

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790228

研究課題名（和文） 摂食制御を担う視床下部NPYニューロンのエネルギー輸送機構

研究課題名（英文） Mechanism of energy transport in feeding-related hypothalamic NPY neuron

研究代表者

前川 文彦（MAEKAWA FUMIHIKO）

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号：40382866

研究成果の概要（和文）：

細胞外からの栄養素の取り込みやそこから作り出されるエネルギーがNPYニューロンの機能や形態にどのような影響を与えるか確かめるため、解糖系酵素の阻害剤である無機ヒ素を培養液中に添付したところ、2 μ M程度の濃度の添付で細胞死誘導や神経突起伸長抑制などの影響が見られることが確認され、神経活動が低下していることが推測された。また、この時AMPA型グルタミン酸受容体の発現が低下していたことから、神経突起伸長の抑制はグルタミン酸受容体発現抑制と関連していると考えられた。一方、0.5 μ M程度の低濃度の添付により、逆に細胞死が抑制され、AMPA型グルタミン酸受容体の発現も高くなる傾向にあった。これらの結果は、エネルギー輸送によって細胞内に取り込まれ、解糖系により生成されるエネルギーレベルに応じてNPYニューロンの神経活動の促進／抑制のスイッチが切り替わることを示している。

研究成果の概要（英文）：

To clarify whether the nutrients taken up from extracellular space and the consequent energy derived from the nutrients affect the physiological function and cellular morphology of NPY neuron, we examined the effects of arsenic, an inhibitor of glycolysis, on cellular survival, neurite outgrowth and glutamate AMPA receptor expression in primary culture of NPY neurons. Both significant suppressions of total neurite length and cellular survival were found at the concentration above 2 μ M. Immunofluorescence staining of glutamate receptors in NPY-hrGFP neuron revealed that arsenic above 2 μ M decreased a subtype of glutamate AMPA receptor expression. On the other hand, the enhancements of cellular survival and an AMPA receptor expression were found at the concentration below 0.5 μ M. These results demonstrate the possibility that neuronal activity is dramatically changeable by the nutrients transported and consequent intracellular energy level in NPY neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：摂食調節、全身代謝調節、神経エネルギー学

1. 研究開始当初の背景

視床下部弓状核は摂食量・エネルギー消費の調節を行う全身代謝調節器官である。弓状核には、摂食亢進ペプチド NPY と Agouti-related peptide(AgRP) を併せ持つ NPY/AgRP ニューロン (以下 NPY ニューロンと略す) と、摂食抑制因子 proopiomelanocortin(POMC) と

cocaine-amphetamine regulated transcript (CART) を併せ持つ POMC/CART ニューロンの 2 種類の代表的ニューロン群が存在する。弓状核 NPY ニューロンを遺伝子工学を用いて選択的に破壊すると摂食量が正常の 20% にまで低下するので (Luquet et al. Science 310:683-685, 2005)、NPY ニューロンは摂食亢進系の最重要構成要素と捉えられている。

エネルギー感知に着目すると、NPY ニューロンはグルコースを情報伝達分子として感知し、低血糖時に活動亢進するグルコース感受性ニューロンである (Muroya, Yada et al., Neurosci. Lett. 264:113-6,1999)。NPY ニューロンのグルコース感知機序については、取り込まれたグルコースから産生される(ATP 等)代謝産物の低下が神経活動亢進に繋がると考えられている (代謝説, González et al. J. Physiol. 587:41-8, 2009)。

一方、“感知”とは別に、神経細胞が興奮し続けるためにはエネルギー“利用”が必要である。脳の第一義的なエネルギー源はグルコースである。脳は安静時でも血中グルコースの 20% 以上を消費し、特定領域活性化時にはさらに 1.5 倍量を消費すると考えられている。神経細胞内では ATP 消費の半分以上は活動電位伝播から神経伝達物質放出に至る前シナプス領域の活動に使われる (Attwell, Laughlin, JCBFM21:1133-1145, 2001)。活性化時にグルコースをより消費するという脳の一般的なエネルギー消費原則を NPY ニューロンに当てはめると、細胞外グルコース濃度が低下する低血糖環境下で NPY ニューロンの活動が亢進し長期的に維持される現象はパラドックスである。

2. 研究の目的

NPY ニューロンはグルコースの輸送体を発現していることが報告されており、また、乳酸を含む短鎖脂肪酸類、ケトン体といった各種栄養素を取り込む特性を持っていることが推測されている。NPY ニューロンにおいて、1) 血糖以外のエネルギー「感知」、2) 低血糖時のエネルギー「利用」、がどのように仕分けされ、どのような分子機構に基づいて実行されているのか探ることは重要な課題であると考えられる。

本研究では、数多くの種類のニューロンが混在する神経核から NPY ニューロンのみを

特異的に識別するため、NPY 遺伝子のプロモーターの下流に緑色蛍光タンパク hrGFP を発現する遺伝子組換えマウスからニューロンを単離培養し、NPY ニューロンの機能、形態を調べることが出来る細胞培養系を確立した。その上で、解糖系酵素の阻害剤である無機ヒ素を培養液中に添加して NPY ニューロンへの影響を調べた。また、MCT1 遺伝子発現亢進を意図したプラスミド・ベクターを作成し、将来の NPY ニューロンへの遺伝子導入を見据えて培養細胞に導入し、その動態を観察した。このように、栄養条件が少ない時により活発に活動する NPY ニューロンの活動様式を支える分子基盤に関する基礎的な研究を行うことが目的である。

3. 研究の方法

(1) 初代培養 NPY ニューロン培養系の確立

NPY-hrGFP 遺伝子改変マウス (Strain name: B6.FVB-Tg(Npy-hrGFP)1Low/J, Stock #:006417) を米国ジャクソン研究所より購入して維持した。ヘテロ改変動物の雌雄を交配にかけ、プラグを確認して妊娠日を特定した。17 日令胎児から脳を摘出し、個体毎の脳における hrGFP 発現を倒立型蛍光顕微鏡により確認した (図 1)。その後、組織を摘出し、Papain (Sigma P-4762)、DNaseII (Sigma P-4138)、L-Cystein、牛血清アルブミンを含む酵素処理溶液中で 37°C で 10 分程度処理し、細胞分散を促進した。さらに、酵素処理溶液を除き、ピペッタにより機械的に細胞を分散させた。分散させた細胞をマイクロカバーガラスに播種し、B27 supplement



図 1. 胎生 17 日令の NPY-hrGFP マウスから摘出した脳の全体像

を含む Neurobasal 培養液 (Invitrogen) で培養 4 日目 (DIV4) まで培養を行った。

(2) 無機ヒ素の添加と細胞機能の検討

無機ヒ素は DIV2~4 まで、0, 0.5, 1.0, 2.0 μ M の Sodium arsenite を培養液中に添加した。Wst-1 アッセー法 (# 11644807001, Roche) により、生細胞のレベルを検出した。神経細胞の形態を観察するため共焦点レーザー顕微鏡 Leica TCS-SP5 を用いて、Z 軸方向に 1 μ m おきに画像を取得し、全画像をマージして全体像を再構築した。神経細胞の神経突起の長さおよび分枝数は、プラグイン NeuronJ

を実装した ImageJ によって解析した。

(3) 免疫細胞化学によるグルタミン酸受容体発現量の検討

細胞を 4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液により固定した。1%カゼイン・リン酸緩衝液からなるブロッキングバッファーにより、抗体の非特異的結合に対するブロッキングを行った。その後、抗グルタミン酸受容体抗体を含んだブロッキングバッファーで 4°Cで一晩処理した。翌日、Alexa546 標識抗ウサギ IgG 抗体で 37°C 2 時間処理した。このように染色された細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、hrGFP と Alexa546 のシグナルを検出し、画像処理により個々の NPY ニューロンにおけるグルタミン酸受容体発現量を測定した。

(4) MCT1、Basigin 過剰発現ベクターの作成と培養細胞における発現位置の検討

赤色蛍光を発する mStrawberry と乳酸輸送体 MCT1 の融合蛋白質を CMV プロモーターの下流で発現する mStrawberry-MCT1 ベクター、青色蛍光を発する ECFP と乳酸輸送体シャペロン Basigin の融合蛋白質を CMV プロモーターの下流で発現する、ECFP-Basigin ベクターを分子生物学的な手法を用いて作成した。これらのベクターを神経芽腫由来の細胞株 Neuro2A に発現させて、その発現位置を確認した。

4. 研究成果

(1) 初代培養

NPY ニューロン

培養系の確立

培養開始後 1 日

後(DIV2)より神経突起の伸長が

観察され、4 日間で十分な神経突起伸長が共焦点

レーザー顕微鏡により観察できた。

(2) 無機ヒ素の

添加と細胞機能

の検討

無機ヒ素の 2

μM 以上の添加により、細胞死が誘導されることが明らかとなった(図 2)。逆に低濃度で投与した場合に細胞死の抑制が起こることが明らかとなった。神経突起伸長

図 2. ヒ素が NPY ニューロンの神経突起伸長に与える影響

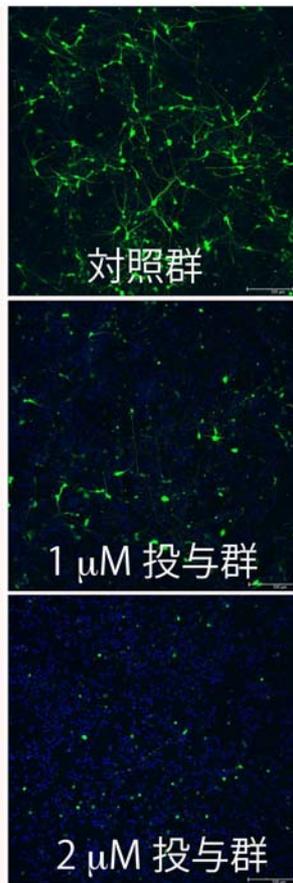


図 2. ヒ素が NPY ニューロンの神経突起伸長に与える影響

に関しては、1 μM から抑制が起こることが明らかとなった(図 2)。

(3) 免疫細胞化学によるグルタミン酸受容体発現量の検討

1 μM 以上の無機ヒ素を投与した場合、AMPA 型グルタミン酸受容体サブタイプの 1 種で発現量の低下が観察された。一方、低濃度投与した場合には発現量が増加する傾向が観察された。この現象は、NPY ニューロンが強くエネルギー欠乏状態に陥った時には興奮性が低下し、弱いエネルギー欠乏状態に陥った時は逆に興奮性が上昇する可能性を示唆している。

(4) MCT1、Basigin 過剰発現ベクターの作成と培養細胞における発現位置の検討

乳酸輸送体 MCT1 が NPY ニューロンに発現していることが *in situ hybridization* による以前の研究から明らかになっており(未発表)、細胞の生存・エネルギー感知における役割に注目している。MCT1 を Neuro2A 細胞に単独で発現させた場合、細胞質に発現していたが、Basigin と共発現させた場合、細胞膜上に発現するようになった(図 3)。

(図 3)。MCT1 を細胞膜上に発現させたい場合には、Basigin と共発現させる必要があるという今回の結果は、今後のより詳細なエネルギー輸送の解析に向けて重要な第一歩となる。

現在、初代培養 NPY ニューロンに MCT1 及び Basigin を発現させ、その影響を検討しているところである。

(5) 総括：

NPY ニューロンの神経活動の ON/OFF に、エネルギー代謝が密接に関連する可能性が見いだされた。

このような *in vitro* で観察された現象が、実際に *in vivo* のエネルギー感知の場面でどのように利用されているのか今後詳しく検討していく必要がある。

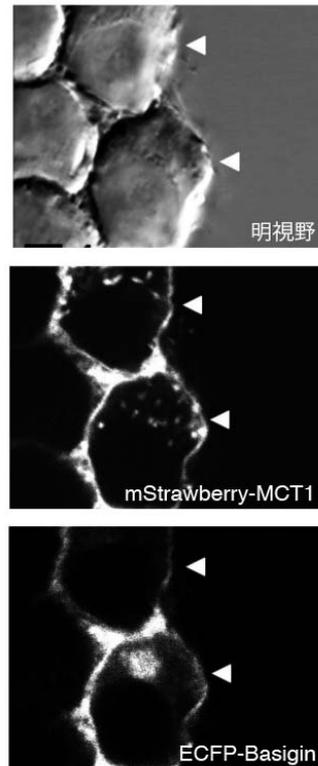


図 3. Neuro2A における MCT1 と Basigin の共局在。矢頭が細胞膜を示す。

このように *in vitro* で観察された現象が、実際に *in vivo* のエネルギー感知の場面でどのように利用されているのか今後詳しく検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yada T, Kohno D, Maejima Y, Sedbazar U, Arai T, Toriya M, Maekawa F, Kurita H, Nijima A, Yakabi K (2012) Neurohormones, Rikkunshito and hypothalamic neurons interactively control appetite and anorexia. *Current Pharmaceutical Design*, 18 (印刷中). 査読有
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632865>
- ② 前川文彦、鳥谷真佐子、前島裕子、矢田俊彦 (2012) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)による摂食調節機構 *内分泌・糖尿病・代謝内科* 34(1)59-64. 査読無 URL:
<http://www.kahyo.com/item/B201201-341>
- ③ Kato Y, Nakashima S, Maekawa F, Tsukahara S (2012) Involvement of postnatal apoptosis on sex difference in number of cells generated during late fetal period in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in rats. *Neurosci. Lett.* 516(2)290-5. 査読有 DOI: 10.1016/j.neulet.2012.04.017
- ④ Toriya M, Maekawa F, Maejima Y, Onaka T, Fujiwara K, Nakagawa T, Nakata M, Yada T 2010 Long-term infusion of brain-derived neurotrophic factor reduces food intake and promotes lipolysis via a corticotropin-releasing hormone pathway in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 22(9)987-95. 査読有 DOI: 10.1111/j.1365-2826.2010.02039

[学会発表] (計 9 件)

- ① 前川文彦、榛葉繁紀、内匠正太、大和田美佳、包金花、野原恵子 環境応答に関わる DNA メチル基転移酵素の時計遺伝子による発現制御 第 14 回環境ホルモン学会 2011 年 12 月 1 日 東京 東京大学山上会館
- ② 前川文彦、榛葉繁紀、内匠正太、大和田美佳、包金花、野原恵子 肝臓における DNA メチル基転移酵素遺伝子発現の概日周期：摂食と時計遺伝子の役割 第 32 回日本肥満学会大会 兵庫 淡路夢舞台国際会議 2011 年 9 月 24 日
- ③ 安藤明彦、Gantulga Darambazar、山本早和子、吉田なつ、倉科智行、前島裕子、河野大輔、前川文彦、出崎克也、中田正範、長坂昌一郎、石橋俊、矢田俊彦 2 型糖尿病モデル GK ラットにおける週齢特異的過食の成因 第 32 回日本肥満学会大会 兵庫 淡路夢舞台国際会議 2011 年 9 月 23 日
- ④ 前川文彦、坪井貴司、野原恵子 ヒ素による神経突起伸長抑制に対する AMPA 型グル

タミン酸受容体過剰発現の効果 第 34 回日本神経科学大会 神奈川 パシフィコ横浜 2011 年 9 月 14-17 日

- ⑤ 前川文彦、村井景、野原恵子 胎児期ヒ素曝露が導く成体 C3H マウスにおける血糖制御異常 日本糖尿病学会第 54 回大会 北海道 札幌市 2011 年 5 月 21 日
- ⑥ 前川文彦、包金花、野原恵子 環境応答に関わる DNA メチル基転移酵素 mRNA 発現の肝臓での概日周期 第 13 回環境ホルモン学会研究発表会 東京大学山上会館 2010 年 12 月 16 日
- ⑦ 包金花、前川文彦、野原恵子 マウス肝臓における DNA メチル化酵素 Dnmt mRNA の概日周期とその制御 日本時間生物学会第 17 回大会 早稲田大学国際会議場 2010 年 11 月 20 日
- ⑧ Endo T, Maekawa F, Voikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, Kakeyama M Corridor shuttling spatial learning task[1]: Automated analysis of behavioral flexibility and reversal learning-set in mice using IntelliCage system. 40th Annual Meeting of the Society-for-Neuroscience San Diego, CA, USA November 13-17, 2010

[その他]

ホームページ等

URL <http://www.nies.go.jp/health/labo/toxi.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 文彦 (MAEKAWA FUMIHIKO)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号：40382866

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし