

オキシトシンによる摂食リズム創出神経経路の解明

自治医科大学 医学部 生理学講座
前島 裕子

1. はじめに 目的

近年、体内のサーカディアンリズムの障害と肥満の間には深い関係があることが報告されており、特に正常な摂食リズムは正常なエネルギー代謝制御に非常に重要であることが報告されている (Laernabs et al. 2014)。生体のサーカディアンリズムの創出は、視交叉上核 (SCN) が司っていることが古くから知られている。SCNは網膜からの光情報を脳内に反映する非常に重要な神経核であり、室傍核 (PVN)、背内側核 (DMH)、腹内側核 (VMH) など摂食、自律神経系制御に関与する多くの神経核への投射が報告されている。

摂食制御に関して我々はこれまでに PVN に局在するオキシトシン (Oxt) による摂食制御機構を明らかにし、末梢投与 Oxt の抗肥満・抗メタボリックシンドローム効果を明らかにしてきた。これまでの研究により、摂食、エネルギー制御における Oxt の重要性を明らかにしたものの、内因性 Oxt の制御に関してはまだ不明な点が多く、PVN Oxt 系の調節機構のさらなる解明が重要である。

ラットを含むげっ歯類の摂食は暗期に亢進し、明期に抑制される。摂食行動が低調な明期に Oxt 阻害剤を脳室内投与すると摂食量が亢進することから、明期の摂食抑制リズムの創出には Oxt の関与が考えられる。そこで本研究は、光入力—視交叉上核 (SCN) 経路を介して作られる光誘導因子による PVN オキシトシンニューロンの制御が日内 (明期・暗期) 摂食リズムを構築するとの仮説を立て、これを検証することを目的とした。本研究は Oxt による摂食リズム創出メカニズムを解明することで、摂食リズム障害を修復し、新しい肥満治療の一助となると考えられる。

2. 方法

動物: 正常 Wistar Rat および Oxt mRFP ラット (オス: 12時間暗期、明期) を使用し、以下の方法で実験を行った。

光が摂食行動に与える影響: 摂食、飲水、行動量測定装置 (Shin factory) を使用し、24時間1時間ごとの摂食量、飲水量、行動量を測定し、対照データとした。実験群においては、暗期開始2時間後に光 (200 lux、3時間) を照射した。

c-Fos 発現: 光照射により活性化する部位を調べるために、暗期開始2時間後に光を照射し、光照射90分後に灌流固定を行い、免疫組織学的手法により c-Fos 発現部位を調べた。さらに c-Fos 発現が見られたニューロンに関しては二重免疫染色を行った。

神経投射解析: 逆行性トレーサーであるコレラトキシン B (CTB) を、PVN に局所投与し、4日後に灌流固定を行い、SCN の CTB ラベルニューロン数および、バソプレッシンの染色を行った。

機能的解析: PVN より単離した Oxt ニューロンにおいてバソプレッシンの作用を調べるために、細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) のイメージング、および Oxt mRFP ラットを使用しスライスパッチクランプを行った。

摂食における AVP の作用: AVP の PVN における摂食制御の影響を知るために、PVN に AVP を局所投与し、摂食量を測定した。

3. 結果 研究成果

暗期に3時間の光照射を行うと、摂食量、飲水量は最初の1時間のみ、行動量は2時間抑制された。光の照射により活性化する神経核を調べるために、暗期の光照射後90分で灌流固定した動物においてc-Fos発現部位を調べると、PVN、SCN、視索上核(SON)、孤束核(NTS)で増加していた。

PVNのc-Fosタンパク陽性ニューロンにおいてOxtの二重染色を行った結果、c-Fos発現ニューロンの約60%がOxtニューロンであり、対照群と比較して有意に増加していた。一方、SCNには多くのニューロペプチドが分布することが知られているが、予備実験においてAVPが最も低用量で効率よく摂食抑制作用をもつことから、AVPニューロンに着目した。光照射後に発現するc-Fosの約50%がAVPニューロンに発現しており、対照群と比較して有意な増加が見られた。

SCN→AVPの投射を逆行性トレーサーCTBで調べるとPVNに投射するニューロンの70%がAVPニューロンであった。よってSCNにおけるAVPの多くはPVNに投射することが明らかになった。

また、PVNより単離したニューロンにAVP(10^{-9} M)を作用させると35%(42/118)で $[Ca^{2+}]_i$ を増加させた。さらに $[Ca^{2+}]_i$ が増加したニューロンの約50%(16/33)がOxtニューロンであった。さらに電気生理学解析においては、AVPはOxtニューロンにおいて静止膜電位および活動電位を増加させた。69%(9/13)のOxtニューロンがAVPにより活動電位が増加した。

PVNにおけるAVPの摂食への作用を明らかにするために、AVP(60 pmol)をPVNに局所投与すると、0.5-24時間において摂食量の低下がみられた。さらに、光照射による摂食抑制がPVNにおけるAVP作用を介しているかを調べるために、AVP受容体(V1R)阻害剤をPVNに局所投与し、光照射下における摂食量を調べた。光照射により摂食量は低下したが、予めPVNにV1R阻害剤を投与した群においては光照射による摂食量の低下が有意に減弱していた。

4. 考察 まとめ

暗期の光照射により摂食量は光照射開始1時間のみで摂食量が抑制されることが明らかになった。さらに光照射後のc-Fosタンパクの発現から、光による摂食抑制は少なくともPVN、SON、SCN、NTSの4つの神経核が関与していると考えられた。特にPVNにおいてはOxtニューロンが、SCNにおいてはAVPニューロンが深く関与していることが明らかになった。SCNには、AVPを含めVasoactive intestinal peptide (VIP)、Gastrin-releasing peptide (GRP)、Prokineticin-2 (PK2)など、多くの神経ペプチドが存在するが(Cheng et al. 2009, Antle et al. 2009)、本研究ではこれらのペプチドの脳室内投与において、もっとも低用量で、効率よく摂食が抑制されたAVPに注目した。

逆行性トレーサーの結果より、SCN AVPニューロンの70%がPVNに投射していることが明らかになった。SCNにおけるAVPニューロンの役割は未だに明らかになってはいないが、この投射は以前に報告された結果(Novak et al. 2000)と一致している。SCNのAVPはSCNからの光情報をPVNに伝達する役割を担うと考えられ、その機能の一つには今回の結果から摂食情報の伝達が考えられる。

しかし、V1R阻害剤をPVNに局所投与後に光照射しても、光照射による摂食の抑制が減弱したのみで、完全に回復しなかったことは、AVP以外の因子が関連していることを示唆している。最近SCNのVIPニューロンによる弓状核(ARC)の α -MSHニューロン制御がサーカディアンリズムに重要であることが報告されている(Guzman-Ruiz et al. 2014)。このような報告も考え合わせると、光による摂食を含むサーカディアンリズムの制御には多くの神経経路と因子が複雑に関与していると考えられる。

SCN AVPの標的としてPVN Oxtニューロンの関与が、 Ca^{2+} イメージング、パッチクランプの結果より示唆された。Oxtの摂食抑制作用は1991年にはじめて報告されており、その後、詳細なメカニズムが明らかになり

つつある(Maejima et al. 2009, Maejima et al. 2014)。その上流の制御因子として、 α -MSHなどが知られているがそのメカニズムはまだ不明な点が多い。PVNにAVPの受容体が発現していることは報告されており(Rossi et al. 2008)、SCNから投射したAVPがPVN Oxtに作用する可能性は十分考えられる。

以上をまとめると、光照射による摂食抑制メカニズムにおいて、網膜の光情報はSCNのAVPニューロンを活性化させ、投射先のPVN Oxtニューロンを活性化させることで摂食を抑制していると考えられる。このようにして明期に摂食抑制を惹起することで、摂食リズムを創出している可能性が考えられた。

しかし重要なこととして、光による摂食の抑制は長時間持続しないことが明らかになった。よって「光」による摂食抑制作用は「摂食リズムを構築する引き金」と推測できる。光の照射によりSCNを含む多くの神経核において複数の遺伝子の発現が変化する。今回の我々の観察した現象は、それらの遺伝子変化を誘導し、摂食リズムを含むサーカディアンリズムを構築する最初期の反応と解釈できる。しかしこの位置づけにはさらなる研究が必要である。

5. 発表論文、参考文献

<発表論文>

1. Maejima Y, Rita RS, Santoso P, Aoyama M, Hiraoka Y, Nishimori K, Gantulga D, Shimomura K, Yada T. Nasal oxytocin administration reduce food intake without affecting locomotor activity and glycemia with c-Fos induction in limited brain areas. *Neuroendocrinol* 2015 ;101(1)35-44.
2. Maejima Y, Sakuma S, Santoso P, Gantulga D, Katsurada K, Ueta Y, Hiraoka Y, Nishimori K, Tanaka S, Shimomura K, Yada T. Oxytocinergic circuit from paraventricular and supraoptic nuclei to arcuate POMC neurons in hypothalamus. *FEBS Lett.* 2014 ;588(23):4404-12.
3. Sedbazar U, Ayush EA, Maejima Y, Yada T. Neuropeptide Y and α -melanocyte-stimulating hormone reciprocally regulate nesfatin-1 neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroreport.* 2014 ;25:1453-1458

<参考論文>

1. Antle MC, Smith VM, Sterniczuk R, Yamakawa GR, Rakai BD. Physiological responses of the circadian clock to acute light exposure at night. *Rev Endocr Metab Disord* 2009; 10:279-91.
2. Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM, Zhou QY. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 2002; 417: 405-410.
3. Guzmán-Ruiz M, Saderi N, Cazarez-Márquez F, Guerrero-Vargas NN, Basualdo MC, Acosta-Galván G, Buijs RM. The suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus α -MSH neurons in male rats. *Endocrinology.* 2014; 155: 525-35.
4. Laermans J, Broers C, Beckers K, Vancleef L, Steensels S, Thijs T, Tack J, Depoortere I. Shifting the circadian rhythm of feeding in mice induces gastrointestinal, metabolic and immune alterations which are influenced by ghrelin and the core clock gene *bmal1*. *PLoS One.* 2014, 9(10):e110176.
5. Maejima Y, Sakuma S, Santoso P, Gantulga D, Katsurada K, Ueta Y, Hiraoka Y, Nishimori K, Tanaka S, Shimomura K, Yada T. Oxytocinergic circuit from paraventricular and supraoptic nuclei to arcuate POMC neurons in hypothalamus. *FEBS Lett.* 2014 ;588(23):4404-12.
6. Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab.* 2009; 10: 355-65.
7. Novak CM, Harris JA, Smale L, Nunez AA. Suprachiasmatic nucleus injections to the paraventricular thalamic nucleus in nocturnal rats (*Rattus norvegicus*) and diurnal nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*). *Brain Res* 2000; 874:147-157.
8. Rossi NF, Maliszewska-Scislo M. Role of paraventricular nucleus vasopressin V1A receptors in the response to endothelin 1 activation of the subfornical organ in the rat. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59 Suppl 8: 47-59.