

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07300

研究課題名（和文）交感神経活動を制御する視床下部オキシトシン神経系の中枢神経回路の解明

研究課題名（英文）Oxytocinergic neural pathway driving thermogenic sympathetic outflow

研究代表者

福島 章紘（Fukushima, Akihiro）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60799782

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）：神経ペプチドのひとつであるオキシトシンには、エネルギー消費量を上げ、体温を上昇させる作用があることが知られていたが、どのような神経路を介しているかは明らかでなかった。本課題では、インビボラットの交感神経活動記録と、視床下部室傍核オキシトシンニューロン群選択的な光遺伝学的刺激を組み合わせることで、延髄縫線核へ投射するオキシトシン神経が、オキシトシン受容体を介して交感神経調節ニューロンを直接刺激して褐色脂肪組織における熱産生交感神経活動を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の結果により、「延髄縫線核を介した交感神経活動の促進」というオキシトシンの新たな作用とその神経伝達経路が明らかになった。特に、オキシトシンが他の脳領域からの熱産生シグナルを増強することは、情動表出に伴う自律神経反応（心拍数や体温の上昇など）の神経メカニズムの研究への展開が期待される。また、オキシトシンの継続的な熱産生増強作用は全身のエネルギー消費量を長期的に増加させることから、肥満の防止に役立っているものと考えられる。本研究で得られた知見がブラダー・ウィリー症候群の肥満発症機序の解明や、肥満ならびに関連疾患の新たな治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Oxytocin, a neuropeptide produced in the hypothalamus, has been known to increase energy expenditure and body temperature, but the neural pathways and mechanisms have not been clarified. In this study, by combining in-vivo sympathetic nerve activity recordings and optogenetic stimulation selective to oxytocin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus, I discovered that oxytocinergic transmission to the medullary raphe nucleus directly stimulates sympathetic premotor neurons and, as a result, drives sympathetic heat production (thermogenesis) in brown adipose tissue.

研究分野：神経生理学

キーワード：オキシトシン 視床下部室傍核 延髄縫線核 交感神経 褐色脂肪熱産生

1. 研究開始当初の背景

生物は、外環境の変化に応じて体温や血圧・心拍などの内部環境を適切な状態に保つよう内臓機能を常に調節している。このもっとも基本的な生命維持機能である内部恒常性の維持は、交感神経系および副交感神経系からなる自律神経系によっておこなわれている。また自律神経系の活動は外環境の変化だけでなく、情動による影響も受けており、喜怒哀楽や緊張、恐怖は、血圧や心拍の上昇、鳥肌や発汗などの自律神経反応を惹起する。

自律神経系の上位中枢である視床下部では、様々な神経ペプチドが産生されている。そのひとつであるオキシトシンは母性行動や、交尾、社会的相互作用、ストレス負荷などによって脳内に放出されることから、情動をともなう行動や刺激によるオキシトシン神経系の活性化が自律神経活動を変化させると考えられるが、その生理的機能や神経路メカニズムは十分に明らかではなかった。

研究代表者が所属する研究室では、体温調節を中心とした自律神経活動の中枢神経基盤に関する研究をおこなっており、これまで視床下部 - 延髄縫線核 - 脊髄側角からなる下行性神経軸が交感神経系を活性化することを明らかにしてきた (Nakamura, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2011)。これに加えて本研究課題申請前の段階で、オキシトシンニューロン特異的に任意のリポーター遺伝子を高発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV) (OXT-Tet virus) の開発に成功し、視床下部室傍核のオキシトシンニューロンが延髄縫線核へと投射することを見出していた (図 1)。これらの知見と研究ツールを用いることによって、オキシトシン神経による交感神経活性化の神経経路を解明し、その生理的意義の理解に貢献できると考え、本研究課題の立案に至った。

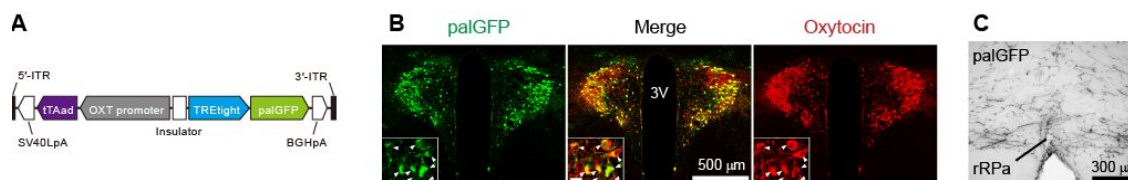


図 1. AAV によるラット室傍核オキシトシンニューロンの選択的標識。

A, OXT-Tet virus (AAV-OXT-Tet-palGFP) の構造。

B, 視床下部室傍核での AAV 由来 palGFP とオキシトシンの免疫染色シグナルとの共局在。3V, 第三脳室。

C, 延髄縫線核 (rRPa) における AAV 由来 palGFP の免疫染色像。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ウイルスを用いた神経トレーシング技術や *in vivo*, *in vitro* の生理学実験技術を用いて、視床下部室傍核から延髄吻側縫線核へ投射するオキシトシンニューロン群の交感神経活性化メカニズムを明らかにし、さらに当該オキシトシンニューロン群の上位中枢領域を同定することで、情動行動における室傍核オキシトシンニューロンの役割を明らかにすることである。この目的を達成するために、

- (1) 延髄縫線核内オキシトシンによる熱産生交感神経反応促進作用の検討
- (2) オキシトシンによる延髄縫線核ニューロン活性化作用機序の検討
- (3) 室傍核オキシトシンニューロンに投射する上位神経細胞群の逆行性トレーシング解析をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 延髄縫線核内オキシトシンによる熱産生交感神経反応促進作用の検討

雄性 Wistar ラット (7-15 週令) を深麻酔後、脳定位装置に固定し、視床下部室傍核へ 2 種のアデノ随伴ウイルス (AAV-OXT-Tet-palGFP および AAV-TRE-ChIEF-mCherry) を混合して注入した。AAV-OXT-Tet-palGFP はオキシトシンプロモーター依存的に tetracycline transactivator (tTA) を発現し、自身の Tet Response Element (TRE) を介して膜移行型緑色蛍光タンパク (palGFP) を発現する (図 1A)。AAV-TRE-ChIEF-mCherry は、AAV-OXT-Tet-palGFP により発現された tTA を用いて光感受性オプシンの一種である ChIEF を発現する。

ウイルス注入から 1 週間後、ウレタン・クロラロースで麻酔し、褐色脂肪組織内交感神経活動および褐色脂肪組織温、呼気中 CO₂ 濃度、血圧、脈拍を同時計測しながら、視床下部室傍核に光ファイバーを刺入した。延髄縫線核に NMDA (NMDA グルタミン酸受容体アゴニスト) を微量注入して熱産生交感神経活動を記録した後、生理食塩水または L-368,899 (オキシトシン受容体アンタゴニスト) を同個所に注入した。次に視床下部室傍核へ青色レーザー (445 nm) を照射してから延髄縫線核に NMDA を再度微量注入し、アンタゴニスト注入前後での熱産生反応を比較した (図 2)。

(2) オキシトシンによる延髄縫線核ニューロン活性化機序の検討

ウレタン・ クロラロースで麻酔した雄性 Wistar ラット(7-15 週令)の延髄縫線核に NMDA を微量注入して熱産生交感神経活動を記録した。同個所にグルタミン酸受容体アンタゴニスト (CNQX および AP5) を注入して NMDA による交感神経反応が阻害されることを確認した後、オキシトシンを微量注入して誘導される熱産生反応を観察した (図 3)。

(3) 室傍核オキシトシンニューロンに投射する上位神経細胞群の逆行性トレーシング解析

延髄縫線核へ投射するオキシトシンニューロンに Cre リコンビナーゼを逆行性発現させるため、本研究室で作製済みの OXT-Tet-palGFP プラスミドのオキシトシンプロモーター領域 (630 bp) と Cre リコンビナーゼの DNA 配列を組み合わせたプラスミド (OXT-Cre) を作製し、逆行性 AAV ヘルパーベクター (rAAV2-retro helper, addgene より入手) を用いてパッケージした。より長いオキシトシンプロモーター領域 (2.6 kbp) についても同様の手法を用いて逆行性 AAV を作製した。作製した逆行性 AAV をラット延髄縫線核に注入してから 4 週間後、ホルマリオン固定をおこない、Cre リコンビナーゼの免疫組織染色により感染および発現効率を検討した。

4. 研究成果

(1) 延髄縫線核内オキシトシンによる熱産生交感神経反応促進作用の検討

延髄縫線核には熱産生交感神経反応に必要なプレモーターニューロンが集中して存在しており、その活動は、視床下部背内側部などからの興奮性シナプス入力によって制御されている。これらの興奮性入力を模倣して、NMDA を延髄縫線核に微量注入すると熱産生交感神経反応が生じるが、光遺伝学的手法を用いて室傍核オキシトシンニューロンを刺激すると、その交感神経反応がより強くなる現象が観察された。興味深いことに、延髄縫線核へのオキシトシン受容体アンタゴニスト (L-368,899) の前投与は、この促進現象を阻害するだけでなく、NMDA による熱産生交感神経反応自体を減弱させることが明らかとなった (図 2)。

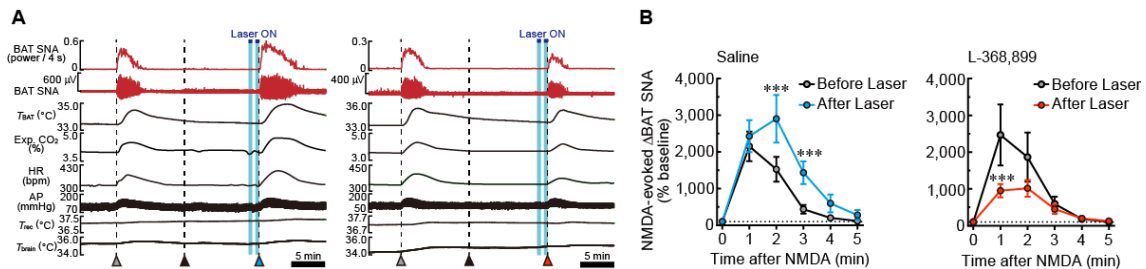


図2. ラット室傍核オキシトシンニューロンの光遺伝学的刺激による熱産生交感神経活動の促進。

A. 延髄縫線核に NMDA を微量注入した際の各種交感神経パラメータの変化。上 2 段(赤色)が肩甲骨間褐色脂肪組織における交感神経線維の発火活動を表す。BAT SNA, 褐色脂肪組織交感神経活動; T_{BAT} , 褐色脂肪組織温; Exp CO_2 , 呼気中 CO_2 濃度; HR, 心拍数; AP; 動脈圧; T_{reco} , 直腸温; T_{brain} , 脳温。

B. オキシトシンニューロンの光刺激による褐色脂肪交感神経活動の促進(左グラフ)と、オキシトシン受容体アンタゴニスト処理による交感神経活動の減弱(右グラフ)。横軸は延髄縫線核への NMDA 微量注入からの時間、縦軸は NMDA により誘導された交感神経活動の大きさを表す。

(2) オキシトシンによる延髄縫線核ニューロン活性化機序の検討

オキシトシンニューロンは伝達物質としてオキシトシンだけでなく、グルタミン酸も共放出することが知られている。研究代表者らはこれまでに、延髄縫線核におけるオキシトシンの微量注入やオキシトシン性軸索の光遺伝学的刺激が熱産生交感神経反応を惹起することを見出していたが、この作用が延髄縫線核プレモーターニューロンに発現するオキシトシン受容体を介した直接作用なのか、それともオキシトシン性軸索や他脳領域から投射する軸索が放出したグルタミン酸による興奮性シナプス伝達を増強することによって現れる間接的な作用なのか明らかでなかった。そこでグルタミン酸受容体アンタゴニスト (CNQX および AP5) を延髄縫線核に微量注入してから同一箇所にオキシトシンを注入したところ、興奮性シナプス伝達が遮断されているにもかかわらず熱産生交感神経反応が誘導され、グルタミン酸受容体アンタゴニスト非存在下での反応と比較しても、その大きさに有意な変化は認められなかった (図 3)。

(3) 室傍核オキシトシンニューロンに投射する上位神経細胞群の逆行性トレーシング解析

どのような生理刺激が室傍核オキシトシンニューロンを活性化するかを知るためには、まずこれらのニューロンが「どの脳領域から入力を受けているか？」を知ることが必要である。そこで本研究では、逆行性感染能をもつ AAV を用いた室傍核オキシトシンニューロン選択的 Cre リコンビナーゼ発現と G 遺伝子欠損狂犬病ウイルス (Osakada and Callaway, *Nat Protoc.*, 2013) を組み合わせることにより、「rMR に投射する」という解剖学的性質と「オキシトシンを産生する」という生化学的性質の 2 つの条件を満たした細胞種に選択的な単シナプス逆行性神経トレーシングを計画していた。

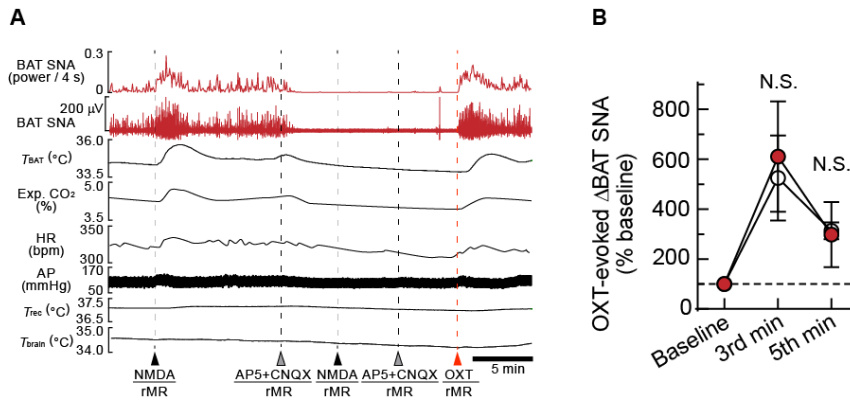


図3.興奮性シナプス伝達遮断下でのオキシトシンによる熱産生交感神経反応の誘導。

- A. 延髄縫線核に NMDA またはオキシトシンを微量注入した際の各種交感神経パラメータの変化。AP5 および CNQX により NMDA の作用は阻害されているが、その後オキシトシン(OXT)を注入すると熱産生反応が誘導された。
 B. AP5+CNQX 存在下(赤丸)および非存在下(白丸)のオキシトシン微量注入による褐色脂肪交感神経活動。グルタミン酸伝達の阻害による有意な変化は見られなかった。横軸は延髄縫線核へのオキシトシン微量注入からの時間、縦軸はオキシトシンにより誘導された交感神経活動の大きさを表す。

このうち、オキシトシンニューロン選択的 Cre リコンビナーゼ発現ウイルス (AAVrg-OXT-Cre) については、上記で用いた OXT-Tet virus のプロモーター領域を転用することで作製可能であると考えられたが、延髄縫線核に感染させて視床下部室傍核を観察したところ、十分な逆行性発現は認められなかった。その原因は不明だが、AAVrg-OXT-Cre だけでなく、他の逆行性 AAV を用いても延髄縫線核からの逆行性発現が認められなかったことから、延髄縫線核に特有なトロピズムの問題であると考えられた。

以上、本研究では(1)および(2)の実験を通じて、視床下部室傍核からのオキシトシン神経が延髄縫線核ニューロンのオキシトシン受容体を直接活性化し、褐色脂肪熱産生や頻脈、血圧上昇など交感神経活動を誘導することが明らかとなった。さらに、このオキシトシン伝達は延髄縫線核ニューロンの興奮性を底上げすることで、他の脳領域から入力される熱産生シグナルも間接的に促進することも明らかとなった。以上の結果は「rMR を介した交感神経活動の促進」という、オキシトシンの新たな作用とその神経路を明らかにしたものであり、養育行動や社会行動中の情動表出に伴う自律神経反応のメカニズムの理解や、肥満症の新たな治療技術開発につながることを期待される(図4)。この成果は論文発表(Fukushima et al., *Cell Reports*, 2022)と国際プレスリリースをおこない、国内外に広く報道された。(3)について今後は、オキシトシンニューロン選択的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス(OXT-Cre mouse)を用いて、投射先依存的な上位神経細胞群の同定を引き続き進めていく予定である。

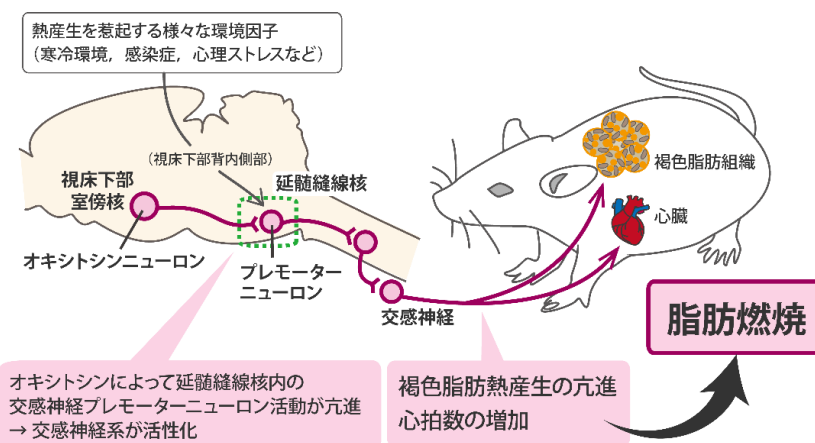


図4.視床下部室傍核オキシトシン神経系による熱産生交感神経活動の促進

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 3件）

1. 著者名 Fukushima Akihiro, Kataoka Naoya, Nakamura Kazuhiro	4. 巻 40
2. 論文標題 An oxytocinergic neural pathway that stimulates thermogenic and cardiac sympathetic outflow	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111380 ~ 111380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111380	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 Nakamura Yoshiko, Yahiro Takaki, Fukushima Akihiro, Kataoka Naoya, Hioki Hiroyuki, Nakamura Kazuhiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons bidirectionally control body temperature via tonic GABAergic signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadd5463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.add5463	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 Arima-Yoshida Fumiko, Raveau Matthieu, Shimohata Atsushi, Amano Kenji, Fukushima Akihiro, Watanabe Masashi, Kobayashi Shizuka, Hattori Satoko, Usui Masaya, Sago Haruhiko, Mataga Nobuko, Miyakawa Tsuyoshi, Yamakawa Kazuhiro, Manabe Toshiya	4. 巻 10
2. 論文標題 Impairment of spatial memory accuracy improved by Cbr1 copy number resumption and GABAB receptor-dependent enhancement of synaptic inhibition in Down syndrome model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71085-9	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14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福島章紘
2. 発表標題 褐色脂肪熱産生を駆動するオキシトシン神経系
3. 学会等名 Biothermology Workshop 2022 & 温度生物学若手の会 合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村和弘、中村佳子、八尋貴樹、福島章紘
2. 発表標題 体温調節の多臓器反応を統合的に制御する中枢ニューロン
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村佳子、八尋貴樹、福島章紘、片岡直也、日置寛之、中村和弘
2. 発表標題 体温の中枢制御システムの基本原理
3. 学会等名 第17回 環境生理学プレコングレス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福島章紘, 中村和弘
2. 発表標題 A central oxytocin neural pathway that regulates metabolism
3. 学会等名 The 3rd ClBoG Retreat
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福島章紘, 中村和弘
2. 発表標題 視床下部オキシトシンニューロンによる褐色脂肪熱産生の調節メカニズム
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村和弘, 片岡直也, 福島章紘
2. 発表標題 情動はどのようにして熱産生や循環機能に影響を与えるのか?
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福島章紘, 中村和弘
2. 発表標題 視床下部 - 延髄縫線核オキトシン神経系による熱産生交感神経反応の促進
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島章紘, 中村和弘
2. 発表標題 視床下部室傍核オキトシン神経系による褐色脂肪熱産生の促進
3. 学会等名 第10回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島章紘, 中村和弘
2. 発表標題 視床下部室傍核オキトシン神経系による褐色脂肪熱産生の促進
3. 学会等名 温熱生理研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Fukushima, Kazuhiro Nakamura
2. 発表標題 Oxytocinergic Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Stimulate Brown Adipose Tissue Thermogenesis Through Rostral Medullary Raphe
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島章紘, 中村和弘
2. 発表標題 視床下部室傍核 延髄縫線核オキシトシン神経系による褐色脂肪熱産生の促進
3. 学会等名 第9回生理学研究所・名古屋大学医学系研究科合同シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島章紘
2. 発表標題 体温調節の中樞神経機構: Central Neural Pathways for Thermoregulation and Beyond
3. 学会等名 第190回薬学談話会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島章紘, 中村和弘
2. 発表標題 Oxytocinergic Transmission from the Paraventricular Hypothalamic Nucleus to Rostral Medullary Raphe Stimulates Brown Adipose Tissue Thermogenesis
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島章紘, 中村和弘
2. 発表標題 視床下部室傍核オキトシン神経系による褐色脂肪熱産生の促進
3. 学会等名 第15回環境生理学プレコンgres
4. 発表年 2019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