

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460322

研究課題名(和文) 幼少期ストレスによる肥満発症のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Effects of early-life stress on the development of obesity

研究代表者

高柳 友紀 (Takayanagi, Yuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10418890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：遊び行動をしているラットと、同居個体の遊びを観察しているが一緒に遊ぶことを阻害されているラットで、視床下部室傍核のオキシトシンニューロンが活性化された。遊び行動長期阻害ラット群では、幼少期から成熟するまでの摂食量と体重に差がなかった。オキシトシンプロモーター制御下でヒトジフテリア毒素受容体を発現する遺伝子改変ラットとプロラクチン放出ペプチド(PrRP)プロモーター制御下でヒトインターロイキン2受容体サブユニットを発現する遺伝子改変ラットを作製した。これらにジフテリア毒素或いはイムノトキシンを局所投与し、部位特異的にオキシトシンニューロン或いはPrRPニューロンを破壊することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of early-life social stress (deprivation of social play) upon food intake and body weight in adulthood of rats. Social play induced the activation of oxytocin neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus. Oxytocin neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus were also activated in the observer rats (which observed playing cagemates). Contrary to our expectations, food intake and body weight of chronic social stressed rats were not significantly different from control rats. We generated two transgenic rat strains that express human diphtheria toxin receptor under the control of the oxytocin promoter and express human interleukin-2 receptor alpha-subunit under the control of the prolactin-releasing peptide (PrRP) promoter. We succeeded in site-specific destruction of oxytocin neurons or PrRP neurons by local injection of diphtheria toxin or immunotoxin in transgenic rats.

研究分野：分子神経科学、生理学

キーワード：オキシトシン PrRP 社会的遊び 社会的ストレス 摂食 肥満

1. 研究開始当初の背景

幼少期に虐待やネグレクト、孤独といった社会的ストレスを経験すると、摂食の異常と肥満が起りやすいという疫学的な報告がある。肥満は死亡率を増大させることが明らかにされている。従って、幼少期の社会環境と摂食行動異常・肥満の関連性についての神経基盤は科学的のみならず、社会的にも大変重大な問題である。しかし、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。

我々は、摂食すると延髄のプロラクチン放出ペプチド(PrRP)産生ニューロンが活性化され、その結果、視床下部のオキシトシン産生ニューロンが活性化されることを、PrRP欠損マウスを用いて、明らかにしてきた。さらに、オキシトシン受容体が活性化されると摂食が終了することを、オキシトシン受容体欠損マウスと生理薬理学的な手法を組み合わせることで証明してきた。

また、高甘味・高カロリー食を摂取すると報酬性を担う側坐核のドーパミン放出が増加すること、この報酬性のため生体は高甘味・高カロリー食を過剰摂取してしまうことが示されている。我々は、PrRPを脳室内に投与することで、この側坐核のドーパミン放出が抑制されることを見出した(未発表)。また、オキシトシンを投与しても、覚醒剤によるドーパミン放出を減弱させると報告されている。さらに、我々は、PrRP欠損マウスでは高甘味・高カロリー食の摂取量が野生型と比べ増加していることを示した。また、オキシトシン欠損マウスにおいて高甘味食の摂取量が増加していることが報告されている。従って、PrRP産生ニューロン-オキシトシン産生ニューロン回路の機能が低下すると、報酬性を担うドーパミン放出が亢進して、高甘味・高カロリー食の報酬性が増加して摂取量が増えることが考えられる。

一方、我々は、母から愛着行動を受けると仔のオキシトシン受容体が活性化され、この活性化が正常な社会行動を維持するのに必須であることを見出した。逆に、幼少期に虐待やネグレクトを経験したヒトは、血中オキシトシン濃度が低下していると報告されている。オキシトシンの放出は、ニューロンの細胞体や樹状突起からも起こり、この放出は刺激を重ねることで増強されることが示されている。また、オキシトシン産生ニューロンでは、自己分泌・傍分泌されたオキシトシンがオキシトシン産生ニューロン自身に作用し、可塑的な変化を生み出すことが判っている。これらのデータから、幼少期にストレスを受けるとオキシトシン系の活動が可塑的に低下することが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、「幼少期に社会的ストレスが加わると、PrRP-オキシトシン神経回路が可

塑的に機能低下し、報酬系が亢進することで摂食量が増加し、その結果、肥満する」という仮説の検証を行うことを目的とした。

そのため、幼少期の社会的ストレスにより、成体で摂食量が増大し、肥満するかを明らかにすることを目指した。

また、摂食を抑制するPrRP-オキシトシン神経回路を同定し、幼少期の社会的ストレスにより、この神経回路が可塑的に機能低下するかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1)幼少期の社会的ストレスとして、ラットに対して社会的遊び行動の阻害を行った。

まず、社会的遊び行動によって、オキシトシン産生ニューロンが活性化するかどうかを検討するため、神経活動の指標であるc-Fosとオキシトシンの二重免疫組織化学法を行った。遊び行動群、隣で同居ラットが遊ぶところを観察できるが一緒に遊ぶことを阻害した群(遊び行動観察群)を設定し、検討した。

また、離乳後から成体になるまでの間、社会的隔離によって遊び行動を阻害した群(隔離群)、隣で同居ラットが遊ぶところを観察できるが一緒に遊ぶことを阻害した群(遊び行動観察群)、遊び行動群を設定した。これらに対して、離乳後から体重と摂食量を測定した。さらに、同じ群同士の2匹を新奇ケージに入れて、社会的相互作用テストを行った。

(2)オキシトシン産生ニューロンを時期・部位特異的に破壊するためのツールとして、これまでにオキシトシン産生ニューロン特異的にヒトジフテリア毒素受容体を発現するトランスジェニックラットを作製してきた。

ヒトはジフテリア毒素感受性であるが、マウスやラットでは受容体とジフテリア毒素の結合力が、ヒトの1000分の1と低く、ジフテリア毒素に対する感受性がきわめて低い。ジフテリア毒素は受容体と結合してエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。細胞内で酸性条件下になると毒素の立体構造が変化してAフラグメントが細胞質へ移動し、タンパク質合成を阻害するため、その細胞は死滅する。

これまでに、トランスジーン(オキシトシン-ヒトジフテリア毒素受容体-2A-YFP)に含まれる蛍光タンパク質YFPを指標にして、ヒトジフテリア毒素受容体がオキシトシン産生ニューロン特異的に発現している可能性が高いトランスジェニックラットを6ライン選定してきた。

本研究では、オキシトシン産生ニューロンを特異的に破壊できるラインを選択するために、ジフテリア毒素を脳室内投与した。オ

キシトシンに対する免疫組織化学法を行い、陽性細胞の数を検討した。さらに、ここで選定したラインにおいて、部位特異的なオキシトシン産生ニューロンの破壊ができることを確認するため、オキシトシン産生ニューロンが存在する視床下部室傍核、視索上核にジフテリア毒素を局所投与した。オキシトシンに対する免疫組織化学法を行い、陽性細胞の数を検討した。

(3)PrRP 産生ニューロンを時期・部位特異的に破壊するためのツールとして、これまでにPrRP 産生ニューロン特異的にヒトインターロイキン2 受容体 α サブユニット(IL-2Ra)を発現するトランスジェニックラットを作製してきた。

IL-2Ra は組み換え体イムノトキシンの標的分子である。組み換え体イムノトキシンは抗ヒトインターロイキン2 受容体抗体可変部と、緑膿菌毒素の膜透過と触媒活性に必要なドメインを含む融合タンパク質である。この分子は IL-2Ra と結合してエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。プロセッシングを経てできた緑膿菌毒素の触媒ドメインを持つフラグメントが、タンパク質合成を阻害するため、その細胞は死滅する。

トランスジーンのコストラクトには、IL-2Ra の下流に自己開裂ペプチドである 2A ペプチドをつないだ蛍光タンパク質 SGFP2 を導入してある (PrRP-IL-2Ra-2A-SGFP2)。これまでにトランスジェニックラットを9ライン得ており、本研究では、これらに対してPrRP と SGFP2 の二重免疫組織化学法を行い、PrRP 産生ニューロン特異的な IL-2Ra の発現を確認し、ラインを選定した。さらに、ここで選定したラインに対して、PrRP 産生ニューロンを部位特異的に破壊できることを確認するため、PrRP 産生ニューロンが存在する延髄孤側核、視床下部背内側核に組み換え体イムノトキシンを局所投与した。PrRP に対する免疫組織化学法を行い、陽性細胞の数を検討した。

4. 研究成果

(1)遊び行動群において、視床下部室傍核のオキシトシン産生ニューロンで c-Fos 陽性を示すものが多い傾向が認められた。さらに、遊び行動観察群では、遊び行動群を観察することによって、一匹で遊ぶ行動が惹起された。また、遊び行動群と同様に、視床下部室傍核のオキシトシン産生ニューロンで c-Fos 陽性を示すものが多い傾向が認められた。遊び行動の阻害が長期的に続くと、このオキシトシン産生ニューロンの活性化が変化するかどうかを今後検討する。

また、離乳後から成体になるまでの間遊び行動を阻害した群 (隔離群、遊び行動観察群) と遊び行動群において、離乳後から成熟する

までの間の体重と摂食量には差がなかった。これに関しては、高甘味・高カロリー食を与えたときの反応も検討する必要がある。

一方、隔離群と遊び行動観察群では、社会的相互作用の低下傾向が認められた。長期的に遊びを阻害されたストレスの影響は社会行動で確認された。しかし、この社会的ストレスでは摂食異常や肥満が誘発されなかったといえる。

(2)オキシトシン産生ニューロンを特異的に破壊できるラインを選択するために、オキシトシン-ヒトジフテリア毒素受容体-2A-YFP トランスジェニックラットに対してジフテリア毒素を脳室内投与し、免疫組織化学法によってオキシトシン陽性細胞数を検討した。オキシトシン産生ニューロンが特異的に、効率的に破壊されるラインを1ライン選定した。

さらに、このラインのラットに対して視索上核、視床下部室傍核に各々ジフテリア毒素を局所投与したところ、部位特異的にオキシトシン産生ニューロン陽性細胞が減少することが明らかとなった。今後はこの動物を用いて、どこのオキシトシン産生ニューロンが摂食の抑制あるいは高甘味・高カロリー食の抑制に働くかを検討する。

(3)PrRP 産生ニューロン特異的な IL-2Ra の発現を確認するために、PrRP-IL-2Ra-2A-SGFP2 トランスジェニックラットに対して、PrRP と SGFP2 の二重免疫組織化学法を行ったところ、9 ライン全てにおいて PrRP 陽性細胞に SGFP2 が発現していることを確認した。よって、これらのラットでは、IL-2Ra が PrRP 産生ニューロンに局限して発現していることが強く示唆された。しかし、その発現強度は全体的にあまり高くなく、サザンブロット法で 30 コピーであることがわかっていてのみ、発現が明瞭に観察できたため、このラインを以降の実験に用いることにした。

PrRP 産生ニューロンを特異的に破壊できることを確認するため、PrRP 産生ニューロンが存在する延髄孤側核、視床下部背内側核に対して、組み換え体イムノトキシンを局所投与し、免疫組織化学法によって PrRP 陽性細胞の数を検討した。今回選定した1ラインのトランスジェニックラットで、PrRP 産生ニューロンが特異的に、効率的に破壊できることを確認できた。今後はこの動物を用いて、どこの PrRP 産生ニューロンがどこのオキシトシン産生ニューロンを刺激してオキシトシン放出を促進し、摂食の抑制あるいは高甘味・高カロリー食の抑制に働くかを検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計6件)

- ① Takayanagi Y, Yoshida M, Takashima A, Takanami K, Yoshida S, Nishimori K, Nishijima I, Sakamoto H, Yamagata T, Onaka T: Activation of supraoptic oxytocin neurons by secretin facilitates social recognition. *Biological Psychiatry* **81**: 243-251, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.biopsych.2015.11.021
- ② Onaka T, Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M: Noxious or Non-Noxious Inputs to Oxytocin Neurons: Possible Roles in the Control of Behaviors. *Interdisciplinary Information Sciences* **21**: 189-195, 2015. 査読有 DOI: 10.4036/iis.2015.B.03
- ③ Okabe S, Yoshida M, Takayanagi Y, Onaka T: Activation of hypothalamic oxytocin neurons following tactile stimuli in rats. *Neuroscience Letters* **600**: 22-27, 2015. 査読有 DOI: 10.1016/j.neulet.2015.05.055
- ④ 尾仲達史、吉田匡秀、高柳友紀: 不安・恐怖とオキシトシン. アンチ・エイジング医学 **11** (1): 24-33, 2015. 査読無
- ⑤ Yoshida M, Takayanagi Y, Onaka T: The medial amygdala-medullary PrRP-synthesizing neuron pathway mediates neuroendocrine responses to contextual conditioned fear in male rodents. *Endocrinology* **155**: 2996-3004, 2014. 査読有 DOI: 10.1210/en.2013-1411
- ⑥ 高柳友紀、尾仲達史: オキシトシンとウロコルチンによる摂食制御. 日本臨牀増刊号 最新肥満症学—基礎・臨床研究の最前線— **1059**: 224-230, 2014. 査読無
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 高柳友紀、吉田匡秀、尾仲達史: 社会行動におけるオキシトシンの働き. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (招待講演), 2017 年 3 月 30 日, 長崎大学 坂本キャンパス (長崎県・長崎市)
- ② 吉田匡秀、高柳友紀、犬束歩、尾仲達史: 遺伝子改変動物とウイルスベクターを用いたオキシトシンシステム特異的な機能調節. 第 94 回日本生理学会大会 (招待講演), 2017 年 3 月 30 日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)
- ③ 犬束歩、吉田匡秀、高柳友紀、山中章弘、尾仲達史: 視床下部特定回路の活動操作と活動記録. 第 44 回自律神経生理研究会, 2016 年 12 月 3 日, 日本光電工業(株) フェニックス・アカデミー (人材開発センター) (東京都・新宿区)
- ④ Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, Inutsuka A, Onaka T: Do stroking stimuli induce a pleasant sensation in rats. 日本動物心理学会第 76 回大会, 2016 年 11 月 25 日, 北海道大学 学術交流会館 (北海道・札幌市)
- ⑤ 高柳友紀、尾仲達史: エネルギー代謝とストレスにおけるオキシトシンの働き. 第 43 回日本神経内分泌学会学術集会 (招待講演), 2016 年 10 月 14 日, アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県・浜松市)
- ⑥ 尾仲達史、高柳友紀、吉田匡秀、岡部祥太: 恐怖あるいは親和的刺激に対する神経内分泌系と行動における反応: オキシトシンの働き. 第 93 回日本生理学会大会 (招待講演), 2016 年 3 月 23 日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)
- ⑦ 岡部祥太、吉田匡秀、高柳友紀、尾仲達史: 接触刺激に対するラット視床下部オキシトシン産生細胞の活性化と超音波発声. 第 42 回日本神経内分泌学会 第 23 回日本神経行動内分泌研究会 合同学術集会, 2015 年 9 月 18-19 日, 仙台市 戦災復興記念館 (宮城県・仙台市)
- ⑧ Onaka T, Takayanagi Y, Yoshida M, Okabe S: Noxious or Non-Noxious Inputs to Oxytocin Neurons: Possible Roles in the Control of Behaviors. Parvo- and Magnocellular Symposium in Sendai (招待講演), 2015 年 9 月 17 日, 長陵会館 (宮城県・仙台市)
- ⑨ 高柳友紀、吉田匡秀、尾仲達史: オキシトシンによる情動・社会行動の制御. 第 92 回日本生理学会大会 (招待講演), 2015 年 3 月 23 日, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)
- ⑩ 尾仲達史、吉田匡秀、高柳友紀: 条件恐怖ストレスの神経内分泌反応における内側扁桃体の働き. 第 92 回日本生理学会大会 (招待講演), 2015 年 3 月 23 日, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)
- ⑪ 高柳友紀、吉田匡秀、尾仲達史: 神経ペプチド産生細胞を特異的に破壊するためのトランスジェニックラットの作製. 「共感性の進化・神経基盤」第 2 回領域会議, 2015 年 1 月 10 日, 東大寺総合文化センター (奈良県・奈良市)
- ⑫ Nasanbuyan N, Yoshida M, Takayanagi Y, Onaka T: Emotional contagion of social defeat: activation of oxytocin/oxytocin receptor system. 「共感性の進化・神経基盤」第 2 回領域会議, 2015 年 1 月 10 日, 東大寺総合文化センター (奈良県・奈良市)

- ⑬ Onaka T, Yoshida M, Takayanagi Y:
Lesions of vasopressin neurons by use
of vasopressin-DTR transgenic rats.
Satellite meeting of ICN 2014 in
Sydney “Recent and Future Trends in
Neuroendocrinology -from Asia and
Oceania to Global-”(招待講演) , 2014
年 8 月 16 日, Novotel Sydney Manly
Pacific (Sydney (Australia))

[その他]

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/usr/pys1/admpys1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高柳 友紀 (TAKAYANAGI, Yuki)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：10418890