

令和元年5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08516

研究課題名(和文) 神経活性化マーカー可視化技術を応用した「末梢-中枢神経」食欲調節伝達経路の解析

研究課題名(英文) Analysis of hunger and satiety signalling pathway from peripheral to central nervous system using visualizing technology of a marker of neuronal activation

研究代表者

久留 和成 (Hisadome, Kazunari)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00592081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、食後に小腸から分泌される内因性ペプチドであり、摂食抑制作用を有していることが知られている。本申請研究では、生理的濃度のGLP-1を門脈内へ投与した際には、血流を介した液性の伝達経路よりも求心性神経を介した神経性の伝達経路が主な伝達経路とし機能し、脳幹孤束核領域の神経細胞が修飾を受けていることを明らかにした。また、神経活性化マーカーであるc-fosタンパクが発現した細胞のみに蛍光タンパクを発現するトランスジェニックラットを用いることで、末梢刺激に対して修飾を受ける中枢神経系の神経細胞を生細胞の状態と同定できる実験モデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、困難とされていた末梢刺激に対して応答を示した中枢神経の神経細胞を生細胞の状態と同定できることから、末梢刺激から中枢神経投射後の神経ネットワーク解析まで一連の求心性伝達系を連続的に解析できる汎用性の高い結果が得られた。

また、食欲調節に関わる情報伝達の詳細な機序を明らかにできる可能性を有していることから、社会的問題とされる肥満や拒食の治療法へつなげる研究結果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) is released postprandially from the gut and known as a satiety peptide. However, it's unclear whether peripheral GLP-1 can directly reach receptors in the brain. To examine how peripheral GLP-1 reaches into the brain, we analyzed the c-Fos, a marker of neuronal activation, expression in the brainstem neurons after intraportal injection of GLP-1. Physiological concentration of GLP-1 induced c-Fos expression of nucleus tract solitarius neurons, but not of area postrema neurons. These results suggest the GLP-1 secreted from the gut might reach the brain as a signal via vagal nerve rather than as a hormone via the bloodstream. These experiments were used transgenic rat expressing green fluorescent protein (GFP) under control of a c-fos promoter. Therefore, c-Fos-expressing neurons were identifiable by GFP. This experimental design might be applicable to the identification of secondary neurons for satiety- or hunger-signal of peripheral peptides.

研究分野：神経生理学

キーワード：摂食調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

現代社会において生活習慣病は深刻な社会問題として顕在化し、その代表的な疾患と考えられる脂質異常症、肥満および糖尿病はいずれも食欲および代謝機能の制御と密接に関わっている。これらの疾病予防および臨床治療のため、主たる食欲調節因子の同定および作用機序の解明が急務とされている。また、複数の食欲調節因子 (Glucagon-like peptide-1, コレシストキニン, アディポネクチン 等) の分泌部位は末梢臓器にも存在しており、それらの食欲調節因子が中枢神経系に作用している事も報告されているが、その食欲調節因子がどのような伝達路を介して中枢神経系に入力されているのか詳細な機序は明らかにされていない。一般的に末梢臓器由来の食欲調節因子が中枢性の作用を示す場合、求心性神経を介して神経シグナルとして中枢神経系に作用する 血流を介し液性シグナルとして中枢神経系に作用する 2 種類の伝達路が考えられるが、末梢部位を起点とした刺激に対して修飾を受ける中枢神経細胞の同定、特に生細胞の状態と同定解析している研究はほとんど報告されていない。

#### 2. 研究の目的

末梢臓器由来の摂食調節因子 (主に GLP-1) に対する求心性伝達路および活性化を受ける神経ネットワークを明らかにし、既に報告されている様々な食欲調節因子の摂食調節機構との共通点・相違点を中枢神経レベルで解析し、末梢臓器由来の食欲調節因子の摂食抑制作用に関する詳細な作用機序を明らかにする事を目的とする。

#### 3. 研究の方法

実験には、神経活性化マーカーである c-fos タンパクが発現した細胞のみに蛍光蛋白が発現するトランスジェニックラットを用い、蛍光陽性細胞を GLP-1 投与にて修飾を受けた細胞として解析を行った。摂食調節因子としては GLP-1 を用い、刺激部位としては GLP-1 の神経性伝達路の起点の 1 つと報告されている門脈領域に焦点を当て実験を行った。事前に門脈内にカニューレ留置手術を行い、そのカニューレを介して様々な濃度の GLP-1 を門脈内へ投与した後、急性脳スライス標本を作成し、eGFP 陽性細胞の組織学的局在および細胞数を蛍光顕微鏡下にて解析した。また、蛍光陽性細胞を分子生物学的手法および電気生理学的手法へ応用することを考え、eGFP 陽性細胞における蛍光強度の経時的变化を解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 門脈内 GLP-1 投与濃度の影響

門脈にて受容された GLP-1 刺激は、左迷走神経を介し同側 (左側) の孤束核へ入力していることから、様々な濃度の GLP-1 を門脈内へ投与し、左右の孤束核における活性化を受けた神経細胞数を観察し、細胞数に左右差の生じる GLP-1 濃度、すなわち神経伝達路のみを刺激する GLP-1 濃度を検討した。血流にて希釈される事を考慮し、様々な濃度の GLP-1 投与した結果、高濃度 GLP 投与時は、左右の孤束核領域において、蛍光陽性細胞が多数かつ同程度に観察された。また、血液脳関門を欠いているとされる最後野においても蛍光陽性細胞が多数観察されたことから、高濃度 GLP-1 門脈内投与時は、血流にて GLP-1 が最後野に到達していることに加えて、神経ネットワークを介して左右両側の孤束核へ情報伝達が行われていることが示唆された。GLP-1 門脈内投与濃度を下げ、生理的な GLP-1 濃度に近づくに従い、最後野および右側の孤束核における蛍光陽性細胞数が減少し、左右の孤束核における蛍光陽性細胞数の違いが顕著となった。これらの結果から、小腸より分泌される内因性 GLP-1 に起因する末梢-中枢神経系の伝達路は神経性経路が主な役割を果たしている事が示唆された。

## (2) 絶食条件と門脈内GLP-1投与の関係性

GLP-1は摂食抑制因子と作用していると考えられることから、空腹状態の実験動物を用いることで、その作用が顕著に観察できると考えられる。そこで、実験的に設けた絶食時間を変化させて、GLP-1門脈内刺激に対する孤束核内における蛍光陽性細胞の組織学的局在と細胞数の変化を観察した。GLP-1投与前の絶食時間に比例して、蛍光陽性細胞は増加する傾向が見られたが、12時間以上の絶食時間(16時間および24時間)では実験結果に有意な差は観察されなかった。また、通常飼育下のラット活動期(摂餌期)は飼育環境消灯期(暗期)に位置しているため、飼育パターンにより生じる習慣的空腹感は消灯前後から生じると考えられる。そこでこの習慣的空腹感が人為的絶食条件にて引き起こされる空腹感に影響を及ぼすか検討するため、絶食終了時刻を暗期直前と暗期期中、明期になるように絶食終了時間を設定し同様の実験を行った。12時間以下の絶食時間においては蛍光陽性細胞数に若干の減少が観察されたが、有意な差は生じず、12時間以上の絶食条件下においてはGLP-1投与のタイミングは実験結果に相違は見られなかった。

## (3) c-fos-eGFPトランスジェニックラットを用いた実験モデルの検討

蛍光陽性細胞に対して生理学的手法および分子生物学的手法を適用するにあたっては、蛍光陽性細胞を生細胞の状態で同定することが実験遂行の鍵となるため、標的細胞の視認可能な蛍光継続時間を明らかにする事を目的として実験を行った。また、生細胞の観察を終えた後の脳スライス標本は、その後速やかに固定し抗c-fos抗原に対する免疫組織化学染色法にてc-fos陽性細胞とeGFP陽性細胞との共局在性について蛍光多重染色法を用いて比較解析した。

今回の実験条件下では、脳スライス標本内における標的細胞の蛍光強度は、刺激後4時間程度まで極めて強く観察され、c-fos陽性細胞との多重染色を用いた確認実験においても、蛍光陽性細胞およびc-fos陽性細胞の、ほぼ全ての細胞間において共局在性が観察された。その後は刺激後の時間経過に伴い、蛍光陽性細胞数およびc-fos陽性細胞数は共に減少していく傾向が見られ、c-fos陽性細胞は刺激後4時間でほぼ観察されなくなり、刺激後5時間以降の脳スライス標本内では、蛍光陽性細胞は確認できるものの、明確に視認できる蛍光陽性細胞数は減少した。結論として7時間程度は、蛍光顕微鏡下で生細胞として同定可能であり、単一細胞を用いた実験に有用であることが明らかとなった。時間経過にともなうc-fos陽性細胞とeGFP陽性細胞の共局在性の低下は、eGFP陽性細胞においてc-fosタンパクの発現とeGFPの発現は同期しているものの、c-fosタンパク消失後もeGFPは残存し蛍光を呈し、蛍光強度持続時間が単に蛍光半減期に依存している事に起因すると考えられた。また同様の理由で、蛍光強度持続時間の細胞差は刺激に対するeGFPの発現量に依存しているものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：舩橋 誠

ローマ字氏名：FUNAHASHI, Makoto

所属研究機関名：北海道大学

部局名：歯学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：80221555

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。