

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06918

研究課題名（和文）視床下部室傍核の摂食抑制CRFニューロンの同定とその機能の解明

研究課題名（英文）Identification of CRF neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that are involved in feeding inhibition

研究代表者

堀尾 修平（HORIO, Shuhei）

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特別協力研究員

研究者番号：80145010

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）：摂食調節に重要な役割を果たしている視床下部室傍核で、CRFニューロンに注目した。このニューロンを選択的に死滅させるとマウスの摂食量、体重が有意に増加した。従ってこのニューロンは正常時には摂食を抑制すると考えられる。しかしCRFニューロンは脳内の様々な部位に神経投射しており、そのうちのどのニューロンが摂食調節に関与するのか明らかでない。そこでCRFニューロンをその脳内投射部位により分類するという新しい方法を用いて、特定の脳部位に投射するニューロンのみを死滅させた。その結果、脳幹に投射するCRFニューロンのうち結合腕傍核もしくは青斑核に投射するニューロンが摂食抑制に関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部は、摂食調節に中心的な働きをしている。本研究で得られた結果は、視床下部の摂食抑制ニューロンの機能を調べると同時に、その投射先ニューロンをも明らかにできるという点で、今後、神経回路の研究の非常に有力な手段となりうる。肥満は様々な健康障害の原因となるため、効果的な摂食抑制薬の登場が望まれるが、現状では、副作用等の問題で有効に使用できる薬はほとんど皆無である。本研究で示すように、摂食抑制に関与するニューロンのタイプとその神経回路を明らかにすることは、特異的で副作用のない薬の開発に際してきわめて有効な情報を提供できると考える。

研究成果の概要（英文）：Corticotropin-releasing factor (CRF) neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH) are involved in many physiological functions. The ablation of PVH CRF neurons increased food intake and body weight of mice, indicating that these neurons inhibit feeding under normal condition. PVH CRF neurons can be classified into various types according to their differential projections to many brain regions. The target regions were found to be the solitary nucleus, locus ceruleus, parabrachial nucleus, dorsal raphe, and lateral hypothalamus. Then, we have ablated each of these CRF neurons and found that neurons projecting to parabrachial nucleus or locus ceruleus are responsible for feeding regulation. This strategy is effective in classifying CRF neurons, tracking each neural pathway, and finding their role in feeding behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：視床下部 神経経路 室傍核 CRF CRH 結合腕傍核 青斑核 摂食調節



(2) 室傍核 CRF ニューロンの摂食調節への関与を明らかにする  
ジフテリア毒素 (DTA) を Cre 依存性に発現する AAV ベクターを CRF-Cre マウスの室傍核に注入し、CRF ニューロンのみを特異的に死滅させる。マウスの摂食量、体重への影響を調べることで、CRF ニューロンの摂食調節への関与を明らかにする。

(3) 室傍核 CRF ニューロンを投射脳部位に従って分類する  
順行性トレーサーの小麦胚芽レクチン (WGA) を AAV ベクターを用いて、室傍核 CRF ニューロンに特異的に発現させ、シナプスを超えて二次ニューロンに運ばれることを利用して投射脳部位を特定する。その投射先に GFP を Cre 依存性に発現する逆行性ウイルスベクターを注入する。逆行性に運ばれ室傍核の CRF ニューロンに GFP が発現、CRF ニューロンを識別する。すでに、弧束核、結合腕傍核、青斑核、縫線核、視床下部外側野へ投射する CRF ニューロンを見出した。それらは特徴的な分布をした異なるニューロン群をなし、また室傍核の大部分を占める神経内分泌ニューロンとも別のニューロンである。神経内分泌ニューロンはフルオロゴールドを腹腔内投与し、血流を通して神経内分泌ニューロンに逆行性に取り込まれることにより検出する。

(4) 摂食調節に関与する CRF ニューロンを同定する  
次に、各部位に投射する室傍核 CRF ニューロン特異的に、DTA を発現させ、その生理機能を明らかにする。各投射脳部位に FLP を Cre 依存性に発現する逆行性ベクターを注入し室傍核に FLP 依存性に DTA を発現する AAV ベクターを注入した。これにより、各脳部位に投射する CRF ニューロンのみで DTA が発現する。この方法により CRF ニューロンを死滅させたマウスを作製し、摂食量、体重増加への影響を調べ、摂食調節ニューロンを同定する。さらに、DREADD 法を用い同様の方法で目的のニューロンに hM3Dq 受容体 (ニューロン活性化)、あるいは hM4Di 受容体 (ニューロン抑制) を発現させ、それらの作用薬である CNO を投与することで、摂食調節への関与を調べる。

(5) どこに投射するのか  
上で明らかにした摂食抑制 CRF ニューロンの投射先ニューロンは WGA 発現により識別できる。また、投射脳部位に FLP を Cre 依存性に発現する逆行性ウイルスベクターを注入し、室傍核に FLP 依存性にシナプトフィジンを発現する AAV ベクターを注入する。これにより、CRF ニューロン投射部位にシナプトフィジンが発現し、投射部位を詳細に特定できる。

(6) どのような入力を受けるのか  
上流のニューロンを特定する。室傍核に G 欠損狂犬病ウイルス (文献⑤) を注入する。CRF ニューロン投射部位に逆行性ウイルスベクター (TVA 受容体と RABV-タンパクを供給する) を注入する。目的の CRF ニューロンのみで狂犬病ウイルスが増殖し、逆行性に上流ニューロンにウイルスが運ばれる。ウイルスは GFP で識別できるので、上流の脳部位が判る。

(7) どのような条件下で CRF ニューロンは摂食抑制するのか  
本研究では、以下の点に的を絞る。① 摂食の日周リズム (マウスの摂食量は暗期に多く、明期に少ない) に関与しているかどうか。② ストレス時の摂食抑制に関与するのか (拘束ストレス、心性ストレスによる摂食抑制への関与が示唆されている)。DREADD 法を用いて CRF ニューロンの活動を増加あるいは抑制することにより調べる。

#### 4. 研究成果

(1) 室傍核 CRF ニューロンの摂食抑制作用  
視床下部室傍核の CRF ニューロンに特異的に DTA を発現させることにより 75% 以上のニューロンを死滅させた。その結果図 3 に示すように、摂食量、体重が有意に増加した。この結果は、室傍核 CRF ニューロンが摂食調節に関与することを明確に示している。また、摂食量が増加することから CRF ニューロンは正常時には摂食を抑制するという調節を行っていると考えられる。

(2) 摂食調節に関与する CRF ニューロン  
室傍核 CRF ニューロンは幾つかのタイプにより構成されており、摂食調節に関与するニューロンはそのうちの 1 つを占めるに過ぎない。そのニューロンを見出すために、CRF ニューロンを投射脳部位により分類し、個々のニューロンを DTA により死滅させるという手法を用いて調べた。CRF ニューロンは様々な部位に投射しているので、そのすべてを調べ尽くすことはできなかった。しかし、摂食調節に重要と考えられる脳部位、すなわち結合腕傍核、青斑核、弧束核、外側核に投射する CRF ニューロンについて

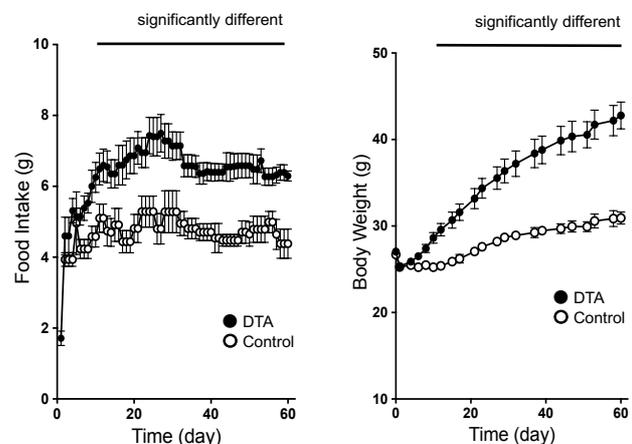


図3 Ablation of PVH CRF neurons

て調べたところ、結合腕傍核ないし青斑核に投射する CRF ニューロンを死滅させた場合のみ摂食量と体重が有意に増加した(図4)。すなわち、視床下部室傍核に存在する、ある特定の CRF ニューロンが摂食抑制に関わっていることが示された。

### (3) CRF ニューロンの機能

この CRF ニューロンは正常時には摂食抑制に働いて、体重の維持に関わっていると考えられる。すなわち、満腹時にはニューロン活動が上昇して摂食を抑制し、空腹時には活動が低下して摂食行動を起こしているのではないだろうか。図5Aに、自由給餌時のマウスの摂食量を示した。明期にはほとんど摂食せず、暗期に入る18時から盛んに摂食を始める。明期にはCRFニューロンが活動して摂食を抑制しているが、暗期に入り始める時にはその活動が落ち、摂食の抑制が解かれるために摂食が増えるのであろうか。そうであれば、このCRFニューロンを選択的に活性化してやれば摂食が抑えられるであろう。その実験の結果が図5Bである。確かに、CRFニューロン活性化により、摂食が抑えられた。

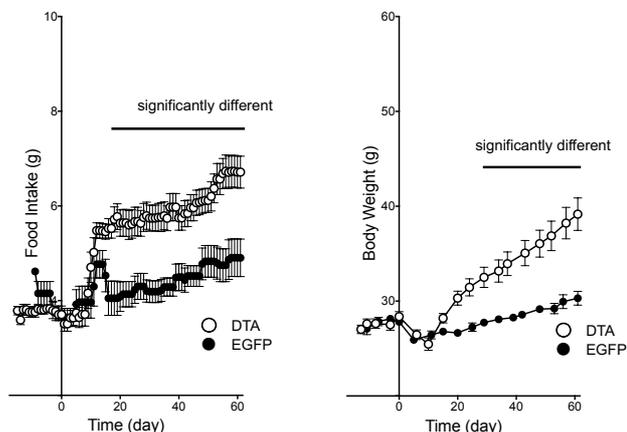


図4 Ablation of PBN and LC-projecting PVH CRF neurons

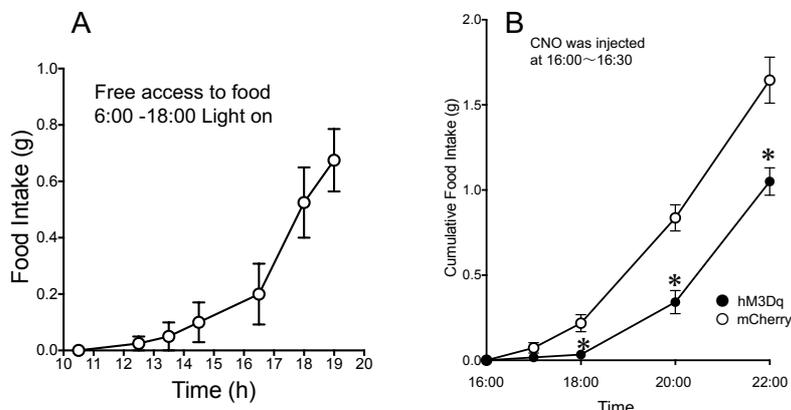


図5 Activation of PBN and LC-projecting PVH CRF neurons

一方、24時間絶食後にマウスに餌を与えると、明期にもかかわらず盛んに摂食を始める(図6A)。絶食後は空腹のため、CRFニューロンの活動が低下しており、摂食抑制が解かれて摂食がおこると考えられる。もしそうであれば、この時CRFニューロンを活性化してやれば摂食が抑えられるはずである。図6Bに示すように、確かにCRFニューロン活性化により摂食が抑えられた。

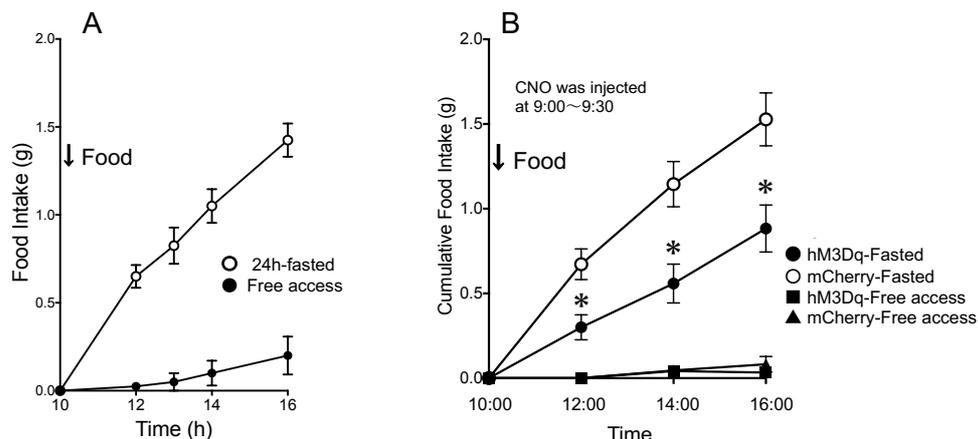


図6 Activation of PBN and LC-projecting PVH CRF neurons

以上の結果は、結合腕傍核ないし青斑核に投射する室傍核 CRF ニューロンが摂食抑制に関与していることを明確に示している。この結果から考えられることは、第一にCRFニューロンは活動時には摂食を抑制し、活性低下時には摂食抑制を解くということである。第二としてCRFニューロンは満腹時には活性が上がり、空腹時には活性が下がるということである。第三としては、未だ全くの仮説であるが、明暗の日周リズムの中で、明期にこのニューロンの活性が上がり暗期に活性が下がるということである。

#### (4) CRF ニューロンの摂食抑制回路に占める位置

① 室傍核の CRF ニューロンのうち、結合腕傍核ないし青斑核に投射するニューロンが摂食調節に関与することが明らかとなった。これらのニューロン特異的にシナプトフィジンを発現させその投射部位を更に詳しく調べた。結合腕傍核には、CGRP ニューロンという摂食抑制ニューロンの存在が報告されており、CRF ニューロンはそこに投射する可能性がある。しかし結合腕傍核におけるシナプトフィジンの発現部位は、CGRP ニューロンの発現部位とは異なっており、投射二次ニューロンは別のニューロンである可能性がある。また、青斑核にも摂食抑制ニューロンが報告されており、シナプトフィジンの発現もみられることから、この経路が摂食抑制に関与する可能性も残っている。

② CRF ニューロンに脳のどの部位のニューロンからの投射があるのかは興味ある点である。今回の結果から、CRF ニューロンが摂食の日周リズムに関与する可能性が示唆された。例えば視交叉上核からの入力を受けるかどうかは重要なポイントである。CRF ニューロンは満腹時に活性が上がると考えられることから、その情報をどこから得ているかということも重要である。妥当な考えの一つは、弓状核の AgRP ニューロンから抑制性を入力を受けるということであるが、いずれにしても弓状核からの入力がある可能性は十分ある。また、今回は調べられなかったが、ストレスによる摂食行動の変化への CRF ニューロンの関与も興味ある点である。この場合もどのような入力を受けるかが分かればその経路についての重要な手がかりとなる。

#### (5) 得られた成果の国内外における位置づけ

視床下部室傍核の CRF ニューロンが摂食調節に関与するかどうか、世界的にみて疑問視する考えもあったが、本研究は CRF ニューロンの摂食調節への関与を明確に示した。さらに、特定の脳部位に投射する室傍核 CRF ニューロンが摂食調節に関与することを様々な方法により示すことができた。その投射部位である結合腕傍核、青斑核には摂食抑制に関与するニューロンの存在が報告されており、それらのニューロンとの関係を明らかにすることは、摂食調節回路の解明に向けて、大きく前進することになると考えられる。

#### (6) 今後の展望

① まず、結合腕傍核、青斑核のどちらに投射する CRF ニューロンが摂食抑制に関与しているかを明らかにすることが重要である。次いで、この CRF ニューロンの性質を調べる必要がある。今までの結果から興奮性のグルタミン酸作動性ニューロンと考えられるが、その他に、ヒスタミン H1 受容体、MC4R 受容体、CRF 受容体などを発現するかどうかを明らかにする必要がある。これらはどのような入力を受けるかということとも関連した問題である。

② CRF ニューロンが摂食日周リズム、ストレスによる摂食行動変化にどの程度関与するのかさらに調べる必要がある。その際には、このニューロンの活動を c-Fos 発現量、あるいは Ca 濃度測定などの方法で測定することも重要である。

③ CRF ニューロンの投射先である二次ニューロンの性質を調べることが次の課題である。この点に関しては、伝達物質である CRF の受容体である CRFR1 ないし CRFR2 をターゲットとした CRFR1-Cre マウス、および CRFR2-Cre マウス（いずれも現在開発中とされる）の利用が必須となるであろう。

④ CRF ニューロンの上流を調べることも必須である。その方法に関しては、研究の方法(6)に示したようにすでに確立している。以上のように CRF ニューロンの上流及び下流の神経経路を明らかにすることにより、摂食調節の神経回路の解明に重要な寄与ができると考えている。

#### <引用文献>

① Li et al. Defined Paraventricular Hypothalamic Populations Exhibit Differential Responses to Food Contingent on Caloric State. *Cell Metab*, 29:681-694, 2019

② 堀尾修平、山形聡、小林憲太、加藤成樹、崎村建司、上山敬司、小林和人、井樋慶一 視床下部室傍核の CRF ニューロンを投射部位により分類する。 第 40 回日本神経科学大会, 2017

③ Itoi et al. Visualization of corticotropin-releasing factor neurons by fluorescent proteins in the mouse brain and characterization of labeled neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinol*, 155:40544060, 2014

④ Kato et al. Selective neural pathway targeting reveals key roles of thalamostriatal projection in the control of visual discrimination. *J Neurosci* 31:17169-17179, 2011

⑤ Osakada, Mori, Cetin, Marchel, Virgen, Callaway, New rabies virus variants for monitoring and manipulating activity and gene expression in defined neural circuits. *Neuron* 71:617631, 2011

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 M Morishita, K Kobayashi, M Mitsuzuka, R Takagi, K Ono, R Momma, Y Tsuneoka, S Horio, S Tsukahara	4. 巻 43
2. 論文標題 Two-Step Actions of Testicular Androgens in the Organization of a Male-Specific Neural Pathway from the Medial Preoptic Area to the Ventral Tegmental Area for Modulating Sexually Motivated Behavior.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Neurosci	6. 最初と最後の頁 7322-7336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0361-23.2023	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚原 伸治、小林 海斗、三塚 萌理、高木 凌、門馬 楽美、恒岡 洋右、堀尾 修平、森下 雅大
2. 発表標題 内側視索前野から腹側被蓋野へ至る雄特異的な神経投射の形成におけるアンドロゲンの2段階作用
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林海斗、森下雅大、三塚萌里、恒岡洋右、堀尾修平、加藤成樹、小林和人、塚原伸治
2. 発表標題 マウスの内側視索前野における性差を構築するカルビンディンニューロンの形態学的特徴と生理機能
3. 学会等名 第93回日本動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinji Tsukahara, Kaito Kobayashi, Moeri Mitsuzuka, Ryo Takagi, Rami Monma, Yosuke Tsuneoka, Shuhei Horio, Masahiro Morishita
2. 発表標題 Two step actions of testicular androgens for organizing male-specific neural pathway from the medial preoptic area to the ventral tegmental area.
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森下雅大、三塚萌里、恒岡洋右、堀尾修平、小林和人、加藤成樹、塚原伸治
2. 発表標題 マウスの内側視索前野から腹側被蓋野へ投射する雄特有なニューロンは雄性行動の制御に関与する
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森下雅大、三塚萌里、小野浩太、恒岡洋右、堀尾修平、加藤成樹、小林和人、塚原伸治
2. 発表標題 内側視索前野の性的二型性を確立するニューロンの形態学的特性、生理機能および性差構築機構の解析
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀尾修平、山形聡、加藤成樹、小林憲太、崎村建司、小林和人、箕越靖彦、井樋慶一
2. 発表標題 視床下部室傍核CRFニューロン死滅の摂食調節への影響
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
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
研究 分担者	加藤 成樹  (KATO Shigeki)  (90443879)	福島県立医科大学・医学部・准教授    (21601)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	山形 聡  (YAMAGATA Satoshi)  (50769940)	弘前大学・医学研究科・客員研究員     (11101)	

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