

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21756

研究課題名（和文）代謝シグナルによる飲酒欲求調節を担う脳内神経回路の解明

研究課題名（英文）Elucidating neural circuit that regulates alcohol intake through metabolic signaling

研究代表者

佐々木 努（Sasaki, Tsutomu）

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：50466687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、飲酒欲求を調節する臓器関連シグナルとして我々が同定したFGF21 - オキトシン（Oxt）系について、脳内の解析を中心に計画した。しかし、これまで問題なく動いていた実験手技2つに、新たな技術的な課題が浮上した結果、思ったように実験が進まなかった。その間、慢性アルコールモデルの作製において、多方面からの検討を進めた。その結果、従来から用いられている流動食を用いたモデル作成プロトコルよりも、流動食をゲル化して固形化することによりモデルの作製を容易にして、作成効率を高める改善策を発見することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルコールの摂取過剰は、社会に対して大きな負荷をもたらしているが、上市されている治療薬（3種類、合計4剤）は効果が弱く、アルコール依存症の推計患者数（調査日当日に医療機関を受診した患者の推計数）は、1999年から2014年の15年間で3.7万人から4.9万人へと増えている。それゆえ、既存薬と作用機序の異なる薬剤を開発して、治療の選択肢を増やし、薬剤の併用により、治療効果を上げることが期待されている。本研究には、アルコールの摂取を調節する脳内メカニズムの解明を進めるといった側面と、その研究を進めるために必要なモデル動物作製方法を改善するという学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to analyze what is going on in the brain with regard to regulating ethanol drinking desire, by focusing on the inter-organ signaling FGF21-oxytocin axis. However, we encountered new technical issues with the protocol that had been working in the past, which delayed the progress of the project. Meanwhile, we worked on another troubleshooting. The currently used protocol for producing of the chronic alcoholism model uses liquid diet and has several problems. We found a way to improve the protocol by solidifying the liquid diet by agarose, which increased the success rate of the model production.

研究分野：神経科学、内分泌代謝学、食品科学

キーワード：FGF21 oxytocin alcoholism ethanol drinking behavior

1. 研究開始当初の背景

過度の飲酒は、個人の健康と社会の両方にとって大きな負荷である。アルコール依存症は、世界疾病負荷の第9位に位置する疾患であり、アルコール摂取過剰による死は世界で年間2300万人と言われており、アルコールは病気による社会的損失の第3位の原因である。また、飲酒は49歳以下の死・障害の最大の危険因子であり、日本でも年間4.15兆円の社会的損失を引き起こしている。

アルコール依存症に対しては3種類の治療薬が上市されている。アルコールの副作用を増強する抗酒剤(ジスルフィラム、シアナミド:アルデヒド脱水酵素の抑制剤)、飲酒欲求の抑制剤(アカンプロサート:GABA作用が推察されるが、作用機序は不明)および飲酒量低減薬(ナルメフェン:選択的オピオイド拮抗薬)である。しかし、既存の飲酒研究により、薬物依存の観点から脳内報酬系に焦点を当てて開発されたこれらの薬剤は効果が弱いため、治療の第一選択は心理社会療法となっている。また、飲酒は「否認の病」と言われ、患者は病状を否定し、医薬品による治療を拒否しがちであるため、必要だが治療を受けていない患者が約9割もいる。その結果、国内のアルコール依存症の推計患者数は、1999年から2014年の15年間で3.7万人から4.9万人へと増えており、既存薬と作用機序の異なる薬剤を開発して治療の選択肢を増やし、既存薬剤との併用により、治療効果を上げることが期待されている。

アルコール(エタノール)は糖の発酵産物であり、糖と同様にカロリーを持つ。また、生物進化の観点で考えると、大型恐竜が存在した時代においては、大型恐竜が食べない「微生物で汚染されてアルコールを含んだ果実」を哺乳類の祖先が食べることで生き延びたとする「Drunken monkey hypothesis」が提唱されている。つまり、糖の摂取調節とアルコールの摂取調節には、生体メカニズムレベルで共通経路を用いる可能性が考えられる。

申請者は、肝臓から分泌されるホルモンであるFibroblast growth factor 21 (FGF21)が、脳視床下部にあるオキシトシン(OXT)陽性神経細胞を活性化し、単純糖質への食欲を抑えることを解明した。他方、FGF21とOXTは、個別に飲酒欲求に関与することが文献的に報告されていたため、両者を「飲酒欲求」という文脈で結び付けた仮説を構築して研究を進め、「FGF21-OXT系」は飲酒欲求も抑制することを発見した。つまり、飲酒に伴い変動する代謝性の臓器関連シグナルFGF21が、オキシトシン神経に端を発する神経回路を介して、飲酒行動を調節するという、従来の脳内報酬系とは異なる作用機序を発見した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、飲酒に伴い変動する代謝性の臓器関連シグナル「FGF21-OXT系」に着目し、同系による飲酒欲求の調節を担う脳内神経回路の解明を進めた。遺伝子組換えマウスへの定位脳手術や、逆行性ウイルスベクターと薬理遺伝学を駆使して、部位や細胞種類などの神経経路特異的な神経活性の操作実験と飲酒行動の解析を行うことを試みた。

飲酒行動を調節する新たな生体メカニズムを解明することにより、既存薬とは作用機序の異なる薬剤の開発に貢献することを目指した。

3. 研究の方法

申請者が発見した飲酒欲求を調節する新規臓器関連システム「FGF21-OXT系」を手掛かりに、飲酒欲求を調節する新たな脳内回路を解明することを試みた。神経回路研究では「一次中枢、二次中枢、…」と情報の流れに沿った解析は、方法論としては比較的確立している。そこで本研究では、申請者が発見した「FGF21受容体陽性OXT神経」を飲酒調節の一次中枢とみなして神経回路を解明するため、他研究者に対して優位な立場で進められると考えた。

そのために、以下の4つの実験を行うことを当初計画した。

(実験1) アルコールによって活性化されるOxt神経の同定

神経回路の解明をすすめるうえで、飲酒調節の一次中枢となる「FGF21受容体陽性OXT神経」の存在部位を明らかにする必要がある。そこで、脳内2か所[視床下部室傍核(PVH)と視床下部視索上核(SON)]に存在するOXT神経のいずれが飲酒欲求の調節を担うかを、定位脳手術とウイルスベクターを用いた遺伝子組換え実験で明らかにすることを試みた。

また、同定した神経核のOXT神経が飲酒依存性に活性化されるかを、神経活性化マーカーc-Fosに対する組織染色を用いて確認することを試みた。

(実験2) 同定したOxt神経からのどの神経投射経路が、飲酒により活性化されるか

同定した神経核のFGF21受容体陽性OXT神経を「臓器関連シグナルによる飲酒調節の一次ニューロン」と捉え、その投射経路特異的な機能操作を、逆行性ウイルスベクターと薬理遺伝学を用いて行い、FGF21-OXT系による飲酒欲求の調節を担う二次中枢を同定することを目指した。逆

行性 AAV ベクターとしては、rAAV2-retro システムを用いた。

(実験 3) 同定した Oxt 神経のどの投射経路が、飲酒欲求を調節するために必要か？

逆行性 AAV ベクターを用いて投射経路特異的に、薬理遺伝学を使って神経活性を操作する実験を計画した。

(実験 4) 慢性アルコールモデルでの検討

上記の実験 1 ~ 3 により明らかにした健常マウスでの飲酒行動の制御メカニズムが、慢性アルコールモデルである Lieber-DeCarli 食を用いたモデルでどのように変容しているかを検証することを試みた。

4. 研究成果

実験を進める過程で、これまで動いていた 2 つの実験手技である「Oxt と神経活性化マーカー c-Fos の二重染色 (実験 1 に必要な手技)」および「AAV ベクターの調製 (タイターが上がらなくなった、実験 2, 3 に必要な手技)」に問題が生じ、トラブルシューティングに追われた。その結果、予定した実験 1 ~ 3 を完遂することができなかった。それに伴い、実験 1 ~ 3 で明らかにした結果を慢性アルコールモデルで検証する実験 4 も完遂出来なかった。

実験 1 に関しては、組織サンプルの採取は済んでおり、組織染色の条件の再調整が終了すれば、実験を完了することができる段階には到達した。

この間、実験 4 に用いる慢性アルコールモデルの作製において、多方面からの検討を進めた。その結果、従来の Lieber-DeCarli 食の問題点 (流動食の摂取量がうまく測定できない、摂取量が安定せず、モデル作成効率が悪い) に対して、モデルの作製を容易にして、作成効率を高める改善策を発見することができた。具体的には、流動食をアガロースゲルにより固形化しても、マウスはその食事を食べてくれることが分かり、食事を介してアルコールをさせることができることを確認した。また、エサを固形化するためのアガロースゲルの濃度や、エサの保存方法の詳細な条件検討を行った。さらに、エサの投与期間が飲酒欲求とアルコール性肝障害に及ぼす影響の検討も進めることができる環境が整った。

COVID-19 に伴う研究の遅れと、技術的な課題による研究の遅れが相まって、期限内に全ての実験を完遂することはできなかったが、2022 年度も研究は続けており、実験 1 に関しては、別の抗体の組み合わせにより、二重染色が再度動く条件を見つけることができている、サンプル処理中である。実験 2, 3 に必要な AAV ベクターの調製については、ベクター調整に用いる細胞を数種類導入して、比較検討を進めている最中である。引き続き、当初の目的を達成するための努力を続けている。これらと、実験 4 の成果を組み合わせることにより、予定よりは遅れるものの、研究成果をあげることは可能と考えている。

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

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 線維芽細胞増殖因子21誘導剤、及びアルコール嗜好性又は単純糖質嗜好性を抑制するための組成物	発明者 佐々木努、松居翔	権利者 国立大学法人京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/3182	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------