

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500294  
 研究課題名（和文） 辺縁系によるレプチン・メラノコルチン系摂食回路の修飾機構を実験形態学的に視る  
 研究課題名（英文） Morphological analysis of limbic modulation of leptin-melanocortin system in the feeding-related neural circuits

## 研究代表者

安井 幸彦 （YASUI YUKIHIKO）  
 島根大学・医学部・教授  
 研究者番号：30174501

## 研究成果の概要：

摂食行動に対する辺縁系の影響を形態学的立場から調べる目的で、視床下部外側野に存在する摂食関連ペプチド産生ニューロン〔オレキシン（ORX）産生ニューロンとメラニン凝集ホルモン（MCH）産生ニューロン〕への扁桃体や辺縁下皮質からの入力様式を解析した。その結果、扁桃体中心核の投射線維および終末の分布領域と、ORXニューロンあるいはMCHニューロンの分布領域の一致を視床下部外側野において認めた。さらに、扁桃体中心核線維の終末ボタンとMCHニューロンあるいはORXニューロンとの間に対称性シナプスを認めた。次に、視床下部外側野において辺縁下皮質からの投射線維と、MCHニューロンあるいはORXニューロンとの間に非対称性シナプスが形成されることを示唆する所見を得た。さらに、視床下部外側野における扁桃体中心核からの投射線維がγ-アミノ酪酸（GABA）の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素陽性であることを証明した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学/神経病理学

キーワード：神経回路網、視床下部、扁桃体、辺縁下皮質、オレキシン、メラニン凝集ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで、情動行動として表出される顎顔面運動の神経路を明らかにするために、扁桃体中心核から脳幹の顎顔面運動核へ至る連絡路の解析を進めてきた。また、情動行動に伴う自律神経性および内分泌性変化の作動経路として、扁桃体から視床下部へ至る間接路の存在様式について分析してきた。この過程で、ストレスによって食が進まないなど、情動に伴って摂食行動に変化を生じることに基づき、この情動による摂食行動の変化が如何なる神経機構によって発現するのかという疑問を抱くようになった。

Damasio (1995)によると、情動は一次情動と二次情動に分けられ、一次情動は原始的で生得的要素が強く、二次情動は学習に依存し、過去の様々な体験に影響されるという。一次情動は扁桃体を中心とする神経回路で処理され、二次情動は扁桃体を中心とする基本回路に前頭葉内側面皮質が加わって形成されることから、それぞれ扁桃体中心核と辺縁下皮質からの出力が情動反応の表出にとって重要であると考えられる。一方、摂食行動が視床下部によって調節されていることは、1940年代から1950年代にかけて破壊実験によって示され、最近では分子生物学の発展によって、視床下部におけるレプチン・メラノコルチン系神経回路が摂食行動の制御に重要な働きをしていることが明らかとなってきた(Elmqvist et al., 1999)。すなわち、視床下部弓状核にメラノコルチンの一つである色素細胞刺激ホルモン( $\alpha$ -MSH)を産生ニューロンやアグーチ関連蛋白(AgRP)を産生するニューロンが存在し、これらレプチンの支配下にあるニューロンが視床下部外側野に存在するメラノコルチン4受容体(MC4-R)発現ニューロンに作用することによって、それぞれ摂食行動を抑制し、促進すると考えられている。このとき、 $\alpha$ -MSHとAgRPは、それぞれMC4-Rのアゴニストとア

ンタゴニストとして作用する。さらに、視床下部外側野には摂食を促進するメラニン凝集ホルモン(MCH)産生ニューロンやオレキシン(ORX)産生ニューロンが多数分布しており、これらのニューロンはMC4-Rを有することなく、レプチンによって直接抑制されるという。

## 2. 研究の目的

上述した摂食関連物質や受容体を有する視床下部外側野ニューロンと、辺縁系に属する扁桃体中心核および辺縁下皮質の出力線維との連絡様式について、光顕的および電顕的に詳細な解析を行うことによって、情動に伴う摂食行動の変化に関与する辺縁系神経機構の一端を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 扁桃体中心核あるいは辺縁下皮質からの出力線維と、MCH産生ニューロンあるいはORX産生ニューロンの分布様態ならびに接合様態を、視床下部にて光顕的および電顕的に解析した。

① マウスの扁桃体中心核にビオチン化デキストラミン(BDA)を電気泳動的に微量注入し、その1週間後に軸索輸送阻害剤であるコルヒチンを側脳室内に圧注入して、24~48時間後に灌流固定した。

② フリージングマイクロトームを用いて、厚さ50 $\mu$ mの前頭断脳切片を作成し、BDA標識終末をアビジン-ビオチン複合体で検出後、抗MCH抗体または抗ORX抗体を用いて、MCH陽性ニューロンまたはORX陽性ニューロンを検出した。なお、この場合クロモゲンとして、BDA標識終末の検出にはジアミノベンチジンにニッケルアンモニウムを加え、MCH陽性ニューロンとORX陽性ニューロンの検出にはジアミノベンチジンのみを用いた。

③ 光顕下で、BDA 標識終末と MCH 陽性ニューロンあるいは ORX 陽性ニューロンの分布様態や接合様態を、視床下部にて詳細に解析した。

④ 電顕観察の場合には、上記の2)と同様に灌流固定して取り出した脳を、ビブラトームを用いて厚さ30 $\mu$ mの前頭断切片とし、上記の4)と同様に反応して、BDA 標識終末と MCH 陽性ニューロンまたは ORX 陽性ニューロンを検出した。なお、この場合にはそれぞれの標識産物を電顕下で区別できるように、BDA の検出にはジアミノベンチジンに銀増感処理を施し、MCH 陽性ニューロンまたは ORX 陽性ニューロンの検出にはジアミノベンチジンのみを用いた。

⑤ 視床下部外側野において、BDA 標識終末と MCH 陽性ニューロンまたは ORX 陽性ニューロンの分布が一致する領域を検索し、その領域を含む切片をエポキシに包埋して電顕用試料とした。

⑥ 電顕下にて、BDA 標識終末と MCH 陽性ニューロンまたは ORX 陽性ニューロンとのシナプス構築を観察し、その画像を解析した。

辺縁下皮質に BDA を注入する場合についても、同様に実験を行い、扁桃体中心核に注入した結果と比較・検討した。

(2) 視床下部外側野へ投射する扁桃体中心核線維が $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)陽性であることを電子顕微鏡下で証明した。

① マウスの扁桃体中心核にビオチン化デキストラミン(BDA)を電気泳動的に微量注入し、その1週間後に灌流固定した。

② 脳切片を作成し、包埋前免疫金-銀法を用いて、 $\gamma$ -アミノ酪酸(GABA)の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)の免疫組織化学的検出を行った。

③ BDA 標識終末をアビジン-ビオチン複合体を用いて組織化学的に検出した。

④ 上記切片から電顕用試料を作成し、視床下

部外側野における BDA 標識終末が GAD 陽性であるかどうかを、電子顕微鏡下で検索した。

#### 4. 研究成果

(1) マウスにおける MCH 産生ニューロンと ORX 産生ニューロンの前脳における分布

抗 MCH 抗体および抗 ORX-A 抗体を用いて、免疫組織化学的に MCH 陽性ニューロンと ORX 陽性ニューロンの検出を行った結果、両ニューロンとも、視床下部の外側野や脳弓周囲領域に数多く存在し、MCH 陽性ニューロン群が ORX 陽性ニューロン群を取り囲むように分布している傾向が見られた。また、MCH 陽性ニューロンは不確帯や背内側核などに、ORX 陽性ニューロンは背内側核に少数ながら存在していた。

(2) 扁桃体線維および辺縁下皮質線維と、MCH 産生ニューロンあるいは ORX 産生ニューロンとの連絡様式

扁桃体中心核に順行性標識物質である BDA を注入し、BDA 標識線維を組織化学的に検出後、免疫組織化学的に MCH 産生ニューロンと ORX 産生ニューロンの検出を行った。その結果、BDA 標識線維および終末の分布領域と、MCH 陽性ニューロンあるいは ORX 陽性ニューロンの分布領域との一致を、視床下部外側野の背外側部において光学顕微鏡下に認めた。さらに、これらの分布一致領域を電子顕微鏡下に観察すると、BDA で標識された扁桃体中心核からの線維終末が、MCH 陽性ニューロンあるいは ORX 陽性ニューロンの主に樹状突起と、そして付加的に細胞体と、対称性のシナプスを形成していた。

上記と同様の方法を用いて、辺縁下皮質から MCH 産生ニューロンあるいは ORX 産生ニューロンへの連絡様式について検討した。その結果、視床下部外側野において、辺縁下皮質からの投射線維と MCH 陽性ニューロンあるいは ORX 陽性ニューロンとの間に非対称性シナプスが形

成されることを示唆する所見を得た。

(3) 扁桃体中心核線維の GABA 陽性についての電顕的観察

電子顕微鏡下で観察した BDA 標識終末のほとんどすべてが GAD 陽性(すなわち、GABA 作動性であることを示唆する)であり、視床下部外側野ニューロンの細胞体や樹状突起と対称性のシナプスを形成していた。

#### 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 6 件)

(1) S. Nakamura, T. Tsumori, S. Yokota, T. Oka, Y. Yasui

Amygdaloid axons innervate melanin-concentrating hormone- and orexin-containing neurons in the mouse lateral hypothalamus.

Brain Research, in press

査読有

(2) S. Yokota, T. Tsumori, T. Oka, S. Nakamura, Y. Yasui

GABAergic neurons in the ventrolateral subnucleus of the nucleus tractus solitarius are in contact with Kölliker-Fuse nucleus neurons projecting to the rostral ventral respiratory group and phrenic nucleus in the rat.

Brain Research 1228 (1): 113-126, 2008

査読有

(3) K. Notsu, T. Tsumori, S. Yokota, J. Sekine, Y. Yasui

Posterior lateral hypothalamic axon terminals are in contact with trigeminal premotor neurons in the parvicellular reticular formation of the rat medulla oblongata.

Brain Research 1244 (1): 71-81, 2008

査読有

(4) T. Oka, T. Tsumori, S. Yokota, Y. Yasui

Neuroanatomical and neurochemical organization of projections from the central amygdaloid nucleus to the nucleus retroambiguus via the periaqueductal gray in the rat.

Neuroscience Research 62 (4): 286-298, 2008

査読有

(5) S. Yokota, T. Oka, T. Tsumori, S. Nakamura, Y. Yasui

Glutamatergic neurons in the Kölliker-Fuse nucleus project to the rostral ventral respiratory group and phrenic nucleus: A combined retrograde tracing and in situ hybridization study in the rat.

Neuroscience Research 59 (3): 341-346, 2007

査読有

(6) K. Tsubouchi, T. Tsumori, S. Yokota, H. Okunishi, Y. Yasui

A disynaptic pathway from the central amygdaloid nucleus to the paraventricular hypothalamic nucleus via the parastrial nucleus in the rat.

Neuroscience Research 59 (4): 390-398, 2007

査読有

[学会発表](計 13 件)

(1) 野津一樹、津森登志子、横田茂文、関根浄治、安井幸彦

顎運動制御に関与する後外側視床下部からの下行性神経路:ラットにおける形態学的解析  
第 63 回日本解剖学会中国・四国支部学術集会、出雲(島根大)、2008年10月25・26日

(2) 野津一樹、安井幸彦、津森登志子、関根浄治

顎運動制御に関与する視床下部からの下行性神経路についての解析

Analysis of descending pathways from the hypothalamus that participate in the control of jaw movement

第53回日本口腔外科学会総会、徳島市、2008年10月20、21日

(3) 横田茂文、岡 達郎、野津一樹、津森登志子、安井幸彦

ラットpre-Bötzing complex 間の交連性結合

第113回日本解剖学会総会・全国学術集会、大分、2008年3月27～29日

(4) 津森登志子、中村佐和子、横田茂文、安井幸彦

遺伝子導入マウスを用いて迷走神経背側運動核メラノコルチン4受容体発現ニューロンへの扁桃体入力を形態学的に解析する

第113回日本解剖学会総会・全国学術集会、大分、2008年3月27～29日

(5) 牛 建国、横田茂文、津森登志子、安井幸彦

ラット外側結合腕傍核ニューロンはオレキシン含有外側視床下部ニューロンに投射する

第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、岡山、2008年3月27～29日

(6) 横田茂文、篠崎義雄、越久仁敬、岡田泰昌、安井幸彦

新生仔ラットの頸髄における吸息関連運動ニューロン

第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、岡山、2008年3月27～29日

(7) Yokota S., Tsumori T., Oka T., Nakamura S., Yasui Y.

Chemical organization of the pathways from the nucleus of the solitary tract to the phrenic nucleus in the rat.

The 37th Annual Meeting Society for Neuroscience, San Diego, November 3 to 7, 2007

(8) 横田茂文、津森登志子、岡 達郎、安井幸彦

彦

Kölliker-Fuse 核から腹側呼吸性ニューロン群吻側部および横隔神経核へのグルタミン酸作動性投射

第62回日本解剖学会中国・四国支部学術集会、倉敷、2007年10月27・28日

(9) 横田茂文、岡 達郎、津森登志子、牛 建国、安井幸彦

ラット左右 pre-Bötzing complex 間の substance P 作動性投射

第63回日本解剖学会中国・四国支部学術集会、出雲(島根大)、2007年10月25・26日

(10) 岡 達郎、津森登志子、横田茂文、安井幸彦

ラット扁桃体中心核から中脳中心灰白質を経て疑核後核に至る神経路の化学的性質

第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学会大会、第17回日本神経回路学会大会合同大会、横浜、2007年9月10～12日

(11) 横田茂文、津森登志子、岡 達郎、安井幸彦

ラット孤束核交連亜核から横隔神経核へのグルタミン酸作動性神経路

第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学会大会、第17回日本神経回路学会大会合同大会、横浜、2007年9月10～12日

(12) 津森登志子、中村佐和子、横田茂文、安井幸彦

遺伝子導入マウスにおける皮質線維終末とメラノコルチン4受容体発現視床ニューロンとのシナプス構築

第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学会大会、第17回日本神経回路学会大会合同大会、横浜、2007年9月10～12日

(13) 中村佐和子、津森登志子、横田茂文、安井幸彦

マウス視床下部における扁桃体終末と摂食関連ペプチド含有ニューロンおよびメラノコルチン4レ

セプター発現ニューロンとのシナプス構築

第30回日本神経科学大会、第50回日本神経化学会大会、第17回日本神経回路学会大会合同大会、横浜、2007年9月10-12日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安井 幸彦 (YASUI YUKIHIKO)

島根大学・医学部・教授

研究者番号:30174501

### (2)研究分担者

津森 登志子 (TSUMORI TOSHIKO)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号:30217377

横田 茂文 (YOKOTA SHIGEFUMI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号:50294369