

氏 名 Rattanajearakul, Nawarat

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2377 号

学位授与の日付 2022 年 9 月 28 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 Regulation of glucoprivation-induced carbohydrate selection
by NPY-CRH neural axis in the paraventricular nucleus of
the hypothalamus

論文審査委員 主 査 富永 真琴
生理科学専攻 教授
箕越 靖彦
生理科学専攻 教授
西田 基宏
生理科学専攻 教授
矢田 俊彦
関西電力医学研究所 総合生理学研究部 部長

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Name: Rattanajarakul, Nawarat

Title: Regulation of glucoprivation-induced carbohydrate selection by NPY-CRH neural axis in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

Feeding is one of the most important activities to maintain energy homeostasis in animals. While neural mechanisms responsible for the regulation of calorie intake have been extensively studied, the neural basis of food selection for macronutrients is less studied. My lab previously reported that a subset of corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons expressing fasting-responsive AMP-activated protein kinase (AMPK) in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH) is necessary for a high carbohydrate diet (HCD) selection over a high fat diet (HFD) under fasting. However, neuronal mechanisms for HCD intake in other conditions such as glucoprivation remain unknown. Glucoprivation induced by a glucopenic reagent, 2-deoxy glucose (2-DG) is known to increase HCD intake, and neuropeptide Y (NPY)-expressing neurons projecting to the PVH might be involved in the food selection. In this study, I investigated the role of NPY-CRH neural axis in the PVH in mice in glucoprivation-induced change in food selection of HCD and HFD after intraperitoneal (IP) administration of 2-DG.

First, I selectively expressed AAV encoding Cre-dependent hM4Di, an inhibitory DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs), into the PVH of CRH-Cre mice. I performed the food selection assay for 4 h after IP injection of 2-DG. 2-DG injection increased HCD intake while it decreased HFD intake. By contrast, chemogenetic inhibition of PVH CRH neurons significantly suppressed the food selection of HCD over HFD. I next examined whether inhibition of CRH neurons affects NPY-induced HCD selection, using the inhibitory DREADD system. Intracerebroventricular (ICV) or intra-PVH injection of NPY led to a rapid increase in HCD intake within 1 h and then a slow increase in HFD intake. By contrast, inhibition of PVH CRH neurons suppressed the HCD intake with no effects on HFD intake. To further examine whether 2-DG-induced change in food selection is mediated by a direct action of NPY on the PVH, I next investigated the effects of pharmacological blockade of NPY receptors Y1R and Y5R expressed in the PVH. Intra-PVH injection of Y1R and Y5R antagonists blocked the 2-DG-induced HCD intake but not HFD intake. I further knocked down AMPK alpha subunits in PVH CRH neurons. AAV encoding Cre-dependent shRNA towards AMPK was injected into the PVH of CRH-Cre mice. Both intra-PVH injection of NPY and administration of 2-DG activated AMPK in the PVH, and preferential knockdown of AMPK in PVH CRH neurons suppressed both NPY and 2-DG-induced HCD intake but not HFD intake. These results suggest that the NPY-CRH

neural axis in the PVH is necessary for 2-DG-induced HCD selection.

Melanocortin-4 receptor (MC4R) in the PVH is important for normal feeding. I investigated the possible role of PVH melanocortin-4 receptor (MC4R) in NPY-induced food selection. Injection of a MC4R agonist, MTII, into the PVH preferentially inhibited HFD intake but not HCD intake after the intra-PVH NPY injection, indicating that the food selection of HFD is mediated by a distinct neural circuit in the PVH from that of HCD selection.

To investigate which NPY neurons project to the PVH and are activated by 2-DG, I introduced the retrograde AAV encoding Cre-dependent tdTomato into the PVH of NPY-Cre mice and administered saline or 2-DG. I found that NPY neurons in various brain areas innervate the PVH, and among them, PVH-projecting NPY neurons in the nucleus tractus solitarius (NTS), ventrolateral medulla (VLM), periaqueductal gray (PAG), and arcuate nucleus of the hypothalamus (ARC) are strongly activated by 2-DG. Since NTS NPY neurons have been reported to be involved in the 2-DG-induced increase in total calorie intake. I next examined the effect of optogenetic activation of PVH-projecting NTS NPY neurons on food selection. AAV encoding Cre-dependent ChR2-EYFP was injected into the NTS of NPY-Cre mice and optic fibers were bilaterally implanted above the PVH to activate the PVH-projecting NTS NPY neurons specifically. Optogenetic activation of PVH-projecting NTS NPY neurons increased c-fos expression in the PVH and led to an increase in HCD intake along with a slow increase in HFD intake similar to those observed after ICV or intra-PVH injection of NPY. These results suggest that NTS NPY neurons projecting to the PVH play an important role in 2-DG-induced HCD selection.

Collectively, my results suggest that the NPY-CRH neural axis in the PVH is necessary for 2-DG-induced HCD selection and food selection of HFD is mediated by a distinct neural circuit in the PVH.

博士論文審査結果

Name in Full

氏 名 Rattanajearakul, Nawarat

Title

論文題目 Regulation of glucoprivation-induced carbohydrate selection by NPY-CRH neural axis in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

本論文は、2-deoxy-D-glucose (2DG) をマウスに投与して全身のグルコース飢餓状態を引き起こした時の炭水化物に対する選択的摂取行動を調べ、その神経回路を明らかにした研究である。出願者はまず、2DG をマウス腹腔内に投与して高炭水化物食と高脂肪食のどちらを選択・摂取するかを調べた。その結果、2DG を投与してから 4 時間までに高炭水化物食の摂取が増加し、マウスが好む高脂肪食の摂取は逆に抑制されることを見出した。これに対して、視床下部室傍核 (PVH) の CRH (corticotropin-releasing hormone) 発現ニューロンを化学遺伝学的に選択的に抑制すると、2DG による高炭水化物食の摂取が抑制され、高脂肪食の摂取が増加した。神経ペプチド neuropeptide Y (NPY) を脳室内或いは PVH に投与した場合も、高炭水化物食の摂取が 30 分から 1 時間以内に選択的に亢進した後、高脂肪食の摂取がゆっくりと増加することを見出した。PVH の CRH ニューロンを抑制すると、NPY による高炭水化物食の摂取は選択的に抑制されたが、高脂肪食の摂取は抑制されなかった。さらに、NPY 受容体 Y1R、Y5R の拮抗阻害薬を PVH に投与すると、2DG による高炭水化物食の摂取が選択的に抑制された。

高炭水化物食の摂取行動には、CRH ニューロンの内、AMPK (AMP-activated protein kinase) 活性化型 CRH ニューロンが関与する。そこで、AMPK に対する shRNA を視床下部室傍核 CRH ニューロンに発現させ、高炭水化物と高脂肪食の摂取を調べた。NPY を PVH に投与すると、PVH において AMPK のリン酸化 (AMPK の活性化マーカー) が増加し、shRNA により抑制された。また、炭水化物摂取も shRNA により抑制された。

次に、逆行性 AAV (adeno-associated virus) を用いて、PVH に投射する NPY ニューロンを調べた。様々な領域の NPY ニューロンが PVH に投射していたが、これらのニューロンの中で、孤束核、視床下部弓状核、水道周囲灰白質、腹外側髄質の NPY ニューロンが 2DG 投与により cFos タンパク質の発現 (ニューロン活性化マーカー) が増加した。さらに、PVH に投射する孤束核 NPY ニューロンを光遺伝学的に活性化すると、PVH において cFos タンパク質の発現が増加すると共に、高炭水化物食の摂取が 30 分以内に増加した。

最後に、総摂取カロリーの調節に関与する PVH MC4R (melanocortin 4 receptor) ニューロンの役割について調べた。MC4R 作動薬を PVH に投与すると、NPY による高脂肪食の摂取が選択的に抑制された。

以上の結果は、PVH に投射する NPY ニューロンが、PVH の AMPK 活性化型 CRH ニューロンを介して 2DG による高炭水化物食の選択・摂取行動を引き起こすことを示唆する画期的な知見である。また、本研究は高炭水化物食と高脂肪食の摂取が異なる神経機構によることも明らかにした。以上の研究結果から、全員一致で本論文が博士学位論文に相応しいと結論した。