

博士論文（要約）

上衣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

佐藤 真梨萌

上衣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

佐藤 真梨萌

東京大学大学院農学生命科学研究科  
獣医学専攻  
獣医繁殖育種学研究室

2022年 3月

# 要旨

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。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 1 kg あたり 24 mg) 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 1 kg あたり 12 mg) 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。





## 学位論文に関連する出版物

1. Marimo Sato, Shiori Minabe, Takahiro Sakono, Fumie Magata, Sho Nakamura, Youki Watanabe, Naoko Inoue, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura, Fuko Matsuda. “Morphological analysis of the hindbrain glucose sensor-hypothalamic neural pathway activated by hindbrain glucoprivation”, *Endocrinology*, Volume 162, Issue 9, 2021, bqab125,

## その他の出版物

1. Shiori Minabe, Marimo Sato, Naoko Inoue, Youki Watanabe, Fumie Magata, Fuko Matsuda, Yoshihisa Uenoyama, Hitoshi Ozawa, Hiroko Tsukamura. “Neonatal estrogen causes irreversible male infertility via specific suppressive action on hypothalamic Kiss1 neurons”, *Endocrinology*, Volume 160, Issue 5, 2019, 1223–1233.
2. Fuko Matsuda, Satoshi Ohkura, Fumie Magata, Arisa Munetomo, Jing Chen, Marimo Sato, Naoko Inoue, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura. “Role of kisspeptin neurons as a GnRH surge generator: Comparative aspects in rodents and non-rodent mammals”, *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, Volume 45, Issue 12, 2019, 2318-2329.
3. Shiori Minabe, Sho Nakamura, Eri Fukushima, Marimo Sato, Kana Ikegami, Teppei Goto,

Makoto Sanbo, Masumi Hirabayashi, Junko Tomikawa, Takuya Imamura, Naoko Inoue, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura, Kei-Ichiro Maeda, Fuko Matsuda. “Inducible *Kiss1* knockdown in the hypothalamic arcuate nucleus suppressed pulsatile secretion of luteinizing hormone in male mice”, *Journal of Reproduction and Development*, Volume 66, Issue 4, 2020, 369-375.

4. Mingdao Dai, Sho Nakamura, Chudai Takahashi, Marimo Sato, Arisa Munetomo, Fumie Magata, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura, Fuko Matsuda. “Reduction of arcuate kappa-opioid receptor-expressing cells increased luteinizing hormone pulse frequency in female rats”, *Endocrine Journal*, Volume 68, Issue 8, 2021, 933-941.

5. Jing Chen, Shiori Minabe, Arisa Munetomo, Fumie Magata, Marimo Sato, Sho Nakamura, Masumi Hirabayashi, Yasuhiro Ishihara, Takeshi Yamazaki, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura, Fuko Matsuda. “*Kiss1*-dependent and independent release of luteinizing hormone and testosterone in perinatal male rats”, *Endocrine Journal*, in publication.

6. Fumie Magata, Lisa Toda, Marimo Sato, Takahiro Sakono, James K Chambers, Kazuyuki Uchida, Hiroko Tsukamura, Fuko Matsuda. “Intrauterine lipopolysaccharide inhibited arcuate *Kiss1* expression, LH pulses, and ovarian function in rats”, *submitted to Reproduction*.



# 目次

要旨	・・・1
学位論文に関連する出版物	・・・5
その他の出版物	・・・5
目次	・・・7
謝辞	・・・10
略語一覧	・・・14
<b>第1章 緒言</b>	・・・16
恒常性とは何か	・・・17
エネルギー恒常性に関連した諸問題	・・・18
エネルギー状態に基づき制御される生理機能	・・・19
エネルギー状態の指標	・・・20
末梢組織によるグルコースセンシング	・・・21
視床下部でのグルコースセンシング	・・・22
後脳でのグルコースセンシング	・・・23
後脳上衣細胞のグルコースセンサーとしての可能性	・・・24
目的	・・・25
<b>第2章 後脳グルコースセンシングに関与する細胞の同定</b>	
背景	・・・27

方法	．．． 29
結果	．．． 38
考察	．．． 43
図	．．． 47
<b>第 3 章 後脳と視床下部を連絡する神経伝達経路の同定およびその形成に関する解析</b>	
背景	．．． 60
方法	．．． 63
結果	．．． 72
考察	．．． 75
図	．．． 79
<b>第 4 章 上衣細胞剥離モデルラットを用いた上衣細胞の機能の検討</b>	
背景	．．． 87
方法	．．． 89
結果	．．． 95
考察	．．． 97
図	．．． 100
<b>第 5 章 上衣細胞をセンサー細胞とする後脳グルコースセンシングが機能する生理的条件 の検討</b>	
背景	．．． 107

方法	．．． 109
結果	．．． 115
考察	．．． 118
図	．．． 121
<b>第6章 総合考察</b>	
4V 上衣細胞に着目した後脳グルコースセンシング機構の解明	．．． 130
後脳グルコースセンシング機構の神経伝達経路	．．． 132
4V 上衣細胞の細胞内および細胞間シグナル伝達	．．． 134
後脳グルコースセンシングの生理的意義	．．． 136
本研究の臨床応用	．．． 137
結論	．．． 138
図	．．． 139
参考文献	．．． 143

## 謝辞

この博士論文を完遂させるにあたり、多くの方々からご理解およびご支援いただきました。ここにお礼を述べさせていただきます。

指導教官である松田二子先生には、最後まで面倒をみていただいたこと、心から感謝しています。先生には、自分がやりたいと思ったことを自由にやらせていただき、科学を楽しむ機会をたくさん与えていただきました。前多先生が急逝した後も、研究室の運営にご尽力される姿がとても格好良かったです。研究室もメンバーも、先生に守っていただければ今のようにはなりません。先生のもとで研究できたこと、誇りに思います。最後まで本当にお世話になりました。ありがとうございます。

真方文絵先生には、研究のお話を聞いていただいたり、実験環境に気を配っていただいたり、日頃から研究のサポートをしていただき、大変心強かったです。先生の研究に取り組む姿勢から、多くのことを学びました。誠にありがとうございました。

大学院へ進学する前に急逝された前多敬一郎先生には、科学や研究の素晴らしさを教えていただきました。もっと一緒に研究したかったですが、たとえ短い時間であっても先生のもとで学ぶことができ本当に良かったです。ありがとうございました。

束村博子先生には、論文執筆にあたり手厚いご指導をいただきました。先生の研究室に所属する学生でないにも関わらず、何度も丁寧に議論していただけて嬉しかったです。プライベートにおいても、娘のように気にかけていただきました。今後私も、先生のように情熱にあふれた前向きな姿勢で、何事にも取り組んでいきたいと思えます。心から

お礼申し上げます。

上野山嘉久先生には、実験の相談にのっていただいたほか、名古屋大学の研究室との窓口のような役割をしていただき、色々な融通を利かせていただいたかと思います。先生のおかげで、実験を進めることができました、ありがとうございます。

井上直子先生には、染色などに関して相談にのっていただきました。テレビ電話でパソコン上の画像を見ながらご指導いただいたことは、今でもよく覚えています。ありがとうございました。

大蔵聡先生には、試薬などを分与していただき、実験を行うことができました。また、学会などでお会いした時は、先生から感じる穏やかさに一人癒されていることもありました。ありがとうございました。

蔡沛學先生には、獣医繁殖育種学研究室しか知らない私に、海外での研究ならびにいつもと違う研究室での研究を体験する機会を与えていただきました。研究や進路についても、力強いお言葉で励ましていただいたのを憶えています。先生のもとで過ごした時間は、とても刺激的でした。ありがとうございました。

日々の研究生生活を共にしたのが、獣医繁殖育種学研究室の方々でなければ、最後までやりきることはできなかったと思います。敬意を表してここに名前を記述させていただきます。立川君子さん、中村翔先生、狩郷智美先生、青木悦也さん、美辺詩織先生、渡辺雄貴先生、棟朝亜理紗先生、野村菜奈さん、石山大先生、田中哲也先生、菊池允人先生、江頭真広先生、Josh Octura 先生、福本善之助さん、和泉すみれさん、伊藤祥子さん、

戴明道先生、高橋宙大さん、福嶋恵梨さん、棚橋美優さん、林薫さん、高橋ひとみさん、五十部由紀さん、木越敦子さん、藤井陽介さん、陳晶先生、迫野貴大さん、春日崇さん、中島大貴さん、中平陽子さん、大下雪奈さん、戸田理沙さん、王茜さん、黒木智絵さん、陳昉さん、楠本龍さん、保田亜久利さん、崔文昊さんほか多くの方々。特に美辺詩織先生には、研究指導をよくしていただき、異動された後も電話でよく相談にのっていただきました。また、中村翔先生は、研究室に入って間もない私に *in vivo* 実験のノウハウを丁寧に教えて下さいました。研究室の方々のご助力に、重ねてお礼申し上げます。

名古屋大学動物生殖科学研究室および動物生産科学研究室の学生の方々と、学会などで会うたびに研究のことや他愛もない世間話などで盛り上がり、とても有意義な時間を過ごさせていただきました。ありがとうございました。

パラフィン包埋をしていただいた東京大学農学生命科学研究科獣医学専攻獣医病理学研究室の加藤静香先生、c-Fos 抗体を譲渡していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門の若林嘉浩先生、遺伝子組換えマウスの作出に携わっていただいた生理学研究所遺伝子組み換え動物作製室の平林真澄先生、三宝誠先生、後藤哲平先生、大西皆子様ならびに生理学研究所ウイルスベクター開発室の小林憲太先生がいなければ、研究が完成しませんでした。心から感謝申し上げます。

実験をおこなうにあたり、犠牲となった動物たちに感謝します。彼らの命が無駄にならないよう、研究が何らかの形で人々に活用されることを願っています。また、実験を円滑に進めるご協力をいただいた業者の方々にもこの場をお借りしてお礼申し上げたい

です。特に株式会社カークの栗原このみさんには、実験に必要な試薬や器材を迅速に手配していただいたり、代替品を探していただいたりとお力添えいただきました。ありがとうございました。

最後に、これまでの長い間、自分のやりたいようにやらせてくれた両親と弟に、心からの感謝を捧げます。

## 略語一覽

AMP	adenosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	area postrema
ATP	adenosine triphosphate
CC	central canal
cDNA	complementary DNA
CRH	corticotropin-releasing hormone
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBH	dopamine beta-hydroxylase
DNA	deoxyribonucleic acid
DREADD	designer receptor exclusively activated by designer drugs
ERT2	estrogen receptor T2
GFP	green fluorescent protein
HE	hematoxylin and eosin
Kir	inward rectifier potassium channels
LH	luteinizing hormone
LV	lateral ventricle
mRNA	messenger RNA



NPY	neuropeptide Y
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
POMC	pro-opiomelanocortin
RNA	ribonucleic acid
UPW	ultrapure water
WGA	wheat germ agglutinin
SDGs	sustainable development goals
SUR	sulfonylurea receptor
2DG	2-Deoxy-D-glucose
3V	third ventricle
4-OHT	4-hydroxytamoxifen
4V	fourth ventricle
5TG	5-Thio-D-glucose

# 第 1 章

## 緒言

## 恒常性とは何か

あらゆる生物は、内分泌系や神経系の働きを介して、内部環境を一定に保つ性質をもつ。この性質は、当初「無生物と比較して生物は外部刺激による支配を受けにくい」と、内部環境の独立性もしくは固定性として言及され(1)、20世紀前半に恒常性という概念にまとめられた(2)。恒常性の維持は複雑なフィードバック機構により成立しており、内のおよび外的変化を感知して生理機能が適宜調節されることで、内部環境は一定に保たれている。フィードバック機構の例としては、視床下部—下垂体—性腺軸が挙げられる。視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモンが、下垂体からの黄体形成ホルモン(LH)や卵胞刺激ホルモンといった性腺刺激ホルモン分泌を介し、性腺での精子形成や卵胞発育を促進させる。一方、精子形成や卵胞発育に伴い、性腺からはステロイドホルモンが分泌され、結果的に性腺刺激ホルモン放出ホルモン神経細胞の活動を抑制し、性腺機能に著しい変動が生じることを防いでいる(3)。また、血糖制御に関与するフィードバック機構には、視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)が分泌され、下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン分泌を促し、副腎皮質刺激ホルモンの作用により副腎皮質から分泌されたグルココルチコイドは糖新生を促進しつつ、視床下部および下垂体に作用することでホルモン分泌を抑えるという視床下部—下垂体—副腎軸が挙げられる(4)。他にも、血圧や体温、イオン濃度、エネルギー状態など、生命を存続させるために様々な恒常性が維持されている。(5-7)

## エネルギー恒常性に関連した諸問題

様々な恒常性のうち、本研究ではエネルギー恒常性について着目する。生体のエネルギー状態は常に一定の範囲になるよう調節されている。たとえば、肝臓においてアデノシン3リン酸（ATP）が枯渇すれば摂食量が増える(8)。また、絶食すると、肝臓でグリコーゲン分解や糖新生が亢進し(9)、一方食事後には、インスリンにより細胞へのグルコースの取り込みが促進され、血中グルコース濃度は常に4-6 mMに維持されている(10)。他にも、飢餓や激しい運動でエネルギーが不足した状態となれば、消費エネルギーを節約するため生殖機能が抑制される(11,12)。しかし、エネルギー恒常性に関連した健康問題が、現在世界で大きな問題となっている(13)。世界の糖尿病患者数および肥満人口は、それぞれ4.6億人と6.5億人にも及び(14,15)、摂食障害を抱える患者もアメリカにだけで2千万人も存在している(16)。特に、摂食障害を抱える女性では、過食か拒食かに関わらず、無月経を呈することが多い(17)。一方、恒常性には問題がなくとも、低エネルギー状態による生殖機能の抑制は、乳牛の効率的な繁殖を阻害する一因となっている(18)。育種選抜により泌乳量が飛躍的に伸びた乳牛は、泌乳に莫大なエネルギーを消費するため、出産後から泌乳初期まではエネルギー消費量が摂取量を上回ってしまい、生殖機能の維持に必須であるLHおよび卵胞刺激ホルモンの分泌が抑制される。結果として、卵胞発育ならびに排卵の遅延、無発情が生じ、空胎期間が延長してしまう(19-22)。実際に、乳牛の空胎期間の延長は、日本の農家において経済損失の一因となっている(23)。さらに、女性の運動選手では、過度なトレーニングによって生じるエネルギー不足に起因して初潮の遅延や月経不順

が生じる(24)。こうした、エネルギー恒常性に関わる諸問題を解決できれば、世界中の人々の生活の質を向上させる一助となるほか、効率的な家畜生産を実現し、食料問題などのSDGsの達成にも寄与できる。そのためにも、エネルギー状態をモニターし、生理機能を調節する種々のメカニズムを、一つずつ解明していくことが喫緊の課題である。

### エネルギー状態に基づき制御される生理機能

本研究では、エネルギー状態に基づき制御される生理機能として、糖新生、摂食、生殖機能に着目した。糖新生は、主に肝細胞において、グリセロールや糖原性アミノ酸などの糖質以外の分子からグルコースを産生する代謝経路であり、絶食時や運動時といったエネルギー摂取量が低下する状態でも、グルコースを供給し続け、血中グルコース濃度を維持する生理機能である。実際に、ヒトにおける絶食開始から22時間までの間のグルコース産生は、64%が糖新生によるものだということが明らかとなっている(25)。また、糖新生は、アドレナリンやグルココルチコイド、グルカゴンで促進され、インスリンで抑制されるなど(9,26,27)、これまで糖新生を制御するメカニズムが多く明らかとなってきたが、近年はmRNAに結合することで転写後の発現調整を担うmicroRNAに着目した実験が行われており、乳がん研究で着目されていたmiR-185-5pが肝臓での糖新生も制御する可能性が新たに示唆された(28)。摂食もエネルギー状態の向上に寄与する生理機能の1つである。例えば、エネルギー源であるATP量が肝臓で減少すれば促進されるほか(8)、血中グルコース濃度との負の相関性も示唆されており、血中グルコース濃度が上昇すると摂食量は低下する(29)。

また、迷走神経を介した消化管の伸展刺激による摂食制御も明らかとなっている(30)。哺乳類の生殖機能は、視床下部の神経細胞からパルス状に分泌された性腺刺激ホルモン放出ホルモンが、下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞に作用し性腺刺激ホルモンのパルス状分泌を促し、さらに、下垂体からパルス状に分泌された性腺刺激ホルモンが精巣および卵巣といった性腺に作用することで精子形成や卵胞発育を促進するという、視床下部—下垂体—性腺軸により制御されている(3)。視床下部—下垂体—性腺軸のなかでも、産婦人科領域において妊孕性の指標として利用され(31)、かつ、サンプリングにおいて実験動物に対する侵襲性が低いと考えられる性ステロイドホルモンおよび性腺刺激ホルモンであるLHの血中濃度に着目して、本研究では生殖機能を評価した。生殖機能もエネルギー状態に基づいて制御される生理機能の1つであるが、糖新生や摂食とは異なり、エネルギー状態が低下するとエネルギー消費量を抑えるために、生殖機能は抑制されるよう制御されている。例えば、オスの主要な性ステロイドホルモンであるテストステロンは、連続した長時間の運動や絶食といった条件下で血中濃度が低下することが報告されている(32)。また、正常な性腺機能の維持のために必要なLHのパルス状分泌も、絶食により抑制されることが様々な動物種で報告されている(33-36)。

### エネルギー状態の指標

エネルギー状態のモニターには数多くのエネルギー基質が活用されている。古くから、グルコースに着目した実験は広く行われており、現在では脂肪酸やケトン体、アミノ

酸といった様々な物質に着目したエネルギー恒常性の研究も行われている(37-39)。これらのエネルギー状態の指標となる分子のなかでも、本研究では生命維持に必須のエネルギー基質であるグルコースに着目した。グルコースは、細菌から哺乳類まで幅広い生物が活用するエネルギー基質である(40-45)。特に、哺乳類では脳の機能維持に必須であり(46)、血中グルコース濃度は一定の範囲に収まるよう種々のフィードバック機構により厳密に制御されている(10)。低エネルギー状態でみられる糖新生、摂食ならびに生殖機能の制御も、全身もしくは脳におけるグルコース代謝を阻害した場合に再現されることから(47-50)、末梢組織および中枢神経に存在するグルコース利用率をモニターするグルコースセンサー細胞がその制御を司ると考えられる。

### 末梢組織によるグルコースセンシング

生物には細胞でのグルコース利用率を指標に、生体中のグルコース濃度を一定に保つ仕組みが多く備わっている。膵 $\beta$ 細胞によるグルコースセンシングはその最たる例である。膵 $\beta$ 細胞では、血中グルコース濃度が高い場合、II型グルコース輸送体によりグルコースが細胞内に取り込まれ、膵臓型グルコキナーゼによりリン酸化され、クエン酸回路での代謝を経てATPが産生される。産生されたATPは、膵 $\beta$ 細胞に発現するATP感受性カリウムチャネル(Kir6.2とSUR1の複合体)を抑制することで、 $\beta$ 細胞の脱分極を誘起し、インスリンが分泌され、血中グルコース濃度が低下する(4,51)。このように膵 $\beta$ 細胞では、細胞内のグルコース利用率によりインスリン分泌が制御され、血中グルコース濃度を

一定に保つよう機能している。肝門脈に分布する肝臓迷走神経も肝門脈血中のグルコース濃度が低下すると、求心性の迷走神経を介して中枢にシグナル伝達することで摂食や糖新生を促進させるほか(52,53)、モルモットの筋層間神経叢には細胞外グルコース濃度が上昇もしくは低下すると活動電位が生じるというグルコースセンサー細胞の特徴を有する神経細胞が存在することが確認されている(54)。また、頸動脈小体のグロムス細胞も細胞外グルコース濃度が低下すると、細胞内カルシウム濃度が上昇することが、*in vitro*実験により明らかとなっている(55)。

### 視床下部でのグルコースセンシング

末梢組織と同様に、脳でもグルコースセンシングは行われており、グルコース利用率をもとに糖新生や摂食、生殖機能など様々な生理機能が制御されている。アナンドやヘザリントンがおこなった破壊実験により視床下部の外側野、腹内側野がそれぞれ摂食中枢、満腹中枢だということが明らかとなった(56,57)。さらにイヌやネコを用いた*in vivo*実験の結果から、10%グルコース溶液を静脈投与すると発火頻度が増加/減少する神経細胞が摂食中枢と満腹中枢に分布し(58)、相互作用しながら摂食を制御している可能性が示唆された(58,59)。近年、コンディショナルノックマウスを用いて、腹内側核において一次繊毛の形成を阻害すると、過食やエネルギー消費量の低下により肥満となることが報告されており(60)、腹内側核によるエネルギー恒常性の維持には、一次繊毛が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。細胞外グルコース濃度の変化に伴い発火頻度が変わる神経



細胞は外側野および腹内側野以外にも、視床下部の様々な神経核で報告されている。弓状核では、NPY神経細胞が細胞外グルコース濃度の高い時には発火頻度が低下し、対照的にPOMC神経細胞は細胞外グルコース濃度が低いと発火頻度が低下することが*in vitro*実験により確認された(61,62)。また、性腺刺激ホルモン放出ホルモン神経細胞も、培養細胞を用いた実験において細胞外グルコース濃度が高い場合 (5 mM)、コントロール群および低濃度グルコース群 (0.5 mM) に比べて性腺刺激ホルモン放出ホルモンおよび細胞活性化の指標である *c-fos* mRNA の発現が増加する(63)。マウスの脳スライスを用いて性腺刺激ホルモン放出ホルモン神経細胞の発火頻度を解析した実験でも、細胞外グルコース濃度が低下すると、性腺刺激ホルモン放出ホルモン神経細胞の発火頻度が低下することが確認された(64)。こうした結果から、脳によるグルコースセンシングでは、視床下部が重要な役割を果たしていることが示唆され、長い間視床下部が着目されてきている。

### 後脳でのグルコースセンシング

視床下部が着目される一方、後脳によるグルコースセンシングの重要性も1800年代に指摘された(65)。くわえて、視床下部の視交叉上核、外側野、腹内側野にグルコース類縁体である2-デオキシ-D-グルコース (2DG) を投与し、グルコースの代謝を阻害しても、摂食が誘起されないことや(66)、Diroccoらにより前脳を除去したラットでも2DGの腹腔投与による血中グルコース濃度の上昇が確認されたことから(67)、視床下部だけでなく後脳にも、グルコースをモニターし種々の生理機能を制御する機構が存在することが明

らかとなった。さらに、グルコース代謝を阻害する5-チオ-D-グルコース (5TG) を側脳室 (LV) もしくは第4脳室 (4V) に投与すると、摂食量および血中グルコース濃度が上昇するが、これらの反応は、中脳水道をシリコンで塞ぎ、脳脊髄液のLVから4Vへの流れを遮断したうえで5TGをLVに投与しても生じない(68)。また、5TGを視床下部の61か所、後脳の142か所に投与し摂食量と血中グルコース濃度への影響を解析した結果、視床下部では1か所のみで摂食が誘起された一方、後脳では66か所で摂食誘起が、49か所で血中グルコース濃度の上昇がみられた (うち33か所では、両反応が見られた) (69)。さらに、2DGをオスラットの4Vに投与すると、摂食量の増加およびLH分泌の抑制がみられる(47)。また、メスラットでも同様の結果が報告されている(50)。こうした過去の研究から、後脳のグルコースセンサー細胞でグルコース利用率が低下すると、エネルギー恒常性を保つように糖新生、摂食ならびにLH分泌を調節するということが明らかとなった。

### 後脳上衣細胞のグルコースセンサーとしての可能性

後脳のグルコースセンサー細胞としては、4Vや脊髄中心管 (CC) の上衣細胞が考えられる。上衣細胞はLVからCCまでの全ての脳室壁上を裏打ちするグリア細胞である。これまでの組織学的解析から、上衣細胞には臍臓型グルコキナーゼ、II型グルコース輸送体およびAMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK) といったグルコースセンシングに重要な分子が発現していることが確認されている(70,71)。さらに、*in vitro*実験において、CCの上衣細胞では細胞外グルコース濃度が低いと細胞内カルシウム濃度が上昇することが

明らかとなった(72)。この上衣細胞の細胞外グルコース濃度低下への反応は、*in vitro*でAMPK活性化剤の添加により再現できる(71)。以上から、後脳の上衣細胞はAMPKを介してグルコース利用率の低下を感知するグルコースセンサーである可能性が示唆されてきた。しかし、これらの後脳上衣細胞に関する知見は、組織学的特徴や*in vitro*実験からの推測に留まり、上衣細胞がどのような役割で後脳グルコースセンシングに関与しているかは、明らかではない。

## 目的

以上を踏まえ本研究では、上衣細胞に着目して後脳グルコースセンシング機構を明らかにすることを目的とした。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*in vivo*で証明し、後脳グルコースセンシングにおいて生理機能を制御すると考えられる神経細胞の同定を行った。第3章では、遺伝子組換えマウスを用いた神経伝達経路のトレーシングにより、第2章で示唆された神経細胞と後脳上衣細胞の間に神経伝達経路が存在するかを検証し、かつ、その神経伝達経路の形成に関する知見を得た。第4章では、上衣細胞剥離モデルラットを用い、生理機能制御における上衣細胞の役割を明らかにした。最後に、第5章において、全身性グルコース利用率低下モデルラットおよび慢性低エネルギーモデルラットを用い、後脳上衣細胞がこういった低エネルギー状態で機能しているか検証した。

## 第2章

# 後脳グルコースセンシングに関与する細胞 の同定

## 2-1 背景

前章で述べた通り、後脳上衣細胞はグルコース利用率の低下を感知できることがこれまでに示唆されてきた。ただし、これまでの細胞外グルコース濃度の低下への反応性はあくまでも *in vitro* で確認された事象であり(71,72)、上衣細胞が生体内でもグルコース利用率の低下に反応するかは *in vivo* で検証する必要がある。

グルコース利用率が低下した際にみられる糖新生や摂食の促進ならびに生殖機能の抑制には、上衣細胞以外にも、脳幹のカテコールアミン神経細胞や視床下部のCRH神経細胞の関与が示唆されている。例えば、2DGの皮下投与で誘起される摂食と血中グルコース濃度の上昇には、視床下部室傍核に投射している脳幹のA2領域およびC1領域に分布するカテコールアミン作動性神経細胞と、脊髄へと投射するC1領域のカテコールアミン作動性神経細胞がそれぞれ必要だということが、神経毒であるサポリンを用いた神経細胞破壊実験で示唆された(73)。さらに、DREADD法を用い、C1領域のカテコールアミン作動性神経細胞を特異的に活性化させた場合、血中グルコースおよびグルココルチコイド濃度の上昇、摂食の促進がみられた(74)。また生殖機能についても、カテコールアミン合成阻害剤である  $\alpha$ -メチル-p-チロシンを視床下部室傍核に投与する、もしくはCRH拮抗剤を脳室内投与すると、絶食により生じるLH分泌の抑制がみられなくなるほか(75)、視床下部室傍核にドーパミン- $\beta$ -ヒドロキシラーゼ (DBH) サポリンを投与し、視床下部室傍核へ投射しているカテコールアミン作動性神経細胞を破壊すると、2DGの末梢への反復投与により生じる性周期の遅延が減弱することが明らかとなっている(76)。これらの結果から、後脳

でグルコース利用率の低下が感知された場合にも、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞および視床下部室傍核のCRH神経細胞を介して、生理機能が制御される可能性がある。

トレーサータンパク質であるコムギ胚芽凝集素 (WGA) をラットの4Vに投与すると、WGAが弓状核まで伝達されることから(77)、後脳でグルコース利用率が低下した際に生じる生殖や摂食の制御には、弓状核の細胞も関与していると考えられる。弓状核には、ニューロペプチドY (NPY) 神経細胞の分布が確認されている(78)。NPYをラットの脳室内に投与すると、摂食が誘起され、射精行動およびロードーシスが抑制される(79)。また、絶食により弓状核での *Npy* mRNA発現細胞数が増加することから(80)、弓状核NPY神経細胞は、低エネルギー状態での摂食及び生殖機能の制御に関与している可能性が示唆される。

以上から本章では、後脳上衣細胞のグルコースセンシングへの関与を明らかにするため、2DGを4Vに投与し後脳でグルコース利用率が低下したラットの脳における、細胞活性化の指標であるc-Fosのタンパク質もしくは *c-fos* mRNAの発現を組織学的に解析した。さらに、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞や視床下部のCRH神経細胞やNPY神経細胞が後脳グルコースセンシング機構に関与しているかを検証した。

## 2-2 方法

### 動物

本実験には、一般財団法人動物繁殖研究所より購入したWistar-Imamichi系オスラット（8週齢）を用いた。ラットは、自由摂餌・摂水ならびに一定の照明条件（明期5:00～19:00、暗期19:00～5:00）、気温条件（室温 $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ）に制御された環境で飼育した。すべての手術はイソフルラン（2-4%、和光）麻酔下でおこなった。本実験は、東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認を得たうえで、東京大学動物実験実施規則に従いおこなった。

### 2DGの第4脳室投与による後脳でのグルコース代謝の阻害

2DG投与の1週間前に、ステンレス製のガイドカニューラ（22ゲージ、Plastic One、アメリカ）をラットの4V（ブレグマから12.5 mm尾側、6.8-8.4 mm腹側の正中(81)）に留置した。2DG投与当日に、ガイドカニューラから脳脊髄液が流出した個体のみをその後の実験に使用した。4Vに留置されたガイドカニューラにインナーカニューラ（28ゲージ、Plastic One）を挿入し、そのインナーカニューラを通して2DG（Sigma-Aldrich、アメリカ）を0.5時間（体重1 kgあたり12 mg、 $n = 4$ ）もしくは1時間（体重1 kgあたり24 mg、 $n = 6$ ）、マイクロシリンジポンプ（Eicom、京都、日本）を用いて、毎分0.2  $\mu\text{L}$ の速度で投与した。この投与速度で4Vに溶液を投与した場合、溶液は3Vに逆流しないことがすでに確認されている(47)。また、浸透圧の影響を考慮するため、対照群には、

げっ歯類では利用できない糖であるキシロース（和光純薬、大阪、日本）を等量投与した（0.5時間投与群：n = 4、1時間投与群：n = 4）。

### 採血ならびに血中グルコース、黄体形成ホルモンおよびテストステロン濃度の測定

先行研究の手順に従い(82)、2DG投与前日に、シリコン製のカテーテル（信越ポリマー、東京、日本）を右頸静脈経由で、右心房に留置した。すべての採血は、ラットに拘束ストレスを与えないよう、留置したカテーテルを通して、無拘束・無麻酔でおこなった(82)。血中グルコースおよびテストステロン濃度の解析のために、採血は2DGもしくはキシロースの4V投与直前、投与後0.5および1時間後におこなった。LH分泌動態解析用の血液サンプルは、100  $\mu$ Lの採血を6分間隔で3時間続け、2DGもしくはキシロースの4Vへの投与は、最初の採血直後に開始した。頻回採血によるヘマトクリット値の低下を防止するため、毎回の採血後には、事前にドナーラットから採取した赤血球を採血量と等量投与した。

血中グルコース濃度は、グルコースCII-テスト（和光）を用い、血漿サンプル1.5  $\mu$ L中のグルコース濃度を測定することで算出した。96穴プレートにグルコースCII-テストの発色試液を200  $\mu$ Lずつ分注し、各ウェルに血漿サンプルを1.5  $\mu$ L加えた後、38°Cで5分振盪し、吸光度を測定した。吸光度の測定には、プレートリーダー（ARVO X4、Perkin Elmer、アメリカ）を用いた。

血中LH濃度は、ラジオイムノアッセイ法により血漿50  $\mu$ L中のLH濃度を測定する



ことで算出した。まず、50  $\mu$ Lの血漿に50  $\mu$ Lの希釈液（0.05M リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、0.1% アジ化ナトリウム、1% 牛血清アルブミン）および14000倍希釈したウサギ抗マウスLH抗体（A.F. Parlow National Hormone and Peptide Program）を50  $\mu$ L加え、4°Cで二晩インキュベートした。名古屋大学生殖科学研究室で作製された放射性同位元素（ $^{125}$ I）標識ラットLHを0.05M PBS（0.1% アジ化ナトリウム、0.1% 牛血清アルブミン）で希釈し、50  $\mu$ Lずつサンプルに加えた。4°Cで二晩インキュベートした後、希釈液（0.05M PBS、0.1% アジ化ナトリウム、0.02% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム、3% ポリエチレングリコール）で6倍に希釈したヤギ抗ウサギIgG血清（名古屋大学動物生産科学研究室より譲受）をサンプルに100  $\mu$ Lずつ分注し、再度4°Cで二晩インキュベートした。サンプルを遠心分離し（3000回転/分、4°C、30分）、上清を吸引した後、オートウェル $\gamma$ システム（ARC-370、ALOKA、日本）を用いて、沈殿物の放射線量を測定した。標準曲線の作成には、0.05M PBS（0.1% アジ化ナトリウム、1% 牛血清アルブミン）で希釈したラットLH（NIDDK-Rat LH-RP-3）を用いた。検出限界値は0.156 ng/mL、アッセイ内およびアッセイ間誤差はそれぞれ0.45 ng/mLで5.0%、1.35 ng/mLで5.0%だった。LHパルスの検出には、PULSARソフトウェア(83)を用いた。

血中テストステロン濃度の測定には、2DGもしくはキシロースを4Vに投与する直前と投与開始後0.5および1時間後の血漿サンプルを用いた。酵素免疫測定法によるテストステロンの測定は、先行研究と同様の手順でおこなった(84)。まず、20  $\mu$ Lの血漿サンプルとヘキサン（和光）およびエーテル（和光）を混ぜることで、テストステロンを抽出

し、100  $\mu$ Lの0.05 M PB (0.1% ゼラチン) で希釈した。ウサギ抗ヒツジIgG抗体 (Rockland Immunochemicals, アメリカ) が固相化された96穴プレートに、40  $\mu$ Lの希釈したテストステロンと100  $\mu$ Lのヒツジ抗テストステロン抗体 (1:60,000、コロラド大学のG.D.Niswender博士より譲受) を加えた。4°Cで一晩振盪した後。反応液を捨て、西洋わさびペルオキシダーゼ標識テストステロンを各ウェルに加え、さらに4°Cで4時間振盪した。発色には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (Dojindo、日本) を用い、プレートリーダーにより吸光度を測定した。検出限界値は0.0125 ng/mL、アッセイ内およびアッセイ間誤差はそれぞれ0.41 ng/mLで3.7%、3.9 ng/mLで12.9%だった。

### 摂食量測定

連続採血の1週間後に、4Vに留置したガイドカニューラから脳脊髄液の流出が見られた個体のみを用い、摂食量を測定した。マイクロシリンジポンプを使用し、連続採血の日に投与した溶液 (2DGもしくはキシロース) と同様の溶液を各ラットの4Vに1時間投与し、その後3時間の摂食量を測定した (2DG投与群、n = 6; キシロース投与群、n = 6)。2DGもしくはキシロースの投与量ならびに投与流速は、連続採血時の投与条件と同様にした。

### 脳の採材および凍結切片の作製

0.5もしくは1時間の4Vへの2DGもしくはキシロースの投与が終了し、採血した直

後、ペントバルビツールナトリウム注射液（共立製薬、東京、日本）をカテーテル経由でラットの静脈内に投与した。深麻酔状態のラットを用い、左心室から0.05M PBSおよび4%パラホルムアルデヒド（PFA）溶液を順番に灌流し固定した。灌流固定後、脳を取り出し4% PFAに一晩浸漬させ、その後30%スクロース溶液に脳が沈下するまで浸漬させた。

クリオスタット（Leica CM1860、Leica、ドイツ）を使用し、固定した視床下部および脳幹から厚さ50  $\mu\text{m}$ の冠状凍結切片を作製した。脳切片を作製した脳領域は以下の通り：LV、ブレグマから尾側に-0.36 mm~0.60 mm；3V、ブレグマから尾側に1.72 mm~4.36 mm；4V、ブレグマから尾側に8.64 mm~13.68 mm；CC、ブレグマから尾側に13.68 mm~15.72 mm；A2領域、ブレグマから尾側に13.68 mm~15.72 mm；C2領域、ブレグマから尾側に11.04 mm~13.48 mm；C1領域、ブレグマから尾側に12.00 mm~13.56 mm；A6領域、ブレグマから尾側に9.48 mm~10.32 mm；最後野（AP）、ブレグマから尾側に13.68 mm~14.28 mm；C1/A1領域、ブレグマから尾側に13.68 mm~14.08 mm；視床下部室傍核、ブレグマから尾側に0.6 mm~2.28 mm；弓状核、ブレグマから尾側に1.72 mm~4.36 mm(81)。

*in situ* ハイブリダイゼーション法による *c-fos*、*Crh* および *Npy* mRNA の検出および免疫組織化学染色による *c-Fos*、ビメンチンおよびドーパミン- $\beta$ -ヒドロキシラーゼの検出

DIG RNAラベリングキット（Roche、スイス）を用い、ラットの視床下部cDNAから *c-fos* (NM\_022197)、*Crh* (NM\_031019)、*Npy* (NM\_012614) の相補性RNAプロ

ープを合成した。合成に用いたプライマー配列は下記の通り：*c-fos*、5'-TGAGAAGACTGGATAGAGCCG-3'および5'-TGCAGCCATCTTATTCCTTTCC-3'；*Crh*、5'-GCTAACTTTTTCCGCGTGTT-3'および5'-GCAGATGGAAGTCACCCAGT-3'；*Npy*、5'-AGGTAACAAACGAATGGGGCTG-3'および5'-GATGAGATGAGATGTGGGGGGAAA-3'。ラットの脳切片に0.25%無水酢酸（和光純薬）/0.1Mトリエタノールアミン（和光純薬）処理を10分間施し、ラット*c-fos*、*Crh*、もしくは*Npy*のいずれか1種類の相補性RNAプローブ 1 µgを加えて、60°Cで一晩インキュベートした。次に、20 µg/mLのRNase A（Sigma-Aldrich）に浸漬し37°Cで30分間振盪後、室温で1.0%ブロッキング剤（Roche）に1時間浸漬させ、アルカリフォスファターゼ標識DIG抗体（1:1000、Roche）と、4°Cで一晩反応させた。最後に、4-ニトロブルーテトラゾリウム（Roche）および5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩（Roche）と2時間インキュベートすることで、発色させた。*Crh*もしくは*Npy*の*in situ*ハイブリダイゼーション法を施した切片には、100%エタノールに室温で5分浸漬したのち、引き続きc-Fosの免疫組織化学染色を実施した。

c-Fosの免疫組織化学染色は、すべての工程を室温でおこなった。脳切片を0.01M PBSで希釈した0.3%過酸化水素に浸漬させた後、ブロッキングバッファー（0.01M PBS、3%ヤギ正常血清、1%牛血清アルブミンおよび0.2% Tween-20）に浸漬した。切片はウサギ抗ヒトc-Fos抗体（1:500、Merck、ドイツ）と40時間インキュベートした後、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体（1:500、Vector Laboratories Inc、アメリカ）と1時間反応させ

た。VECTASTAIN Elite ABC HRPキット (Vector Laboratories Inc) の試薬に30分間浸漬したのち、3,3'-ジアミノベンジジン水溶液に浸漬することで発色させた。c-Fos抗体の特異性は、先行研究ですでに確認されている(85)。

c-Fosおよびビメンチン、もしくはc-FosおよびDBHの蛍光二重免疫組織化学染色についても、言及する場合を除き、全ての工程を室温で実施した。切片は、ウサギ抗ヒトc-Fos抗体 (1:2000、Merck) とニワトリ抗ビメンチン抗体 (1:2000、Merck) の混合液と40時間、もしくはマウス抗ウシDBH抗体 (1:10000、Merck) との混合液と1週間、4°Cで浸漬振盪させた。ニワトリ抗ビメンチン抗体およびマウス抗DBH抗体の特異性は、先行研究によりすでに確認されている(86,87)。二次抗体反応では、Alexa 488ヤギ抗ウサギIgG抗体 (1:800、Invitrogen、アメリカ)、Alexa 594ヤギ抗ニワトリIgY抗体 (1:400、Invitrogen) もしくはAlexa 594ヤギ抗マウスIgG抗体 (1:800、Invitrogen) に切片を2時間浸漬させた。

各種組織化学的解析には、それぞれの領域で隣接する切片間の距離が200  $\mu\text{m}$ になる一連の切片を用いた。明視野画像は光学顕微鏡 (Leica DM2500、Leica) を用いて、蛍光画像は共焦点顕微鏡 (ZEISS LSM 700、Carl Zeiss、ドイツ) を用いて撮影した。

#### ***c-fos* mRNA発現領域面積およびc-Fos免疫陽性細胞数の定量**

200  $\mu\text{m}$ 間隔の一連の脳切片を用いて、下記後脳および視床下部領域における *c-fos* mRNA発現領域面積およびc-Fos免疫陽性細胞数を定量した (n = 3~6) : LV、3V、

4VおよびCCの上衣細胞層；孤束核（A2領域およびC2領域）；C1領域（吻側および尾側）；C1/A1領域；A6領域；AP；視床下部室傍核；弓状核。

*c-fos* mRNAの発現解析は、上衣細胞層では*c-fos* mRNA発現細胞が重なってしまい、個々の細胞の観察が難しかったため、細胞数の代わりに面積による定量をおこなった。光学顕微鏡で撮影した画像をもとに、孤束核とLV、3V、4VおよびCCの上衣細胞での*c-fos* mRNA発現面積をImage J（version 1.52a, The National Institutes of Health、アメリカ）により定量した。

LV、3V、4V、CC、A2領域、C2領域、C1領域、A6領域、AP、視床下部室傍核、および弓状核におけるc-Fos免疫陽性細胞数、そしてA2領域、C2領域、C1領域、A6領域、C1/A1領域、視床下部室傍核および弓状核における*Crh*もしくは*Npy* mRNA発現c-Fos免疫陽性細胞数は、光学顕微鏡下で2回数えた。A2領域、C2領域、C1領域、A6領域および最後野におけるc-FosおよびDBH免疫陽性細胞数は、共焦点顕微鏡により撮影した1匹あたり3枚の代表的な画像を用いて2回数えた。各領域における総c-Fos免疫陽性細胞数は、各切片の計測値2回分の平均細胞数を合計した。

## 統計解析

統計解析には、Rソフトウェア（バージョン3.5.0、R Foundation for Statistical Computing）を用いた。2DGもしくはキシロース投与前後の血中グルコース濃度は、対応のある検定により解析した。キシロース投与群と2DG投与群における、血中テストステ

ロン濃度、LH分泌動態、摂食量、*c-fos* mRNA発現面積、c-FosおよびDBH免疫陽性細胞数、*Npy*もしくは*Crh* mRNA発現c-Fos免疫陽性細胞数はスチューデントのt検定により解析した。各領域のc-Fos発現細胞数に関しては、二元配置分散分析を行い、交互作用が見られた領域に関しては、単純主効果検定をおこなった。P値が0.05未満の場合を統計的に有意とした。

## 2-3 結果

**2DGを第4脳室内に1時間投与すると血中グルコース濃度が上昇、血中テストステロン濃度は低下、摂食量は増加した**

2DGを4Vに0.5時間投与しても血中グルコース濃度は変化しなかったが、1時間投与した場合、血中グルコース濃度は有意に上昇した ( $P < 0.05$ 、対応のある  $t$  検定、図2-1)。キシロースを1時間投与しても、血中グルコース濃度は上昇しなかった。

2DGを4Vに0.5時間投与しても血中テストステロン濃度は変化しなかった一方、1時間投与した場合、キシロース投与群と比較して有意に血中テストステロン濃度が低かった ( $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定、図2-2A)。2DGを4Vに1時間投与しても、平均および基底血中LH濃度、LHパルス頻度ならびにLHパルス振幅に影響は出なかった (図2-2B、2C)。

2DGを4Vに1時間投与してから3時間の摂食量は、キシロース投与群と比べ、有意に多かった ( $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定、図2-3)

**2DGを第4脳室内に1時間投与すると第4脳室の上皮細胞でc-Fosが発現した**

2DGを4Vに1時間投与した個体では、多くのc-Fos免疫陽性上皮細胞が4Vに観察され (図2-4A)、キシロース投与群と比較して、c-Fos免疫陽性上皮細胞数は有意に多かった ( $P < 0.05$ 、二元配置分散分析、図2-4B)。また、時間の主効果もみられたが、交互作用はなかった。LV、3VおよびCCでもc-Fos免疫陽性上皮細胞がみられたものの (図2-



4A)、キシロース投与群と2DG投与群で有意差はなかった(図2-4B)。c-Fos免疫活性と上衣細胞のマーカーであるビメンチンの共局在が4Vで確認できた(図2-4A、蛍光写真)。

### 2DGを第4脳室内に1時間投与すると脳幹のドーパミン-β-ヒドロキシラーゼ免疫陽性細胞もしくはNpy発現細胞でc-Fosが発現した

2DGを4Vに1時間投与した個体では、多くのc-Fos免疫陽性細胞が孤束核(A2領域およびC2領域)、C1領域、A6領域ならびにAPに観察された(図2-5A)。2DGを4Vに投与した個体のC2領域、C1領域およびA6領域では、c-Fos免疫陽性細胞数がキシロース投与群に比べ有意に多かった( $P < 0.05$ 、二元配置分散分析、図2-5B)。C1領域およびA6領域では、時間の主効果も認められた。特に、C1領域に関しては、吻側部ではc-Fos免疫陽性細胞数に関して時間の主効果のみが認められた一方(キシロース 0.5時間:  $14 \pm 5.6$ 細胞、キシロース 1時間:  $53.8 \pm 4.2$ 細胞、2DG 0.5時間:  $24.3 \pm 4.9$ 細胞、2DG 1時間:  $85.7 \pm 13.5$ 細胞)、尾側部では投与群および時間の両方で主効果が認められた(キシロース 0.5時間:  $0.3 \pm 0.3$ 細胞、キシロース 1時間:  $25.8 \pm 9.7$ 細胞、2DG 0.5時間:  $40 \pm 13.6$ 細胞、2DG 1時間:  $70.2 \pm 8.6$ 細胞) ( $P < 0.05$ 、二元配置分散分析)。2DGを4Vに1時間投与した個体のA2領域およびAPのc-Fos免疫陽性細胞数は、2DGを0.5時間投与した個体もしくはキシロースを1時間投与した個体のc-Fos免疫陽性細胞数よりも有意に多かった( $P < 0.05$ 、二元配置分散分析および単純主効果検定、図2-5B)。

キシロースもしくは2DGを4Vに1時間投与した個体の孤束核(A2領域およびC2

領域)、C1領域、A6領域ならびにAPにおいて、c-FosおよびDBH免疫陽性細胞が観察できた(図2-5A)。DBH免疫陽性細胞中のc-Fos陽性細胞率は以下の通りだった:キシロース投与群;A2領域:0.6±0.6%、C2領域:0%、C1領域:9.3±9.3%、A6領域:0.6±0.6%、AP:0%、2DG投与群;A2領域:19.7±8.4%、C2領域:45.2±19.8%、C1領域:52.5±6.7%、A6領域:26.9±5.1%、AP:3.9±3.9%。なお、2DG投与によるDBH免疫陽性細胞数の増減はいずれの領域においても確認されなかった。キシロースを4Vに1時間投与した個体と比べて、2DGを4Vに1時間投与した個体のC2領域、C1領域およびA6領域では、c-FosおよびDBH免疫陽性細胞数が有意に多かった( $P < 0.05$ 、スチューデントのt検定、図2-5C)。

キシロースもしくは2DGを4Vに1時間投与した個体の孤束核(A2領域およびC2領域)、C1領域、A6領域ならびにC1/A1領域において、c-Fos免疫陽性*Npy*mRNA発現細胞が観察できた(図2-5A)。*Npy*mRNA発現細胞中のc-Fos免疫陽性細胞率は以下の通りだった:キシロース投与群;A2領域:1.0±0.5%、C2領域:0.2±0.2%、C1領域:0%、A6領域:0.4±0.4%、C1/A1領域:0%、2DG投与群;A2領域:7.1±3.3%、C2領域:12.1±2.6%、C1領域:24.5±6.9%、A6領域:4.5±1.6%、C1/A1領域:17.6±13.6%。なお、2DG投与による*Npy*陽性細胞数の増減はいずれの領域においても確認されなかった。4Vに2DGを1時間投与した個体のC2領域では、キシロースを4Vに1時間投与した個体と比べて、c-Fos免疫陽性*Npy*mRNA発現細胞数が有意に多かった( $P < 0.05$ 、スチューデントのt検定、図2-5D)。またC1領域では、4Vに2DGを1時間投与した場合、c-Fos/*Npy*陽性

細胞数が多い傾向にあった ( $P = 0.07$ 、スチューデントの  $t$  検定、図2-5D)。APでは、いずれのグループにおいても *Npy* mRNA発現細胞は観察されなかった。

#### 2DGを第4脳室内に1時間投与すると視床下部室傍核の *Crh* 発現細胞でc-Fosが発現した

2DGを4Vに1時間投与した個体では、多数のc-Fos免疫陽性細胞が視床下部室傍核に観察され (図2-6A)、キシロースの1時間投与群および2DGの0.5時間投与群と比較して、c-Fos免疫陽性細胞数は有意に多かった ( $P < 0.05$ 、二元配置分散分析および単純主効果検定、図2-6B)。視床下部室傍核におけるc-Fos免疫陽性 *Crh* mRNA発現細胞数は、2DGの1時間投与群では、キシロースの1時間投与群と比べ有意に多かった ( $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定、図2-6A、6B)。2DGの1時間投与群における視床下部室傍核でのc-Fos免疫陽性細胞中の *Crh* 発現細胞の割合は、 $16.7 \pm 4.1\%$  だった。

#### 2DGを第4脳室内に1時間投与すると弓状核の *Npy* 発現細胞でc-Fosが発現した

2DGを4Vに1時間投与した個体では、多数のc-Fos免疫陽性細胞が弓状核に観察され (図2-7A)、キシロース投与群に比べ、2DG投与群では弓状核におけるc-Fos免疫陽性細胞数が有意に多かった ( $P < 0.05$ 、二元配置分散分析、図2-7B)。また、時間の主効果も認められた。弓状核におけるc-Fos免疫陽性 *Npy* mRNA発現細胞数は、2DGを1時間投与した群では、キシロースを1時間投与した群と比べ有意に多かった ( $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定、図2-7B)。2DG1時間投与群における弓状核でのc-Fos免疫陽性細胞中の

*Npy*発現細胞の割合は、 $42.4 \pm 2.9\%$ だった。

## 2DGを第4脳室内に0.5時間投与すると孤束核の細胞や第3脳室の上衣細胞ではなく第4脳室の上衣細胞で*c-fos* mRNA発現が誘起された

2DGの4Vへの0.5時間投与により、4Vの上衣細胞層に*c-fos* mRNAが発現し（図2-8）、キシロース投与群と比較して、2DG投与群の4V上衣細胞層における*c-fos* mRNA発現領域面積は、有意に大きかった（ $P < 0.05$ 、スチューデントの*t*検定、図2-8B）。対照的に、LV、3VおよびCCの上衣細胞層では、*c-fos* mRNAの顕著な発現は確認できず、2DG投与群とキシロース投与群の間で有意差もみられなかった（図2-8B）。孤束核での*c-fos* mRNA発現領域面積においても、2DG投与群とキシロース投与群の間で有意差はみられなかった（図2-8B）。

## 2-4 考察

後脳でグルコース利用率が低下し、糖新生や摂食、生殖といった生理機能に変化が生じたラットにおいて、4Vの上衣細胞、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞やNPY神経細胞、視床下部室傍核のCRH神経細胞および弓状核のNPY神経細胞が活性化していたことから、これらの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が明らかとなった(図2-9)。特に、2DGを4Vに0.5時間投与すると、4Vの上衣細胞のみで細胞活性化の指標である*c-fos* mRNA発現が増加した一方、過去の研究からグルコースセンサーの局在が示唆されている脳幹の孤束核では*c-fos* mRNAの増加はみられなかったことから、生体内で上衣細胞は独立してグルコース利用率の低下に反応できることがわかった。つまり、4Vの上衣細胞は、後脳においてグルコースセンサーとして機能していると考えられる。脳室を流れる脳脊髄液中のグルコース濃度は、血中グルコース濃度より低い値で維持されているものの、その変動は血中グルコース濃度と連動していることが報告されており(88,89)、過去の*in vitro*実験においても、細胞外グルコース濃度が低下すると後脳の上衣細胞内カルシウム濃度が上昇する。したがって、4Vの上衣細胞は脳脊髄液中のグルコースを取り込み、自身のグルコース利用率をモニターしていると考えられる。また、カテコールアミンやCRH、NPYは糖新生、摂食および生殖機能の制御に関与していることが知られている(79,90-93)。以上から、後脳グルコースセンシング機構では、4Vの上衣細胞がグルコース利用率の低下を感知し、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞やNPY神経細胞、視床下部のCRH神経細胞やNPY神経細胞が糖新生や摂食、生殖機能を制御している可能性が

示唆された。

後脳でグルコース利用率が低下すると、C2領域、C1領域およびA6領域のカテコールアミン作動性神経細胞ならびにC2領域のNPY神経細胞が活性化することが明らかとなった。後脳の上衣細胞は、細胞突起を脳幹実質へと伸ばしていることが報告されていることもあり(77)、4Vの上衣細胞により感知されたグルコース利用率の低下は、これらの脳幹に分布する神経細胞へシグナルとして伝達されている可能性が示唆される。また、これらの脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞とNPY神経細胞は、視床下部一下垂体一副腎軸を構成する視床下部室傍核のCRH神経細胞へ投射していることも知られている(73,94)。

さらに本実験では、C1領域を吻側と尾側に分割して解析し、尾側側に分布する細胞が後脳のグルコースセンシングに関与していることを示した。なお、C1領域の尾側側に分布するカテコールアミン作動性神経細胞も視床下部室傍核に投射することが知られている(73)。

以上から、4Vの上衣細胞により感知されたグルコース欠乏シグナルは、脳幹に分布するカテコールアミン作動性神経細胞やNPY神経細胞に伝達され、視床下部を介して糖新生や摂食、生殖機能を制御すると考えられる。もしくは、オスラットの後脳にNPYもしくはノルアドレナリンを投与すると、摂食量が増加することから(95)、脳幹のNPY神経細胞やカテコールアミン作動性神経細胞が直接摂食を誘起した可能性もある。また、本実験では、C2領域、C1領域およびA6領域の神経細胞の重要性が強調された。しかし、A2領域やAPにおいても2DG投与によってc-Fos免疫陽性細胞数が増加したことから、A2領域やAPの細胞もグルコースセンシングや後脳から視床下部へのシグナル伝達に関与していると言える。実

際に先行研究では、グルコースが欠乏した状態においてA2領域やAPが摂食や生殖機能を制御している可能性が示唆されている(96-98)。

本実験では、後脳でグルコース利用率が低下すると、活性化する視床下部室傍核の細胞にはCRH神経細胞が含まれていることが明らかとなった。CRHを頸静脈経路で投与すると、血中テストステロン濃度が低下することから(99)、本実験でみられたテストステロン分泌の抑制にも視床下部室傍核のCRH神経細胞が関与していると考えられる。ただし、視床下部室傍核のc-Fos免疫陽性細胞中の*Crh* mRNA発現細胞は約16%に留まった。さらに、エストロゲンチューブ留置卵巢除去ラットの4Vに2DGを投与すると、視床下部室傍核のダイノルフィンA神経細胞で*c-fos* mRNA発現が増加するほか、ダイノルフィンA拮抗剤を脳室内投与すると2DGを4Vに投与した時に生じるLH分泌の抑制が阻害されることから(50)、視床下部室傍核に分布しているダイノルフィンA神経細胞も、本実験において活性化し、生殖機能を抑制していた可能性がある。一方、ダイノルフィンA拮抗剤を脳室内投与しても2DGを4Vに投与した時に生じる糖新生は阻害されないため(50)、視床下部室傍核のCRH神経細胞は、主に糖新生の促進を制御しているとも考えられる。

4Vに2DGを投与すると、弓状核のNPY神経細胞が活性化したことから、視床下部のNPYシグナリングが後脳グルコースセンシングによる摂食制御に関与していることが本実験で明らかとなった。先行研究においても、絶食後の摂食量制御におけるNPY神経細胞の必要性は示唆されている(100)。また、副腎除去モデルラットを用いた実験ではNPYだけでなく、NPYと糖質コルチコイドの両方が摂食誘起に必要であることが明らかとなっ

ているほか(101)、視床下部室傍核へと投射している脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞がグルコース欠乏時の摂食誘起に必要であることが明らかとなっている(73,76,102)。以上から、4Vの上衣細胞がグルコース利用率の低下を感知すると、脳幹の神経細胞を介して、視床下部—下垂体—副腎軸および弓状核NPY神経細胞を活性化させることで摂食を誘起している可能性が示唆される。

過去の研究では、テストステロンチューブを皮下に留置することでテストステロン濃度を一定に保った去勢オスラットの4Vに2DGを投与すると、1時間投与した時点でLH分泌が抑制されたが(47)、本実験ではオスラットの4Vに2DGを1時間投与しても、LH分泌は抑制されなかった。この差は、用いた動物モデルの違いに起因すると考えられる。すなわち、本実験で用いたオスラットでは、血中テストステロン分泌が低下したことで、LH分泌が促進されてしまい、2DGのLH分泌抑制効果が打ち消された可能性が高い。また、このようなエネルギー状態に基づくLH分泌制御における動物モデルの差は、48時間絶食によるLH分泌の抑制効果においても確認されている(103)。

以上から本章では、4Vの上衣細胞がグルコースの利用率をもとにエネルギー状態をモニターし、低エネルギー状態となると、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞やNPY神経細胞ならびに視床下部のCRH神経細胞やNPY神経細胞を介して、糖新生や摂食、生殖機能を制御する可能性を示唆した(図2-10)。次章では、実際に4Vの上衣細胞が種々の神経細胞にシグナルを伝達することが可能か検証するため、4Vの上衣細胞と脳幹および視床下部の神経細胞との間に神経伝達経路が存在するかを明らかにした。



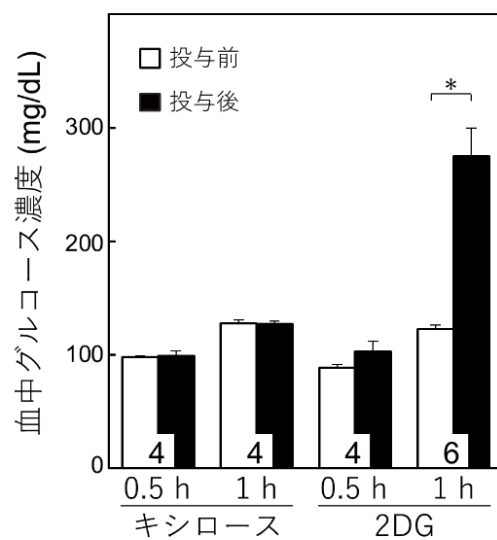


図 2-1 第 4 脳室 (4V) 投与した 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) がラットの血中グルコース濃度にもたらす影響

グラフは、2DG もしくはキシロースを第 4 脳室に投与する直前、投与してから 0.5 時間後および 1 時間後の血中グルコース濃度を示す。\* $P < 0.05$ , 対応のある  $t$  検定。数値は平均 ± 標準誤差。棒グラフ中の数字は使用した動物の数。

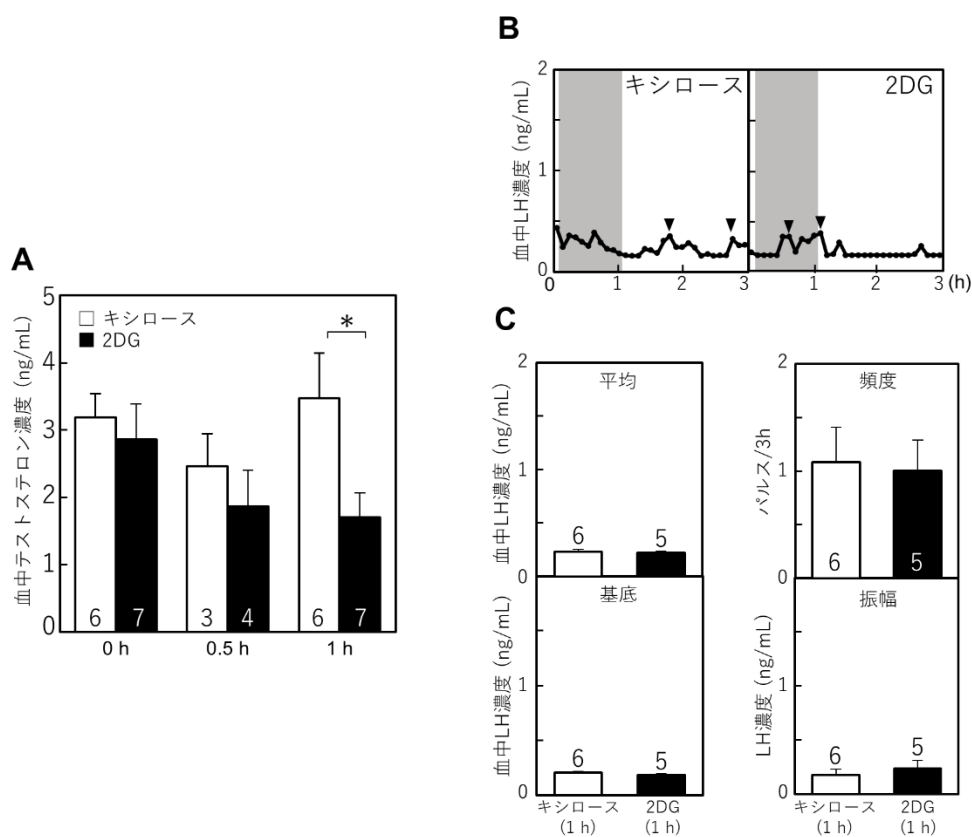


図 2-2 第 4 脳室 (4V) 投与した 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) がラットの血中テストステロン濃度および黄体形成ホルモン (LH) 分泌にもたらす影響

A、2DG もしくはキシロースを 4V に投与してから 0.5 時間後および 1 時間後の血中テストステロン濃度。 $*P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定。B、2DG もしくはキシロースを 4V に 1 時間投与した個体における、代表的な LH パルス分泌動態。矢頭は PULSAR により検出された LH パルスを指す。灰色の領域はキシロースもしくは 2DG を投与している時間をあらわす。C、2DG もしくはキシロースを第 4 脳室に 1 時間投与した個体における、3 時間のサンプリング中における平均および基底血中 LH 濃度、LH パルス頻度、LH パルス振幅。数値は平均±標準誤差。棒グラフ中の数字は使用した動物の数。

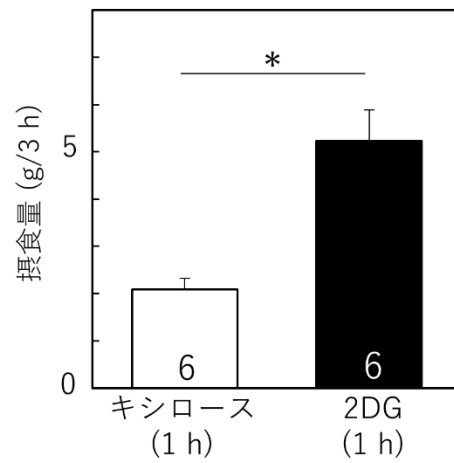


図 2-3 第 4 脳室 (4V) 投与した 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) がラットの摂食量にもたらす影響

グラフは、2DG もしくはキシロースを第 4 脳室に 1 時間投与してから 3 時間の摂食量を示す。  
\* $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定。数値は平均  $\pm$  標準誤差。棒グラフ中の数字は使用した動物の数。

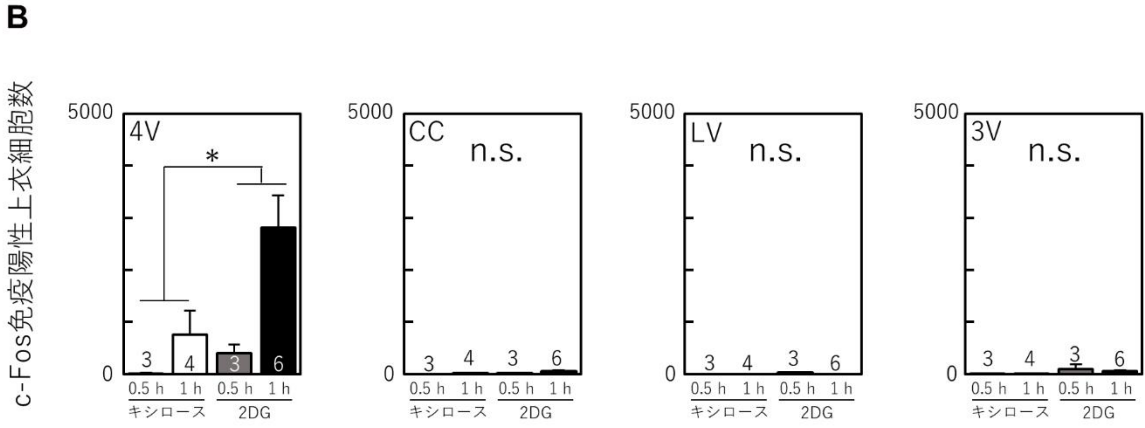
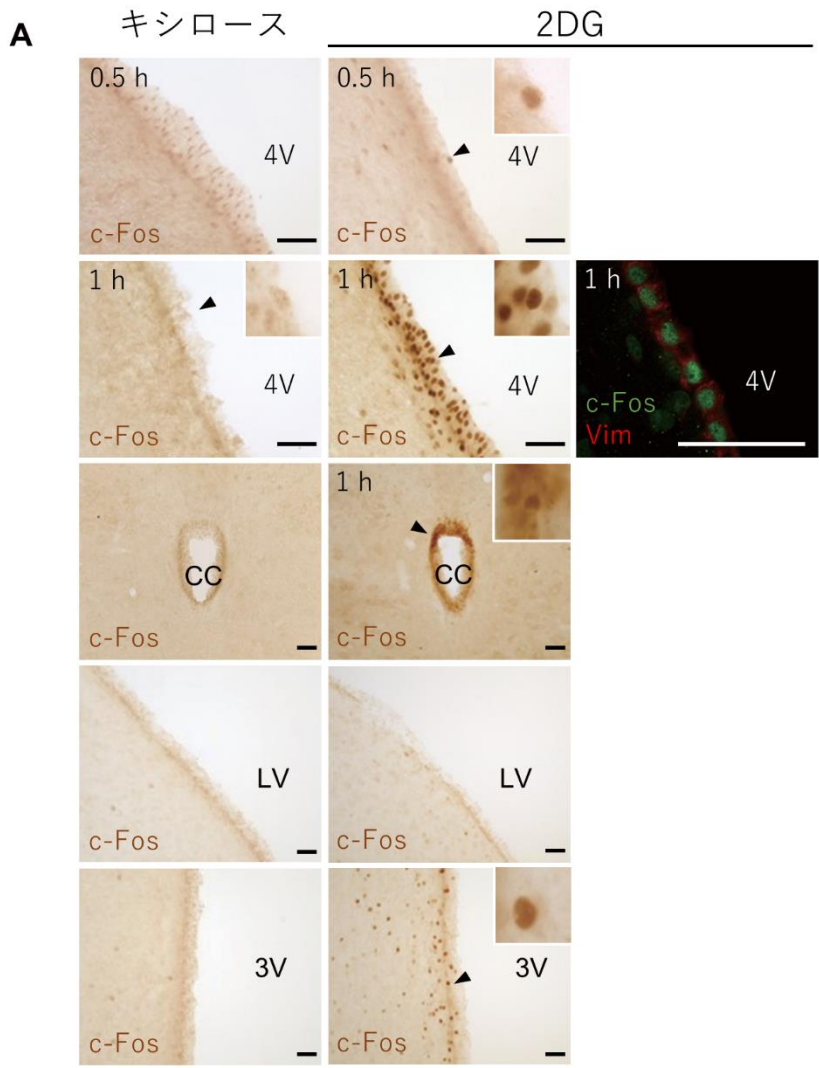


図 2-4 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) を第 4 脳室 (4V) に投与したラットの上衣細胞における c-Fos 発現

A、2DG を 4V に 0.5 時間もしくは 1 時間投与した個体の、4V、脊髓中心管 (CC)、側脳室 (LV) ならびに第 3 脳室 (3V) における代表的な c-Fos 免疫組織化学染色像。蛍光写真は、2DG を 1 時間投与したラットの 4V における、c-Fos (緑) および上衣細胞のマーカであるビメンチン (Vim、赤) 免疫陽性上衣細胞を示す。インセットは、矢頭が指す c-Fos 免疫陽性細胞の強拡大像。スケールバー：50  $\mu\text{m}$ 。B、グラフは、2DG もしくはキシロースを 4V に 0.5 時間もしくは 1 時間投与した個体の、4V、CC、LV および 3V における c-Fos 免疫陽性上衣細胞数を示す。 $*P < 0.05$ 、二元配置分散分析。n.s. (not significant) は有意差がなかったことを示す。数値は平均  $\pm$  標準誤差。棒グラフ中の数字は使用した動物の数。

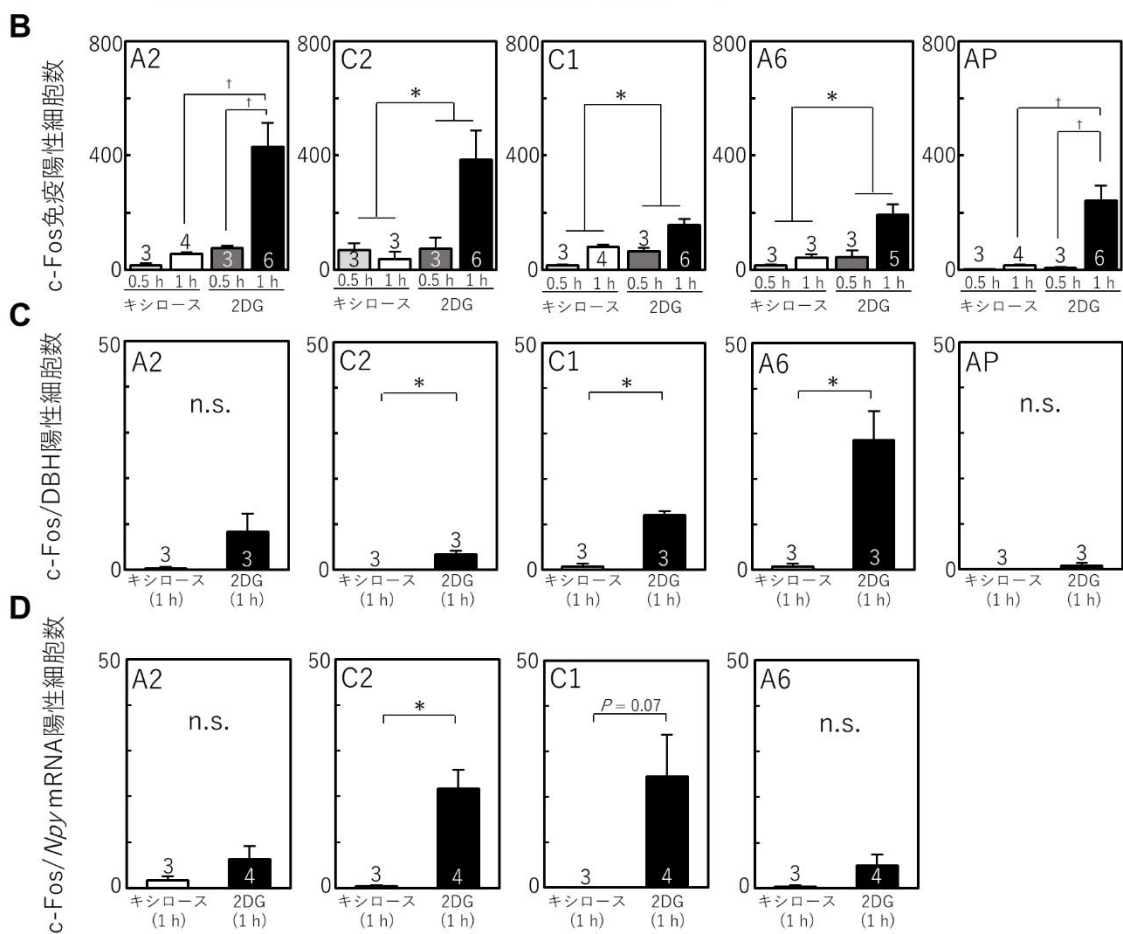
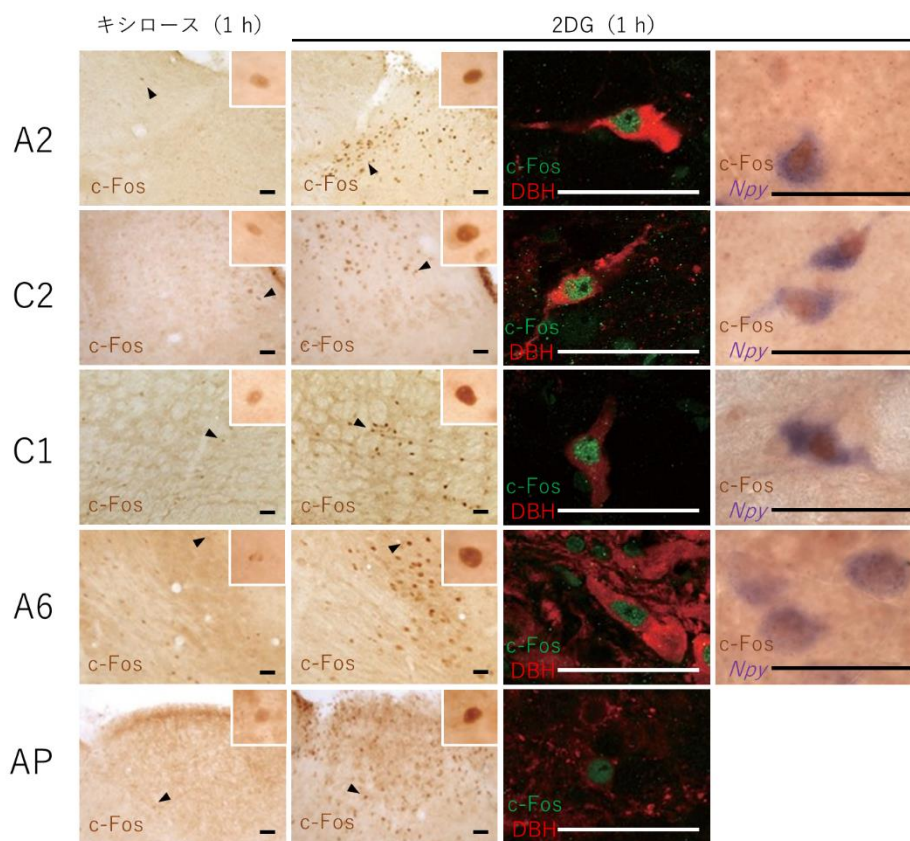


図 2-5 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) を第 4 脳室 (4V) に投与したラットの脳幹のカテコールアミン神経細胞およびニューロペプチド Y (NPY) 神経細胞における c-Fos 発現

A、2DG を 4V に 1 時間投与した個体の、A2 領域、C2 領域、C1 領域、A6 領域および最後野 (AP) における代表的な c-Fos 免疫組織化学染色像。蛍光写真は、2DG を 1 時間投与された個体の A2 領域、C2 領域、C1 領域、A6 領域および AP における、c-Fos (緑) およびカテコールアミン作動性神経細胞のマーカであるドーパミン- $\beta$ -ヒドロキシラーゼ (DBH、赤) 免疫陽性細胞を示す。右列は、2DG を 1 時間投与された個体の A2 領域、C2 領域、C1 領域および A6 領域における、c-Fos (茶) 免疫陽性 *Npy* mRNA (紫) 発現細胞を示す。インセットは、矢頭が指す c-Fos 免疫陽性細胞の強拡大像。スケールバー：50  $\mu$ m。B、グラフは、2DG もしくはキシロースを 4V に 0.5 時間もしくは 1 時間投与された個体の、A2 領域、C2 領域、C1 領域、A6 領域および AP における c-Fos 免疫陽性細胞数を示す。†  $P < 0.05$ 、二元配置分散分析および単純主効果検定。\* $P < 0.05$ 、二元配置分散分析。C、グラフは、2DG もしくはキシロースを 4V に 1 時間投与した個体の、A2 領域、C2 領域、C1 領域、A6 領域および AP における c-Fos および DBH 免疫陽性細胞数を示す。\* $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定。D、グラフは、2DG もしくはキシロースを 4V に 1 時間投与した個体の、A2 領域、C2 領域、C1 領域および A6 領域における c-Fos 免疫陽性 *Npy* mRNA 発現細胞数を示す。\* $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定。n.s. (not significant) は、有意差がなかったことを示す。数値は平均  $\pm$  標準誤差。棒グラフ中の数字は使用した動物の数。

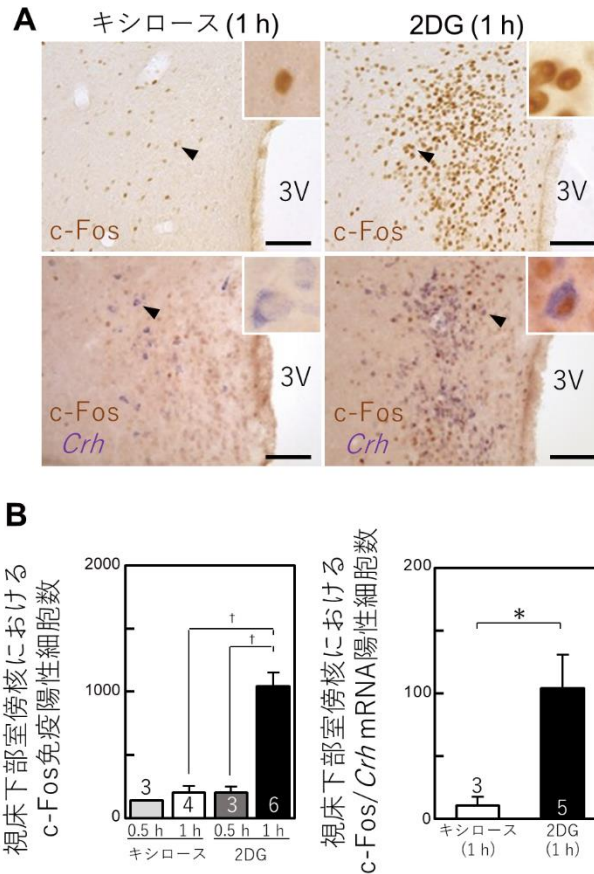


図 2-6 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) を第 4 脳室 (4V) に投与したラットの視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) 神経細胞における c-Fos 発現

A、2DG もしくはキシロースを 4V に 1 時間投与した個体の視床下部室傍核における c-Fos 免疫陽性細胞 (茶、上段)、ならびに c-Fos 免疫陽性 *Crh* mRNA 発現細胞 (下段)。インセットは 矢頭が指す c-Fos 免疫陽性細胞もしくは c-Fos 免疫陽性 *Crh* mRNA 発現細胞の強拡大像。スケールバー: 100  $\mu$ m。B、左グラフは、2DG もしくはキシロースを 4V に 0.5 時間もしくは 1 時間投与した個体の、視床下部室傍核における c-Fos 免疫陽性細胞数を示し、右グラフは 2DG もしくはキシロースを 4V に 1 時間投与した個体の、視床下部室傍核における c-Fos 免疫陽性 *Crh* mRNA 発現細胞数を示す。†  $P < 0.01$ 、二元配置分散分析および単純主効果検定。\* $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定。数値は平均  $\pm$  標準誤差。棒グラフ中の数字は使用した動物の数。



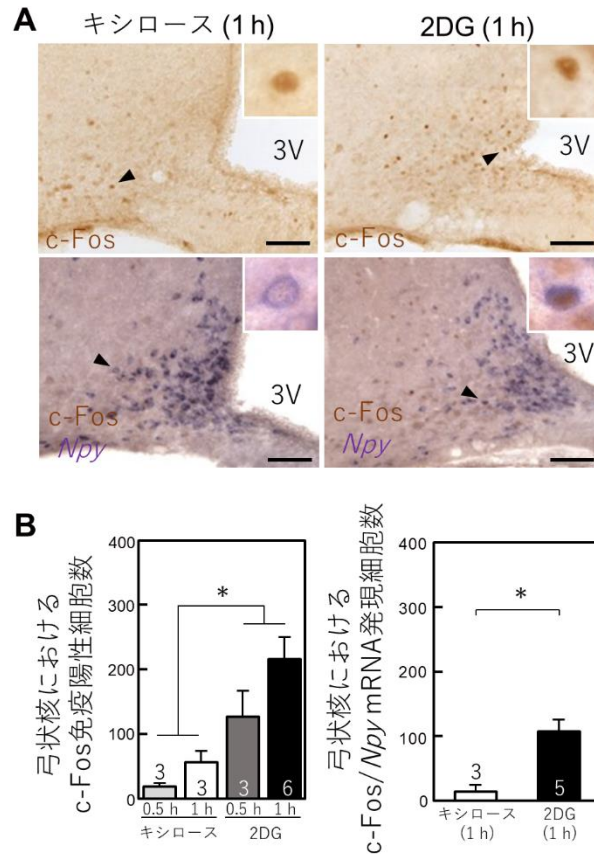


図 2-7 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) を第 4 脳室 (4V) に投与したラットの弓状核のニューロペプチド Y (NPY) 神経細胞における c-Fos 発現

A、2DG もしくはキシロースを 4V に 1 時間投与した個体の弓状核における c-Fos 免疫陽性細胞 (茶、上段)、ならびに c-Fos 免疫陽性 *Npy* mRNA 発現細胞 (下段)。インセットは、矢頭が指す c-Fos 免疫陽性細胞もしくは c-Fos 免疫陽性 *Npy* mRNA 発現細胞の強拡大像。スケールバー：100  $\mu$ m。B、左グラフは、2DG もしくはキシロースを 4V に 0.5 時間もしくは 1 時間投与した個体の、弓状核における c-Fos 免疫陽性細胞数を示し、右グラフは 2DG もしくはキシロースを 4V に 1 時間投与した個体の、弓状核における c-Fos 免疫陽性 *Npy* mRNA 発現細胞数を示す。\* $P < 0.05$ ；二元配置分散分析 (左グラフ)、スチューデントの *t* 検定 (右グラフ)。数値は平均  $\pm$  標準誤差。棒グラフ中の数字は使用した動物の数。

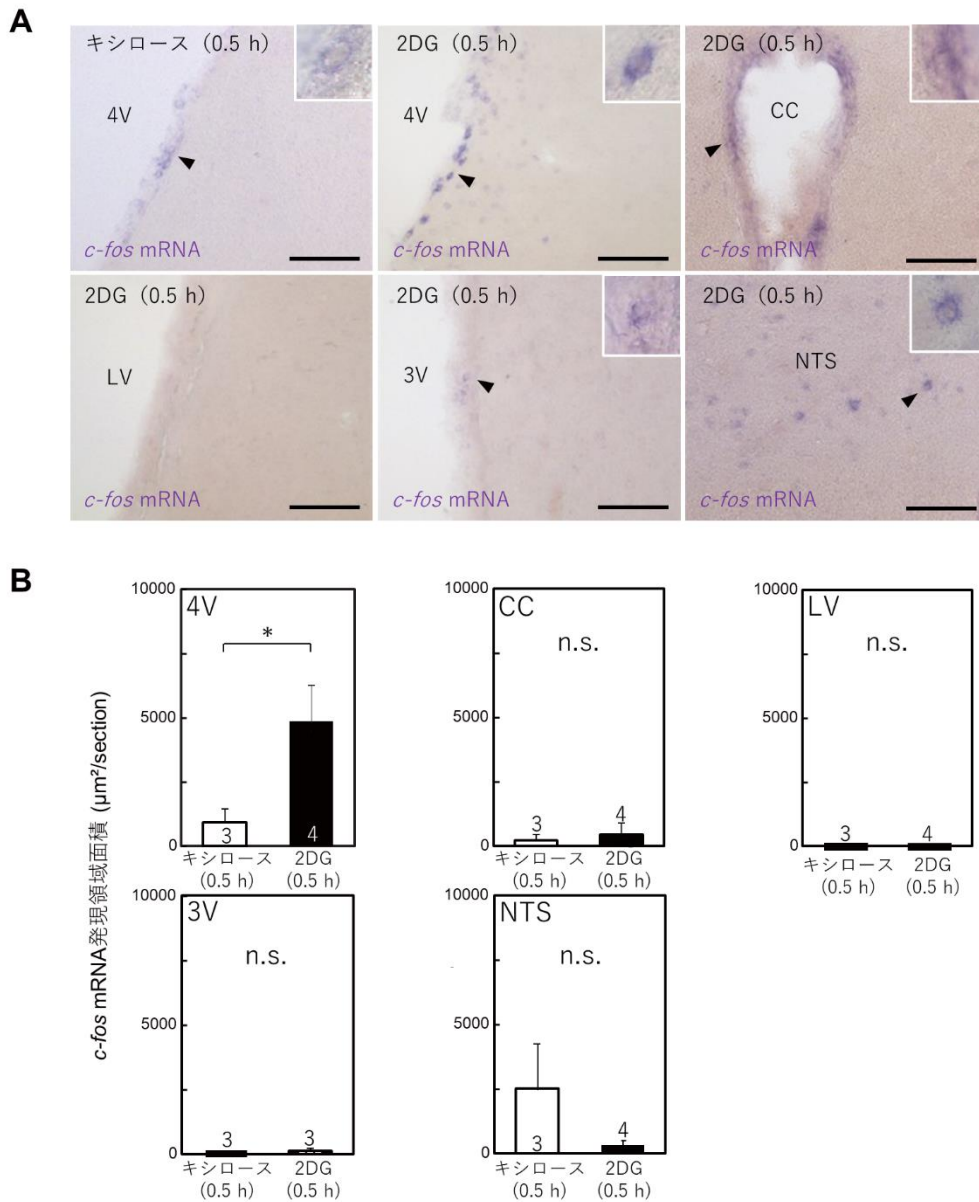


図 2-8 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) を第 4 脳室 (4V) に 0.5 時間投与した個体の *c-fos* mRNA の脳内発現

A、2DG を 4V に 0.5 時間投与した個体の、4V、脊髓中心管 (CC)、側脳室 (LV)、第 3 脳室 (3V) ならびに孤束核 (NTS) における *c-fos* mRNA (紫) 発現を示す代表的な染色像。インセットは、矢頭が指す *c-fos* mRNA 発現細胞の強拡大像。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。B、グラフは、2DG もしくはキシロースを 4V に 0.5 時間投与した個体の、4V、CC、LV および 3V の上皮細胞層ならびに NTS における、切片 1 枚あたりの *c-fos* mRNA 発現領域面積 ( $\mu\text{m}^2/\text{セクション}$ ) を示す。\* $P < 0.05$ 、スチューデントの  $t$  検定。n.s. (not significant) は有意差がなかったことを示す。数値は平均  $\pm$  標準誤差。棒グラフ中の数字は使用した動物の数。

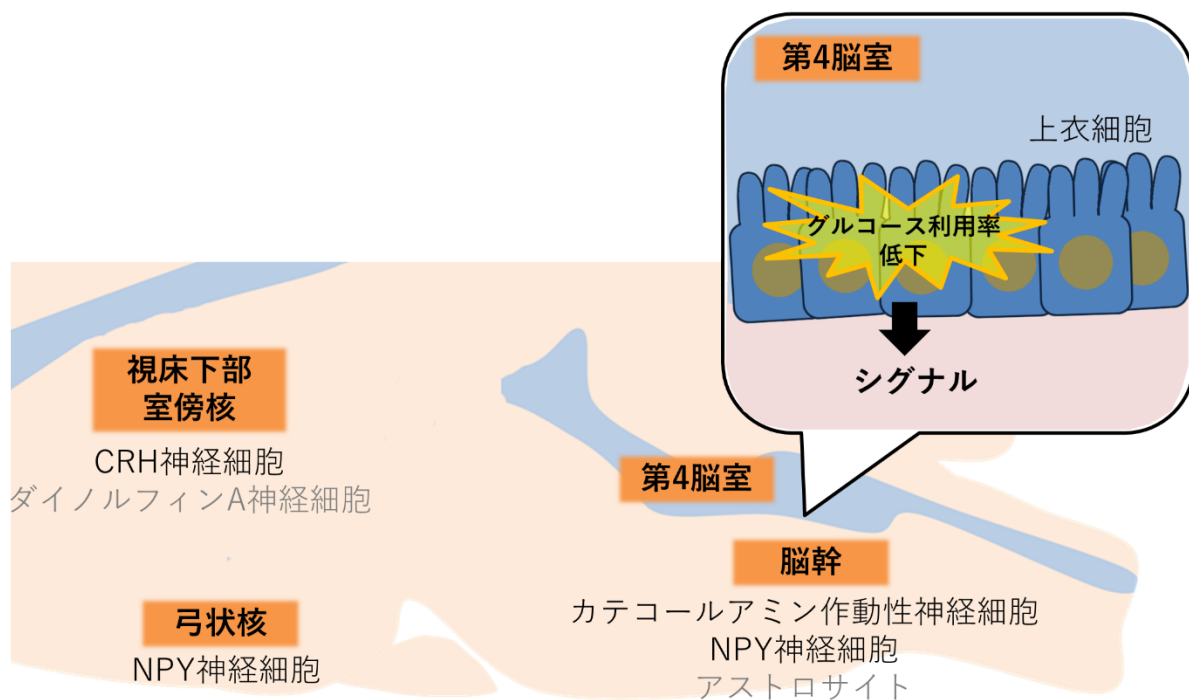


図 2-9 本章で示唆された後脳グルコースセンシングに関与する細胞群

第 4 脳室 (4V) の上皮細胞、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞およびニューロペプチド 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) 神経細胞ならびに弓状核の NPY 神経細胞が関与していることが明らかとなった。特に、4V の上皮細胞がグルコース利用率の低下を感知するセンサー細胞である可能性が示唆された。後脳グルコースセンシングには、他にも脳幹のアストロサイトや視床下部室傍核のダイノルフィン A 神経細胞が関与していると推測される。

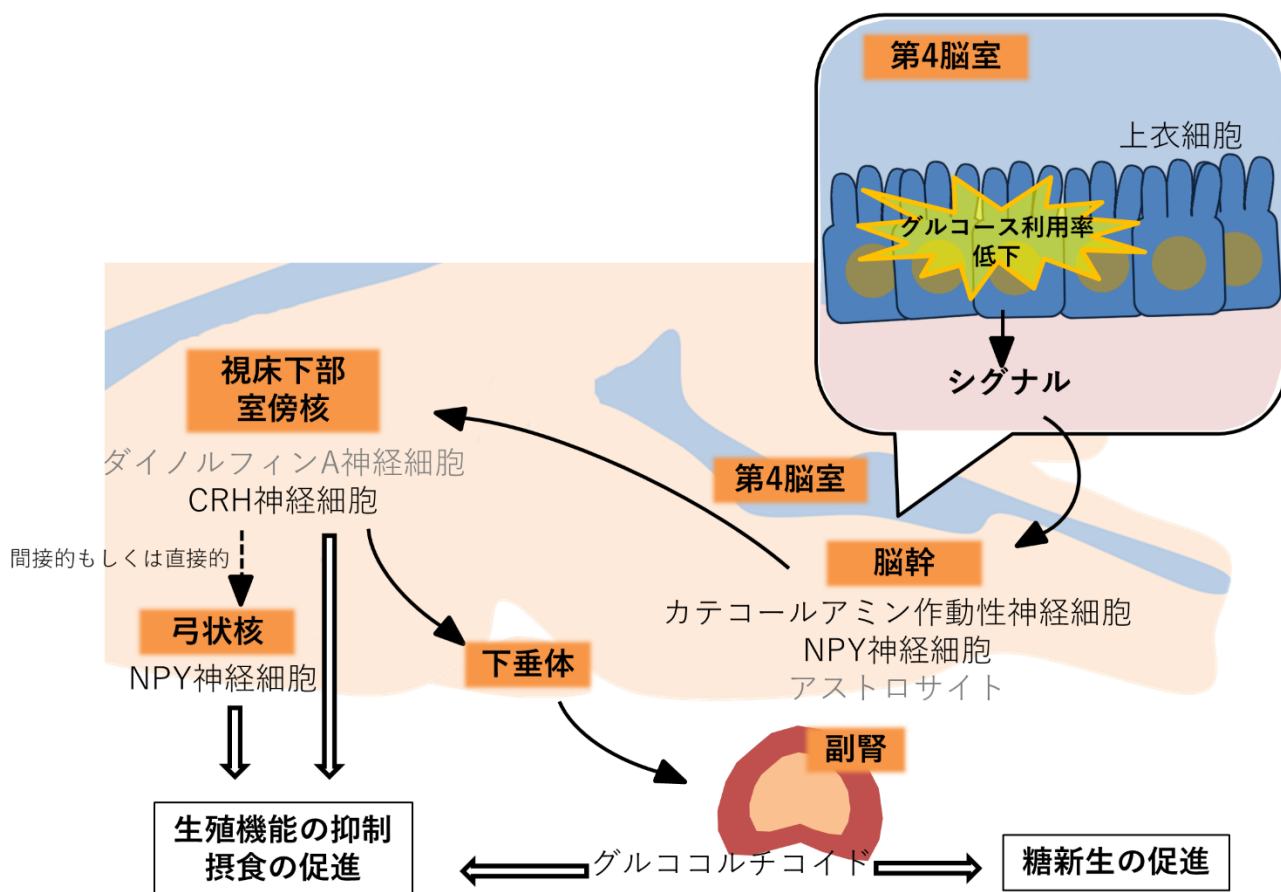


図 2-10 本章で示唆された後脳グルコースセンシング機構

第4脳室(4V)の上皮細胞がグルコース利用率の低下を感知すると、脳幹のカテコールアミン作動性神経細胞およびニューロペプチド 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) 神経細胞ならびに弓状核の NPY 神経細胞を介して、糖新生や摂食、生殖機能を制御する可能性が示唆された。他にも脳幹のアストロサイトや視床下部室傍核のダイノルフィン A 神経細胞も生理機能の制御、もしくは上皮細胞からのシグナル伝達に関与していると推測される。

## 第3章

# 後脳と視床下部を連絡する神経伝達経路の同定 およびその形成に関する解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出  
版予定。

























































## 第 4 章

# 上衣細胞剥離モデルラットを用いた 上衣細胞の機能の検討



本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内に出  
版予定。









































## 第5章

# 上皮細胞をセンサー細胞とする 後脳グルコースセンシングが機能する 生理的条件の検討

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内  
に出版予定。

















































## 第 6 章

### 総合考察

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内  
に出版予定。





























## 参考文献

1. Claude B. Introduction à L'etude De la Médecine Expérimentale. Translated by Miura T. Iwanami Shoten;1970.
2. Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*. 1929;9(3):399-431.
3. The Society for Reproduction and Development. Textbook of reproduction and development. EDUWARD Press; 2013.
4. Barrett EK, Barman MS, Boitano S, Brooks LH. Ganong's Review of Medical Physiology. 25th edition. McGraw-Hill Education; 2019.
5. Morrison SF, Nakamura K. Central mechanisms for thermoregulation. *Annual Review of Physiology*. 2019;81(1):285-308.
6. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal Control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2015;10(7):1257.
7. Chapelot D, Charlot K. Physiology of energy homeostasis: Models, actors, challenges and the glucoadipostatic loop. *Metabolism*. 2019;92:11-25.
8. Schneider JE, Wise JD, Benton NA, Brozek JM, Keen-Rhinehart E. When do we eat? Ingestive behavior, survival, and reproductive success. *Hormones and Behavior*. 2013;64(4):702-728.
9. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*. 2014;4(1):177-197.
10. Röder P, Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48(3):e219.
11. Wade GN, Schneider JE, Li HY. Control of fertility by metabolic cues. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1996;270(1):E1-E19.
12. Gittleman JL, Thompson SD. Energy allocation in mammalian reproduction. *American Zoologist*. 1988;28(3):863-875.
13. Zigman JM, Elmquist JK. Minireview: From anorexia to obesity—the yin and yang of body weight control. *Endocrinology*. 2003;144(9):3749-3756.
14. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 9th edition. 2019.
15. World Health Organization. Obesity and overweight. 2021.
16. Deloitte Access Economics. The social and economic cost of eating disorders in the United States of America: A report for the strategic training Initiative for the prevention of eating disorders and the academy for eating disorders. 2020.
17. Curran KA, Pitt PD. The reproductive impact of eating disorders in adolescents. *Seminars in Reproductive Medicine*. on line. 2022.
18. Butler W. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal reproduction science*. 2000;60-61:449-457.
19. Beam SW, Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first

- ovulation in postpartum dairy cows. *Journal of reproduction and fertility Supplement*. 1999;54:411-424.
20. Roche JF, Mackey D, Diskin MD. Reproductive management of postpartum cows. *Animal Reproduction Science*. 2000;60-61:703-712.
  21. Dobson H, Walker S, Morris M, Routly J, Smith R. Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal*. 2008;2(8):1104-1111.
  22. Nigussie T. A review on the role of energy balance on reproduction of dairy cow. *Journal of Dairy Research & Technology*. 2018;1(1):003.
  23. Livestock Improvement Association of Japan, Inc.. *LIAJ News*. 2005;93:6-15.
  24. Zanker CL. Regulation of reproductive function in athletic women: an investigation of the roles of energy availability and body composition. *British journal of sports medicine*. 2006;40(6):489-490.
  25. Rothman Douglas L, Magnusson I, Katz Lee D, Shulman Robert G, Shulman Gerald I. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with <sup>13</sup>C NMR. *Science*. 1991;254(5031):573-576.
  26. Sherwin Rs Fau - Saccà L, Saccà L. Effect of epinephrine on glucose metabolism in humans: contribution of the liver. *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1984;247(2):E157-E165.
  27. Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;872:99-126.
  28. Zheng H, Wan J, Shan Y, Song X, Jin J, Su Q, Chen S, Lu X, Yang J, Li Q, Song Y, Li B. MicroRNA-185-5p inhibits hepatic gluconeogenesis and reduces fasting blood glucose levels by suppressing G6Pase. *Theranostics*. 2021;11(16):7829-7843.
  29. Anderson GH, Catherine NLA, Woodend DM, Wolever TMS. Inverse association between the effect of carbohydrates on blood glucose and subsequent short-term food intake in young men. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76(5):1023-1030.
  30. Janssen P, Vanden Berghe P, Verschueren S, Lehmann A, Depoortere I, Tack J. Review article: the role of gastric motility in the control of food intake. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2011;33(8):880-894.
  31. Concepción-Zavaleta M, Paz Ibarra JL, Ramos-Yataco A, Coronado-Arroyo J, Concepción-Urteaga L, Roseboom PJ, Williams CA. Assessment of hormonal status in male infertility. An update. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2022;16(3):102447.
  32. Guezennec CY, Ferre P, Serrurier B, Merino D, Pesquies PC. Effects of prolonged physical exercise and fasting upon plasma testosterone level in rats. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 1982;49(2):159-168.
  33. Cameron JL, Weltzin TE, McConaha C, Helmreich DL, Kaye WH. Slowing of pulsatile

- luteinizing hormone secretion in men after forty-eight hours of fasting. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1991;73(1):35-41.
34. Cagampang FRA, Maeda KI, Tsukamura H, Ohkura S, Ôta K. Involvement of ovarian steroids and endogenous opioids in the fasting-induced suppression of pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Journal of Endocrinology*. 1991;129(3):321-328.
  35. Tanaka T, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y. Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Animal Reproduction Science*. 2002;72(3):185-196.
  36. Cameron JL, Nosbisch C. Suppression of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion during short term food restriction in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*)\*. *Endocrinology*. 1991;128(3):1532-1540.
  37. Le Foll C. Hypothalamic fatty acids and ketone bodies sensing and role of FAT/CD36 in the regulation of food Intake. *Frontiers in Physiology*. 2019;10(1036).
  38. Heeley N, Blouet C. Central amino acid sensing in the control of feeding behavior. *Frontiers in Endocrinology*. 2016;7(148).
  39. Ritter S, Li AJ, Wang Q, Dinh TT. Minireview: The value of looking backward: The essential role of the hindbrain in counterregulatory responses to glucose deficit. *Endocrinology*. 2011;152(11):4019-4032.
  40. Jeckelmann JM, Erni B. Transporters of glucose and other carbohydrates in bacteria. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2020;472(9):1129-1153.
  41. Costa B, Nahas E. Growth and enzymatic responses of phytopathogenic fungi to glucose in culture media and soil. *Brazilian journal of microbiology*. 2012;43(1):332-340.
  42. Geiger D. Plant glucose transporter structure and function. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2020;472(9):1111-1128.
  43. Soengas JL, Aldegunde M. Energy metabolism of fish brain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 2002;131(3):271-296.
  44. Haselton AT, Fridell YWC. Adult *Drosophila melanogaster* as a model for the study of glucose homeostasis. *Aging*. 2010;2(8):523-526.
  45. Nakrani MN, Wineland RH, Anjum F. Physiology, glucose metabolism. *StatPearls*; 2021.
  46. Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neuroscience*. 2013;36(10):587-597.
  47. Murahashi K, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL, Maeda KI. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinology*. 1996;137(4):1171-1176.
  48. Kinoshita M, Moriyama R, Tsukamura H, Maeda KI. A rat model for the energetic regulation of gonadotropin secretion: role of the glucose-sensing mechanism in the brain. *Domestic Animal Endocrinology*. 2003;25(1):109-120.

49. Nagatani S, Bucholtz DC, Murahashi K, Estacio MA, Tsukamura H, Foster DL, Maeda KI. Reduction of glucose availability suppresses pulsatile luteinizing hormone release in female and male rats. *Endocrinology*. 1996;137(4):1166-1170.
50. Tsuchida H, Mostari P, Yamada K, Miyazaki S, Enomoto Y, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H. Paraventricular dynorphin A neurons mediate LH pulse suppression induced by hindbrain glucoprivation in female rats. *Endocrinology*. 2020;161(11).
51. MacDonald PE, Joseph JW, Rorsman P. Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2005;360(1464):2211-2225.
52. Hevener AL, Bergman RN, Donovan CM. Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein. *Diabetes*. 1997;46(9):1521.
53. Novin D, VanderWeele D, Rezek M. Infusion of 2-deoxy-D-glucose into the hepatic-portal system causes eating: evidence for peripheral glucoreceptors. *Science*. 1973;181(4102):858-860.
54. Liu MT, Seino S, Kirchgessner AL. Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system. *The Journal of Neuroscience*. 1999;19(23):10305.
55. Pardal R, López-Barneo J. Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nature Neuroscience*. 2002;5(3):197-198.
56. Anand BK, Brobeck JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1951;24(2):123-140.
57. Hetherington AW, Ranson SW. The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1942;136(4):609-617.
58. Anand BK, Chhina GS, Sharma KN, Dua S, Singh B. Activity of single neurons in the hypothalamic feeding centers: effect of glucose. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1964;207(5):1146-1154.
59. Oomura Y, Kimura K, Ooyama H, Maeno T, Iki M, Kuniyoshi M. Reciprocal activities of the ventromedial and lateral hypothalamic areas of cats. *Science*. 1964;143(3605):484-485.
60. Sun JS, Yang DJ, Kinyua AW, Yoon SG, Seong JK, Kim J, Moon SJ, Shin DM, Choi YH, Kim KW. Ventromedial hypothalamic primary cilia control energy and skeletal homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(1).
61. Ibrahim N, Bosch MA, Smart JL, Qiu J, Rubinstein M, Rønnekleiv OK, Low MJ, Kelly MJ. Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express KATP channels. *Endocrinology*. 2003;144(4):1331-1340.
62. Muroya S, Yada T, Shioda S, Takigawa M. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neuroscience Letters*. 1999;264(1):113-116.

63. McFadden SA, Menchella JA, Chalmers JA, Centeno ML, Belsham DD. Glucose responsiveness in a novel adult-derived GnRH cell line, mHypoA-GnRH/GFP: Involvement of AMP-activated protein kinase. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;377(1):65-74.
64. Roland AV, Moenter SM. Glucosensing by GnRH neurons: Inhibition by androgens and involvement of AMP-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology*. 2011;25(5):847-858.
65. Claude B. *Lecons de physiologie experimentale appliquee a la medecine: faites au college de France*. J.B. Bailliere et fils; 1855.
66. Miselis R, Epstein A. Feeding induced by intracerebroventricular 2-deoxy-D-glucose in the rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 1975;229(5):1438-1447.
67. DiRocco RJ, Grill HJ. The forebrain is not essential for sympathoadrenal hyperglycemic response to glucoprivation. *Science*. 1979;204(4397):1112-1114.
68. Ritter RC, Slusser PG, Stone S. Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: location in the hindbrain. *Science*. 1981;213(4506):451.
69. Ritter S, Dinh TT, Zhang Y. Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Research*. 2000;856(1):37-47.
70. Maekawa F, Toyoda Y, Torii N, Miwa I, Thompson RC, Foster DL, Tsukahara S, Tsukamura H, Maeda K. Localization of glucokinase-like immunoreactivity in the rat lower brain stem: for possible location of brain glucose-sensing mechanisms. *Endocrinology*. 2000;141(1):375-384.
71. Minabe S, Deura C, Ikegami K, Goto T, Sanbo M, Hirabayashi M, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. Pharmacological and morphological evidence of AMPK-mediated energy sensing in the lower brain stem ependymocytes to control reproduction in female rodents. *Endocrinology*. 2015;156(6):2278-2287.
72. Moriyama R, Tsukamura H, Kinoshita M, Okazaki H, Kato Y, Maeda K. In vitro increase in intracellular calcium concentrations induced by low or high extracellular glucose levels in ependymocytes and serotonergic neurons of the rat lower brainstem. *Endocrinology*. 2004;145(5):2507-2515.
73. Ritter S, Bugarith K, Dinh TT. Immunotoxic destruction of distinct catecholamine subgroups produces selective impairment of glucoregulatory responses and neuronal activation. *Journal of Comparative Neurology*. 2001;432(2):197-216.
74. Li AJ, Wang Q, Ritter S. Selective pharmacogenetic activation of catecholamine subgroups in the ventrolateral medulla elicits key glucoregulatory responses. *Endocrinology*. 2018;159(1):341-355.
75. Maeda K, Cagampang FR, Coen CW, Tsukamura H. Involvement of the catecholaminergic input to the paraventricular nucleus and of corticotropin-releasing hormone in the fasting-induced suppression of luteinizing hormone release in female

- rats. *Endocrinology*. 1994;134(4):1718-1722.
76. l'Anson H, Sundling LA, Roland SM, Ritter S. Immunotoxic destruction of distinct catecholaminergic neuron populations disrupts the reproductive response to glucoprivation in female rats. *Endocrinology*. 2003;144(10):4325-4331.
  77. Deura C, Minabe S, Ikegami K, Inoue N, Uenoyama Y, Maeda KI, Tsukamura H. Morphological analysis for neuronal pathway from the hindbrain ependymocytes to the hypothalamic kisspeptin neurons. *Journal of Reproduction and Development*. 2019; 2019;65(2):129-137.
  78. Morris BJ. Neuronal localisation of neuropeptide Y gene expression in rat brain. *Journal of Comparative Neurology*. 1989;290(3):358-368.
  79. Clark JT, Kalra PS, Kalra SP. Neuropeptide Y stimulates feeding but inhibits sexual behavior in rats. *Endocrinology*. 1985;117(6):2435-2442.
  80. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience*. 1998;1(4):271-272.
  81. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Elsevier/Academic Press;2009.
  82. Tsukamura H, Maeda KI. Serial blood sampling technique using unrestraint and non-anesthetic rats[in Japanese]. *Newsletter of Japan Society for Comparative Endocrinology*. 1997;23(86):17-22.
  83. Merriam GR, Wachter KW. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1982;243(4):E310-E318.
  84. Nakamura S, Uenoyama Y, Ikegami K, Dai M, Watanabe Y, Takahashi C, Hirabayashi M, Tsukamura H, Maeda KI. Neonatal kisspeptin is steroid-independently required for defeminisation and peripubertal kisspeptin-induced testosterone is required for masculinisation of the brain: A behavioural study using *Kiss1* knockout rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 2016;28(10).
  85. Scharner S, Prinz P, Goebel-Stengel M, Kobelt P, Hofmann T, Rose M, Stengel A. Activity-based anorexia reduces body weight without inducing a separate food intake microstructure or activity phenotype in female rats-mediation via an activation of distinct brain nuclei. *Frontiers in neuroscience*. 2016;10:475-475.
  86. Wittmann G, Farkas E, Szilvasy-Szabo A, Gereben B, Fekete C, Lechan RM. Variable proopiomelanocortin expression in tanycytes of the adult rat hypothalamus and pituitary stalk. *Journal of Comparative Neurology*. 2017;525(3):411-441.
  87. Dvoryanchikov G, Tomchik SM, Chaudhari N. Biogenic amine synthesis and uptake in rodent taste buds. *Journal of Comparative Neurology*. 2007;505(3):302-313.
  88. Iwata K, Kinoshita M, Yamada S, Imamura T, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI. Involvement of brain ketone bodies and the noradrenergic pathway in diabetic

- hyperphagia in rats. *The Journal of Physiological Sciences*. 2011;61(2):103-113.
89. Jacob RJ, Fan X, Evans ML, Dziura J, Sherwin RS. Brain glucose levels are elevated in chronically hyperglycemic diabetic rats: No evidence for protective adaptation by the blood brain barrier. *Metabolism - Clinical and Experimental*. 2002;51(12):1522-1524.
90. Brown MR, Fisher LA, Spiess J, Rivier C, Rivier J, Vale W. Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology*. 1982;111(3):928-931.
91. Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin,  $\beta$ -endorphin, and corticosterone\*. *Endocrinology*. 1982;110(1):272-278.
92. Su Y, Foppen E, Fliers E, Kalsbeek A. Effects of intracerebroventricular administration of neuropeptide Y on metabolic gene expression and energy metabolism in male rats. *Endocrinology*. 2016;157(8):3070-3085.
93. Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. 1984;115(1):427-429.
94. Sahu A, Kalra SP, Crowley WR, Kalra PS. Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain Research*. 1988;457(2):376-378.
95. Taylor K, Lester E, Hudson B, Ritter S. Hypothalamic and hindbrain NPY, AGRP and NE increase consummatory feeding responses. *Physiology & Behavior*. 2007;90(5):744-750.
96. Hyde TM, Miselis RR. Effects of area postrema/caudal medial nucleus of solitary tract lesions on food intake and body weight. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1983;244(4):R577-R587.
97. Schneider JE, Zhu Y. Caudal brain stem plays a role in metabolic control of estrous cycles in Syrian hamsters. *Brain Research*. 1994;661(1-2):70-74.
98. Schneider JE, Finnerty BC, Swann JM, Gabriel JM. Glucoprivic treatments that induce anestrus, but do not affect food intake, increase FOS-like immunoreactivity in the area postrema and nucleus of the solitary tract in Syrian hamsters. *Brain Research*. 1995;698(1):107-113.
99. Norman RL. Effects of corticotropin-releasing hormone on luteinizing hormone, testosterone, and cortisol secretion in intact male rhesus macaques<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 1993;49(1):148-153.
100. Lambert PD, Wilding JP, al-Dokhayel AA, Bohuon C, Comoy E, Gilbey SG, Bloom SR. A role for neuropeptide-Y, dynorphin, and noradrenaline in the central control of food intake after food deprivation. *Endocrinology*. 1993;133(1):29-32.
101. Zakrzewska KE, Sainsbury A, Cusin I, Rouru J, Jeanrenaud B, Rohner-Jeanrenaud FO. Selective dependence of intracerebroventricular neuropeptide Y-elicited effects on

- central glucocorticoids\*. *Endocrinology*. 1999;140(7):3183-3187.
102. Nagatani S, Tsukamura H, Murahashi K, Bucholtz DC, Foster DL, Maeda K. Paraventricular norepinephrine release mediates glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*. 1996;137(8):3183-3186.
  103. Tsukamura H, Yamada S, Maeda KI. Fasting-induced changes in pulsatile luteinizing hormone (LH) Secretion in male rats: The role of testosterone and the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Reproduction and Development*. 2000;46(4):227-234.
  104. Nagae M, Uenoyama Y, Okamoto S, Tsuchida H, Ikegami K, Goto T, Majarune S, Nakamura S, Sanbo M, Hirabayashi M, Kobayashi K, Inoue N, Tsukamura H. Direct evidence that KNDy neurons maintain gonadotropin pulses and folliculogenesis as the GnRH pulse generator. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(5):e2009156118.
  105. Cázarez-Márquez F, Eliveld J, Ritsema WIGR, Foppen E, Bossenbroek Y, Pelizzari S, Simonneaux V, Kalsbeek A. Role of central kisspeptin and RFRP-3 in energy metabolism in the male Wistar rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 2021;33(7):e12973.
  106. Saleeba C, Dempsey B, Le S, Goodchild A, McMullan S. A student's guide to neural circuit tracing. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13(897).
  107. Shibata H, Suzuki T, Matsushita M. Afferent projections to the interpeduncular nucleus in the rat, as studied by retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology*. 1986;248(2):272-284.
  108. Shipley M. Transport of molecules from nose to brain: transneuronal anterograde and retrograde labeling in the rat olfactory system by wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase applied to the nasal epithelium. *Brain research bulletin*. 1985;15(2):129-142.
  109. Vigh B, Manzano e Silva M, Frank C, Vincze C, Czirok S, Szabó A, Lukats A, Szél A. The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histology and histopathology*. 2004.
  110. Walling SG, Brown R, Miyasaka N, Yoshihara Y, Harley C. Selective wheat germ agglutinin (WGA) uptake in the hippocampus from the locus coeruleus of dopamine- $\beta$ -hydroxylase-WGA transgenic mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2012;6.
  111. Caron E, Ciofi P, Prevot V, Bouret SG. Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function. *The Journal of Neuroscience*. 2012;32(33):11486.
  112. Zeiss CJ. Comparative milestones in rodent and human postnatal central nervous system development. *Toxicologic Pathology*. 2021;49(8):1368-1373.
  113. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of



- feeding behavior in mice. *The Journal of Neuroscience*. 2004;24(11):2797.
114. Kiriwara Y, Takechi M, Kurosaki K, Kobayashi Y, Kurosawa T. Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. *Experimental Animals*. 2013;62(3):173-180.
  115. Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Experimental Animals*. 2011;60(5):481-487.
  116. Balčiūnaitė-Murzienė G, Dzikaras M. Wheat germ agglutinin—from toxicity to biomedical applications. *Applied Sciences*. 2021;11(2).
  117. Ganat YM, Silbereis J, Cave C, Ngu H, Anderson GM, Ohkubo Y, Ment LR, Vaccarino FM. Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells *in vivo*. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(33):8609.
  118. Paxinos G, Franklin BJK. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates. 4th edition. Academic Press;2012.
  119. Yeo SH, Kyle V, Blouet C, Jones S, Colledge WH. Mapping neuronal inputs to Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *PLOS ONE*. 2019;14(3):e0213927.
  120. Gonzalez-Santander R. Electron-microscopic study of the secretion of the ependymal cells in the domestic cat (ependymin- $\beta$  cells). *Cells Tissues Organs*. 1979;103(3):266-277.
  121. Oomura Y, Sasaki K, Suzuki K, Muto T, Li AJ, Ogita Z, Hanai K, Tooyama I, Kimura H, Yanaihara N. A new brain glucosensor and its physiological significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1992;55(1):278S-282S.
  122. Robinson SR, Noone DF, O'Dowd BS. Ependymocytes and supra-ependymal axons in rat brain contain glutamate. *Glia*. 1996;17(4):345-348.
  123. Rogers RC, Burke SJ, Collier JJ, Ritter S, Hermann GE. Evidence that hindbrain astrocytes in the rat detect low glucose with a glucose transporter 2-phospholipase C-calcium release mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2019;318(1):R38-R48.
  124. Mizuno Y, Oomura Y. Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: In vitro study. *Brain Research*. 1984;307(1):109-116.
  125. Buchanan AR, Hill RM. Temperature regulation in albino rats correlated with determinations of myelin density in the hypothalamus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1947;66(3):602-608.
  126. Bailoo JD, Voelkl B, Varholick J, Novak J, Murphy E, Rosso M, Palme R, Würbel H. Effects of weaning age and housing conditions on phenotypic differences in mice. *Scientific Reports*. 2020;10(1):11684.
  127. Itoh T, Quastel JH. Acetoacetate metabolism in infant and adult rat brain in vitro. *Biochemical Journal*. 1970;116(4):641-655.
  128. Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A. Glucose and ketone body utilization by the brain of

- neonatal rats. *Progress in Neurobiology*. 1993;40(2):163-220.
129. Del Carmen Gómez-Roldán M, Pérez-Martín M, Capilla-González V, Cifuentes M, Pérez J, García-Verdugo JM, Fernández-Llebrez P. Neuroblast proliferation on the surface of the adult rat striatal wall after focal ependymal loss by intracerebroventricular injection of neuraminidase. *Journal of Comparative Neurology*. 2008;507(4):1571-1587.
  130. Gromnicova R, Kaya M, Romero IA, Williams P, Satchell S, Sharrack B, Male D. Transport of gold nanoparticles by vascular endothelium from different human tissues. *PLOS ONE*. 2016;11(8):e0161610.
  131. Tissir F, Qu Y, Montcouquiol M, Zhou L, Komatsu K, Shi D, Fujimori T, Labeau J, Tyteca D, Courtoy P, Poumay Y, Uemura T, Goffinet AM. Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nature Neuroscience*. 2010;13(6):700-707.
  132. Wang S, Lv W, Zhang H, Liu Y, Li L, Jefferson JR, Guo Y, Li M, Gao W, Fang X, Paul IA, Rajkowska G, Shaffery JP, Mosley TH, Hu X, Liu R, Wang Y, Yu H, Roman RJ, Fan F. Aging exacerbates impairments of cerebral blood flow autoregulation and cognition in diabetic rats. *GeroScience*. 2020;42(5):1387-1410.
  133. Hu H, Zhu T, Gong L, Zhao Y, Shao Y, Li S, Sun Z, Ling Y, Tao Y, Ying Y, Lan C, Xie Y, Jiang P. Transient receptor potential melastatin 2 contributes to neuroinflammation and negatively regulates cognitive outcomes in a pilocarpine-induced mouse model of epilepsy. *International Immunopharmacology*. 2020;87:106824.
  134. Li AJ, Wang Q, Dinh TT, Ritter S. Simultaneous silencing of *Npy* and *Dbh* expression in hindbrain A1/C1 catecholamine cells suppresses glucoprivic feeding. *The Journal of Neuroscience*. 2009;29(1):280.
  135. Granados-Durán P, López-Ávalos MD, Grondona JM, Gómez-Roldán MdC, Cifuentes M, Pérez-Martín M, Alvarez M, Rodríguez de Fonseca F, Fernández-Llebrez P. Neuroinflammation induced by intracerebroventricular injection of microbial neuraminidase. *Frontiers in Medicine*. 2015;2(14).
  136. Fioramonti X, Contié S, Song Z, Routh VH, Lorsignol A, Pénicaud L. Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus. *Diabetes*. 2007;56(5):1219.
  137. Moriyama R, Reyes BA, Tsukamura H, Maeda K. Glucoprivation-induced Fos expression in the hypothalamus and medulla oblongata in female rats. *Journal of Reproduction and Development*. 2003;49(2):151-157.
  138. Kreisman MJ, Tadrousse KS, McCosh RB, Breen KM. Neuroendocrine basis for disrupted ovarian cyclicity in female mice during chronic undernutrition. *Endocrinology*. 2021;162(8).
  139. Knuth U, Friesen H. Starvation induced anoestrus: effect of chronic food restriction on body weight, its influence on oestrous cycle and gonadotrophin secretion in rats.

- European Journal of Endocrinology*. 1983;104(4):402-409.
140. Minabe S, Uenoyama Y, Tsukamura H, Maeda KI. Analysis of pulsatile and surge-like luteinizing hormone secretion with frequent blood sampling in female mice. *Journal of Reproduction and Development*. 2011;57(5):660-664.
  141. Maeda KI, Tsukamura H, Uchida E, Ohkura N, Ohkura S, Yokoyama A. Changes in the pulsatile secretion of LH after the removal of and subsequent resuckling by pups in ovariectomized lactating rats. *Journal of Endocrinology*. 1989;121(2):277-283.
  142. Chen J, Cheng M, Wang L, Zhang L, Xu D, Cao P, Wang F, Herzog H, Song S, Zhan C. A vagal-NTS neural pathway that stimulates feeding. *Current Biology*. 2020;30(20):3986-3998.e3985.
  143. Silver TS, Todd JK. Hypoglycorrhachia in pediatric patients. *Pediatrics*. 1976;58(1):67-71.
  144. Viola GM. Extreme hypoglycorrhachia: not always bacterial meningitis. *Nature Reviews Neurology*. 2010;6(11):637-641.
  145. Anderson JN, Peck EJ, Clark SB. Estrogen-induced uterine responses and growth: relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei. *Endocrinology*. 1975;96(1):160-167.
  146. Kato R. Species differences in drug metabolism—Overview from animals to man—[in Japanese]. *Experimental Animals*. 1981;30(4):507-517.
  147. Rohrbach A, Caron E, Dali R, Brunner M, Pasquettaz R, Kolotuev I, Santoni F, Thorens B, Langlet F. Ablation of glucokinase-expressing tanycytes impacts energy balance and increases adiposity in mice. *Molecular Metabolism*. 2021;53:101311.
  148. Orellana JA, Sáez PJ, Cortés-campos C, Elizondo RJ, Shoji KF, Contreras-Duarte S, Figueroa V, Velarde V, Jiang JX, Nualart F, Sáez JC, García MA. Glucose increases intracellular free Ca<sup>2+</sup> in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia*. 2012;60(1):53-68.
  149. Bolborea M, Pollatzek E, Benford H, Sotelo-Hitschfeld T, Dale N. Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(25):14473.
  150. Lhomme T, Clasadonte J, Imbernon M, Fernandois D, Sauve F, Caron E, da Silva Lima N, Heras V, Martinez-Corral I, Mueller-Fielitz H, Rasika S, Schwaninger M, Nogueiras R, Prevot V. Tanycytic networks mediate energy balance by feeding lactate to glucose-insensitive POMC neurons. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021;131(18).
  151. Engström Ruud L, Pereira MMA, de Solis AJ, Fenselau H, Brüning JC. NPY mediates the rapid feeding and glucose metabolism regulatory functions of AgRP neurons. *Nature Communications*. 2020;11(1):442.
  152. Saito R, Tanaka K, Nishimura H, Nishimura K, Sonoda S, Ueno H, Motojima Y, Yoshimura M, Maruyama T, Yamamoto Y, Kusuhara K, Ueta Y. Centrally administered

- kisspeptin suppresses feeding via nesfatin-1 and oxytocin in male rats. *Peptides*. 2019;112:114-124.
153. Glowa JR, Barrett JE, Russell J, Gold PW. Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors. *Peptides*. 1992;13(3):609-621.
  154. Takumi K, Iijima N, Higo S, Ozawa H. Immunohistochemical analysis of the colocalization of corticotropin-releasing hormone receptor and glucocorticoid receptor in kisspeptin neurons in the hypothalamus of female rats. *Neuroscience Letters*. 2012;531(1):40-45.
  155. Yip SH, Liu X, Hessler S, Cheong I, Porteous R, Herbison AE. Indirect suppression of pulsatile LH Secretion by CRH neurons in the female mouse. *Endocrinology*. 2021;162(3):bqaa237.
  156. Israel Y, Kandov Y, Khaimova E, Kest A, Lewis SR, Pasternak GW, Pan YX, Rossi GC, Bodnar RJ. NPY-induced feeding: pharmacological characterization using selective opioid antagonists and antisense probes in rats. *Peptides*. 2005;26(7):1167-1175.
  157. Singh SR, Briski KP. Septopreoptic  $\mu$  opioid receptor mediation of hindbrain glucoprivic inhibition of reproductive neuroendocrine function in the female rat. *Endocrinology*. 2004;145(11):5322-5331.
  158. Tsuchida H, Kawai N, Yamada K, Takizawa M, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H. Central  $\mu$ -opioid receptor antagonism blocks glucoprivic LH pulse suppression and gluconeogenesis/feeding in female rats. *Endocrinology*. 2021;162(10).
  159. Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y. An inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2001;281(3):C922-C931.
  160. Fujita A, Inanobe A, Hibino H, Nielsen S, Ottersen OP, Kurachi Y. Clustering of Kir4.1 at specialized compartments of the lateral membrane in ependymal cells of rat brain. *Cell and Tissue Research*. 2015;359(2):627-634.
  161. Alex A, Luo Q, Mathew D, Di R, Bhatwadekar AD. Metformin corrects abnormal circadian rhythm and Kir4.1 channels in diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2020;61(6):46-46.
  162. Sibille J, Dao Duc K, Holcman D, Rouach N. The neuroglial potassium cycle during neurotransmission: Role of Kir4.1 channels. *PLOS Computational Biology*. 2015;11(3):e1004137.
  163. Yao ST, Barden JA, Finkelstein DI, Bennett MR, Lawrence AJ. Comparative study on the distribution patterns of P2X1–P2X6 receptor immunoreactivity in the brainstem of the rat and the common marmoset (*Callithrix jacchus*): Association with catecholamine cell groups. *Journal of Comparative Neurology*. 2000;427(4):485-507.
  164. Yao ST, Barden JA, Lawrence AJ. On the immunohistochemical distribution of

- ionotropic P2X receptors in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuroscience*. 2001;108(4):673-685.
165. Berthoud H-R, Earle T, Zheng H, Patterson LM, Phifer C. Food-related gastrointestinal signals activate caudal brainstem neurons expressing both NMDA and AMPA receptors. *Brain Research*. 2001;915(2):143-154.
  166. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*. 2008;3(3):265-278.
  167. Hamilton LK, Truong MKV, Bednarczyk MR, Aumont A, Fernandes KJL. Cellular organization of the central canal ependymal zone, a niche of latent neural stem cells in the adult mammalian spinal cord. *Neuroscience*. 2009;164(3):1044-1056.
  168. Robins SC, Stewart I, McNay DE, Taylor V, Giachino C, Goetz M, Ninkovic J, Briancon N, Maratos-Flier E, Flier JS, Kokoeva MV, Placzek M.  $\alpha$ -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nature Communications*. 2013;4(1):2049.
  169. Langlet F. Tanycyte gene expression dynamics in the regulation of energy homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10(286).
  170. Monge Argilés JA, Palacios Ortega F, Vila Sobrino JA, Bautista Prados J, Pérez Vicente JA, Morales Ortiz A, Palao Sánchez A. Brainstem lesions decrease heart rate variability. *Neurologia*. 2000;15(4):158-163.
  171. Benarroch EE. Brainstem respiratory chemosensitivity: New insights and clinical implications. *Neurology*. 2007;68(24):2140.
  172. Borowsky IW, Collins RC. Metabolic anatomy of brain: A comparison of regional capillary density, glucose metabolism, and enzyme activities. *Journal of Comparative Neurology*. 1989;288(3):401-413.
  173. MacNeill C, Bryan RM. Regional cerebral glucose utilization transiently increases during mild hypoxia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1988;8(4):495-501.
  174. Prothmann C, Wellard J, Berger J, Hamprecht B, Verleysdonk S. Primary cultures as a model for studying ependymal functions: glycogen metabolism in ependymal cells. *Brain Research*. 2001;920(1):74-83.
  175. Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Research*. 1993;623(2):208-214.
  176. Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 2007;55(12):1263-1271.
  177. Ahn SI, Sei YJ, Park HJ, Kim J, Ryu Y, Choi JJ, Sung HJ, MacDonald TJ, Levey AI, Kim Y. Microengineered human blood-brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms. *Nature Communications*. 2020;11(1):175.
  178. Takeda M. Current status and promising future of nasal drug delivery [in Japanese].

*Folia Pharmacologica Japonica*. 2017;150(3):148-152.

179. Lv H, Tang L, Guo C, Jiang Y, Gao C, Wang Y, Jian C. Intranasal insulin administration may be highly effective in improving cognitive function in mice with cognitive dysfunction by reversing brain insulin resistance. *Cognitive neurodynamics*. 2020;14(3):323-338.