前頭前野破壊による神経ヒスタミン変化と生体リズム異常

実験動物および飼育条件は同様である。試薬は ibotenic acid を用いた。前頭前野の辺縁下皮質 (infralimbic cortex, IL) の破壊は、脳定位固定下で bregma より前方 3.0mm、側方 0.6mm、大脳表面より腹側 4.0mm の位置に両側性に 23G カテーテルを慢性留置し、29G 注入用カテーテルを介して ibotenic acid (1 μ g/ μ l, 1 μ l) を微量投与して作成した。また sham operation として同容量の PBS を投与した群を設けた (対照群)。視床下部ヒスタミン含有量の解析は HPLC を用いた。測定指標として体重、摂食量、飲水量、体温、一般活動量を解析した。群間の差の検定は分散分析を用い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

②神経ヒスタミンによる前頭前野・扁桃体の情動行動発現とリズム

実験動物その他は同様である。試薬は、ヒスタミン代謝回転測定のために pargylin hydrochloride を、人工脳脊髄液 (aCSF) としてアートセレブ (大塚製薬) を、実験試薬としてヒスタミンを用いた。IL へのカテーテル慢性留置は前述したものと同様の操作を一側性に行った。扁桃体に対しては bregma より後方 2.4mm、側方 4.2mm、大脳表面より腹側 7.4mm の位置に同様の処置を行った。術後 1 週間の回復期において IL または扁桃体に注入用カテーテルよりヒスタミン 30 μ g/1 μ l/rat を微量投与した。実験終了後に脳切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色法を用いて IL および扁桃体への注入を確認した。行動変化については、明期直後および暗期直前に、無麻酔無拘束下でヒスタミンを微量投与し、その前後の食行動および情動行動変化を解析した。一般的指標としては摂食量、飲水量、一般活動量の測定を行った。群間の差の検定は分散分析を用い、 $p < 0.05$ を有

意と判定した。

4. 研究成果

(1)オレキシン、NMU による神経ヒスタミンの制御

①オレキシンによる神経ヒスタミン代謝回転亢進作用

ラット第 3 脳室へのオレキシン A およびオレキシン B の投与は神経ヒスタミンの代謝回転 (tMH 含有量) を有意に増加させた ($p < 0.05$ for each)。ラット後部視床下部の結節乳頭核におけるオレキシン 2 受容体 (OX2-R) の存在はすでに予備実験で明らかにしており、オレキシンによる神経ヒスタミンの活性化は同受容体を介して発揮されると考えられる。睡眠覚醒調節に関与しているオレキシンが神経ヒスタミンに直接影響することで、睡眠覚醒機能とエネルギー代謝および生体リズム調節機能が結びついていることが考えられる。

②飢餓・エネルギー欠乏状態におけるオレキシン神経系と神経ヒスタミンの機能連関

自由給餌下において、オレキシン神経変性マウス (orexin/ataxin-3 マウス) では、視床下部 tMH 含有量が対照群に比べ有意に低下していた ($p < 0.05$) (図 1)。24 時間の絶食負荷によって対照群の tMH 含有量が著明に増加した ($p < 0.01$) が、オレキシン神経変性マウス (orexin/ataxin-3 マウス) では、この tMH 増加反応が有意に減弱していた ($p < 0.01$) (図 1)。

低血糖などエネルギー欠乏状態はオレキシン神経系や神経ヒスタミンを活性化する。今回の結果から、絶食によるエネルギー欠乏情報はまずオレキシン神経系に伝わって同神経活動を亢進させ、それがオレキシン受容体を介して神経ヒスタミンに伝達され、同神経系を活性化することが考えられる。空腹状態と不眠、満腹状態での眠気などエネルギー代謝動態と睡眠覚醒・リズム調節系の連携を考える上で重要な所見であると考えられる。

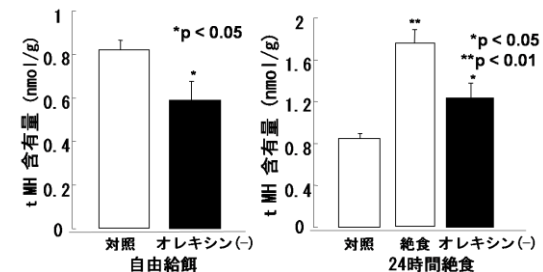


図 1. オレキシン神経変性マウスにおける神経ヒスタミン代謝回転

③NMU による神経ヒスタミンの制御

マウス側脳室への NMU の投与により神経ヒスタミンの代謝回転 (tMH 含有量) は増加傾向

を示した。

(2) 神経ヒスタミンによる SCN 神経活動調節および時計遺伝子 BMAL1 への作用

ヒスタミンの脳室内投与により SCN の c-fos 発現が有意に増加した ($p < 0.05$)。H1KO マウスにおいては、ヒスタミン投与による SCN の c-fos 発現増加反応が対照マウスと比較して有意に減弱していた。すなわち神経ヒスタミンは H1 受容体を介して SCN の神経活動を促進的に調節していることが示唆される。SCN を中心とする生体リズム調節機構と神経ヒスタミンによるエネルギー代謝調節機構との間に機能的連関が存在する可能性が示唆された。

また H1KO マウスの視床下部内 BMAL-1 の発現は明期 (10:00) および暗期 (22:00) ともに対照群に比べ著変を認めなかった。ただし、BMAL-1 発現の暗期と明期の変動比 (暗期/明期比) は対照群に比べ H1KO マウスで有意に低下していた ($p < 0.05$) (図 2)。

神経ヒスタミンは BMAL-1 の発現そのものには直接影響しないが、その明暗期での変動パターンを修飾していることが考えられ、それを介して SCN のリズム形成に関与している可能性が示唆される。

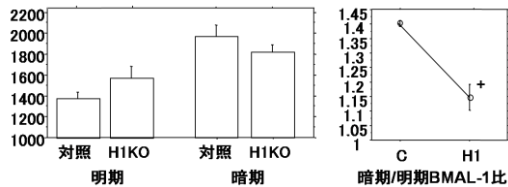


図 2. H1KO マウスにおける BMAL-1 の変化

(3) 摂食行動およびリズム調節におけるエストロゲンと神経ヒスタミンの機能連関

① エストロゲンの摂食抑制作用と神経ヒスタミン (図 3)

E2 投与で摂食行動が抑制された ($p < 0.05$)。E2 による摂食抑制作用は FMH 投与による神経ヒスタミンの枯渇化によって減弱された ($p < 0.05$)。同様に、E2 の摂食抑制作用は α -helical CRH の前処置によって減弱された ($p < 0.05$)。FMH や α -hCRH 自体の投与は摂食行動に影響しなかった。

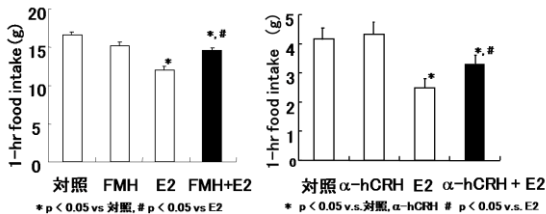


図 3. 神経ヒスタミンを介するエストロゲンの摂食抑制作用

② 卵巣摘出マウスの摂食行動、リズム異常、体重変化と神経ヒスタミン

野生型マウスは卵巣摘出により摂食量および体重が増加した ($p < 0.05$ for each) (図 4)。野生型卵巣摘出マウスでは摂食行動概日リズムの障害が認められた ($p < 0.05$) (図 5)。野生型卵巣摘出マウスの摂食量増加と体重減少はエストロゲンの補充で改善された (図 4)。H1 受容体欠損マウスでも卵巣摘出で摂食量と体重の増加、摂食行動のリズム異常が観察された ($p < 0.05$ for each) (図 4)。しかし、H1 受容体欠損卵巣摘出マウスの摂食量と体重の増加反応はエストロゲンの補充で改善されなかった (図 4)。

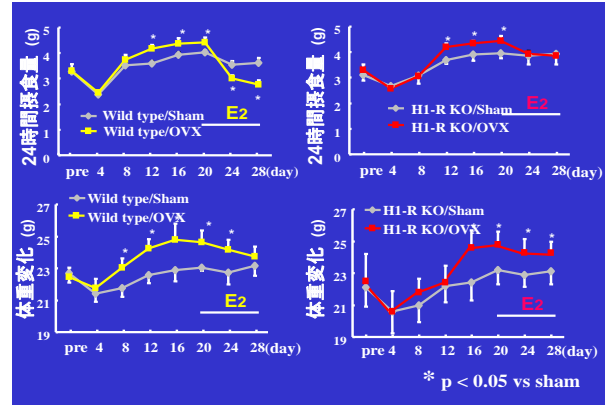


図 4. 卵巣摘出マウスの摂食量・体重変化、エストロゲン補充と神経ヒスタミン

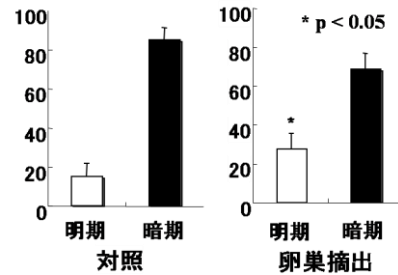


図 5. 卵巣摘出マウスの食行動リズム異常

③ 神経ヒスタミンおよび CRH に対するエストロゲンおよび卵巣摘出の効果

E2 投与で神経ヒスタミンの代謝回転が増加した ($p < 0.05$) (図 6)。同反応は α -hCRH の前処置で減弱された ($p < 0.05$) (図 7)。神経ヒスタミンの代謝回転は卵巣摘出マウスでは低下していた ($p < 0.05$) (図 6)。E2 投与は視床下部の CRH 含有量を増加させた (図 8)。

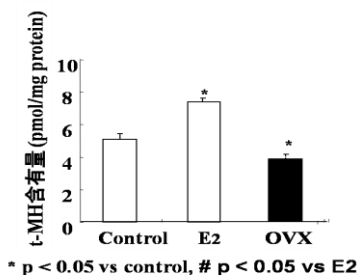


図 6. エストロゲン投与、卵巣摘出と神経ヒスタミン

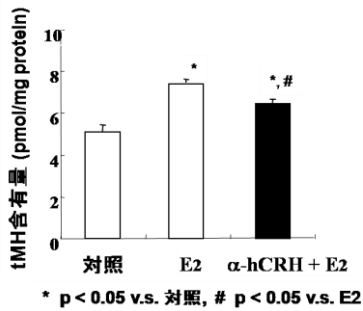


図 7. CRH を介するエストロゲンのヒスタミン活性化作用

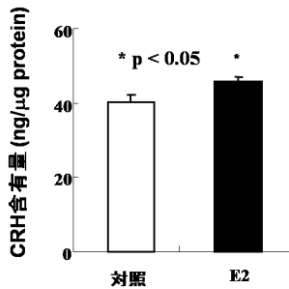


図 8. エストロゲン投与による視床下部 CRH の変化

④ヒスタミン神経細胞体におけるエストロゲン受容体の発現

TMN のヒスタミン神経細胞体においてエストロゲン受容体 α が同定された (図 9)。エストロゲン受容体 β の共存は認められなかった。エストロゲンはエストロゲン受容体 α を介して直接的に、あるいは CRH を介して間接的に神経ヒスタミンを活性化し食行動を抑制することが明らかになった。逆に卵巣摘出によりエストロゲンが欠乏すると神経ヒスタミンの代謝回転は低下し、過食と体重の増加が促進される。卵巣摘出動物では食行動のリズム異常も出現しており、このリズム異常の発現には神経ヒスタミンの機能低下が関与していることが示唆される。また卵巣摘出後のエストロゲン補充療法は過食と体重の修正に有効であるが、この現象にも神経ヒスタミンおよび H1 受容体が必要であることが判明した。エストロゲンについては、ヒトにおいても閉経後の婦人の肥満発症、生活習慣病発症への関与が大きく、これに神経ヒスタミンが関わることを明らかにした今回の研究成果は臨床的にも重要な所見であると考えられる。

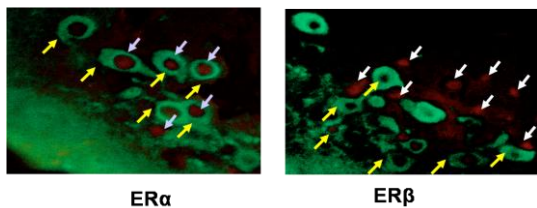


図 9. ヒスタミン神経細胞体のエストロゲン受容体発現
黄色矢印; ヒスタミン神経細胞、白矢印; エストロゲン受容体

(5) リズム調節における前頭前野・扁桃体機能と神経ヒスタミン

①前頭前野破壊による神経ヒスタミン変化と生体リズム異常

IL 破壊群では脳破壊後 3 週から体重が増加傾向となり、4 週で有意な体重増加を認めた。IL 破壊群では、摂食量は対照群との間に有意な差を認めなかったが、一般活動量の有意な低下が認められた。また IL 破壊群では明期摂食量および活動量の有意な増加が認められ、それらの概日リズムが障害されていた (図 10)。また IL 破壊群では暗期直前 (18:00) の直腸温に有意な低下が認められ、体温のリズム異常があることも示唆された (図 10)。また IL 破壊は、視床下部のヒスタミン含有量を有意に低下させた ($p < 0.05$)。

IL は認知機能、情動行動、ストレス情報処理に関与しており視床下部機能との連携が強い高次中枢である。今回の研究により、IL 破壊は神経ヒスタミン含有量を有意に低下させることが観察された。また活動性の低下、食行動、活動性、体温の概日リズム異常も認められた。体重、食行動、体温、睡眠・覚醒、生体リズムなど調節系はいずれも視床下部機能に属しており、特に神経ヒスタミンによる制御を受けている。したがって IL 破壊によって生じるそれらの調節系の破綻には視床下部の機能異常、すなわち同部破壊によって生じる神経ヒスタミンの機能低下が関与していることが示唆される。

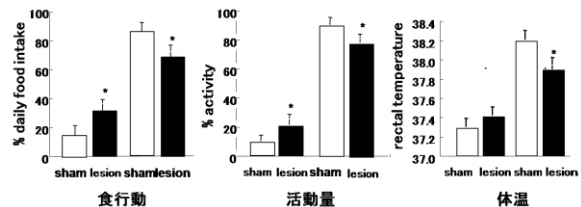


図 10. Infralimbic cortex 破壊によるリズム異常

* $p < 0.05$

②神経ヒスタミンによる前頭前野・扁桃体の情動行動発現とリズム

明期直後のラット IL へのヒスタミン微量投与は投与後 3 時間、12 時間の明期においてラット食行動を有意に抑制したが ($p < 0.05$ for each)、暗期 12 時間および 24 時間摂食量には影響しなかった。暗期直前のラット IL へのヒスタミン微量投与では明期、暗期、24 時間ともにラット食行動に有意な変化は認められなかった。明期直後のラット IL へのヒスタミン微量投与はすくみ行動を有意に増加した。暗期直前のラット IL へのヒスタミン微量投与はラット探索行動および嘔みつき行動を有意に増加した ($p < 0.05$ for each)。明期直後のラット扁桃体へのヒスタミン微量投与は投与後 3 時間、12 時間の明期、暗期 12 時間および 24 時間摂食量を有意に抑

制した ($p < 0.05$ for each)。暗期直前のラット扁桃体へのヒスタミン微量投与はラットすくみ行動を有意に増加した。

IL へのヒスタミン投与は、摂食量ではなく、すくみ行動、探索行動、噛みつき行動など情動行動の発現に影響することが判明した。またヒスタミンの作用時間によって発現する情動行動が異なる。扁桃体へのヒスタミン投与は食行動抑制作用を示し、IL と異なり暗期にすくみ行動を誘発した。前頭前野および扁桃体における神経ヒスタミンによる食行動調節および情動行動発現に部位特異性および時間・リズム特異性があることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Torigoe Y, Takahashi N, Hara M, Yoshimatsu H, Saikawa T. Adrenomedullin Improves cardiac expression of heat-shock protein 72 and tolerance against Ischemia/reperfusion injury in insulin-resistant rats. *Endocrinology*. 150:1450-5. 2009 査読有
- ② Chiba S, Itateyama E, Sakata T, Yoshimatsu H. Acute central administration of immpip, a histamine H3 receptor agonist, suppresses hypothalamic histamine release and elicits feeding behavior in rats. *Brain Res Bull*. 79:37-40. 2009 査読有
- ③ Yoshimatsu H. Hypothalamic neuronal histamine regulates body weight through the modulation of diurnal feeding rhythm. *Nutrition*. 24:827-31. 2008 査読有
- ④ Araki K, Masaki T, Katsuragi I, Kakuma T, Yoshimatsu H. Effects of Pravastatin on Obesity, Diabetes, and Adiponectin in Diet-induced Obese Mice. *Obesity (Silver Spring)*. Jun 26. 2008 査読有
- ⑤ Fan W, Yanase T, Nishi Y, Chiba S, Okabe T, Nomura M, Yoshimatsu H, Kato S, Takayanagi R, Nawata H. FUNCTIONAL POTENTIATION OF LEPTIN-STAT3 SIGNALING BY THE ANDROGEN RECEPTOR. *Endocrinology*. Aug 14. 2008 査読有
- ⑥ Gotoh K, Fukagawa K, Fukagawa T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone - induced

suppression of food intake.

J Neurochem. 103:1102-10. 2007 査読有

- ⑦ Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. TNF-alpha induces hepatic steatosis in mice by enhancing gene expression of sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). *Exp Biol Med (Maywood)*. 232:614-21. 2007 査読有
- ⑧ Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology*. 148:2690-7. 2007 査読有
- ⑨ Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. Involvement of stomach ghrelin and hypothalamic neuropeptides in tumor necrosis factor-alpha-induced hypophagia in mice. *Regul Pept*. 140:94-100. 2007 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 吉松 博信、摂食障害における脳内ストレス情報処理と神経ヒスタミン、第 4 回日本摂食障害学会学術集会、平成 20 年 9 月 20 日、東京
- ② 吉松 博信、中枢神経系からアプローチする新たな肥満症治療ターゲット 神経ヒスタミンによる視床下部機能のクロストーク、第 29 回日本肥満学会、平成 20 年 10 月 17 日、大分

[図書] (計 2 件)

- ① 吉松 博信、西村書店、カラー版糖尿病学 基礎と臨床、2007、p1063-1070
- ② 吉松 博信、朝倉書店、内科学第 9 版、2007、p100-103、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉松 博信 (YOSHIMATSU HIRONOBU)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00166993

(2) 研究分担者

加隈 哲也 (KAKUMA TETSUYA)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：80343359

(3) 連携研究者

なし