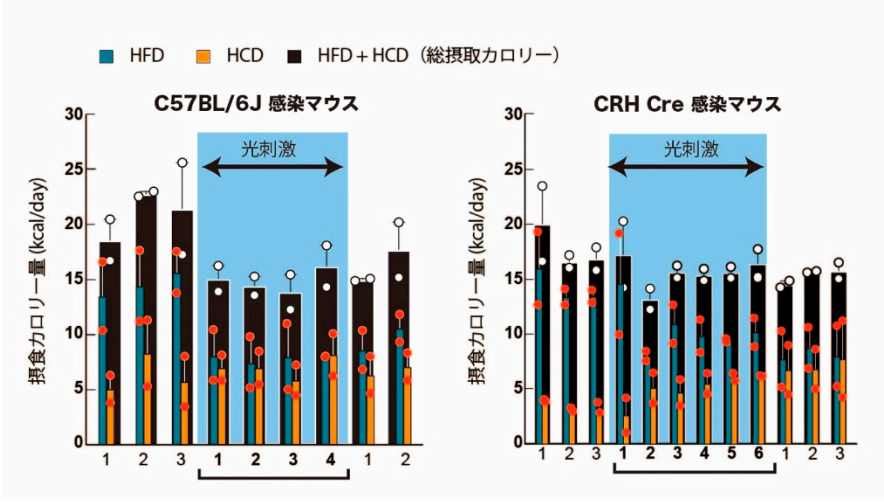
17　動物性脂肪の過剰を制御する『足るを知る脳』の再構築	益崎　裕章

【目的】世界人口の約 3 分の 1 が肥満もしくは過体重である現代において、肥満症として包含される一連の代謝性疾患、脳・心血管病、がんの治療に多大な医療コストが費やされている。多くの肥満者が動物性脂肪に対して強い嗜好性を示して必要量以上のカロリーを摂取し、様々な抗肥満治療を施しても改善されず、リバウンドを繰り返すケースが少なくない。本研究では、マウスの恐怖や不安制御に関わる分界条床核（BNST）に存在するストレス応答ホルモンであるコルチコトロピン放出ホルモン（CRH）産生ニューロン（BNST-CRH ニューロン）に着目し、マウスが動物性脂肪を摂取する度に光遺伝学的手法により時間的な遅延を伴うことなく BNST-CRH ニューロンを選択的に活性化することによって脂肪嗜好性と総摂食量を同時に抑制出来る可能性を検証した。

【方法】1．動物性脂肪摂取直後に BNST-CRH ニューロンを無侵襲に刺激するため、対照マウスである C57BL/6J マウスと CRH Cre ノックインマウスの BNST にチャネルロドプシン（ChR2）をコードするアデノ随伴ウィルス（AAV）を接種し、光刺激により無侵襲で随意に BNST-CRH ニューロンのみを活性化できるモデルマウスを作製した。2. 作製したモデルマウスを食嗜好性測定ケージで飼育し、ラード主体の高動物性脂肪餌（HFD）および蔗糖主体の高炭水化物餌（HCD）それぞれの摂食量を測定した。HFD 側に赤外線ゲートを設置し、HFD 摂食時に連動して光刺激を与え、BNST-CRH ニューロンを活性化させた。さらに、各餌へのアクセス回数、摂食時間、摂食量、嗜好性を計測した。3. HFD の摂食抑制効果を確認した後、赤外線ゲートを外し、自由摂食下における HFD 摂食量低下を確認し、脂肪嫌悪記憶の定着を検証した。

【結果】C57BL/6J マウス BNST ニューロンに AAV ベクターを用いて ChR2 を発現させ、脂肪摂取直後に BNST ニューロンを光刺激すると、予想通り、脂肪摂取量が減少し炭水化物嗜好性が増加した。総摂取カロリー量は 20%、減少し（下図左）、行動量は約 50%、減少した。また光刺激終了後においても、脂肪摂取抑制効果は 2 日間以上持続した。そこで、CRH Cre マウスの BNST ニューロンに flox-ChR2-YFP をコードする AAV ベクターを感染させ、BNST-CRH ニューロン特異的に光刺激を施した。BNST-CRH ニューロンに限定して刺激すると、CRH Cre マウスでは光刺激による嗜好性変化は観察されたが、C57BL/6J マウスと異なり総摂取カロリー量の減少は観察されなかった（下図右）。以上の結果から、総摂取カロリー量の制御には BNST からの CRH ニューロン以外の神経連絡経路の関与が示唆された。

光刺激による食嗜好性と総接種カロリー量の変化



17. 動物性脂肪の過剰を制御する『足るを知る脳』の再構築

益崎　裕章

琉球大学 大学院医学研究科 内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座（第二内科）

Key words：動物性脂肪，食嗜好性，総摂取カロリー量，CRH，肥満

緒　言

世界人口の約３分の１が肥満もしくは過体重である現代において、肥満症として包含される一連の代謝性疾患、脳・心血管病、がんの治療に多大な医療コストが費やされている。多くの肥満者が動物性脂肪に対して強い嗜好性を示して必要量以上のカロリーを摂取し、様々な抗肥満治療を施しても改善されず、リバウンドを繰り返すケースが少なくない。過度な脂肪の摂取を抑制できれば肥満症の改善につながると考えられるが、脂肪の食べ過ぎを抑制する脳内ニューロンネットワークの詳細は解明されていない。マウスの恐怖や不安制御に関わる分界条床核（BNST）に存在するストレス応答ホルモンであるコルチコトロピン放出ホルモン（CRH）産生ニューロン（BNST-CRH ニューロン）は①炭水化物嗜好性制御中枢を含む視床下部の室傍核（PVH）、②総摂食量の制御中枢を含む中脳縫線核（DRN）、③嫌悪条件付け記憶を司る扁桃体（Amy）の３つの神経核に直接、投射しており［1，2］、食行動制御において決定的役割を担っている可能性が注目されている。脳科学・分子栄養学の最新知見を踏まえ、病的肥満を根本的に改善・予防するためには炭水化物嗜好性中枢と総摂取カロリー制御中枢を同時に制御することが必須であるという作業仮説を立て、本研究では両中枢に投射する BNST ニューロンをマウスが動物性脂肪を摂取する度に光遺伝学的手法により時間的な遅延を伴うことなく選択的に活性化することにより、動物性脂肪の過剰摂取を抑制し、総摂取カロリー量も同時に抑制した結果、肥満を防御する新規の治療システムの構築の可能性を検証した。

方　法

高動物性脂肪餌（HFD）摂食時には炭水化物食嗜好性制御中枢と摂食量制御中枢が同時に活性化され、HFD 摂食量と総摂食量が減少する可能性を検証した。さらに HFD に対する嫌悪条件付け記憶が形成され、持続的に HFD 摂食量が低下することにより肥満が抜本的に改善する可能性を検証した。

1. BNST ニューロン活性化 CRH Cre マウスの作製

YFP 融合型チャネルロドプシン（ChR2）をコードするアデノ随伴ウィルスを CRH Cre ノックインマウスの左側 BNST に接種し、CRH ニューロン特異的に ChR2 を発現させ、光刺激により無侵襲で随意に BNST-CRH ニューロンのみを活性化できるモデルマウスを作製した。

2. BNST ニューロン活性化 CRH Cre マウスの食行動解析

作製したモデルマウスを食嗜好性測定ケージで飼育し、ラード主体の HFD および蔗糖主体の高炭水化物餌（HCD）のそれぞれの摂食量を測定した。HFD 側に赤外線ゲートを設置し、HFD 摂食時に連動して光刺激を与え、BNST-CRH ニューロンを活性化させる。その後、各餌へのアクセス回数、摂食時間、摂食量、嗜好性を計測した。

3. 光刺激終了後の BNST ニューロン活性化 CRH Cre マウスの食行動解析

HFD の摂食抑制効果を確認した後、赤外線ゲートを外し、自由摂食下における HFD 摂食量低下を確認し、脂肪嫌悪記憶の定着を検証した。

4. BNST ニューロン活性化 CRH Cre マウスにおける新規ニューロンネットワーク形成の検証

持続的な HFD の摂食抑制効果が観察された場合には、新規ニューロンネットワーク形成の有無を検証するため、

BNST-CRH ニューロンの投射先である PVH、DRN、Amy において YFP と交差反応する抗 EGPF 抗体を用いて ChR2-YFP タンパク質を発現する投射ニューロンを限定した。さらに神経活性化マーカー（Arc）、幼若神経マーカー（Dcx）、グルタミン酸ニューロンマーカー（vGLUT3）、シナプトフィジンに対する二重免疫染色法を用いた共発現解析および樹状突起の形状観察を行い、神経可塑性の可能性を検証した。

結　果

1.　BNST ニューロン活性化 C57BL/6J マウスの食嗜好性変化と行動変容

BNST に食嗜好性と総摂取カロリー量を同時に制御できる細胞集団が存在することを検証するため、C57BL/6J 系統マウスの BNST ニューロンに YFP を融合した ChR2 を強制発現させる AAV ベクターを局所感染させ、さらに光ファイバープローブを BNST に留置した（C57BL/6J 感染マウス、n=2）。このマウスでは BNST 内のすべてのニューロンを活性化できる。術後 2 週間の回復期間後、食嗜好性測定ケージを用いて HFD と HCD 摂餌量を継続的に測定すると、光刺激前では明らかに脂肪嗜好性を示した（図 1a）。その後、HFD 摂取時に瞬時に光刺激処置を施した結果、HFD 摂取量が約 50%減少した。その後、光刺激を 4 日間継続しても、嗜好性は変化せず HFD 摂取量は 10 kcal/day 以下で推移した。総摂取カロリー量は約 20%減少した。光刺激期間中は HCD へのアクセス回数が上昇し、刺激後も高い傾向が持続した（図 1b）。飲水量は刺激前から最後まで有意な変化がなかった（図 1c）。運動量は光刺激期間において 50%程度減少していた（図 1d）が、刺激後は回復する傾向が観察された。

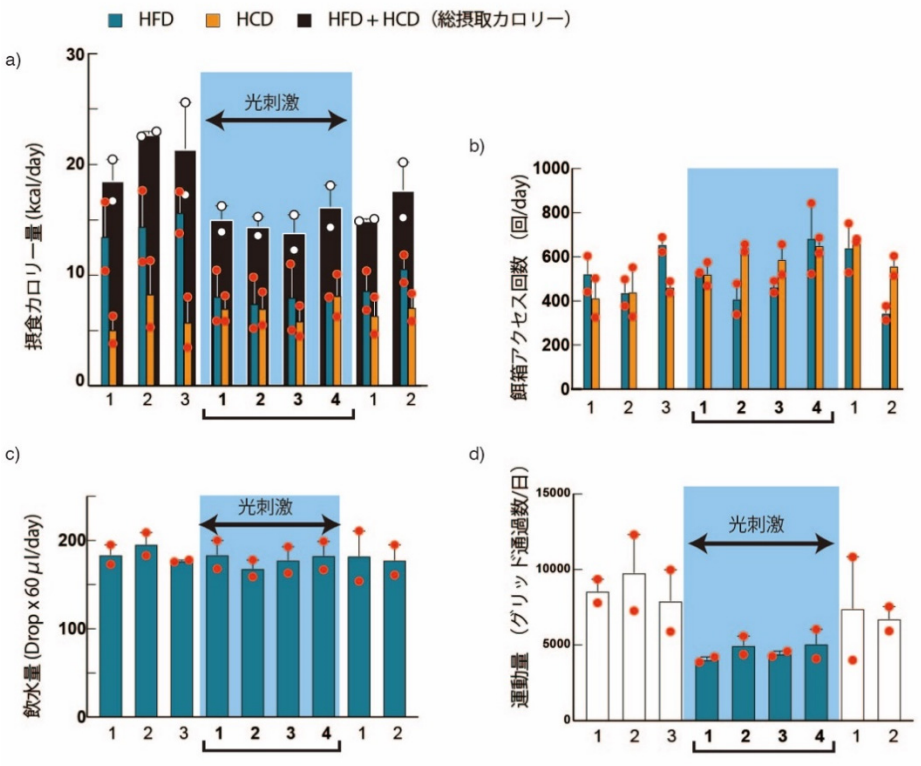


図 1.　C57BL/6J マウス BNST 光刺激後の食嗜好性変化と行動変容

a)　高動物性脂肪餌（HFD）、高炭水化物餌（HCD）の 1 日摂取カロリー量および総摂取カロリー量を示す。赤丸は各マウスの摂餌量を示し、白丸は総摂取カロリー量の実測値を示す。

b～d)　各餌箱へのアクセス回数（b）、飲水量（c）、運動量（d）を示す。赤丸は各マウスの実測値を示す。

2. BNST ニューロン活性化 CRH Cre マウスの食嗜好性変化と行動変容

BNST に存在する CRH ニューロンが食嗜好性と総摂取カロリー量を同時に減少させる可能性を検証するため、CRH Cre マウス BNST ニューロンに loxP-ChR2-YFP をコードする AAV ベクターを局所感染させ、さらに光ファイバープローブを BNST に留置した（CRH Cre 感染マウス、n=2）。このマウスでは BNST 内の CRH ニューロンを限定して活性化できる。術後 2 週間の回復期間後、食嗜好性測定ケージを用いて HFD と HCD 摂餌量を継続的に測定すると、光刺激前では HFD を多く摂食する脂肪嗜好性を示した（図 2a）。HFD 摂取時に瞬時に光刺激処置を施した結果、刺激開始 2 日目以降は HFD 摂取量が約 30%減少し HCD 摂取量は 20%程度増加した。その後、光刺激を 5 日間継続しても、嗜好性は変化せず HFD 摂取量はおよそ 10 kcal/day のまま推移し、光刺激終了後も HFD 摂取量の抑制は継続した。一方、総摂取カロリー量は光刺激前後で変化せず、光刺激による総摂取カロリー量の抑制は観察されなかった。光刺激開始日には HFD へのアクセスが 2 倍以上に増加したマウスが観察されたが、刺激 3 日目以降には均等に各餌にアクセスした（図 2b）。飲水量は刺激前から最後まで変化しなかった（図 2c）。運動量は光刺激期間において変化しなかった（図 2d）。

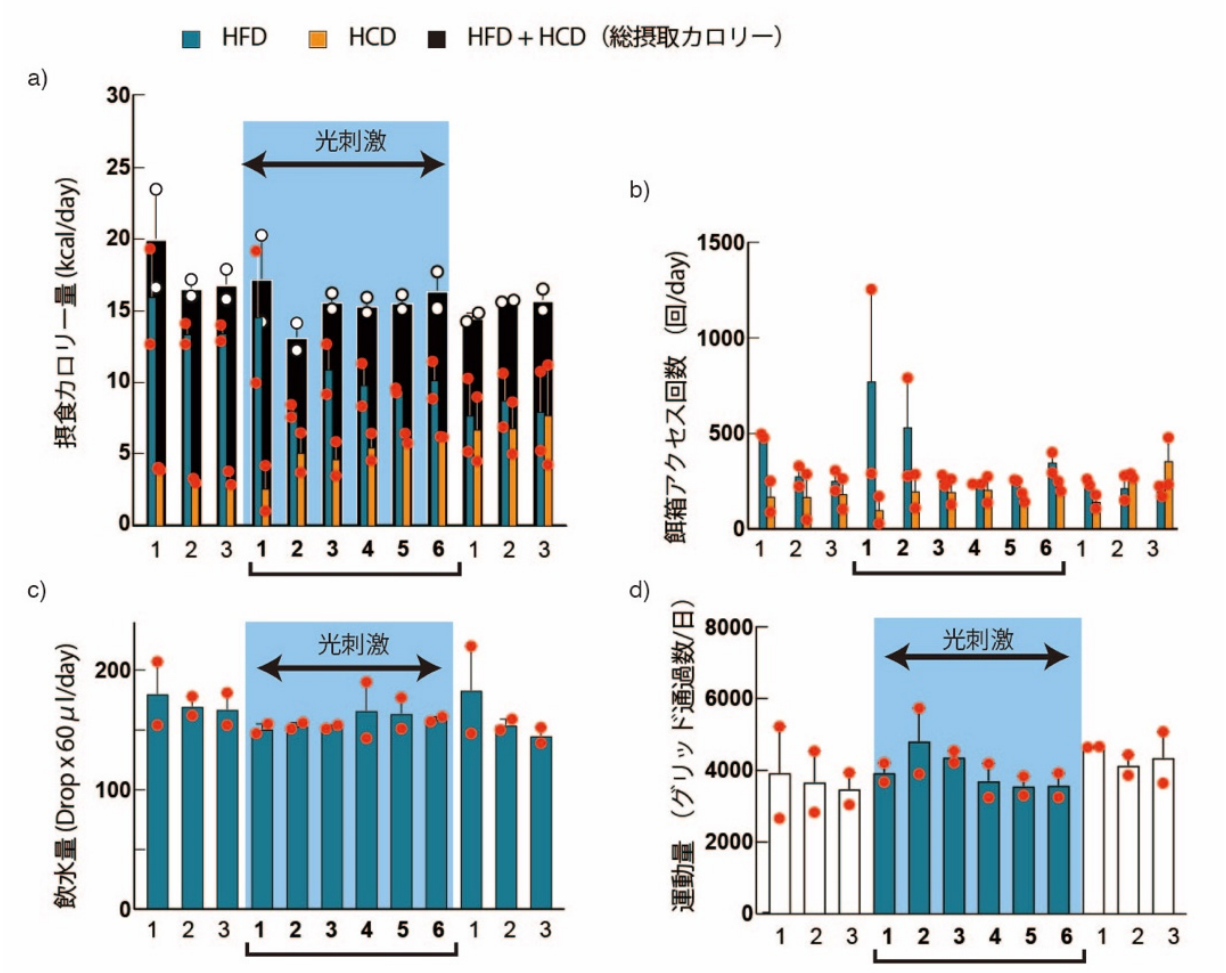


図 2. CRH Cre マウス BNST 光刺激後の食嗜好性変化と行動変容

a) 動物性脂肪餌（HFD）、高炭水化物餌（HCD）の 1 日摂取カロリー量および総摂取カロリー量を示す。
赤丸は各マウスの摂餌量を示し、白丸は総摂取カロリー量の実測値を示す。

b～d) 各餌箱へのアクセス回数（b）、飲水量（c）、運動量（d）を示す。赤丸は各マウスの実測値を示す。

3. CRH Cre マウスにおける BNST - CRH ニューロンの投射部位の観察

loxP -ChR2-YFP をコードする AAV ベクターを CRH Cre マウスの左側 BNST に片側性に局所感染させた後、投射先と考えられる。視床下部室傍核（PVH）、中脳縫線核（DRN）、扁桃体中心核（cAmy)における YFP 融合型 ChR2 発現を免疫組織染色法により検出した。AAV 接種部位である BNST では多数の YFP 陽性神経細胞が観察された（図 3a)。炭水化物嗜好性制御中枢を含む PVH では、接種側である左側にのみ多数の YFP 陽性繊維が確認された（図 3b)。嫌悪条件付け記憶を司る左側 cAmy においても多数の YFP 陽性繊維の投射が確認された（図 3b)。また総摂食量制御中枢を含む DRN においても、片側性に多数の YFP 陽性繊維の投射が確認された（図 3c)。

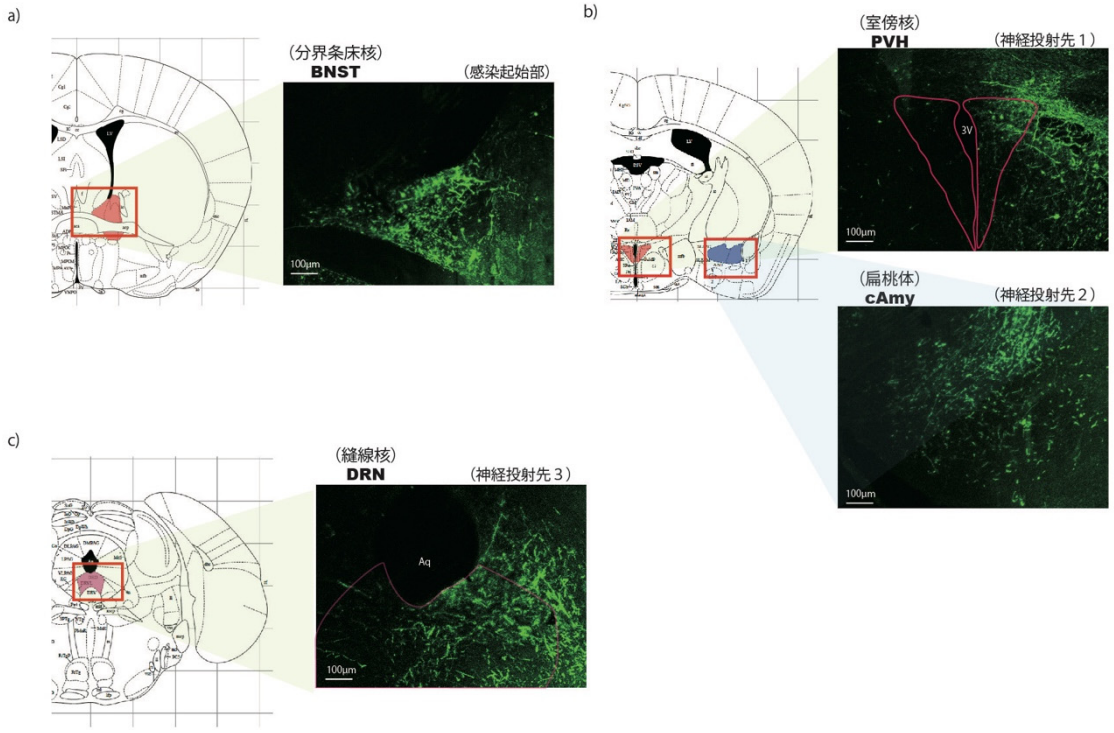


図 3. CRH Cre マウスにおける BNST-CRH ニューロンの投射部位の観察

a) loxP -ChR2-YFP をコードする AAV ベクターの接種部位である BNST における YFP 発現細胞の検出を示す。

b) 視床下部室傍核（PVH)、扁桃体中心核（cAmy）における YFP 発現細胞の検出を示す。

c) 中脳縫線核(DRN) における YFP 発現細胞の検出を示す。接種側である左側片側性に YFP 陽性神経繊維が検出され、反対側に YFP 陽性神経繊維は検出されなかった。スケールバーは 100μm を示す。

考　察

動物性脂肪摂取量を抑制する食嗜好性変化と総摂取カロリー量の抑制を同時に誘導し、肥満の解消を目指す革新的な試みを検証した。元来、動物性脂肪嗜好性が高い C57BL/6J マウスの BNST に ChR2 を発現させた対照マウスでは光刺激により速やかに HFD 摂取量が減少し、総摂取カロリー量も抑制され（図 1a)、HFD 摂取時に限定した BNST 刺激による脂肪食の過食を抑制することに成功した。これに対して CRH Cre マウスの BNST に ChR2 を発現させたマウスでは光刺激によって HFD 摂取量は減少したが総摂取カロリー量には変化が見られなかった（図 2a)。CRH Cre 感染マウスでは HFD 摂取量の抑制と同時に HCD 摂取量の増加が観察され、炭水化物嗜好性が惹起されたために総摂取カロリー量の減少が観察されなかった可能性がある。また DRN にも BNST-CRH ニューロンの投射が多数観察され

ているにもかかわらず(図 3c)、C57BL/6J 感染マウスと異なり総摂取カロリー量の抑制が観察されなかったことから、BNST から DRN に投射する CRH ニューロンは総摂取カロリー量の調節には関与しない可能性が高い。現在、CRH Cre 感染マウスを用いた追加試験に加え、GABA やグルタミン酸陽性ニューロンなど CRH 陽性ニューロン以外の投射ニューロンが関与する可能性を考慮し、他の Cre マウスを用いた検証実験を準備中である。

本研究で用いた 2 系統の感染マウスモデルでは数日間の光刺激により光刺激終了後も HFD 摂取量の持続的な抑制が観察された。壮年期マウスの 1 週間はヒトでは約 1 年に相当する［3］ことを考慮すると、数日間 HFD 摂取時にのみ BNST に光刺激を与えた条件において、既に嫌悪条件付け記憶が形成されている可能性が高い。今後、嗜好性中枢が存在する PVH と嫌悪記憶を担う cAmy におけるシナプス形成の亢進について検証を進める予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座の岡本士毅博士、照屋太輝医師をはじめとする研究・臨床スタッフ、リサーチ・コーディネーターとして実験の推進に協力戴いた池松智子氏、野村育美氏、堀口千枝氏、秘書の野口千佳子氏、平田真美子氏、上間次己氏、稲嶺友香里氏に心より感謝申し上げます。

文　献

1) Forster, G. L., Anderson, E. M., Scholl, J. L., Lukkes, J. L. & Watt, M. J. Negative consequences of early-life adversity on substance use as mediated by corticotropin-releasing factor modulation of serotonin activity. Neurobiol Stress 9, 29-39, doi:10.1016/j.ynstr.2018.08.001 (2018).

2) Kondoh K, Lu Z, Ye X, Olson DP, Lowell BB, Buck LB. A specific area of olfactory cortex involved in stress hormone responses to predator odours. Nature 532, 103-106, doi:10.1038/nature17156 (2016).

3) Dutta, S. & Sengupta, P. Men and mice: Relating their ages. Life Sci 152, 244-248, doi:10.1016/j.lfs.2015.10.025 (2016).