

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460318

研究課題名(和文) オレキシン受容体を介した体重制御と糖代謝制御の遺伝学的神経解剖

研究課題名(英文) Neural mechanism regulating body weight and glucose metabolism via orexin receptors

研究代表者

船戸 弘正 (FUNATO, Hiromasa)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：90363118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部の産生する神経ペプチドに着目して、体重制御機構を検討した。2種のオレキシン受容体が、エネルギー代謝に関して異なる役割を持つことを示した。オレキシン受容体シグナルがmTORC1シグナルを促進すること、高脂肪餌飼育したオレキシン過剰発現マウスはmTORC1シグナルが脳内で強まることを示した。メタアナリシスによりMCHシグナル欠損が、エネルギー産生促進によって体重増加が促成されていることも示した。

研究成果の概要(英文)：We examined the body weight regulation via hypothalamic neuropeptides. We showed the differential roles of orexin receptors in energy metabolism. Orexin receptor signalings enhance mTORC1 signaling. Orexin-overexpression mice fed with a high-fat diet showed stronger mTORC1 signaling in their brains. Meta-analysis revealed that MCH-signaling-deficient mice suppress body weight gain due to increased energy expenditure.

研究分野：神経科学

キーワード：体重制御 神経ペプチド 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

私たちが一定した体重を維持できるのは、体重を制御するフィードバックシステムが働いているためである。このフィードバックシステムにより、エネルギー蓄積が過剰になると、エネルギー摂取を抑制されたりエネルギー消費が促進されたりして、エネルギーの余剰が脂肪として蓄積せず、結果として体重を安定に保つことができる。

しかし、このフィードバック機構は食糧が不足しがちな環境で個体が生き延びていくために形成されたと考えられ、エネルギーが不足した際には強く機能するが、エネルギーが過剰となる方向には制御が緩く、安価な高カロリー食が普及した現代社会では肥満や糖尿病罹患率が高くなる。日本人は肥満程度に比して糖尿病罹患率が高いことや、マウスでの検討でも肥満と糖尿病は密接に関連するものの独立して制御されていると考えられており、この統御機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

C57BL/6 マウスは高脂肪高カロリー餌で飼育すると肥満し、耐糖能低下を示すことから、ヒトの肥満および糖尿病のよいモデルとなる。オレキシンは脳視床下部に局限して発現する神経ペプチドであり、その受容体は1型受容体と2型受容体の2種類である。オレキシンは摂食行動を促進する作用をもたらすことが報告されているが、その後の検討ではオレキシン神経を欠損させると体重増加を示すことが報告されている (Hara et al. *Neuron* 2001)。さらに、研究代表者はオレキシンがオレキシン1型受容体と2型受容体を介して、体重調節と糖代謝制御とをそれぞれ独立した経路で制御することを示した (Funato et al. *Cell Metabolism* 2009)。しかし、この検討は強力かつ組織特異性のない CAG プロモーター下でオレキシンを過剰に発現させたトランスジェニックマウスを用いた検討であることから、得られた結果が必ずしもオレキシン1型および2型受容体の生理的役割を反映しているとは限らない。したがって、オレキシン1型受容体と2型受容体それぞれの体重調節及び糖代謝への影響を明らかにする必要がある。また、栄養状態の変化がオレキシン受容体下流のシグナル伝達系にどのような影響を与えるかも明らかにする必要がある。また、オレキシンと同様に視床下部に局限するメラニン凝集ホルモン (melanin-concentrating hormone; MCH) も摂食行動や体重制御に関与しているが、研究グループによって報告内容が異なりコンセンサスが得られていない。

本研究の目的は、オレキシン1型および2型受容体欠損マウスの体重制御および糖代謝の解析、オレキシン受容体下流シグナルの検討およびメタアナリシスによる視床下部ペプチドおよび受容体欠損マウスのエ

ネルギー代謝制御の検討である。

3. 研究の方法

1) オレキシン欠損マウス、オレキシン1型受容体欠損マウス、オレキシン2型受容体欠損マウスを用いた。すべて C57BL/6 系統である。生後3週より8週間、通常餌および高脂肪餌で飼育した。毎週体重測定を行った。

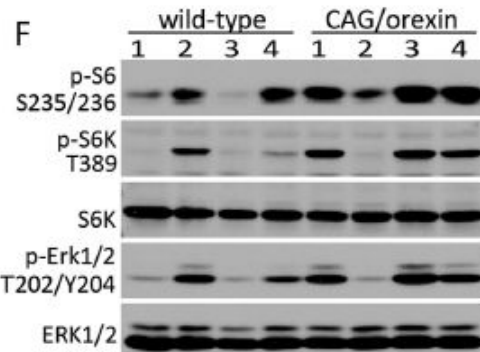
2) オレキシン1型受容体およびオレキシン1型受容体を安定的に発現する HEK293T 細胞を用いた。さらに、視床下部神経での検討のため、マウス胎児視床下部神経由来細胞株である N41 細胞を用いた、オレキシン受容体安定的発現細胞株も用いた。マウス脳での検討のため、オレキシンを過剰発現する CAG/Orexin トランスジェニックマウスを用いた。12週間、高脂肪餌 (D12451; リサーチダイエツト社) を用いて飼育した。

3) MCH 欠損マウス、MCH 受容体欠損マウスの研究をサーチした。文献上の統計学的情報から効果量の指標として相関係数 r を算出し、さらに相関係数 r の 95% 信頼区間した。

4. 研究成果

1) オレキシン欠損マウスは通常餌、高脂肪餌ともに野生型マウスに比べて有意な体重増加を示した。オレキシン1型受容体欠損マウスやオレキシン2型受容体欠損マウスは、オレキシン欠損マウスのような肥満傾向を示さなかった。摂食量やエネルギー消費量については、通常餌、高脂肪食それぞれについて、オレキシン1型受容体とオレキシン2型受容体が異なる影響を与えることが示された。

2) 血清を除去した培養液で24時間培養後にオレキシンAまたはオレキシンBを投与したところ、投与20分後に eIF4E (セリン 422)、S6 キナーゼ p70S6K (スレオニン 389)、ribosomal protein S6 (セリン 235/236、240/244) のリン酸化が促進された。これらは mTORC1 の下流に位置する。HEK293T 細胞、N41 細胞ともに同様の変化が認められた。



高脂肪餌飼育による肥満に CAG/Orexin マウスが抵抗性を示すことから、12週間高脂肪餌飼育し、野生型および CAG/Orexin マウス脳

の検討を行ったところ、図に示すように CAG/Orexin マウスは S6 および S6 キナーゼのリン酸化が亢進していた。以上のことは、オレキシン受容体シグナルは mTORC1 を活性化すること、そのために、オレキシン過剰発現マウスにおける脳内 mTORC1 シグナルの活性化が肥満抵抗性の分子機構に關与していることを示唆している (Wang et al JBC 2014)。

3) メタアナリシスから、MCH シグナルを欠失したマウスは、野生型に比べて体重、脂肪量、血中レプチンが少ない。酸素消費量の低下と体温低下も見られる。逆に、摂食量は、むしろ増加することから、エネルギー産生の増加が、体重低下をもたらしていると考えられる (Takase et al PLoS One, 2014)

Behavioral/Physiological/ Biochemical Parameters	Sample Size	Number of Studies	r	95% Confidence Interval		P value vs. 0
				Lower Limit	Upper Limit	
Body Length	54	3	0.17	-0.12	0.44	N.S.
Body Temperature	68	3	-0.64	-0.46	-0.76	<0.05
Body Temperature (Dark Phase)	32	2	-0.18	0.20	-0.51	N.S.
Body Temperature (Light Phase)	32	2	-0.52	-0.19	-0.75	<0.05
Body Weight	192	11	0.25	0.10	0.39	<0.05
Body Weight (High Fat Diet)	90	5	0.49	0.30	0.64	<0.05
Fat Mass	143	11	0.67	0.55	0.76	<0.05
Fat Mass (High Fat Diet)	30	3	0.73	0.47	0.88	<0.05
Food Intake	129	7	-0.26	-0.08	-0.43	<0.05
Food Intake (High Fat Diet)	116	7	-0.21	-0.02	-0.40	<0.05
Lean Mass	82	5	0.19	-0.04	0.41	N.S.

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)

Kenkichi Takase, Yousuke Tsuneoka, Satoko Oda, Masaru Kuroda, Hiromasa Funato, High-fat diet feeding alters olfactory-, social- and reward-related behaviors of mice independent of obesity, Obesity 査読有 24: 886-894, 2016

DOI: 10.1002/oby.21441.

Takeshi Kanda, Natsuko Tsujino, Eriko Kuramoto, Yoshimasa Koyama, Etsuo A. Susaki, Sachiko Chikahisa, Hiromasa Funato, Sleep as a biological problem: an overview of frontiers in sleep research, Journal of Physiological Sciences 査読有 66: 1-13, 2016

DOI: 10.1007/s12576-015-0414-3.

Zhiqiang Wang, Shimeng Liu, Miyo Kakizaki, Yuuki Hirose, Yukiko Ishikawa, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Yonghao Yu, Qinghua Liu, Orexin/Hypocretin activates mTOR complex 1 (mTORC1) via an Erk/Akt-independent and calcium-stimulated lysosome v-ATPase pathway, Journal of Biological Chemistry 査読有 289: 31950-31959, 2014

DOI: 10.1074/jbc.M114.600015.

Kenkichi Takase, Kenichi Kikuchi,

Yousuke Tsuneoka, Satoko Oda, Masaru Kuroda, Hiromasa Funato, Meta-analysis of melanin-concentrating hormone signaling-deficient mice on behavioral and metabolic phenotypes, PLoS One 査読有 9: e99961, 2014

DOI: 10.1371/journal.pone.0099961.

Satoko Oda, Hiromasa Funato, Fumi Sato, Satomi Adachi-Akahane, Masanori Ito, Kenkichi Takase, Masaru Kuroda, A subset of thalamocortical projections to the retrosplenial cortex possesses two vesicular glutamate transporter isoforms, VGluT1 and VGluT2, in axon terminals as well as somata. Journal of Comparative Neurology 査読有 522: 2089-2106, 2014.

DOI: 10.1002/cne.23519

Kenkichi Takase, Satoko Oda, Masaru Kuroda, Hiromasa Funato, Monoaminergic and neuropeptidergic neurons have distinct expression profiles of histone deacetylases, PLoS One 査読有 8: e58473, 1-15, 2013

DOI: 10.1371/journal.pone.0058473.

[学会発表](計26件)

Mohammad Sarowar Hossain, Fuyuki Asano, Tomoyuki Fujiyama, Chika Miyoshi, Makito Sato, Aya Ikkyu, Satomi Kanno, Noriko Hotta, Miyo Kakizaki, Ikuo Miura, Hideki Kaneda, Tomohiro Suzuki, Shigeharu Wakana, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Identification of Mc4r mutation through obesity screening of ENU-mutagenized mice, 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグプレート

ふくしま(福島県郡山市) 2016.3.29

浅野冬樹、Mohammad Sarowar Hossain、藤山知之、三好千香、佐藤牧人、一久綾、菅野里美、堀田範子、柿崎美代、三浦郁生、金田秀貴、鈴木智広、若菜茂晴、船戸弘正、柳沢正史、ランダム点突然変異マウスの肥満スクリーニングによる Sim1 遺伝子変異の同定、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグプレート

ふくしま(福島県郡山市) 2016.3.29

小田哲子、船戸弘正、恒岡洋右、吉田さちね、黒田優、前頭前皮質の興奮性および抑制性細胞におけるにおけるムスカリン受容体 M1 局在分布の比較、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグプレート

ふくしま(福島県郡山市) 2016.3.29

恒岡洋右、吉田さちね、小田哲子、黒田優、船戸弘正、生得的社会行動を制御する内側視索前野の機能解剖学的解析、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグプレート

ふくしま(福島県郡山市)

2016.3.28

吉田さちね、大西竜子、恒岡洋右、小田哲子、船戸弘正、黒田優、黒田公美、母子分離ストレスによる仔マウス輸送反応の減弱、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、ビッグハットふくしま(福島県郡山市) 2016.3.28

Sachine Yoshida, Ryuko Ohnishi, Yousuke Tsuneoka, Satoko Oda, Hiromasa Funato, Masaru Kuroda, Kumi O. Kuroda, Developmental changes of Transport Response after maternal separation in mouse pups、第 93 回生理学会大会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市) 2016.3.23

Chika Miyoshi, Tomoyuki Fujiyama, Makito Sato, Aya Ikkyu, Satomi Kanno, Noriko Hotta, Miyo Kakizaki, Takato Honda, Staci J. Kim, Haruna Komiya, Fuyuki Asano, Tomohiro Suzuki, Vivek Kumar, Joseph S. Takahashi, Shigeharu Wakana, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa Sleep screening of randomly mutagenized mice established a long sleep pedigree, The 4th Annual IIS International Symposium, 筑波大学(茨城県つくば市) 2016.2.26

Mohammad Sarowar Hussain, Fuyuki Asano, Tomoyuki Fujiyama, Chika Miyoshi, Makito Sato, Aya Ikkyu, Satomi Kanno, Noriko Hotta, Miyo Kakizaki, Takato Honda, Staci J. Kim, Haruna Komiya, Ikuo Miura, Tomohiro Suzuki, Kumar Vivek, Joseph S. Takahashi, Shigeharu Wakana, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Identification of Sim1 and Mc4r mutations through obesity screening of randomly mutagenized mice, The 4th Annual IIS International Symposium, 筑波大学(茨城県つくば市) 2016.2.26

Liqin Cao, Daniela Klewe-Nebenius, Andong Tang, Chika Miyoshi, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Qinghua Liu, Understanding the molecular basis of fear and the role of emotion in sleep regulation, The 4th Annual IIS International Symposium, 筑波大学(茨城県つくば市) 2016.2.26

Takato Honda, Tomoyuki Fujiyama, Chika Miyoshi, Makito Sato, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Systematic behavioral screening of Sleepy and Dreamless, newly identified mouse pedigrees with sleep abnormalities, The 4th Annual IIS International Symposium, 筑波大学(茨城県つくば市) 2016.2.26

Zhiqiang Wang, Jing Ma, Xiaojie Yang, Chi-Yu Lee, Hiromasa Funato, Yonghao

Yu, Masashi Yanagisawa, Qinghua Liu, Sleep widespread remodelig brain phosphorproteome implicate sleep homeostasis restoration mechanism, The 4th Annual IIS International Symposium, 筑波大学(茨城県つくば市) 2016.2.26

Tomoyuki Fujiyama, Chika Miyoshi, Makito Sato, Takeshi Kanda, Seiaya Mizuno, Satoru Takahashi, Hiroki Muramoto, Fuyuki Asano, Takato Honda, Kanako Iwasaki, Aya Ikkyu, Miyo Kakizaki, Noriko Hotta, Satomi Kanno, Yukiko Ishikawa, Ikuo Miura, Tomohiro Suzuki, Shigeharu Wakana, Vivek Kumar, Joseph S Takahashi, Hiromasa Funato, Masashi Yanagisawa, Identification of a single nucleotide substitution specific to the Dreamless mutant mouse by linkage analysis and whole exome sequencing and its genetic verification by CRISPR, The 4th Annual IIS International Symposium, 筑波大学(茨城県つくば市) 2016.2.26

Hiromasa Funato, Kenkichi Takase, Satoko Oda, Yousuke Tsuneoka, Masaru Kuroda, High-fat diet feeding alters social behaviors and sensorimotor system of mice independent of obesity, 2015 Keystone Symposia Conference "Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies", ウェスティン都ホテル(京都府京都市) 2015.10.26

Yousuke Tsuneoka, Sachine Yoshida, Satoko Oda, Masaru Kuroda, Hiromasa Funato, Functional neuroanatomy of the medial preoptic area: a study on its functional and anatomical heterogeneity, 第 38 回日本神経科学大会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015.7.29

藤山知之、船戸弘正、三好千香、佐藤牧人、水野聖哉、上田壮志、高橋智、村本玄紀、Qinghua Liu、一久綾、堀田範子、柿崎美代、菅野里美、石川有紀子、浅野冬樹、本多隆利、鈴木智広、若菜茂晴、柳沢正史、第 38 回日本神経科学大会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、2015.7.28

鹿糠実香、船戸弘正、柳沢正史、林悠、幼児マウスの大脳活動における母子間相互作用の効果とその神経基盤、第 40 回日本睡眠学会定期学術集会、栃木県文化センター(栃木県宇都宮市) 2015.7.2

船戸弘正、オレキシンによる体重制御機構、第 22 回日本行動神経内分泌研究会、神戸大学(兵庫県神戸市) 2015.3.24

Yousuke Tsuneoka, Kenkichi Takase, Satoko Oda, Masaru Kuroda, Hiromasa

Funato, Newly-identified sexually dimorphic gene expressions in the mouse medial preoptic area of hypothalamus. 第 120 日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2015.3.23

Hiromasa Funato, Forward genetic approach to identify novel genes regulating sleep/wakefulness behavior. 第 120 日本解剖学会・第 92 回日本生理学会合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2015.3.23

Hiromasa Funato, Chika Miyoshi, Makito Sato, Aya Ikkyu, Noriko Hotta, Miyo Kakizaki, Satomi Kanno, Kanako Harano, Fuyuki Asano, Tomoyuki Fujiyama, Tomohiro Suzuki, Shigeraru Wakana, Masashi Yanagisawa, Identification of a single nucleotide substitution specific to the Sleepy mutant mouse pedigree by linkage analysis and whole exome sequencing, Nanosymposium "Sleep and Memory", Neuroscience 2014, Washington DC, 2014.11.17

- ⑳ 船戸弘正、三好千香、佐藤牧人、一久綾、堀田範子、柿崎美代、菅野里美、原野加奈子、浅野冬樹、藤山知之、鈴木智広、若菜茂晴、柳沢正史、Identification of a single nucleotide substitution specific to the Sleepy mutant mouse pedigree by linkage analysis and whole exome sequencing, 第 37 回日本神経科学学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014.9.12

- ㉑ 小田哲子、船戸弘正、佐藤二美、赤羽悟美、伊藤雅方、高瀬堅吉、黒田優、Vesicular glutamate transporters 1 and 2 are colocalized at two types of axon terminal in the posterior cingulate cortex, 第 37 回日本神経科学学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2014.9.12

- ㉒ Satoko Oda, Hiromasa Funato, Fumi Sato, Satomi Adachi-Akahane, Masanori Ito, Kenkichi Takase, Masaru Kuroda, A subset of thalamocortical projections to the retrosplenial cortex possesses both VGluT1 and VGluT2, 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学 (栃木県下野市) 2014.3.28

- ㉓ 恒岡洋右、高瀬堅吉、黒田優、船戸弘正、摂食関連神経ペプチド産生細胞ネットワークにおけるヒストン脱アセチル化酵素の発現、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、自治医科大学 (栃木県下野市) 2014.3.28

- ㉔ Hiromasa Funato, Chika Miyoshi, Makito Sato, Aya Ikkyu, Mariko Isshiki, Yuto Goto, Kanako Harano, Satomi Kanno,

Miyo Kakizaki, Sayuki Kiatagawa, Sachiko Tomita, Tomohiro Suzuki, Shigeharu Wakana, Masashi Yanagisawa, Forward genetic analysis of ENU mutagenized mice identified multiple pedigrees exhibiting heritable sleep/wake abnormalities, Neuro2013, 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2013.6.22

- ㉕ Kenkichi Takase, Kenichi Kikuchi, Satoko Oda, Masaru Kuroda, Hiromasa Funato, Statistical inference of neural circuits responsible for behavioral parameters of mice, Neuro2013, 国立京都国際会館 (京都府京都市) 2013.6.21

[図書](計1件)

Hiromasa Funato et al, Springer, Orexin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects, 2015, 363-380.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船戸 弘正 (FUNATO, Hiromasa)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号: 90363118

(2) 研究分担者

高瀬 堅吉 (TAKASE, Kenkichi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80381474

(3) 連携研究者

なし