

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11664

研究課題名(和文) 摂食リズムの制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism underlying the regulation of food-entrained feeding rhythm

研究代表者

梅原 隼人 (Umehara, Hayato)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20610182

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)：筆者は脳内で作られるヒスタミンという生理活性物質の摂食リズム制御における役割を明らかにする研究を行った。げっ歯類であるマウスは、一日一回同じ時刻に数時間だけエサを与えると毎日の摂食時刻を予知する摂餌予知行動(FAA)を起こすようになる。筆者は脳内でヒスタミンを産生する一部の細胞の活動がFAAのリズムすなわち摂食リズムと同調して変動することを見出した。また、脳内のヒスタミンの機能を抑制するような薬剤を投与するとFAAが起こりにくくなることを明らかにした。さらに、ヒスタミンによりFAA制御にかかわる脳内の機能部位のひとつを同定しつつある。現在これらの成果を論文にまとめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日々の摂食時刻を予知する摂餌予知行動は明らかな概日リズムを示す。このリズムは既知の体内時計を破壊しても消失しないことから、第2の体内時計の存在が示唆されてきた。しかし、未だその本体は明らかとなっていない。本研究は摂餌予知行動のリズムを生み出す仕組みの一端を解明することとなり、未知の生体時計の解明につながる可能性がある(学術的意義)。一方、摂食リズムの破綻は肥満の危険因子として知られ、正常な摂食リズムの制御機構の解明は、その異常により引き起こされる病態の病理機構解明にもつながりうる。したがって、本研究の成果は今後肥満やそれに伴う病態の新たな治療戦略の構築に役立つ可能性がある(社会的意義)。

研究成果の概要(英文)：When mice were subjected to a scheduled feeding in which food availability is restricted for a few hours in a day, they develop food-anticipatory activity (FAA) but the mechanism underlying the daily food-anticipation remains elusive. The author demonstrated a part of histaminergic neurons were activated synchronizing the circadian rhythm of food-anticipation. In addition, injection of anti-histaminergic drugs prior to the daily mealtime reduced FAA as well as activity of downstream neurons that receive projection of the histaminergic neurons. In addition, gene expressions of histamine-producing enzyme, and of histamine receptor at the projection site showed dynamic changes correspondingly with the rhythm of the histaminergic activity, in a pilot study. These data suggest that the histaminergic neurons play a role in the regulation of food-anticipation through H1R via specific histaminergic circuit.

研究分野：神経科学、薬理学

キーワード：摂食リズム 条件給餌 摂餌予知行動 ヒスタミン神経系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

摂食リズムの破綻は肥満形成の重要な危険因子であるが、規則的な摂食リズムを生み出す仕組みは明らかとなっていない。げっ歯類において、一日の給餌時間が限られると給餌開始時刻に対する予知行動 (FAA) が起こり、既知の時計遺伝子群に依存する概日リズムとは独立した摂餌時計が形成される。この FAA を引き起こす発信機構 (FEO) が摂食リズムを生み出していると考えられる。筆者はこれまでに、摂食亢進性のニューロペプチド Y (NPY) 神経系が Y1 受容体 (Y1) を介して FAA の制御に関与することを明らかにしてきた。さらに、後部視床下部の一部のヒスタミン (HA) 神経細胞群の活性が Y1 欠損 (Y1KO) マウスで顕著に低下していることも見出した。しかし、HA 神経系の FAA への関与は知られておらず、FAA 制御に関わる HA 神経細胞群及びその投射回路、HA 受容体サブタイプは明らかでない。そこで本研究では、Y1 による FAA 制御に関わる HA 神経の標的投射部位及び受容体サブタイプを明らかにし、FAA 制御機構の一端を解明することを目的とした。

HA 神経系は後部視床下部の結節乳頭核 (TMN) に起始核を持ち、視床下部への投射を介して主に覚醒維持や摂食行動調節などに関与する。TMN の HA 神経系は解剖学的に E1 から E5 の 5 つの亜核群に分類されるが (PLoS ONE 8(3): e60276, 2013)、申請者らはこれらが機能的にも分類しうることを報告した (Umehara et al. (2012) Neurochem. Intl. 61(6):942-7)。SF を行ったラットにおいて、給餌に先立ち TMN に神経活性化マーカーである c-fos 遺伝子の発現が起こるという報告がある (Behav. Brain Res. 158: 311-319, 2005)。申請者らはさらに詳細な研究を行い、主に E2 及び E3 の TMN 亜核群において c-Fos タンパク質の発現が起こり、これらの HA 神経亜核群の活性化に伴い、ARC 尾側内側部 (ArcMP) において HA H1 受容体 (H1) 依存性の c-Fos 発現が起こることを報告した (Umehara et al. (2011) Brain Res. 1387:61-70)。一方、摂食亢進性の NPY 神経系は TMN 亜核群へと投射しており (Brain Res. 1657: 16-28, 2017)、中枢への NPY 投与により視床下部への HA 放出量が増加する (Physiol Behav. 89: 295-300, 2006)。TMN 亜核群における Y1 の発現分布を調べたところ、上記の NPY 神経線維の投射パターンと一致したことから、申請者は NPY 神経系が ArcMP への HA 神経回路の活性化を介して FAA に関与するのではないかと考えた。そこで、SF を行ったマウスにおける、HA 神経系及び ArcMP 神経の活性化に対する Y1KO の影響を調べたところ、Y1KO において TMN と ArcMP における c-Fos の発現が顕著に抑制された。

課題として、Y1KO における ArcMP の c-Fos 発現抑制が、HA 神経の活動の抑制によるものであるかどうか調べる必要があった。また、ArcMP に投射し FAA 制御に関わる HA 神経細胞群が明らかでなかった。さらに FAA 制御に関わる HA 受容体のサブタイプを明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、Y1 による FAA 制御に関わる HA 受容体サブタイプと HA 神経の標的投射部位及びを明らかにし、FAA 制御機構の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用動物

実験には C57BL/6 マウスあるいは Y^{+/-} heterozygous マウス (C57BL/6 バックグラウンド) の交配により得られた兄弟マウス【Y^{+/-} マウス (Y-KO) および野生型マウス (Y^{+/+} マウス (WT))】を用いた。

(2) 条件給餌 (SF)

10 週齢マウスを個別ケージに移し、11 週齢から一週間は自由給餌、自由飲水にて環境に馴化させた。12 週齢から一日一回 4 時間 (12 時から 16 時) の SF を行った。

(3) 摂餌予知行動 (FAA)

条件給餌 6 日目の 10 時から 14 時までのマウスの行動をモニターし、12 時から 14 時までのマウスの自発運動活性を FAA として測定した。ただし、grooming や resting に費やした時間は測定対象から除いた。

(4) 研究試薬の投与

抗ヒスタミン薬あるいは中枢ヒスタミン合成・放出抑制薬を午前 9 時 30 分から 10 時の間にそれぞれ腹腔内投与あるいは脳室内投与した。

(5) 脳サンプル回収、凍結浮遊切片の作成

行動実験を終えたマウスを直ちに麻酔し、滅菌したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 及び 4 % パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定した後、直ちに脳を摘出し、同固定液にて一晩後固定した。

(4) 。その後 20% ショ糖溶液中 2 日間脱水した後、O.C.T コンパウンドに浸漬し、ドライアイスで急速凍結した。凍結脳ブロックをクライオスタットにて 35 μm に薄切し、不凍液 (エチレングリコール、グリセロール、PBS) 中に回収した。サンプルは免疫組織化学染色を行うまで、-30 $^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

(6) 免疫組織化学染色

凍結浮遊切片を PBS で 3 回洗った後、5% ヤギ血清でブロッキングした。その後各種一次抗体を単体あるいはカクテルにて 4 $^{\circ}\text{C}$ で攪拌しながら反応させた。0.1% triton-X100 を含む PBS (PBST) で 3 回洗浄した後、一次抗体の血清動物に対応する蛍光二次抗体を使用抗体により、4 $^{\circ}\text{C}$ あるいは 25 $^{\circ}\text{C}$ で適宜反応させた。PBST および PBS で洗浄後、浮遊切片を MAS コートスライドガラス上に回収し、退色防止剤で封入した。蛍光シグナル画像は共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM710) を用いて撮影した。

(7) *In situ* hybridization (ISH)

ISH プロローブの設計と作成

BLAST サーチを行い、標的 mRNA と相補的であり、標的遺伝子以外にはハイブリッドしない DNA 配列を選び、プラスミドベクター (Bluescript) にクローニングした。作成したベクターを鋳型として T7 あるいは T3 RNA ポリメラーゼを用いて DIG あるいは Biotin ラベルの RNA プロローブを合成した。

蛍光 ISH (TSA 法) と酵素 ISH (NBT/BCIP 法) による mRNA の局在と発現解析

(5) と同様の方法で浮遊切片を作成した。浮遊切片を PBS で 3 回洗浄した。切片をハイブリダイゼーションバッファー (HB) で前処理 (プレハイブリダイゼーション) した。次に切片を HB に溶解した RNA プロローブ (DIG 標識あるいは Biotin 標識) 溶液中、一晚ハイブリダイゼーションした。蛍光 ISH 法では抗 DIG 抗体で反応後、TSA システムで標的遺伝子の細胞局在を可視化した。酵素 ISH 法では蛍光標識したストレプトアビジンを反応させ標的遺伝子の局在を可視化した。反応が終わった切片は PBS で洗浄後、MAS コートスライドガラス上に回収し、退色防止剤で封入した。切片上の蛍光シグナルは共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM710) を用いて画像化した。

4. 研究成果

本研究では、摂餌予知行動 (FAA) 制御に関わる中枢 HA 受容体サブタイプ、ヒスタミン (HA) 神経細胞群、神経回路を明らかにすることを目的とした。

まず FAA 制御にかかわる条件給餌を行ったマウスに対して、ヒスタミン H3 受容体 (H3R) 拮抗薬 (ヒスタミン合成・放出抑制薬) であるメチメピップを給餌時刻 5 時間前に腹腔内投与 (5 mg/kg) したところ、FAA の有意な抑制がみられた。H3 受容体は主に中枢神経系でオーレセプターとして機能していることから、この効果は中枢ヒスタミン神経機能の抑制によるものであると考えられた。次に、条件給餌を行ったマウスに選択的 H1R 拮抗薬を中枢投与し、FAA への影響を調べた予備実験では、拮抗薬の投与により FAA が抑制された。以上の結果から、FAA の抑制が中枢神経系の H1R を介するものであることが示唆された。現在データの再現性を確認すると共に、H2R 受容体の関与の有無についても検討している。

次に、FAA 制御にかかわるヒスタミン神経細胞群を明らかにするために、FAA と同調して神経活性化マーカータンパク質である c-Fos を発現するヒスタミン神経細胞群 (TMN 亜核群) の探索を行った。条件給餌を行ったマウスの脳を給餌前の複数の時間にサンプリングし、ヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) と c-Fos との二重免疫組織化学染色を行った。その結果、E2, E3 亜核に加え、E4 亜核のヒスタミンニューロンの一部で FAA に伴う c-Fos の発現上昇が見られた。HDC に対する抗体はドパミン脱炭酸酵素との交叉性が懸念されることから、現在 ISH 法を用いて HDC mRNA と c-fos mRNA との二重染色実験も進めている。ISH 法を用いた実験から、遺伝子レベルで見ると、各亜核群の中にも、HDC mRNA の発現が比較的大きいニューロンと小さいニューロンが混在していることがわかってきた。以上の結果から、FAA 制御にかかわるヒスタミンニューロンは主に E2 から E4 の亜核群に分布するが、これらの解剖学的分類がそのまま機能的分類になっているのではなく、FAA 制御にかかわる機能的細胞集団がこれらの領域に散在している可能性が考えられた。

続いて、FAA 抑制にかかわるヒスタミン神経回路を明らかにするため、抗ヒスタミン薬の処置によって神経活性化マーカーである c-Fos の発現が抑制された弓状核 (尾側部位) に逆行性トレーサーを投与する実験を行った。その結果、E2 から E4 亜核群の少なくとも一部の HA 神経細胞集団が標識され、トレーサーで標識される HA ニューロンは、FAA に同調して活性化 (c-Fos を発現) されていた。以上のことから、FAA 制御には少なくとも弓状核へと投射する一部のヒスタミンニューロンが関与していることが示唆された。現在、c-Fos の特異的抗体による免疫組織化学染色と、H1R mRNA の ISH による染色法とを組み合わせ、弓状核の c-Fos 発現ニューロンが H1R を発現するニューロンであることを明らかにする実験を進めている。

以上の知見から、E2 から E4 の TMN 亜核群に分布するヒスタミン神経の一部が、弓状核への投射経路を介して、主に H1R を介して摂餌予知行動 (FAA) 制御に関与していることが示唆された。未だ解決すべき課題は残っているものの、本研究が進めば、ヒスタミン神経系の摂餌予知行動へ

の関与とそのメカニズムの一端が初めて明らかとなり、摂餌予知行動の制御に係わる特定のヒスタミンニューロン群とその神経回路を同定できる可能性がある。

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