

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 30 年度博士課程進学

佐藤 真梨萌

指導教員：松田 二子

論文題目 上皮細胞に着目した後脳グルコースセンシング機構に関する研究

生物が生命を存続していくには、エネルギー恒常性を維持する必要がある。エネルギー恒常性が正常に維持されなければ、肥満や摂食障害、エネルギー状態を原因とする生殖機能障害が生じる。こうしたエネルギー恒常性に関連した問題は、健康面だけでなく、食料の安定供給においても脅威となっている。したがって、エネルギー恒常性を維持する機構が解明できれば、学問的意義だけでなく、様々な角度から人々の生活の質を向上させる端緒となると言える。エネルギー恒常性を維持する機構の 1 つとして、グルコース利用率をモニターするグルコースセンシング機構が挙げられる。グルコースセンシング機構は、末梢組織や中枢神経に幅広く存在し、小脳や脳幹を含む後脳もグルコースセンシング機構を有することが知られている。後脳のグルコースセンシング機構は、後脳でグルコース利用率が低下すると、エネルギー状態を保つように血中グルコース濃度、摂食ならびに性腺刺激ホルモン分泌を調節することが明らかとなっている。

る。しかし、グルコース利用率の低下を感知するセンサー細胞や生理機能を制御するエフェクター細胞、神経伝達経路などはいまだ不明な点が多い。脳室を裏打ちするグリア細胞である上衣細胞は、第4脳室(4V)といった後脳脳室にも分布しており、*in vitro* 実験や形態学的解析から、後脳の上衣細胞はグルコース利用率の低下を感知する可能性が示唆されている。したがって、本研究では後脳の上衣細胞に着目し、後脳グルコースセンシング機構の解明を試みた。

第2章において、上衣細胞が後脳グルコースセンシング機構に関与していることを証明するため、ラットの4Vにグルコース代謝阻害剤である2-デオキシ-D-グルコース(2DG)を投与し、後脳特異的にグルコース利用率を低下させた場合の、上衣細胞における活性を組織学的に解析した。4Vへ2DG(体重1kgあたり24mg)を1時間投与すると、血中グルコース濃度の上昇、摂食量の増加ならびに血中テストステロン濃度の低下が確認され、4V上衣細胞でも細胞活性化マーカーであるc-Fosが発現した。他にも、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞やニューロペプチドY(NPY)神経細胞、視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)神経細胞、弓状核のNPY神経細胞においてc-Fos発現が確認できた。一方、4Vへ2DG(体重1kgあたり12mg)を0.5時間投与すると、血中グルコースおよびテストステロン濃度、c-Fosの発現に変化は見られなかったが、4V上衣細胞のみで*c-fos* mRNAが発現していた。以上から、4V上衣細胞が後脳グルコースセンシング機構にセンサー細胞として関与していることが明らかとなった。さらに、視床下部のCRH神経細胞やNPY神経細胞、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞やNPY神経細胞も後脳による糖新生、生殖機能ならびに摂食の制御に関与していることを示すことができた。

第3章では、第2章において後脳グルコースセンシング機構に関与していることが示

唆された 4V 上衣細胞や脳幹および視床下部神経細胞の間に神経伝達経路が存在するかを検証した。越シナプス性トレーサーであるコムギ胚芽凝集素 (WGA) を視床下部神経細胞で発現する遺伝子組換えマウス (*Kiss1*-Cre-IRES-GFP/*CAG*-STOP floxed-WGA-2A-GFP マウス) もしくは 4V 上衣細胞で発現する遺伝子組換えマウス (*Vim*-Cre-ERT2/*CAG*-STOP floxed-WGA-2A-GFP マウス) を用いて、WGA の脳内局在を組織学的に解析した。*Kiss1*-Cre-IRES-GFP/*CAG*-STOP floxed-WGA-2A-GFP マウスでは、弓状核キスペプチン神経細胞の $41.7 \pm 15.0\%$ 、弓状核 NPY 神経細胞の $29.8 \pm 5.4\%$ 、視床下部室傍核の CRH 神経細胞の $40.3 \pm 2.7\%$ 、4V 上衣細胞の $16.0 \pm 1.2\%$ および脳幹の NPY 神経細胞の約 60% で WGA の免疫陽性反応がみられた。*Vim*-Cre-ERT2/*CAG*-STOP floxed-WGA-2A-GFP マウスでは、4V および脊髄中心管 (CC) の上衣細胞と脳幹の細胞で WGA の免疫陽性反応が観察できた。また、*Kiss1*-Cre-IRES-GFP/*CAG*-STOP floxed-WGA-2A-GFP マウスの新生子 (3 日齢および 14 日齢) では、WGA の免疫陽性反応は弓状核のみで観察された一方、23 日齢の個体では、弓状核にくわえ視床下部室傍核や脳幹、第 4 脳室上衣細胞層においても WGA の免疫陽性細胞が観察された。したがって、4V 上衣細胞と脳幹の NPY 神経細胞および視床下部の CRH 神経細胞、NPY 神経細胞およびキスペプチン神経細胞との間に神経伝達経路が存在することが証明できた。さらに、4V 上衣細胞は最初に脳幹の細胞へとシグナルを伝達することが明らかとなったほか、この後脳と視床下部を連絡する神経伝達経路は生後 2~3 週で発達する可能性が示唆された。

第 4 章では、上衣細胞剥離モデルラットを用いて、後脳グルコースセンシングによる糖新生、生殖機能および摂食の制御に後脳上衣細胞が必要かを明らかにした。上衣細胞傷害効果が知られるノイラミニダーゼ (100 mU) をラットの 4V に投与することで、上衣細胞を剥離さ

せ、続いて 4V に 2DG を投与してグルコース利用率を低下させた場合の糖新生、生殖機能および摂食を解析した。ノイラミニダーゼを 4V に投与したラットでは、4V において脳室壁から剥離した上衣細胞もしくは変形した上衣細胞が観察できた。また、上衣細胞が剥離したラットでは、4V に 2DG を投与してもコントロール群と同様に血中グルコース濃度は上昇し、黄体形成ホルモン (LH) パルス振幅は抑制されたが、摂食は誘起されなかった。したがって、4V 上衣細胞はグルコース利用率低下時の摂食制御に必要であることが明らかとなった。

最後に、4V 上衣細胞がどういった低エネルギー状態でグルコース利用率の低下を感知しているのかを検証した。検証には、2DG (体重 1 kg あたり 400 mg) を静脈内投与することで作出した全身性グルコース利用率低下モデルラットおよび 50%制限給餌により作出した慢性低エネルギーモデルラットを用いた。全身性グルコース利用率低下モデルラットでは、血中グルコース濃度の上昇、視床下部室傍核および孤束核での c-Fos 発現が見られたが、4V 上衣細胞における c-Fos 発現は確認できなかった。慢性低エネルギーモデルラットでは、発情休止期の延長や LH 分泌の抑制、肝臓および生殖器重量の減少、孤束核での c-Fos 発現が確認できたが、血中グルコース濃度の上昇および 4V 上衣細胞での c-Fos 発現は確認できなかった。したがって、4V 上衣細胞は、後脳において顕著にグルコース利用率が低下するような状況で機能する可能性が示唆された。

以上から、本研究では、4V の上衣細胞は後脳でグルコース利用率が低下すると、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞や NPY 神経細胞、視床下部室傍核の CRH 神経細胞、弓状核の NPY 神経細胞、キスペプチン神経細胞へとシグナルを伝達し、摂食を誘起することが明らかとなった。