

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15571

研究課題名(和文) 視床下部メラノコルチン受容体の神経細胞内局在と肥満発症の関連機構

研究課題名(英文) Mechanisms of interaction between age-dependent obesity and localization of melanocortin-4 receptors

研究代表者

大屋 愛実(Oya, Manami)

名古屋大学・医学系研究科・学振特別研究員(RPD)

研究者番号：90777997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、加齢性肥満発症の原因の一つとして考えられる代謝量低下のメカニズムを、視床下部におけるメラノコルチン4型受容体(MC4R)に着目して解析した。In vivo生理実験の結果、皮膚冷却に対する褐色脂肪の熱産生量が加齢と共に減少することを明らかにした。褐色脂肪の熱産生を制御する視床下部背内側部にはMC4Rが発現している。MC4Rのアゴニスト投与時の褐色脂肪熱産生量を解析すると、アゴニストに対する応答性が加齢と共に低下することが分かった。免疫染色の結果、加齢と共にMC4Rの局在が変化しており、それによりメラノコルチンに対する応答性が変化し、代謝量が減少する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

飽食と高齢化が進む現代において、加齢による肥満の発症機構の解明は重要な課題である。加齢性肥満の発症の原因の一つとして代謝量の減少が考えられるが、加齢による代謝量の低下メカニズムは明らかにされていない。本研究によってMC4Rを介した摂食・代謝調節機構が加齢によって変化するメカニズムを分子レベルで解明することが出来れば、これまでに考えられていなかった新しい肥満発症機構の提示につながるだけでなく、MC4Rの局在の制御を通じた画期的な肥満予防法や治療法の開発に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：Obesity is often developed with age due to attenuation of energy expenditure including metabolic thermogenesis. However, the mechanism of age-dependent attenuation of whole-body metabolism is unknown. In this study, we focused on melanocortin-4 receptors (MC4Rs), which play essential roles in the regulation of the central neural circuit controlling metabolic thermogenesis in brown adipose tissue (BAT). Our in vivo physiological experiments revealed that skin cooling-induced BAT thermogenesis and MC4R agonist-induced BAT thermogenesis were attenuated in older (6 months old) male rats compared with younger (9 weeks old) ones. To elucidate the mechanism of the age-dependent attenuation of MC4R sensitivity to melanocortin signals, we examined the distribution of MC4Rs. We found that aging changes the localization of MC4Rs. Thus, we hypothesized that age-dependent alteration in the localization of MC4R induces attenuation of MC4R sensitivity in older animals.

研究分野：生理学

キーワード：メラノコルチン 生理学 肥満 加齢 代謝調節 摂食制御

1. 研究開始当初の背景

現在、先進国では成人人口の約 40%が肥満を発症しており、肥満は高脂血症や高血圧、脂肪肝などの合併症を引き起こすだけでなく、直接の死因ともなることから、肥満発症機構の根本的な解明は現代社会における喫緊の課題である。また、加齢に伴い肥満の発症率が上昇することがよく知られているにもかかわらず、単純性肥満の中でも加齢性肥満の発症機構については不明な点が多く残されている。特に飽食と高齢化が進む現代では、加齢による肥満の発症機構の解明は医学研究における重要な課題の一つである。

肥満の発症要因として、摂食制御機構や代謝調節機構の障害が挙げられる。正常な生体では、白色脂肪細胞から血中へ分泌されるレプチンが、視床下部弓状核のプロオピオメラノコルチン (POMC) ニューロンおよびニューロペプチド Y (NPY) /アグーチ関連ペプチド (AgRP) ニューロン上にあるレプチン受容体に作用すると、POMC 産生ニューロンが活性化される。すると、NPY/AgRP ニューロンは抑制される一方、POMC ニューロンは活性化され、視床下部室傍核に伸びた軸索終末から α -メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) を放出する。 α -MSH は室傍核内の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) ニューロンやオキシトシンニューロンなどに発現するメラノコルチン受容体に作用し、交感神経系を介した代謝の亢進および孤束核を介した摂食抑制を導く。

メラノコルチン受容体は現在 5 種類が同定されており、そのなかでも 4 型メラノコルチン受容体 (MC4R) の肥満への関与が注目されている。MC4R ノックアウトマウスは過食および肥満を呈するが、興味深いことに、食後の血中レプチン濃度上昇は生じるものの、食欲が抑制されず、食後の体温上昇も野生型マウスと比較して少なかった。さらに近年の研究で、オプトジェネティクスを用いて、室傍核の MC4R 発現ニューロンを活性化すると食欲が抑制された。以上の結果から、MC4R は過食の抑制と過剰摂取エネルギーの消費に重要な働きをもつことが示唆されたが、MC4R が加齢性肥満発症に及ぼす影響については不明である。

2. 研究の目的

上述したように、MC4R は摂食・代謝調節に関与するが、加齢に伴う代謝量減少に対する MC4R の寄与を調べた研究はこれまでにない。そこで本研究では、*in vivo* 生理実験と研究代表者の所属研究室で独自に作製した抗 MC4R 特異的抗体を用いた免疫組織染色によって、視床下部 MC4R を介した摂食・代謝調節機構ならびにその局在変化による加齢性肥満発症機構を解析した。

具体的には、

- (1) *In vivo* 生理実験による、加齢に伴う褐色脂肪熱産生量の変化の観察
- (2) MC4R の細胞内局在の観察と加齢がその局在に与える影響の解析
- (3) ウイルスを用いて、MC4R の局在に関与する遺伝子をノックダウンした際のラット個体の摂食量、体重変化および代謝量の解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) *In vivo* 生理実験による、加齢に伴う褐色脂肪熱産生量の変化の観察

9 週齢と 6 ヶ月齢のオスの Wistar ST 系統のラットに、ウレタン・クロラル麻酔をかけ、既報の方法により、褐色脂肪における交感神経活動、褐色脂肪組織温度、心拍数、血圧および呼気中 CO₂ 濃度を同時計測した。ラットの体幹部表面に装着したウォータージャケット中の水温を変化させることで深部体温を 36、37 および 38 に調節し、それぞれの体温条件下でウォータージャケットに氷水を 1 分間流すことで皮膚冷却を行った。次に、脳内にガラスキャピラリーを刺入して MC4R のアゴニストであるメラノタン を視床下部背内側部 (片側) に微量注入 (100nl) し、上述の生理学的パラメーターを経時的に測定した。

計測終了後、メラノタンの注入部位に蛍光マイクロビーズを微量注入した。計測を終了したラットの右心室から 4%ホルムアルデヒド水溶液を灌流することで全身組織を固定した。脳を摘出した後、一晚以上 30%スクロース水溶液中で振とうした後、凍結マイクロトームを用いて 30 μ m の厚さの組織切片を作製した。作製した脳組織切片に対し本研究室で独自に作成した抗 MC4R 抗体を用いて免疫組織染色を行った。脳組織切片はスライドガラスに貼り、封入後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。蛍光マイクロビーズを検出することにより、MC4R アゴニストの注入部位を確認した。

- (2) MC4R の細胞内局在の観察と加齢がその局在に与える影響の解析

3 週齢のオスの Wistar ST 系統のラットを購入し、9 週齢、15 週齢、21 週齢および 24 週齢になるまで摂餌量測定装置付ケージで 1 個体ずつ飼育した。先述の週齢に到達した時点で深麻酔をかけ、右心室から 4%ホルムアルデヒド水溶液を灌流することで全身組織を固定した。脳を摘出

し、一晚以上 30%スクロース水溶液中で振とうした後、凍結マイクロトームを用いて 30 μm の厚さの組織切片を作製した。作製した脳組織切片に対し本研究室で独自に作成した抗 MC4R 抗体を用いて免疫組織染色を行った。脳組織切片はスライドガラスに貼り、封入後、蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(3) ウイルスを用いて、MC4R の局在に関する遺伝子をノックダウンした際のラット個体の摂食量、体重変化および代謝量の解析

MC4R 遺伝子プロモーター下で Cre を発現するノックインラット (9 週齢) に深麻酔をかけ、脳定位装置に装着した状態で頭頂部の皮膚を切開し、視床下部背内側部の MC4R 発現神経細胞特異的に MC4R が局在する細胞内構造を変容させるウイルスを注入した。注入後、皮膚切開部を縫合・消毒し、抗生物質を投与することで感染予防を行った。麻酔より回復させた後、摂餌量測定装置付きケージにおいて 6 週間飼育を行った。飼育中は毎日 1 日あたりの摂餌量を計測し、EchoMRI を用いて体重と体脂肪率を 1 週間に 1 度測定した。6 週間観察した後、代謝計測装置内で 3 日間飼育することで代謝量を計測し、先述の固定法によって脳組織標本を作製した。

4. 研究成果

(1) *In vivo* 生理実験による、加齢に伴う褐色脂肪熱産生量の変化の観察

9 週齢と 6 ヶ月齢のオスの Wistar ST 系統のラットにおいて、*in vivo* 生理実験を行ったところ、9 週齢のラットでは 36、37、38 の全ての深部体温で皮膚冷却に対する褐色脂肪の熱産生が起こった。それに対し 6 ヶ月齢のラットは深部体温が 37、38 では皮膚冷却に対する褐色脂肪の熱産生が起こらず、深部体温を 36 まで下げて初めて皮膚冷却に対する褐色脂肪熱産生が起こった。つまり、加齢に伴い褐色脂肪の熱産生が起こりにくくなっていることが分かった。褐色脂肪熱産生の制御において重要な役割を果たす視床下部背内側部は MC4R を発現しており、メラノコルチン系は中枢神経系において摂食や代謝を調節する働きを持つ。加齢性肥満の発症に対する MC4R の関与の可能性を検証するため、視床下部背内側部に MC4R のアゴニストを微量注入し、褐色脂肪熱産生に及ぼす影響を調べた。MC4R のアゴニストであるメラノタン を視床下部背内側部に微量注入した際に起こる褐色脂肪熱産生量を 9 週齢と 6 ヶ月齢のラットで比較すると、9 週齢に比べ、6 ヶ月齢のラットの方がアゴニスト投与によって起こる褐色脂肪熱産生が減弱することが分かった。つまり、加齢に伴い MC4R の応答性が低下していることが明らかになった。

(2) MC4R の細胞内局在の観察と加齢がその局在に与える影響の解析

MC4R のメラノコルチンへの感受性が加齢と共に弱まる原因を明らかにするため、本研究室で独自に作製した抗 MC4R 抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、MC4R が視床下部背内側部の神経細胞の特定の細胞内構造に局在していることが分かった。さらに、3 週齢から 24 週齢までの様々な週齢のラットから作製した脳組織切片に対して抗 MC4R 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、MC4R を発現しない神経細胞の細胞内構造は変化しないのに対し、MC4R が局在する特定の細胞内構造だけが加齢に伴って変容していた。この結果から、加齢に伴い MC4R が局在する特定の細胞内構造が変容することでメラノコルチンシグナルに対する MC4R の感度が低下し、メラノコルチン系を介した代謝を制御する神経回路が抑制されるようになり、次第に褐色脂肪熱産生の機能が低下していくという可能性が示唆された。

(3) ウイルスを用いて、MC4R の局在に関する遺伝子をノックダウンした際のラット個体の摂食量、体重変化および代謝量の解析

MC4R 遺伝子プロモーター下で Cre を発現するノックインラットを用いて、視床下部背内側部の MC4R 発現神経細胞選択的に、MC4R が局在する細胞内構造を変容させたところ、コントロール群と比較して代謝量が減少していた。また、体重と体脂肪率は増加し、肥満傾向となることがわかった。MC4R は視床下部背内側部だけでなく、視床下部室傍核にも発現することがわかっており、室傍核の MC4R は主に摂食を制御する。上記と同じ方法で視床下部室傍核および背内側部の MC4R 発現神経細胞選択的に特定の細胞内構造を変容させたところ、視床下部背内側部だけで変容させた時と比較して摂食量が増加し、さらに体重と体脂肪率が増加することが分かった。

今後は MC4R 陽性細胞内構造の加齢による変容を、ウイルス注入により人為的に起こらないようにした個体を作製して、摂食量や代謝量に及ぼす影響を解析していく。また、これまでに作成したサンプルを用いて遺伝子解析を行い、加齢性肥満発症に関する因子の同定を行い、加齢性肥満発症の脳内機構の解明を目指す。

< 引用文献 >

Ng M, Fleming T, Robinson M, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384: 766–81, 2014.

Butler AA, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nature Neuroscience* 4:605–11, 2001.

Garfield AS, Li C, Madara JC, et al. A neural basis for melanocortin-4 receptor- regulated appetite. *Nature Neuroscience* 18: 863-871, 2015.

Kataoka N, Hioki H, Kaneko T, Nakamura K. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus–medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell Metabolism* 20:346–358, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshimi Kazuto, Oka Yuichiro, Miyasaka Yoshiki, Kotani Yuko, Yasumura Misato, Uno Yoshihiro, Hattori Kosuke, Tanigawa Arisa, Sato Makoto, Oya Manami, Nakamura Kazuhiro, Matsushita Natsuki, Kobayashi Kazuto, Mashimo Tomoji	4. 巻 140
2. 論文標題 Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 277 ~ 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-020-02198-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大屋 愛実
2. 発表標題 加齢性肥満発症機構の解明を目指した抗メラノコルチン4型受容体抗体の作製
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大屋 愛実
2. 発表標題 Age-dependent attenuation of hypothalamic sensitivity to thermogenic melanocortin signals.
3. 学会等名 第9回FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大屋 愛実
2. 発表標題 視床下部メラノコルチン受容体を介した熱産生反応は加齢とともに減弱する
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中村 和弘 (Nakamura Kazuhiro) (00548521)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究協力者	真下 知士 (Mashimo Tomoji) (80397554)	東京大学・医科学研究所・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------