

氏 名 佐藤 達也

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1846 号

学位授与の日付 平成28年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Regulatory role of AMP-activated protein kinase in
corticotropin releasing hormone secreting neurons in the
paraventricular hypothalamus in social stress-induced
alteration of food selection behavior

論文審査委員 主 査 教授 富永 真琴
教授 箕越 靖彦
教授 南部 篤
教授 尾仲 達史 自治医科大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

INTRODUCTION

Psychological stress often stimulates intake of sweet foods or high carbohydrate diets. The paraventricular hypothalamus (PVH) plays a key role in macronutrient selection between carbohydrate and fat in mice and rats. Our laboratory recently revealed that AMP-activated protein kinase (AMPK) in a subset of corticotropin releasing hormone (CRH) expressing neurons in the PVH (PVH-CRH neurons) increased a high-carbohydrate diet (HCD) selection over a high-fat diet (HFD) in mice after overnight fasting or neuropeptide Y (NPY) injection into the PVH. CRH is involved in the regulation of stress-related behavior as well as adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion from pituitary and subsequent glucocorticoid secretion from adrenal gland [hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis]. However, the role of AMPK in PVH-CRH neurons in stress-induced change in food selection behavior remains elusive. The objective of present study is to unravel whether AMPK in PVH-CRH neurons regulates food selection behavior between a HCD and HFD in mice in response to stress.

METHODS

C57BL/6J mice were subjected to social defeat stress, which was composed of 5 min of direct interaction and 24 h of sensory contact to an ICR mouse (as an aggressor). CRH mRNA expression in the PVH, plasma corticosterone concentration, and locomotor activity were measured as stress markers. Phosphorylation of AMPK was measured by immunoblot and immunohistochemical analysis. NPY mRNA expression in hypothalamic nuclei was examined by quantitative polymerase chain reaction.

Lentivirus expressing short hairpin RNA (shRNA) for CRH (shCRH) was injected into the PVH of C57BL/6J mice. Lentivirus expressing shRNA for $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ subunits of AMPK (shAMPKs^{f/f}) or constitutively active form of AMPK (CA-AMPK^{f/f}) in a Cre recombinase (Cre)-dependent manner was injected into the PVH of Cre-knock-in mice expressing Cre under the control of CRH gene promoter and enhancer (CRH-Cre mice). Adeno associated virus (AAV) expressing inhibitory DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs), hM4Di, in CRH neurons was injected into the PVH of CRH-Cre mice. Neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor (Y1R) selective antagonist BIBP3226 was injected into the PVH of C57BL/6J mice.

Mice were subjected to measurements of stress markers and food selection before and after social defeat stress. Food selection experiments were performed with a combination of a HFD (55% of calories from lard) and a HCD (HCD1: 57% of

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

calories from sucrose; HCD2: 50% of calories from starch). Constituents other than carbohydrate and fat were same among HCDs and HFD.

RESULTS

Social defeat stress increased CRH mRNA expression in the PVH and plasma corticosterone concentration, and decreased locomotor activity. All mice chose HFD over HCDs when fed ad libitum. In contrast, social defeat stress increased selection of HCDs (HCD1 or HCD2) and decreased that of HFD in a two-diet choice experiment. Total calorie intake did not change. Inhibition of CRH expression in the PVH by shCRH blunted the enhancement of carbohydrate selection as well as the increased CRH mRNA expression and plasma corticosterone concentrations after social defeat stress. Specific inhibition of neural activity of PVH-CRH neurons by DREADD system also suppressed stress-induced increase in carbohydrate selection. Immunoblot and immunohistochemical analysis revealed that social defeat stress increased the phosphorylation of AMPK in a subset of CRH neurons in the rostral part of the PVH. Specific inhibition of AMPK expression in PVH-CRH neurons by shAMPKs^{f/f} abolished the social defeat stress-induced change in food selection. In contrast, it did not affect change in CRH mRNA expression, plasma corticosterone concentration, or locomotor activity after social defeat stress. Expression of CA-AMPK^{f/f} in PVH-CRH neurons increased selection of HCD and decreased that of HFD, similar to those after social defeat stress. However, it did not affect stress markers: CRH mRNA expression, plasma corticosterone concentration, and locomotor activity. Social defeat stress significantly increased mRNA expression of NPY in the dorsomedial hypothalamus (DMH) but not in the arcuate hypothalamus. Administration of NPY receptor Y1R antagonist, BIBP3226, into the PVH partially suppressed stress-induced carbohydrate selection.

CONCLUSIONS

A social defeat stress induces carbohydrate selection via AMPK activation in a subset of PVH-CRH neurons in C57BL/6J mice. AMPK activation in PVH-CRH neurons is necessary and sufficient for the alteration of food selection behavior after social defeat stress. Neural activation of PVH-CRH neurons and CRH expression in the PVH are also necessary for the social defeat stress-induced carbohydrate selection. In contrast, activation of HPA axis by social defeat stress is independent of AMPK activity in PVH-CRH neurons. Thus, AMPK in PVH-CRH neurons plays a crucial role in stress-induced carbohydrate selection, via a distinct mechanism for activation of HPA axis. NPY neurons in the DMH and Y1R in the PVH are likely involved in the social defeat stress-induced food selection behavior.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

心理的なストレスは、炭水化物、特に蔗糖など甘味な炭水化物の摂取を増加させる。これまでの先行研究によって、paraventricular hypothalamus (PVH) のcorticotropin releasing hormone (CRH) 含有ニューロン (PVH-CRHニューロン) が、AMP-activated protein kinase (AMPK) を介して、炭水化物食と脂肪食の食餌選択行動を制御することが明らかにされている。CRHニューロンは、ストレスによって活性化するため、PVH-CRHニューロンのAMPKが、ストレス時の食餌選択行動の変化にも関与する可能性がある。本論文は、社会性ストレスを成熟雄マウスに負荷し、これにより惹起される食餌選択行動の変化に、CRHニューロンのAMPKがどのような調節作用を及ぼしているかを、ウイルスベクターを用いた分子生物学的手法によって調べた研究である。

出願者は、ストレス刺激としてsocial defeat stressを用いた。攻撃性の高いICRマウスのケージに、C57BL/6Jマウスを入れて5分間放置した後、両者を金網で隔てて24時間非接触同居飼育を行った。ストレス負荷後、C57BL/6Jマウスは、PVHにおいてCRHのmRNA発現が増加し、血中コルチコステロン濃度が増加した。また、マウスに高脂肪食と高炭水化物食を同時に与え、どちらの食餌を摂取するかを調べた。その結果、ストレス負荷前、マウスは高脂肪食を多く摂取したが、ストレス負荷後、高炭水化物食の選択が有意に増加することを見出した。総カロリー摂取量に変化は無かった。次に、PVH-CRHニューロンがストレス負荷後の食餌選択行動の変化にどのような調節作用を営むかを明らかにするため、1) C57BL/6JマウスのPVHにレンチウイルスを用いてCRHに対するshRNAを発現させたマウス、2) 抑制性DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) (hM4Di) をCRH-Cre knock-inマウスのPVH-CRHニューロンにアデノ随伴ウイルスを用いて選択的に発現させたマウスを作成し、ストレス負荷による食餌選択行動の変化を調べた。その結果、同食餌選択行動にPVH-CRHニューロンが必須であることを証明した。

次に、ストレス負荷による食餌選択行動の変化に、PVH-CRHニューロンのAMPKがどのような調節作用を及ぼすかを調べた。ストレスを負荷すると、PVH吻側部のCRHニューロンにおいてAMPKが活性化した。また、ウイルスベクターとCRH-Cre knock-inマウスを用いて、1) PVH-CRHニューロン選択的にAMPKの発現を抑制したマウス、2) 活性化型AMPKを発現したマウスを作成し、食餌選択行動への効果を調べた。その結果、AMPKの発現を選択的に抑制するとストレス後の食餌選択行動の変化が抑制されること、反対に、活性化型AMPKを発現させるとストレス負荷と同様に、炭水化物食の摂取量が増加することを見出した。ストレス負荷後のCRH mRNAの発現増加、コルチコステロンの分泌増加に変化はなかった。さらに、出願者は、AMPKを活性化させる上流因子として、神経ペプチド neuropeptide Y (NPY) の関与を調べた。その結果、ストレス負荷により視床下部背内側核においてNPY mRNAの発現が増加すること、PVHにNPY-Y1受容体のアンタゴニストを投与すると、ストレスによる食餌選択行動の変化が部分的に抑制されることを示した。以上の結果から、PVH-CRHニューロンが、AMPKを介して、ストレスによる食餌選択行動を制御すること、AMPKの活性化にNPYが関与している可能性があることを示した。一方、

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

PVH-CRHニューロンのAMPKは、視床下部-下垂体-副腎皮質系の制御には関与しないと考えられる。

本研究成果は、PVH-CRHニューロンが、AMPKを介して、ストレスによる食餌選択行動の変化を引き起こすことを明確に示しており、その科学的価値は大きい。したがって、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと、審査委員会において全会一致で判定した。