

氏 名	おとごん うーる ぜせむどるじえ Otgon Uul Zesemdorj
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 529 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 21 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	光遺伝学による視床下部背内側核 GABA 作動性ニューロンの 摂食亢進作用の検証
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 石 橋 俊 (委 員) 教 授 松 浦 徹 教 授 高 橋 将 文

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

Obesity is a major risk factor for metabolic diseases including diabetes, hypertension and cardiovascular diseases, and for certain types of cancer. To date, no effective treatment for obesity has been developed. Obesity results from hyperphagia as well as excessive energy accumulation in the body. To solve the problems of obesity, it is essential to elucidate the mechanisms for regulation of feeding. In the central feeding regulatory circuit, several anorexigenic neurons have been identified in several regions of brain including hypothalamus and hind brain. As orexigenic neurons, in contrast, only neuropeptide Y/Agouti related protein (NPY/AgRP) neuron in the arcuate nucleus of hypothalamus (ARC) has been established by now. However, several lines of knockout mice studies have suggested that  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)ergic neuron may also serve as an orexigenic neuron. GABA is a classical inhibitory neurotransmitter which inactivate postsynaptic neurons. The dorsomedial hypothalamus (DMH) has been considered an orexigenic center since its lesion decreases food intake and body weight. However, the mechanisms by which DMH promotes food intake, particularly the neuron that regulates food intake, are unclear. In DMH, GABAergic and glutamatergic neurons are localized. The present study aimed to clarify the role of DMH GABAergic neurons in regulation of food intake and to elucidate the downstream neural pathway.

### 2 研究方法

Channelrhodopsin fast receiver (ChRFR)-C167A, one of bistable variants of chimeric channelrhodopsin, has been used to activate neurons. ChRFR-C167A was fused with Venus, yellow fluorescent protein variant, and cloned into adeno-associate virus (AAV)2-GAD1 promoter-WPRE-BGH-polyA vector. GAD1 promoter is specifically expressed in GABAergic neuron. Blue light (473 nm) stimulation opens this channel with longer duration than ChR, and yellow light (589) stimulation closes the channel. The vector was injected to DMH

bilaterally in wild type male mice (C57BL/6J) to express ChRFR-C167A-Venus in GABAergic neurons. Food intake was measured with or without blue (473 nm) and yellow (586 nm) laser light exposure for 3 h via optical fiber inserted above DMH. To study the regulation of DMH-GABAergic neurons, their responses to systemic hunger and satiety factors, low glucose and leptin respectively, were examined. For this, membrane potential of ChRFR-C167A-expressing neurons was recorded by slice patch clamp. In another study to elucidate the downstream neural pathway, fluorescence protein Venus in axonal fibers and terminals of DMH GABAergic neurons were acquired with a confocal laser-scanning microscope. In response to light exposure via optical fiber inserted above paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), inhibitory synaptic transmission was measured by patch clamp and food intake was measured.

### 3 研究成果

ChRFR-C167A-Venus fluorescence was observed in DMH GABAergic neurons. It was shown by using slice patch clamp with current clamp mode, that the ChRFR-C167A-Venus expressing neurons were long-lastingly depolarized by blue LED light and repolarized by yellow LED light exposure. The optogenetic selective activation of GABAergic neurons in DMH, significantly increased cumulative food intake at 2 and 3 h of light exposure, compared to corresponding values in mice without light exposure. ChRFR-C167A-expressing neurons in DMH were depolarized by lowering glucose from 2.5 to 0.5 mM and hyperpolarized by administration of leptin at  $10^{-7}$  M. Venus fluorescence in axonal terminal of ChRFR-C167A-expressing neurons was detected in the PVN, ventromedial hypothalamus (VMH), ARC, and dorsal motor nucleus of vagus (DMNV), the areas known as satiety centers. LED light exposure to PVN increased inhibitory postsynaptic current onto PVN neurons *in vitro*. The light exposure for 3 h to PVN via optical fiber increased cumulative food intake for 3 h and 6 h significantly as well as a trend for increase of cumulative food intake for 0.5, 1 and 2 h. These data indicated the DMH GABAergic neuron's inhibitory synaptic transmission to PVN promotes food intake.

### 4 考察

Although orexigenic function of DMH has long been postulated, actual role of DMH in the feeding regulation has remained unclear. I have demonstrated that selective activation of DMH GABAergic neurons by optogenetics promoted food intake. Furthermore, DMH GABAergic neurons substantially projected and exerted inhibitory synaptic transmission to the neurons of PVN, the integrative center of feeding. Moreover, DMH GABAergic neurons were directly inhibited by leptin and activated by lowering glucose, the representative factors reflecting systemic energy states and implicated in physiological regulation of feeding. These results suggest that the DMH-GABAergic neurons serve as orexigenic neurons, which are activated by peripheral hunger signal, and inhibited by satiety signal and hence promote food

intake.

## 5 結論

The DMH GABAergic neuron is activated by orexigenic signal, lowering glucose, and inactivated by anorexigenic signal, leptin. The DMH GABAergic neuron projects to and inhibits satiety center PVN, and thereby promotes food intake.

## 論文審査の結果の要旨

肥満の形成において摂食の神経性調節は重要な役割を果たしている。摂食抑制系に比較して、摂食促進系の解明は遅れており、視床下部孤束核(ARC)の NPY/AgRP 作動性ニューロンしか明らかにされていない。そこで、申請者らは光遺伝学的方法を用いたマウスの GABA 作動性ニューロンの活動電位の変化が摂餌量に及ぼす影響を調べることで、視床下部背内側核(DMH)における GABA 作動性ニューロンの摂食調節における役割の解明を目指した。

Channelrhodopsin fast receiver (ChRFR)-C167A と Venus の融合蛋白を GAD1 プロモーターによって発現するアデノ随伴ウイルス (AAV)2 を両側の DMH に注入し、組織切片のパッチクランプを用いて、青色光(473nm)による脱分極と黄色光(586nm)による再分極を事前に確認した。DMH 上方に挿入した光ファイバーによって青色光と黄色光を 3 時間照射した。青色光照射すると摂餌量が増加した。DMH の GABA 作動性ニューロンは、0.5mM ブドウ糖で脱分極し、レプチンで過分極した。DMH に注入した ChRFR-C167A-Venus の蛍光は、傍室核 (PVN)、腹内側核(VMH)、ARC、迷走神経背側運動核(DMN)の軸索末端に検出された。PVN への青色光照射で摂餌量が増加した。以上の結果から、DMH の GABA 作動性ニューロンは、レプチンで抑制され、低ブドウ糖で活性化を受ける。また、その活性化は PVN への神経投射を介し、摂食を亢進させると考えられた。

これらの結果から、DMH の GABA 作動性ニューロンは飢餓による活性化を受け、満腹シグナルで抑制を受ける摂食促進性のニューロンであることが明らかになった。

本論文は、DMH の GABA 作動性ニューロンが摂食促進性のニューロンであることを光遺伝学的方法で初めて証明した独創的な研究である。

論文の記載に一部不明瞭な点があり、表現上の問題も散見されたため、改訂を指示したところ、適切に改訂された。

以上の結果、本学位論文は博士論文に相応しいと全員一致で判断した。

## 最終試験の結果の要旨

申請者から研究の背景、目的、方法、結果、考察が英語で明快かつ簡潔にプレゼンテーションされた。その概要については「論文審査の結果」を参照。

審査員からは以下の質問が口頭と文書で提起された。1) Channelrhodopsin fast receiver (ChRFR)-C167A と Venus の融合蛋白が光照射によって発現するニューロンの活動電位を調整す

る原理、2) ニューロンの研究分野で最近頻用される DREDD(Designer receptor exclusively activated by designer drug)と本実験で用いた光遺伝学的方法の比較、3) 細胞を用いた in vitro の実験で、用いた方法が期待通り動くことを確認したか、4) DMH における発現陽性細胞の割合と範囲、GABA 作動ニューロン発現への特異性、5) 組織切片にブドウ糖・レプチンを添加してニューロン膜電位を計測した実験で、摂食調節作用のある他の物質（例えばインスリン）の効果を検証したか、6) 光照射によって膜電位が変化しなかったニューロンの特徴、7) 光照射後、摂餌量の変化の出現が遅れ、一過性である理由、8) 注入した AAV ベクターが軸索末端まで輸送されるのに要する時間、9) DMH の GABA 作動ニューロンの神経投射があった PVN 以外の神経核（PVN、VMH、ARC、DMNV）でも光照射実験を実施しなかった理由、10) PVN への光照射による摂食亢進の程度が、DMH への光照射の効果よりも大きい理由。

これらの質問に対する理解は良好であり、口頭あるいは文書で適切に回答された。さらに、これらの質疑に対応した論文記載にも必要に応じて適切な修正が加えられた。

以上の結果、本学位論文は博士論文に相応しいと全員一致で判断した。