

視床下部背内側核ガラニン神経の 摂食調節作用

椎谷 友博

新潟大学大学院医歯学総合研究科薬理学分野

(主任：樋口宗史教授)

Effect of Galanin Neurons in the Dorsomedial Nucleus in the Feeding Behavior

Tomohiro SHIYA

Division of Pharmacology

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Hiroshi HIGUCHI)

要 旨

中枢での摂食制御は視床下部に存在する摂食関連神経ペプチドが重要な働きをしている。その中でニューロペプチド Y (NPY) は最も強い摂食誘導作用を示す。マウスに絶食負荷を行うと視床下部弓状核 (ARC) での NPY 発現が増加し、これによって摂食行動が促進される。別の摂食関連神経ペプチドであるガラニンは、NPY と同様に摂食を誘導する作用を持ち、脳内へ投与すると摂食行動が促進される。しかし、ガラニンが脳内でどのようなメカニズムで摂食行動を調節しているかは不明である。今回の研究では、野生型マウス (C57BL/6N) に 50 時間絶食負荷を施し、視床下部のどの神経核でガラニン遺伝子発現が変化しているか検討するために *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、絶食負荷によって視床下部背内側核 (DMN) でのガラニン mRNA 発現が増加した。この神経核には、ARC から摂食誘導性の NPY 神経が投射しており、NPY 受容体 (Y1 受容体, Y5 受容体) が発現している。そのため、絶食負荷によるガラニン mRNA 増加が Y1 受容体及び Y5 受容体を介して引き起こされるという仮説を立て、Y1 受容体又は Y5 受容体をノックアウトしたマウスに絶食負荷を行い、絶食による DMN でのガラニン mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検討した。その結果、Y1 受容体又は Y5 受容体をノックアウトしたマウスでは、DMN でのガラニン発現増加が消失した。さらに、DMN での Y1 受容体及び Y5 受容体を siRNA 発現ベクターによりノックダウンすることでも、絶食負荷によるガラニン発現増加が消失した。さらに、通常では絶食後の再摂食行動が促進されるが、DMN での Y1 受容体及び Y5 受容体をノックダウンすることで、絶食後の再摂食行動増加が抑制された。これらの結果より、DMN に発現するガラニン神経は、NPY による Y1 受容体及び Y5 受容体を介して活性化され、絶食後の摂食行動増加に関与していると考えられた。

キーワード：ガラニン, ニューロペプチド Y (NPY), 背内側核 (DMN), 弓状核 (ARC)

Reprint requests to: Tomohiro SHIYA
Division of Pharmacology
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科薬理学分野

椎谷 友博

緒 言

摂食行動は視床下部摂食中枢の神経細胞に存在する20種類あまりの摂食関連ペプチド遺伝子の発現により精密に調節されている。絶食負荷は摂食行動を強く誘導する生理的シグナルである。代表的な摂食神経ペプチドであるNPYは36個のアミノ酸から成るC末がアミド化されたペプチドで、中枢神経系および末梢神経系に豊富に存在する。視床下部のNPYは摂食及びエネルギー調節に重要な役割を果たしていると考えられる¹⁾。NPYは視床下部に最も多量に存在する神経ペプチドの一つで、弓状核 (ARC) で産生されNPY自身の遊離を介して摂食を促進する。NPY受容体は7回膜貫通Gタンパク質共役受容体で、Y1受容体からy6のサブタイプが知られており²⁾³⁾、特にY1受容体とY5受容体が摂食亢進作用に深く関係している^{4)–6)}。

一方、同じく摂食誘導作用を持つガラニンは29アミノ酸から成る、C末がアミド化されたペプチドでブタの腸より単離された⁷⁾。また、ほ乳類では末梢神経及び中枢神経にガラニン及びガラニン受容体が広く分布している⁸⁾。ガラニンは様々な生理機能に関与しており、情動、記憶、学習、痛覚、摂食、などへ関与していると考えられている^{9)–14)}。ガラニンは視索前野核内側部 (MPOM)、青斑核 (LC)、ARCなど様々な部位で産生される¹⁵⁾¹⁶⁾。また、室傍核 (PVN) や視床下部背内側核 (DMN) などの部位はガラニンの生理機能に関係すると考えられている。ガラニンはNPYと同じように摂食誘導作用があり、実際にPVNにガラニンを投与すると摂食増加が観察される¹⁷⁾。DMNにはNPY受容体が存在し、ARCに細胞を持つNPY神経がDMNに投射していることが知られている^{18)–22)}。

NPYは絶食負荷によりARCでの産生増加²³⁾ および遊離増加²⁴⁾ が報告されているが、ガラニンは絶食に関して視床下部のどの部位で遺伝子発現が増加するのか詳細はよく解っていない。そこで今回の研究ではマウスに絶食負荷を施し、ガラニン遺伝子発現がどの部位で変化するのかを検討

した結果、DMNでのガラニン mRNA 発現が絶食負荷により増加することを見出した。そこで、DMNでのガラニン神経がY1受容体及びY5受容体を介して絶食時遊離されるNPYにより、ガラニン mRNA 発現量を増加させ、そのことが絶食時の摂食行動を誘導しているか検討するために、Y1受容体及びY5受容体を siRNA 発現ベクター投与によってノックダウンし、摂食行動への影響を検討した。

方 法

動物

雄性 C57BL/6N マウスをチャールズリバー (横浜) より購入した。雄性 ICR マウスは日本 SLC (浜松) より購入した。動物は室内温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、12時間ごとの明暗サイクル (明期 6:00–18:00, 暗期 18:00–6:00) で行った。全ての動物実験は新潟大学動物実験規則に沿って行った。

実験デザイン

8週齢雄性 C57BL/6N マウスを3匹/ケージに分け、自由摂食、自由飲水条件下で1週間予備飼育を行った。その後、2群に群分けを行い、1群は自由飲水下で50時間絶食を行った。もう1群は対照群として自由飲水、自由摂食で飼育を行った。その後、CO₂ 麻酔後、解剖し脳を摘出した。脳内でのガラニン遺伝子発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した。

8週齢雄性 ICR マウスを1匹/ケージに分け、自由摂食、自由飲水条件下で1週間予備飼育を行った。予備飼育後、ネブタール麻酔下で pRNA-U6.1-Y1受容体 siRNA/Hygro (Y1受容体 siRNA) ベクター及び pRNA-U6.1-Y5受容体 siRNA/Hygro (Y5受容体 siRNA) ベクターを $1\mu\text{g}$ ずつ導入試薬であるリポフェクトアミン 2000 (インビトロゲン) と共に視床下部背内側核へ投与した。脳内投与には脳定位固定装置 SR-5 (ナリシゲ) を使用し、プラグマ縫合を基準点として尾側: -1.70 mm 、外側: $\pm 0.25\text{ mm}$ 、深度: -4.8 mm の位置に投与を行った。siRNA 配列を含まな

い pRNA-U6.1/Hygro (Empty) ベクターを同量投与し対照群とした。ベクター投与6日後、48時間絶食負荷を行い、再摂食を行った。ベクター投与11日後まで摂食量、摂水量、体重を12時間ごとに計測した。その後、マウスをCO₂麻酔下で解剖し脳を摘出した。摘出した脳を用いて摂食関連遺伝子発現を *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて検討した。

in situ ハイブリダイゼーション

マウス解剖後、摘出した脳をドライアイスで凍結し-80℃で保存した。クライオスタット(ライカ)を用いて10μm厚の脳切片を作製し、マスコートスライドガラス(松浪)に貼り付けた。アンチセンスプローブ及びセンスプローブはジゴキシゲニンでラベルしたものを使用した。*in situ* ハイブリダイゼーションの大部分の行程は室温(20℃)で行った。まず始めに4%パラホルムアルデヒド/PB(pH 7.4)で20分間固定した。プロテイナーゼK(10μg/ml)で5分間処理した後、0.25%無水酢酸(pH 8.0)で10分間処理を行った。その後、エタノール溶液(70-100%)及びクロロホルムで段階的に脱水処理を行った。ハイブリダイゼーション溶液は50%ホルムアミド、20 mM Tris-HCl(pH 8.0)、0.3 M NaCl、5 mM EDTA(pH 8.0)、10%デキストラン硫酸ナトリウム、0.25%ドデシル硫酸ナトリウム、200(μg/ml)酵母 tRNA、200μg/ml サケ精子 DNA、1×デンハート溶液を含有する。ジゴキシゲニンラベルしたアンチセンスプローブ及びセンスプローブは塩化リチウム存在下でエタノール沈殿により精製し、ハイブリダイゼーション溶液に1μg/mlとなるように溶解した。ハイブリダイゼーション溶液を脳切片へ滴下しカバーした後、42℃で16時間ハイブリさせた。その後、スライドを5×SSC、50%ホルムアミド/1×SSCを用いて50℃で30分間ずつ洗浄し、RNase 溶液(RNase 40μg/ml、10 mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.5 M NaCl、1 mM EDTA)処理を37℃で30分間行った。2×SSC及び0.2×SSCを用いて50℃で20分間ずつ洗浄し、バッファーA(0.2%ツイーン、0.1 M Tris-

HCl(pH 7.5)、0.15 M NaCl)で5分間洗浄した。その後、ブロッキング溶液を用いて4℃で1晩処理した。アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体(ロシュ)を600倍希釈したものをを用いて3時間処理を行った。抗体処理後、バッファーAで15分間2回洗浄し、バッファーB(0.2%ツイーン、0.1 M Tris-HCl(pH 9.5)、0.1 M NaCl、0.05 M MgCl₂)を用いて3分間処理した。その後、BCIP/NBT 溶液(ロシュ)を用いて発色反応を行った。光学顕微鏡エクリプス TE300(ニコン)を用いて標本を観察し、デジタルカメラ D70(ニコン)を用いて写真撮影を行った。画像をイメージゲージ(ニコン)を用いて解析し、ハイブリダイズした細胞の発色強度を計測した。

免疫染色

マウスを35%飽水クロライドで麻酔し、4%パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸バッファー(pH 7.4)で灌流固定した。その後、ピブラトーム(堂阪)を用いて40μm厚の切片を作製した。NPY受容体及びガラニンのタンパク質局在を検討するために各々に対する一次抗体を用いて4℃で24時間反応を行った。一次抗体を洗浄後、AlexaFluor 488 標識抗モルモット抗体(インビトロゲン)及びAlexaFluor 555 標識抗ウサギ又は抗ヒツジ抗体(インビトロゲン)を用いて4℃で12時間反応を行った。その後、脳切片をレーザー共焦点顕微鏡 FV 300(オリンパス)を用いて画像取得した。

一次抗体

抗ガラニンモルモットポリクローナル抗体(ペニンストラ)、抗Y1受容体ポリクローナル抗体(バイオジェネシス)、抗Y5受容体ポリクローナル抗体(サンタクルーズ)を使用した。

siRNA 発現ベクター

siRNA 発現ベクターにはU6プロモーター含有pRNAU6.1/Hygroベクター(ジーンスクリプト)を使用した。pRNA-U6.1-Y1受容体 siRNA/Hygroベクターは、Y1受容体遺伝子の20塩基に

相同性を持つ配列 (5'-GATCCCGTTCAAGCGAA TGTATATCTTGTGATATCCGCAAGATATACA TTCGCTTGAATTTTTTCCAAA-3') を二本鎖にして pRNAU6.1/Hygro ベクターの Bam HI/Hind III サイトに組み込んで作製した。70 塩基の内、21 塩基が目的遺伝子のターゲット配列で間に 10 塩基のスペーサー配列を含有している。pRNA-U6.1-Y5 受容体 siRNA/Hygro ベクターも同様に、Y5 受容体遺伝子の 20 塩基に相同性を持つ配列 (5'-GATCCCGTTAAACTACTAGAG GCAGGATTGATATCCGTCCTGCCTCTAGTATG TTTAATTTTTTCCAAA-3') を二本鎖にして pRNAU6.1/Hygro ベクターの Bam HI/Hind III サイトに組み込んで作製した。

統計処理

Student t-test による統計処理で危険率 5% 未満を有意とした。

結 果

絶食負荷による NPY 発現への影響

50 時間絶食負荷することで、ARC での NPY mRNA 発現が増加しているか検討するために *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、絶食負荷することで ARC での NPY mRNA 発現が有意に増加した (細胞数: 対照群 45.2 ± 1.3 , 絶食負荷群 68.7 ± 1.8 , 総強度: 対照群 1.0 ± 0.0 , 絶食負荷群 2.0 ± 0.1) (図 1)。このことは 2 日間の絶食負荷による NPY 神経の活性化が著しく生じていることを示している。

DMN でのガラニン神経と NPY 受容体との共局在

DMN には多くのガラニン mRNA 及びガラニンペプチドが発現する。DMN には NPY 神経終末が存在することが知られているので、ガラニン発現神経が NPY 受容体 Y1 受容体及び Y5 受容体を含有しているか免疫染色により検討した。その結果、DMN でのガラニン発現神経に Y1 受容体及び Y5 受容体の共存が確認された (図 2)。NPY 神経終末からガラニン神経への伝達があることが示

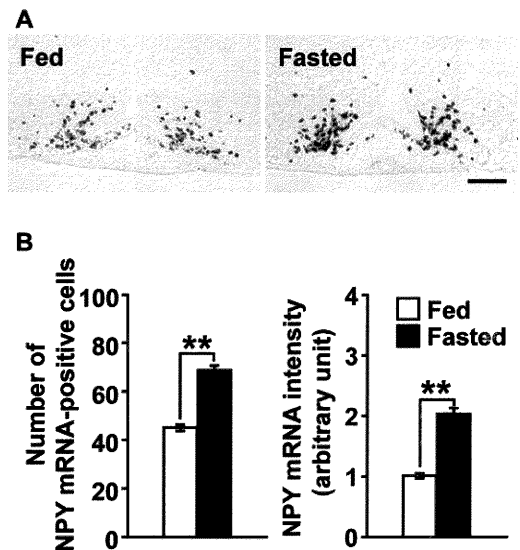


図 1 絶食負荷による視床下部弓状核 (ARC) での NPY mRNA 発現増加

A. ARC での NPY mRNA 発現を示す。自由摂食 (Fed) に対して、絶食負荷 (Fasted) することによって、ARC での NPY mRNA 発現が増加した。スケールは $100 \mu\text{m}$ を示す。

B. 絶食負荷後の ARC での NPY mRNA 発現レベルの解析結果を示す。結果は平均値±標準誤差で示す ($n = 4$)。統計解析は Student t-test を使用し、危険率 5% 未満を統計的有意と見なした (** : $p < 0.01$)。

唆された。

絶食負荷による視床下部でのガラニン mRNA 発現への影響

50 時間絶食負荷することで、NPY 遺伝子発現は上昇し、NPY 遊離が促進することが知られている²⁴⁾。この時に視床下部でのガラニン mRNA 発現が変化しているか検討するために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、絶食負荷することで DMN でのガラニン mRNA 発現が有意に増加した (細胞数: 対照群 48.3 ± 1.7 , 絶食負荷群 74.5 ± 4.0 , 総強度: 対照群 1.0 ± 0.1 ,

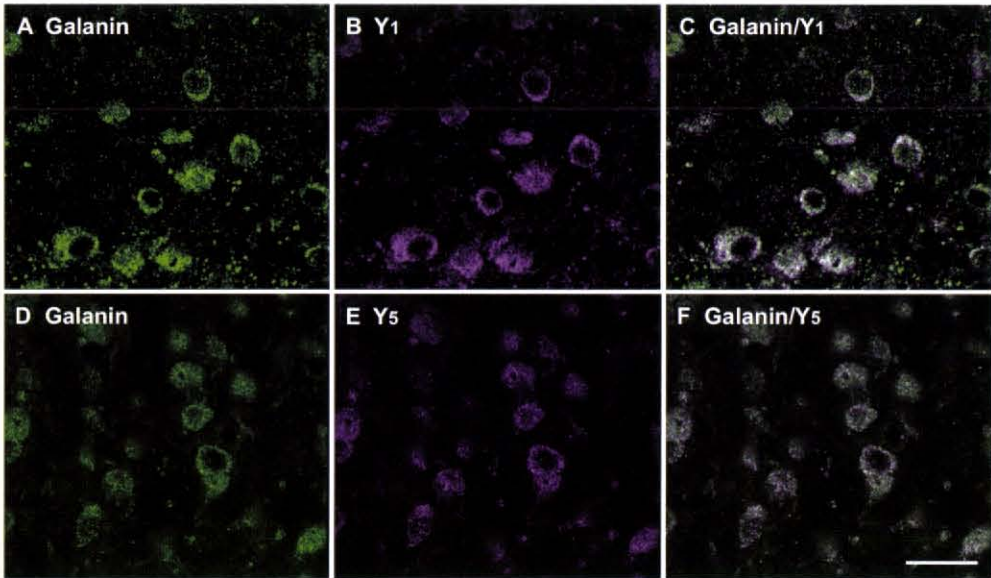


図2 ガラニンとNPY受容体の共発現

A-C. 画像は視床下部背内側核 (DMN) でのガラニン (緑), Y1 受容体 (紫紅色), ガラニンと Y1 受容体の共発現 (白色) を示す.

D-F. 画像は視床下部背内側核でのガラニン (緑), Y5 受容体 (紫紅色), ガラニンと Y5 受容体の共発現 (白色) を示す. スケールは $30\mu\text{m}$ を示す.

絶食負荷群 1.8 ± 0.1) (図3 A と B, G). これに対して, ARC でのガラニン mRNA 発現には変化が認められなかった (図3 A と B, G). DMN でのガラニン神経は Y1 受容体及び Y5 受容体を発現しており, NPY 神経による投射を受けて活性化している可能性がある. そこで Y1 受容体又は Y5 受容体をノックアウトしたマウスを用いて, 絶食負荷を行った. その結果, Y1 受容体又は Y5 受容体をノックアウトしたマウスでは, 絶食負荷を行っても DMN でのガラニン mRNA 発現が変化しなかった (図3 C と D, E と F, H, I). このことは, 絶食時のガラニン発現誘導は絶食により NPY 神経から遊離促進されて NPY が Y1 受容体あるいは Y5 受容体を介して生じさせていることを示唆していた.

DMN での Y1 受容体及び Y5 受容体 mRNA ノックダウンによるガラニン mRNA 発現への影響

Y1 受容体及び Y5 受容体のノックアウトマウスにおける絶食負荷による DMN でのガラニン mRNA 発現増加の消失が, ノックアウトマウスにおける何らかの間接的な影響の結果ではないことを示すために, DMN の Y1 受容体及び Y5 受容体 mRNA を siRNA 発現ベクターにより直接ノックダウンし, 絶食負荷による影響を検討した. siRNA 発現ベクターによるそれぞれ Y1 受容体及び Y5 受容体 mRNA のノックダウン効率は約 57%, 68% であるので, この実験では2つまとめた時に相加作用が出る条件で行った. その結果, 対照群マウスでは絶食負荷による DMN でのガラニン mRNA 発現増加が認められた (図4 A と B, E). これに対して Y1 受容体及び Y5 受容体 mRNA をノックダウンした場合には, 絶食負荷に

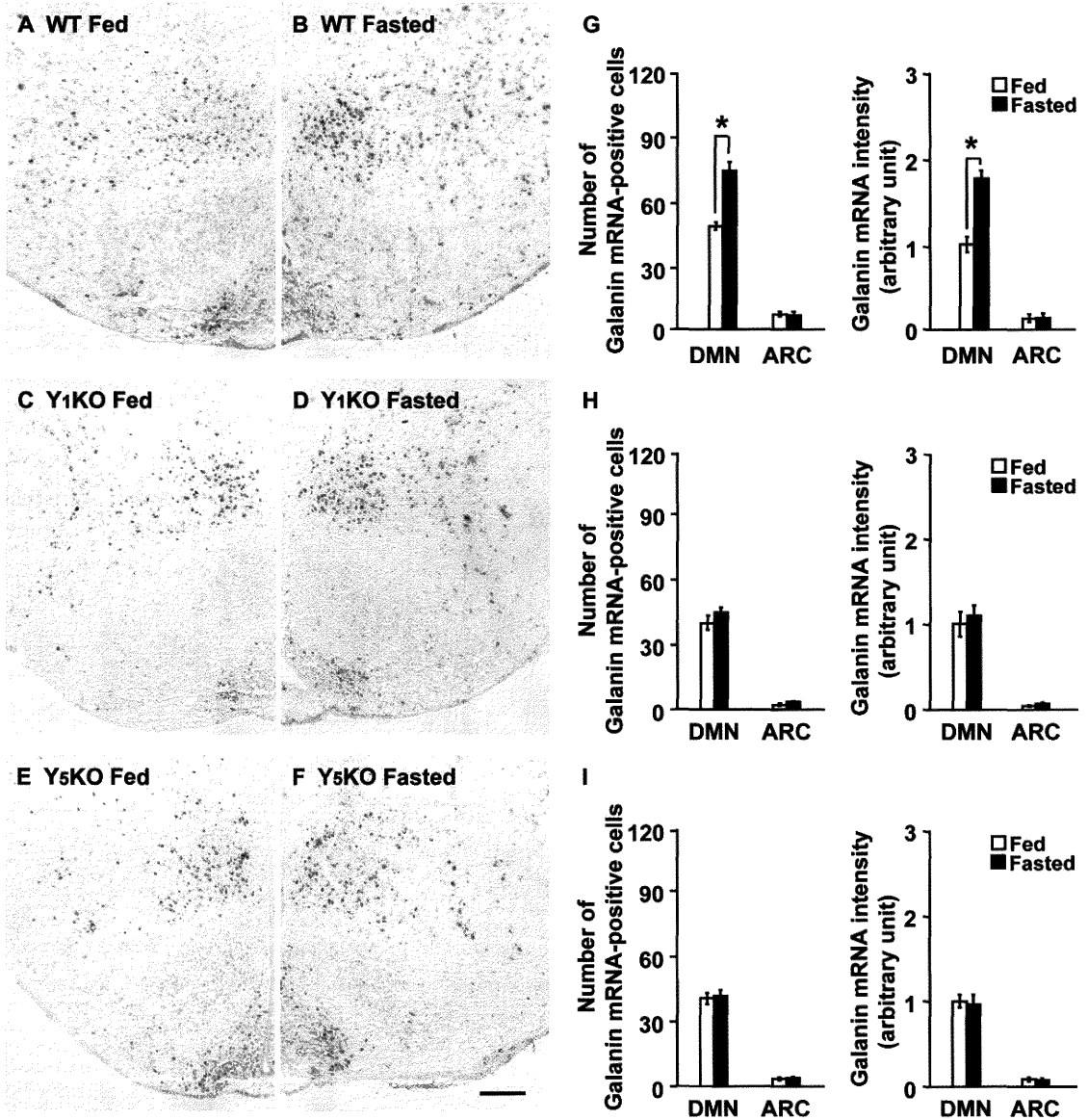


図3 絶食負荷による視床下部でのガラニン mRNA 発現への影響

A-F. 視床下部でのガラニン mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した写真を示す。A：野生型マウス 自由摂食, B：野生型マウス 絶食負荷, C：Y1 受容体欠損マウス 自由摂食, D：Y1 受容体欠損マウス 絶食負荷, E：Y5 受容体欠損マウス 自由摂食, F：Y5 受容体欠損マウス 絶食負荷。スケールは 200 μ m を示す。

G-I. *in situ* ハイブリダイゼーション写真の画像解析結果を示す。G：野生型マウス 自由摂食群を白棒グラフ, 絶食負荷群を黒棒グラフで示す (n = 7)。H：Y1 受容体欠損マウス 自由摂食群を白棒グラフ, 絶食負荷群を黒棒グラフで示す (n = 5)。I：Y5 受容体欠損マウス 自由摂食群を白棒グラフ, 絶食負荷群を黒棒グラフで示す (n = 5)。グラフは平均値±標準誤差を示す。統計解析は Student t-test を使用し、危険率 5% 未満を統計的有意と見なした (* : p < 0.05)。

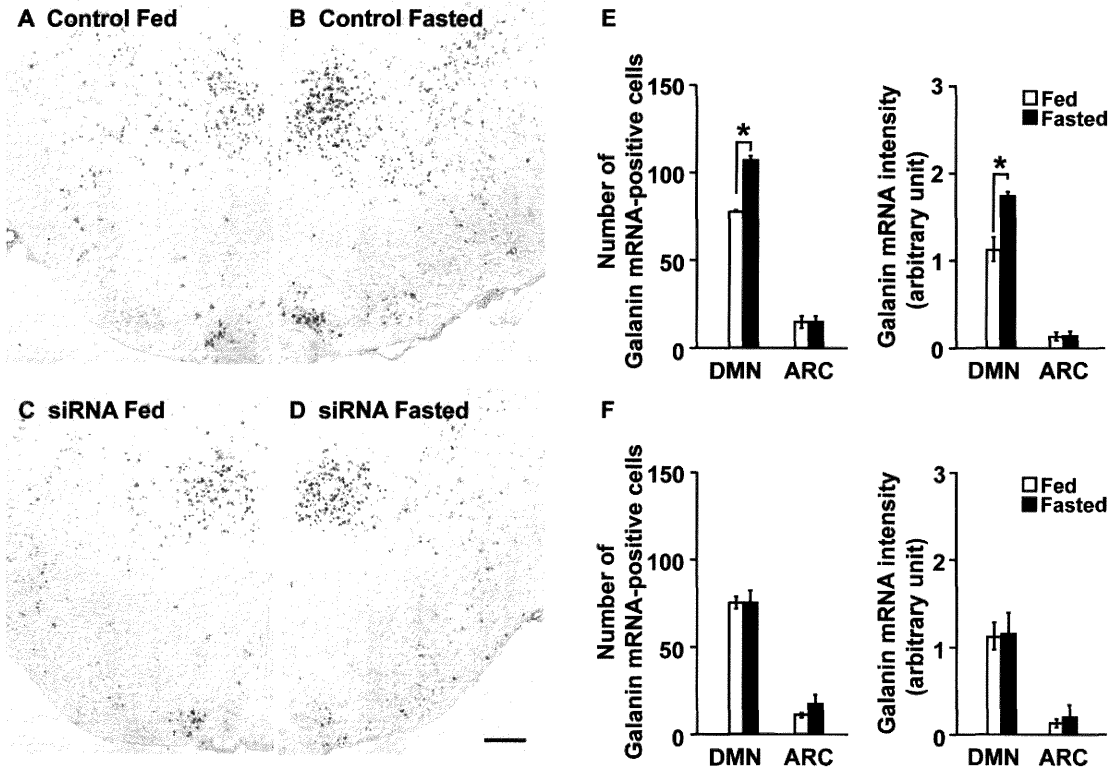


図4 絶食負荷による視床下部でのガラニン mRNA 発現への影響

A-D. 視床下部でのガラニン mRNA 発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより検討した写真を示す。A: 対照群マウス 自由摂食, B: 対照群マウス 絶食負荷, C: Y1 受容体及び Y5 受容体をノックダウンしたマウス 自由摂食, D: Y1 受容体及び Y5 受容体をノックダウンしたマウス 絶食負荷, スケールは 200 μ m を示す。

E-F. *in situ* ハイブリダイゼーション写真の画像解析結果を示す。E: 対照群マウス 自由摂食群を白棒グラフ, 絶食負荷群を黒棒グラフで示す (n = 5)。F: Y1 受容体及び Y5 受容体をノックダウンしたマウス 自由摂食群を白棒グラフ, 絶食負荷群を黒棒グラフで示す。グラフは平均値±標準誤差を示す (n = 5)。統計解析は Student t-test を使用し, 危険率 5% 未満を統計的有意と見なした (*: p < 0.05)。

よるガラニン mRNA 発現増加が消失した (図 4 C と D, F)。

DMN での Y1 受容体及び Y5 受容体ノックダウンによる摂食行動への影響

これまでの結果より, DMN でのガラニンは絶食負荷により Y1 受容体及び Y5 受容体を介して発現増加すると考えられる。そこで, DMN での Y1 受容体及び Y5 受容体をノックダウンし, 摂食

行動への影響を観察した。摂食行動は明期, 暗期の 1 日 2 回測定し siRNA 発現ベクターを投与後 6 日間行った。まず, Y1 受容体及び Y5 受容体の siRNA によるノックダウンでは通常の摂食行動への影響は観察されなかった (図 5 A, B, C)。次にノックダウン後絶食負荷を行い, 絶食負荷における再摂食誘導への影響を検討した。その結果, 再摂食時の摂食量が有意に減少した (図 5 D)。摂食量の減少に伴って体重も減少した (図 5 F)。

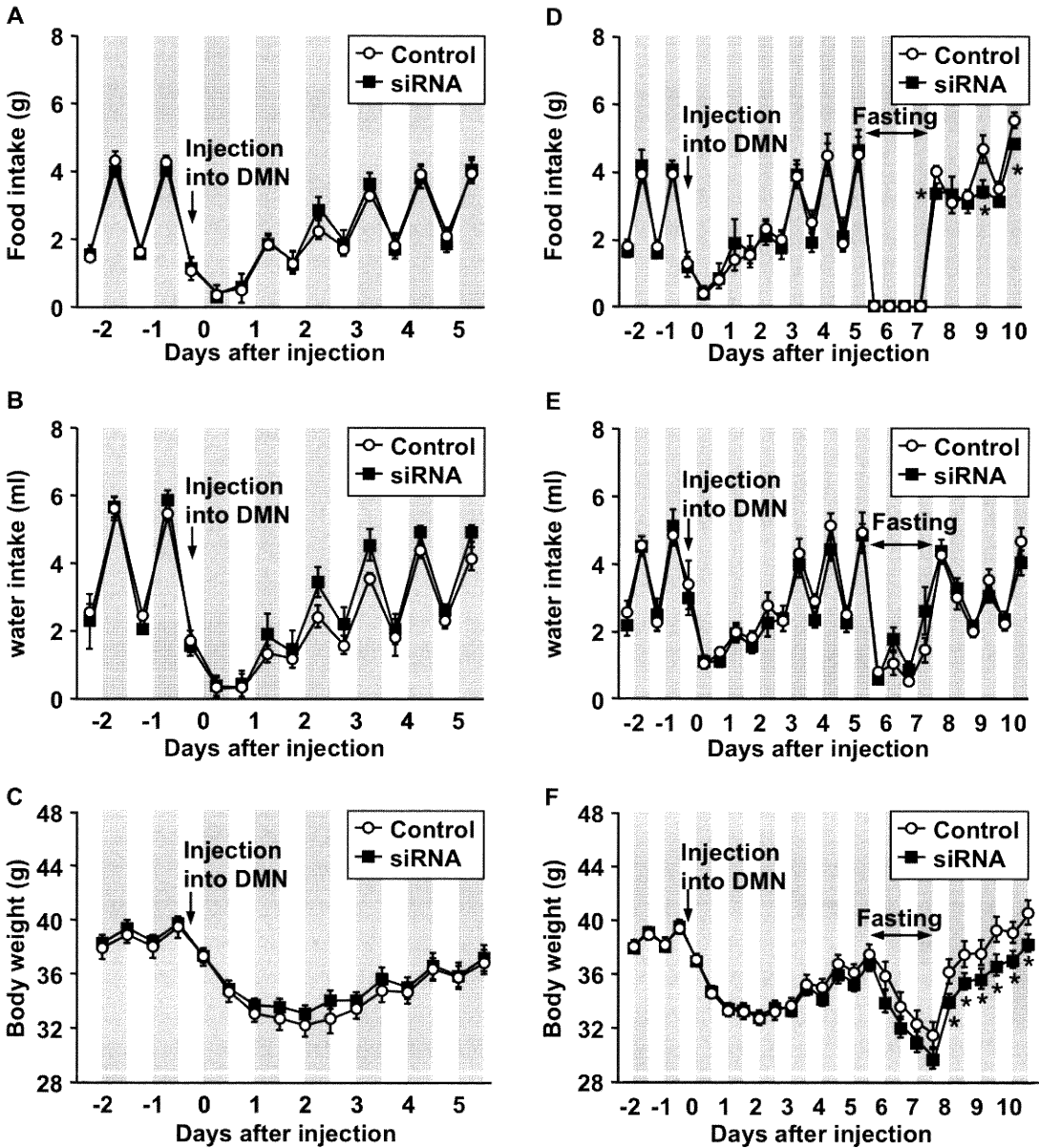


図5 DMNでのY1受容体及びY5受容体ノックダウンによる摂食行動への影響

A-C. Y1受容体及びY5受容体ノックダウンによる通常摂食行動への影響を示す。摂食量 (A), 摂水量 (B), 体重 (C) の変化を示す。対照群を白丸, Y1受容体及びY5受容体ノックダウンした群を黒四角で示す。グラフは平均値±標準誤差を示す (対照群: n = 19, Y1受容体及びY5受容体ノックダウン群: n = 20)。

D-F. Y1受容体及びY5受容体ノックダウンによる絶食後の再摂食行動への影響を示す。摂食量 (D), 摂水量 (E), 体重 (F) の変化を示す。対照群を白丸, Y1受容体及びY5受容体ノックダウンした群を黒四角で示す。siRNAベクター投与6日後に48時間絶食を行った。絶食負荷終了後, 再摂食を行った。グラフは平均値±標準誤差を示す (対照群: n = 10, Y1受容体Y及びY5受容体ノックダウン群: n = 10)。統計解析はStudent t-testを使用し, 危険率5%未満を統計的有意と見なした (*: p < 0.05)。

摂水量には変化が認められなかった(図5E)。このことは、絶食時の摂食誘導の内因性のメカニズムとしてARC NPY 遺伝子発現が増加し、それがDMNでNPYが遊離されるとY1受容体及びY5受容体を介してガラニンの遺伝子発現増加をきたすことが解る。多分、合成遊離の増加したガラニン神経活動が絶食誘導による摂食量増加に帰与していると思われる。平常摂食時にはガラニン神経のガラニン発現には変化をきたさないことも解る。

考 察

ガラニン及びNPYは視床下部に多量に発現する神経ペプチドであり、摂食行動、エネルギー代謝、熱産生などの調節を行っている²⁵⁾。NPYとガラニンは摂食行動やエネルギー代謝調節に重要な分子であるが、NPY又はガラニンを単独でノックアウトしても著明な摂食障害は示さない。NPYとガラニンを両方ノックアウトすると体重制御における代償作用を示す。これより、両方はお互いに機能代償する働きがあるらしいが²⁶⁾、そのメカニズムは不明であった。

これまでの報告では、絶食負荷によってARCでのNPY mRNA発現が増加し²³⁾、ARCのNPY神経の投射先であるPVNにおいてNPY遊離が促進されることが報告されている²⁴⁾。これによって絶食負荷後は摂食誘導作用が強くなり、過食を引き起こすと考えられていた。今回の研究で、ガラニンがNPYの下流にあり、絶食負荷でNPY発現量が増加するとY1及びY5受容体を介してDMNガラニン遺伝子発現を増加させる可能性が示された。図1に示したように、既報²³⁾と同様にARCでのNPY mRNA発現が有意に増加した。NPYは摂食促進作用があるので、絶食負荷によって遺伝子発現の増加が生じ、NPYの生合成が増加することで食欲の増強が生じたと考えられている。また、それに加えて絶食負荷によるガラニンmRNA発現が視床下部のDMNで増加していることが明らかとなった。これまでの報告より脳室内又はPVNにガラニンを投与すると摂食促進効

果が認められること¹⁷⁾から、絶食負荷に伴うDMNでのガラニン発現神経細胞数の増加、ガラニン生合成の増加が摂食行動誘発に重要であることが示唆される(図3, 4)。

DMNにはARCからNPY神経が投射しており、DMNにはY1受容体、Y2受容体、Y5受容体の存在が確認されている^{27)–30)}。また、DMNガラニン神経にY1受容体及びY5受容体発現に関する報告が無いため、二重免疫染色により共存を検討した。その結果、DMNガラニン神経にはY1受容体及びY5受容体のタンパク質発現が主にガラニン神経細胞体に確認された。多分、絶食負荷に伴うガラニンmRNA増加はY1及びY5受容体を介してガラニン細胞で生じている可能性がある。これを検証するために、NPY受容体をノックアウトしたマウスを用いて絶食負荷を行った。その結果、Y1受容体又はY5受容体を欠損したマウスでは、絶食負荷によるガラニンmRNA発現増加が消失することが明らかになった。さらに、DMNのガラニン神経が自身の細胞に発現するY1受容体及びY5受容体を介して、発現量を増加させているのか直接に示すために、DMNでのY1受容体及びY5受容体をsiRNA発現ベクターを用いてノックダウンした。その結果、絶食負荷によるガラニンmRNA発現増加が消失した。この時、摂食行動への影響を調べると、DMNでのY1受容体及びY5受容体をノックダウンすると、絶食負荷後の摂食誘導作用が有意に抑制された(図5)。ARCのNPY神経はDMNに投射しており、実際に今回の実験でDMNのガラニン神経にNPY受容体発現が認められた(図2)。このためDMNでのガラニンmRNA増加はY1受容体及びY5受容体を介していると考えられる。要するに、絶食負荷によりARCのNPY神経が活性化され、そのNPY神経がDMNのガラニン神経に投射し、Y1受容体及びY5受容体を介して、ガラニン遺伝子転写が増加していると考えられる。しかし、Y1及びY5受容体を介するガラニン遺伝子増加のメカニズムはまだ不明である。

ガラニン受容体は3種類のサブタイプ(GALR1, GALR2, GALR3)が知られている³¹⁾。

視床下部では GALR1 が広く分布しており、ガラニンの摂食調節機能に関係していると考えられている。今後、各 GALR サブタイプの視床下部における絶食時における摂食誘導への関与も今後の検討課題である。

謝 辞

本研究を行うに当たってご指導頂きました本学薬理学教室教授 樋口宗史先生、同准教授村瀬真一先生、技術的協力を頂きました同技官 三富明夫さん、論文作成に協力して頂きました同秘書 荒川英子さんに深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Stanley BG and Leibowitz SF: Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3940 - 3943, 1985.
- 2) Lin S, Boey D and Herzog H: NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* 38: 189 - 200, 2004.
- 3) Higuchi H: Neuropeptide Y (NPY). *Nippon Yakurigaku Zasshi* 132: 310 - 312, 2008.
- 4) Higuchi H, Niki T, and Shiya T: Feeding behavior and gene expression of appetite-related neuropeptides in mice lacking for neuropeptide Y Y5 receptor subclass. *World J Gastroenterol* 14: 6312 - 6317, 2008.
- 5) Higuchi H, Yamaguchi T and Niki T: Regulation of hypothalamic neuropeptide expression and feeding behavior in NPY-Y5 knockout (KO) mice. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 127: 92 - 96, 2006.
- 6) Kalra SP and Kalra PS: NPY and cohorts in regulating appetite, obesity and metabolic syndrome: beneficial effects of gene therapy. *Neuropeptides* 38: 201 - 211, 2004.
- 7) Tatemoto K, Rokaeus A, Jornvall H, McDonald TJ and Mutt V: Galanin - a novel biologically active peptide from porcine intestine. *FEBS Lett* 164: 124 - 128, 1983.
- 8) Merchenthaler I, Lopez FJ and Negro VA: Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways. *Prog Neurobiol* 40: 711 - 769, 1993.
- 9) Barrera G, Echevarria DJ, Poulin JF, Laforest S, Drolet G and Morilak DA: One for all or one for one: does co-transmission unify the concept of a brain galanin "system" or clarify any consistent role in anxiety? *Neuropeptides* 39: 289 - 292, 2005.
- 10) Crawley JN: Galanin - acetylcholine interactions: relevance to memory and Alzheimer's disease. *Life Sci* 58: 2185 - 2199, 1996.
- 11) Liu HX and Hokfelt T: The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends Pharmacol Sci* 23: 468 - 474, 2002.
- 12) McDonald MP, Willard LB, Wenk GL and Crawley JN: Coadministration of galanin antagonist M40 with a muscarinic M1 agonist improves delayed nonmatching to position choice accuracy in rats with cholinergic lesions. *J Neurosci* 18: 5078 - 5085, 1998.
- 13) Wiesenfeld - Hallin Z and Xu XJ: Neuropeptides in neuropathic and inflammatory pain with special emphasis on cholecystokinin and galanin. *Eur J Pharmacol* 429: 49 - 59, 2001.
- 14) Xu XJ, Hokfelt T, Bartfai T and Wiesenfeld - Hallin Z: Galanin and spinal nociceptive mechanisms: recent advances and therapeutic implications. *Neuropeptides* 34: 137 - 147, 2000.
- 15) Levin MC, Sawchenko PE, Howe PRC, Bloom SR and Polak JM: Organization of galanin-immunoreactive inputs to the paraventricular nucleus with special reference to their relationship to catecholaminergic afferents. *J Comp Neurol* 261: 562 - 582, 1987.
- 16) Holets VR, Hokfelt T, Rokaeus A, Terenius L and Goldstein M: Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus. *Neuroscience* 24: 893 - 906, 1988.
- 17) Crawley JN, Austin MC, Fiske SM, Martin B, Consolo S, Berthold M, Langel U, Fisone G and Bartfai T: Activity of centrally administered

- galanin fragments on stimulation of feeding behavior and on galanin receptor binding in the rat hypothalamus. *J Neurosci* 10: 3695 - 3700, 1990.
- 18) Sawchenko PE: Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol* 402: 435 - 441, 1998.
- 19) Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M and Hokfelt T: The neuropeptide Y/agouti gene - related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate - treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15043 - 15048, 1998.
- 20) Elias CF, Saper CB, Maratons - Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M and Elmquist JK: Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 402: 442 - 459, 1998.
- 21) Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorrbok C, Flier JS, Saper CB and Elmquist JK: Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775 - 786, 1999.
- 22) Legradi G and Lechan RM: The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y - innervation of thyrotropin - releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 139: 3262 - 3270, 1998.
- 23) Kim HJ, Lee JH, Choi SH, Lee YS and Jahng JW: Fasting - induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* 39: 587 - 594, 2005.
- 24) Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP and Kalra PS: Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10931 - 10935, 1991.
- 25) Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL and Kalra PS: Interacting appetite - regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20: 68 - 100, 1999.
- 26) Hohmann JG, Teklemichael DN, Weinschenker D, Wynick D, Clifton DK and Steiner RA: Obesity and endocrine dysfunction in mice with deletions of both neuropeptide Y and galanin. *Mol Cell Biol* 24: 2978 - 2985, 2004.
- 27) Wolak ML, Joseph MR, Cator AD, Mokashi AS, Brownfield MS and Urban JH: Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 464: 285 - 311, 2003.
- 28) Fetissov SO, Byrne LC, Hassani H, Ernfors P and Hokfelt T: Characterization of neuropeptide Y Y2 and Y5 receptor expression in the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 470: 256 - 265, 2004.
- 29) Kishi T, Aschkenasi CJ, Choi BJ, Lopez ME, Lee CE, Liu H, Hollenberg AN, Friedman JM and Elmquist JK: Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin - 4 receptor. *J Comp Neurol* 482: 217 - 243, 2005.
- 30) Stanic D, Brumovsky P, Fetissov S, Shuster S, Herzog H and Hokfelt T: Characterization of neuropeptide Y2 receptor protein expression in the mouse brain. I. Distribution in cell bodies and nerve terminals. *J Comp Neurol* 499: 357 - 390, 2006.
- 31) Branchek T, Smith KE and Walker MW: Molecular biology and pharmacology of galanin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 863: 94 - 107, 1998.

(平成22年12月7日受付)