

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500473

研究課題名(和文) 満腹中枢リズム活動の神経機構と生理学的意義の解明

研究課題名(英文) The interaction between novel oscillation within the ventromedial hypothalamus and the sympathetic nervous system

研究代表者

飯ヶ谷 嘉門(Iigaya, Kamon)

昭和大学・医学部・普通研究生

研究者番号：80445204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部腹内側核(VMH)は摂食と交感神経(SNA)に対し重要な役割を担っている。VMHには種々の摂食ペプチドの受容体が存在する。今回我々はラットのVMHに新規リズムバースト(オシレーション)を発見した。このVMHオシレーションの周波数はグルコース濃度上昇により減少し、また摂食ペプチドにより変化した。この変化は脳内への摂食ペプチド投与時やグルコース濃度変化時のSNAの変化と類似し、さらに、SNAの成分である心拍変動の低周波数成分と一致した。本研究により、VMHオシレーションは、SNA-エネルギー代謝経路に直接関わり、その機構の解明は肥満治療の新しい戦略に結びつく可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The ventromedial hypothalamus (VMH) is known to play an important role in feeding behavior and sympathetic nerve activity (SNA) control, however, the details of its involvement are unclear. VMH neurons express receptors of various neuropeptides that are involved in the regulation of feeding behavior. We herein report the identification of novel neuron groups that showed oscillations on both sides of the VMH on hypothalamus slice preparations from rats. The application of feeding peptides and changes in extracellular glucose concentration induced frequency changes in VMH oscillation, similar to the changes in the SNA induced by the application of those compounds in brain. The VMH oscillation frequency also corresponded to a low range of heart rate variability which is one of the indexes of SNA. We hypothesize that the VMH oscillation is involved in SNA and that its regulation could be a new strategy for control of energy expenditure and eventually obesity.

研究分野：交感神経

キーワード：視床下部腹内側核 交感神経 肥満 摂食 エネルギー調節

1. 研究開始当初の背景

肥満はメタボリックシンドロームの根幹をなし、後の心血管イベントの発生に深く関わり医療費の高騰や人類の生命を脅かす医療上の大きな問題である (Gustafson B et.al, 2007)。肥満は交感神経と摂食によって大きく影響される。視床下部は摂食と交感神経を介してエネルギー調節を行っている重要な領域である (Abizaid A et.al, 2008)。中でも視床下部腹内側核 (VMH) は、電気破壊すると過食から肥満になり、逆に電気刺激すると交感神経活動 (SNA) を介して血圧、心拍数、血糖、肝での糖新生の亢進を起こすことから、摂食と SNA にかかわる重要な領域であることがわかっている (Shimazu T et.al, 1981)。VMH の一部のニューロンはグルコース感受性ニューロンであり、さらにグルコース興奮性ニューロンとグルコース抑制性ニューロンがある (Song Z et.al 2001)。これまでの研究では、VMH グルコース感受性ニューロンは持続的発火のパターンを示すことが報告されている (Watts A.G et.al, 2009)。またこのグルコース感受性ニューロンが SNA に関連しているかについてはわかっていない。VMH にはインスリン、NPY (Y5)、オレキシン (OX1)、ガラニン、グレリン、ノルアドレナリン、CART、CCK-A and CRF2 など様々な摂食ペプチドの受容体が存在するが、これらの摂食ペプチドがグルコース感受性ニューロンの活動に影響を及ぼしているかどうかについては不明である。

2. 研究の目的

今回、我々はラット視床下部スライス標本から VMH にリズムミックバースト活動 (Oscillation) を示すニューロングループを発見した。そこで、この Oscillation を示すニューロンにグルコース感受性があるかどうか、またこの Oscillation が SNA に影響を及ぼしている可能性があるかどうかを検証した。

3. 研究の方法

1) **動物、標本、灌流液** 生後 5-14 日の Wistar rat から 0.5 mm の視床下部スライス標本を作製した。標本をグルコース 10mM 濃度の脳脊髄液で灌流した (pH7.4, NaCl 124, K 5.0, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 25, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, D-Glucose 10 in mmol/L)。

2) **光学測定法 (Optical imaging)** 視床下部スライス標本を膜電位色素感受性色素 Di2-ANEPEQ 50 μg あるいはカルシウム感受性色素 Fluo-8TM 10mM で染色した。VMH 領域の神経活動を光学測定装置 MiCAM02 で観察した。

3) **電気生理学の実験** 光学測定法で行った別の標本を用いて VMH にガラス電極を刺入し

Field potential と whole cell patch clamp 法を用いて単独あるいは同時記録を行いながら神経活動を記録した。

4) 摂食ペプチドによる VMH の電気活動の変化

光学測定法あるいは電気生理学の実験で神経活動を記録した後、脳脊髄液のグルコース濃度を 10mM から 2mM あるいは 30mM に変更しグルコース感受性の有無および変化を記録する。グルコース感受性を確認した後、摂食にかかわる種々の神経ペプチド (Orexin, Insulin, CRF, PACAP, Galanin, Ghrelin, Leptin, Isoproterenol, CCK, CART, NPY) を灌流し神経活動の変化を記録した。

4. 研究成果

1) 両側 VMH における新規 Oscillation の発見

10mM グルコース濃度の人工脳脊髄液灌流下で、光学測定 (膜電位イメージング) を行ったところ、視床下部スライス標本内の左右の VMH に新規リズムミックバースト (Oscillation) を発見した (図 1A)。この VMH oscillation の周波数は右 0.068 ± 0.010 Hz, 左 0.066 ± 0.011 Hz (それぞれ $n=11$) だった。また左右の位相は完全に異なっていた。カルシウムイメージングで VMH oscillation を観察すると VMH の外側端のニューロンから Oscillation が始まっていることが観察された。

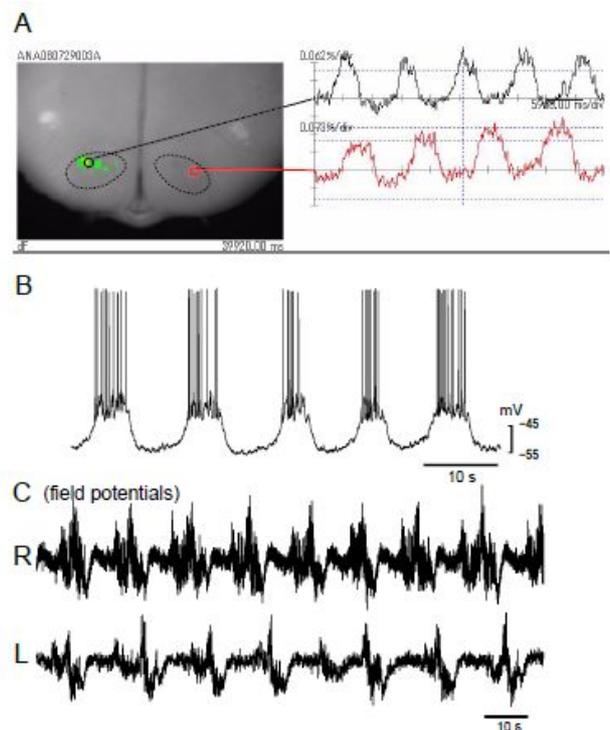


図 1. 視床下部スライス標本の VMH における周期的神経活動. A, 膜電位イメージング. B, 細胞内記録. C, 細胞外記録.

光学測定とカルシウムイメージングで認められた VMH の自発発火による oscillation の、電気生理学的性質を調べるため細胞外および細胞内記録をおこなった。フィールドポテンシャルによる細胞外記録でも同様に VMH に oscillation を認めた。左右の VMH の oscillation の周波数は右 0.063 ± 0.016 Hz (n=25)、左 0.063 ± 0.018 Hz (n=25) と完全に一致したが、左右の位相は完全に異なっており、これらの結果は光学測定で得られた結果と一致する結果だった。(図 1C)。またこの細胞外記録の電極の近傍に細胞内記録用の電極を刺入し、ホールセルパッチクランプを行うと、細胞外記録で得られた oscillation と完全に同調する oscillation が認められた (n=20) (図 1B)。このニューロンの膜電位は -44.2 ± 21.7 mV、周波数 0.069 ± 0.019 Hz、膜抵抗 728 ± 418 M だった。外科的に VMH を孤立させた状態で光学測定を行っても、VMH oscillation は残存したため、この VMH oscillation は VMH 自身から自発的に発生していると考えられた。また VMH oscillation に性差は認められなかった。VMH oscillation の周波数は心拍変動の低周波数成分 (Low frequency: LF) と類似しており、LF は交感神経成分であることから VMH oscillation は交感神経に関与している可能性が考えられた。

2) VMH oscillation のグルコース感受性

VMH にはグルコース濃度を感知するニューロンが存在することは以前から知られており (Song Z et.al, 2001)、低血糖時に対するカウンター反応の調節機構に関与していると考えられている (Chan O et.al, 2013)。そのため今回発見された VMH oscillation がグルコース濃度を感知するグルコース感受性ニューロンであるかどうかを検討した。一般的に視床下部スライス標本で使用される人工脳脊髄液内グルコース濃度 10mM を Euglycemia とし、低濃度グルコース濃度として 2mM、高濃度グルコース濃度として 30mM の溶液をそれぞれ灌流した。2mM のグルコース濃度は VMH oscillation の周波数を亢進させた (28.0 ± 30.0 % n=11, P = 0.009)、また 30mM のグルコース濃度は VMH oscillation の周波数を低下させた (28.0 ± 30.0 % n=11, P = 0.009)。このことは VMH oscillation はグルコース抑制性ニューロンの性質を有していると考えられた。低血糖を感知するのは主として VMH のグルコース抑制性ニューロンと考えられており、カウンター反応の主役は交感神経であることからこの VMH oscillation は交感神経に関与していることが示唆された。

3) VMH oscillation の摂食ペプチドの反応

VMH は摂食ペプチドが反応する最も重要な領域の一つである (Bray G.A et al, 1991)。そのため VMH oscillation に種々の摂食ペプチドを灌流しその電気生理学的変化について検討した。

摂食抑制ペプチドであるインスリン、PACAP、CRF の投与は VMH oscillation の周波数を亢進させた (21.9 ± 19.9 %, n=6, P = 0.020; 13.3 ± 9.8 %, n=5, P = 0.053; 35.7 ± 26.6 %, n=4, P = 0.032)。摂食促進ペプチドであるオレキシンの投与は VMH oscillation の周波数を亢進させた (28.2 ± 20.9 %, n=9, P = 0.001)。摂食抑制ペプチドであるレプチン、CCK、CART の投与は VMH oscillation の周波数を抑制した (37.3 ± 54.9 %, n=11, P = 0.059; 55.2 ± 46.5 %, n=7, P = 0.016; 67.2 ± 46.7 %, n=8, P = 0.043)。摂食促進ペプチドであるガラニン、イソプロテレノール、グレリン、NPY の投与は VMH oscillation の周波数を抑制した (84.7 ± 34.1 %, n=9, P < 0.001; 55.6 ± 51.4 %, n=4, P = 0.106; 87.9 ± 29.7 %, n=16, P < 0.001; 66.4 ± 39.1 %, n=4, P = 0.026)。これらの結果は、摂食ペプチドの脳内投与時による交感神経の変化と相同しており、このことから VMH oscillation が交感神経に影響を及ぼしている可能性を示唆する結果であった。しかし VMH oscillation が実際に交感神経出力であるかどうかは今後 in vivo 実験系での検討課題である。

【引用文献】

- Gustafson, B., Hammarstedt, A., Andersson, C.X. & Smith, U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2276-2283 (2007).
- Abizaid, A. & Horvath, T.L. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul Pept* 149, 3-10 (2008).
- Shimazu, T. & Ishikawa, K. Modulation by the hypothalamus of glucagon and insulin secretion in rabbits: studies with electrical and chemical stimulations. *Endocrinology* 108, 605-611 (1981).
- Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., Bakhos, N. & Routh, V.H. Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 50, 2673-2681 (2001).
- Watts, A.G. & Donovan, C.M. Sweet talk in the brain: glucosensing, neural networks, and hypoglycemic counterregulation. *Front Neuroendocrinol* 31, 32-43 (2009).

Chan, O. & Sherwin, R. Influence of VMH fuel sensing on hypoglycemic responses. Trends Endocrinol Metab 24, 616-624 (2013)

Bray, G.A. Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the MONA LISA hypothesis. J Nutr 121, 1146-1162 (1991).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

1 . **Dampney RA, Furlong TM, Horiuchi J, Iigaya K.** Role of dorsolateral periaqueductal grey in the coordinated regulation of cardiovascular and respiratory function. Auton Neurosci. 175,17-25,2013. 査読有 doi: 10.1016/j.autneu.2012.12.008.

2 . **Iigaya K, Horiuchi J, McDowall LM, Lam AC, Sediqi Y, Polson JW, Carrive P, Dampney RA.**

Blockade of orexin receptors with Almorexant reduces cardiorespiratory responses evoked from the hypothalamus but not baro- or chemoreceptor reflex responses. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 303,R1011-22,2012. 査読有 doi: 10.1152/ajpregu.00263.2012.

3 . **Iigaya K, Müller-Ribeiro FC, Horiuchi J, McDowall LM, Nalivaiko E, Fontes MA, Dampney RA.** Synchronized activation of sympathetic vasomotor, cardiac, and respiratory outputs by neurons in the midbrain colliculi. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 303,R599-610,2012. 査読有 doi: 10.1152/ajpregu.00205.2012.

4 . **Tsuzawa K, Minoura Y, Takeda S, Inagaki K, Onimaru H.** Effects of 2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine on respiratory rhythm generation of newborn rats. Neurosci Lett. 597,117-120,2015. 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2015

5 . **Onimaru H, Tsuzawa K, Nakazono Y, Janczewski WA.** Midline section of the medulla abolishes inspiratory activity and desynchronizes pre-inspiratory neuron rhythm on both sides of the medulla in newborn rats. J Neurophysiol. 113,2871-8,2015. 査読有 doi: 10.1152

6 . **Lin ST, Onimaru H.** Effects of riluzole on respiratory rhythm generation in the brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. Neurosci Res. 94,28-36,2015. 査読有 doi: 10.1016/j.neures.2014.12.001

7 . **Oshima N, Onimaru H, Yamamoto K, Takechi H, Nishida Y, Oda T, Kumagai H.** Expression and functions of 1- and 2-adrenergic receptors on the bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. Hypertens Res. 37,976-83,2014. 査読有 doi: 10.1038/hr.2014.112.

8 . **Onimaru H, Ikeda K, Mariho T, Kawakami K.** Cytoarchitecture and CO(2) sensitivity of Phox2b-positive Parafacial neurons in the newborn rat medulla. Prog Brain Res. 209,57-71,2014. 査読有 doi: 10.1016/B978-0-444-63274-6.00004-7.

9 . **Oshima N, Onimaru H, Takechi H, Yamamoto K, Watanabe A, Uchida T, Nishida Y, Oda T, Kumagai H.** Aldosterone is synthesized in and activates bulbospinal neurons through mineralocorticoid receptors and ENaCs in the RVLM. Hypertens Res. 36,504-12, 2012. 査読有 doi: 10.1038/hr.2012.224

10 . **Tanabe A, Onimaru H, Suzuki H, Takeyama Y, Homma I.** Effects of corticotropin-releasing factor on intermediolateral cell column neurons of newborn rats. Auton Neurosci. 171,36-40,2012. 査読有 doi: 10.1016

11 . **Arata S, Nakamachi T, Onimaru H, Hashimoto H, Shioda S.** Impaired response to hypoxia in the respiratory center is a major cause of neonatal death of the PACAP-knockout mouse. Eur J Neurosci. 37,407-16,2013. 査読有 doi:10.1111/ejn.12054

12 . **Onimaru H, Ikeda K, Kawakami K.** Postsynaptic mechanisms of CO(2) responses in parafacial respiratory neurons of newborn rats. J Physiol. 590,1615-24,2012. 査読有 DOI: 10.1113/jphysiol.2011.222687

13. Kumagai H, Oshima N, Matsuura T, Iigaya K, Imai M, Onimaru H, Sakata K, Osaka M, Onami T, Takimoto C, Kamayachi T, Itoh H, Saruta T.

Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure.

Hypertens Res. 35,132-41,2012. 査読有 doi: 10.1038/hr.2011.208.

14. Oshima N, Kumagai H, Iigaya K, Onimaru H, Kawai A, Nishida Y, Saruta T, Itoh H.

Baro-excited neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) recorded using the whole-cell patch-clamp technique.

Hypertens Res. 35,500-6,2012. 査読有 doi: 10.1038/hr.2011.211.

15. Onimaru H, Dutschmann M. Calcium imaging of neuronal activity in the most rostral parafacial respiratory group of the newborn rat. J Physiol Sci. 62,71-7,2012. 査読有 DOI 10.1007/s12576-011-0179-2

16. 飯ヶ谷 嘉門, 今福 俊夫, 安藤 孝, 立松 覚, 黄田 宗明, 大槻 昌子, 内藤 真規子, 亀山 香織 重症筋無力症にて胸腺腫摘出後ネフローゼ症候群を合併し LDL アフェレシスが著効した1例 日本透析医学会雑誌 2014 47: 241-247

17. 飯ヶ谷 嘉門, 熊谷 裕生 中脳における交感神経と呼吸機能との相互作用 医学のあゆみ 2012 243:384-391

[学会発表](計 8件)

1. 飯ヶ谷 嘉門, 瀧本洋一, 唐澤隆明, 侯金成, 吉村公一郎, 新山道大, 今福俊夫 肺炎球菌による Waterhouse-Friderichsen 症候群の1例 第24回臨床内分泌代謝 Update 2014.11.29 大宮

2. 飯ヶ谷 嘉門, 唐澤隆明, 侯金成, 吉村公一郎, 瀧本洋一, 今福俊夫 Zoledronic acid による Fanconi 症候群の2例 第44回日本腎臓学会東部学術大会 2014.10.25 東京

3. Kamon Iigaya, Hiroshi Onimaru Novel oscillation (burst rhythm) in

ventromedial nucleus of the hypothalamus may mediate the sympathetic nerve activity 第8回国際神経内分泌学会会議 (ICN2014) 2014.8.18 シドニー

4. 飯ヶ谷 嘉門, 今福俊夫, 立松覚, 吉村公一郎, 侯金成, 新山道大, 福岡良麿 腎死を回避できた抗GBM抗体型腎炎の2例 第59回日本透析医学会 学術集会・総会 2014.6.13 神戸

5. 飯ヶ谷 嘉門, Jouji Horiuchi, Lachlan McDowall, Alex Lam, Yusuf Sediqi, Jamie Polson, Pascal Carrive, Roger Dampney オレキシン受容体拮抗薬は視床下部性昇圧反応を減弱させる 第36回日本高血圧学会総会 2013.10.24 大阪

6. 飯ヶ谷 嘉門, 今福俊夫, 立松覚, 内藤真規子, 小出隆司, 佐々木文, 藤ヶ崎純子 剖検にて嗜銀顆粒性認知症を認めた維持透析患者の1例 第58回 日本透析医学会学術集会・総会 2013.6.22 福岡

7. Hiroshi Onimaru New mechanisms of modulation of respiratory rhythm: Effects of TRP channel related substances 第90回日本生理学会大会 2013.3.27

8. Hiroshi Onimaru, Keiko Ikeda, Kiyoshi Kawakami CO2 sensitivity and histological characteristics of Phox 2b-positive parafacial neurons in newborn rat medulla. The XIIth Oxford Conference 2012.9.17 Almelo

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯ヶ谷嘉門 (Iigaya, Kamon)
昭和大学・医学部・普通研究生
研究者番号：80445204

(2) 研究分担者

鬼丸 洋 (Onimaru, Hiroshi)
昭和大学・医学部・客員教授
研究者番号：30177258

(3) 連携研究者

()

研究者番号：