

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：32310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590241

研究課題名(和文) GALP産生ニューロンの求心路の遺伝子工学的同定とその機能形態学的解析

研究課題名(英文) Morphological analysis of afferent neurons of galanin-like peptide (GALP) using transgenic mice expressing retrogradely transported tracer under the control of GALP promoter with Cre-loxP system.

研究代表者

影山 晴秋 (KAGEYAMA, Haruaki)

桐生大学・その他部局等・准教授

研究者番号：00433839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ガラニン様ペプチド(GALP)は摂食調節とエネルギー代謝に深く関与している。これまでに GALPの摂食調節に関わる神経回路網を報告してきた。当該研究ではCre-loxPシステムによってGALP発現細胞から逆行性輸送されるトレーサーとGALP産生細胞を示すβ-ガラクトシダーゼを共発現する遺伝子改変マウスを用いて、GALP神経細胞に対する求心性神経の同定を行った。視床下部室傍核、弓状核、小脳のプルキンエ細胞、内側手綱核、中隔および内側視索前野にあるニューロンがGALPに対する求心性神経であると同定された。GALP神経は摂食調節以外にも種々の生理学的行動を中継するニューロンであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Galanin-like peptide (GALP) plays an important role of feeding regulation and energy metabolism. We have reported on neuronal circuits involving GALP in the hypothalamus. To identify afferent neurons of GALP neurons, we used transgenic mice co-expressing retrogradely transported tracer and beta-galactosidase under the control of GALP gene regulatory region using Cre-loxP recombination. Afferent neurons are present in the medial septal, medial habenular nucleus, anterodorsal thalamic nucleus, medial preoptic nucleus, paraventricular hypothalamic nucleus, hypothalamic arcuate nucleus and Purkinje cells. These results suggest that GALP neurons function as a regulator of not only feeding and energy metabolism but also several physiological actions such as male-typical sexual behavior and reward system.

研究分野：免疫組織学

キーワード：神経回路網 遺伝子改変動物 摂食調節

1. 研究開始当初の背景

ガラニン様ペプチド (GALP) は視床下部弓状核と下垂体後葉で産生され、脳内で摂食抑制およびエネルギー代謝亢進作用をもつ神経ペプチドである。摂食調節やエネルギー代謝を含めたロバスト性の維持を理解するためには、統御器官である脳での作用やニューロンネットワークの解明が重要である。これまでに申請者らは下記の2点を明らかにしている。

(1) 視床下部での GALP による摂食調節のニューロンネットワークの解析を行い、神経関連や摂食調節機構の一部を解明している。

(2) Cre-loxP システムで GALP 産生細胞特異的に緑色蛍光タンパク質を過剰発現する遺伝子改変動物を完成させている。この遺伝子改変マウスを用いることで、これまでに報告されている中枢神経系での発現以外にも脂肪組織でも GALP 産生細胞があることを明らかにした (H21-H23、基盤研究 (C) 代表者: 影山、分担研究: 塩田 研究課題番号 21590222)。

GALP ニューロンのネットワークは視床下部周辺のみで解析が進んでいるが、脳全体を網羅した解析はほとんど進んでいない。特に GALP ニューロンに対する求心性ニューロンはどのような種類のニューロンなのかは不明のままである。申請者らが新規開発した Cre-loxP システムで逆行性トレーサーを遺伝子工学的に発現するマウスを用いることで、脳全体の GALP ニューロンの求心路が明らかになる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

Cre-loxP システムで GALP 発現細胞特異的に逆行性トレーサー機能を付加した緑色蛍光タンパク質と β -ガラクトシダーゼを共発現する遺伝子改変マウスを用い、実験を行った。

(1) 脳全体の GALP 産生細胞の求心性ニューロンの起始部位となる神経核の同定を行う。

(2) 外部刺激によって GALP ニューロンの求心性ニューロンの活性化を評価する。

当該研究によって GALP ニューロンの求心路や求心性ニューロンを理解することで内在性の GALP を活性化させる方法や物質の開発が進み、将来創薬展開につながる。さらに創薬展開を考えた場合、抗肥満薬としての効果を最大に発揮させる手がかかりや方法、さらには抗肥満効果に伴う鬱などの副作用の軽減につながると考えられる。このように、メタボリックシンドロームの根底にある肥満の成因となる摂食障害やエネルギー代謝異常の病因究明の手がかかりや改善法、あるいは新しい視点に立った画期的な肥満の予防や

治療法開発へのターゲットとなる可能性が高いので、国民の健康に貢献できると期待される。

3. 研究の方法

(1) 動物

平成 19 から 20 年度の科研費萌芽研究でタモキシフェン誘導型 Cre-loxP システムで GALP 産生細胞特異的に緑色蛍光タンパク質を過剰発現する遺伝子改変動物を完成させている (代表者: 塩田、分担研究: 影山 研究課題番号 19659047)。また新学術領域研究 (研究領域提案型) では逆行性トレーサー機能を付加した緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスの開発に成功している (H22-H26 代表者: 塩田、分担研究: 影山他、研究課題番号 22126004)。これらのマウスを実験に供した。また点鼻投与の実験には ICR マウスを用いた。

(2) タモキシフェン誘導型 Cre-loxP 組換えシステムによるトレーサータンパク質の発現

Cre-loxP システムによって GALP 産生細胞特異的に逆行性トレーサー機能を付加した緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現させるために遺伝子改変マウスにタモキシフェン (3 mg) を 7 日間腹腔内投与した。

(3) GALP 産生細胞の求心路の同定

タモキシフェン連続投与後、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液で灌流固定した。脳を摘出後、凍結切片あるいはピラトーム切片を作製した。抗緑色蛍光タンパク質抗体を使った免疫染色を行った。さらに X-gal 試薬による β -ガラクトシダーゼアッセイを行った。またこれら 2 つの染色を同じ切片上で行った。染色した切片を顕微鏡で観察した。

(4) c-Fos 発現

GALP を点鼻投与することによってどのような神経核が活性化するかを神経活性化マーカーである c-Fos の発現を指標に評価した。GALP 点鼻投与し、90 分後に 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脳を取り出したのち、切片を作製した。抗 c-Fos 抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) Cre-loxP システムによるトレーサータンパク質の検出

この遺伝子改変動物は細胞の核に移行する β -ガラクトシダーゼと逆行性トレーサー機能を持つ GFP を共発現できる仕組みになっている。 β -ガラクトシダーゼ陽性細胞は GALP 産生細胞を、GFP 免疫陽性細胞は GALP 産生細胞および求心性ニューロンを示す。すなわち

-ガラクトシダーゼアッセイ陽性かつ緑色蛍光タンパク質免疫陽性細胞は GALP 産生細胞を示す。また -ガラクトシダーゼアッセイ陰性かつ緑色蛍光タンパク質免疫陽性細胞は、GALP 産生神経細胞に対して求心性の細胞を示している。この判定基準を免疫染色とガラクトシダーゼアッセイを組み合わせた方法に適用した。最初に GALP 産生ニューロンの局在を調べるために、-ガラクトシダーゼアッセイを行った。この -ガラクトシダーゼは遺伝子工学的修飾によって核内

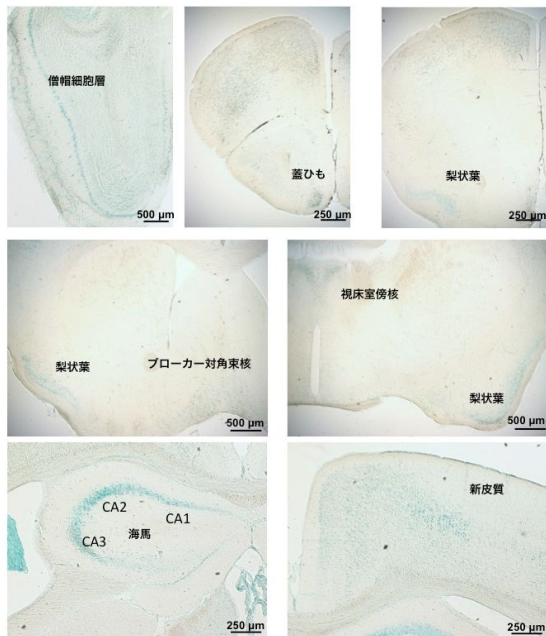


図1 β-ガラクトシダーゼアッセイによるGALP産生ニューロンの分布図
遺伝子改変マウスの脳からヒフトラーム切片を作成した。GALP遺伝子制御領域によってβ-ガラクトシダーゼを発現させるので、β-ガラクトシダーゼアッセイ陽性細胞はGALP産生細胞を意味する。β-ガラクトシダーゼアッセイ陽性細胞は青色に染色される。

に移行するようにした。したがって、ガラクトシダーゼによる基質分解は核内で行わ

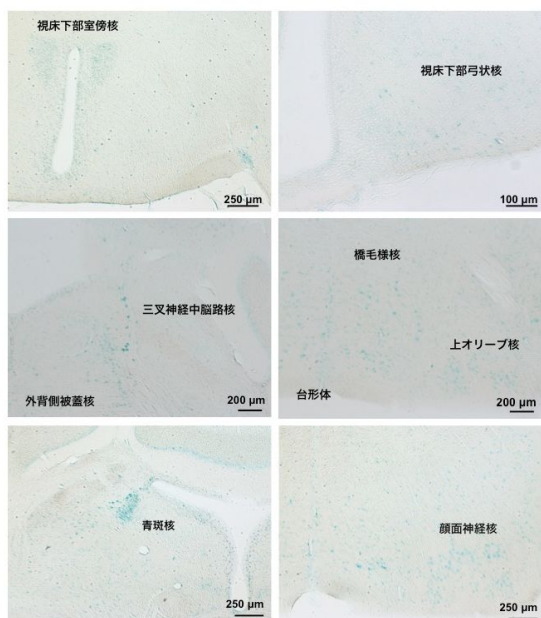


図2 β-ガラクトシダーゼアッセイによるGALP産生ニューロンの分布図
遺伝子改変マウスの脳からヒフトラーム切片を作成した。GALP遺伝子制御領域によってβ-ガラクトシダーゼを発現させるので、β-ガラクトシダーゼアッセイ陽性細胞はGALP産生細胞を意味する。β-ガラクトシダーゼアッセイ陽性細胞は青色に染色される。

れるので、核が染色される。その結果、GALP産生細胞は僧帽細胞層、蓋ひも、梨状葉、ブローカー対角束核、視床室傍核、海馬、新皮質にも局在していた(図1)。視床下部室傍核、視床下部弓状核、三叉神経中脳路核、外背側被蓋野、橋網様核、青斑核および顔面神経核に分布していた(図2)。また、小脳の星状細胞に局在していた(図3)。

一方、視床下部室傍核、視床下部弓状核、小脳のプルキンエ細胞、内側手綱核、中隔および内側視索前野にあるニューロンがGALPに対する求心性ニューロンであると同定された(図3)。

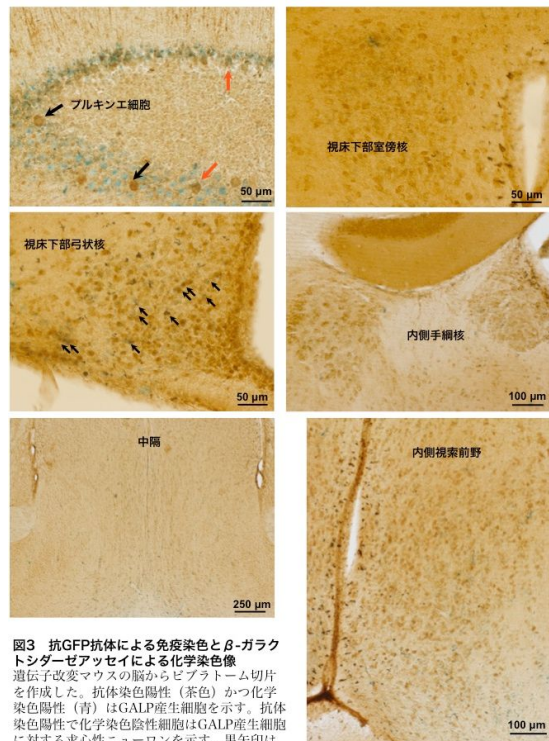


図3 抗GFP抗体による免疫染色とβ-ガラクトシダーゼアッセイによる化学染色像
遺伝子改変マウスの脳からヒフトラーム切片を作成した。抗体染色陽性(茶色)かつ化学染色陽性(青)はGALP産生細胞を示す。抗体染色陽性で化学染色陰性細胞はGALP産生細胞に対する求心性ニューロンを示す。黒矢印は求心性ニューロンを、赤矢印は、GALP産生ニューロンを示す。

(2) c-Fos による神経活性化の指標

当該研究により、GALP は僧帽細胞層の細胞で産生されていることが明らかとなった。最近の申請者らの研究では GALP の点鼻投与は摂

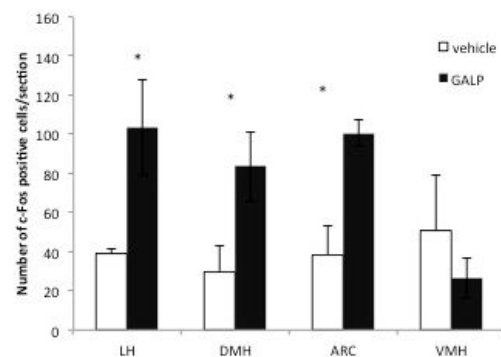


図4 GALP点鼻投与90分後のc-Fos発現
ICRマウスに2 nmol GALPを点鼻投与を行った。外側視床下部(LH)、視床下部背内側核(DMH)、視床下部弓状核(ARC)および視床下部腹内側核(VMH)においてvehicle(生理食塩水)とGALP投与群と比較した。

食量の抑制及び体重減少を引き起こす結果

を得られている。GALP 点鼻投与によって僧帽細胞層のニューロンを刺激したときに、僧帽細胞層の GALP を經由して、視床下部に作用するのではないかと考え、c-Fos 発現を調べることにした。投与後 90 分後では外側視床下部、弓状核および視床下部背内側核に c-Fos の免疫陽性細胞を同定した。しかし視床下部腹内側核は c-Fos 発現に差異はなかった。

当該研究では、マウスにおいて GALP 産生ニューロンは弓状核以外にもいろいろな神経核に分布していることを、遺伝子改変動物を用いて、明らかにした。嗅覚路を構築する神経回路網、学習・記憶にかかわる神経核に GALP 産生ニューロンが存在していることから、GALP 産生ニューロンは摂食やエネルギー代謝だけでなく、嗅覚や学習・記憶にも関与しているという新しい生理機能の可能性を示唆した。また内側視索前野はオスの典型的な性行動を引き起こす中枢である。GALP 脳室内投与でオスの性行動を起こすことから、内側視索前野からの情報が GALP ニューロンを中継して引き起こしていると考えられた。GALP 点鼻投与による刺激は、視床下部まで伝えることができることから、侵襲性が少なく効率の良いペプチド投与方法であると考えられた。

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 2 件)

Kageyama H, Endo K, Osaka T, Watanabe J, Wang L H, Ito K, Suzuki M, Sakagami J, Takenoya F, Shioda S. Galanin-like peptide (GALP) facilitates thermogenesis via synthesis of prostaglandin E2 by astrocytes in the periventricular zone of the third ventricle. *J Mol Neurosci*, 50, 3, 443-452 (2013) (査読有) doi: 10.1007/s12031-013-9952-4

Ito K, Kageyama H, Hirako S, Wang L, Takenoya F, Ogawa T, Shioda S. Interactive effect of galanin-like peptide (GALP) and spontaneous exercise on energy metabolism. *Peptides*, 49, 109-116 (2013) (査読有) doi: 10.1016/j.peptides.2013.09.003

[学会発表](計 6 件)

平子哲史、竹ノ谷文子、影山晴秋、和田亘弘、塩田清二 GALP による肝臓の脂質代謝調節機構 第 120 回日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、2015 年 3 月 23 日

平子哲史、竹ノ谷文子、影山晴秋、和田亘弘、木村愛、岡部まい、塩田清二 摂食調節ペプチド GALP 点鼻投与による脂質代謝改善のメカニズム 第 35 回日本肥満学会、2014

年 10 月 25 日 シーガイアコンベンションセンター(宮崎県・宮崎市)

影山晴秋、大坂寿雅、渡邊潤、竹ノ谷文子、平子哲史、太田英司、井上修二、塩田清二 星状膠細胞産生プロスタグランジン E2 を介したガラニン様ペプチドの熱産生経路 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 28 日 自治医科大学(栃木県・下野市)

太田英司、平子哲史、和田亘弘、竹ノ谷文子、影山晴秋、塩田清二 GALP および摂食調節ペプチドの神経相関に関する細胞生理学的検討 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 3 月 28 日 自治医科大学(栃木県・下野市)

平子哲史、影山晴秋、竹ノ谷文子、太田英司、和田亘弘、塩田清二 ガラニン様ペプチド(GALP)投与による抗肥満作用とその機序 第 28 回日本糖尿病肥満動物学会、2014 年 2 月 14 日 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

太田英司、平子哲史、和田亘弘、竹ノ谷文子、影山晴秋、塩田清二 ガラニン様ペプチド(GALP)の尊敬相関に関する研究 第 28 回日本糖尿病肥満動物学会、2014 年 2 月 15 日 宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 晴秋 (KAGEYAMA, Haruaki)
桐生大学・医療保健学部・准教授
研究者番号：00433839

(2) 研究分担者

塩田 清二 (SHIODA, Seiji)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：80102375

(3) 研究協力者

長谷川 文雄 (HASEGAWA, Fumio)
昭和大学・医学部・普通研究生

広瀬 佐知 (HIROSE, Sachi)
昭和大学・医学部・普通研究生

伊藤 和夫 (ITO, Kazuo)
昭和大学・医学部・特別研究生