

平成30年6月15日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18985

研究課題名(和文) NPYとヒスタミン神経系との相互作用による食餌性リズムの制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of neural mechanism underlying the regulation of feeding rhythm by interaction of the NPY- and histaminergic neurons

研究代表者

梅原 隼人 (Umehara, Hayato)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20610182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：筆者は摂食リズム制御機構におけるニューロペプチドY(NPY)という生理活性物質の役割を明らかにする研究を行った。一日一回同じ時刻に数時間だけ給餌を行うと、マウスは毎日の摂食時刻を予知する摂餌予知行動(FAA)を起こすようになる。本研究によりNPYの生理シグナル伝達に関係する蛋白質であるNPY受容体サブタイプ(Y-R)を生まれつき持たないマウスではFAAが減弱することを見出した。さらに、Y-Rを介するFAAの調節シグナルに関わる機構として、視床下部弓状核へのヒスタミン神経回路の活性化が関与することを突き止めた。現在これらの成果を論文にまとめている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine an interactive role of neuropeptide Y (NPY) and brain histamine in the regulation of feeding rhythm. When mice were subjected to a scheduled feeding in which food availability is restricted for a few hours in a day, they develop food-anticipatory activity (FAA). Daily rhythm of FAA is controlled independent of light-evoked circadian cycle regulated by a mechanisms involving several clock genes but the mechanism underlying the daily food-anticipation remains elusive. The author demonstrated that mice lacking NPY-receptor (Y-R) manifest markedly reduced FAA. Correspondingly with the reduction of the FAA, activity of the histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus was significantly attenuated. In addition, both anti-histamine and histamine-release blocker reduced FAA. These evidence suggests that the histaminergic neurons were activated through Y-R to elicit FAA.

研究分野：神経科学、薬理学

キーワード：摂食リズム 条件給餌 摂餌予知 ニューロペプチドY Y1受容体 ヒスタミン神経系 弓状核

1. 研究開始当初の背景

通常、げっ歯類は自由給餌で飼育されるが、一日一回一定時間だけの制限給餌 (scheduled feeding, SF) を行うと、給餌時刻に先立ち顕著な運動活性の増加と食餌探索行動を特徴とする摂餌予知行動; food anticipatory activity (FAA) を示すようになる。FAA は本来活動期でない明期に給餌を行っても形成され、自由給餌下で概日リズム形成を司る視交叉上核の破壊を行っても抑制されない (Behav. Neural. Biol. 25:545-554, 1979) ことから、明暗サイクルとは独立したメカニズムによって調節されていると考えられる。しかし、FAA を制御し食餌性リズムを生み出すメカニズム (FEO; food entrainable oscillator) は明らかとなっていない。

FEO を司る脳領域として、Tahara らは脳領域の破壊による FAA の消失を指標として、マウスの視床下部内側基底核 (MBH) の重要性を報告した (J Biol. Rhythms. 25:9-18, 2010)。Guiding らは MBH のうち背内側核 (DMH) 及び ARC における神経活性化の概日リズムの存在を明らかにした (Mol Brain. 2:28, 2009)。一方、DMH の破壊を行っても FAA は抑制されない (Eur J Neurosci. 29:1447-1460, 2009) ことから、ARC が FAA においてより重要な役割を果たしている可能性が考えられた。ARC には摂食促進性の NPY/AGRP 産生ニューロンと摂食抑制性の POMC/CART 産生ニューロンが存在する。SF を行ったマウスにおいて、給餌時刻に先立つ視床下部への NPY 放出の増加が報告されていたことから (Am J Physiol. 270:E596-600, 1996) 我々は NPY 神経系が視床下部への神経投射を介して FAA にも関与するのではないかと考えた。

ヒスタミン神経系は後部視床下部結節乳頭核 (TMN) に起始核を持ち、主に視床下部のヒスタミン H1R を介して覚醒や摂食行動調節に参与する。肥満の表現型を示す H1R-KO マウスでは、自由給餌下で、本来摂食行動の見られない明期の摂食行動量が上昇し、暗期の摂食行動ピークが平坦化することから、H1R は摂食リズム形成において重要な役割を果たしている可能性が示唆された (Diabetes 53: 2250-2260, 2004)。申請者らは以前、SF を行ったラットにおいて、求餌行動と共に TMN と ARC 尾側部位とに c-Fos 発現が起こることを見出した (Umehara et al., 2010, 2011)。Inzunza ら (2000)、Meynard (2005) らは明期に SF を行ったラットにおいて、FAA とパラレルにの TMN 腹背側部と視床下部外側野 (LHA) とに c-Fos (c-fos 遺伝子) 発現が起こることを報告した (Neurosci. Lett. 293, 139-142; Behav. Brain Res. 158, 311-319)。これらの知見からヒスタミン神経系が FAA に伴い活性化され、行動活性を増加させることが摂食行動の

開始点となっているのではないかと考えた。

解剖学的な知見として TMN への NPY 神経線維の投射が証明されている (Neurosci Lett 99 (3): 241-245, 1989)。TMN における NPY 受容体の分布は詳細には調べられていないが、FAA と同時に c-fos 発現の見られる TMN 背側部には少なくとも Y1R mRNA の発現が見出されている (J Comp Neurol 482(3):217-243, 2005)。薬理的には NPY の ICV 投与により視床下部の HA 放出が増加することがわかっている (Physiol Behav. 89(3):295-300, 2006)。しかし、NPY による HA 神経放出制御の生理学的意義は明らかとなっていない。FAA に伴う NPY 神経系及び HA 神経系の活性化のタイミングが重なることから、NPY が HA 神経系を活性化させているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、NPY 神経系による、ヒスタミン神経系の活性化制御が、FAA を引き起こすメカニズムとして重要であることを明らかにすることを目的とした。

具体的には以下の (1) ~ (5) について調べた。

- (1) FAA への NPY 受容体の関与
- (2) NPY 受容体遺伝子欠損のヒスタミン神経系の活性化への影響
- (3) NPY のヒスタミン神経系への投射とヒスタミン神経系における NPY 受容体の発現の解析
- (4) ヒスタミン神経系の投射部位における神経活性化に対する NPY 授与体遺伝子欠損の影響
- (5) ヒスタミン神経放出抑制薬とヒスタミン受容体拮抗薬の FAA およびヒスタミン神経系の投射部位における神経活性化に対する影響

3. 研究の方法

(1) 使用動物

実験には Y^{+/+} heterozygous マウス (C57Bl/6 バックグラウンド) の交配により得られた Y^{-/-} マウス (Y-KO) 及び野生型マウス (Y^{+/+} マウス (WT)) を用いた。

(2) 条件給餌 (SF)

10 週齢マウスを個別ケージに移し、11 週齢から一週間は自由給餌、自由飲水にて環境に馴化させた。12 週齢から一日一回 4 時間 (12 時から 16 時) の SF を行った。

(3) 摂餌予知行動 (FAA)

条件給餌 7 日目の朝 9 時から昼 12 時までのマウスの行動をモニターし、10 時から 12 時までのマウスの自発運動活性を FAA として測定した。ただし、grooming や resting に費やした時間は測定対象から除いた。

(4) 研究試薬の投与

抗ヒスタミン薬あるいは中枢ヒスタミン構成、放出抑制薬を午前9時ないし8時にそれぞれ腹腔内投与した。

(5) 脳サンプル回収、凍結浮遊切片の作成
行動実験を終えたマウスを直ちに麻酔し、滅菌したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 及び4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定した後、直ちに脳を摘出し、同固定液にて一晩後固定した(4)。その後30%ショ糖溶液中2日間脱水した後、O.C.Tコンパウンドに浸漬し、ドライアイスで急速凍結した。凍結脳ブロックをクライオスタットにて40µmに薄切し、不凍液(エチレングリコール、グリセロール、PBS)中に回収した。サンプルは免疫組織化学染色を行うまで、-30にて保存した。

(6) 免疫組織化学染色

凍結浮遊切片をPBSで3回洗った後、5%ヤギ血清でブロッキングした。その後各種一次抗体を単体あるいはカクテルにて4で適宜反応させた。0.05% triton-X100を含むPBS (PBST)で3回洗浄した後、一次抗体の血清動物に対応する蛍光二次抗体を使用抗体により、4あるいは25で適宜反応させた。PBSTおよびPBSで洗浄後、浮遊切片をMASコートスライドガラス上に回収し、退色防止剤入りの封入剤で封入した。蛍光シグナルは共焦点顕微鏡 (Zeiss 710)にて取得した。

4. 研究成果

以下に、目的の(1)から(5)に対応する研究の成果を記す。(未発表データのため、詳細は省略させていただく。)

(1) FAAへのNPY受容体(Y-R)の関与

WTに比べて、Y-KOではFAAが顕著に抑制されたことからY-RサブタイプがFAAに関与することが示唆された。

(2) NPY受容体遺伝子欠損のヒスタミン神経系の活性化への影響

Y-RによるFAAの発現機構にヒスタミン神経系が関与することを明らかにするために、FAAに伴うヒスタミン神経系の活性化に対するY-KOの影響を調べた。FAAが見られる時間帯のマウス脳サンプルを1時間おきに回収し、神経活性化のマーカーの1つであるc-Fosとヒスタミン神経マーカーであるヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)との蛍光二重免疫染色を行ったところ、ヒスタミン神経系における時間依存的なc-Fos発現が、Y-KOにより顕著に抑制された。このことから、FAAが見られる時間帯にY-Rを介してヒスタミン神経系が活性化されていることが示唆された。

(3) NPYのヒスタミン神経系への投射とヒスタミン神経系におけるY-R発現の解析

NPYのヒスタミン神経系への投射およびヒスタミン神経系におけるY-Rの発現についての詳細なデータはない。そこで、NPY、HDC、Y-Rの蛍光3重免疫組織化学染色を行い、詳細なパターンを解析した。その結果、TMNの一部のヒスタミン神経核群において、NPYの投射とY-Rの発現が見られた。これらのデータから、NPYは直接一部のヒスタミン神経系に投射し、Y-Rを介してその活性を調節していることが示唆された。

(4) ヒスタミン神経系の投射部位における神経活性化に対するY-KOの影響

Y-KOによりヒスタミン神経系の活性化が抑制されたので、次にY-Rにより制御をうけるヒスタミン神経回路を明らかにするため、ヒスタミン神経系の視床下部における主な投射先の神経活性化に対するY-KOの影響を調べた。視床下部において、ヒスタミン神経系は主に室傍核(PVN)や腹内側核(VMH)への投射を介して摂食行動の調節に関与することが知られるが、これらお部位においてはFAAが見られる時間にc-Fosの発現がほとんど見られなかった。そこで以前申請者が、SFを行ったラットにおいてヒスタミン神経系の新規標的部位として見出した弓状核の尾側部位(ArcMP)におけるc-Fos発現に対するY-KOの影響を調べた。その結果、ArcMPにおいてもヒスタミン神経系と同様のタイムコースでc-Fos発現が起こり、その発現はY-KOで顕著に抑制された。これらの知見から、FAAが見られる時間帯において、Y-R依存的にTMNからArcMPへのヒスタミン神経回路が活性化させていることが示唆された。

(5) ヒスタミン神経放出抑制薬とヒスタミン受容体拮抗薬のFAAおよびヒスタミン神経系の投射部位における神経活性化に対する影響

Y-R依存的に活性化されたヒスタミン神経回路が実際にFAAの発現に関与することを明らかにするために、FAAおよびArcMPのc-Fos発現に対する抗ヒスタミン薬およびヒスタミン放出抑制薬の影響を調べた。すると、抗ヒスタミン薬によりFAAは有意に抑制され、ヒスタミン放出抑制薬においても抑制傾向が見られた。またFAAが有意に抑制された抗ヒスタミン薬の処置によりArcMPのc-Fos発現も抑制された。以上のことから、FAAの見られる時間帯に事実ヒスタミン神経放出が起こっており、ArcMPのヒスタミン受容体サブタイプを介してFAAの発現に関与していることが強く示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

国内学会(計4件)

梅原 隼人、樋口 宗史 NPY による中枢ヒスタミン神経系調節の生理的意義 **第 18 回応用薬理シンポジウム** (2016年8月5-6日、名古屋、名古屋大学 医学部 医系研究棟1号館(地下会議室))

梅原 隼人、樋口 宗史 食餌性リズム形成時の NPY による摂餌予知行動調節とヒスタミン神経系の関与 **第 67 回日本薬理学会北部会** (2016年9月30日、札幌、北海道大学 学術交流会館)

Hayato Umehara and Hiroshi Higuchi. Regulation of feeding behavior by NPY in scheduled feeding and involvement of histaminergic neurons in its mechanism **第 90 回日本薬理学会年会** (2017年3月15-17日、長崎、長崎ブリックホール・長崎新聞文化ホール)

梅原 隼人、樋口 宗史 NPY 神経系による摂時予知行動制御におけるヒスタミン受容体の関与 **第 68 回日本薬理学会北部会** (2017年9月15-16日、山形、山形テルサ)

国際学会(計1件)

Hayato Umehara, Hiroyuki Fukui and Hiroshi Higuchi. Neuropeptide Y regulates activation of histaminergic subgroups through Y receptor to induce food-anticipatory activity. **Histamine 2017; 1st joint meeting of the European Histamine Research Society and the Japanese Histamine Research Society** (Vrije Universiteit Amsterdam, 0|2 research building, Amsterdam, Netherlands, May 11th-13th 2017)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者 ()
研究者番号：
(2) 研究分担者 ()
研究者番号：
(3) 連携研究者 ()
研究者番号：
(4) 研究協力者 ()