

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17961

研究課題名（和文）抗肥満薬開発を目指したガラニンの脂肪摂取メカニズム研究

研究課題名（英文）Research on fat intake mechanism of galanin for development of anti-obesity drugs

研究代表者

椎谷 友博（Shiia, Tomohiro）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80613190

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では肥満形成につながる脂肪摂取メカニズムについて、視床下部に発現している神経ペプチドであるガラニンの機能に着目して研究を行った。視床下部におけるガラニン遺伝子発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより観察した。その結果、ガラニン遺伝子は視床下部室傍核、背内側核、弓状核、外側野等で発現が認められた。背内側核のガラニン発現神経に発現している受容体を検討した結果、食欲を強く亢進する神経ペプチドY受容体の発現が認められた。また、神経ペプチドYは背内側核に神経投射していることがわかっている。ガラニンは神経ペプチドYの投射を介して発現を増加させ、摂食行動を調節している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満は世界中で問題となっており、抗肥満薬の開発が切望されている。肥満を放置することで、糖尿病や心血管障害、高血圧、脂質異常症などをきたし、健康上の大きな問題となっている。抗肥満薬のターゲットとして過食や脂肪摂取の過程が注目され研究対象になっている。ガラニンは29アミノ酸から構成される神経ペプチドの一種で、中枢で脂肪摂取を調節している。実際にガラニンを動物に投与すると高脂肪食への嗜好性が高まることが報告されている。中枢での摂食制御機構を研究することで、肥満治療に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism of fat intake leading to obesity formation, focusing on the function of galanin, a neuropeptide expressed in the hypothalamus. We observed galanin gene expression in the hypothalamus by *in situ* hybridization. The results showed that the galanin gene was expressed in the paraventricular nucleus, dorsomedial nucleus, arcuate nucleus, and lateral hypothalamic area. The receptors expressed on the galanin-expressing nerves in the dorsomedial nucleus showed expression of the neuropeptide Y receptor, which strongly enhances appetite. In addition, neuropeptide Y has been found to innervate the dorsomedial nucleus. These results suggest that galanin may regulate feeding behavior by increasing expression of neuropeptide Y through its projection.

研究分野：薬理学

キーワード：ガラニン 肥満 摂食制御 視床下部

1. 研究開始当初の背景

肥満により糖尿病や心血管障害、脂質異常症などの健康障害をきたし健康上の大きな問題となっている。肥満の有効な治療法として外科的処置があるが、薬で治療できる方法の開発が期待される。日本では抗肥満薬としてマンジドールが認可されている。マンジドールは前シナプス部位でのノルアドレナリン再取り込み抑制作用があり、食欲抑制効果につながっている。ノルアドレナリン再取り込み抑制作用があるため、循環器系への影響が懸念される。肥満者は高血圧や脂質異常症を合併していることが多く、使用しづらい問題点がある。ガラニン¹は動物実験で脂肪摂取を調節していることがわかっているため、抗肥満薬のターゲットとして期待されるが、詳しい機構について未解明な部分がある。ガラニンの神経科学的機構を明らかにすることで、肥満治療に役立つと考えられる。

2. 研究の目的

中枢における摂食行動の制御は、視床下部に存在する摂食関連神経ペプチドが重要な働きをしている。この摂食関連神経ペプチドの一種である神経ペプチド Y は非常に強い摂食促進作用を示す。ガラニンも神経ペプチドの一種で神経ペプチド Y と同じように摂食行動を促進する働きがある。しかし、ガラニンが脳内でどのように摂食行動を調節しているかは不明である。今回の研究では、神経ペプチドの一種であるガラニンに着目して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 視床下部での摂食関連神経ペプチド発現評価

野生型マウスに絶食負荷を行い食欲が促進される状況を作り出した。この条件下で視床下部における神経ペプチド遺伝子発現の変化を RT-PCR により検討した。実際には、絶食負荷を行ったマウスを解剖し脳を摘出した。その後、脳組織から視床下部を切り取り、Trizol を加えてホモジナイズした。ホモジナイズした標本から RNA 抽出を行い、RT-PCR 用の標本とした。自由摂食させたマウス視床下部からも RNA 抽出しコントロールとした。

(2) in situ ハイブリダイゼーションによる視床下部での神経ペプチド発現評価

自由摂食または絶食負荷を行ったマウスを解剖し、摘出した脳をドライアイスで凍結した。クライオスタットを用いて 10 μm 厚の脳切片を作製し、マスコートスライドガラスに貼り付けた。脳切片に神経ペプチド mRNA に相補的なアンチセンスプローブまたは神経ペプチド mRNA と同配列を持つセンスプローブを反応させた。アンチセンスプローブ及びセンスプローブはジゴキシゲニンラベルしたものを使用した。その後、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体で反応を行い、BCIP/NBT 溶液を用いて発色反応を行った。光学顕微鏡を用いて標本を観察しデジタルカメラを用いて画像取得を行った。得られた画像を画像解析ソフトにより解析し、視床下部での領域ごとの発色強度を計測した。

(3) 免疫組織化学染色による視床下部での神経ペプチド発現評価

自由摂食または絶食負荷を行ったマウスを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。そ

の後、ピブラトームを用いて 40 μm 厚の脳切片を作製し、マスコートスライドガラスに貼り付けた。神経ペプチド Y やガラニン等のタンパク質局在を観察するために、各々に対する一次抗体を用いて抗体反応を行った。その後、蛍光標識した二次抗体で抗体反応した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像取得を行った。

(4) 神経ペプチド Y 受容体欠損マウスでのガラニン発現評価

絶食負荷による背内側核でのガラニン発現増加が神経ペプチド Y を介しているか検討するために、神経ペプチド Y 受容体欠損マウスを用いて評価を行った。実際に、神経ペプチド Y Y1 受容体欠損マウスと Y5 受容体欠損マウスに絶食負荷を行い、視床下部でのガラニン mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により評価した。

4. 研究成果

(1) 視床下部での摂食関連神経ペプチド発現評価

絶食負荷により視床下部での神経ペプチド Y 及びガラニン mRNA 発現量が増加した。一方、アゴウチ関連ペプチド及びメラニン凝集ホルモン mRNA 発現は絶食負荷により増加傾向は示したが、有意な差はなかった。

(2) *in situ* ハイブリダイゼーションによる視床下部での神経ペプチド発現評価

マウスに絶食負荷を行うことで、神経ペプチド Y 遺伝子発現が増加することが報告されている。今回の実験条件でも神経ペプチド Y 遺伝子発現増加を検出できるか検討を行った。その結果、視床下部弓状核での神経ペプチド Y 発現の増加を確認することができた。このことは絶食負荷により神経ペプチド Y 神経が活性化され、摂食行動を促進する作用が働いていると考えられる。

絶食負荷により視床下部のどの部位でガラニン mRNA 発現が増加するのか *in situ* ハイブリダイゼーション法によって検討した。ガラニン mRNA は、視索前野核、室傍核、弓状核、背内側核、視索上核、室傍核、扁桃中央、脳弓周囲核、視床下部外側、青斑核、孤束核で発現が確認された。絶食負荷により、背内側核、脳弓周囲核、視床下部外側でのみ発現量が増加した。これらの領域でのガラニン mRNA 発現の増加は陽性細胞数の増加と相関しており、細胞 1 個あたりの発現が増加するのではなく、陽性細胞数の増加によるものと考えられる。その他の部位での絶食負荷によるガラニン mRNA 発現の変化は認められなかった。

(3) 免疫組織化学染色による視床下部での神経ペプチド発現評価

マウスに絶食負荷を行うことで弓状核での神経ペプチド Y 発現が増加し、投射先の室傍核での遊離が促進されることが報告されている。今回の実験条件でも神経ペプチド Y がペプチドレベルで増加しているか確認を行った。その結果、絶食負荷により弓状核での神経ペプチド Y 染色強度が増加した。また、神経ペプチド Y 陽性細胞数が増加し、この部位で神経ペプチド Y 産生が促進していると考えられる。さらに、投射先の室傍核での神経ペプチド Y 染色強度が増加した。この部位でドット状の染色が増加し、神経ペプチド Y 遊離が促進していると考えられる。今回の実験では、部室傍核以外にも神経ペプチド Y 陽性のドット状の染色が確認された。背内側核では神経ペプチド Y 陽性のドット状の染色が確認され、絶食負荷により増加する傾向が観察された。

弓状核から背内側核へ神経投射していることが報告されているため、弓状核の神経ペプチド Y 神経が背内側核のガラニン神経に神経投射している可能性がある。背内側核のガラニン神経が神経ペプチド Y 受容体を発現しているか、二重免疫組織化学染色により検討した。その結果、背内側核においてガラニンと神経ペプチド Y 受容体の Y1 及び Y5 との共局在が観察された。この結果より、弓状核の神経ペプチド Y 神経が背内側核のガラニン神経に投射し、Y1 または Y5 受容体を介してガラニン発現を増加させている可能性がある。

(4) 神経ペプチド Y 受容体欠損マウスでのガラニン発現評価

背内側核には神経ペプチド Y 受容体神経ペプチド Y 受容体のうち Y1 及び Y5 が摂食促進に重要であるとわかっている。また、背内側核にはこれらの受容体が発現しておりガラニン発現に関与している可能性が考えられる。そのため、神経ペプチド Y Y1 又は Y5 受容体を欠損したマウスでの絶食負荷による影響を検討した。

神経ペプチド Y Y1 受容体欠損マウスにおいて絶食負荷によるガラニン mRNA 発現を検討した結果、野生型マウスにみられた絶食負荷によるガラニン mRNA 増加が消失した。神経ペプチド Y Y5 受容体欠損マウスにおいても、野生型マウスにみられた絶食負荷によるガラニン mRNA 増加が消失した。

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〕

〔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
---------	---------