

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06525

研究課題名(和文) 視床下部室傍核C1q like proteinによるエネルギー代謝調節機序の解明

研究課題名(英文) Regulation of energy metabolism by C1q like protein in hypothalamus

研究代表者

須山 成朝 (SUYAMA, Shigetomo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：80528414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：C1qファミリータンパク質はシナプス前部から分泌され、神経伝達物質受容体を集積し、シナプス形成に働く。視床下部の摂食/満腹中枢は末梢のエネルギー代謝情報(ホルモン、栄養素)を受容、統合し、エネルギー代謝恒常性を維持する。C1qファミリータンパク質の視床下部ニューロンのシナプス伝達を介したエネルギー代謝調節への寄与を検討した。C1ql3は視床下部外側野、弓状核、室傍核及び隣臓ラ氏島に発現し、欠損マウスは、一晚絶食後の有意な過食、顕著な耐糖能を示した。Cbln4は視床下部弓状核の摂食亢進性AgRPニューロンの軸索上に発現し、絶食負荷によりシナプスへ集積し、抑制性シナプスを形成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部の満腹・摂食中枢は食欲・エネルギー消費のバランスをとり、全身のエネルギー恒常性の維持を担う。その神経回路網はシナプス可塑性により、全身エネルギー状態(空腹/満腹など)を反映して、動的に再編される。その可塑性の分子機序の解明を目指し、全身エネルギー状態の変化によるシナプス形成分子C1ql3、Cbln4の局在変化とその欠損による表現型の変化を見出した。過食・肥満などのメタボリックな病態ではこの可塑性に異常が起こることが知られており、本研究成果は新規の治療標的につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：C1q family proteins are secreted from presynaptic terminals, accumulate neurotransmitter receptors, and play a role in synaptogenesis and transmission regulation. The hypothalamic hunger / satiety center receives and integrates peripheral energy metabolism information (hormones, nutrients) to maintain energy metabolism homeostasis. Focusing on C1ql3 and Cbln4, which belong to the C1q family, we investigated their contribution to systemic energy metabolism through synaptic transmission of hypothalamic neurons.

C1ql3 is expressed in the lateral hypothalamus, arcuate nucleus, paraventricular nucleus and pancreatic islet, and C1ql3 deficient mice show significant overeating after fasting and marked glucose tolerance. Cbln4 was observed on the axons of AgRP neurons, which are orexigenic neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus, accumulates at synapses by fasting, and regulates inhibitory synaptic transmission.

研究分野：神経生理学

キーワード：摂食・エネルギー代謝 視床下部 シナプス C1qファミリータンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

摂食・エネルギー代謝は視床下部により調節され、生体恒常性を維持する。低血糖、グレリンなどの末梢空腹シグナルは視床下部弓状核 (ARC) に局在する摂食亢進系 Agouti related peptide (AgRP)/GABA ニューロンを活性化し、インスリン、レプチンなどの満腹シグナルは摂食抑制系 Proopiomelanocortin (POMC) ニューロンを活性化する。これら2つのニューロンが視床下部室傍核を中心とする二次満腹中枢を競合的に制御することで、摂食・エネルギー代謝の恒常性を調節している。摂食・エネルギー代謝は視床下部により調節され、生体恒常性を維持する。低血糖、グレリンなどの末梢空腹シグナルは視床下部弓状核 (ARC) に局在する摂食亢進系 Agouti related peptide (AgRP)/GABA ニューロンを活性化し、インスリン、レプチンなどの満腹シグナルは摂食抑制系 Proopiomelanocortin (POMC) ニューロンを活性化する。これら2つのニューロンが視床下部室傍核を中心とする二次満腹中枢を競合的に制御することで、摂食・エネルギー代謝の恒常性を調節している。

自然免疫において働いているタンパク質である補体 C1q と似た構造を持つ一連の分子群 (C1q ファミリー) は、中枢神経系においてシナプス前終末から分泌され、シナプス前終末、シナプス後部にそれぞれ局在する膜タンパク質と三者複合体を作ることによってシナプス形成とともにシナプス可塑性を制御する。また、特定のグルタミン酸受容体と結合し、そのシナプス後部への集積と機能を調節する。

予備実験によって C1q12 や C1q13 が視床下部室傍核に発現するのみでなく C1q12 や C1q13 遺伝子欠損マウスにおいて体重減少と血中脂質代謝マーカーが変化することを見出したことから、新しいシナプス調節機構を介したエネルギー代謝調節系が存在することを着想するに至った。

2. 研究の目的

摂食・エネルギー代謝は、さまざまな環境因子によって制御されていると考えられているが、その詳細な分子機構は分かっていない点が多く、未同定の摂食・エネルギー代謝調節ニューロンが存在すると考えられている。また視床下部でのシナプス可塑性は1回の食餌ではなく、長期に渡る食習慣に関与すると考えられるが、その詳しい分子機構はよく分かっていない。本申請研究では、補体 C1q ファミリー分子 (Yuzaki, *Curr Opin Neurobiol*, 2017) に着目し、「**視床下部に発現する C1q ファミリー分子のシナプス伝達調節機序とエネルギー代謝に与える影響の解明**」を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

研究に使用したマウスは個別換気ケージ内で 12 時間明暗サイクル、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ の環境下で自由摂食、自由飲水で飼育した。

遺伝子組換えマウスとして、C1q13 欠損マウス、Cb1n4 欠損マウスを用い、対照群として同腹仔の野生型マウスを用いた。また、AgRP-ires-Cre マウスと DIO-synaptophysin-Tdtomato マウスを交配し、免疫組織化学実験に使用した。

組換え DNA 実験、動物実験は慶應義塾大学における慶應義塾大学医学部遺伝子組換え実験安全委員会、慶應義塾動物実験委員会の認可のもとそのガイドラインに沿って実施した。

(2) エネルギー代謝測定

摂食量/体重測定は個別換気ケージ内で4週齢から24週齢まで粉末飼料で個飼いされたマウスに対し週に一度行った。25週齢時に一晚絶食(16時間)負荷し再摂食量を測定または直腸温測定を行い、1週間ゾンデ挿入の順化を行った後、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行った。

(3) 免疫組織化学

8~10週齢のマウスから glyoxal 固定液を経心灌流後に脳を取り出し、sucrose 置換の後、cryostat で凍結切片を作成した。一部の切片は脳を液体窒素で凍結し、cryostat で凍結切片を作成後 glyoxal 固定液で固定した。各標本に一次抗体を16時間、二次抗体を3時間加え、共焦点顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) C1ql3 によるエネルギー代謝調節

C1ql3 によるエネルギー代謝調節への寄与を検討するために、C1ql3 欠損マウスの摂食量・体重変化を週1回、4~24週齢にわたり計測した。しかし、摂食量・体重ともに野生型マウスと比較して有意な差は観察されず、予備検討の結果を再現できなかった。また、エネルギー消費への寄与を検討するため経時的に直腸温測定を行ったが有意な変化を見出すことができなかった。一方で、短期的なエネルギー代謝の変動に対する応答を調べるため、一晚絶食後の再摂食量・体重を測定したところ、C1ql3 欠損マウスにおいて有意な体重増加率の上昇と再摂食量の増加を示した。

糖代謝への寄与を調べるため、経口グルコース負荷試験、インスリン負荷試験を行い、C1ql3 欠損マウスは耐糖能の亢進とインスリン感受性の上昇を示した(図1)。

in situ hybridization 及び免疫組織化学法により、視床下部満腹/空腹中枢における C1ql3 発現ニューロンを検索した。視床下部外側野、室傍核、弓状核後部の細胞に発現が認められた。特に外側野においては Orexin 発現ニューロンとの共局在が認められた。また、膵臓ランゲルハンス氏島にも免疫陽性が認められた。

以上より C1ql3 は短期的なエネルギー代謝と糖代謝の恒常性の維持に寄与することが示唆された。さらなる研究によりこれらの表現型を担う責任ニューロン(細胞)の同定が期待される。

C1ql3欠損マウスは耐糖能とインスリン感受性の亢進を示した

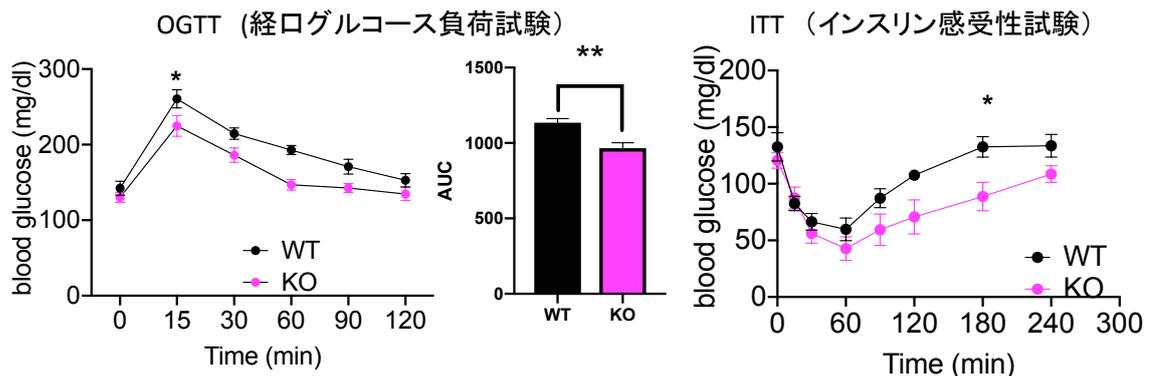


図 1

(2) Cbln4 によるエネルギー代謝調節

Cbln4 によるエネルギー代謝調節への寄与を調べるため、Cbln4 欠損マウスの摂食量・体重変化を週 1 回、4~24 週齢にわたり計測した。体重は野生型マウスと比較して変化はなかったが、摂食量の有意な増加が認められた。また、エネルギー消費への寄与を検討するため経時的に直腸温測定を行ったところ欠損マウスにおいて上昇が認められた。

免疫組織化学染色により視床下部弓状核に局在する摂食亢進系 AgRP 発現ニューロンの軸索上に Cbln4 免疫陽性が観察された。プレシナプスマーカー-synaptophysin と Tdtomato の融合タンパク質を用いて AgRP ニューロンの室傍核へ投射するプレシナプスを可視化し、ポストシナプスマーカー-gephyrin と Cbln4 との共染色を行った。自由摂食群と比較し一晩絶食負荷群では synaptophysin と共局在する Cbln4 が増加し、これに伴い synaptophysin と gephyrin の共局在が増加した。従って AgRP ニューロンの活動が亢進する絶食負荷により、Cbln4 がシナプス形成することが示唆された。さらに AgRP の免疫組織化学染色により、一晩絶食負荷群では AgRP 免疫陽性 pancta のサイズが縮小することを観察した。これは空腹により AgRP ニューロンが活性化し、AgRP が放出されたためと考えられる。Cbln4 欠損マウスにおいては、自由摂食下においても AgRP 免疫陽性のサイズが一晩絶食負荷下の野生型マウスと同等に縮小することを観察した(図 2)。従って、AgRP ニューロンの Cbln4 はシナプス形成のみならず神経ペプチド分泌調節を担う可能性が示唆された。

以上より Cbln4 は視床下部弓状核 AgRP ニューロンと満腹中枢である室傍核ニューロン間のシナプス形成及び神経ペプチド分泌調節を担うことが示唆された。さらなる研究によりこのシナプス形成分子の動態の詳細及び受容体の同定が期待される。これまで不明であった摂食/エネルギー代謝調節ニューロンのシナプス形成機構の分子機序を明らかにする一助となることが期待される。また、C1q ファミリータンパク質のほとんどが興奮性シナプス形成に働くことから、AgRP ニューロンの抑制性シナプス形成機構の解明は大きな意義を持つと考えられる。

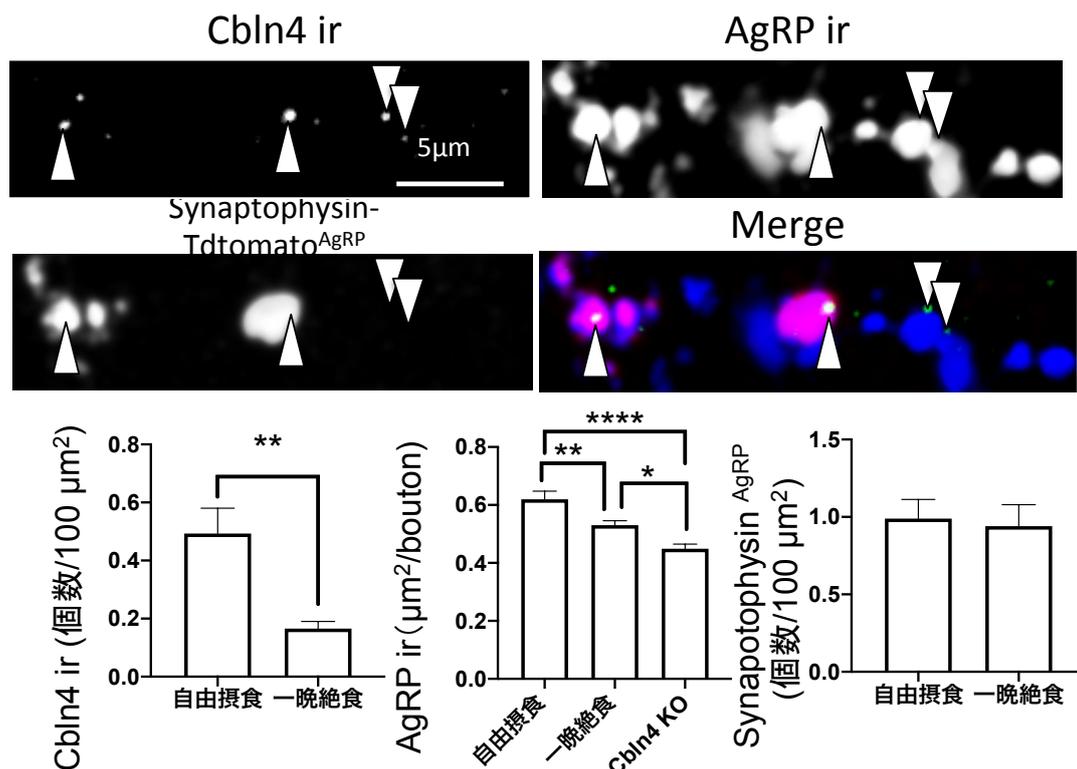


図 2

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 0件）

1. 著者名 Shigetomo Suyama, Tochihiko Yada	4. 巻 Volume 68, Issue 6
2. 論文標題 New insight into GABAergic neurons in the hypothalamic feeding regulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 717~722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-018-0622-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	柚崎 通介 (Yuzaki Michisuke)		
研究協力者	今野 孝太郎 (Konno koutaro)		

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
---------	---------