

吸啜期ラットの摂食調節中枢における ニューロペプチドYの発現変化

学位論文内容の要旨

哺乳類の摂食行動は、幼若期の哺乳・吸啜運動から成熟型の捕食・咀嚼運動へとダイナミックに変化する。摂食機能の発達には、末梢の咀嚼器官の成熟に先がけて中枢神経系の発達が不可欠であり、特に胎生期および生後の一定期間に摂食機能に関連する神経回路が正しく形成されることが、正常な摂食・咀嚼機能の獲得に極めて重要であることが明らかにされている。摂食行動の開始には、主として視床下部に存在する摂食調節中枢の活動が大きく関与している。摂食調節中枢は、飢餓状態あるいは満腹状態を感知し、摂食行動を調節する上で不可欠である。成熟ラットにおいては、インシュリン、ブドウ糖、レプチン、グレリンなどの物質が血液を介して脳に達し、摂食調節中枢に対するシグナルとして主要な働きをしていることが明らかになっている。視床下部にはこれらのリガンドに対する受容体が豊富に存在する部位がいくつかあり、なかでも弓状核はこれらの受容体が多く存在し、また液性シグナルが血液脳関門を通過しやすい部位であることが知られている。

成熟動物の視床下部においてニューロペプチドY (NPY) は摂食亢進ペプチドとして作用し、弓状核は視床下部での主要な NPY 合成部位であることが知られている。NPY は 36 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで、中枢神経系に広く分布しており、特に視床下部や脳幹では豊富に存在する。成熟ラットの弓状核の NPY mRNA は絶食により増加し、摂食亢進に作用し、再摂食により平常レベルに戻る。しかしながら、吸啜期における脳内の NPY 発現と摂食行動の関連や調節メカニズムについては不明な点が多い。今回、吸啜期ラットの視床下部および脳幹における NPY mRNA 発現を、自由摂食群、絶食群および絶食後摂食群に分け、*in situ* ハイブリダイゼーション法により検討した。さらに、吸啜期ラットの視床下部および脳幹での NPY 陽性細胞の局在や軸索投射に関して、コルヒチン処理も含めて組織学的に検索した。

生後 2, 7, 10 日 (P2, 7, 10) の新生 Sprague-Dawley ラットを自由摂食群、絶食群および絶食後摂食群の 3 群に分類した。弓状核、孤束核および延髄腹外側部に位

置する A1 領域における、給餌条件の違いによる NPY mRNA の発現変化を定量的に測定し、その影響について検討した。自由摂食群は常に母ラットとともに飼育し、絶食群は母ラットから分離し絶食としたのち脳を摘出し、絶食後摂食群は絶食後、再び哺乳させたのち脳を摘出した。

また、延髄においてカテコールアミンを合成し、室傍核に投射している神経細胞群が摂食調節に関与していることが以前より知られているが、これらの細胞に NPY が共存していることが成熟ラットの研究で明らかにされている。そこで、ドーパミンからノルアドレナリンが合成される際に必須であるドーパミン β 水酸化酵素 (DBH) および NPY について、免疫組織化学的手法を用い、吸啜期ラットの視床下部ならびに脳幹での局在を明らかにすることにより、ノルアドレナリン作動性ニューロンと NPY 産生ニューロンの分布ならびに投射部位におけるこれらの神経伝達物質の共存について検討した。

絶食群の弓状核での NPY mRNA 発現量は、P2, 7, 10 のいずれの日齢においても自由摂食群より多かった。また、絶食後摂食群では、自由摂食群と絶食群の中間の発現レベルを示した。オートラジオグラフをイメージアナライザ (MCID) で解析した結果、いずれの日齢についても、自由摂食群と比較して絶食群の弓状核 NPY mRNA 発現は有意に増加していた (P2 ; $p < 0.05$, P7, 10 ; $p < 0.01$)。

孤束核の NPY mRNA 発現量は P2 では自由摂食群に比べ、絶食群で有意に増加していた ($p < 0.01$)。また、絶食後摂食群では自由摂食群と絶食群の中間的な値を示した。一方、P7 および 10 では、自由摂食群に比べ絶食群で NPY mRNA 発現量が増加する傾向が認められたが、有意差はなかった。しかし、P7 では絶食後摂食群の NPY mRNA 発現量は自由摂食群よりも少なく、絶食群との間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

A1 領域では、P2 では絶食後摂食群に比べ絶食群の NPY mRNA 発現量が有意に低かった ($p < 0.05$) が、自由摂食群との比較では差は認められなかった。また、P7 および P10 においても、各群間で NPY mRNA 発現量に差は認められなかった。

コルヒチンを脳内に投与すると軸索輸送が阻害されるため、神経細胞で産生されたペプチドホルモンの多くはその細胞体に留まる。NPY は細胞体で合成されたのち速やかに神経終末に運ばれることが知られていることから、本研究ではコルヒチン投与群を非投与群と比較した。P2 のコルヒチン非投与群の免疫蛍光染色では、弓状核では NPY に濃染する神経線維および終末が腹内側部を中心に多数存在していたが、確認できた細胞体はわずかであった。また、弓状核において DBH 陽性細胞体は存在せず、神経終末が散在性に認められた。NPY と DBH の共存は、弓状核腹内側部に散在性に認められただけであった。孤束核において確認できた NPY 陽性細胞体は極めて少数であった。孤束核の間質亜核に少数の NPY 陽性細胞と散在性の NPY 陽性終末

が認められたのに対し、孤束核の腹側に位置する迷走神経背側運動核には比較的多くの NPY 陽性神経終末が存在していた。多数の DBH 陽性細胞体が存在していた A2 領域では、二重染色による解析において NPY との共存は確認できなかった。一方、A1 領域には、多数の NPY および DBH 陽性細胞体が存在し、両者の共存が認められたことから、この領域の NPY 陽性細胞の多くはノルアドレナリン作動性ニューロンであることが示された。

コルヒチン投与群では、NPY 産生細胞体での免疫陽性シグナルは非投与群に比べ明らかに増強されていた。P2 のコルヒチン投与群では、非投与群と比較して、弓状核で多数の NPY 陽性細胞体が確認された。この結果より、P2 においてすでに弓状核で産生された NPY の多くが軸索輸送により神経終末へ運ばれていることが裏付けられた。弓状核ではコルヒチン投与群、非投与群ともに DBH 陽性細胞体は確認できず、神経線維および終末が少数認められた。NPY との重ね合わせでは、少数の終末にシグナルの共存が認められた。コルヒチン投与群では、孤束核の間質亜核に加えて A2 領域の外側部に NPY 陽性細胞がみられ、DBH との共存が認められた。従って、孤束核の A2 領域の外側部に細胞体のある NPY ニューロンの一部はノルアドレナリンを産生すること、ならびに孤束核で作られた NPY の大半は速やかに神経終末に運ばれていることが示された。コルヒチン非投与群と同様、孤束核では NPY 陽性細胞体のみならず NPY 陽性神経終末が多数存在した。

以上の結果より、吸啜期でも絶食により弓状核の NPY mRNA の発現が増加し、摂食後に減少すること、また孤束核では P2 の絶食時に NPY mRNA 発現が増加することが示された。NPY を介する摂食調節に、P2 では弓状核および孤束核の両者が関与し、P7 以降では弓状核がより主要な働きをしている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	小口	春久
副査	教授	赤池	忠
副査	教授	吉田	重光
副査	助教授	白川	哲夫

学位論文題名

吸啜期ラットの摂食調節中枢における ニューロペプチドYの発現変化

審査は赤池、吉田、白川および小口審査委員それぞれ個別に実施し、学位申請者に対して提出論文の内容とそれに関連する学科目について口頭試問の形式によって行われた。以下に、提出論文の要旨と審査の内容を述べる。

学位申請者は、生後2、7、10日（P2、7、10）の新生 Sprague Dawley ラットを実験動物として使用し、摂食調節中枢におけるニューロペプチドY（NPY）mRNA発現を、自由摂食群、絶食群および絶食後摂食群の3群に分けて調べた。脳組織を固定後、視床下部弓状核、脳幹孤束核およびA1領域を含む冠状断切片を作製し、NPY mRNA に対する *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、得られたオートラジオグラフをイメージアナライザにて解析し、定量化した。また、ドーパミンβ水酸化酵素（DBH）とNPYに対して二重染色後、蛍光顕微鏡で観察し、視床下部および脳幹でのノルアドレナリン作動性ニューロンとNPY産生ニューロンの分布ならびに投射部位におけるこれらの神経伝達物質の共存について、軸索輸送阻害のためのコルヒチン処理も含めて組織学的に検索した。

以上の方法によって得られた結果は次のとおりである。弓状核におけるNPY mRNA 発現量は、P2、7、10ともに、自由摂食群と比較して絶食群が有意に高かった。また、絶食後摂食群では、自由摂食群と絶食群の中間の発現レベルを示した。孤束核のNPY mRNA 発現量は、P2では自由摂食群に比べ絶食群で有意に増加し、絶食後摂食群では自由摂食群と絶食群の中間の値を示した。一方、P7、10では、自由摂食群に比べ絶食群でNPY mRNA 発現量が増加する傾向が認められたが、有意差はなかった。A1領域では、P2では、絶食後摂食群に比べ絶食群でNPY mRNA 発現量が有意に低かったが、自由摂食群との比較では差は認められなかった。また、P7、

10 では、各群間で NPY mRNA 発現量に差は認められなかった。

P2 のコルヒチン非投与群の免疫蛍光染色では、弓状核では NPY に濃染する神経線維および終末が腹内側部を中心に多数存在していたが、確認できた細胞体はわずかであった。また、DBH 陽性細胞体は存在しなかった。NPY と DBH の共存は、腹内側部に散在性に認められた。孤束核では、確認できた NPY 陽性細胞体は極めて少数であった。孤束核の間質亜核に少数の NPY 陽性細胞と散在性の NPY 陽性神経終末が認められたのに対し、腹側に位置する迷走神経背側運動核には多くの NPY 陽性神経終末が存在していた。多数の DBH 陽性細胞体が存在していた A2 領域では、NPY との共存は確認できなかった。一方、A1 領域には、多数の NPY および DBH 陽性細胞体が存在していたため、この領域の NPY 陽性細胞の多くはノルアドレナリン作動性ニューロンであることが示された。P2 のコルヒチン投与群では、非投与群と比較し、弓状核で多数の NPY 陽性細胞体を確認された。この結果より、P2 においてすでに弓状核で産生された NPY の多くが軸索輸送により神経終末へ運ばれていることが裏付けられた。弓状核ではコルヒチン投与群でも、DBH 陽性細胞体は確認できず、神経線維および終末が少数認められた。一方、孤束核のコルヒチン投与群では、間質亜核に加えて A2 領域の外側部に NPY 陽性細胞がみられ、DBH との共存が認められたため、この部位に細胞体のある NPY ニューロンの一部はノルアドレナリンを産生すること、ならびに孤束核で作られた NPY は速やかに神経終末に運ばれていることが示された。以上の結果より、吸啜期でも絶食により弓状核の NPY mRNA の発現が増加し、摂食後に減少すること、また孤束核では P2 の絶食時に NPY mRNA 発現が増加することが明らかにされた。本研究により、NPY を介する摂食調節に P2 では弓状核および孤束核の両者が関与し、P7 以降では弓状核がより主要な働きをしている可能性が示された。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われた。主な質問事項を列挙すると、1) 孤束核における NPY mRNA の変化が P2 のみでみられるのは何に起因しているか、2) 免疫染色の結果は P7、10 ではどうであったか、3) コルヒチン投与に対する為害性の有無、4) 出生早期の神経回路の形成について、5) 視床下部および脳幹 NPY は出生早期に摂食調節に関与しているかどうか、である。それらの質問に対しいずれも適切な回答が得られた。また、本研究は生後発達期のラットの摂食調節における NPY の関与を、視床下部に加えて脳幹の摂食調節中枢で初めて明瞭にした点が評価された。さらに、学位申請者は、NPY mRNA 発現に直接関与していると考えられるレプチンおよびインシュリンについて、それらのシグナル伝達系に関する詳細な解析を進めており、将来の展望についても高い評価を与え得ると判断された。

したがって、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。