

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20659

研究課題名（和文）摂食行動を制御する視床下部神経ペプチドの性差形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of sex-related formation of hypothalamic neuropeptides controlling feeding behavior.

研究代表者

森下 雅大（Masahiro, Morishita）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10909063

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：脳の性差は摂食行動、ひいては摂食障害に性差を生む重要な要因であると考えられるが、摂食行動を制御する神経回路の性差には不明な点が多い。本研究では、マウスの視床下部に発現し、摂食行動に寄与する神経ペプチドの性差を明らかにする事を目的とした。雌雄マウスのMBHにおける神経ペプチドのmRNA発現を、胎仔期から成熟期にかけて解析をした。その結果、摂食を亢進させる3種類の神経ペプチド（Npgl, Agrp, NPY）に雄優位な性差があった。それらの発現調節における生殖腺ホルモンの役割を解析しところ、NpglとAgrpは、雄の精巣から分泌されるアンドロゲンの作用で発現が上昇することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、性差を考慮した医療（性差医療）の発展が望まれている。摂食障害のリスクは実験動物からヒトに至るまで、雌において高く、性差を考慮する必要がある。摂食行動を制御する脳の性差の理解は、病態の理解や治療法開発に役立つと考えられ、不明な点が多い。本研究ではマウスを用いて、摂食行動の制御中枢である視床下部に発現する神経ペプチドの性差とその形成機構を明らかにした。摂食を亢進する作用がある3つの神経ペプチドに雄優位な性差があり、そのうち2つは成熟期に精巣から分泌されるアンドロゲンの働きで発現が増加することが示された。これらの研究成果は、摂食障害の性差医療開発に資する基礎知見になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sex differences in the brain are involved in sex differences in feeding behavior and eating disorders; however, neural mechanisms of feeding behavior remain unclear. This study aimed to clarify sex differences in feeding behavior-relating neuropeptides in the mouse hypothalamus. We analyzed the mRNA expression of neuropeptides in the hypothalamus of male and female mice from the fetal to the adult period. We found male-biased sex differences in three neuropeptides (Npgl, Agrp, and NPY) that enhance feeding. Next, we analyzed the role of gonadal hormones in regulating their expression and found that the mRNA expression of Npgl and Agrp was upregulated by androgens testicular androgens.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：マウス 性差 摂食 神経ペプチド 性ステロイドホルモン アンドロゲン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多くの疾患の病態や薬の副作用に性差があることが明らかになり、性差を考慮した医療(性差医療)の発展が望まれている。過食症や拒食症などの摂食障害には性差があり、性差医療が必要な疾患である。摂食障害の性差は、思春期以降に顕著になり、発症率は成人男性より成人女性の方が10倍高い。マウスやラットでも、嗜好性が高い餌を与えた時に過食や、ストレスを与えた時に拒食を起こす頻度は、春機発動期(思春期に相当する時期)以降、雄よりも雌の方が高くなる。このことから、生物学的な性差は摂食行動、ひいては摂食障害に性差を生む重要な要因であり、動物実験から得られる知見が病態の理解や治療法開発に役立つと考えられる。しかし、摂食行動の性差が形成されるメカニズムは未解明であり、摂食障害の性差医療を開発する妨げになっている。

摂食行動を制御する脳の視床下部には形態学的な性差がある。これまでの研究から、マウスの脳の性差形成には、周生期(出生日の前後数日間)に精巣から一過的に大量分泌されるアンドロゲンと、春機発動期に雌雄の生殖腺から分泌される性ステロイドホルモンが重要であると考えられている。このことから、性ステロイドホルモンの作用によって脳に性差が生じ、ひいては摂食行動に性差が生じる可能性がある。

Neurosecretory Protein GL (*Npgl*) は視床下部内側基底部 (mediobasal hypothalamus: MBH) で近年発見された神経ペプチドであり、摂食行動の増加や末梢での脂肪の合成・蓄積を促す作用があるため、摂食障害や肥満の治療薬のターゲットになることが期待されている。視床下部には他にも既知の摂食関連遺伝子が多数存在するが、それらの性差や性差形成機構は不明である。

## 2. 研究の目的

マウスを用いて MBH に発現する摂食関連遺伝子の性差とその形成機構を明らかにするため、成熟期において MBH に発現する主要な摂食関連遺伝子 (*Npgl*, *Npgm*, *Agrp*, *Pomc*, *Npy*) の mRNA 発現量の性差を比較し、その性差が出生から成熟期に至るまでの発達過程のどの時期に生じるのかを調べ、摂食関連遺伝子の性差を生む因子を同定する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) MBH における摂食関連遺伝子発現の性差の解析

成熟期の MBH において、発現量に性差がある摂食関連遺伝子を同定するため、成熟雌雄マウスの MBH を採取し、RT-qPCR により *Npgl*, *Npgm*, *Agrp*, *Pomc* 及び *Npy* の mRNA 発現量を比較した。

### (2) 発達過程における摂食関連遺伝子の発現変化の解析

摂食関連遺伝子に性差が生じる時期を特定するため、胎生 18 日、出生 5、20 及び 35 日の雌雄マウスから MBH を採取し、PT-qPCR により *Npgl*, *Npgm*, *Agrp*, *Pomc* 及び *Npy* の mRNA 発現量を比較した。

### (3) 摂食関連遺伝子の性差形成に対する性ステロイドホルモンの影響の解析

成熟期の生殖腺ホルモンが摂食関連遺伝子の発現量に及ぼす影響を明らかにするため、成熟雌雄マウスに性腺除去と性ステロイドホルモンの代償投与を施し、(1)の実験で性差が確認された摂食関連遺伝子の mRNA 発現量について、処置の影響を解析した。

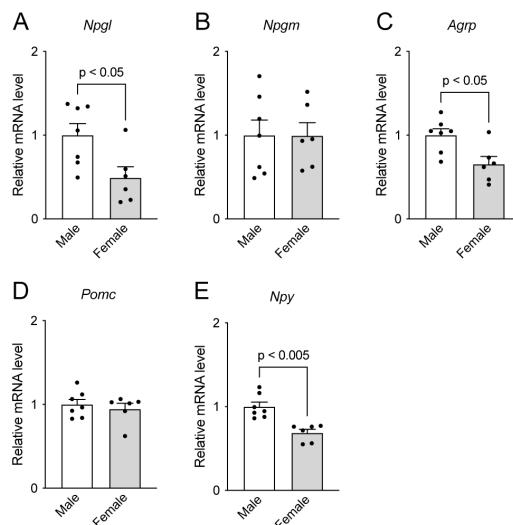
### (4) エストロゲン受容体の発現解析

MBH は性ステロイドホルモンの核内受容体が発現する。アンドロゲン受容体 (AR) とエストロゲン受容体の一種である ER $\alpha$  が豊富に発現する事は古くから知られているが、もう一つのエストロゲン受容体である ER $\beta$  は検出が困難であり、発現部位が同定されていない。そこで、MBH における ER $\beta$  の発現を明らかにするため、所属研究室で新たに開発された免疫組織学的手法を用いて、ER $\beta$  発現部位のマッピングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) MBH における摂食関連遺伝子発現の性差

雄マウスは *Npgl*, *Agrp* 及び *Npy* の mRNA 発現量が、雌マウスよりも多い事が明らかになった。これら 3 つの遺伝子は全て摂食を促進する作用が



成熟雌雄マウスの MBH における摂食関連遺伝子の性差

ある神経ペプチドであることから、摂食量の雄優位な性差に寄与する可能性が示唆された。

#### (2) 発達過程における摂食関連遺伝子の発現変化

脳の性分化に重要な周生期と春機発動期の前後における摂食関連遺伝子の発現量を解析したが、どの時期においても性差はみとめられなかった。このことから、(1)で明らかになった *Npgl*、*Agrp* 及び *Npy* の性差は、成熟期において生じると考えられた。

#### (3) 摂食関連遺伝子の性差形成に対する性ステロイドホルモンの影響

雄マウスの精巣を切除すると、*Npgl* と *Agrp* の mRNA 発現量が減少することが明らかになった。一方で、*Npy* には影響がなかった。また、雌マウスの卵巣を除去しても、これらの遺伝子の mRNA 発現量に変化は見られなかった。

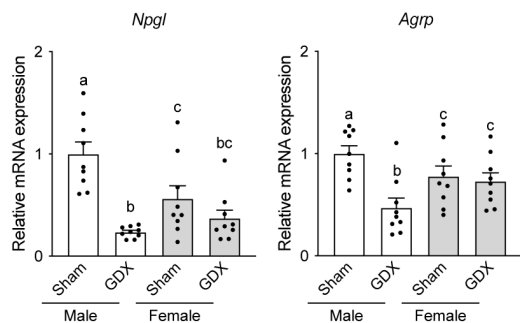
精巣を切除した雄マウスにテストステロン、ジヒドロテストステロン、17β-エストラジオールを代償投与すると、いずれの処置でも *Npgl* mRNA 発現が上昇した。その影響は、テストステロン > ジヒドロテストステロン > 17β-エストラジオールの順に大きかった。一方で、*Agrp* mRNA 発現は、テストステロンと 17β-エストラジオールを代償投与すると上昇したが、ジヒドロテストステロンでは変化しなかった。

MBH には神経ステロイド合成酵素が発現していることから、精巣から分泌されたテストステロンは、5 $\alpha$ -リダクターゼによりジヒドロテストステロンに変換されてアンドロゲン受容体に結合する経路と、アロマトラーゼにより 17β-エストラジオールに変換されてエストロゲン受容体に結合する経路との2つの作用経路が想定される。本研究の結果から、MBH における *Npgl* と *Agrp* の mRNA 発現量の性差形成には、成熟期に精巣から分泌されるテストステロンが寄与することが明らかになった。さらに、テストステロンは、アンドロゲン受容体とエストロゲン受容体の両方（主にアンドロゲン受容体）を介して *Npgl* mRNA を上昇させ、エストロゲン受容体を介して *Agrp* mRNA を上昇させると考えられた。

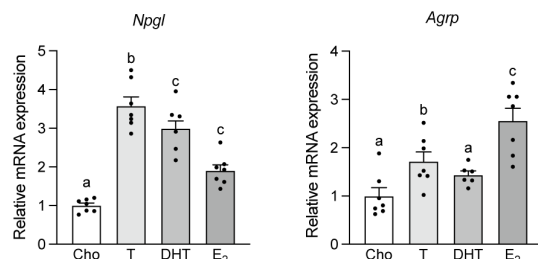
#### (4) MBH における性ステロイドホルモンの発現解析

組織学的解析の結果、MBH のいくつかの亜領域（前腹側室周囲核、視索前核、分界条床核、視床下部室傍核、円形核）に ERβ が発現する事が明らかになった。しかし、*Npgl* と *Agrp* が主に発現する弓状核には ERβ は発現していなかった。過去の先行研究から、弓状核には AR および ER $\alpha$  が発現することが示されている。以上の事から、*Npgl* と *Agrp* の発現調節に ER は関与せず、AR と ER $\alpha$  が関与すると考えられた。

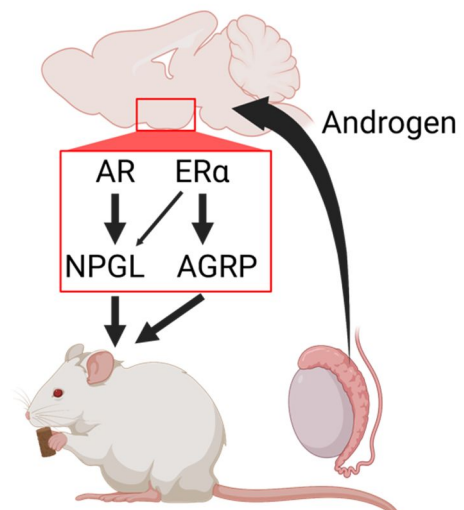
以上の成果から、マウスの MBH では、2種類の摂食促進に働く神経ペプチド（*Npgl* と *Agrp*）の発現に雄優位な性差があることが示された。さらに、その性差は成熟期に精巣から分泌されるアンドロゲンの作用で形成されるが、*Npgl* と *Agrp* の発現調節におけるアンドロゲンの作用機序は異なることが示唆された。生殖腺の発達に伴い、摂食障害の性差が顕著になるという臨床的な知見と、摂食促進に働く神経ペプチドの性差が生じる時期が一致することを示した本研究の成果は、摂食障害のリスクや治療法を研究する上で非常に重要であると考えられる。今後、これらの神経ペプチドの性差が、摂食行動の量や質の違いにどのように寄与するのかを解析していきたい。



Npgl と Agrp mRNA 発現に対する生殖腺切除の影響



Npgl と Agrp mRNA 発現に対する性ステロイドホルモンの代償投与の影響



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 2件）

1. 著者名 Tsukahara Shinji, Morishita Masahiro, Sasaki Shiho, Wakayama Kanta, Kobayashi Kaito, Ohno Koichi, Kawashima Takaharu	4. 巻 314
2. 論文標題 Sexually dimorphic expression of sexual differentiation genes in the internal genital organs of Japanese quail embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113917 ~ 113917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2021.113917	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 -

1. 著者名 Narimatsu Yuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Fukumura Keisuke, Shikano Kenshiro, Furumitsu Megumi, Morishita Masahiro, Bentley George E., Kriegsfeld Lance J., Ukena Kazuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Hypothalamic Overexpression of Neurosecretory Protein GL Leads to Obesity in Male C57BL/6J Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroendocrinology	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） 10.1159/000518969	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 Morishita Masahiro, Higo Shimpei, Hattori Yujiro, Ozawa Mina, Otsuka Mai, Matsumoto Keisuke, Ozawa Hitoshi, Ishii Hirota	4. 巻 -
2. 論文標題 Immunohistochemistry for ESR2 with a mouse monoclonal antibody (PPZ0506)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	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） 10.1272/jnms.JNMS.2023_90-209	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiro Morishita, Moeri Mitsuzuka, Yosuke Tsuneoka, Shuhei Horio, Kazuto Kobayashi, Shigeki Kato, Shinji Tsukahara
2. 発表標題 A male-specific neuronal projection from the medial preoptic area to the ventral tegmental area is involved in the control of male sexual behavior in mice
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/第1回CJK国際会議（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下雅大, 三塚萌里, 小野浩太, 恒岡洋右, 堀尾修平, 加藤成樹, 小林和人, 塚原伸治
2. 発表標題 内側視索前野の性的二型性を確立するニューロンの形態学的特性、生理機能および性差構築機構の解析
3. 学会等名 第47回神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林海斗, 三塚萌里, 森下雅大, 恒岡洋右, 塚原伸治
2. 発表標題 内側視索前野の性的二型性を確立するカルピンディンニューロンの雄性行動制御における役割
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2021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