

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09032

研究課題名(和文) Cre/loxPシステムを用いたニューロペプチドY発現ニューロンの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of neuropeptide Y-expressing neurons using Cre/LoxP system

研究代表者

山田 俊児 (Yamada, Shunji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40454079

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)：視床下部の存在するニューロペプチドY (NPY) 発現ニューロンは強力に摂食を促進する。一方、側坐核や扁桃体と行った部位にもNPY発現ニューロンは存在するが、その機能や解剖学的特徴は明らかになっていない。本研究ではNPY-CreマウスとCre依存型アデノ随伴ウイルスを用いて、側坐核のNPY発現ニューロンが不安行動に関与することと、側坐核のNPY発現ニューロンの解剖学的特徴を明らかにした。また、同様の方法を用いて、側坐核に投射するNPYニューロンを発見し、それらのニューロンが高脂肪食の摂取に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NPYはNPY受容体タイプ1 (Y1R) を介して摂食を促進することから、Y1Rのアンタゴニストが抗肥満薬の候補として研究・開発が進んでいる。一方、脳内や臓器を含む末梢にもY1Rは発現し、さまざまな行動・内分泌変化に関与することが報告されている。本研究結果は側坐核のNPYニューロンが不安行動を減少させる働きがあることを明らかにした。この作用がY1Rを介する場合、Y1Rアンタゴニストが抗肥満を導く代わりに、不安を増加させる可能性があることを意味する。抗肥満薬Y1Rアンタゴニストの一つの副作用の可能性を発見できたのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：Neuropeptide Y (NPY) expressing neurons in the hypothalamus stimulate food intake strongly. On the other hands, there are NPY-expressing neurons in the nucleus accumbens (NAc) and amygdala, the anatomical and functional characteristics has not been understood yet. In the present study, we found that NPY neurons in the NAc are responsible for anxiety behavior and anatomical characteristics of NPY neurons in the NAc using Cre/loxP system and Cre-dependent adeno associated virus. Moreover, using same methods, we also found that the origins for NPY neurons projecting to the NAc and the neurons are involved in intakes of high fat diet.

研究分野：神経内分泌

キーワード：NPY Cre/loxP 側坐核 不安

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は世界中で 20 億人以上の人々が苦しむ大きな問題であり、二型糖尿病や心疾患、様々な悪性腫瘍といった深刻な疾患にもつながる。我々の身体には空腹になったら摂食し満腹になったら摂食を中止するというメカニズムがあるが、肥満を引き起こす「過食」はこのメカニズムが破綻した状態にほかならない。エネルギー摂取を減らし、エネルギー消費を増やす事が肥満を解消するもっとも単純な方法であるが、これ実行することはとても難しい。「やる気がない」ことが精神論ではなく疾患として考えられる現代において、肥満を導いてしまう過食も、精神的に弱いのではなく、脳の構造変化を伴う一つの疾患として考えることができる。過食が疾患であるならば薬で対処するのが一つの解決策であることは間違いない。

脳内（特に視床下部）で合成される神経ペプチドの一つであるニューロペプチド Y (neuropeptide Y; NPY) は、その受容体である Y1R を介して摂食を強力に促進する事が報告されている。そのため、Y1 受容体のアンタゴニストは抗肥満薬として研究・開発が進められている。一方、視床下部以外の大脳皮質や基底核、脳幹といった部位にも NPY や Y1R を発現するニューロンは多く存在し、それらのニューロンが情動行動を含む様々な行動・内分泌に関与することも報告されている。NPY アンタゴニストを抗肥満薬としてより安全に使用するためには、脳内の NPY 発現ニューロンの機能を鮮明にしておく必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳内の様々な部位における NPY 発現ニューロンを Cre/loxP システムとアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて可視化し、その NPY 発現ニューロンの機能解析を行うことで、脳内に存在する NPY 発現ニューロンの機能の一端を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) Cre/loxP システム

Cre/loxP システムは DNA 組換え酵素「Cre」が loxP 配列という DNA 配列に作用することで生じる遺伝子組換え反応である。向かい合うように配列した loxP 配列の間にマウスの脳内で発現させたい遺伝子（目的遺伝子）を逆向きに配列した「導入遺伝子」がある場合、そのままでは逆向きなので目的遺伝子の発現は起こらないのに対し、Cre 存在下では Cre が loxP に作用して遺伝子組換えを起こし、目的遺伝子が反転する（正しい向きになる）ことで、目的遺伝子の発現が誘起される。本研究では、導入遺伝子のベクターとして AAV を利用し、AAV を NPY-Cre マウス（NPY 発現細胞特異的に Cre を発現するマウス）の脳内に投与することで、ある部位の NPY ニューロン特異的に目的遺伝子を発現させた。

#### (2) 側坐核 (NAc) に存在する NPY ニューロンの可視化とその機能について

NPY-Cre マウスの NAc に AAV(dj)-FLEX-mCherry or AAV (dj)-FLEX-hM3Dq-mCherry を投与し、NAc の NPY ニューロンに mCherry もしくは hM3Dq を発現させた。hM3Dq は内因性に存在しない受容体でありクロザピン-N-オキサイド (CNO) を外因性に投与することで、hM3Dq 発現ニューロン（本実験の場合は NAc の NPY ニューロン）を活性化することができる。CNO により NAc の NPY ニューロンが活性化した時の摂食量、高脂肪食摂取量、不安行動（オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験）を調べ、NAc に存在する NPY ニューロンの機能を解析した。

また、Cre/loxP システムを用いて NAc の NPY ニューロンにジフテリアトキシン受容体を発現させ、ジフテリアトキシンを投与する事で NAc の NPY ニューロンが欠損したマウスを準備し、同様の行動実験を行った。

#### (3) 逆行性もしくは順行性能の強い AAV や組換え狂犬病ウイルス (rRABV) を用いた神経回路トレーシング

AAV には様々なセロタイプが知られているが、その中でニューロンを逆行性に進む（神経終末から細胞体側）能力に特化したセロタイプ (AAV-rg) が知られている。また、Cre/loxP システムと rRABV を組み合わせる事で、NAc の NPY ニューロンに投射するニューロンを direct に可視化する事が可能である。本研究では、これらのウイルスを用いて、NAc の NPY ニューロンに投射するニューロンや NAc に投射する NPY ニューロンを可視化し、NAc に関わる NPY ニューロン神経回路網を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 側坐核に存在する NPY ニューロンは不安行動に関与する

視床下部以外の NPY ニューロンとして、NPY 発現ニューロンが多く存在する NAc に着目し実験を行った。NAc の NPY ニューロンの機能を調べるために、ジフテリアトキシン受容体を用いて NAc の NPY ニューロンを脱落したマウスを作出し、様々な行動実験を行った。NAc の NPY ニューロンの脱落は体重、普通食の摂食量に影響を及ぼさなかった。一方、不安行動を調べるためにオー

ブンフィールド試験を行ったところ、NAcのNPY脱落マウスでは中心エリアの滞在時間が脱落する前に比べ優位に短くなった。同様に高架式十字迷路試験では、オープンアームの滞在時間がNAc NPY脱落前に比べ脱落後で優位に短くなった。これらのことからNAc NPYニューロンの欠損により不安が高まっている可能性が示唆された。次に、hM3DqをNAcのNPYニューロンに発現させ、NAcのNPYニューロンを活性化させた時の不安行動を調べた。その結果、オープンフィールド試験と高架式十字迷路試験において、NAc NPYニューロンの活性化により不安行動が減少した。これらのことから、NAcのNPYニューロンは不安を緩和する作用を有することが明らかとなった。この結果は、*Experimental Neurology* 誌に掲載された (Neuropeptide Y neurons in the nucleus accumbens modulate anxiety-like behavior, *Experimental Neurology* 327, 2020)。

#### (2) 側坐核に存在するNPYニューロンは視床下部外側野に投射する

NAc NPYニューロンの機能解析後その解剖学的特徴を解析した。蛍光色素mCherryでNAc NPYニューロンを標識し、その神経終末を探索した。その結果、外側視床下部(LH)にmCherry陽性線維を認めた。逆行性トレーサーであるコレラトキシンbサブユニット(CTb)を用いて、この神経投射を確認したところ、mCherryで標識されるNAc NPYニューロンのうち7-10%がCTb共陽性であった。さらに、組換え狂犬病ウイルスを用いた逆行性トレーシングでもNAcからLHへのNPYニューロンの投射を確認した。最後に、組換え狂犬病ウイルスを用いた初期感染細胞特異的逆行性トレーシングを行った。その結果、NAc NPYニューロンは視床正中核群と後内側扁桃核から多くの神経入力を受けることが明らかとなった。この結果は、*Frontiers in Neuroanatomy* 誌に掲載された (Efferent and afferent connections of neuropeptide Y neurons in the nucleus accumbens of mice, *Frontiers in Neuroanatomy* 15, 2021)。

#### (3) 側坐核に投射するNPYニューロンの起始部の一つは扁桃核基底外側部である

NAcにはNPYを発現する神経線維も多く存在することから、NAcへのNPYニューロンの投射が考えられた。そこでNAcに投射するNPYニューロンの解剖学的解析とその機能解析を行なった。強い逆行性能を有するAAV-rgをNPY-CreマウスのNAcに投与し、蛍光色素mCherryでNAcに投射するNPYニューロンを標識したところ、mCherry陽性細胞が扁桃核基底外側部(BLA)に多く観察された。NPY-CreマウスのBLAへCre依存性に膜結合型GFP(mGFP)を発現できるAAVを投与しBLA NPYニューロンを標識した。その結果、mGFP陽性の神経線維が前頭前皮質、NAc、分界条床核に見られた。これらのことから、BLA NPYニューロンのうち一部はNAcに投射することが明らかとなった。BLA NPYニューロンの機能を解析するために、Caspase3をBLA NPYニューロン特異的に発現させBLA NPYニューロン欠損マウスの作出を試みた。BLA NPYニューロン欠損マウスの普通食および高脂肪食摂取量はコントロール群と比べ差は見られなかったが、ストレス負荷後の高脂肪食摂取量は優位に減少した。また、ストレスによる不安行動の増加がコントロールに比べBLA NPYニューロン欠損マウスで顕著であった。これらのことから、BLA NPYニューロンはストレス緩和作用を有する可能性が示唆された。これらの結果は、*Neuro2022* (2022年7月、沖縄)や第48回日本神経内分泌学会学術集会(2022年10月、奈良)で発表した。

#### (4) 側坐核へのNPY作用が高脂肪食摂取を高める可能性がある

NAcは報酬系に關する事が古くから報告されている。また、NAcにはNPY以外にもNPY受容体タイプ1(NPY-Y1R)を発現するニューロンが多く存在する。そこで、NAcのNPYやNPY-Y1Rが報酬である高脂肪食の摂取に關与するか否かを調べた。14日間にわたって高脂肪食を1日1時間マウスに供与すると、マウスは昼間にも関わらず1日の半分程のカロリーを摂取するようになった。このようなマウスに対し、NPY-Y1RのantagonistをNAcに投与したところ、vehicle投与時に比べ高脂肪食の摂取量が有意に減少した。一方、NPYを投与すると高脂肪食の摂取量は有意に増加した。これらのことから高脂肪食摂取により側坐核においてNPYに対する感受性が高まり、Y1Rを介して高脂肪食摂取が促進する可能性が示唆された。

次に、NAcにおいて高脂肪食摂取を誘起するNPYニューロンの起源を調べるために、研究成果4-(3)で得られた結果を元に、BLAからNAcに投射するNPYニューロンに着目し、このニューロンを特異的に活性化・不活性化できるモデルを作出した。BLAからNAcに投射するNPYニューロンを不活性化すると高脂肪食の摂取量が減少傾向であった。一方、NAcに存在するNPYニューロン自体の關与を調べたところ、NAc NPYニューロンの不活性化により高脂肪食摂取が優位に減少した。

視床下部のNPYニューロンとその過食との關係に着目し研究を開始したが、側坐核のNPYニューロンが不安行動の他に、報酬系として高脂肪食の摂取に關与する事が明らかとなってきた。過食の原因の一つに「依存」があると思われるので、報酬系や薬物依存に深く關与する側坐核、またそこに存在するNPYニューロンの働きをより深く解明することが過食の抑制については肥満の抑制につながると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Tanaka Masaki, Yamada Shunji, Watanabe Yoshihisa	4. 巻 22
2. 論文標題 The Role of Neuropeptide Y in the Nucleus Accumbens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7287 ~ 7287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22147287	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 Yamada Shunji, van Kooten Nienke, Mori Takuma, Taguchi Katsutoshi, Tsujimura Atsushi, Tanaka Masaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Efferent and Afferent Connections of Neuropeptide Y Neurons in the Nucleus Accumbens of Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 741868 ~ 741868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2021.741868	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 Yamada Shunji, Islam Mohammad Shyful, van Kooten Nienke, Bovee Sonny, Oh Yoon-Mi, Tsujimura Atsushi, Watanabe Yoshihisa, Tanaka Masaki	4. 巻 327
2. 論文標題 Neuropeptide Y neurons in the nucleus accumbens modulate anxiety-like behavior	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 113216 ~ 113216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2020.113216	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 Wada Hiroaki, Ikoma Kazuya, Oka Yoshinobu, Nishida Atsushi, Onishi Okihiro, Kim Wook Choel, Tanida Takashi, Yamada Shunji, Matsuda Ken ichi, Tanaka Masaki, Kubo Toshikazu	4. 巻 51
2. 論文標題 Status of growth plates can be monitored by MRI	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance Imaging	6. 最初と最後の頁 133 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmri.26771	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13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田俊児、Nienke van Kooten、森琢、田口勝敏、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 側坐核ニューロペプチドY発現ニューロンの解剖学的解析
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田俊児、田中雅樹
2. 発表標題 側坐核のニューロペプチドY発現ニューロンが不安行動に及ぼす影響とその解剖学的解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunji Yamada, Mohammad Shyful Islam, Nienke van Kooten, Atsushi Tsujimura, Yoshihisa Watanabe, Masaki Tanaka
2. 発表標題 Neuropeptide Y neurons in the nucleus accumbens modulate anxiety-like behavior
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田俊児
2. 発表標題 組織と細胞の基本
3. 学会等名 第45回組織細胞化学講習会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shunji Yamada, Takuma Mori, Katsutoshi Taguchi, Atsushi Tsujimura, Masaki Tanaka
2. 発表標題 Anatomical analysis of neuropeptide Y (NPY) neurons in the nucleus accumbens
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田俊児、呉胤美、Nienke van Kooten、Mohammad Shyful Islum、田口勝敏、森琢磨、辻村敦、渡邊義久、田中雅樹
2. 発表標題 側坐核に存在するニューロペプチドY発現細胞が不安行動に及ぼす影響とその解剖学的解析
3. 学会等名 第15回GPCR研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunji Yamada, Nienke van Kooten, Katsutoshi Taguchi, Takuma Mori, Atsushi Tsujimura, Masaki Tanaka
2. 発表標題 Anatomical analysis of neuropeptide Y (NPY) neurons in the nucleus accumbens using NPY-Cre mice.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田俊児、呉胤美、Nienke van Kooten、Mohammad Shyful Islum、田口勝敏、辻村敦、渡邊義久、田中雅樹
2. 発表標題 側坐核ニューロペプチドY発現細胞が不安行動に及ぼす影響について
3. 学会等名 第46回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田俊児、Nienke van Kooten、森琢磨、田口勝敏、辻村敦、田中雅樹
2. 発表標題 側坐核ニューロペプチドYニューロン入出力についての解剖学的解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shunji Yamada, Yoshihisa Watanabe, Masaki Tanaka
2. 発表標題 Anatomical and functional analysis of neuropeptide Y neurons in the basolateral amygdala
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田俊児、渡邊義久、田中雅樹
2. 発表標題 扁桃体基底外側部に局在するニューロペプチドYニューロンの解剖学的および機能解析
3. 学会等名 第48回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田俊児、渡邊義久、田中雅樹
2. 発表標題 側坐核に投射するNeuropeptide Y (NPY) ニューロンの探索とその機能解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田俊児
2. 発表標題 ウイルスベクターを用いた神経回路トレーシング法
3. 学会等名 第47回組織細胞化学講習会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 山田俊児	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本組織細胞化学会	5. 総ページ数 250
3. 書名 組織細胞化学2020 -組織と細胞の基本-	

1. 著者名 山田俊児	4. 発行年 2022年
2. 出版社 日本組織細胞化学会	5. 総ページ数 258
3. 書名 組織細胞化学2022 -ウイルスベクターを用いた神経回路トレーシング法-	

〔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
---------	---------