

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 4 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790875

研究課題名（和文） 食餌嗜好性制御中枢の細胞内制御メカニズムの解析

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of AMP kinase-fatty acid oxidation axis in the food preference center.

研究代表者

岡本 士毅 (OKAMOTO SHIKI)

生理学研究所・発達生理学研究系・助教

研究者番号：40342919

研究成果の概要（和文）：

視床下部は、動物個体のエネルギー代謝を自律的に調節している。研究代表者は視床下部AMPキナーゼ (AMPK) が、高脂肪食と高炭水化物の選択的摂食行動を調節することを明らかにした。そしてこの嗜好性変化は視床下部室傍核における脂肪酸酸化亢進に起因する事を明らかにした。本研究では、嗜好性変化に寄与する主要神経細胞がPVNに含まれるコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) 含有ニューロンである事を同定した。これは神経細胞の主要エネルギー源と考えられているグルコース以外にも、脂肪酸代謝シグナルが神経活動の発火に寄与する事を示す直接的な証拠と考えられ、嗜好性制御には脂肪酸代謝により発火する細胞集団による寄与が重要であると考えられている。

研究成果の概要（英文）：

Paraventricular hypothalamus (PVH) is implicated in the selection of high carbohydrate diet (HCD) and high fat diet (HFD). I clarified that AMP-activated protein kinase (AMPK) and fatty acid oxidation (FAO) in CRH neurons of PVH are critical for food selection whether HCD or HFD. Constitutively-active (CA)-AMPK in PVH neurons increases HCD intake but inhibits HFD intake dependent on FAO in PVH. Fasting increased AMPK activity in the PVH and induced high preference for carbohydrate to maintain the energy balance rapidly. Inhibition of CRH expression using shRNA technique could completely reverse this preference change. Subpopulation of CRH neurons in the anterior part of PVH increased intracellular Ca^{2+} levels and might evoke via AMPK-FAO axis. These results reveal a novel role of AMPK-FAO pathway in CRH neurons of PVH in food selection behaviour under physiological conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：脳・神経、ウイルス、メタボリックシンドローム、AMP キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

AMP キナーゼは、酵母から植物、哺乳動物に至る、ほとんどすべての細胞に発現するセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞内エネルギーレベルの低下によって活性化し、ATP レベルを回復させる酵素として知られている。AMP キナーゼは、レプチン・アディポネクチン・レジスチン等の代謝調節ホルモン、並びに運動によって活性が変化し、骨格筋、肝臓、白色脂肪細胞などにおいて糖・脂質代謝に調節作用を営む。また視床下部の AMP キナーゼ活性が摂食行動の調節に関与する事を、研究代表者の所属部門教授・箕越は、アデノウイルスを用いて変異 AMPK を内側視床下部に発現させることにより、体重・摂食量が増加することを示している (Nature 2004)。これまでに研究代表者は、摂食行動と代謝調節への視床下部 AMP キナーゼの関与をより長期間で解明するため、レンチウイルスベクターと視床下部に慢性的に選択的に持続活性化型変異 AMPK (CA-AMPK) を発現させ観察したところ、対照群に比べ有為に摂食量が増加し、体重が大幅に上昇する事を見いだした。更に興味深い事に高脂肪食よりも高炭水化物食（蔗糖含有）を多く摂食していた。そこで CA-AMPK マウスの嗜好性を調べるため、同じケージ内で 2 種類の餌を同時に選択し摂食できる行動計測ケージを独自に考案し、高脂肪食と高蔗糖食を自由に選択させた時の各々の摂食量を測定した。すると、対照マウスは高脂肪食を主として摂取するのに対し、CA-AMPK マウスは高蔗糖食を多く摂取した。嗜好性を変化させる脳内機構を検討するため、CA-AMPK マウスの視床下部各神経核における代謝酵素、ホルモン、ニューロペプチドの mRNA 発現の変動を検討すると、CA-AMPK を発現した室傍核でのみ、PPAR γ やその標的遺伝子である FATP1 (fatty acid transport protein1)、ACS (Acyl-CoA synthetase)、CPT1c (carnitine palmytoyltransferase 1c 型) など、脂肪酸酸化に関わる転写因子、代謝酵素の発現が亢進していた。さらに、AMP キナーゼの標的蛋白質の一つであり、ミトコンドリアでの脂肪酸酸化調節に関わる acetyl-CoA carboxylase (ACC) のリン酸化も亢進していた。AMP キナーゼによって ACC がリン酸化されると、ACC 活性が抑制され、産物である malonyl-CoA 量が低下する。malonyl-CoA はミトコンドリアへの脂肪酸の取り込みに関与する酵素 CPT1 の強いアロステリック阻害剤なので、CPT1 活性が上昇し、脂肪酸酸化が亢進する。研究代表者の示す実験結果は、CA-AMPK が PVH において脂肪酸酸化関連遺伝子の発現を高め、かつ CPT1 活性を上昇させることによって、脂肪酸酸化が亢進することを示唆する。

そこで PVH での脂肪酸酸化と嗜好性との関連を調べるため、CPT1 遮断薬である etomoxir を CA-AMPK マウス PVH に前投与して嗜好性に及ぼす影響を調べた。すると高蔗糖食を食べていた CA-AMPK マウスが、高脂肪食を食べる嗜好性に完全に逆転した。従って CA-AMPK が PVH における脂肪酸酸化を促進し、高蔗糖食に対する嗜好性を高めることが明らかとなった。更に AMP キナーゼによる嗜好性制御作用がどのような生理的条件下で機能しているかを明らかにする目的で、絶食後における再摂食の効果を調べた。絶食により PVH \cdot AMP キナーゼ活性は亢進することが明らかにされているが、再摂食させたマウスは、CA-AMPK マウスと同様に高蔗糖食の摂食量が有意に増加した。しかし etomoxir を再摂食前に投与すると、高脂肪食の摂食量が増加した。また摂食促進物質である NPY を投与すると、以上の実験結果から、人為的にレンチウイルスにより PVH \cdot AMP キナーゼ活性を上昇させた際と同様に、絶食-再摂食のような生理的条件下においても、PVH における AMP キナーゼの上昇とそれに伴う脂肪酸酸化の亢進が嗜好性の変化に必須であることが予想される。

2. 研究の目的

AMP キナーゼは、近年、肥満・糖尿病の分野でとりわけ注目されるキナーゼである。研究代表者は持続活性化型 AMP キナーゼを、レンチウイルスベクターを用いてマウス視床下部室傍核に局限して発現させると、感染マウスは過食になり肥満する事を見いだした。更に興味深い事にこのマウスは脂肪食よりも炭水化物食を好む事が判明し、その制御に室傍核における脂肪酸酸化が関与する事を明らかにした。そこで本研究では、視床下部 AMP キナーゼによる食餌嗜好性制御機構の解明を目的とし、嗜好性制御に寄与する細胞体の同定を行い、その活性メカニズムを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

マウス視床下部室傍核 (PVH) の AMP キナーゼ活性を上昇させると、脂肪酸酸化が亢進し、炭水化物摂取の嗜好性に变化する事を見出した。この嗜好性の変化は絶食後の再摂食時にも生じる事から、PVH における AMP キナーゼの活性化は低栄養からの回復時など生理的に必須の摂食調節機構であると思われる。

本研究では AMP キナーゼを中心に、視床下部における嗜好性制御細胞の同定と、その活性化メカニズムを解明する。

まず PVH \cdot AMP キナーゼ活性を変化させる得る摂食調節因子の脳内投与により、食餌嗜好性に対する変化を検討する。変化がみられた候補因子に対する shRNA を作製し、レンチウ

イルスベクターでPVHに発現させ、炭水化物嗜好性を来す絶食時における嗜好性変化を測定することで、候補因子を限定する。解剖学的手法と併せてPVHのAMPキナーゼを活性化させ嗜好性を変化させる細胞種を同定する。また嗜好性制御神経細胞における、AMPK及び脂肪酸酸化亢進から神経活動の上昇へ至る分子メカニズムを、単離神経細胞培養を用いた、細胞内カルシウム濃度測定により判定し、測定後に免疫組織学的手法を用いて細胞種を確定する。

4. 研究成果

本研究では、嗜好性変化に寄与する主要神経細胞を同定に至る事が出来た。PVNには様々な神経ペプチドが存在するが、自由摂食下において各種神経ペプチドのPVN微量投与により高蔗糖食の摂食量が亢進したのは、コルチコトロピン放出ホルモン(CRH)のみだった。更にCRH受容体アンタゴニストやCRHに対するshRNAをPVHに発現させる事によって絶食後の再摂食時に観られる炭水化物嗜好性が完全に遮断されたことから、生理学的にPVHにおけるCRHニューロンが嗜好性決定細胞であると考えられた。CRHは一般にストレス応答ホルモンとして考えられているが、嗜好性制御機構とストレス反応との関連を神経細胞レベルで繋ぐ重要な結果である。そこで更に単離したCRHニューロンを用いて、AMPKの活性化により神経活動が上昇するか否か検討した。単離CRHニューロンのAMPKをAMPK活性化剤で薬理的に活性化すると、細胞内の脂肪酸酸化が亢進し、さらに細胞内カルシウム濃度が上昇して神経活動が惹起される事を見出した。これは神経細胞の主要エネルギー源と考えられているグルコース以外にも、脂肪酸代謝シグナルが神経活動の発火に寄与する事を示す直接的な証拠と考えられ、嗜好性制御にはむしろ脂肪酸代謝により発火する細胞集団による寄与が重要であると考えている。

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)

[学会発表] (計 5件)

- ① **AMP-kinase in the paraventricular hypothalamus regulates food selection behavior in mice** 岡本土毅、箕越靖彦
(第89回日本生理学会大会 シンポジウム48 (入澤宏・彩記念 JPS 優秀論文賞 (入澤賞) シンポジウム) 2012. 3. 31、長野県、松本文化会館)
- ② 食餌嗜好性に及ぼす視床下部室傍核 CRH

ニューロンのAMPキナーゼ調節作用 岡本土毅、箕越靖彦 (第32回日本肥満学会シンポジウム3) 2011. 9. 23、兵庫県、淡路夢舞台国際会議場

- ③ 食餌嗜好性に及ぼす視床下部室傍核 CRHニューロンのAMPキナーゼ調節作用 岡本土毅 (第152回日本獣医学会学術集会) 2011. 9. 19、大阪府、大阪府立大学
- ④ 肥満マウスの食餌嗜好性に及ぼす視床下部室傍核AMPキナーゼの調節作用 岡本土毅、箕越靖彦 (第31回肥満学会シンポジウム2: 神経内シグナル異常と肥満) 2010. 10. 1、群馬県、前橋テルサ
- ⑤ **Regulatory role of AMP-kinase in the paraventricular hypothalamus in calorie intake and food preference** 岡本土毅、箕越靖彦 (第11回国際肥満学会(International Congress on Obesity: IOC2010) サテライトシンポジウム「Regulation of Feeding and Energy Metabolism by the Brain」) 2010. 7. 10、ストックホルム、Clarion Hotel Sign (スウェーデン)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/endoclin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本土毅 (OKAMOTO SHIKI)

生理学研究所・発達生理学研究系・助教

研究者番号: 40342919