

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22749

研究課題名(和文)化学遺伝学的手法を応用したオキシトシンと摂食の概日リズム・食嗜好性連関の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship between oxytocin and circadian rhythm, feeding behavior, food preference by applying chemogenetics

研究代表者

園田 里美 (Sonoda, Satomi)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30644009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラットのオキシトシンニューロンを内因性に活性化させた際、摂食量、飲水量、活動量および深部体温に変化が見られず、ショ糖負荷試験にて短時間でのショ糖の嗜好性が減少し、糖負荷後のインスリン初期分泌が低下していた。内因性のオキシトシンニューロンの活性化は必ずしも摂食抑制に作用するのではないこと、オキシトシンのサーカディアンリズムの変化はラットの活動量に影響しないことが分かった。また内因性にオキシトシンニューロンを活性化させるとインスリン分泌を抑制する可能性が示唆された。内因性のオキシトシンニューロンの活性化させた際と外因性にオキシトシン投与後した際の摂食行動や糖代謝の挙動は異なっていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外因性のオキシトシン投与による摂食抑制効果はこれまで報告されているが、内因性にオキシトシンを活性化させた際の生体反応については不明であった。今回、化学遺伝学的手法を用いて内因性にオキシトシンを活性化させた際のラットの行動解明を通して、今後のオキシトシンニューロンの生理学的な解明の一助となりうる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When rat oxytocin neurons were endogenously activated, there were no changes in food intake, water intake, activity and core body temperature. In the sucrose preference test, sucrose intake in a short time decreased, and the early insulin release decreased after glucose tolerance test when oxytocin neurons were activated. It was found that activation of oxytocin neurons endogenously does not necessarily affect feeding suppression and that changes in oxytocin circadian rhythm do not affect rat activity. It was also suggested that activation of oxytocin neurons endogenously may suppress insulin secretion. It was found that changes in feeding behavior and glucose metabolism differ between when oxytocin neurons are activated by administration of oxytocin and when where oxytocin neurons are activated endogenously.

研究分野：内分泌学

キーワード：オキシトシン

様式 C-19, F-19-1, Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

社会問題となっている肥満症の過食、特に夜間の過食による体重増加へのアプローチは重要な臨床上の課題である。認知行動療法などを通して肥満症患者の食習慣を改善させ、意識的に夜間の過食を抑制できる患者は一定の治療効果を上げることが可能である。高齢化社会を迎え、意識的に夜間の過食を抑制できない認知症の肥満症患者も増加しており、摂食行動の変容のためには、中枢神経の摂食中枢をターゲットとし、直接治療介入する方策が有用であると考えられる。治療介入において、薬物療法については十分な効果と安全性が担保されている薬剤は未だに確立されていない。

中枢神経系や末梢組織において産生される摂食促進性および抑制性のペプチドが重要なターゲットと考えられ、肥満症への治療応用を目指すには、摂食行動の制御につながる摂食関連ペプチドの病態生理学的な役割の解明が必要である。オキシトシン(OXT)は齧歯類に対する中枢内・皮下・腹腔内・点鼻投与で摂食量が減少することが報告されており(Arletti R, et al., 1989, Maejima Y, et al., 2011, Maejima Y, et al., 2015)、外因性の OXT による摂食抑制効果は証明されている。しかし、内因性の OXT ニューロンが活性化することによる摂食や飲水行動の変化は不明であり、OXT の概日リズムが変化した場合の活動量など生体反応は不明である。さらに、腹側被蓋野(VTA)の内因性 OXT がショ糖摂取を抑制することが報告されており、OXT ニューロン活動もしくは OXT 分泌の調節によって炭水化物摂取を抑制できれば、抗肥満薬引いては糖尿病の発症を抑制する創薬につながる創造性を秘めている。

2. 研究の目的

本研究では、ラットの内因性の OXT ニューロンを特異的に活性化させて、OXT 分泌のサーカディアンリズムを変化させた際に、摂食および飲水行動、ショ糖への嗜好性、身体活動量や深部体温の変化、糖代謝への影響を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

化学遺伝学的手法を応用し、薬物興奮性レセプター (hM3Dq) 遺伝子を挿入した融合遺伝子を用いて、OXT-hM3Dq-mCherry トランスジェニックラットを作出した。OXT ニューロン特異的に GPCR である hM3Dq を発現させ、特異的なリガンドである Clozapine-N-Oxide (CNO) の末梢もしくは局所投与により、標的としている OXT ニューロンを選択的に興奮させることができる。このラットを用いて、以下の検討を行った。

(1) ラットに生理食塩水 (1mL/kg) もしくは CNO (1 mg/kg/mL) を皮下投与し、投与 2 時間後に灌流固定を行い脳を取り出し、薄切した脳切片で Fos タンパクに対する免疫組織化学的染色法を行い、Fos タンパク陽性細胞数を定量した。

(2) ラットに生理食塩水 (1mL/kg) もしくは CNO (1 mg/kg/mL) を皮下投与後、経時的に採血を行い、RIA 法を用いて血中 OXT 濃度を測定した。

(3) ラットに生理食塩水 (1mL/kg) もしくは CNO (1 mg/kg/mL) を皮下投与後、24 時間の積算摂食量および積算飲水量の測定を行った。

(4) ラットに生理食塩水 (1mL/kg) もしくは CNO (1 mg/kg/mL) を 7 日間連日皮下投与した際の体重、積算摂食量の測定を行った。

(5) ラットに活動量および深部体温が測定可能な Nano tag® を留置し、生理食塩水 (1mL/kg) もしくは CNO (1 mg/kg/mL) を皮下投与した。活動量および深部体温の変化を評価した。

(6) ラットに生理食塩水 (1mL/kg) もしくは CNO (1 mg/kg/mL) を 30 分前に投与し、ショ糖負荷試験を行った。スクロース摂取量の割合の差異を評価した。

(7) ラットに 24 時間の絶食後、糖負荷試験 (経口投与および腹腔内投与) 開始 30 分前に、生理食塩水 (1mL/kg) もしくは CNO (1 mg/kg/mL) を皮下投与した。ブドウ糖投与後 0 分、30 分、60 分、120 分に、セポフルランによる吸入麻酔下で尾静脈採血を行った。簡易血糖測定器 (メディセーフフィット®) を用いた血糖測定、ELISA 法を用いた血清インスリン、グルカゴン、GLP-1 濃度の測定を行った。

(8) (1)と同様の方法で、交感神経節前ニューロンが局在する吻側延髄腹内側核 (RVLM) と吻側淡蒼線核 (rRPa) の Fos タンパク陽性細胞数を定量した。

4. 研究成果

(1) CNO 投与群において OXT ニューロン特異的に Fos タンパク陽性細胞の増加が認められた。OXT ニューロンが特異的に活性化していることを確認した。

(2) CNO 投与群において OXT 血中濃度は、30 分後に有意に増加しており、少なくとも投与後 3 時間にわたって有意に増加していることが判明した。

以上より、本実験に用いた OXT-hM3Dq-mCherry トランスジェニックラットは、CNO 投与によって OXT ニューロンを特異的に活性化されること、OXT 血中濃度が有意に増加していることを確認した。内因性の OXT ニューロンの活性化での変化を評価できるラットであることを確認した。

(3) CNO 投与群の 24 時間の積算摂食量および積算飲水量は、生理食塩水投与群と比べて変化がなかった。

(4) 7 日間連日 CNO 投与した群の体重と積算摂食量にも、生理食塩水投与群と比べた変化は

認めなかった。

(5) Nano tag[®]で測定された活動量および深部体温も CNO 投与群と生理食塩水投与群で差異を認めなかった。

(6) ショ糖負荷試験にて、CNO 投与群でショ糖負荷 1 時間のショ糖摂取割合が低下していた。以上のことより、内因性の OXT ニューロン活性化は摂食量、飲水量、活動量、深部体温に変化をもたらさないことが分かった。また、ごく短時間のショ糖嗜好性を低下させることも示唆された。

(7) 糖負荷試験は経口投与・腹腔内投与いずれにおいても、血糖、インスリンの血中濃度の推移および 2 時間の曲線下面積に変化がなかった。またグルカゴン、GLP-1 濃度も変化を認めなかった。一方、インスリン初期分泌の指標となる Insulinogenic Index は CNO 投与群で生理食塩水投与群より低下していた。

(8) CNO 投与群において rRPa および RVLM の Fos 陽性細胞の増加を認め、交感神経節前ニューロンが活性化していることが分かった。

以上のことより、内因性の OXT ニューロンの活性化は耐糖能に変化を認めなかったものの、インスリン初期分泌を低下させることが示唆された。血中 OXT 濃度の増加はインスリン分泌を促進させることが報告されているが、内因性に OXT ニューロンを活性化させると内臓交感神経の興奮を介してインスリン分泌が抑制する作用も発現することが考えられる。この相反する作用の后者の方がより強く作用することで、インスリン初期分泌が低下したのではないかと考えている。機序の解明においてはさらなる検討を要する。

これまでは外因性に OXT を投与することで OXT ニューロンの病態生理学的な解明を行うことしかできなかったが、このラットにおいて OXT-hM3Dq-mCherry トランスジェニックラットを用いることで、内因性の OXT ニューロンの病態生理学的な解明が可能となった。本研究の成果として、これまでの外因性の OXT 作用にて報告されている結果とは異なる結果も判明し、外因性にオキシトシン投与後した際の生体反応は、内因性に OXT ニューロンの活性化させた際の生体反応は異なっている可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 園田 里美、吉村 充弘、丸山 崇、岡田 洋右、上田 陽一、田中 良哉
2. 発表標題 オキシトシン-hM3Dq-mCherryトランスジェニックラットにおける行動解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 園田 里美、吉村 充弘、岡田 洋右、上田 陽一、田中 良哉
2. 発表標題 内因性オキシトシンニューロンの活性化はインスリン初期分泌能を低下させる
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------