

令和元年6月18日現在

機関番号：24701
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2015～2018
 課題番号：15K09442
 研究課題名(和文) 弓状核・室傍核軸の概日リズムによる摂食・エネルギー代謝調節とその破綻機序の解明

研究課題名(英文) The rhythmic activity of neurons in arcuate nucleus and paraventricular nucleus regulate feeding behavior and metabolism.

研究代表者
 中田 正範 (Nakata, Masanori)
 和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10305120
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムは摂食・エネルギー代謝に重要である。本研究では弓状核・室傍核を標的とした時計遺伝子BMAL1のKOマウスを4系統作成・解析を行ったが、いずれのマウスも過食と肥満を呈する事はなかった。

一方、室傍核のNesfatin-1ニューロンの活動リズムが、摂食リズムを調節する事、Nesfatin-1ニューロンのリズム失調が肥満、糖代謝異常、高血圧を引き起こす事を明らかにした。さらに、Nesfatin-1ニューロンの活動リズム形成は、血糖上昇とFGF21により制御されていた。このことから、末梢代謝シグナルによるNesfatin-1ニューロンのリズム形成が、摂食リズムに重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活リズムの乱れ、特に食行動リズムの乱れは生活習慣病を増悪させる。食行動リズムの形成機構を解明することは、生活習慣病の病態の解明および予防・治療に有用である。本研究では、食行動リズムは、室傍核Nesfatin1ニューロンの活動リズムが制御する事を示した。さらにNesfatin-1ニューロンの上流はFGF21、下流はOxytocinニューロンである事も示した。この結果から、FGF21、Nesfatin-1、Oxytocinを標的とした生活習慣病の予防・治療法確立への展開が期待できる。さらに、弓状核・室傍核軸を切り口として血圧制御機構の分子基盤を与え、治療介入点を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Nesfatin-1, an anorectic peptide processed from nucleobindin-2 (NUCB2), is expressed in the hypothalamus including the paraventricular nucleus (PVN). PVN specific NUCB2 knockdown induces LP-selective hyperphagia and reduction of PVN Oxt mRNA expression as early as 3-4 weeks after AAV treatment, which were followed by increases in daily food intake and body weight in later period. These results reveal that the endogenous nesfatin-1 neuron in PVN regulates PVN oxytocin and consequently the energy balance. Furthermore, we clarified that fibroblast growth factor (FGF) 21 is a novel regulator of nesfatin-1 neurons. ICV injection of FGF21 markedly suppressed food intake in fed mice with elevated blood glucose. FGF21 failed to suppress food intake in PVN-preferential Nucb2 knockout mice. These results demonstrate that the PVN nesfatin-1 neurons physiologically sense key peripheral metabolic signals, and thereby regulate circadian feeding rhythm and glucose metabolism.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：摂食行動 室傍核 Nesfatin-1 FGF21 メタボリックシンドローム 弓状核 概日リズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 内分泌系・自律神経系をはじめ多くの生理機能は24時間周期の概日リズムの制御を受けている。時計遺伝子により形成される概日リズムはほとんどすべての細胞に存在しており、光刺激を感受して視交叉上核はすべての細胞の概日リズムを同調している。近年、概日リズムの乱れが生活習慣病を進展させる事が明らかになってきているが、概日リズムの乱れが如何にして摂食・エネルギー代謝を破綻させるのかは、不明な点が多い。

(2) これまでに肥満動物の視床下部室傍核において摂食抑制性ペプチド Nesfatin-1 の遺伝子発現リズムが変調している事、この Nesfatin-1 の発現リズム変調が摂食行動の概日リズム異常を引き起こす事を報告してきた。さらに、肥満動物の室傍核で時計遺伝子 BMAL1 の発現リズムが変調している事を見出していた。一方で、視交叉上核の概日リズムは正常に調律されていたことから、視交叉上核と独立した室傍核概日リズム変調が、神経伝達物質の発現リズムを変調させ、過食・肥満・糖脂質代謝異常を増悪させると、仮説を立てた。

視床下部弓状核から室傍核への神経回路は摂食・エネルギー代謝調節の中軸であり、弓状核の Agouti-related peptide (AgRP) ニューロンは、室傍核を介して摂食行動を惹起する事が報告されている。さらに、時計遺伝子の自発振動発現が弓状核で確認されている。そこで、AgRP ニューロンの自発振動概日リズムが室傍核の概日リズムを調律すると、仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、弓状核 - 室傍核軸の概日リズムによる摂食・エネルギー代謝制御機構、弓状核 - 室傍核軸の概日リズム変調によるメタボリックシンドロームの進展機序を解明し、弓状核 - 室傍核軸の概日リズム改善による摂食・エネルギー代謝失調是正を目指した治療戦略の基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 室傍核 Nesfatin-1 ニューロンの概日リズムによる摂食・代謝調節機構の解析

Nesfatin-1 は Nucleobindin 2 (NUCB2) 由来のペプチドである。そこで、室傍核特異的に NUCB2 の発現を抑制した2種類のマウスを作成した。第1のモデルマウスは、アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて NUCB2 の shRNA 発現ベクター (AAV-NUCB2 shRNA) を作成し、C57B6 マウスの両側の室傍核に脳定位手術により局所投与を行い NUCB2 knockdown (NUCB2 KD) マウスを作成した。対象にはスクランブル配列の shRNA 発現 AAV ベクターを局所投与したマウス (Scr マウス) を用いた。第2のモデルマウスは、室傍核特異的 Cre recombinase 発現の為に Single minded 1 (Sim1) プロモーター制御で Cre を発現する Sim1 Cre マウスをドライバーマウスを入手し用いた。NUCB2 の exon3-6 を挟むように loxP 配列を挿入した NUCB2 flox マウスを樹立した。その後 Sim1 Cre マウスと NUCB2 flox マウスを交配し、Sim1 Cre/NUCB2 flox (NUCB2 KO) マウスを樹立した。対象には Sim1 Cre マウスを用いた。この2種類のマウスの、摂食・代謝の解析を行なった。

(2) 弓状核および室傍核ニューロンの概日リズムによる摂食・代謝調節機構の解析

弓状核の摂食関連ニューロンとして Agouti-related protein (AgRP) ニューロンと Pro-opiomelanocortin (POMC) ニューロンに、室傍核の摂食関連ニューロンとして Oxytocin ニューロンに着目し、AgRP Cre マウス、POMC Cre マウスおよび Oxy Cre マウスを入手した。前述の Sim1 Cre マウスと合わせて4種類のドライバーマウスを、BMAL1 flox マウスと交配し4種類のコンディショナル KO マウス (AgRP Cre/BMAL1 flox マウス、POMC Cre/BMAL1 flox マウス、Oxy Cre/BMAL1 flox マウス、Sim1 Cre/BMAL1 flox マウス) を作成した。この4系統の KO マウスの摂食・代謝の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) マウスでは摂食行動の大半が暗期に行われ、特に暗期の初期と終盤に摂食行動増加する。そして、明期開始とともに摂食行動が停止し、明期の摂食行動は非常に少ない。NUCB2 KD マウスは AAV ベクター投与7週後より体重が Scr マウスに比べて有意に増加した。KD マウスでは3週後より明期の摂食量が、4週後には一日摂食量がその後は体重も有意に増加した (図1)。一方、一日酸素消費量及び呼吸商は変化を認めなかった。この結果から、KD マウスの体重増加は摂食の増加によるものと考えられた。

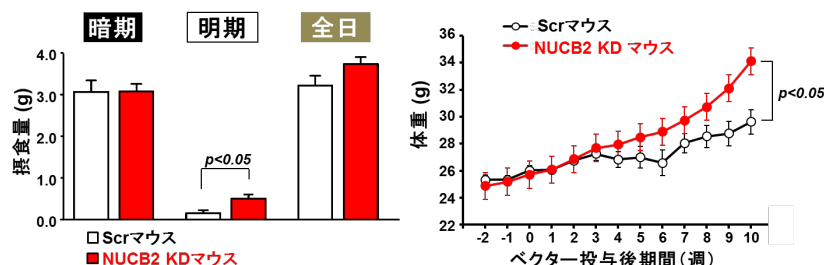


図1 A. 投与3週後の摂食量。B. 投与後の体重変化

Nesfatin-1 の摂食抑制作用は室傍核 Oxytocin ニューロンの活性化を介している事をこれまでに報告しており、KD マウスの明期過食の原因として oxytocin ニューロンの機能異常の関与を検討した。正常マウスでは室傍核の Oxytocin の発現は明期では暗期に比べて上昇しており、明期に oxytocin 受容体阻害剤を脳室内投与すると摂食量が亢進した。一方、KD マウスでは、明期の oxytocin 発現上昇が消失しており、明期野 Oxytocin 阻害剤投与は明期の摂食量に影響しなかった。一方、oxytocin の脳室内投与は KD マウスの明期過食を是正したことから、KD マウスでは Oxytocin ニューロンのリズム障害により明期過食が起こり、摂食リズム障害から肥満と代謝異常が誘発されたと考えられた。

(2) これまでにインスリンやレプチンが室傍核 Nesfatin-1 ニューロンの活性化因子である事を報告してきたが、これらは末梢代謝状況により分泌されるために Nesfatin-1 ニューロンのリズム形成を制御しているとは考えにくい。そこで、分泌に概日リズムがある Fibroblast growth factor 21(FGF21)に着目した。FGF21 は主に肝臓から分泌される内分泌作用をもつ FGF であり、血漿 FGF21 濃度を測定したところ、明期初期に上昇する事を確認した。次に暗期に FGF21 を正常マウスの脳室内投与したところ、短期(3 時間)の摂食量が低下し、室傍核で NUCB2 の遺伝子発現が増加した。次に、NUCB2 KO マウスに FGF21 の脳室内投与を行ったが、FGF21 の摂食抑制作用は観察されなかった。この事から FGF21 は室傍核 Nesfatin-1 ニューロンを活性化し摂食抑制作用を発揮する事が明らかになった。

次に正常マウスの室傍核からニューロンを単離し、FGF21 による単一 Nesfatin-1 ニューロンの活性化を細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を指標に解析した。FGF21 は Nesfatin-1 ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた、さらにこの作用は細胞外グルコース濃度依存性であった(図2)。そこで、絶食マウスで FGF21 の摂食抑制作用を検討したところ、血糖値が上昇する摂食 3 時間以降に摂食抑制作用が観察され、過剰な摂食による過度の血糖上昇が抑制された。この研究により、明期初期には FGF 21 の分泌上昇と暗期終盤の摂食による血糖上昇により室傍核 Nesfatin-1 ニューロンの活性化が起こり、明期の摂食量を調節し、過度の血糖上昇を防止していると考えられる。

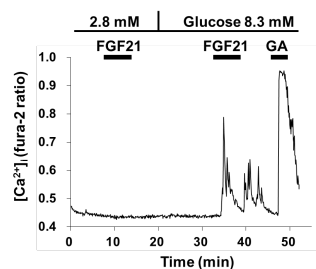


図2 単離室傍核Nesfatin-1ニューロンの細胞内 Ca^{2+} 濃度変化
FGF21は、細胞外グルコース濃度が8.3mMの時は細胞内 Ca^{2+} 濃度を有意に増加させた。一方、2.8mMグルコースの時は細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させなかった。

(3) 4種類のコンディショナルKOマウス(AgRP Cre/BMAL1 flox マウス、POMC Cre/BMAL1 flox マウス、Oxy Cre/BMAL1 flox マウス、Sim1 Cre/BMAL1 flox マウス)の体重を観察したところ、極度の肥満を呈するマウスは見つからなかった。特に POMC Cre/BMAL1 flox マウスと Oxy Cre/BMAL1 flox マウスでは、摂食量と摂食リズムの異常も認めなかった。一方、AgRP Cre/BMAL1 flox マウスでは明期の摂食量が増加していたが、一日摂食量の増加には至らなかった。さらに、行動量や酸素消費量及び呼吸商に関しては異常が認められなかった。また Sim1 Cre/BMAL1 flox マウスも摂食リズムの異常は認められなかった。さらに(1)の研究から、NUCB2 KD マウスでは室傍核の BMAL1 発現リズムが正常であった。

本研究からは、概日リズムは弓状核および室傍核のニューロンにも存在するが、摂食・エネルギー代謝調節に関連するニューロン機能への寄与は少ないと考えられる。血糖やインスリン、レプチン等の末梢代謝情報因子が弓状核および室傍核のニューロンに直接作用し活性調節を行うことをこれまで報告してきたが、本研究と合わせて末梢代謝情報が弓状核-室傍核軸による摂食・エネルギー代謝調節に最重要であると考えられる。特に摂食リズムに関して FGF21 と血糖による室傍核 Nesfatin-1 ニューロンの活性化とそれに惹起される oxytocin ニューロンの活性化が主経路である(図3)。

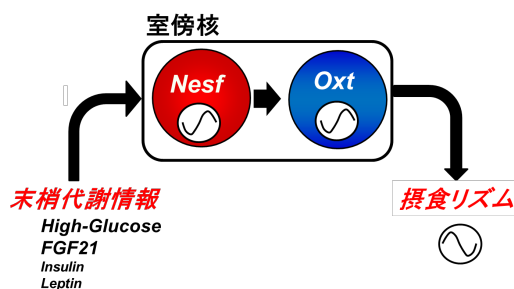


図3 Nesfatin-1ニューロンによる摂食リズム形成の模式図

(4) 体液・血圧調節に関して室傍核の arginine vasopressin (AVP) ニューロンは重要であり、3週間の8%高食塩食により正常マウスでは室傍核で AVP の発現が著明に上昇し、体液量の増加により血圧上昇が起こる。しかし、NUCB2 KD マウスでは室傍核 AVP の発現上昇が抑制され、血圧上昇も観察されなかった。この事から、過剰な塩分摂取(血漿浸透圧上昇)時の AVP による体液調節は室傍核 Nesfatin-1 ニューロンにより制御されている可能性が示唆される。血圧調節に室傍核 Nesfatin-1 ニューロンは関与している事が本研究以外にも多施設からの報告で明らかになってきている。メタボリックシンドロームの肥満、高血圧、耐糖能障害、脂質代謝異常のすべての病態に室傍核 Nesfatin-1 ニューロン機能異常が関連している可能性があり、室傍核 Nesfatin-1 ニューロンを標的とした予防・治療法の有用性を示す事が出来たと考えられる。今後は、臨床応用へ向けた更なる研究の飛躍が期待される。

さらに、4種類のコンディショナルKOマウスに関して本研究では代謝と血圧調節に関してスクリーニングを行ったところ、Sim1 Cre/BMAL1 flox マウスでのみ糖代謝異常が認められた。

本研究期間内には、その病態の全容解明は出来なかったが、今後も研究を継続し解明を目指す必要性があると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Nakata M, Gantulga D, Santoso P, Zhang B, Masuda C, Mori M, Okada T, Yada T. Paraventricular NUCB2/Nesfatin-1 Supports Oxytocin and Vasopressin Neurons to Control Feeding Behavior and Fluid Balance in Male Mice. *Endocrinology*. 査読有, vol. 157, 2016, pp. 2322-2332.

Nakata M, Yamamoto S, Okada T, Yada T. AAV-mediated IL-10 gene transfer counteracts inflammation in the hypothalamic arcuate nucleus and obesity induced by high-fat diet. *Neuropeptides*. 査読有, vol. 62, 2017, pp 87-92.

Santoso P, Nakata M, Shiizaki K, Boy,ang Z, Parmila K, Otgon-Uul Z, Hashimoto K, Satoh T, Mori M, Kuro-O M, Yada T. Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose, activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Sci Rep*. 査読有, vol. 7, 2017 pp, 45819.

Sasanuma H, Nakata M, Parmila K, Nakae J, Yada T. PDK1-FoxO1 pathway in AgRP neurons of arcuate nucleus promotes bone formation via GHRH-GH-IGF1 axis. *Mol Metab*. 査読有, vol. 6, 2017, pp 428-439.

Ota M, Yoshida S, Nakata M, Yada T, Kunugi H. The effects of adjunctive intranasal oxytocin in patients with schizophrenia. *Postgraduate Medicine*. 査読有, vol. 130、2018、pp 122-128.

Iwasaki I, Sendo M, Dezaki K, Hira T, Sato T, Nakata M, Goswami C, Aoki R, Arai T, Kumari P, Hayakawa M, Masuda C, Okada T, Hara H, Drucker DJ, Yamada Y, Tokuda M, Yada T. GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat Commun*. 査読有, vol. 9, 2018, pp 113.

Okamoto S, Sato T, Tateyama M, Kageyama H, Maejima Y, Nakata M, Hirako S, Matsuo T, Kyaw S, Shiuchi T, Toda C, Sedbazar U, Saito K, Asgar NF, Zhang B, Yokota S, Kobayashi K, Fougelle F, Ferré P, Nakazato M, Masuzaki H, Shioda S, Yada T, Kahn BB, Minokoshi Y. Activation of AMPK-Regulated CRH Neurons in the PVH is Sufficient and Necessary to Induce Dietary Preference for Carbohydrate over Fat. *Cell Rep*. 査読有, vol. 22, 2018, pp 706-721.

Zhang B, Nakata M, Lu M, Nakae J, Okada T, Ogawa W, Yada T. Protective role of AgRP neuron's PDK1 against salt-induced hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, vol. 500, 2018, pp 910-916

Zhang B, Nakata M, Nakae J, Ogawa W, Yada T. Central insulin action induces activation of paraventricular oxytocin neurons to release oxytocin into circulation. *Sci Rep*. 査読有, vol. 8, 2018, pp 10415.

Santoso P, Nakata M, Ueta Y, Yada T. Suprachiasmatic Vasopressin to Paraventricular Oxytocin Neurocircuit in the Hypothalamus Relays Light Reception to Inhibition of Feeding Behavior. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 査読有, vol. 315, 2018 pp E478-E488.

〔学会発表〕(計 9 件)

中田正範 他、室傍核 Nesfatin-1 ニューロンによるバゾプレッシン発現と血圧の調節、第 36 回日本肥満学会 2015 年 10 月

Nakata M et al. Paraventricular nucleus NUCB2/nesfatin-1 neurons regulate feeding and glucose metabolism. *Keystone Symposia Conference 2015*, 10, Kyoto.

中田正範 他、FGF21 の中枢性摂食抑制作用と仲介ニューロンの同定、第 59 回日本糖尿病学会 2016 年 5 月

中田正範 他、FGF21 の中枢作用における室傍核 Nesfatin-1/NUCB2 ニューロンの役割、第 37 回日本肥満学会 2016 年 10 月

中田正範、招待講演 視床下部室傍核 Nesfatin-1 ニューロンによる摂食・エネルギー代謝調節、第 21 回アディポサイエンスシンポジウム 2016 年 8 月

中田正範 他、GLP-1 受容体作動薬 Liraglutide の中枢性血糖降下作用のメカニズム、第 60 回日本糖尿病学会 2016 年 5 月

中田正範 他、弓状核 AgRP ニューロンの PDK1 シグナルを起点として血圧調節機構、第 38 回日本肥満学会 2017 年 10 月

中田正範 他、GLP-1 受容体作動薬 Liraglutide の中枢作用による膵 β 細胞増殖促進、第 61 回日本糖尿病学会 2018 年 5 月

中田正範 他、弓状核 AgRP ニューロンの室傍核 Nesfatin-1 ニューロンを介して血圧調節回路、第 39 回日本肥満学会 2018 年 10 月

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/160414/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし