

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700331

研究課題名(和文)新規視床下部神経核SGNの摂食・エネルギー代謝調節メカニズムへの関与の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the functions of a newly identified hypothalamic region.

## 研究代表者

森 浩子(MORI, HIROKO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60616895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、Sagittalis Nucleus (SGN)の生体機能の解明である。SGNはホルモンの作用と協調し摂食調整に関与している可能性が高い。本研究では、SGNとその周辺領域にある受容体の中から、エストロゲンシグナルとの関連が考えられるヒスタミン受容体1(H1R)に注目した。H1Rの分布はエストロゲン受容体(ER)の分布と一致しており、SGN周辺領域のエストロゲン感受性ニューロンのほとんどがヒスタミンへの感受性を有している事がわかった。特に視床下部腹内側核ではERとH1Rを高発現するニューロンが確認でき、エストロゲン依存的な食欲調節へのヒスタミンシグナルの関与が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to reveal physiological function of sagittalis nucleus of the hypothalamus (SGN) that was newly-identified. SGN are located in a target of sex steroid action that is important for central regulation of food intake and reproduction. We found that neurons in SGN and its surrounding region express histamine receptor 1 (H1R). H1R is exclusively located in the ventrolateral subregion of the female ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMN), coexistent with estrogen receptor alpha. Intriguingly, H1R located in the vlVMN showed sensitivity to estrogen, since H1R mRNA was induced in ovariectomized female rats treated with estrogen benzoate. These brain regions have a well-known role in modulation of estrogen-induced feeding and sexual behavior. These finding that the femal VMN contains high levels of estrogen-regulated H1R in the vl region suggests a causal link between histamine signaling and estrogen-induced behavioral function.

研究分野：神経科学 神経内分泌

キーワード：エストロゲン 摂食

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は2008年にラット視床下部領域において、今まで報告されていない新たな神経核、Sagittalis Nucleus (SGN)を発見し (Mori et al. 2008. PNAS)、SGNの脳内での詳細な位置の特定、SGNを構成する神経細胞の形態的特徴を明らかにし (Mori et al. 2009. J Neuroendocrinol)、その機能の解明へむけての研究基盤を確立してきた。SGNは神経内分泌学的に重要な領域に位置しながら、他の研究者によって検証されていない未知の領域である。これまでの森の研究により、SGNの特徴として以下のものがあげられる。

- (1) SGNの大きさ、細胞数が で異なる。
- (2) SGNにはエストロゲン受容体 (ER ) が豊富に発現している。
- (3) SGNのER 発現量は血中のエストロゲンレベルによって変化する(エストロゲンに対する感受性が高く、排卵前など高濃度のエストロゲン環境下でER 発現量が減少することをmRNAレベル、タンパクレベルで確認した。逆に卵巣摘出によって雌のSGNのER 発現量が増加し、その後のエストロゲン補充投与によって再び減少することを確認した。
- (4) SGNにはヒスタミン受容体 (H1R) が発現しており、ER と共存している(中枢ヒスタミンは近年、摂食機能調整および性機能発現との関連が注目されている)。
- (5) SGNにはcalbindinD28kおよびGABAの合成酵素であるGAD67が発現しており、ER と共存している。

近年、摂食のあり方や体のエネルギー代謝の中枢制御機構への関心が高まる一方で、中枢性の摂食異常症が広く認知され、摂食関連障害の病態解明と摂食調節機構の解明が求められている。摂食障害が女性に多いこと、発症時期が思春期という女性ホルモンの分泌が著しく変化する時期に集中していることから、摂食中枢制御系において、エストロゲンが重要な役割を担っていると考えている。これまでの研究で、近年摂食調節への関与が注目されている神経ヒスタミンの特異的受容体 (H1R) がSGNを中心とした領域に発現していることを新たに確認している。SGNは性ホルモンや摂食関連ペプチド・ホルモンと強調してはたらし、摂食調節機構に深く関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が新たに同定した神経核、SGNの生体での機能の解明である。SGNは摂食・性行動の中枢制御を行う脳領域内に位置し、女性ホルモンや摂食関連ペプチド・ホルモンの作用と協調し摂食(摂食パターン、摂食量)や性行動の調整に関与している可能性が高い。本研究では、新規神経核SGNの摂食御機構・エネルギー代謝調整機構および性行動発現機構への関与を検証する。

## 3. 研究の方法

SGNはエストロゲンとペプチド、アミンなどの各種神経伝達物質の相互作用により、摂食調整および代謝機能調整に関与しているものと考えられる。その生体内での役割を明らかにするため、生体を用いた解析、脳組織を用いた組織学的解析および mRNA およびタンパクの定量解析の複数のアプローチから実験を遂行した。

組織学的解析ではSGNおよびその周辺領域における摂食関連ペプチド(摂食促進系および摂食抑制系)およびそれらの特異的受容体の分布のマッピング(固定脳組織を用いた組織学的解)を主にラットモデルを使用して行った。成体雌ラット(SDラット、10週齢)を2% isofluraneによる麻酔下で安楽死させ死亡確認後に4%パラフォルムアルデヒドにより還流固定し、脳を摘出してサンプルとした。

mRNA およびタンパクの定量解析では、成体雌ラット(SDラット、10週齢)を2% isofluraneによる麻酔下で安楽死させ死亡確認後に、マイクロピプラトームを用いて関心領域である視床下部の脳組織を摘出し、ライセートに溶解し使用した。

生体を用いた解析では、マウスに栄養価の異なる特殊飼料を与えて飼育し、まずは体重および摂食量への影響を観察した。脂質代謝系を亢進させるとされる特殊飼料(高脂肪食)を購入し給餌観察した。

すべての動物実験の実施にあたり、京都府立医科大学の定める動物実験委員会の承認のもと、動物の愛護および管理に関する法律、実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準及び研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針並びに日本学術会議が作成した動物実験の適正な実

施に向けたガイドライン、その他法令等に定めがあるもの及び京都府立医科大学の定める規定に従い実施し、科学的観点、動物愛護の観点及び環境保全の観点並びに実施者の安全確保の観点から適正に行った。

#### 4. 研究成果

これまでの研究で、SGN 領域には ER、GABA の合成酵素：GAD67、カルシウム結合タンパク：calbindinD28k (Mori et al. 2008. PNAS) H1R が発現していることを確認しているため、これらの中からエストロゲンシグナルとの関連性が見られるものの同定を試みた。神経伝達物質であるヒスタミンの受容体のうち、サブタイプ 1 (H1R) の分布を、特異抗体 (LS-B1745; Life Span Bio Science, Inc.; 1:1,000 dilution) を用いて蛍光免疫染色により観察したところ、SGN およびその周辺領域である視床下部弓状核および腹内側核に分布していることがわかった。さらに、エストロゲン受容体の特異的抗体との二重免疫蛍光染色により、H1R と ER は共存していることがわかった。また、腹内側核は腹外側部 [ventrolateral (vl) part]、背内側部 [dorsomedial (dm) part] およびその間の領域 (intermediate area) に分けることができるが、エストロゲンの感受性の強い腹外側部に H1R を高発現する細胞が分布していた。図 1 は ER と H1R 受容体の蛍光免疫染色の結果である。A-C は弱拡大の視床下部で、弓状核 (ARC) と腹内側核腹外側部 (vl VMN) に分布する ER 陽性細胞 (A) に一致して、H1R 強陽性細胞 (赤) が分布していることがわかる。D-F は腹内側核腹外側部の強拡大であり、両者が共発現共存していることが、明確である。図 2 は更に強拡大で観察した像で、ER は核に分布し、H1R は細胞膜に分布していることが明確である。

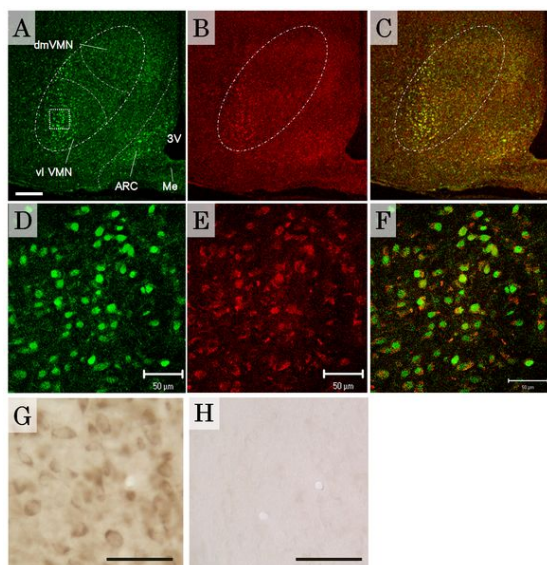


図 1. 視床下部領域の H1R および ER 免疫

二重染色像。ER が緑、H1R が赤で示されている。(Mori et. Al. *PLOS ONE*, 2014. vol. 9 (5), e96232 より)

マウスにおいて腹内側核腹外側部に発現する ER を、siRNA を用いて選択的に抑制すると肥満を呈することから、腹内側核腹外側部における ER の機能が摂食・エネルギー代謝制御に重要であることが示されている (Musatov S et. al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 2501-2506, 2007)。その領域において、ER と H1R が領域特異的に共存するという知見は、エストロゲン依存的な食欲調節との関与が強く示唆された。

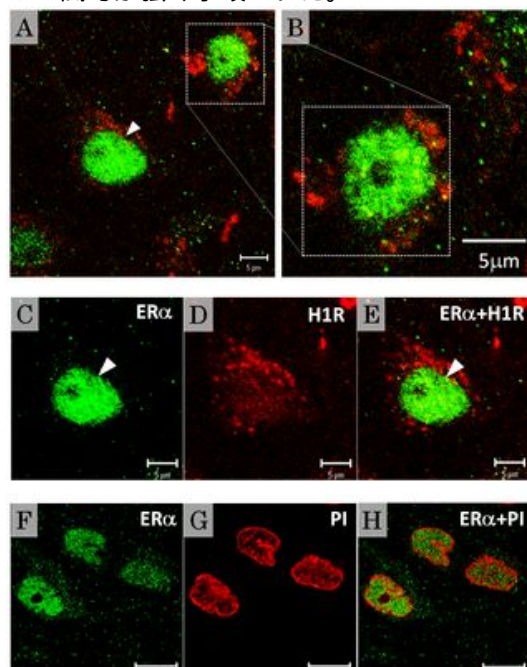


図 2. 腹内側核外側部の H1R および ER 免疫二重染色像 (強拡大)。ER が緑、H1R が赤で示されている。(Mori et. Al. *PLOS ONE*, 2014. vol. 9 (5), e96232 より)

転写制御因子である ER は、プロゲステロン受容体、オキシトシン受容体、バソプレシン受容体など様々な遺伝子の発現調整に関わっていることが知られている (Xu X et al. *Cell* 148: 596-607, 2012, Hewitt SC et al. *J Biol Chem* 285: 2676-2685, 2010)。そこで、実際にこの領域においてエストロゲンシグナルとヒスタミンシグナルの相互作用を調べるために、卵巣を摘出した雌ラットに estrogen benzoate を保管投与し H1R の mRNA 発現量およびタンパク発現量を解析した。

その結果、estrogen benzoate 投与後 24 時間から 48 時間にかけて腹内側核腹外側部の H1R mRNA が著しく増加することがわかった [図 3 A 卵巣摘除群 (OVX Oil 群) に比べ、estrogen benzoate 投与 24 時間群 (OVX+EB5 24h) と estrogen benzoate 投与 48 時間群 (

OVX+EB5 48h) において有意に H1R mRNA 発現が高い。]。さらに興味深いことに、このエストロゲン依存的な H1R 発現上昇は、もう一つの女性ホルモンであるプロゲステロンによって抑制された[図 3A estrogen benzoate 投与 24 時間後にプロゲステロンを投与した群( OVX+EB5+P)では卵巣摘除群( OVX Ovl 群)と同程度の発現量しか示さない。]。また、このような変動は、ER と H1R の共存が希である腹内側核背内側部では検出されなかった(図 3B)。この結果は、腹内側核腹外側部において、エストロゲンが ER を介して H1 受容体の発現を正に制御していることを示していた。

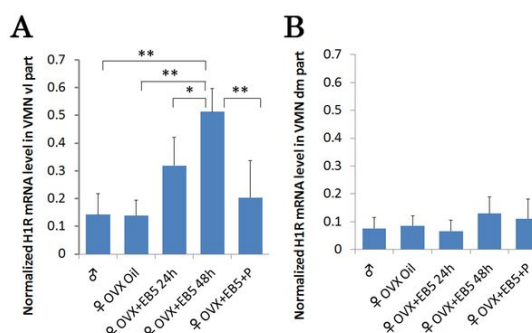


図 3. 卵巣摘出雌ラットへの estrogen benzoate 補充投与による腹内側核腹外側部の H1mRNA 発現量への影響。卵巣摘出雌ラットへの estrogen benzoate の投与により、H1R mRNA 発現量が増加した。(Mori et. Al. *PLOS ONE*, 2014. vol. 9 (5), e96232 より)

このように、エストロゲンによって H1R の発現量の制御が行われることは、これまでに報告がなく、本研究によって初めて明らかにされた。

これまでに、ヒスタミンは H1R を介して脳に作用し食欲抑制効果を示すことが明らかになっている。しかしながら、具体的な作用部位は同定されていない。本研究の結果は、エストロゲンとヒスタミンへの感受性を持つ視床下部腹内側核の神経細胞が、エストロゲン依存的な摂食制御に関与している可能性が考えられた。これらの知見は、視床下部の ER 陽性神経で発現する H1R が、中枢性摂食障害や女性ホルモンの攪乱に伴う摂食・代謝異常症等の発症原因の解明につながる可能性があり、今後は H1R のアゴニストやアンタゴニストと組み合わせて、摂食の中枢制御系への影響を検証したい。

一方、生体を用いた解析では、マウスに脂質代謝系を亢進させると思われる特殊飼料(高脂肪食)を購入し給餌観察し体重および摂食量への影響を一定期間観察した。体重の変動が確認できた後に、脳組織を取り出し、SGN お

よびその周辺領域における摂食関連因子の変動を解析する予定であったが、当初想定していたマウスの体重変動が認められず、特殊飼料の配合比率の決定等の予備実験の段階などで難航したため中断し、短期間で確実に結果の出せる組織学的検証に切り替えた。

本研究で得られた結果の一部は、論文としてまとめ、*PLOS ONE*, (2014) vol. 9 (5), e96232 として成果発表した。

#### 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 2件)

(1) Estrogenic regulation of histamine receptor 1 expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus in female rat.

Mori H (他3人、第一著者)

*PLOS ONE*, (2014) vol. 9 (5), e96232.

査読あり

(2) 「脳と食」摂食中枢のしくみ

森 浩子

嚙下医学 第4巻1号 63-67 (2014)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

【PLOS ONE オンライン速報版掲載】エストロゲンが神経ヒスタミン受容体の発現を制御

<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2014/20140512.html>

エストロゲンが神経ヒスタミン受容体の発現を制御

<http://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2014/files/7551.pdf>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

森 浩子 (MORI, Hiroko )

京都府立医科大学大学院 総合医療医学  
教育学 助教

研究者番号：60616895

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：