

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24590302  
研究課題名(和文) 視床下部ヒスタミンH1受容体発現ニューロンを標的とした摂食調節回路の包括的研究  
  
研究課題名(英文) Comprehensive study on the neural circuit of feeding regulation targeting hypothalamic histamine H1 receptor-expressing neurons  
  
研究代表者  
堀尾 修平 (HORIO, Shuhei)  
  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
  
研究者番号：80145010  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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(H1R)発現ニューロンに注目した。このH1Rニューロンを選択的に死滅させるとマウスの摂食量、体重が増加した。エネルギー消費量、自発運動量に影響はなかった。H1Rニューロンは、室傍核にある神経内分泌ニューロンのうち、CRHニューロンと密接な関係があること、オキシトシン、バソプレシン、TRH各ニューロンとは直接の関係がないことが分かった。この結果から、室傍核にはH1R/CRH系を介した摂食抑制経路があることが強く示唆された。また、最近報告されているオキシトシンニューロンを介した摂食抑制作用とは全く別の経路であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To identify the neurons involved in the regulation of food intake, we have chosen histamine H1 receptor (H1R)-expressing neurons as the target. To ablate these neurons, we have constructed gene-targeted (knock-in) mice that expressed human IL-2R under the control of the H1R gene. H1Rs were highly expressed in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). 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, but had no effect on energy expenditure or spontaneous mobility. The ablation of H1R neurons also ablated CRH neurons but had no effect on oxytocin, vasopressin or TRH neurons. More than half of CRH neurons expressed H1R, but oxytocin, vasopressin or TRH neurons expressed little H1R. These results indicate that H1R-expressing neurons in the PVH are involved in the regulation of food intake.

研究分野：薬理学

キーワード：ヒスタミン H1 受容体 イムノトキシン CRH 室傍核 摂食調節

## 1. 研究開始当初の背景

摂食調節の中心は視床下部にあると考えられている。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、一方内臓諸器官からの神経性情報は迷走神経経路で延髄孤束核 NTS を介してやはり PVH に届けられる (図1を参照)。

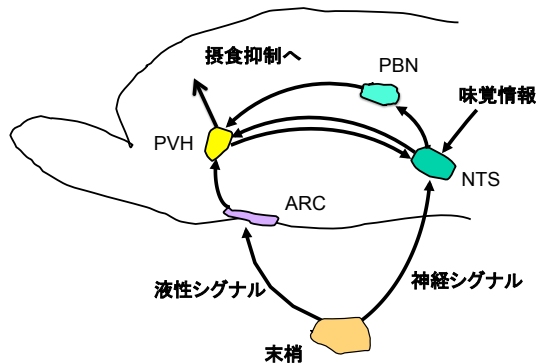


図1. 摂食抑制の神経回路

また味覚情報も NTS、結合腕傍核 PBN を介して PVH に届く経路が存在する。すなわち室傍核 PVH は摂食抑制センターの一つであると考えられる。実際、室傍核には摂食抑制に関与すると考えられる、CRH ニューロン、オキシトシン (OXT) ニューロン、TRH ニューロン、Nesfatin-1 ニューロン、melanocortin 4 受容体 (MC4R) ニューロンなどが存在することがわかっている。

ヒスタミン神経系は以前から摂食抑制への関与が示され、とくに H1R を介する作用が重要であると考えられていた。申請者は、視床下部の H1R 発現ニューロンに注目しこのニューロンの機能を調べた。H1R 発現ニューロンが室傍核に存在することをまず確認し、次いで、この H1R 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。このマウスは H1R ニューロン特異的に human interleukin-2 receptor  $\alpha$ -subunit (IL-2R  $\alpha$ ) を発現させたもので、イムノトキシン (IT) を局所投与すると、IL-2R  $\alpha$  発現細胞のみに取り込まれその細胞を死滅させる (Dr. Pastan, Dr. Kobayashi の方法)。実際に、室傍核に IT を注入すると、H1R ニューロンが選択的に死滅し、このマウスの摂食量、体重ともに明らかに増加した。すなわちこの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 (Horio, J Physiol Sci, 2012)。しかし、こ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明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、この H1R ニューロンに注目し、その生理機能をさらに詳しく調べるとともに、視床下部内での摂食調節回路に占める位置を明らかにしようと考えた。

まず、H1R ニューロンをイムノトキシンにより選択的に死滅させる遺伝子改変マウスを用い、H1R ニューロン死滅が摂食量、体重、エネルギー消費量、運動量などへ及ぼす影響を調べることにより、摂食調節、エネルギーバランス調節における当該ニューロンの役割を明らかにする。

次に、H1R ニューロンのタイプを、組織化学的手法により明らかにする。PVH に存在する、CRH、TRH、オキシトシン (OXT)、バソプレッシン (AVP) と H1R との共存を調べ、それらのニューロンとの関係を明らかにする。

第三に、H1R 発現細胞特異的に Cre recombinase (Cre) を発現するマウスを作製する。Cre 依存性に種々のタンパク質を特異的に発現させ、様々な測定手段を用いて H1R ニューロンの性質を調べることをめざす。

## 3. 研究の方法

(1) 摂食行動の測定：イムノトキシンを視床下部室傍核に注入した遺伝子改変マウスについて、マウス用個別飼育ケージを用いて摂食量、体重変化を継続して測定した。餌は標準的な飼育用餌を用い、自由給餌とした。

(2) エネルギー消費量、運動量の測定：24 時間の酸素消費量を呼吸代謝測定装置により測定、24 時間運動量をビームセンサー式自発運動量測定装置により測定し、エネルギー消費量、運動量を測定した。

(3) 視床下部室傍核の H1R ニューロンを死滅させた際に、室傍核の他のニューロン、すなわち CRH、OXT、AVP、TRH 各ニューロンが受ける影響を調べた。

(4) 視床下部室傍核の H1R ニューロンと他の、CRH、OXT、AVP、TRH 各ニューロンの重なりを、二重蛍光 *in situ* hybridization 法により測定した。

(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 細胞を選別した。この TT2 細胞を用いてキメラマウスを作製した。

#### 4. 研究成果

(1) 遺伝子改変マウスの視床下部室傍核にイムノトキシン (anti-Tac (Fv)-PE38) を注入すると、室傍核の H1R ニューロンは、3 日後から死滅が見られ 7 日後にはほぼ 80% が死滅した。このマウスの摂食量、体重を継続的に測定すると、イムノトキシン投与後、150 日間にわたって、摂食量が増加し、それに伴って体重も増加した。一方で、エネルギー消費量の目安となる酸素消費量は、イムノトキシンを投与した遺伝子改変マウスと、対照群 (野生型マウスあるいは、生理食塩水注入群) とで優位な差はみられなかった。また自発運動量にも差はなかった (イムノトキシン投与 6 週間後に測定)。この結果から、室傍核の H1R ニューロンは摂食抑制に重要な働きをしていることが分かった。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。また、室傍核 H1R ニューロンは、エネルギー消費量、自発運動量には影響を及ぼさないと考えられる。

(2) 遺伝子改変マウスの室傍核へのイムノトキシン投与で、H1R ニューロンが死滅した際、他の室傍核ニューロンへの影響を調べた。まず、CRH ニューロン数が H1R ニューロン死滅に従って大幅に減少した。このことは、CRH ニューロンのかなりの部分が H1R を発現したニューロンであることを示している。一方で、OXT、AVP、TRH ニューロン数はほとんど影響を受けなかった。すなわちこれらのニューロンは、H1R をほとんど発現していないと考えられる。次に、H1R ニューロンと、CRH、OXT、AVP、TRH 各ニューロンとの関係を二重 *in situ* hybridization 法により調べた。CRH ニューロンは、ニューロン数が H1R ニューロンのほぼ半数であり、またその 70% 程度が H1R を発現していた。一方で、OXT、AVP、TRH 各ニューロンは、H1R ニューロンとの重なりがほとんど見られなかった。これらの結果から、室傍核のニューロンは、「H1R/CRH 系」と「OXT/AVP 及び TRH の系」に大別されることが判った。そして、室傍核には H1R/CRH 系を介した摂食抑制経路があることが強く示唆される。また、この経路は、最近報告されている、室傍核の OXT ニューロンを介した摂食抑制作用とは全く別の経路であると考えられる。

(3) H1R 特異的 Cre 発現マウス (H1R-Cre マウス) の作製: Cre 依存性に種々のタンパク質を H1R ニューロン特異的に発現させ、H1R ニューロンの性質を様々な手法で調べることが可能となる遺伝子改変マウスの作製をめざした。まず、H1R 遺伝子部位に Cre recombinase 遺伝子を入れ換える (ノックイン) ターゲティングベクターを作製し、ES 細

胞である TT2 細胞に導入した。目的の相同組換えを起こした TT2 細胞を選別し、この TT2 細胞をもとにキメラマウスを作製した。TT2 細胞は、PCR 及びサザンブロット法により検定した。また TT2 細胞の異なる 3 コロニーから、それぞれ独立にキメラマウスを作製した。これらのキメラマウスで、目的の遺伝子改変が起こっていることを、PCR 及びサザンブロットにより検定した。このキメラマウスを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を得た。さらに、相同組換えの操作の際に付随的に挿入された薬剤耐性 neo 遺伝子を、FLP マウスと交配することにより除去した。このマウス脳における Cre の発現を、免疫組織染色法により検出を試みたが、Cre の発現量が少ないため検出できなかった。そこで、Cre 依存性に蛍光タンパク YFP (yellow fluorescence protein) を発現する遺伝子改変マウス (ROSA-YFP マウス) と交配し、Cre 依存性の YFP 発現を検出することで、Cre の局在を検定した。その結果、室傍核に YFP の発現が見られたものの、H1R の発現と一致しないことが判明した。また YFP の分布は視床下部の室傍核、視交叉上核、弓状核、背内側核にみられるのに対し、H1R の分布は室傍核と腹内側核に限られ、明らかな違いがあった。これらの結果から、得られたマウスは、H1R ニューロンに特異的に Cre を発現していると考えすることはできない。しかし、遺伝子改変に関して、得られたすべてのデータは正確に操作が行われていることを示しており、実際に、上述した 3 系統のキメラマウスすべてで同じ結果を得ている。この不一致の原因についてはさらに検討する必要がある。しかしながら、この遺伝子改変マウスは視床下部の各部位に特異的に Cre を発現していることから、当初の目的には合致しないものの、有用なモデル動物となる可能性を持ち、今後検討に値する。実際、このマウスの室傍核で、YFP (Cre) 発現ニューロンと H1R、CRH、OXT、AVP、TRH 各ニューロンとの重なりを調べたところ、H1R ニューロンの約 20%、CRH ニューロンの約 50% が重なるのに対し、OXT、AVP、TRH ニューロンはほとんど重ならなかった。この結果からも何らかの特異的なニューロンタイプをマークしている可能性が示唆される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① [Horio S, Kitaike S, Fukabori R, Ueyama K, Kobayashi K. Close relationship between histamine H1 receptor-expressing neurons and CRH neurons in the mouse hypothalamic paraventricular nucleus. J Physiol Sci. 65: S293, 2015. 査読無, <http://www.springer.com/biomed/human+physiology/journal/12576>](#)

〔学会発表〕（計4件）

- ① 堀尾修平、北池秀次、深堀良二、上山敬司、小林和人、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と CRH ニューロンの関係、第 92 回日本生理学会大会、2015. 3. 21-23、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）
- ② 堀尾修平、視床下部室傍核におけるヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの機能、第 41 回自律神経生理研究会、2013. 12. 7、日本光電本社研修センター（東京都新宿区）
- ③ 堀尾修平、ヒスタミン H1 受容体発現ニューロンの摂食調節における機能の解明をめざした Cre recombinase 発現遺伝子改変マウスの作製、第 5 回日本生物物理学会中国四国支部大会、2013. 5. 25-26、直島ベネッセハウス（香川県直島町）
- ④ 堀尾修平、視床下部室傍核の吻側部位に存在するヒスタミン H1 受容体発現ニューロンは摂食抑制作用をもつ、第 50 回日本生物物理学会、2012. 9. 22-24、名古屋大学（愛知県名古屋市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀尾 修平 (HORIIO, 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：8 0 1 4 5 0 1 0

### (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：5 0 2 6 4 8 7 5

### (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：1 0 4 2 3 4 0 1

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：1 0 2 0 0 0 9 9

勢井 宏義 (SEI, Hiroyoshi)  
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：4 0 2 0 6 6 0 2

山中 章弘 (YAMANAKA, Akihiro)  
名古屋大学・環境医学研究所・教授  
研究者番号：6 0 3 2 3 2 9 2