

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590258

研究課題名（和文） ヒスタミンH1受容体発現ニューロンの選択的破壊を利用した摂食調節神経回路の研究

研究課題名（英文） Study on the neural network of feeding regulation by selective ablation of histamine H1 receptor-expressing neurons

研究代表者

堀尾 修平（HORIO SHUHEI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：80145010

研究成果の概要（和文）：摂食調節で重要な役割を果たしている視床下部室傍核で、ヒスタミンH1受容体発現ニューロンに注目した。まず、このニューロンがマウス視床下部室傍核に豊富に存在することを示した。次いでこのニューロンを選択的に死滅させる遺伝子改変マウスを作製した。このマウスに、イムノトキシンという毒素を注入しH1受容体ニューロンのみが死滅することを確認した。室傍核H1受容体ニューロンが死滅したマウスは、摂食量が30%増加し、体重も顕著に増加した。すなわち、本ニューロンは摂食調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To identify the neurons involved in the regulation of food intake, we employed highly selective method that ablated specific type of neurons. We have chosen histamine H1 receptor (H1R)-expressing neurons as the target. H1Rs were highly expressed in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). To ablate these neurons, we have constructed gene-targeted (knock-in) mice that express human IL-2R α under the control of the H1R gene. Microinjection of the immunotoxins into PVH selectively ablated H1R-expressing neurons in the mutant mice. The ablation of these neurons increased food intake and body weight gain of the mice. These results indicate that H1R-expressing neurons in the PVH are involved in the regulation of food intake.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：視床下部、室傍核、腹内側核、摂食調節、糖尿病、ヒスタミン受容体、イムノトキシン、神経回路

1. 研究開始当初の背景

(1) 視床下部に摂食中枢および満腹中枢が存在することは、かなり古くから知られていた。しかしこの説は視床下部の神経核を破壊す

るといふ荒っぽい実験から得られたものであった。最近、摂食抑制物質であるレプチンが発見されたのを契機にこの摂食調節機構が見直され、より正確な摂食調節の神経回路

が描きなおされている。すなわち、レプチンは脂肪細胞から血中に分泌され、視床下部の弓状核 ARC に作用し、そこから室傍核 PVH と外側野 LH にそれぞれ信号を伝える。レプチンが高濃度の場合には PVH のニューロンに興奮性入力を送って摂食抑制をおこし、低濃度の場合には PVH への経路が抑制され、逆に LH への経路が促進されて摂食亢進がおこると考えられている。

(2) 現在では、レプチン以外にも続々と新規な摂食調節物質が見出されている。さらにこれらの調節物質は、血液を介して視床下部に作用する以外にも、迷走神経を介して、延髄孤束核 NTS 経由で視床下部に作用する経路があることが判ってきた。

(3) とくに摂食抑制に関しては、末梢からの液性情報が視床下部の弓状核 ARC を介して室傍核 PVH に運ばれ、一方神経性情報は迷走神経、延髄孤束核 NTS を介してやはり PVH に届けられる。すなわち PVH は摂食抑制の 1 つのセンターであると考えられる。実際、PVH には摂食抑制に関与すると考えられる、melanocortin 受容体 (MC4R) ニューロン、CRH ニューロン、オキシトシンニューロン、Nesfatin-1 ニューロンなどが存在することがわかってきた。

(4) ヒスタミン H1 受容体拮抗薬が食欲増進をおこすこと、H1 受容体欠損マウスが肥満になること、視床下部の神経核に H1 受容体が発現していることなどから H1 受容体の摂食調節への関与が示唆されている。すなわち視床下部の H1 受容体発現ニューロンも摂食調節に重要な働きをしているニューロンの 1 つであると考えられる。しかし、そのニューロンの詳しい性質は全く判っておらず、また視床下部内の他のニューロンとの関係も全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、H1 受容体発現ニューロンに注目し、このニューロンを選択的に死滅させた時の摂食行動への影響を調べることにより、当該ニューロンの機能を明らかにしようと考えた。

(2) この目的のために、イムノトキシンを用いた細胞標的により視床下部の H1 受容体発現細胞を特異的に死滅させることが可能な遺伝子改変マウスを作製する。このマウスは、H1 受容体の代わりにイムノトキシン感受性であるヒト IL-2R α を発現させるもので、イムノトキシン投与により H1 受容体発現細胞のみが選択的に死滅すると考えられる。

(3) この遺伝子改変マウスの視床下部神経核に微小カニューレを用いてイムノトキシンを微量注入し、各々の神経核の H1 受容体発現ニューロンを死滅させ、マウスの摂食行動への影響を調べることにより、当該ニューロンの摂食行動調節における役割を明らかにする。すなわち、摂食量の変化を測定することにより、摂食行動に対する当該ニューロンの作用が促進的か抑制的かを明らかにする。また体重の変化を測定することにより、エネルギーバランスへの効果を明らかにする。

(4) 当該ニューロンが、視床下部のどのタイプのニューロンに対応するのかを、組織化学的手法により明らかにする。さらにそのニューロンが発現する受容体を明らかにすることで、摂食調節の神経回路のなかに占める位置を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変マウスの作製: H1 受容体の代わりにイムノトキシン感受性であるヒト IL-2R α を発現させるマウスは、マウス H1 受容体遺伝子部位に、ヒト IL-2R α 遺伝子を置換して入れ換える、ノックインマウスの手法を用いた。ES 細胞は TT2 細胞を用い、上記の遺伝子組換えを起こさせるターゲットベクターを設計し、作成した。TT2 細胞にエレクトロポレーション法によりターゲットベクターを導入し、相同組換えをサザンブロット法により検定し、目的の TT2 細胞を得た。この TT2 細胞を用いてキメラマウスを作製しさらに野生型マウスと交配することにより目的の遺伝子改変マウス (IMCT-H1R マウス) を得た。

(2) 視床下部に存在する H1 受容体発現ニューロンの検出: H1 受容体の発現を *in situ* hybridization (ISH) 法により検出した。マウス H1 受容体遺伝子をもとに H1 受容体の ISH プローブを作製した。また、ヒト IL2R α に対する ISH プローブは、福島医大・小林和人博士より供与を受けた。遺伝子改変マウス、および野生型マウスの脳を急速凍結した後、クリオスタットを用いて 20 mm 切片を作成し、DIG-ラベルした上記のプローブを用い、ISH を行った。

(3) 視床下部神経核の H1 受容体発現細胞の選択的死滅: イムノトキシン (anti-Tac(Fv)-PE38, Dr. Pasten, National Cancer Institute, USA より供与) 40 ng/ml を、IMCT-H1R マウスの視床下部室傍核 PVH に微量注入した。約 1 週間後に、マウス脳凍結切片を作成し、H1 受容体プローブを用いた ISH により、H1 受容体の発現を検出し、その発現量がコントロール群 (野生型マウスあ

るいは、生理食塩水注入群) に比べて減少することにより、H1 受容体細胞の死滅を確認した。

(4) 摂食行動の測定：イムノトキシンを視床下部内に注入したマウスについて（生理食塩水脳内注入マウスを対照とする）、摂食量、体重変化を継続して測定した（マウス用個別飼育ケージを用いた）。餌は標準的な飼育用餌を用い、自由給餌とした。

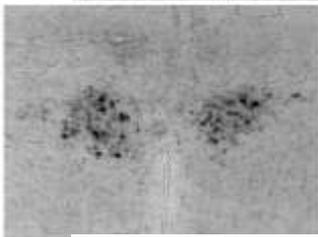
(5) H1 受容体特異的 Cre 発現マウスの作製：H1 受容体遺伝子の代わりに Cre recombinase を発現させるマウスをノックインの手法により作製した。マウス H1 受容体遺伝子部位に、バクテリオファージ Cre recombinase 遺伝子を置換して入れ換えるターゲティングベクターを作成し、TT2 細胞に導入し、相同組換えを起こした TT2 細胞を選別し、キメラマウスを作製した。

4. 研究成果

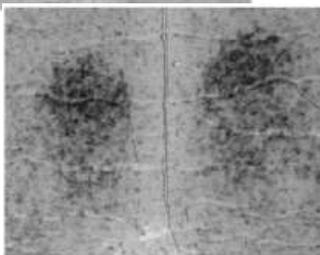
(1) マウス視床下部における H1 受容体発現の分布を ISH により調べた。図 1 に示すように、H1 受容体は視床下部室傍核 PVH、腹内側核 VMH に強く発現していることが判った。とくに PVH においては、その吻側 (anterior part) と尾側 (posterior part) にそれぞれ特徴的な分布を示した。PVH および VMH は、視床下部の中でも、とくに摂食抑制に中心的な働きをされると考えられている部位であり、そこに存在することが明らかになった H1 受容体発現ニューロンの機能を調べることは重要である。



PVH
(anterior part)



PVH
(posterior part)



VMH

図 1. マウス視床下部における H1 受容体発現細胞の分布 (in situ hybridization). PVH および VMH に非常に強い発現がある。

(2) 今回作製した遺伝子改変マウス (IMCT-H1R マウス) が、当初の目的通り、IL-2R α を H1R 発現細胞選択的に発現しているかどうかを調べた。遺伝子改変マウスの脳切片で IL-2R α の発現を ISH により調べた。図 2 に示すように、IL-2R α の発現は H1 受容体の発現とほぼ完全に一致しており、とくに PVH にほぼ限局していた。このことから、本遺伝子改変マウスは確かに IL-2R α を H1 受容体発現ニューロン特異的に発現していることが判った。



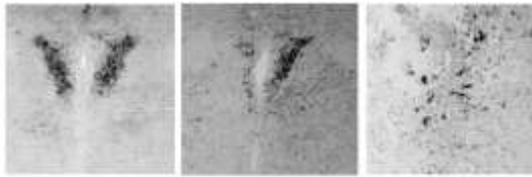
IL-2R α
probe



H1R
probe

図 2. マウス脳の in situ hybridization による染色。IL-2R α の発現、H1 受容体 (H1R) の発現は、ほぼ完全に一致している。

(3) 視床下部の PVH は、摂食抑制に関する液性情報、および神経性情報が集積してくる重要な部位である。そこに H1 受容体発現ニューロンが存在することが明らかとなったので、次に、この部位に存在する H1 受容体発現ニューロンを死滅させる実験を行った。イムノトキシン (anti-Tac(Fv)-PE38) をマウス脳視床下部 PVH に、微小カニューレを用い微量注入を行った。約 1 週間後に、脳切片を作製し、H1 受容体プローブを用いた ISH により、H1 受容体の発現量を測定した。図 3 に示したように、片側のみにイムノトキシンを注入した場合には、注入側のみで、両側性に注入した場合には完全に、PVH の H1 受容体発現細胞が死滅した。すなわち、この遺伝子改変マウスは、選択的に H1 受容体発現ニューロンを死滅させることが可能な実験系であることが示された。



トキシン注入なし 左側のみ注入 両側に注入

図3. マウス視床下部室傍核へのイムノトキシン注入による H1 受容体発現ニューロンの死滅. H1 受容体を in situ hybridization 法により検出した。イムノトキシン注入数日後に細胞が死滅している。

(4) H1 受容体発現ニューロン死滅の摂食行動への影響を調べた。遺伝子改変マウス IMCT-H1R の視床下部 PVH にイムノトキシンを両側性に微量注入し、その後の摂食量、体重変化への影響を調べた。この場合、H1 受容体発現ニューロンは、注入後 3-5 日で死滅する。実験終了後に脳切片を作成し、ISH により、H1 受容体発現ニューロンの死滅を確認した。結果を図4に示した。

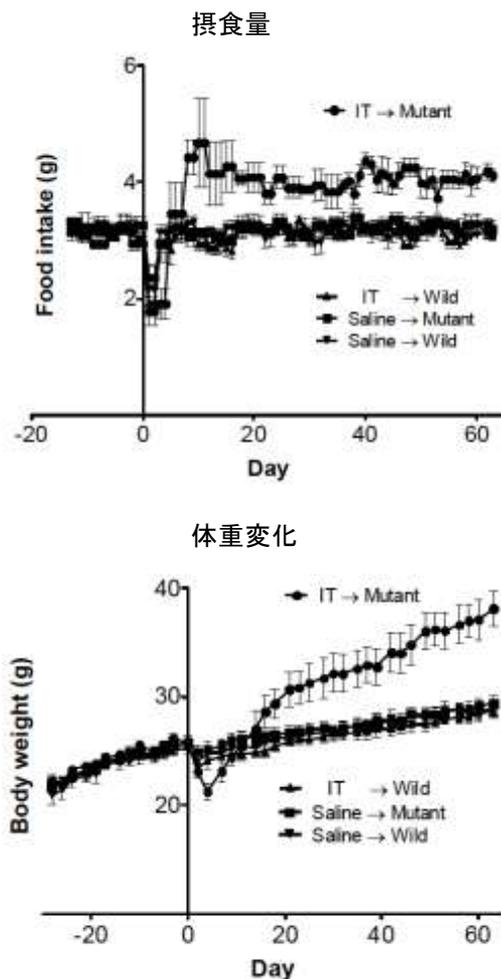


図4. マウス視床下部室傍核の H1 受容体ニューロンを死滅させた時 (IT→Mutant) の摂食量、体重への影響. Day=0 でイムノトキシンをマウス視床下部に注入した。数日後から摂食量が増加し、それに伴って体重も増加した。

イムノトキシンを投与したマウスはコントロール群に比べ、摂食量が 30-40%増加し、体重も 60 日後で約 30%増となった。またさらに実験を継続した場合、体重は増え続け、120 日後では、45-50g に達した (図5)。この結果は、視床下部 PVH の H1 受容体発現ニューロンが摂食抑制に深く関わっていることを示している。すなわち当該ニューロンは本来摂食抑制作用を持っているが、そのニューロンが死滅することで摂食抑制作用が消滅し、摂食量が増加したと考えられる。



図5. イムノトキシンを注入し H1 受容体ニューロンが死滅したマウス (Mutant) は体重が増加し肥満になる。

(5) この PVH に存在する H1 受容体発現ニューロンは、H1 受容体を発現していることがわかっているが、それ以外の性質は全くわかっていない新規なニューロンであると考えられる。そこでこのニューロンの性質を調べるため、H1 受容体発現細胞特異的に Cre recombinase を発現する遺伝子改変マウスの作製に着手した。すでに目的の遺伝子組換えを生じた ES 細胞を得、これをもとにしてキメラマウスの作製も完了した。今後野生型マウスと交配し、系統を確立する予定である。このマウスを利用することで、H1 受容体ニューロンに発現する各種の受容体の種類、本ニューロンの投射先のニューロンを特定する研究が可能になり、摂食調節回路の中で本ニューロンの占める位置を明らかにすることが可能となる。本研究は、H1 受容体ニューロンの活動を調節する薬物を見出すことで、摂食抑制薬の開発に結びつき、過食による肥満症、糖尿病の予防にも貢献できると考えられる。

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 Horio S, Kitaike S, Minokoshi Y, Kai N, Kobayashi K, Ueyama T, Fukui H. (2012) Selective ablation of histamine H1 receptor-expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus increased food intake and body weight gain. *J Physiol Sci*. 査読無 62:S209.
- 2 Horio S, Kitaike S, Shiuchi T, Minokoshi Y, Sanbo M, Hirabayashi T, Yagi T, Kai N, Kobayashi K, Ueyama T, Fukui H. (2011) Selective ablation of histamine H1 receptor-expressing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus to study their role in the regulation of food intake. *Neurosci Res*. 査読無 71:e162.
<http://www.journals.elsevier.com/neuroscience-research/special-issues/>
- 3 Horio S, Kitaike S, Shiuchi T, Minokoshi Y, Sanbo M, Hirabayashi T, Yagi T, Kai N, Kobayashi K, Ueyama T, Fukui H. (2011) Selective ablation of histamine H1 receptor-expressing neurons in the hypothalamus to study their role in the regulation of food intake. *J Physiol Sci*. 査読無 61:S180.
- 4 Horio S, Fujimoto K, Mizuguchi H, Fukui H. (2010) Interleukin-4 up-regulates histamine H1 receptors by activation of H1 receptor gene transcription. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 査読有 381:305-313.
DOI: 10.1007/s00210-010-0491-z
- 5 堀尾修平, (2010) ヒスタミン受容体をめぐるクロストーク 生物物理 査読有 Vol.50, pp. 290-293.
http://www.biophys.jp/journal/journal_dl.php
- 6 Shahriar M, Mizuguchi H, Maeyama K, Kitamura Y, Orimoto N, Horio S, Umehara H, Hattori M, Takeda N, Fukui H. (2009) Suplatast tosilate inhibits histamine signaling by direct and indirect down-regulation of histamine H1 receptor gene expression through suppression of histidine decarboxylase and IL-4 gene transcriptions. *J Immunol*. 査読有 183:2133-2141.
DOI: 10.4049/jimmunol.0901058

[学会発表] (計 8 件)

- 1 堀尾修平, マウス視床下部室傍核のヒスタ

ミン H1 受容体発現ニューロンの選択的破壊による摂食亢進と体重増加、第 89 回日本生理学会大会、2012. 3. 31、松本文化会館 (松本市)

- 2 堀尾修平, マウス視床下部室傍核のヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの選択的破壊による摂食亢進、第 32 回日本肥満学会、2011. 9. 24、淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)
- 3 堀尾修平, 視床下部室傍核に存在するヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの選択的破壊を利用した摂食調節機構の研究、第 34 回日本神経科学大会、2011. 9. 14、パシフィコ横浜 (横浜市)
- 4 堀尾修平, マウス視床下部室傍核に存在するヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの選択的破壊による摂食亢進、第 3 回日本生物物理学会中国四国支部大会、2011. 5. 14、広島大学 (東広島市)
- 5 堀尾修平, Selective ablation of histamine H1 receptor-expressing neurons in the hypothalamus to study their role in the regulation of food intake, 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、2011.3、*J Physiol Sci* 誌上 (61 巻, S180 頁)
- 6 堀尾修平, 視床下部ヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの選択的破壊を利用した摂食調節機構の研究、平成 22 年度生理学研究所研究会「中枢・末梢臓器連関による生体恒常性と仲介分子機構」、2011.2.18、生理学研究所 (岡崎市)
- 7 堀尾修平, ヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの選択的破壊を利用した摂食調節神経回路の研究、第 2 回日本生物物理学会中国四国支部大会、2010.5.8、松山大学 (松山市)
- 8 堀尾修平, 遺伝子改変マウスを利用した摂食調節に關与するニューロンの同定、第 47 回日本生物物理学会年会、2009.10.31、アスティ徳島 (徳島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀尾 修平 (HORIO SHUHEI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：80145010

(2) 研究分担者

上山 敬司 (UEYAMA TAKASHI)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50264875

(3) 連携研究者

小林 和人 (KOBAYASHI KAZUTO)
福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10423401

箕越 靖彦 (MINOKOSHI YASUHIKO)
自然科学研究機構・生理学研究所・教授
研究者番号：10200099

勢井 宏義 (SEI YOSHIHIRO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：40206602