

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21689008

研究課題名（和文）脂肪組織由来ホルモンによる自律神経作用における脳内メカニズムの解明

研究課題名（英文）Central molecular mechanism of autonomic actions by hormone derived from adipose tissue

研究代表者

谷田 守 (TANIDA MAMORU)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：70512309

研究成果の概要（和文）：

本研究では、日本人の約3分の2が原因で死亡する生活習慣病に関する研究を行う目的で、摂食行動と生体恒常性維持機能（ホメオスタシス）に関する物質の作用機序の解析について動物の自律神経計測を基盤に行った。その結果、摂食を抑えるレプチンと摂食を増やすアディポネクチンによる自律神経作用の機序は別々の経路をもつことが分かり、内臓を支配する自律神経が生活習慣病に果たす役割を明らかにした。これらの成果は創薬研究への応用に期待される。

研究成果の概要（英文）：

We strongly noted metabolic syndrome having a high mortality in Japan. Then, in present study, we examined leptin and adiponectin which act in the brain and play an important role in feeding and homeostasis with using animal autonomic recording system. We newly showed that central mechanism of leptin or adiponectin in autonomic regulation, hoping it will be applied to new drug research.

交付決定額 2210 千円（直接経費：1700 千円、間接経費：510 千円）

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：基礎医学、環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：レプチン、肥満、自律神経、視床下部、電気生理、高血圧、

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪組織が過剰に蓄積した肥満は糖尿病・高脂血症・高血圧などのメタボリックシンドロームを引き起こす重要因子である。脂肪組織由来の摂食調節因子であるレプチンやアディポネクチンは、脳・視床下部に作用して摂食調節に関与することが分かっているが、自律神経系への調節経路はよくわかっていない。自律神経は遠心路において、血圧、血糖、体温、代謝などの調節機能をもって

り、内臓組織に投射している。レプチンやアディポネクチンによる調節経路の分子メカニズムが進む一方で、自律神経系に及ぼす作用とその分子メカニズム経路についてはよくわかっていない。したがって、本研究課題は自律神経に及ぼすレプチン及びアディポネクチンの効果における脳内メカニズムの全容解明を目指し、視床下部の各神経核への薬液微量注入法と電気生理学及び免疫組織学的手法を用いて、レプチン及びアディポ

クチンが作用する神経核を探索した後に、神経細胞内分子による相互作用メカニズムの解明を行う。

## 2. 研究の目的

(1) レプチン及びアディポネクチンが作用し、自律神経を調節する脳内部位(視床下部内の神経核)を決定する。レプチン受容体又はアディポネクチン受容体を発現する各神経核内へのレプチン又はアディポネクチンの微量投与と効果について検討する。

(2) 視床下部内の AMP キナーゼがレプチン又はアディポネクチンの自律神経作用に関与するか否かについて、AMP キナーゼのノックダウン効果を検討する目的で AMP キナーゼの si-RNA を視床下部内へ投与した時の効果を検討する。さらに、AMP キナーゼが関与する具体的な神経核を決定する為に、(1) で明らかにした視床下部内の作用神経核へ AMP キナーゼの si-RNA を事前に微量投与した際のレプチン又はアディポネクチンの自律神経作用を確認する。

(3) レプチン又はアディポネクチンの慢性投与によって自律神経、血圧、血糖及び熱産生機能が変化するか確認する。さらに、(3) で明らかにした AMP キナーゼの関与部位(視床下部内神経核)が、レプチン又はアディポネクチンの慢性効果に関与するか否かについて、si-RNA を用いた実験で確認する。

## 3. 研究の方法

(1) 電気生理学手法により、麻酔下ラットの自律神経活動を計測して解析する。これまでレプチン受容体が発現する視床下部神経核には複数の神経核(弓状核、背内側核、腹外側核)が関与することがわかっている。ここでは、熱産生に関与する褐色脂肪交感神経活動、脂肪分解に関与する白色脂肪交感神経活動、血糖調節に関与する肝臓副交感神経活動(HVNA)と肝臓交感神経活動(HSNA)を調節する視床下部内神経核の同定を目指して、ラット脳固定装置と脳アトラスによる脳内薬物微量注入法を用いて検討する。

(2) 電気生理学的手法により、麻酔下ラットの自律神経活動を計測して脳内分子メカニズム解析を行う。本研究で着目する細胞内分子である AMP キナーゼがどの神経核が主要なレプチン又はアディポネクチン調節メカニズムをもっているかについて検討する。In vivo RNA 干渉法により、神経細胞内に局在する AMP キナーゼの si-RNA を神経核内へ微量注入した時のノックダウンラットを作製する。免疫組織化学的又は生化学的解析により、薬液を注入した神経核で AMP キナーゼがノックダウンされているか否かについて確認を行う。

(3) レプチン又はアディポネクチンによ

る自律神経への慢性投与と効果について検討する。(1) で明らかにしたレプチン又はアディポネクチンの作用する神経核へそれぞれを長期的に投与した時の無麻酔ラットの自律神経、血圧、血糖及び熱産生(体温、褐色脂肪組織温度)の変化を確認する。特に自律神経活動の長期計測には無線送信機付の電極を用いて計測を行った。

## 4. 研究成果

(1) レプチン微量投与による自律神経反応部位を検討した結果、褐色脂肪及び白色脂肪交感神経活動上昇作用については、弓状核への投与において、上昇反応が確認された。肝臓交感神経活動について、レプチン脳室内投与で上昇反応が確認された。また肝臓副交感神経活動についてもレプチン脳室内投与で上昇した。現在、肝臓自律神経調節に関与する神経核を検討している。

アディポネクチンによる自律神経反応については、褐色脂肪、白色脂肪及び肝臓交感神経活動へ与える作用と調節神経核の同定実験は現在も進行しており、今後の結果が期待される。

(2) AMPK 不活性化剤である Compound C を麻酔下ラットの脳室内に投与すると、濃度依存的に腎臓交感神経活動を促進した(業績論文3)。さらに、in-vivo RNA 干渉法を用いて、3日間 AMP キナーゼ si-RNA を投与して視床下部特異的 AMP キナーゼノックダウンラットを作製した。生化学的解析により、このノックダウンラットは視床下部の AMP キナーゼ量が減少しており、レプチンを糖質内に投与しても摂食量と体重減少作用が減弱していた。このラットを用いて自律神経測定を行った結果、レプチンによる褐色脂肪、白色脂肪、腎臓交感神経活動の促進作用が AMP キナーゼノックダウンラットで減弱していた。また、アディポネクチンによる腎臓交感神経活動調節作用も AMP キナーゼノックダウンラットで減弱していた。

現在は、AMP キナーゼの下流経路に存在する carnitine palmitoyltransferase 1 又は、Tuberous Sclerosis の役割を検討する為にそれぞれの分子をノックダウンしたラットの作製を行っている。

(3) 現在まで、有線電極による腎臓交感神経活動を覚醒下で計測するシステムでは急性期(12-24時間)のみ計測に成功している。その結果、覚醒ラットにレプチンを投与すると腎臓交感神経活動と血圧・心拍数が上昇する。慢性期間で腎臓交感神経活動を計測する為に、無線送信機付の電極による計測を試みている。現時点では2日間の計測に成功しているが、レプチン投与効果は未だ検出されていないため、今後さらなる改良が必要になる。

## 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 20 件)

Nagai K, Tanida M, Niijima A, Tsuruoka N, Kiso Y, Horii Y, Shen J, Okumura N, :Role of L: -carnosine in the control of blood glucose, blood pressure, thermogenesis, and lipolysis by autonomic nerves in rats; involvement of the circadian clock and histamine. *Amino Acids*, 査読有, 2012 *in press*

Yamamoto N, Matsubara T, Sobue K, Tanida M, Kasahara R, Naruse K, Taniura H, Sato T, Suzuki K, :Brain insulin resistance accelerates A $\beta$  fibrillogenesis by inducing GM1 ganglioside clustering in the presynaptic membranes. *Journal of Neurochemistry*, 査読有, 2012 *in press*

Tanida M, Yamamoto N, :Central AMP-activated protein kinase affects sympathetic nerve activity in rats. *Neuroscience Letters*, 査読有, 503, 167-170, 2011

Tanida M, Nagai K: Electrophysiological analysis of the mechanism of autonomic action by *Lactobacilli*. *Bioscience and Microflora*, 査読有, 30(4), 99-109, 2011

Tanida M, Mori M, :Nesfatin-1 stimulates renal sympathetic nerve activity in rats. *Neuroreport*, 査読有, 22, 309-312, 2011

Tanida M, Shintani N, Hashimoto H, :The melanocortin system is involved in regulating autonomic nerve activity through central pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience Research*, 査読有, 70, 55-61, 2011

Tanida M, Satomi J, :Effects of intragastric Injection of Glutamate on Efferent sympathetic nerve activity in Rats, *Neuroscience Letters*, 査読有, 491, 211-215, 2011

Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A, :PACAP is Implicated in the Stress Axes. *Current Pharmaceutical Design*, 査読有, 17/10, 985-989, 2011

Tsukiyama N, Saida Y, Kakuda M, Shintani N, Hayata A, Morita Y, Tanida M, Tajiri Y, Hazama K, Ogata K,

Hashimoto H, Baba A, :PACAP centrally mediates emotional stress-induced corticosterone responses in mice, *Stress*, 査読有, 4, 368-75, 2011

Horii Y, Tanida M, Shen J, Fujisaki Y, Fuyuki R, Hashimoto K, Niijima A, Nakashima T, Nagai K, :Skin application of urea containing cream affected cutaneous arterial sympathetic nerve activity, blood flow, and water evaporation, *Skin Research and Technology*, 査読有, 117/1, 75-81, 2011

Tanida M, Shen J, Kubomura D, Nagai K, :Effects of anserine on the renal sympathetic nerve and blood pressure in urethane-anesthetized rats, *Physiological Research*, 査読有, 59, 177-85, 2010

Tanida M, Shintani N, Morita Y, Tsukiyama N, Hatanaka M, Hashimoto H, Sawai H, Baba A, Nagai, :Regulation of autonomic nerve activities by central pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Regulatory Peptides*, 査読有, 161, 73-80, 2010

Matsumura S, Eguchi A, Kitabayashi N, Tanida M, Shen J, Horii Y, Nagai K, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T, :Effect of an intraduodenal injection of fat on the activities of the adrenal efferent sympathetic nerve and the gastric efferent parasympathetic nerve in urethane-anesthetized rats, *Neuroscience Research*, 査読有, 67, 236-44, 2010

Horii Y, Tanida M, Shen J, Hirata T, Kawamura N, Wada A, Nagai K, :Effects of *Eucommia* leaf extracts on autonomic nerves, body temperature, lipolysis, food intake, and body weight, *Neuroscience Letters*, 査読有, 479, 181-186, 2010

Tanida M, Tsuruoka N, Shen J, Horii Y, Beppu Y, Kiso Y, Nagai K, :Effects of flavangenol on autonomic nerve activities and dietary body weight gain in rats, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 査読有, 73, 2374-2378, 2009

Tanida M, Satomi J, Nagai K, :Autonomic and cardiovascular effects of central neuromedin U in rats, *Physiology & Behavior*, 査読有, 96, 282-288, 2009

Shen J, Tanida M, Fujisaki Y, Horii Y, Hashimoto K, Nagai K, :Effect of the

culture extract of *Lentinus edodes* mycelia on splenic sympathetic activity and cancer cell proliferation, *Autonomic Neuroscience - Basic and Clinical*, 査読有, 28, 50-54, 2009  
Nakamura T, Tanida M, Niijima A, Nagai K, :Effects of auditory stimulation on parasympathetic nerve activity in urethane-anesthetized rats, *In Vivo*, 査読有, 23, 415-419, 2009  
Shen J, Nakamura H, Fujisaki Y, Tanida M, Horii Y, Fuyuki R, Takumi H, Shiraishi K, Kometani T, Nagai K, :Effect of 4G-alpha-glucopyranosyl hesperidin on brown fat adipose tissue- and cutaneous-sympathetic nerve activity and peripheral body temperature, *Neuroscience Letters*, 査読有, 461, 30-35, 2009  
Hashimoto H, Hashimoto R, Shintani N, Tanaka K, Yamamoto A, Hatanaka M, Guo X, Morita Y, Tanida M, Nagai K, Takeda M, Baba A, :Depression-like behavior in the forced swimming test in PACAP-deficient mice: amelioration by the atypical antipsychotic risperidone, *Journal of Neurochemistry*, 査読有, 110, 595-602, 2009

[学会発表](計 6件)

谷田 守、早田 敦子、新谷 紀人、橋本 均、PACAP ノックアウトマウスの摂食及び交感神経活動へのレプチン投与効果、第 89 回日本生理学会 2012 年 3 月 29 日、長野県松本文化会館(長野県)  
谷田 守、森昌朋、Nesfatin-1 による交感神経活動調節の脳内分子メカニズム解析、第 32 回日本肥満学会 2011 年 9 月、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)  
谷田 守、視床下部 AMP キナーゼによる腎臓及び肝臓を支配する自律神経調節、第 88 回日本生理学会 2011 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜(神奈川県)  
谷田 守、新谷 紀人、橋本 均、PACAP による自律神経調節、第 87 回日本生理学会 2010 年 5 月 20 日、盛岡市民文化ホール(岩手県)  
谷田 守、ラット白色脂肪交感神経の同定に関する電気生理学的解析、第 30 回日本肥満学会 2009 年 10 月 9 日、アクトシティ浜松(静岡県)  
Tanida M, Autonomic, cardiovascular and thermoregulatory responses to central neuropeptide Y or neuromedin U in rats. *Experimental Biology* 2009,

2009 年 4 月 18 日~22 日、ニューオリンズ・米国、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷田 守 (TANIDA MAMORU)  
立命館大学・生命科学部・助教  
研究者番号: 70512309