

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461391

研究課題名(和文) 若齢期の高脂肪食や甘味料曝露による食の嗜好性構築/記憶化(学習)メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of developing food preference and memorization (learning) through exposure to high-fat diets or sweeteners early in life

研究代表者

屋比久 浩市 (YABIKU, Kouichi)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70545748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食の嗜好記憶形成に関して、若齢期マウスへの高脂肪食給餌が、通常食給餌群と比較して、成獣期の海馬におけるERストレス関連蛋白および遺伝子発現の亢進傾向が認められ、さらに4フェニル酪酸(4PBA)を併投与することで、その発現が通常食給餌群のレベルまで回復した。一方、扁桃体においては、ERストレスの明らかな発現そのものが見出せなかった。海馬のprimary cultureでは、パルミチン酸の添加がERストレスの発現を有意に亢進させ、神経突起成長速度の減弱傾向が認められた。さらに4PBAを前投与した群は、パルミチン酸によるERストレスの発現が抑制され、神経突起成長速度の回復傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：Regarding mechanisms of food preference and memorization (learning), a group fed a high-fat diet for a certain period of time at a young age showed a tendency to be enhanced expressions of ER stress-related proteins and genes in the hippocampus in adulthood, compared with a group fed a normal diet, and their expression levels normalized when fed simultaneously with 4-phenylbutyric acid (4-PBA). The amygdala was similarly examined, demonstrating no significant manifestation of ER stress. An experiment with the primary neuronal culture of the hippocampal region demonstrated that the addition of palmitate significantly increased the manifestation of ER stress and decreased the neurite growth rate. In addition, a group pretreated with 4-PBA showed the decreased manifestation of ER stress even after the administration of palmitate and restored neurite growth rate, compared with a group treated with palmitate alone.

研究分野：糖尿病

キーワード：小胞体ストレス 4PBA 海馬 若齢期 高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

肥満者を効果的に減量させるためには適正なエネルギー量の食事療法が最も重要であるが、その継続は困難な場合が多い。理由の一つは、高次脳機能中枢が司る情動、記憶、ストレスといった「人間らしさ」と食欲とが非常に密接に関連しているからである (Neuroimage 19:1381-94, 2003) (Nat Neurosci 9:381-8, 2006) (Am J Clin Nutr 83:1297-305, 2006)。研究代表者はこれまで、若齢期高脂肪食負荷マウスにおいて、特定の甘味料曝露が視床下部における小胞体(ER)ストレスを有意に上昇させること、それを起点にレプチン抵抗性の惹起、成獣期以降の高脂肪食への嗜好性変容および過体重を招くこと、さらに ER ストレス抑制薬である分子シャペロン 4 フェニル酪酸(4PBA)が、食制御に極めて優れた効果を発揮することを報告した(J Metab Syndr Yabiku K et al.7:26-30, 2010)。しかし、この代謝的遺産(レガシー)効果は視床下部のみの解釈では不十分で、“記憶”の定着化に中心的役割をなす海馬や扁桃体といった、大脳辺縁系報酬ネットワークの関与が強く示唆された。

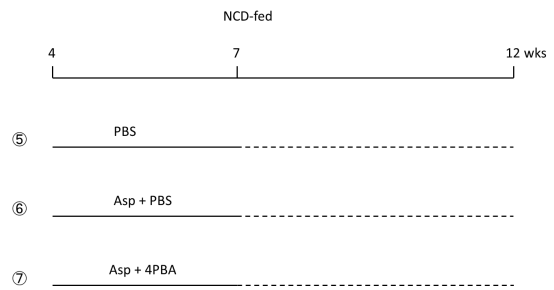
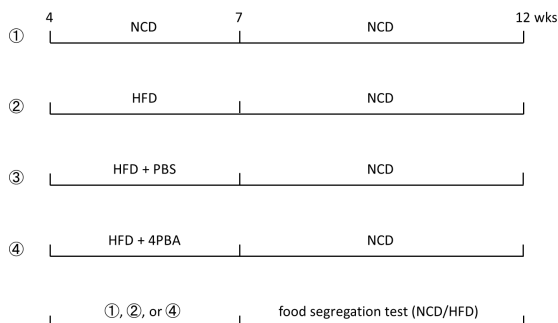
2. 研究の目的

若齢期における高脂肪食給餌や甘味料曝露と成獣期以降の食行動の変容について、その長期記憶化のメカニズムを、大脳辺縁系報酬ネットワークの起点と考えている海馬や扁桃体領域に焦点を絞り解明していく。また、4PBA がこの領域でも ER ストレス抑制効果を発揮し、ひいては成獣期における食行動を制御できるのかを検証していく。

3. 研究の方法

肥満誘発(DIO)モデルである C57BL/6J マウスの若齢期(4~7 週齢)に、高脂肪食(HFD)あるいは通常食(NCD)給餌群に分け、その後の成獣期における“食の嗜好記憶”を海馬および扁桃体領域を中心に比較検証する(~)。さらに、若齢期に甘味料アスパルテーム(Asp)を投与し、同様の検証を行う(~)。

A. 飼育プロトコール



比較項目は、海馬や扁桃体領域における ER ストレス関連因子のみならず、成獣期における摂食行動や体重変化、糖代謝(負荷/血液検査)も検証していく。そして ER ストレスの差異を検証し、さらには ER ストレス抑制薬である 4PBA を共投与後の変化も検証する。次に脳内伝達物質であるモノアミン[セロトニン(5-HT)、DA、ノルアドレナリン(NA)]、さらに各細胞膜トランスポーター[各々、Serotonin transporter (SERT/HIT)、Dopamine transporter (DAT)、Norepinephrine transporter (NET)]について、各拮抗/阻害薬である 5-HT1B 受容体拮抗薬 SB224289 (Physiol Behav 74:507-16, 2001)、methylphenidate、GBR12909、imipramine、cocaine 等の使用を対照として定量解析する。

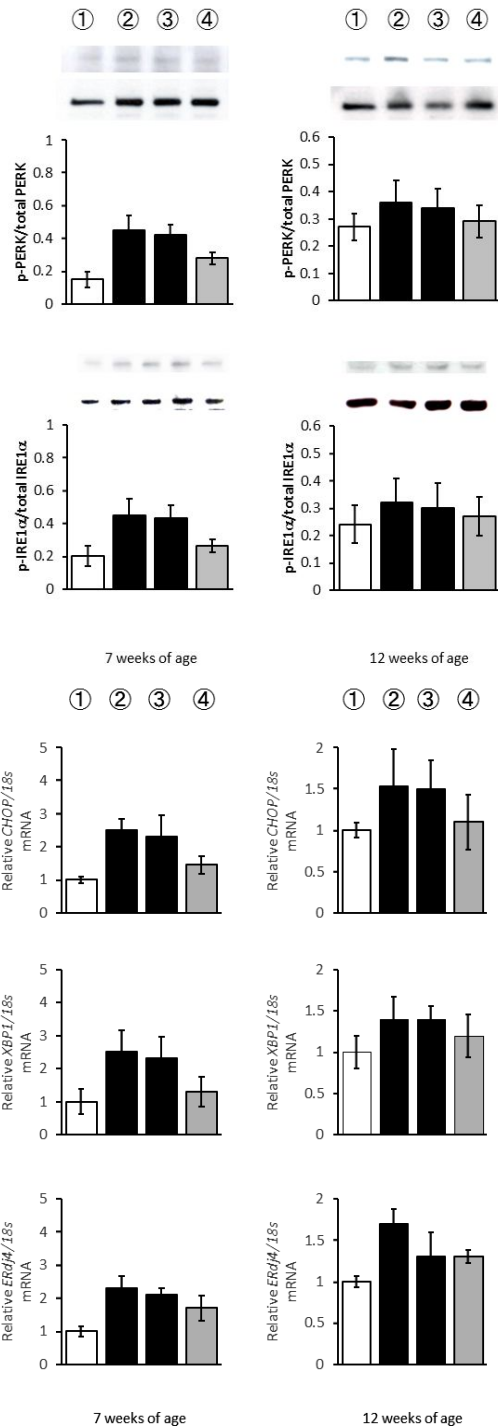
さらにグルタミン酸系興奮性入力回路および GABA 系抑制性入力回路の変容の可能性を検証する。

invitroでは胎児マウス海馬領域から採取した primary neuronal cell に直接パルミチン酸(palmitate)を投与し、ER ストレス関連因子が惹起されるのかを検証し、有意差が認められれば、4PBA で前処置した primary culture と併せて ER ストレス関連因子を制御できるか検証する。

4. 研究成果

若齢期 C57BL/6J マウスに一定期間(4~7 週齢) HFD を給餌した群と、一方は NCD 給餌群とで比較した。まず 7 週齢の時点で、若齢期 HFD 給餌群は海馬における ER ストレス関連因子(PERK および下流の CHOP、IRE1α、XBP1、そして ERdj4)の増強が認められた。さらに 4PBA を供投与することで、HFD 給餌群は、その発現が NCD 給餌群のレベルまで回復した。一方、成獣期 12 週齢においては、海馬における ER ストレス関連蛋白および遺伝子(CHOP、XBP1、そして ERdj4)発現の亢進傾向が認められた(しかし有意差には至らなかった)。そして 4PBA (4 フェニル酪酸)の供投与で、7 週齢マウスと同様に、HFD 給餌群はその発現が NCD 給餌群のレベルまで回復した。本研究では当初、22 週齢においても ER ストレス関連因子を検証していたが、この週齢においては、両群間で差は認められなかった。

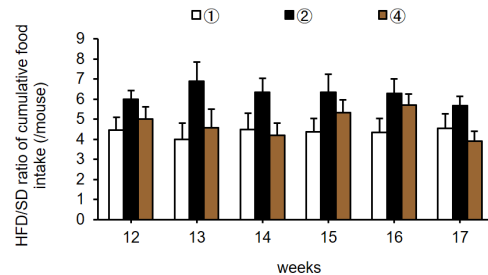
B. 海馬細胞における ER ストレス関連因子



同様の検証を扁桃体領域でも行ったが、ER ストレスの明らかな発現そのものが見出せなかった。

12 週齢では、両群間で体重や耐糖能(糖負荷テストやインスリン感受性テスト)に有意差は認められなかったが、食の嗜好性(food segregation test)において、若齢期 HFD 給餌群は、成獣期以降(12 週齢~17 週齢まで) HFD に対する高い嗜好性を示していた。これも、若齢期に 4PBA を共投与することで、HFD から NCD への嗜好性を回帰できた。しかし 18 週齢以降、各群有意差は認められ

C. 食分けによる食の嗜好行動調査



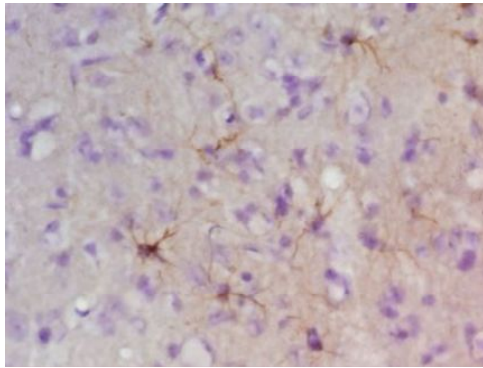
なくなった。この結果からは嗜好記憶の他にも味覚変化(taste alteration)の可能性も考えられたが、その検証は次回の課題としたい。なお、若齢期(4~7 週齢) HFD + Asp 投与により、成獣期以降の HFD に対する高い嗜好性及び、若齢期 4PBA 共投与による HFD から NCD への嗜好性回帰は前回採択された科研費で報告したが(課題番号 22591014)、今回施行した若齢期 NCD + Asp 投与では、成獣期以降の HFD に対する嗜好性変化への影響は認められなかった。

次に、脳内伝達物質であるモノアミン(5-HT、DA、NA)、さらに各細胞膜トランスポーター(各々、SERT/HIT、NET)の定量解析を、各拮抗/阻害薬である 5-HT1B 受容体 antagonist (Physiol Behav 74:507-16, 2001)、methylphenidate、GBR12909、imipramine、cocaine 等の使用を対照として real-time PCR にて検証したが、海馬や扁桃体領域では、若齢期 HFD 給餌あるいは Asp によって、7 週齢や 12 週齢においても、これらの有意な発現亢進あるいは低下は認められなかった。

同時に海馬や扁桃体領域でのグルタミン酸系興奮性入力回路および GABA 系抑制性入力回路の変容の可能性も免疫組織学的手法を中心に検証したが、若齢期 HFD 給餌群あるいは Asp 投与群は、NCD 給餌群と比較して、成獣期での明確な差は認められなかった。

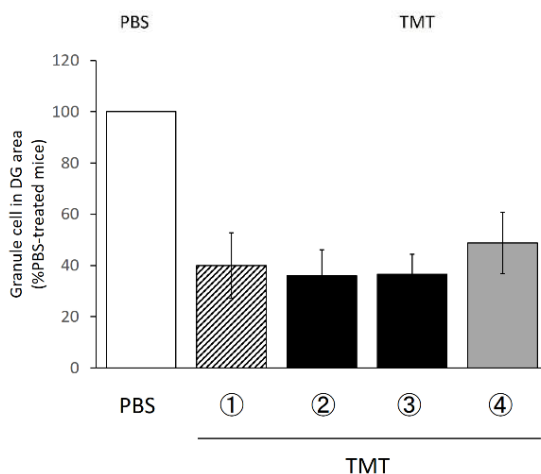
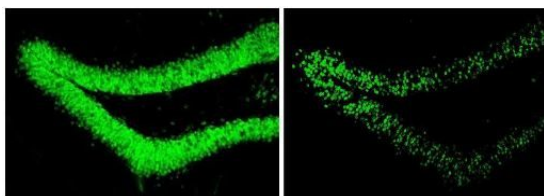
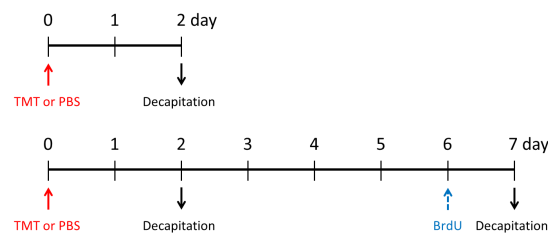
若齢期 NCD 給餌群と HFD 給餌群で、成獣期における海馬 CA1~3 領域及び歯状回(dentate gyrus; DG)領域でのグリア(glia)細胞の集積(グリオシス)について検証したが、明らかな差は認められなかった。

D. 海馬領域におけるグリア細胞



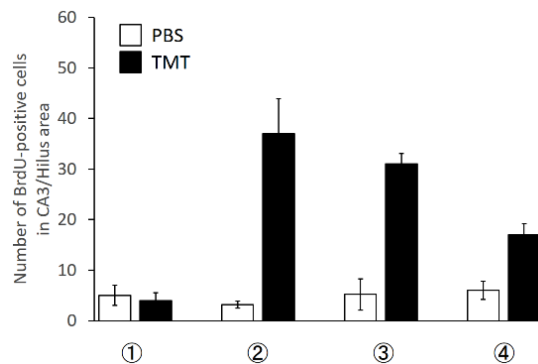
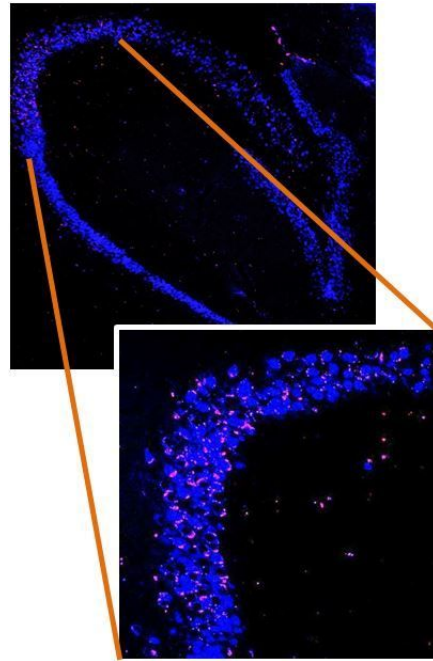
各群成獣マウス(12週齢)で trimethyltin (TMT)処理(0.2mg/100g BW 腹腔内投与)を施し比較したところ、まず TMT 投与2日目に、TMT 非投与群(PBS 投与群)と比較して、DG 領域の顆粒細胞数の有意な減少(神経細胞の脱落)が認められた。しかし ~ 群間で TMT 投与による明確な差は認められなかった。

E. TMT 投与による海馬神経細胞脱落



ところが TMT 投与7日目に、海馬領域(特に CA3 領域)で、若齢期 HFD 給餌群(グループ &)は他の群と比較して、有意に BrdU の取り込み増加が認められた。

F. TMT 投与7日後の海馬神経細胞再生



これは成熟神経細胞マーカーである NeuN の発現も検証したが、BrdU とほぼ同様の結果が得られた。つまり、本実験系では神経細胞死と神経新生の両方が一定の時間差をもって起きていることが示された。そして 4PBA 処置した群において BrdU 取り込みが抑えられていた。これが 4PBA の TMT に対する直接的な作用かどうか、海馬の primary neuronal culture で検証したが、明らかな差は認めなかった。この点を考察するに、若齢期 HFD 給餌が、ER ストレスによる海馬神経細胞の脆弱性を惹起するが、これを 4PBA が抑制することで、TMT 投与後でも神経傷害が軽微で済んだのではないかと考えた。

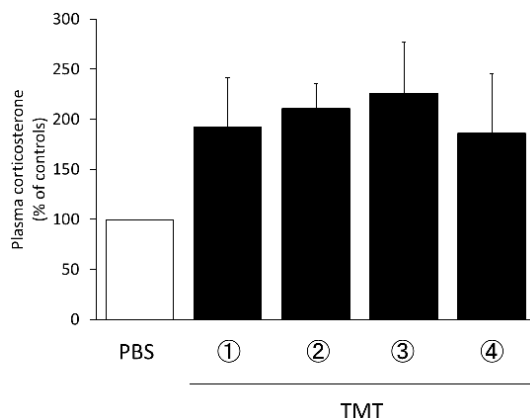
ここで気になる点は、文献的には TMT 投与は、ラットでは CA 及び DG 領域(特に CA3 領域)の神経細胞を傷害するのに対し、マウスでは DG 顆粒細胞を特異的に傷害するはずということである(Haga S. et al. *Acta Neuropathol.*, 103, 2002)(Ogita K. et al. *J. Neurosci. Res.*, 82, 2005)。しかし本実験系では C57BL/6J マウスを使用したにもかかわらず、若齢期 HFD 給餌群の成獣期(12週齢)における TMT 投与が CA3 領域を傷害している

可能性が強く示唆された。これが直接的なものか間接的なものか現時点で不明であるが、この事実はまさに食の嗜好記憶が塗り替えられた重要な手掛かりになるのではないかと考えている。

また、DG 領域は海馬への情報入力の入口である(例えば苔状線維を介して DG から CA3 へ情報伝達される)。したがって TMT を投与した 2 日後の DG 顆粒細胞脱落においても ~ 群間で何らかの差がつくことを予想したが、ここで明確な差がなかったことが BrdU の結果とつじつまが合わない。この一見矛盾する結果を考察するに、DG 領域ではファゴサイトーシスや神経新生が盛んなため形態上の細胞死のみを的確に定量するのが難しいのではないかと推察した。

他にも、TMT は血中コルチコステロン量の持続的増加を引き起こすこと(Tsunami S. et al., *Exp. Neurol.*, 171, 2001)、そして血中コルチコステロンの過剰分泌は神経細胞に対して傷害的に働くことや神経新生を抑制することも報告されていることから(Nichols N.R., et al., *Brain Res. Rev.*, 48, 2005)、本研究の BrdU や NeuN の結果がコルチコステロンによる間接作用の可能性も考えられた。そこで TMT 投与 2 日後に血中コルチコステロンも測定した。その結果、TMT 非投与群と比較して確かに TMT 投与群は血中コルチコステロン値が約 2 倍量に上昇した。しかし TMT 投与した ~ 群間で明らかな差は認めなかった。

G. TMT 投与後の血中コルチコステロン

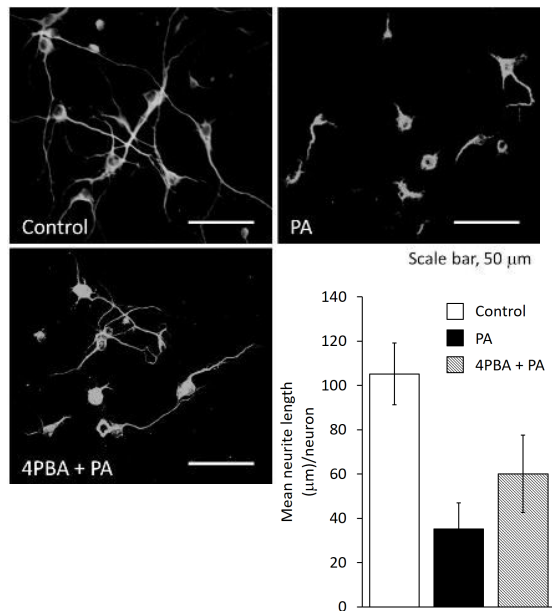


したがって、海馬領域での BrdU 取り込みの差は、若齢期 HFD 給餌による影響の差と判断するのが理にかなっている。

最後に、海馬領域の primary neuronal culture を使用し、パルミチン酸 (palmitate; PA) や 4PBA の直接添加による ER ストレスの発現および神経突起成長速度を検証した。その結果、PA の添加により ER ストレス関連遺伝子 (CHOP, XBP1、そして ERdj4) の発現亢進が認められ、同時に神経突起成長速度の有意な減弱が認められた。さらに 4PBA を前投与した群は、その後 PA を投与しても、上記 ER ストレス関連遺伝子の発現亢進が抑制され、

PA 単独投与群と比較して、神経突起成長速度の回復傾向が認められた。

H. 海馬 primary culture における PA および 4PBA の影響



以上より、若齢期 HFD 給餌によって成獣期における海馬神経細胞の脆弱性が惹起され、その分子メカニズムの一つとして ER ストレスの関与が考えられた。そしてこれが成獣期以降の食の嗜好記憶変容に影響している可能性、さらに 4PBA がこの嗜好記憶変容を有効に制御できる可能性が示された。

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 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

屋比久 浩市 (YABIKU Kouichi)
琉球大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70545758

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ()