

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890260

研究課題名(和文) 味覚の発達を支える島皮質味覚野における摂食抑制因子のシナプス伝達修飾作用

研究課題名(英文) Anorectic factor modulates synaptic transmission in the insular cortex

研究代表者

武井 浩樹 (TAKEI, Hiroki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50632543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：パッチクランプ法を用いて、摂食抑制因子であるレプチンまたはインスリンの島皮質における局所神経回路に対する修飾作用を明らかにすることを目標とした。

レプチンを投与することにより抑制性シナプス後電流の振幅が濃度依存的に増加し、これはシナプス前ニューロンに作用していることを明らかとした。さらにレプチン受容体の各細胞内伝達経路阻害薬を用いることにより、レプチンによる抑制性シナプス後電流の振幅の増加はPI3-KまたはSTAT3経路を介して生じていることを明らかとした。これらの結果よりレプチンは島皮質における味覚情報処理に対して抑制的に作用すると示唆される。

研究成果の概要(英文)：Leptin and insulin are hormone that suppress appetite. The insular cortex (IC) expresses high density of these receptors. However almost no information is about the functional roles of leptin and insulin in the IC. To explore this, I performed multiple whole-cell patch clamp recording in the IC slice preparation. I found that the amplitude of excitatory postsynaptic current (EPSC) was decreased by leptin. In contrast to EPSC, leptin increased the amplitude of inhibitory postsynaptic current (IPSC) in fast-spiking neuron (FS) to pyramidal cell (Pry) connections via phosphoinositid 3-kinase (PI3-K) and signal transducers and activators of transcription factors 3 (STAT3) cascade. The facilitative effect of leptin on the IPSC were dose dependent. These results suggest leptin is likely to play a role in suppression of gustatory information processing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：レプチン 島皮質

1. 研究開始当初の背景

近年、社会的に健康意識が高まっており、成人病を予防する様々な啓蒙が行われている。その一つとして「食育」が挙げられている。食育とは、食に関する知識を習得し、自らの食を自分で選択する判断力を身につけるための取り組みを目指し、2005年に設定された食育基本法では、国民が生涯にわたって健全な心身を培い、豊かな人間性を育むことを謳っている。「味覚」は食習慣を決定する最も重要な因子である。

味覚情報は脳幹孤束核から視床後内側核を介して島皮質に入力される。入力した情報は、同皮質内に存在する興奮性・抑制性ニューロンによって構成される局所神経回路にて統合・処理させ、さらなる高次脳へと出力される。そこで、味覚の発達を支える一次味覚野である島皮質ニューロンに焦点を当てて研究を行ってきた。

2. 研究の目的

味覚情報は様々な因子の修飾作用により処理されていると考えられ、その一つとして食欲が挙げられる。一次味覚野である島皮質は、摂食中枢である視床下部と密な神経連絡が存在する。したがって、味覚と食欲の情報は島皮質で統合されていると考えられる。

主要な摂食抑制因子としてレプチンとインスリンが知られている。それぞれの受容体は島皮質にて多く分布していることが報告されている。しかし、受容体の存在が確認されているのにも関わらず、その神経活動修飾作用は明らかとされていない。そこで本研究では、多チャンネル同時ホールセル・パッチクランプ法を用いてレプチンおよびインスリンの島皮質における局所神経回路に対する修飾作用を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 実験には Venus 蛍光タンパク遺伝子ノックインラット、いわゆる Venus 発現ラットを用いる。通法によって厚さ 350 μm の急性脳スライス標本を作製する。脳スライス標本を記録用チャンバーに静置し、標準人口脳脊髄液を 2-3 ml/分で灌流する。実顕微鏡および CCD カメラにて記録したい細胞を同定する。この際、蛍光観察にて Venus 陽性ニューロン(抑制性ニューロン)および Venus 陰性ニューロン(興奮性ニューロン)を分別する(図 1A)。記録用ガラス電極に電極内液を充填し、わずかな陽圧を付加した状態で電動マニピュレータにてニューロンにアプローチし、電極の先端がニューロンに到達したら陽圧を解除しギガシールを形成、その後陰圧を付加してホールセルを形成する。パッチクランプ法を用いて膜電位を記録し、脱分極パルスに対する発火パターン、発火閾値などの膜応答特性の差異により記録するニューロンを大別する。分類したニューロンに対し、-60 mV の電

位固定し複数のニューロンから膜電位を同時に記録する。さらに脱分極性パルス刺激(80 mV, 2.5 ms)を各ニューロンに順番に行い、記録するニューロン同士でのシナプス結合を見つける。その後、パルス刺激によって誘発された単一シナプス後電流を各ニューロンより記録する。

(2) シナプス伝達に対するレプチンおよびインスリンの影響を調べるために、レプチンまたはインスリン投与中のシナプス後電流の振幅の変化を解析する。

(3) レプチンおよびインスリンの投与にてシナプス後電流の振幅の変化が認められた場合、それぞれの細胞内情報伝達経路の阻害薬を共投与する。共投与した際の振幅の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) 初めにレプチンの抑制性シナプス後電流(inhibitory postsynaptic current: IPSC)への修飾作用について検討した。

島皮質内の抑制性ニューロンは大きく fast spiking neuron (FS) と non-fast spiking neuron (non FS) に分類でき、興奮性ニューロンは pyramidal neuron (Pyr) である。

レプチン(100 nM)の投与により、FS Pyr の IPSC の振幅が有意に増加した(図 1B)。一方、nonFS Pyr における IPSC の振幅はレプチン投与による変化は認められなかった。

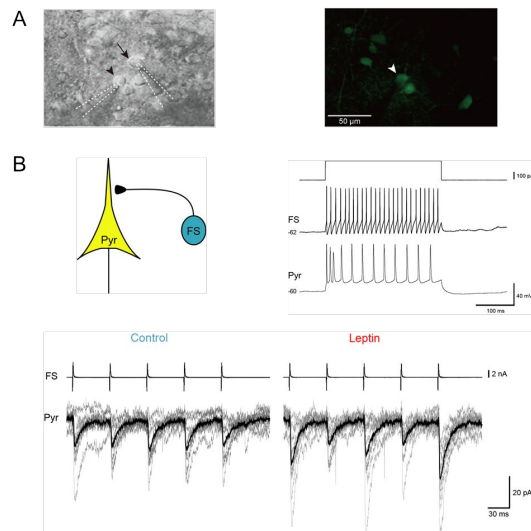


図 1. レプチンによる IPSC の振幅の変化

(2) 次にレプチンによる FS Pyr の IPSC 振幅の増加とレプチンの濃度との関係を調べた。レプチン 0, 10, 100, 300 nM の各濃度での IPSC 振幅の増加率をみると、濃度が高くなるにつれ振幅の増加率が上がった(図 2)。このことより、レプチンによる IPSC 振幅の増加は濃度依存性であることが明らかとなった。

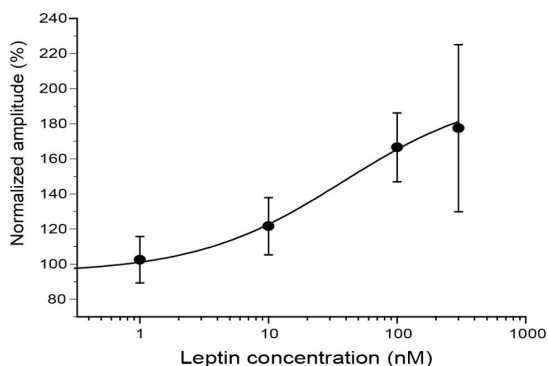


図 2. レプチンの濃度と IPSC の振幅の増加率

(3) レプチンの細胞内情報伝達経路には phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) 経路と mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路、signal transducers and activators of transcription factors 3 (STAT3) 経路が存在する。それぞれの阻害薬をレプチンと共投与した際にレプチン単独投与で認められた IPSC 振幅の増加が生じるかを検討した。

レプチン受容体はチロシンキナーゼ型受容体の一つである。チロシンキナーゼ型受容体と PI3-K 経路、STAT3 経路の阻害薬である Lavendustin A, wortmannin, LY294002, deguelin, AG490 を投与した場合、レプチン単独投与でみられた IPSC の振幅の増加は認められなかった。一方、MAPK 経路の阻害薬である PD98059 を投与してもレプチンによる IPSC の増加がみられた(図 3)。

このため、レプチンによる IPSC の振幅の増加は PI3-K 経路または STAT3 経路を介して生じることが明らかとなった。

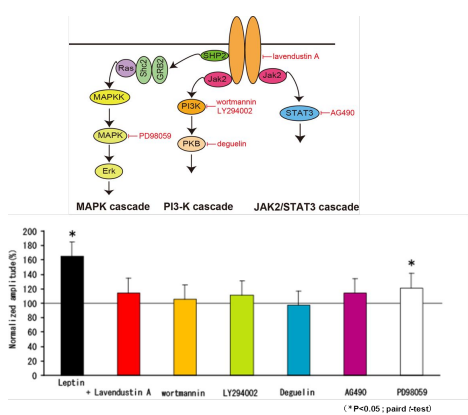


図 3. 各阻害薬による IPSC の振幅の変化

(4) レプチンの興奮性シナプス後電流 (excitatory post synaptic current:EPSC) への修飾作用を調べた。レプチン (100 nM) の投与により EPSC の振幅は有意に減少した(図 4)。

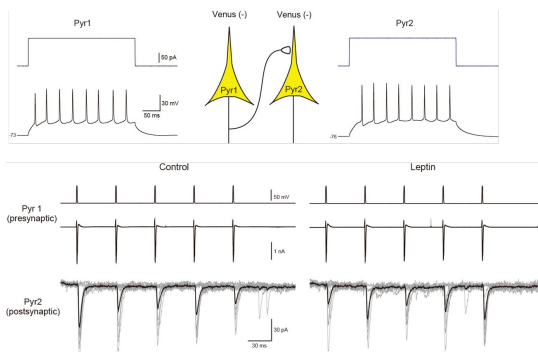


図 4. レプチンによる EPSC の振幅の変化

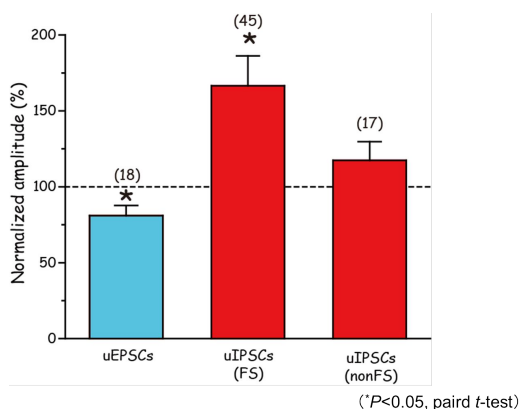


図 5. レプチンによる EPSC と IPSC 振幅の変化

(5) レプチンによる IPSC および EPSC に対する相反的な修飾作用が明らかとなった(図 5)。そこで、レプチンがシナプス前ニューロンとシナプス後ニューロンどちらに作用しているかを調べるために coefficient of variation (CV) 解析を行った。CV 解析は各イベントの振幅の分散を指標としたプロットで、点線で示す Identical line 上にプロットが乗ってくればシナプス前ニューロンに対する作用だと推定できる。

図 6 より、IPSC と EPSC に対するレプチンの修飾作用はシナプス前ニューロンに作用した結果であると考えられる。

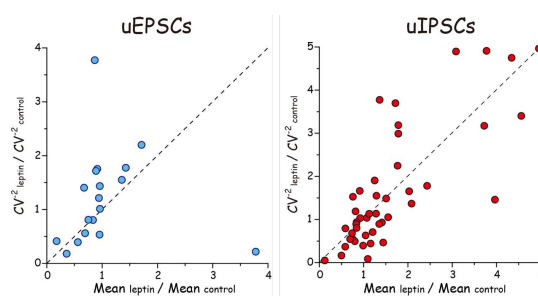


図 6. EPSC および IPSC の CV 解析

(6) (1) ~ (5) の結果より、レプチンは IPSC に促進的に作用し、この修飾作用は PI3-K または STAT3 経路を介して生じていることが明らかとなった。IPSC とは反対に、EPSC には抑制的にレプチンが作用することがわかった。

以上より、レプチンは島皮質における味覚情報処理に対して抑制的に作用することが

示唆される。

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

武井浩樹、中村紘子、白川哲夫、幼若期ラットにおけるレプチンによる島皮質シナプス伝達の抑制作用、第51回日本小児歯科学会大会、2013、5.23-24、岐阜

武井浩樹、小林真之、越川憲明、レプチンはPI3-KおよびJAK2/STAT3経路を介して島皮質シナプス伝達を修飾する、第54回日本歯科基礎医学会、2012.9.15-16、福島

6．研究組織

(1)研究代表者

武井 浩樹 (TAKEI, Hiroki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50632543