

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21458

研究課題名（和文）ドーパミン神経に作用するインスリンシグナルの解明

研究課題名（英文）Elucidating the nutrient-induced dopamine signals

研究代表者

植松 朗（Uematsu, Akira）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・特任講師

研究者番号：90716242

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：栄養素を胃に投与することにより脳の腹側被蓋野におけるドーパミン神経細胞の応答がおこることを電気生理学的に確認した。実際にマイクロダイアリシスを用いてドーパミン変化量を側坐核にて測定すると栄養素投与によるドーパミン上昇がみられた。ドーパミン神経細胞は投射先によって異なる機能をもつ細胞群にわけられるため、それぞれの機能を解明するための多点ドーパミン計測を行った。蛍光ドーパミンセンサーを用いて脳の複数部位からのドーパミン応答を観察することを行った。その結果、側坐核において糖を投与した際の応答に脳部位の特異性があ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

脳腸は互いに情報伝達を行っていると言われていたがその詳細はまだまだ解明されていない。本研究により、腸から脳へどのような情報伝達が行われているのか栄養素によって異なるメカニズムがあることの一部を解明する事ができた。栄養素は摂取したものの嗜好性にも関与していることが知られている。この機構について解明するため、今後は栄養素の情報が摂取した味嗅覚情報をどのように変化させるのか焦点を当てていきたい。

研究成果の概要（英文）：We found that the administration of nutrients into the stomach elicits a response in putative dopamine neurons in the ventral tegmental area using in-vivo electrophysiology. Next we measured extracellular dopamine changes using microdialysis in the nucleus accumbens and confirmed an increase in dopamine levels after nutrient administration. Since dopamine neurons are divided into cell groups with different functions depending on their projection targets, multi-point dopamine measurements were conducted to elucidate each function in the context of nutrient information. Using fluorescent dopamine sensors, we quantified dopamine responses from multiple brain regions. We found the projection-specific dopamine increases in response to intragastric nutrient administration.

研究分野：神経科学

キーワード：脳腸関連 ドーパミン 糖

### 1. 研究開始当初の背景

動物には消化管で吸収された栄養素の情報が脳に伝達される脳腸相関と呼ばれる機構が存在する。この中でも、糖や脂肪を摂取すると栄養素としてのシグナルが脳の報酬系に関係するドーパミン (DA) 神経細胞を活性化させ、その結果として食物摂取時の味・嗅覚嗜好性や選択に影響を与えることが明らかとなっている。腸から脳への情報伝達において、迷走神経由来のシグナルが嗜好を生じる機構については解明されてきているが (Han et al. 2018; Uematsu et al. 2010)、液性因子が脳に作用する機構については未解明である。DA 神経細胞にはインスリン受容体が発現しており、インスリンが DA 神経細胞の発火頻度を上昇に関与することが知られている。そこで、本研究においては糖により分泌されるインスリンを介したシグナルに焦点を当て、インスリンが腹側被蓋野の DA 神経に作用して嗜好性に影響を及ぼすという仮説を検証する。

### 2. 研究の目的

脳腸相関において液性因子であるインスリンが DA 神経細胞や嗜好性に及ぼす機能について明らかにする。

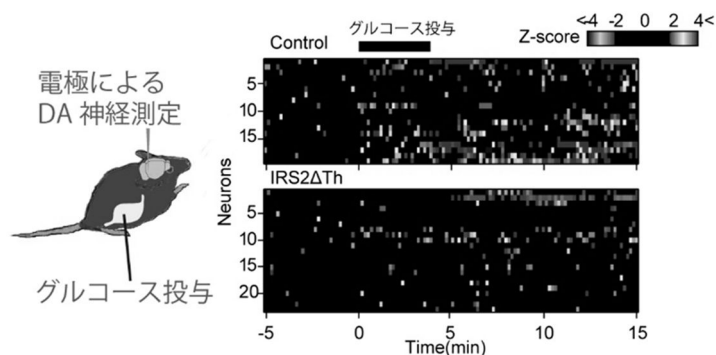
### 3. 研究の方法

DA 神経応答や DA 応答を観察するため、マウスの胃にチューブを通すことにより、味覚を介さずに栄養素を投与可能とした。Tyrosine hydroxylase (Th) -Cre マウスと floxed-IRS2 マウスを交配し、Th 細胞特異的な IRS2 ノックアウト (KO) 動物を作製した。1. マウスには VTA にテトロド電極を留置して胃に栄養素を投与した際の神経細胞活動を記録した。2. マウスの側坐核と前頭前野において蛍光ドーパミンセンサー (GRAB-DA) をアデノ随伴ウイルスにより発現させた。また、同一領域に光ファイバーを留置した。胃に栄養素を投与した際の蛍光量変化について観察を行った。

行動実験としては上記と同様に胃チューブを留置した。VTA 内に抗インスリン抗体を投与する群では両側 VTA に微小投与用カニューレを留置した。手術から回復後、マウスは制限給餌とし、溶液 A と B を片方ずつ提示した。溶液 A の場合は胃に水を投与し、溶液 B の場合には胃にグルコースを投与した。溶液の摂取量と胃内投与量は同一になるよう調整を行った。

### 4. 研究成果

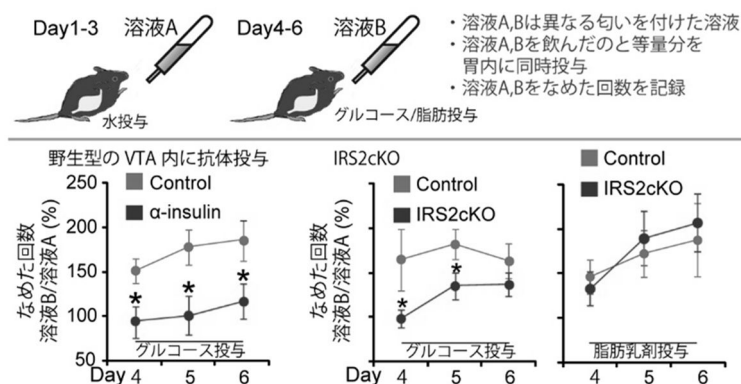
記録している細胞がドーパミン神経細胞かどうかを確認するために、胃内投与後に D2 受容体のアゴニストを投与して神経細胞の自発発火が減少するかを確認した。D2 アゴニスト投与後に自発発火の減少があるもののみを DA 神経と仮定した。野生型動物の胃内にグルコースを投与すると、VTA の DA 神経細胞のうち発火頻度が上昇するものが観察することができた。次に同様の操作をコンディショナル KO マウスにて行ったところ、グルコース投与に対して応答する DA 神経細胞はほとんどみられなかった。野生型マウスと IRS2KO マウスとで比較してもグルコース投与に対して発火頻度が上昇する IRS2KO マウスの DA 細胞比率は野生型と比べて減少していた。この応答がグルコース特異的であるかを検討するために胃にイントラリピッドを投与したところ、発火頻度が上昇する DA 神経細胞の比率は IRS2KO と野生型において変化は見られなかった。以上の結果から、DA 神経細胞における IRS2 シグナルが栄養素グルコースの応答に重要であることが示唆された。



VTA の DA 神経細胞は投射先によって異なるサブセットをなし、それぞれ異なる機能をもつことが知られている。そこで、グルコースの栄養素情報が投射先によって異なるのかを検討した。最初に、側坐核にダイアリシスプローブを留置して細胞外 DA が上昇するか検討した。胃内にグルコースを投与したマウスでは DA 濃度が上昇したものの、IRS2KO マウスでは DA 濃度の上昇はみられなかった。またインスリンを VTA に局所投与することによっても野生型マウスの側坐核 DA 濃度が上昇した。マイクロダイアリシスでは時間分解能が 10 分程度であり、複数の脳部位を同時にみることが困難であった。そのため、蛍光インディケーター GRAB-DA を用いて複数領域の

DA 変化をみることを試みた。蛍光強度の変化量を見る手法であるが、GRAB - DA の輝度低下が徐々に低下するため、本実験に適用するためには光強度などの最適化が必要であった。いろいろと検討した結果、胃内投与に対して GRAB-DA 変化がみられる設定ができた。グルコースに対する応答を前頭前野と側坐核にて検討したところ、側坐核においてのみ DA 上昇がみられ、グルコースの栄養素情報には投射特異性があることが示唆された。

次に IRS2KO がグルコース栄養素による嗜好性形成に影響があるか検討をおこなった。苦味物質であるキニーネ溶液と水を提示するとマウスは水を有意に多く摂取した。次に、制限給餌の状態でも苦味物質を飲んだときに胃内にグルコースを投与するような実験を 10 日間行った後に同様にキニーネ溶液と水を提示した。その結果、マウスはキニーネのほうをより多く摂取するようになることが明らかとなった。この系においては長時間の実験が必要となるため、短時間で条件づけができる系を探索した。グレープの匂いがついた溶液 A を飲むと胃に水を投与する条件づけを 1 日 1 時間にて 3 日連続で行い、次の 3 日間ではオレンジの匂いがついた溶液 B を飲むと胃にグルコースを投与する条件づけを同様に 3 日間行った。野生型マウスは溶液 B を溶液 A よりも多く飲むようになった。この系を用いて VTA のインスリン受容シグナル操作を行った。最初に VTA に抗インスリン受容体抗体を投与して、条件づけを行った。すると対照群に比べて、溶液 B のリック回数が減少することが明らかとなった。また IRS2KO マウスにて同様の条件づけを行うと、野生型に比べてグルコースのリック回数が減少した。この条件づけはグルコース特異的かどうかをみるためにグルコースの代わりにイントラリピッドを投与したところ、IRS2KO マウスと野生型の溶液 B のリック回数は変化がみられなかった。以上の結果からグルコースは VTA におけるインスリンシグナルを介して嗜好性変化に影響を及ぼすことが示唆された。



IRS2KOマウスにおいてはDA神経細胞のほかにもThを発現する細胞にIRS2が発現する場合はKOしている。また、発達時におけるKOにより代償性変化が起こっている可能性も考えられる。マウスが成熟してから投射部位特異的なVTA - DA細胞のノックアウトを可能にするためにCRISP-Cas9をアデノ随伴ウイルスで行う系について最後に検討を行った。アデノ随伴ウイルスに搭載可能なサイズであるsaCas9とインスリン受容体を標的とするgRNAをデザインした。これらのウイルスを投与することによって実際にインスリン受容体が減少することを確認した。今後はこのウイルスを投射部位特異的に標的できるよう検討し、投射部位特異的なインスリンシグナルのKOによって嗜好性における機能を探りたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe Mayumi, Uematsu Akira, Johansen Joshua P.	4. 巻 14
2. 論文標題 Enhanced synchronization between prelimbic and infralimbic cortices during fear extinction learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00884-6	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 -

1. 著者名 Nakahama Ryota, Saito Aika, Nobe Sensho, Togashi Kazuya, Suzuki Ikuo K., Uematsu Akira, Emoto Kazuo	4. 巻 15
2. 論文標題 The tyrosine capsid mutations on retrograde adeno-associated virus accelerates gene transduction efficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-022-00957-0	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 -

1. 著者名 Sulkes Cuevas Jessica, Watanabe Mayumi, Uematsu Akira, Johansen Joshua P.	4. 巻 -
2. 論文標題 Whole-brain afferent input mapping to functionally distinct brainstem noradrenaline cell types	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biorxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.11.22.517460	査読の有無 無
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
---------	---------