

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15177

研究課題名（和文）摂食制御における最後野神経幹細胞の機能的役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the functional role of neural stem cells in the area postrema in the regulation of feeding behavior

研究代表者

古部 瑛莉子（Furube, Eriko）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30845566

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：延髄最後野には成体神経幹細胞ニッチェが存在する。最後野は背側迷走神経複合体（DVC）の一部を形成し、DVCは食物摂取を阻害する内臓ニューロンおよびホルモンの情報を統合する。そこで、マウスに高脂肪食摂取またはスクロース飲水させ、最後野の神経幹細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、高脂肪食摂取またはスクロース飲水はその継続期間の長さによって神経幹細胞および前駆細胞の増殖に与える影響が異なることが判明した。また、摂食抑制ホルモンの末梢投与に応答し神経幹細胞の増殖活性および分化細胞種が変化していた。本研究結果から、最後野神経幹細胞および前駆細胞が摂食またはエネルギー代謝の制御に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飽食の時代である現在、肥満や糖尿病などの摂食に起因した生活習慣病の罹患者は増え続け、大きな問題となっている。しかし認可されている摂食を制御する薬剤は1種類にとどまり使用ハードルも高いため、治療や予防方法は極めて少ない。脳室周囲器官である最後野（AP）は血液脳関門のない非常に特異な脳領域で、血液中の分子を直接受容し、他の脳部位に末梢からの情報を伝える役割を持つ重要な器官である。本研究では、最後野神経幹細胞および前駆細胞が摂食またはエネルギー代謝の制御に関わる可能性を示した。この結果は学術的意義だけでなく血液脳関門を考慮しなくてもよい薬剤開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recent studies indicate the presence of NSCs in the circumventricular organs such as the area postrema (AP). The AP is located in the medulla oblongata and forms a part of the dorsal vagal complex (DVC), which is the first site for integration of visceral neuronal and hormonal cues that act to inhibit food intake. Therefore, we investigated the effects of high-fat diet or sucrose drinking on NSCs in the AP in mice. The results showed that high-fat diet or sucrose drinking had different effects on the proliferation of neural stem and progenitor cells, depending on the length of the duration. In addition, the proliferative activity and differentiated cell types of NSCs were altered in response to peripheral administration of anorexigenic hormones. These results suggest that NSCs in the AP and progenitor cells are involved in the regulation of feeding or energy metabolism in adult mouse.

研究分野：神経解剖学

キーワード：最後野 成体神経幹細胞 高脂肪食 スクロース コレシストキニン レプチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで成体マウスの最後野(AP)に存在する神経幹細胞及び神経前駆細胞・グリア前駆細胞の特徴について以下の点を明らかとしてきた。

- ・ 神経幹細胞および前駆細胞のマーカータンパク質発現の特徴づけを行い、前駆細胞が VEGF に依存して増殖し、AP および隣接する孤束核や舌下神経核などに神経細胞を含む新しい細胞を供給すること(Furube et al., 2015)
- ・ 脳出血モデルや脱髄モデルを用いた損傷実験から、損傷領域の再生に関わるとされている側脳室下帯の神経幹細胞と同様に、AP 神経幹細胞も脳損傷時には損傷部位へ細胞供給を行うこと(Hiratsuka et al.,2018、2019、Furube et al., 2020)

AP は孤束核と舌下神経核と共に背側迷走神経複合体(DVC)を形成し、DVC は食物摂取を阻害する内臓ニューロンおよびホルモンの情報を統合する。AP 神経幹細胞からの細胞供給先の中には孤束核と舌下神経核が含まれており、AP 自身も悪心・嘔吐の中枢であることから AP に存在する成体神経幹細胞は摂食の制御に関わるのではないかと考えるに至った。

さらに、別のグループによる研究では、AP の神経幹細胞が存在する領域には摂食に関連する Amylin や Cholecystokinin、Leptin、Ghrelin などに対する多くの受容体の発現が報告されていた(Potes et al., 2010, *Physiology & Behavior*、Sugeta et al.,2015 他)。しかし未だに、成体 AP に存在する神経幹細胞の機能的な役割は不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、血液脳関門が存在しない特殊な部位である AP に存在する神経幹細胞の摂食に対する機能的な役割を明らかにすることを目指した。飽食の時代に突入した現在、肥満や糖尿病などの摂食に起因した生活習慣病の罹患者は増え続け、大きな問題となっている。しかし認可されている摂食を制御する薬剤は 1 種類にとどまり使用ハードルも高いため、治療や予防方法は極めて少ない。脳室周囲器官の AP は血液脳関門のない特徴的な脳領域であることが知られている。AP 神経幹細胞による摂食制御機構が判明すれば、社会的に大きな問題である生活習慣病に対する血液脳関門を考慮しない薬剤の開発に繋がることも期待される。

3. 研究の方法

動物

離乳後の 7 週齢の雄 C57BL/6J マウスを株式会社クレアジャパン (東京都目黒区) より入手し、7 日間馴化させた。実験用マウスをグループ (各グループ 4 匹) に割り振り、個別のプラスチックケージで飼育した。動物は湿度および温度 (22±2°C) を制御した部屋で、12 時間: 12 時間の明暗サイクルで維持し、水および餌を自由摂取させた。8 週齢でマウスを対照食、高脂肪食 (脂肪からのカロリー 60% : Test Diet 58Y1)、および対照食+50w/v%スクロース群に分けた。マウスは 1 週間または 4 週間飼育された。1 週間(4 週間の実験では最後の 1 週間) マウスに 1 日 1 回、200mg/kg の BrdU (Sigma-Aldrich) を 7 日間、i.p.注射した。

免疫組織化学

マウス (実験群あたり n=4 匹) を三種混合麻酔 (0.3 mg/kg メドミジン、4.0 mg/kg ミダゾラム、5.0 mg/kg ブトルファノール) で深く麻酔し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で経心灌流し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で固定し脳を取り出した。24 時間後固定の後、凍結した。その後クライオスタットにより 20µm 厚の切片を作製した。免疫組織化学には、ウサギポリクローナル抗 Olig2 抗体 (希釈度 1 : 500 ; Millipore, Billerica, MA, USA)、マウス抗 Math1 抗体 (Clone Atoh1 ; 希釈度 1 : 20; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA)、鶏ポリクローナル抗 Vimentin 抗体 (希釈 1 : 12000; Millipore, Temecula, CA) を用いた。二次抗体として、Alexa-488 および Alexa-594 -conjugated 二次抗体 (希釈度 1 : 400 ; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) を使用した。その後、切片を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Olympus) で撮像した。

統計解析

マウス脳アトラスに従って、他の脳領域から 1 動物あたり 8 切片を解析した。定量解析を行うため、共焦点画像は同じピンホールサイズ (光学スライス厚 4µm)、明るさ、コントラストの設定で取得した。共焦点顕微鏡 (FV1000-D, Olympus, Tokyo, Japan) を用いて、画像 (1,024 × 1,024 pixels) を TIF ファイルとして保存し、Vimentin+BrdU+細胞または Olig2+BrdU+細胞の密度は WinRoof を用いて評価した。データは、平均値±SEM で表した。統計的な差は、Tukey's test を含む ANOVA または unpaired Student's t test により、P<0.05 の有意水準で評価された。

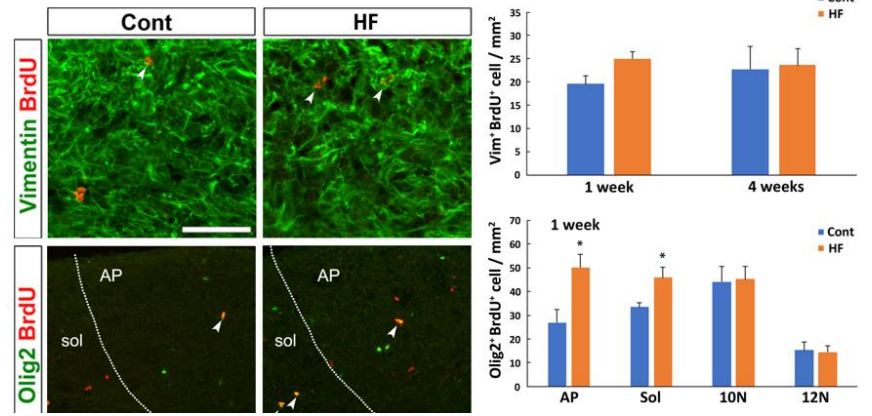
4. 研究成果

① 高脂肪食摂取を短期間(1週間)及び長期間(4週間)行った群ともに Vimentin 陽性神経幹細胞の増殖には変化は見られなかった。一方で、Olig2 陽性オリゴ前駆細胞の増殖は短期間でも AP および孤束核(Sol)で促進されていることが判明した。AP での Olig2 陽性オリゴ前駆細胞の増殖は高脂肪食を長期間続けた群では見られなくなっていたが、Sol では長期間継続させても増殖は促進されていた。分化について検討を行ったところ多くの BrdU 陽性細胞は成熟オリゴデンドロサイトマーカー APC および CNPase 陰性であり、未分化オリゴデンドロサイトマーカーの PDGFR α 陽性であることが判明した。

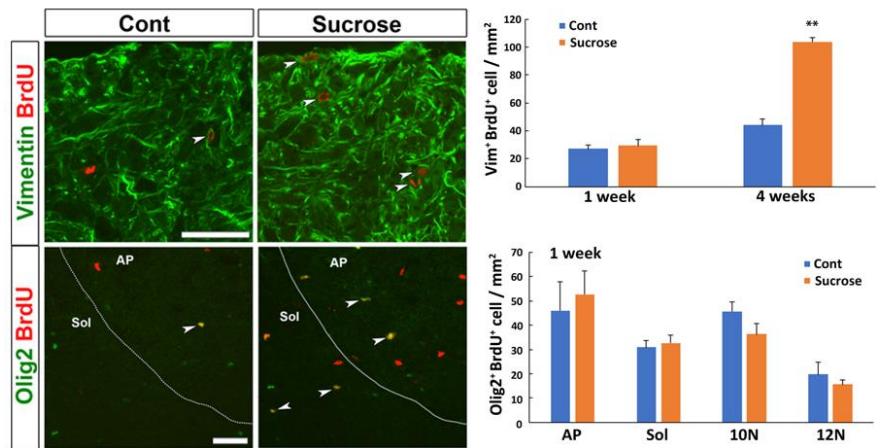
② 50%スクロース飲水を短期間(1週間)行った場合、コントロール群と比較して Vimentin 陽性神経幹細胞および Olig2 陽性オリゴ前駆細胞の増殖に変化は見られなかった一方で、スクロース飲水を長期(4週間)続けた群では AP の Vimentin 陽性神経幹細胞および Olig2 陽性オリゴ前駆細胞の増殖が促進されていた。

③ 摂食抑制ホルモンとして知られるコレシストキニンの末梢投与を行い AP での神経新生の有無を検討したところ、BrdU を取り込んだ Math1 陽性細胞が有意に増加することが判明した。このとき、神経幹細胞およびオリゴ前駆細胞の増殖に変化は見られなかった。

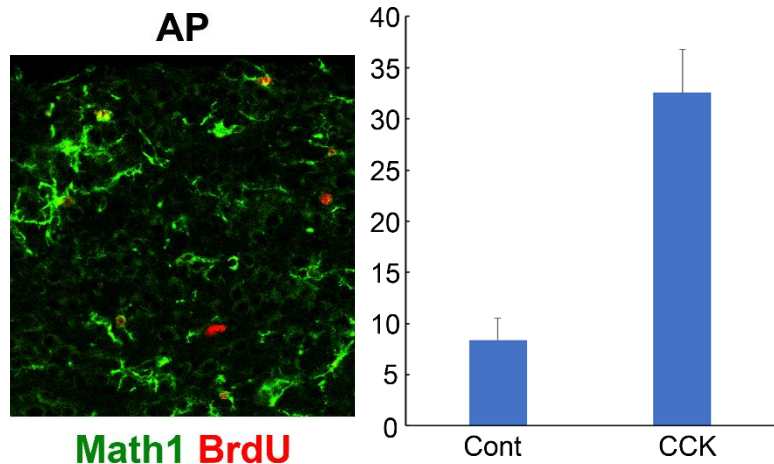
現在、上記によって同定した条件で、これらの新生細胞により影響を受ける神経回路や、摂食行動に実際にどのような変化を及ぼすのかの検討を行っている。



マウスに高脂肪食を 1 週間または 4 週間摂取させた。1 週間の高脂肪食の摂取は BrdU を取り込んだ Olig2 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞の数を AP と孤束核(Sol)で有意に増加させた。4 週間の高脂肪食摂取では、BrdU を取り込んだ Olig2 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞の数は Sol で有意に増加したが、AP では増加しなかった。



マウスに 50%スクロース溶液を 1 週間または 4 週間通常の水の代わりに飲水させた。1 週間のスクロース飲水は神経幹細胞および前駆細胞の増殖に変化を与えなかった。4 週間のスクロース飲水は、AP での BrdU を取り込んだ Vimentin 陽性神経幹細胞および Olig2 陽性オリゴデンドロサイト前駆細胞の数を増加させた。



マウスに 0.53 mg/kg のコレシストキニンを 1 週間腹腔内投与した。AP での BrdU を取り込んだ Math1 陽性神経前駆細胞数はコレシストキニン投与群で有意に増加した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furube Eriko, Ohgidani Masahiro, Yoshida Shigetaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Systemic Inflammation Leads to Changes in the Intracellular Localization of KLK6 in Oligodendrocytes in Spinal Cord White Matter	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-023-03929-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 古部瑛莉子
2. 発表標題 感知系脳室周囲器官神経幹細胞の機能的役割の解明
3. 学会等名 日本解剖学会第67回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古部瑛莉子
2. 発表標題 最後野神経幹細胞に対する摂食の影響
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

〔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
---------	---------