

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08494

研究課題名(和文) レプチンによる糖代謝制御を司る神経回路の解明

研究課題名(英文) Neural circuits for leptin-mediated glucose homeostasis

研究代表者

近藤 邦生 (Kondoh, Kunio)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・助教

研究者番号：90784950

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)：糖は体内の主要なエネルギー源であり、脳は糖の体内濃度が適切に保たれるように制御する。白色脂肪から分泌されるレプチンは、脳の視床下部に働きかけて筋肉や脂肪の糖取込みを促進し、血中の糖濃度を下げる重要な働きを担っている。本研究では、レプチンのシグナルを視床下部から骨格筋と褐色脂肪に伝え、糖の取込みを制御する神経回路の解析を行った。神経回路トレーサーである狂犬病ウイルスを用いて、脳と骨格筋と褐色脂肪を結ぶ神経回路の網羅的解析を行い、視床下部と末梢組織を結んで糖代謝を制御する新しい神経細胞の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脳と末梢組織を結ぶ神経回路の構造が明らかになり、さらに末梢組織を制御することで血糖値の調節に関わる可能性のある新しい神経細胞グループが同定された。このような神経細胞グループはこれまであまり同定されておらず、脳による全身の糖代謝の新たな調節メカニズムの解明につながる重要な発見である。この神経細胞グループは肥満や糖尿病などの糖代謝の異常を伴う代謝疾患の発症にも関与する可能性があり、この神経細胞グループの神経活性の人為的な制御法を開発することで、生活習慣病の新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Glucose is the main source of energy in the body, and the brain controls the proper concentration of glucose in the body. Leptin, which is secreted from white fat, acts on the hypothalamus of the brain to promote the uptake of glucose in muscles and fat and plays an important role in lowering the glucose concentration in the blood. In this study, we analyzed the neural circuits that control glucose uptake by transmitting leptin signals from the hypothalamus to skeletal muscle and brown fat. Using a neural circuit tracer pseudorabies virus, we conducted a comprehensive analysis of the neural circuit from the brain to skeletal muscle or brown adipose tissue. As a result, we identified a new population of neurons that connects the hypothalamus and peripheral tissues to control glucose metabolism.

研究分野：神経科学 代謝学

キーワード：視床下部 糖代謝 仮性狂犬病ウイルス 末梢神経系

## 1. 研究開始当初の背景

糖（グルコース）は動物の最も重要なエネルギー源であり、動物細胞のエネルギー代謝は主にグルコースによって担われる。一方で高濃度のグルコースは生体に有害であり、血液内グルコース濃度（血糖値）は常に一定の範囲内に保たれる必要がある。血糖値が制御されず高い状態が維持されると、糖尿病などの病的症状が現れる。血糖値の正常な範囲への維持にはグルコースの産生と消費（取込み）の最適なバランスが必要であり、脳の視床下部の神経細胞が重要な役割を果たしている。

脳はグルコース感受性神経細胞を通して血糖値を検知する。さらに、体内の様々な器官から分泌されるホルモン（インスリンやグレリンなど）を通して情報を受け取る。低血糖下では脳は肝臓による糖産生を促し、筋肉や脂肪での糖取込みを抑制する。一方血糖値が上昇すると、脳は肝臓での糖産生を抑制し、筋肉や脂肪における糖取込みなどを促進し、血糖値を低下させる（図1）。

白色脂肪から分泌されるホルモンであるレプチンは、視床下部の神経細胞に働きかけて食欲を抑制し、さらに筋肉や脂肪組織における糖取込みを促し、血糖値を低下させる。インスリンの分泌が起こらなくしたマウスやラットは糖尿病を発症するが、レプチンの投与により血糖値がほぼ正常化する[Wang et al. PNAS 2010, Fujikawa et al. PNAS 2010]。脂肪萎縮症の患者では血中レプチン濃度が低下し重症の糖尿病を発症するが、レプチンの投与はこれをほぼ正常化することができ、現在治療薬として用いられている[Ebihara et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2007]。これらのレプチンの作用は脳の中樞神経系を介することが明らかになっている。したがって、脳を介したレプチンのシグナルは血糖値の制御に非常に重要である。

これまでの研究から、脳の視床下部腹内側核（Ventromedial hypothalamus、以下VMH）の神経細胞に発現するレプチン受容体が、レプチンによる糖代謝の制御に関わることがわかっている。VMHのレプチン受容体を欠損したマウスは肥満と高血糖値を示す[Dhillon et al. Neuron 2006, Bingham et al. Endocrinology 2008]。またVMHにレプチンを注入すると、交感神経系を介して骨格筋および心臓、褐色脂肪の糖の取込みが促進される[Minokoshi et al. Diabetes 1999, Toda et al. Diabetes 2009]。したがって、VMHに存在するレプチンを受容する神経細胞から末梢組織へシグナルを伝える神経回路は、血糖値の恒常性の制御において重要な役割を果たしている。

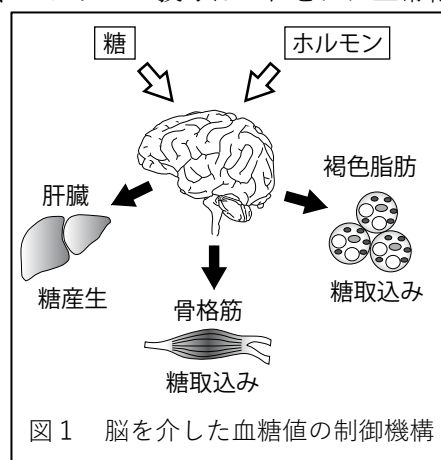


図1 脳を介した血糖値の制御機構

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、レプチンによる血糖値の制御において、「レプチンが働きかける中枢神経細胞 (=VMH)」と「レプチンが糖取込みを制御する末梢組織 (=骨格筋、褐色脂肪など)」は明らかになってきたものの、それらを繋いで制御する神経回路はほとんど分かっていない。本研究は、視床下部VMHから骨格筋と褐色脂肪まで、レプチンのシグナルを伝えて糖の取込みを制御する神経回路を同定することを目的とした（図2）。

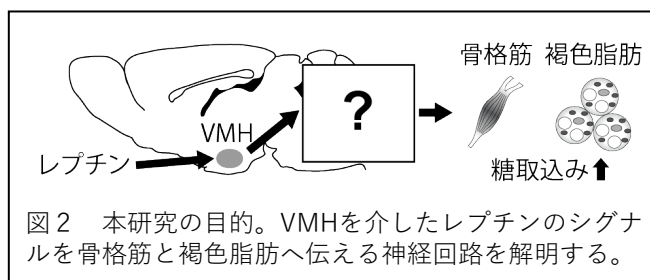


図2 本研究の目的。VMHを介したレプチンのシグナルを骨格筋と褐色脂肪へ伝える神経回路を解明する。

## 3. 研究の方法

本研究ではレプチンによる骨格筋と褐色脂肪の糖取込みを制御する神経回路を解析するため、以下の3つの方法で研究を行った。

### (1) 骨格筋・褐色脂肪にシグナルを伝える神経回路の同定

仮性狂犬病ウイルス Bartha 株 (以下 PRV) は神経細胞に感染すると増殖し、シナプス結合を介して上流の神経細胞に逆行的に輸送される (図3)。PRV を用いると、特定の神経細胞にシグナルを伝える上流の神経細胞を網羅的に同定できる。この PRV を骨格筋と褐色脂肪組織に接種し、ウイルス感染細胞を同定することで、脳と骨格筋と褐色脂肪組織を結ぶ神経回路網の構造を解析した。

### (2) 骨格筋・褐色脂肪に VMH からのシグナルを伝える神経細胞の同定

(1) で同定したウイルス感染細胞に発現する遺伝子マーカーを同定し、末梢組織を制御する神

神経細胞グループを同定した。さらに、それらの中から、VMH からのシグナルを伝える神経細胞を同定した。

(3) 骨格筋・褐色脂肪に VMH からのシグナルを伝える神経細胞の機能解析

(2)で明らかした VMH から骨格筋・褐色脂肪にシグナルを伝える脳領域の、糖代謝での役割を解析した。Dreadd 法は、人工的なリガンド(CNO)によってのみ活性化して神経活動を操作できる、特殊な受容体を用いて神経活動を操作する方法である[Roth Neuron 2016]。アデノ随伴性ウイルスを用いて Dreadd 受容体を神経細胞に発現させて CNO を投与することで、任意の場所の神経細胞を活性化・不活性化できる。目的の脳領域の神経細胞を活性化し、糖代謝への影響を解析した。

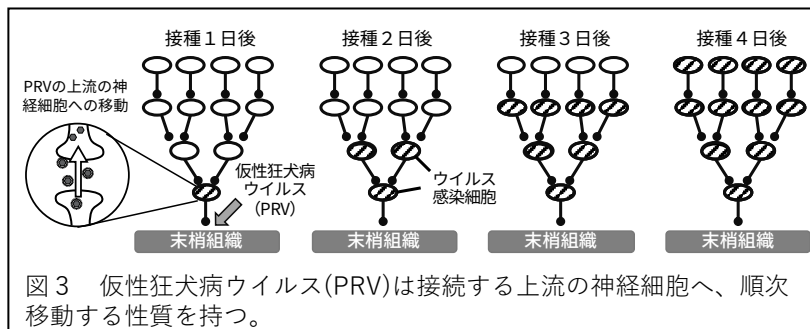


図3 仮性狂犬病ウイルス(PRV)は接続する上流の神経細胞へ、順次移動する性質を持つ。

4. 研究成果

(1) 骨格筋・褐色脂肪にシグナルを伝える神経回路の同定

蛍光タンパク質を発現する PRV を骨格筋 (ヒラメ筋)・褐色脂肪組織に接種し、脳と脊髄におけるウイルス感染細胞の局在を 1 日ごとに解析した。その結果、ウイルス接種 2 日後にはウイルス感染細胞は脊髄のみに観察され、3 日後に初めて脳へのウイルス感染が観察された。また、接種 4 日後には VMH の神経細胞にウイルスの感染が確認された。したがって VMH の神経細胞と骨格筋・褐色脂肪組織を結ぶ神経回路が確かに存在することが示された (図 4)。VMH の神経細胞と脊髄の間のウイルスの移動に 2 日かかることから、おそらく 1、2 個の神経細胞 (脳領域) が両者の間に存在すると考えられる。この中継する神経細胞を同定するため、ウイルス感染 3 日後の神経細胞の局在を詳細に解析した。その結果、延髄の腹側領域、橋の青斑下核と視床下部室傍核にウイルス感染細胞が観察された。したがって、VMH の神経細胞からのシグナルはこれらの神経細胞のいずれかを介して脊髄と末梢組織へ伝えられると考えられる。

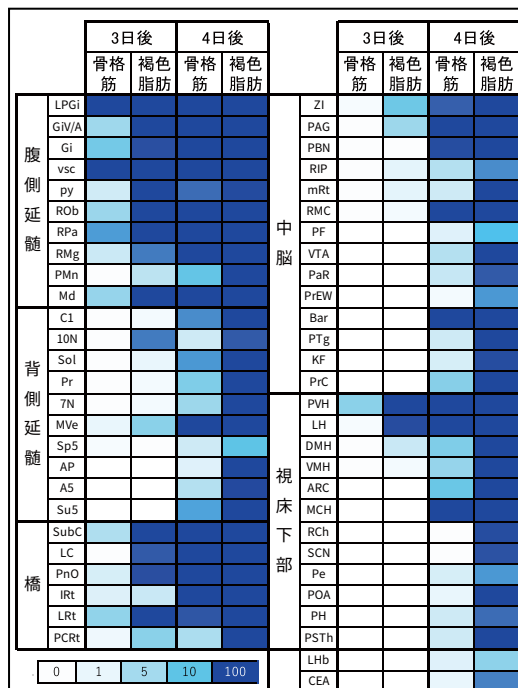


図4 PRVを褐色脂肪と骨格筋にPRVを接種し、これらの組織に投射する神経細胞を同定した。ウイルス接種3、4日後におけるウイルス感染細胞の脳内局在。色の濃さはウイルス感染細胞の数を示す。

(2) 骨格筋・褐色脂肪に VMH からのシグナルを伝える神経細胞の同定

次にこれらのウイルス接種 3 日後にウイルスに感染する神経細胞が特異的に発現する遺伝子の探索を行った。延髄の腹側領域、橋の青斑下核と視床下部室傍核に特異的に発現する遺伝子の発現解析の結果、室傍核のウイルス感染細胞の多くが Nos1 (Nitric oxide synthase 1) と呼ばれる遺伝子を発現していることがわかった (図 5A)。この Nos1 発現神経細胞 (Nos1 ニューロン) へ投射する神経細胞を含む脳領域と、Cre リコンビナーゼ依存的に増殖する PRV と、Cre を Nos1 ニューロン特異的に発現する遺伝子組換えマウス (Nos1-Cre マウス) を用いて解析したところ、VMH から Nos1 ニューロンに投射する神経細胞が存在することがわかった。

(3) 骨格筋・褐色脂肪に VMH からのシグナルを伝える神経細胞の機能解析

Nos1 ニューロンの機能を Dreadd 法を用いて解析した。Cre リコンビナーゼ依存的に Dreadd 受

容体を発現するアデノ随伴ウイルスを, Nos1-Cre マウスの室傍核に接種し, その後 CNO を腹腔内投与することで, Nos1 ニューロンを人為的に活性化した。その結果, CNO の投与により, マウスのエネルギー消費量が増加し, 血糖値が上昇することが観察された (図 5B)。このことから, Nos1 ニューロンが血糖値の制御に関わることが示された。

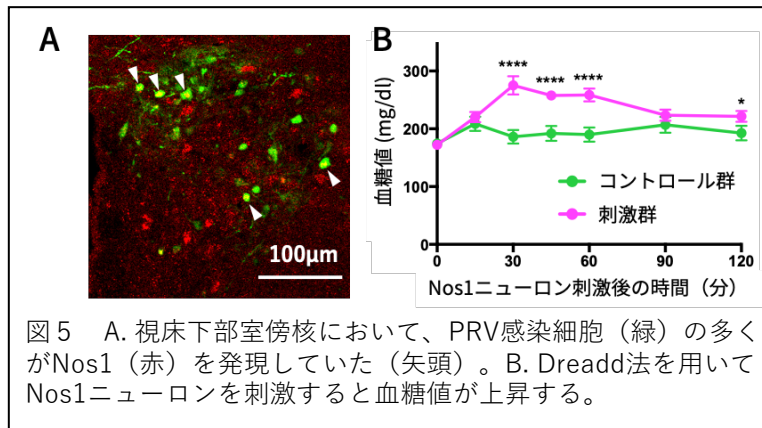


図 5 A. 視床下部室傍核において, PRV感染細胞 (緑) の多くがNos1 (赤) を発現していた (矢頭)。B. Dreadd法を用いてNos1ニューロンを刺激すると血糖値が上昇する。

以上の結果から, 視床下部室傍核に存在する Nos1 ニューロンが骨格筋と褐色脂肪組織を制御することで糖代謝を制御する可能性が示された。Nos1 ニューロンは VMH からの投射を受けており, VMH からのレプチンのシグナルを末梢組織に伝達する可能性がある。また, Nos1 ニューロン自体がレプチンの受容体を発現し, Nos1 ニューロン特異的にレプチン受容体を欠損させると高血糖が起こることも報告されている [Leshan et al. Nat. Med. 2012]。したがって, Nos1 ニューロン自体がレプチンのシグナルを受け取り, 末梢組織の糖代謝を制御している可能性も考えられる。今後はこれらのメカニズムの解明に取り組みたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Jiamin Li, Taian Liu, Yun Dong, Kunio Kondoh, Zhonghua Lu	4. 巻 35
2. 論文標題 Trans-synaptic Neural Circuit-Tracing with Neurotropic Viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Bulletin	6. 最初と最後の頁 909-920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12264-019-00374-9	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 該当する

1. 著者名 Lee Eun Jeong, Hanchate Naresh K., Kondoh Kunio, Tong Ai Phuong S., Kuang Donghui, Spray Andrew, Ye Xiaolan, Buck Linda B.	4. 巻 6
2. 論文標題 A psychological stressor conveyed by appetite-linked neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 5366 ~ 5366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aay5366	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 該当する

1. 著者名 Hanchate Naresh K., Lee Eun Jeong, Ellis Andria, Kondoh Kunio, Kuang Donghui, Basom Ryan, Trapnell Cole, Buck Linda B.	4. 巻 117
2. 論文標題 Connect-seq to superimpose molecular on anatomical neural circuit maps	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 4375 ~ 4384
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1912176117	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 近藤邦生
2. 発表標題 糖代謝を制御する神経回路網のウイルストレーサーを用いた解析
3. 学会等名 第4回 愛知糖尿病・内分泌研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤邦生
2. 発表標題 脳から末梢組織へシグナルを伝達する神経回路の解析
3. 学会等名 第4回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤邦生
2. 発表標題 視床下部腹内側核の長期的活性化による抗肥満作用
3. 学会等名 第40回日本肥満学会・第37回日本肥満症治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kunio Kondoh
2. 発表標題 Hypothalamic Neural Circuits Mediating Homeostasis
3. 学会等名 186th academic seminar, 中国科学院深セン先進技術研究院（中国）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤邦生, Zhonghua Lu, David P. Olson, Bradford B. Lowell, Linda B. Buck
2. 発表標題 内分泌系を制御する脳中枢神経回路のウイルストレースーを用いた解析
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤邦生
2. 発表標題 越シナプス性ウイルストレーサーにより明らかになった生理的応答を制御する神経回路
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤邦生, 箕越靖彦
2. 発表標題 エネルギー代謝を制御する中枢 末梢神経回路
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近藤邦生
2. 発表標題 エネルギー代謝を制御する中枢 末梢神経回路
3. 学会等名 生理学研究所研究会 運動器/代謝系連関による生体機能制御とその変容の仕組み
4. 発表年 2020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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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