

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870457

研究課題名(和文) 大脳皮質が調節する摂食行動に対するオレキシンの役割

研究課題名(英文) The role of Orexin to appetitive behavior regulated by cerebral cortex.

研究代表者

楠本 郁恵 (Kusumoto, Ikue)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：80724757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでにその関与が示唆されてきてはいるものの、まだまだ実態が不明な点の多い、大脳皮質による食欲調節メカニズムについて、視床下部から分泌される神経ペプチドであるオレキシンとの関係に着目して実験を行った。食欲調節メカニズムを調べるにあたり、オペラントタスク、嗜好性試験、摂食量測定の3項目の摂食関連行動試験を立ち上げ、それに対するオレキシンの役割を、薬理的、光遺伝学的に調べ、その効果を確認した。大脳皮質におけるオレキシンの役割については、光遺伝学的手法を改良し、更なる研究が必要であるという結論を得た。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to elucidate neuronal mechanism of appetitive regulation which is controlled by cerebral cortex. It has been suggested that not only hypothalamus which has been mentioned strong involvement to eating behavior but also cerebral cortex might have role to control motivation to food. However, because of its complexity of cerebral cortex, it was not easy to study its role for specific behaviors. We applied optogenetics technichs to overcome such difficulty and focused the relationship between orexin and cerebral cortex related appetitive behaviors. We set up three different appetitive behaviors, cumulative eating curve, choice test and operant behavior successfully. And we tested effect of orexin to these behaviors. However, it will be needed to refine optogenetic technique to directly approach relationship between cerebral cortex and orexin.

研究分野：神経科学

キーワード：オレキシン 大脳皮質 摂食行動 食欲 オプトジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

空腹・満腹であることの知覚は、我々の摂食に関わる価値判断と行動を決める重要な情報である。動物の摂食行動調節は、これまで主に、視床下部での摂食関連ペプチドを中心に精力的に研究が進められてきており、それらのペプチド産生細胞の摂食行動に与える機能の重要性が確認され、さらにそれらの気候を担う詳細な神経回路が明らかにされつつある (Sternson SM, Neuroendocrinology 2014, review)。しかし、我々の食に関する価値判断や意識が、どのような神経メカニズムで生まれているのかについては、視床下部の摂食調節機構の知識だけではまだまだ不明な点が多い。

本研究で申請者が注目したいと考えた項目は、もう少し我々の意識に上るような感覚を扱うと考えられている大脳皮質領域による摂食調節への関与である。我々が、空腹か満腹かを感じることによって摂食行動を意識的に起こすことができることは、日頃の経験からも明らかである。申請者は、そのような意識的な摂食調節は、視床下部との相互作用によって生まれた大脳皮質の神経活動を介して起こっているのではないかと考えている。

そこで、本研究では、摂食活動を調節している可能性の高い大脳皮質領域と、体内の空腹 - 満腹状態を反映する信号として視床下部オレキシンに着目することにより、それら二つの摂食行動に果たす役割を検証することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究を始めるにあたり、新規に所属した現研究室での摂食行動解析システムを立ち上げること、視床下部オレキシン神経の活動調節に用いるオプトジェネティクス技術の確認と立ち上げを行うことの必要があった。よって、本研究の目的は以下のようにした。

【目的】

大脳皮質が関与しうる摂食行動に対する視床下部オレキシンの影響の解析

具体的には、(1) マウスを用いた、3種類の摂食行動解析タスクの確立、

(2) それらのタスクに対するオレキシン神経光刺激の影響の解析

3. 研究の方法

(1) 摂食関連行動

には、餌をどの程度食べるか、自らの生存に有利な餌を選ぶことができるか、餌を獲得しようとする動機を持っているか、等の様々な側面が考えられる。本研究では、上記 - の側面について、マウスをモデル動

物とした行動実験で解析できるように、行動タスクを確立した。

餌をどの程度食べるか

この点に関しては、平均体重 30g 程度のマウスが短時間に摂取する餌量が微量であることから、長時間にわたる摂食量を累積して測定することによって評価することにした。継続した摂食量の測定のため、デジタル天秤とデータロガーを用いることによって分単位の計時測定を行った。測定時間は6時間とした。

自らの生存に有利な餌を選ぶことができるか

この点に関しては、固形の餌を用いるのではなく、比較的短時間で摂取量の測定が望める液体の選択試験を採用した。スクロース水と水との選択試験を基盤として、実験の目的に合わせて、嗜好性の高い液体のスクロース濃度を変化させたり、溶解物を変化させたりした。嗜好性の判定には、一定時間中に摂取した量を重量として測定し、比較した。必要に応じて、舐める行動パターンの解析も組み合わせさせた。

餌を獲得しようとする動機を持っているかどうか

この点に関しては、餌を得るために、マウスに特定の行動をさせるオペラントタスクを採用した。オペラントタスクを実施するために、当初、世界中で当該実験を行う際に一般的に用いられている既製品の購入を申請したが、本研究費では購入できないことがわかり、自作のシステムを開発することを目指した。当初購入予定であった装置と同等サイズのチャンバー、また、餌獲得のための特定の行動として鼻を穴に挿入する行動を採用するためのノーズポークとそれを感知するためのセンサーを設置し、マウスによってこれらのシステムが稼働するかを確認した。ノーズポークにより獲得する報酬である餌は、手動で提供することにした。

当該手製装置は、実験期間中常に動物のそばに実験者がいる必要があり、餌を提供するたびに実験者の動きが動物に伝わってしまうこと、さらには、行動実験の実施で重要なポイントである複数条件の動物を同時にテストできないという問題点があった。幸い、本研究期間中に、本来導入するはずであった既成のオペラントチャンバーを入手する機会に恵まれ、後の実験は、既成のオペラントチャンバー (Med Associates 社製) を用いた実験に切り替えることとした。

(2) 視床下部オレキシン神経選択的な神経活動制御

神経ペプチドであるオレキシンは、視床下部の主に外側部にあるオレキシン神経によって産生されている。しかし、視床下部領域

は、多様な神経伝達物質を持つニューロンが混在しており、旧来の方法では、選択的に神経活動の制御が難しいという問題点があった。そこで、本研究では、名古屋大学山中章弘先生から提供いただいたオレキシン神経特異的に光感受性タンパクを発現しているマウスのラインを用いることで、オレキシン神経特異的にその神経活動を制御する方法を用いた。特定の波長のレーザー光を光感受性タンパクに到達させるため、フェルールに固定した光ファイバーをマウス脳内に埋め込んだ。一定の回復期間の後、レーザーとマウス脳に埋め込んだ光ファイバーを接続することで、光刺激実験を行った。光刺激パラメーターは、チャンネルロドプシンは10Hzから20Hzのパルス状、アーキロドプシンは、対象イベント中継続した照射を行った。

4. 研究成果

(1) 摂食関連行動タスクの検証

6時間累積摂食量の計測

6時間にわたる長時間の摂食量を測定した結果、総摂食量で2gといった安定した摂食量と、その継時的変化をモニターすることが可能になった。また、動物の空腹状態依存的に、累積摂食量も変化すること、累積摂食量の明期・暗期による変化も確認できた。このように確立した行動タスクを用いて、視床下部オレキシン神経選択的な光活性化が、累積摂食量にどのような影響を及ぼすかを検証した。オレキシン神経特異的にチャンネルロドプシンを発現させたマウスで、摂食量を測定したところ、光刺激あり群でなし群に比べて有意な摂食量の増加を観察することができた。

嗜好性の計測

マウスのホームケージに2本のボトル(15mlのチューブに飲み口を付けた物)を提示することで、2本のボトルの中身を選択させる液体嗜好性試験を行った。タスクの時間は、10分と1時間で行った。後に行う光刺激実験のために、できるだけ短時間での行動タスクにできるように考えていたが、10分間では、動物ごとのばらつきが大きく、安定した嗜好性行動が見られないことがわかった。このことから、1時間のタスクに切り替えて、実験を行った。オレキシン神経の神経活動を抑制するために、本実験では、オレキシン神経特異的にアーキロドプシンを発現したマウスを用いた。532nmの緑色の光を1時間の行動タスク中照射したところ、光刺激あり群では、なし群に比べて、摂水量・スクロース水摂取量が減少する傾向が見られた。光刺激実験の確認のために、オレキシン1受容体アンタゴニストであるSB334867を腹腔内投与し、1時間の嗜好性試験を行わせたと、摂水量の減少が観察された。

餌獲得のための動機づけ

Med Associates社製のオペラントチャンバーを用い、ノーズポーク行動を引き金として餌を獲得できるタスクをマウスに学習させた。2日間のhabituation期間の後、FR1、FR3、FR5、とトレーニングを進め、progressive ratio法で餌を獲得するための動機を測定できるようにした。過去の文献で報告されているレベルの動機づけ行動がみられるようになった状態で、オレキシン1受容体アンタゴニストを腹腔内投与することで、動機づけ行動がどのような影響を受けるのかを検討したところ、コントロール群と比べ、ほとんど差が見られないという結果が得られた。今後は、神経活動抑制の時間調節に優れた光刺激法を用いて、更なる影響を観察する必要があると考えられた。

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2件)

楠本 吉田 郁恵、生駒葉子、桑木共之、オプトジェネティクスを用いた自律神経機能を制御する神経回路の研究、自律神経、Vol.52 No.4、December 2015 270-274

Ikue Kusumoto-Yoshida, Haixin Liu, Billy T. Chen, Alfredo Fontanini and Antonello Bonci, Central role for the insular cortex in mediating conditioned responses to anticipatory cues, PNAS, January 27, 2015 1190-1195

[学会発表](計6件)

Yoko Ikoma, Ikue Kusumoto, Akihiro Yamanaka, Youichiro Ootsuka, Tomoyuki Kuwaki, Contribution of serotonergic neurons in the medullary raphe to physiological responses induced by stress, 第93回日本生理学会大会、2016年3月22-24日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

生駒 葉子, 楠本 郁恵, 山中 章弘, 大塚 曜一郎, 桑木 共之, ストレス性頻脈にはセロトニン神経が必要である -光操作による証明-, 第9回桜ヶ丘地区基礎系研究発表会、2016年2月8日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)

Yoko Ikoma, Ikue Kusumoto, Akihiro Yamanaka, Youichiro Ootsuka, Tomoyuki Kuwaki, The role of serotonergic neuron of medullary raphe in cardiac function,

第7回光操作研究会、2015年12月4-5日、
東京医科歯科大学（東京都・文京区）

生駒 葉子、楠本 郁恵、山中 章弘、大塚 曜
一郎、桑木 共之、延髄縫線核セロトニン神
経の心機能調節での役割、第6回鹿児島神経
科学研究会、2015年8月8日、鹿児島大学（鹿
児島県・鹿児島市）

生駒 葉子、楠本 郁恵、桑木 共之、情動
による心機能変化に関するセロトニン神経
のオプトジェネティクスによる検討、第14回
九州脳・高血圧・循環制御研究会、2015年7
月11日、ホテル日航福岡（福岡県・福岡市）

楠本-吉田 郁恵、生駒 葉子、岩元 嘉
志、迫 はるか、大塚 曜一郎、桑木 共之、
オプトジェネティクスを用いた自律神経機
能を制御する神経回路の研究、第67回日本
自律神経学会総会、2014年10月30日、ラフ
レ埼玉（埼玉県・さいたま市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~physiol1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠本 吉田 郁恵 (KUSUMOTO-YOSHIDA, Ikue)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：80724757