

厚生省
特定疾患対策研究事業

中枢性摂食異常症に関する調査研究

平成11年度研究報告書

主任研究者 中 尾 一 和

平成11年度研究報告書

目次

I. 序文	1
II. 総括研究報告	5
III. 分担研究報告	9
神経性過食症の病態における CRF の解析：ラットテイルピチストレスを用いた検討	11
日本医科大学第二生理	芝崎 保
レプチンの生殖機能調節作用の解析—レプチン過剰発現トランスジェニックマウスを用いた検討—	17
京都大学大学院 臨床病態医科学・第二内科	小川 佳宏
トランスジェニックマウス・スキニーマウスにおける糖代謝解析—レプチンの新しい糖尿治療薬としての可能性—	22
京都大学大学院 臨床病態医科学・第二内科	中尾 一和
中枢性摂食異常症における神経ヒスタミン機能の H_1 受容体欠損動物による解析	32
大分医科大学医学部第一内科	坂田 利家
オレキシン神経欠損マウスの開発	42
筑波大学基礎医学系	桜井 武
中枢性摂食異常症におけるエネルギー消費調節機構	47
京都大学大学院 人間・環境学研究科	細田 公則
生命危機的状态で入院となった摂食障害患者の臨床的特徴	53
鹿児島大学医学部附属病院 心身医療科	野添 新一

摂食障害全国疫学第二調査と市民対象の頻度調査について	56
京都大学医療技術短期大学部	中井 義勝
中枢性摂食異常症患者における QT 間隔と QT dispersion	65
東京大学医学部 心療内科	久保木 富房
摂食障害を合併した I 型糖尿病患者のレプチン動態	70
九州大学医学部 心療内科	久保 千春
中枢性摂食異常症患者における骨量減少と低 T3 症候群	78
国立京都病院内分泌・代謝性疾患センター	葛谷 英嗣
黒色表皮腫(Acanthosis Nigricans)をもつ単純性肥満児の臨床的特徴につ いての検討	81
東京女子医科大学附属第二病院 小児科	村田 光範
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	87
V. 平成 11 年度研究者名簿	97

I. 序 文

厚生省特定疾患中枢性摂食異常症調査研究班は、平成 8 年度の厚生省特定疾患研究の大幅な改組の下で、私を班長として研究の継続が承認され、平成 8 年から 10 年まで研究活動を行った。この研究班では、近年の摂食調節の分子機構研究のめざましい成果を本症の成因、病態の解明、新しい治療法の開発へ応用することを目指した。また、中枢性摂食異常症の患者数の増加、臨床像の多様化、重症化が認められ、それに対応するため、本症の本格的な疫学調査を合わせて行った。

今後、この研究成果を踏まえて、以下のことが課題になると考えられ、平成 11 年度から新たに厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 中枢性摂食異常症調査研究班を編成した。

- 1) 中枢性摂食異常症に関する総合的な臨床的研究、すなわち、疫学調査をさらに全国的規模に拡大し、我国における本症の頻度、臨床像をより明確にすることが必要である。
- 2) 本症の成因、病態に関する基礎的研究を一層進展させ、本症の成因解明、病態把握、新しい治療法の開発を促進することが不可欠である。

今後、この目標の達成のために、本症の基礎及び臨床研究、疫学研究を進展させたいと考えている。

最後に本研究に多大な御援助をいただいている厚生省保険医療局エイズ疾病対策課の皆様に深く感謝を申し上げます。

平成 12 年 4 月

厚生省特定疾患対策研究事業
中枢性摂食異常症
主任研究者 中尾 一和

Ⅱ．総括研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

中枢性摂食異常症に関する調査研究

主任研究者	中尾一和	京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科教授
分担研究者	芝崎 保	日本医科大学第二生理教授
	小川佳宏	京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科助手
	坂田利家	大分医科大学第一内科教授
	桜井 武	筑波大学基礎医学系助教授
	細田公則	京都大学大学院人間・環境学研究科助手
	野添新一	鹿児島大学医学部附属病院心身医療科教授
	中井義勝	京都大学医療技術短期大学部教授
	久保木富房	東京大学医学部心療内科教授
	久保千春	九州大学医学部心療内科教授
	葛谷英嗣	国立京都病院副院長
	村田光範	東京女子医科大学附属第二病院小児科教授

【平成 11 年度における研究目標】近年の我国の文化、社会的環境の変化は、中枢性摂食異常症の病態、発症様式、予後を変貌させつつあり、本症の予防、診断、治療の確立は重要な医学的課題である。また、摂食調節を不可欠な構成要素とするエネルギー代謝調節の分子機構に関する研究は、近年著しく進展し、それに関与する多くの新規関連分子が同定され、それらの生理的役割及び中枢性摂食異常症の成因及び病態生理の解明が期待される。

中枢性摂食異常症調査研究班は、上述の背景を踏まえ、従来より中枢性摂食異常症の病因、病態を解明し、本症の予防、診断、治療の有効な方法を開発することを目的とした。このため、平成 11 年度は以下のことを目標とした。

1) 中枢性摂食調節機構をレプチンと新しい神経ペプチドであるオレキシン及び脳内アミンであるヒスタミンを中心に分子生物学的、発生工学的研究を行い解明するとともに、(中尾、桜井、小川、坂田)、
2) 本症の臨床像を明確に把握するために、本格的な疫学調査を継続するために、2次調査票を作製し、全国的規模での疫学調査を実施する(中尾、中井、野添、久保木)、3) エネルギー代謝調節系の重要な構成要素であるエネルギー消費系の分子機構の解明を脱共役蛋白(UCP3)に関する研究を介して行うとともに、本症における病態生理的意義を解明する(細田)、4) 中枢性摂食調節に関与する CRF の本症の病態形成における意義を検討する(芝崎)、5) 臨床的研究として、本症の自律神経機能異常、

レプチン動態、骨代謝動態等を検討する（久保木、久保、野添、葛谷、村田）。

【概要及び成果】以下に平成 11 年度の研究成果を示す。

1) オレキシン-A と-B は、1998年に発見された神経ペプチドであり、動物の脳室内にオレキシンAまたはBを投与すると、摂食量の増加が認められる。また、絶食によりオレキシンの発現が増加することが示されている。最近では、オレキシン遺伝子欠損マウスが作成され、摂食量が20%減少するとともに、ナルコレプシー様の睡眠障害を呈することが示され、オレキシンが、摂食行動と睡眠の制御に関与していることが示されている。さらに、オレキシン神経の摂食行動における役割を解析するために、オレキシン神経を特異的に除去したマウスを作成した。

オレキシン含有神経は、摂食中枢として知られる視床下部外側野に局在し、脳内の広範な領域に投射している。ヒトオレキシンプロモーターの性質をトランスジェニックマウスを用いて解析した結果、転写開始点から5'上流3.2-kbの断片にはオレキシン神経にきわめて特異的に外来の遺伝子を発現させる能力があることをつきとめた。

この転写制御領域を用いて、Machado-Joseph病の原因遺伝子 ataxin-3に含まれるポリグルタミン・リピートの部分を発現させるトランスジーンを構築し、トランスジェニックマウスを作成した。このマウスではオレキシン神経特異的にアポトーシスが誘導され、オレキシン神経を特異的に脱落したマウスを作成することが出来た。このマウスではナルコレプシー様の症状を呈するとともに、摂食量の著明な減少がみられた。今後、このマウスを用いて、摂食行動をはじめとする表現系の解析を行うとともに、本症におけるオレキシンの病態生理的意義を検討する。（桜井）

レプチンは、脂肪組織に由来するホルモンであり、視床下部を介して、摂食量やエネルギー代謝調節に関与することが知られている。我々はレプチン過剰発現トランスジェニックマウス (Tg/+) を作製し、2型糖尿病モデル動物である KKA^y マウス (A^y/+) と Tg/+ を交配することにより4種類の F1 マウス (Tg/+, A^y/+, Tg/+; A^y/+, +/+) を得た。6週齢の Tg/+; A^y/+ と A^y/+ は共に正常体重であったが、Tg/+; A^y/+ では、血中レプチン濃度が約8倍に上昇し、糖代謝の亢進が認められた。A^y/+ では既にインスリン感受性の低下が認められた。一方、12週齢の Tg/+; A^y/+ は A^y/+ と同程度の高レプチン血症であるにもかかわらず、A^y/+ 同様の重症の肥満と糖尿病を発症した。摂取カロリー制限により、Tg/+; A^y/+ と A^y/+ の体重は同程度に減少したが、A^y/+ の血中レプチン濃度が著しく低下したのに対して、Tg/+; A^y/+ では高レプチン血症が持続して認められ、A^y/+ や +/+ に比較してインスリン感受性の亢進が認められた。従って、レプチンが KKA^y マウスにおける糖尿病の発症を遅延させること、減量療法における糖代謝改善作用を有することが証明され、肥満に伴う糖尿病におけるレプチンの治療薬としての可能性が示された。（中尾）

神経性食欲不振症では、体重減少に伴い月経異常が認められるが、その原因については不明の点が多い。体重減少すなわち、脂肪組織の減少には同時に血中レプチン濃度の低下を伴うため、両者が月経異常にどのように影響しているのかを明らかにする必要がある。そこで、レプチン過剰発現トランスジェニックマウスを用いて検討を行い、脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンが生殖機能の発現および維持

において中心的役割を果たしていること、一方、長期間持続する高レプチン血症により生殖機能が抑制される可能性があることを明らかにし、肥満あるいは痩せに合併する生殖機能異常におけるレプチンの病態生理的意義を示唆した。(小川)

本症における脳内摂食調節物質の機能異常を明らかにする目的で、histamine H₁-receptor knockout (H1KO) mice を用い、神経ヒスタミン機能について以下の解析を行った。H1KO mice は定常状態においては、対照群との間で摂食行動や体重に差を認めないが、高脂肪食負荷時には脂肪蓄積が増加する。すなわち神経ヒスタミンが H₁ 受容体を介して高脂肪食負荷による脂肪蓄積に抑制的に働いていることが示唆された。レプチンによる摂食抑制作用と末梢エネルギー消費亢進作用が H1KO mice で減弱することから、ヒスタミン神経系はレプチンの下流で作動し、食欲調節系と共にエネルギー消費系の制御に H₁ 受容体を介して関与していることが、明らかになった。また神経ヒスタミンによる抗肥満作用は、レプチン抵抗性肥満動物においても有効であることが確認された。(坂田)

2) 本症の臨床像をさらに明確に把握するため、全国規模の疫学調査を開始した。まず、二次調査用紙作成のため中井が1965年以降診察した摂食障害患者854例を分析した。分析の結果、神経性食欲不振症(AN)は増加しているが、神経性大食症(BN)と特定不能の摂食障害(EDNOS)の増加はさらに著しく、今後もその傾向は続くことが予測された。またうつ病性障害、不安障害、アルコール・薬物乱用、人格障害、強迫性障害などの摂食障害と関連した精神疾患 comorbidity を有する患者の増加も明らかとなった。これらの点が明確に抽出でき、かつ原因を明らかに出来るよう工夫した第2次調査用紙を作成し、全国規模での疫学調査を実施した。(中尾、中井、野添、久保木)

3) 本症の病態生理で重要なエネルギー代謝調節系は摂食調節系とエネルギー消費調節系より成る。骨格筋は全身のエネルギー消費調節の約4割を占め、重要な役割を果たしているが、脱共役蛋白質3(UCP3)は、骨格筋のエネルギー消費調節に関与する。中枢性摂食異常症の神経性食欲不振症では患者は飢餓状態であり、飢餓状態におけるエネルギー消費調節が注目される。飢餓状態におけるUCP3遺伝子発現増加は血中脂肪酸濃度の上昇を介していると考えられている。そのため、脂肪酸による骨格筋におけるUCP3遺伝子発現増加の分子機構について検討した。

飢餓状態における骨格筋のUCP3遺伝子発現増加におけるPPAR δ の関与が明らかにされ、エネルギー消費調節におけるPPAR δ の生理的意義が示唆された。(細田)

4) 神経性過食症(BN)の病態におけるCRFの役割について検討し、心理ストレス下にあるBNでも視床下部・下垂体・副腎系の機能亢進の存在が示唆されていることから、CRFがBNの過食の病態に関与していると推測された。(芝崎)

5) 臨床的研究として、本症の自律神経異常、レプチン動態、骨代謝動態、小児肥満症の臨床的特徴に関する研究を行った。(久保木、久保、野添、葛谷、村田)

以上、平成11年度においては、本症の成因、病態に関して発生工学的研究を中心に研究を行い、独創的な成果を達成するとともに、本症の全国的規模での疫学調査を開始した。すでに進行している同様の疫学調査を視野に入れた調査票を作製することができ、結果の集約が期待される。

Ⅲ. 分担研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

神経性過食症の病態におけるCRFの解析：

ラットテイルピンチストレスを用いた検討

分担研究者 芝崎 保 日本医科大学第二生理 教授
新井 桂子 日本医科大学第二生理
堀田 眞理 東京女子医科大学内科二

《KEYWORD；神経性食欲不振症、神経性過食症、テイルピンチ、CRF、摂食行動、オピオイド、ドーパミン》

[研究要旨]

[目的] CRF(corticotropin-releasing factor)の過剰分泌が存在する神経性食欲不振症(AN)の病態にはCRFが強く関与していると考えられているが、神経性過食症(BN)の病態におけるCRFの役割については不明である。そこで、ラットにおいてテイルピンチ(TP)の摂食促進機序を解析することによりBNの病態に考察を加えた。

[方法] 体重180gのWistar系雄ラットを用いた。

[結果] ラットに1分間のTPを加えるとその直後30分間の摂食量は有意に増加し、これはCRF type1受容体(CRFR1)拮抗薬の前投与により阻止された。2、10ngのCRFのicv投与は摂食量を増した。TP及び2ng CRFのicv投与の摂食促進はオピオイド受容体やドーパミンD2受容体の拮抗薬により阻止された。

[総括] 従ってTPの摂食促進機序にはCRF-CRFR1がオピオイドやドーパミンD2受容体の関与も介して作用していると考えられる。以上より、心理ストレス下にあるBNでも視床下部・下垂体・副腎系の機能亢進の存在が示唆されていることから、CRFがBNの過食の病態に関与していると推測される。

[本文]

[はじめに]

心理ストレス下にある神経性食欲不振症(AN)ではCRF(corticotropin-releasing factor)の過剰分泌が存在する¹⁾。CRFのラット脳室内投与は摂食抑制、行動量の増加、性腺系の抑制等、ANの主症状である不食、活動性の亢進、無月経に類似した変化をもたらすことから^{2,3,4)}、ANの病態にはCRFが強く関与していると考えられている。しかしながら、同様に強い不安状態にあり視床下部・下垂体・副腎系の機能亢進が示唆されている神経性過食症(BN)でのCRFの病態への関与に関する検討はされていない。そこで、ラットにおいて多くのストレスが摂食抑制をもたらす中^{5,6)}、摂食亢進をもたらすテイルピンチ(TP)⁷⁾の摂食亢進機序を明ら

かにすることにより、BNの病態におけるCRFの役割について考察を加えることを目的に本研究を計画した。

[対象と方法]

実験には体重180gのWistar系雄ラットを個別ケージ内で飼育し、自由摂食下で用いた。TPストレスでは、両接触内面を綿とテープで覆ったクリップを尾の2/3遠位部に1分間かけた。その直後に定量済みの新たな粉末飼料を個別ケージ内に入れ、30分間の摂食量を測定した。CRF脳室内投与実験では実験5日前にペントバルビタール麻酔下で側脳室内にカニューレを留置したラットを用いた。CRF type1受容体(CRFR1)選択的拮抗薬として10mg/kg体重量のCRA1000(大正製薬)を腹腔内投与した。

[結果]

1 分間のTPは30分間の摂食量を有意に増し、この増加はCRFR1拮抗薬の腹腔内投与により阻止された(図1)。CRFR1拮抗薬そのものは対照と比較し摂食量に有意な変化をもたらさなかった。各用量のCRF脳室内投与により生じた摂食量の変化を図2に示す。2、10ngのCRFの脳室内投与は摂食量を有意に増した。250ngのCRFは摂食抑制傾向を示したが、対照群と比較し有意なものではなかった。TPあるいは2ngのCRFの脳室内投与による摂食促進は、1 mgのnaloxoneをTP負荷あるいはCRFの脳室内投与15分前に腹腔内投与することにより阻止された(図3、4)。naloxoneそのものは摂食量に有意な変化を示さなかった。さらに、TPあるいは2ngのCRFの脳室内投与による摂食促進は、1 mgのpimozideをTP負荷あるいはCRFの脳室内投与15分前に腹腔内投与することにより阻止された(図5、6)。pimozideそのものは対照群と比較し、摂食量に有意な変化を示さなかった。

[考案・結論]

TPによる摂食促進がCRFR1選択的拮抗薬により阻止されたことから、TPによる摂食促進にはCRFR1が関与すると考えられる。CRFの脳室内投与は摂食を抑制することが知られていたが、本研究では、CRFが2、10ngの投与量で有意に摂食量を増すことが明らかになった。過去のCRFの摂食抑制作用に関する実験では、24時間絶食ラットが用いられ、摂食抑制をもたらすCRFの投与量は主にmg単位であった^{2,7)}。本実験の如く自由摂食下では、低用量のCRFの脳室内投与が摂食を促進することが明らかになった。したがって、TPによる摂食促進機序にはCRF-CRFR1が関与していると考えられる。

TPによる摂食促進はオピオイド受容体拮抗薬であるnaloxoneやドーパミンD2受容体拮抗薬であるpimozideにより阻止されることが報告されている^{8,9)}。本研究でもこれらの報告と一致する結果を得た。したがって、TPによる摂食促進機序にはオピオイド受容体やD2受容体も関与していることが示唆される。さらに、2ngのCRFの脳室内投与による摂食促進作用もnaloxoneやpimozideにより阻止されることを明らかにした。したがって、TPによる摂食促進機序にはCRF-CRFR1が関与し、さらに加えてオピオイド受容体やD2受容体も関与していることが示唆される。ANは心理スト

レス下であり、内分泌学的検討により視床下部・下垂体・副腎系の機能亢進の存在が知られている。実際、同患者の脳脊髄液中のCRF濃度は有意に高く¹⁾、CRFの過剰分泌の存在が示されている。CRFの脳室内投与がANの主症状に類似した変化をもたらすことから、ANの病態にはCRFが強く関与していると考えられる。一方、BNでは過食が主症状である。BNでは不安が強く、ANと同様に心理ストレス下にあると考えられ、視床下部・下垂体・副腎系の機能亢進の存在を示唆する内分泌学的検討結果も報告されている¹⁰⁾。しかしながら、BNではANに比し同系の機能亢進の程度は軽度であるという報告もある^{11,12)}。これはBNではANと異なりCRFの分泌亢進が弱いことを示めすものと推測される。本研究で明らかになったように低用量のCRFが高用量とは逆に摂食を促進することから、心理ストレス下でありCRFの分泌が軽度亢進しているBNでは、ANとは異なりCRF-CRFR1が摂食を促進するように作用していると推測される。さらにCRF-CRFR1の摂食促進作用の発現にはオピオイドやドーパミンが関与していると推測される。

[参考文献]

1. Hotta M, Shibasaki T, Masuda A, et al : The response of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:167-173.
2. Shibasaki T, Kim YS, Yamauchi N, et al: Antagonistic effect of somatostatin on corticotropin-releasing factor-induced anorexia in the rat. *Life Sci* 1988; 42:329-334.
3. Imaki T, Shibasaki T, Masuda A, et al: Effects of adrenergic blockers on corticotropin-releasing factor-induced behavioral changes in rats. *Regul Pept* 1987; 19:243-252.
4. Rivier C, Rivier J and Vale W : Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* 1986; 231:607-609.
5. Shibasaki T, Yamauchi N, Kato Y, et al : Involvement of corticotropin-releasing factor in restraint stress-induced anorexia and

- reversion of the anorexia by somatostatin in the rat. *Life Sci* 1988; 43:1103-1110.
6. Hotta M, Shibasaki T, Arai K, et al : Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. *Brain Res* 1999; 823:221-225.
7. Morley JE and Levine AS : Corticotropin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci* 1982; 31:1459-1464.
8. Antelman SM and Szechtman H : Tail pinch induces eating in sated rats which appears to depend on nigrostriatal dopamine. *Science* 1975; 189:731-733.
9. Morey JE and Levine AS : Stress-induced eating is mediated through endogenous opiates. *Science* 1980; 209:1259-1261.
10. Mortola JF, Rasmussen DD and Yen SS : Alterations of the adrenocorticotropin-cortisol axis in normal weight bulimic women:evidence for a central mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:517-522.
11. Walsh BT, Roose SP, Katz JL, et al : Hypothalamic-pituitary-adrenal-cortical activity in anorexia nervosa and bulimia. *Psychoneuroendocrinology* 1987; 12:131-140
12. Fichter MM, Pirke KM, Pollinger J, et al : Disturbances in the hypothalamo-pituitary-adrenal and other neuroendocrine axes in bulimia. *Biol Psychiatry* 1990; 27:1021-1037.
- 図の説明
- 図1 テイルピンチによる摂食促進への選択的CRF type 1 受容体拮抗薬の作用
- 図2 CRF脳室内投与による摂食への影響
- 図3 テイルピンチによる摂食促進へのnaloxoneの作用
- 図4 CRF脳室内投与による摂食促進へのnaloxoneの作用
- 図5 テイルピンチによる摂食促進へのpimozideの作用
- 図6 CRF脳室内投与による摂食促進へのpimozideの作用

SPECULATION ON PATHOPHYSIOLOGICAL ROLE OF CRF IN BULIMIA NERVOSA : MECHANISM OF TAIL PINCH STRESS-INDUCED FOOD INTAKE IN RATS.

Tamotsu Shibasaki¹⁾, Keiko Arai¹⁾, Mari Hotta²⁾
 Nippon Medical School, Department of Physiology¹⁾,
 Tokyo Women's Medical School, Department of Medicine²⁾

[Purpose] CRF(corticotropin-releasing factor) is thought to be involved in pathophysiology of anorexia nervosa. However, since the pathophysiological role of CRF in anorexia bulimia (BN) is unknown, we aimed to speculate on the role of CRF in BN by clarifying the mechanism of tail pinch (TP)-induced food intake in rats.

[Method] Male Wistar rats weighing 180 g were used for this study.

[Results] A 1-min period of TP significantly increased food intake for 30 min after TP, and this increase was blocked by ip injection of selective CRF receptor type1 (CRFR1) antagonist. ICV injection of CRF significantly increased food intake at doses of 2 and 10ng. TP-induced or 2ng CRF-induced food intake was inhibited by naloxone, an opioid receptor antagonist, or pimozide, a dopamine D2 receptor antagonist.

[Conclusion] These results indicate that CRF-CRFR1 is involved in the mechanism of TP-induced food intake, and that opioid receptor and dopamine D2 receptor are also involved in the mechanism. It is therefore suggested that CRF may be involved in the pathophysiology of binge eating in patients with BN, who are under psychological stress.

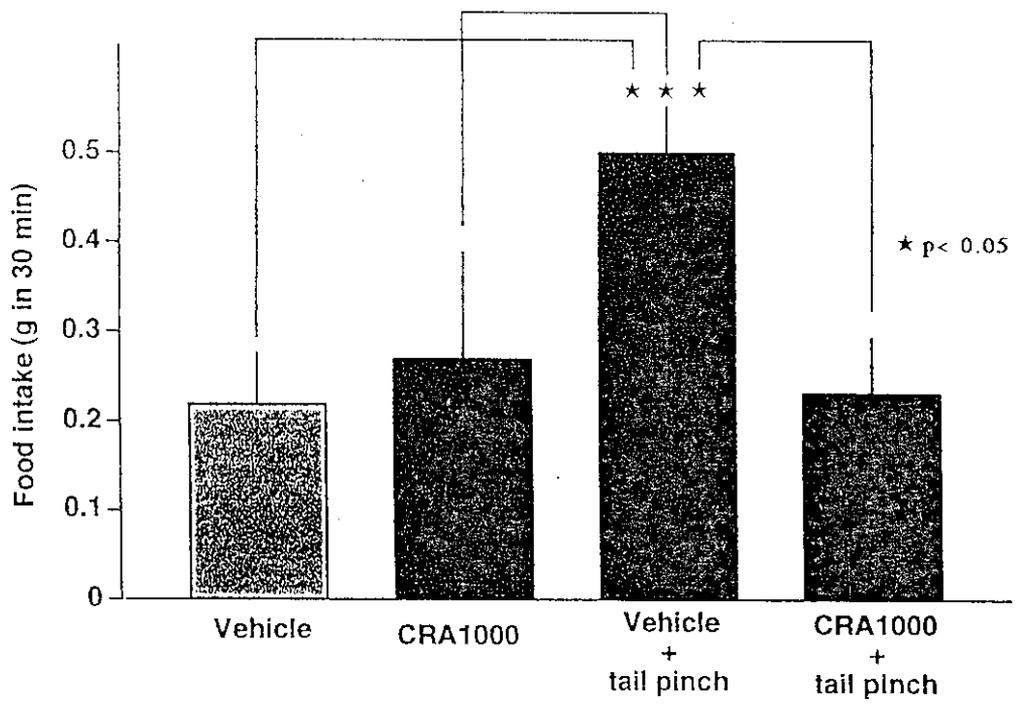


図1 テイルピンチによる摂食促進への選択的CRF type 1 受容体拮抗薬の作用

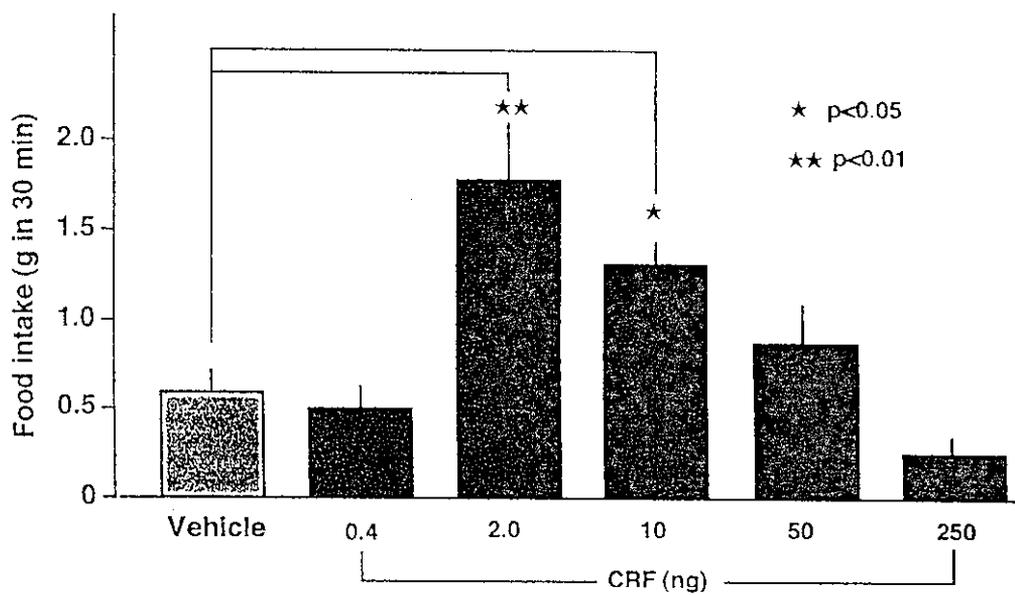


図2 CRF脳室内投与による摂食への影響

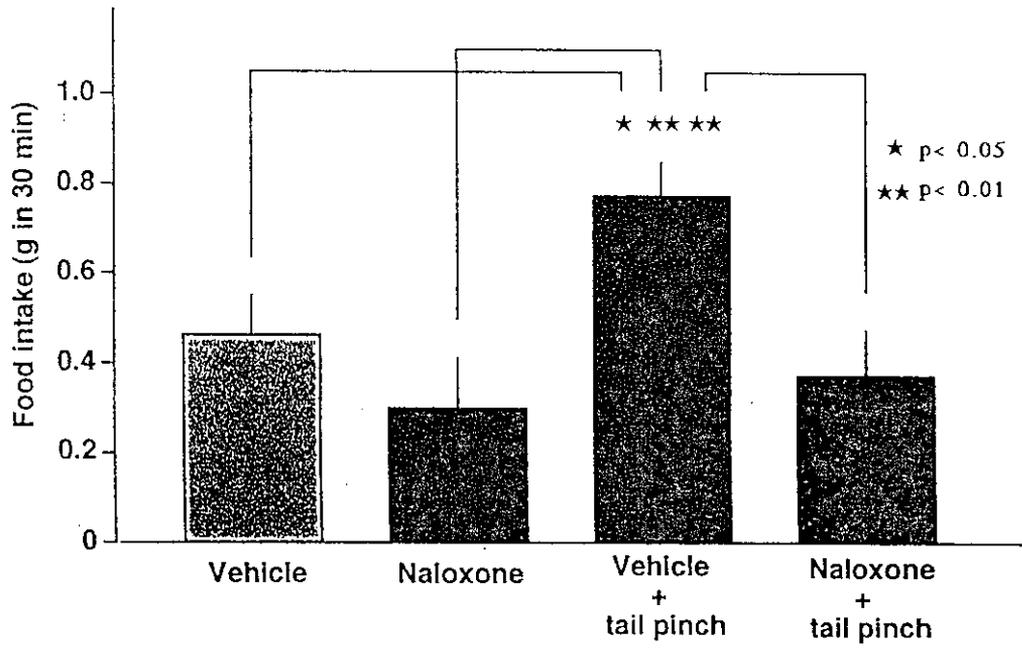


図3 テイルピンチによる摂食促進へのnaloxoneの作用

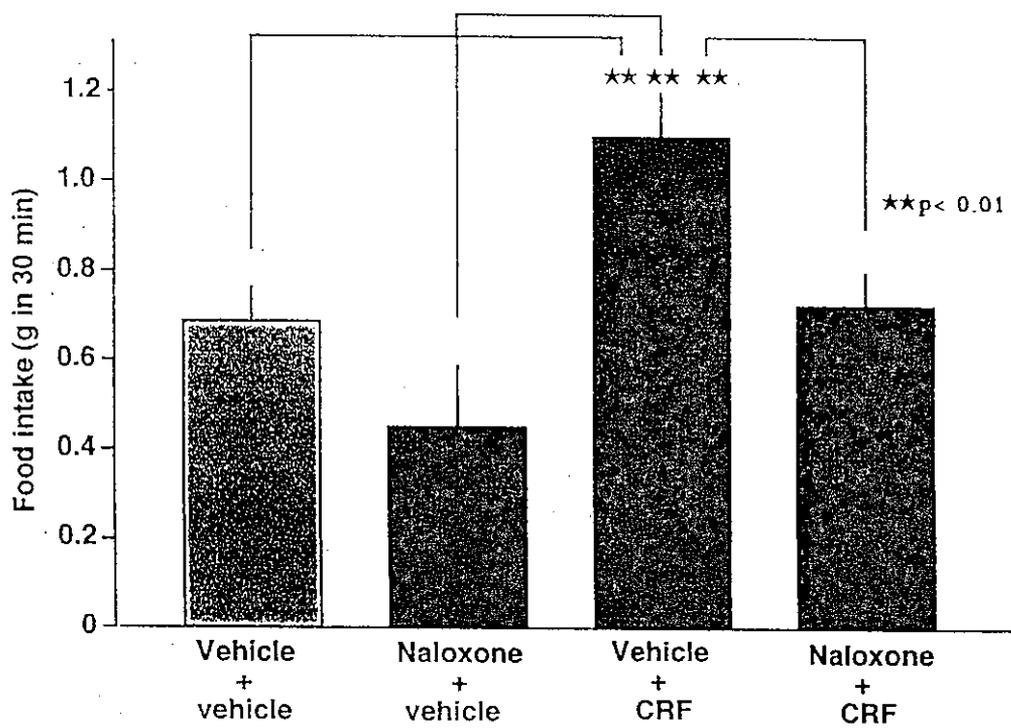


図4 CRF脳室内投与による摂食促進へのnaloxoneの作用

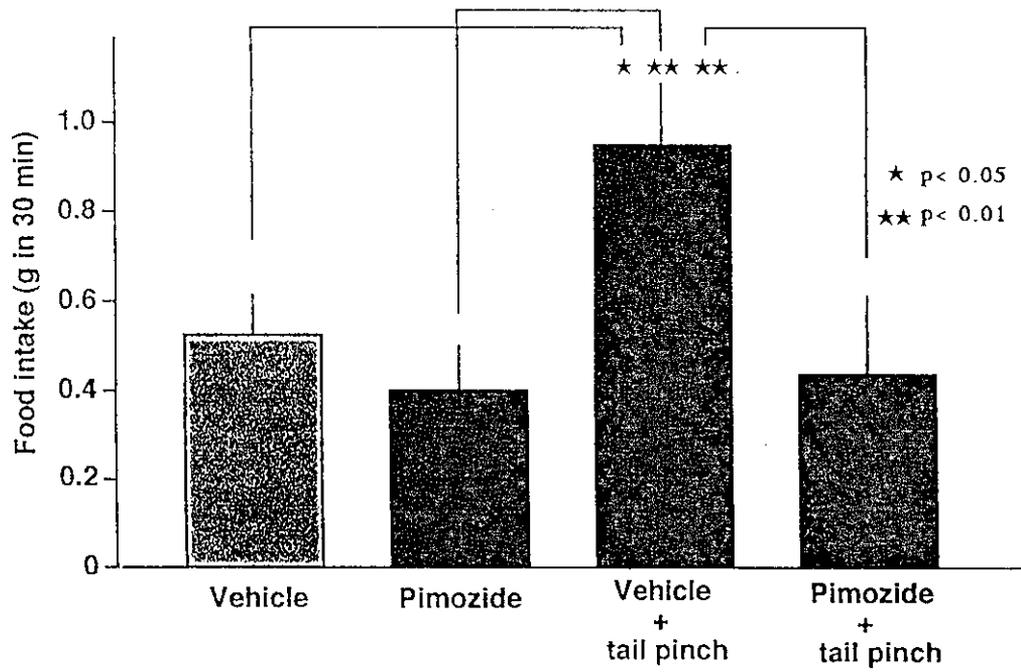


図5 テイルピンチによる摂食促進へのpimozideの作用

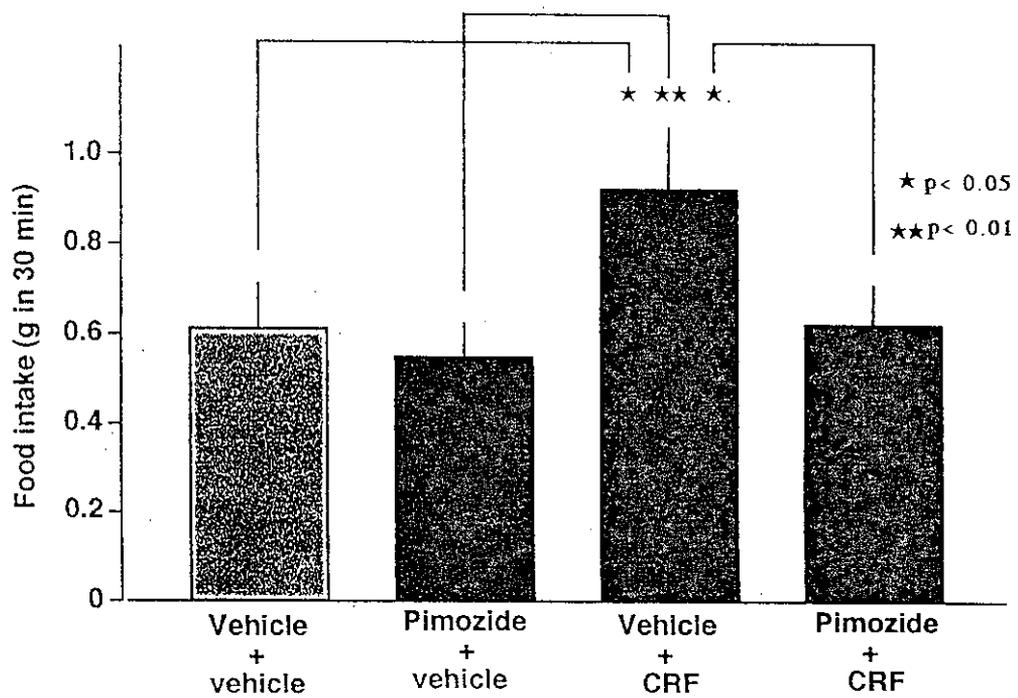


図6 CRF脳室内投与による摂食促進へのpimozideの作用

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

レプチンの生殖機能調節作用の解析

—レプチン過剰発現トランスジェニックマウスを用いた検討—

分担研究者 小川 佳宏 京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科 助手

《KEYWORD; レプチン、生殖機能調節、トランスジェニックマウス、視床下部、GnRH》

[研究要旨]

神経性食欲不振症では、体重減少に伴い月経異常が認められるが、その原因については不明の点が多い。体重減少すなわち、脂肪組織の減少には同時に血中レプチン濃度の低下を伴うため、両者が月経異常にどのように影響しているのかを明らかにする必要がある。本研究では、我々が作製したレプチン過剰発現トランスジェニックマウスを用いて検討を行い、脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンが生殖機能の発現および維持において中心的役割を果たしていること、一方、長期間持続する高レプチン血症により生殖機能が抑制される可能性があることを明らかにした。以上より、肥満あるいは痩せに合併する生殖機能異常におけるレプチンの病態生理的意義が示唆された。

[本文]

[研究目的]

神経性食欲不振症では、体重減少に伴い月経異常が認められるが、その原因については不明の点が多い。体重減少すなわち、脂肪組織の減少には同時に血中レプチン濃度の低下を伴うため、両者が月経異常にどのように影響しているのかを明らかにする必要がある。本研究では、我々が作製したレプチン過剰発現トランスジェニックマウスを用いて、生殖機能に対するレプチンの持続作用を検討した。

[研究方法]

雌性トランスジェニックマウスと同腹の対照マウスを用い、3週齢において生殖機能の発現時期を膣開口により検討した。次に、8～30週齢において卵巣重量を測定し、卵胞発育を組織学的に、発情周期を膣スミアにより観察し、また妊娠能を検討した。さらに、視床下部におけるGnRH含有量、GnRH負荷後の血中LH値を測定した。

[結果と考察]

トランスジェニックマウス (n=10) の膣開口 (27.7 ± 0.5日) は対照マウス(29.0 ± 1.0日) と比較して早期に発来し (図1a)、生後3～4週齢で、トランスジェニックマウスの卵巣及び子宮の重量は対照マウスと比較して有意に増加していた (図1b, c)。又、卵胞発育も対照マウスと比較して亢進していた(図2a, e)。生後8～11週齢では、トランスジェニックマウスの卵巣重量、卵胞発育は対照マウスと有意な差を認めなかった (図1b, c、図2b, f)。また、トランスジェニックマウス (n=3) の発情周期 (4.7 ± 0.2日) は対照マウス (5.4 ± 0.8日) と有意な差を認めず、いずれの群も妊娠可能であった (図1b, c、図2c, g)。しかしながら、生後21～30週齢ではトランスジェニックマウスの卵巣重量は対照マウスと比較して有意に低値であり(7.8 ± 0.3 vs. 10.8 ± 0.5 mg, n=4)、組織学的に成熟卵胞数は少数であった (図1d)。トランスジェニックマウスの発情周期 (平均10.2 ± 1.6日, n=3) は対照マウス (5.5 ± 0.8日) より有意に延長し、妊娠成立率は有意に低率であった (2/12 vs. 5/7)。トランスジェニックマウスの視床下

部におけるGnRH含有量は3週齢、4週齢、11週齢においては対照マウスと有意な差を認めなかったが、21週齢では有意に低値であった(0.52 ± 0.05 vs. 0.92 ± 0.11 ng, $n=3$) (図3a)。さらに、GnRH負荷後の血中LH値とLHサージの時の血中LH値も21週齢において対照マウスと比較して低値であった (4.0 ± 0.7 vs. 5.3 ± 0.6 ng/ml, $n=4$) (図3b, c)。

レプチン過剰発現トランスジェニックマウスでは高レプチン血症が持続し、脂肪組織が完全に消失するほどの痩せを呈するが、生殖機能が早期に発来し、また性成熟期早期には妊孕性も維持されていた。以上より、レプチンが脂肪細胞から産生されるホルモンとして、生殖機能の発現、維持に主要な役割を果たしていることが証明された。一方、レプチン過剰発現トランスジェニックマウスでは20週齢以降の性成熟期において妊孕性の低下と生殖関連内分泌機能の抑制がみられた。すなわち、高レプチン血症が長期間持続した場合には、逆に生殖機能を抑制する可能性が示唆された。

[結論]

レプチンは脂肪細胞由来ホルモンとして生殖機能の発現および維持に中心的役割を果たしているが、長期間持続する高レプチン血症により生殖機能が抑制される可能性があることが明らかになり、以上より、肥満あるいは痩せに合併する生殖機能異常におけるレプチンの病態生理的意義が示唆された。

[参考文献]

1. K. Chin, K. Shimizu, T. Nakamura, N. Narai, H. Masuzaki, Y. Ogawa, M. Mishima, T. Nakamura, K. Nakao, and M. Ohi: Changes in intra-abdominal visceral fat and serum leptin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome following nasal continuous positive airway pressure therapy. *Circulation* 1999; 100: 706-712.
2. H. Masuzaki, Y. Ogawa, M. Aizawa-Abe, K. Hosoda, J. Suga, K. Ebihara, N. Satoh, H. Iwai, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal yellow agouti mutation: Usefulness of leptin for the

treatment of obesity-associated diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 1615-1622.

3. N. Satoh, Y. Ogawa, G. Katsuura, Y. Numata, T. Tsuji, M. Hayase, K. Ebihara, H. Masuzaki, K. Hosoda, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: Leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes* 1999; 48: 1787-1793.
4. K. Ebihara, H. Iwai, N. Matsuoka, N. Satoh, H. Odaka, H. Kasuga, Y. Fujisawa, G. Inoue, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Diabetes* 1999; 48: 1822-1829.
5. K. Ebihara, Y. Ogawa, G. Katsuura, Y. Numata, H. Masuzaki, N. Satoh, M. Tamaki, T. Yoshioka, M. Hayase, N. Matsuoka, M. Aizawa-Abe, Y. Yoshimasa, and K. Nakao: Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* 1999; 48: 2028-2033.
6. S. Yura, Y. Ogawa, N. Sagawa, H. Masuzaki, H. Itoh, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, S. Fujii, and K. Nakao: Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 749-755.

図1. レプチン過剰発現トランスジェニックマウスの生殖機能

- a, 膣開口を示すマウスの数
- b, 卵巣重量
- c, 子宮重量
- d, 発情周期

■, レプチン過剰発現トランスジェニックマウス、
□, 対照マウス

図2. レプチン過剰発現トランスジェニックマウスの卵巣組織像

対照マウス (a, b, c) レプチン過剰発現マウス (e, f, g)

図3. レプチン過剰発現トランスジェニックマウスの

ホルモンプロフィール

a, 視床下部GnRH含量

b, GnRH負荷後血中LH濃度

c, 血中LH濃度

■, レプチン過剰発現トランスジェニックマウス、

□, 対照マウス

LEPTIN REGULATION OF REPRODUCTIVE FUNCTION: STUDIES WITH TRANSGENIC SKINNY MICE OVEREXPRESSING LEPTIN.

Yoshihiro Ogawa

Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine

Excess or loss of body fat can be associated with infertility, suggesting that adequate fat mass is essential for proper reproductive function. Leptin is an adipocyte-derived hormone that is involved in the regulation of food intake and energy expenditure, and its synthesis and secretion are markedly increased in obesity. Short-term administration of leptin accelerates the onset of puberty in normal mice and corrects the sterility of leptin-deficient ob/ob mice. These findings suggest a role for leptin as an endocrine signal between fat depots and the reproductive axis, but the effect of hyperleptinemia on the initiation and maintenance of reproductive function has not been elucidated. To address this issue, we examined the reproductive phenotypes of female transgenic skinny mice with elevated plasma leptin concentrations comparable to those in obese subjects. With no apparent adipose tissue, female transgenic skinny mice exhibit accelerated puberty and intact fertility at younger ages followed by successful delivery of healthy pups. However, at older ages, they develop hypothalamic hypogonadism characterized by prolonged menstrual cycles, atrophic ovary, reduced hypothalamic gonadotropin releasing hormone contents, and poor pituitary luteinizing hormone secretion. This study has demonstrated for the first time to our knowledge that accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism are associated with chronic hyperleptinemia, thereby leading to a better understanding of the pathophysiological and therapeutic implication of leptin.

図 1

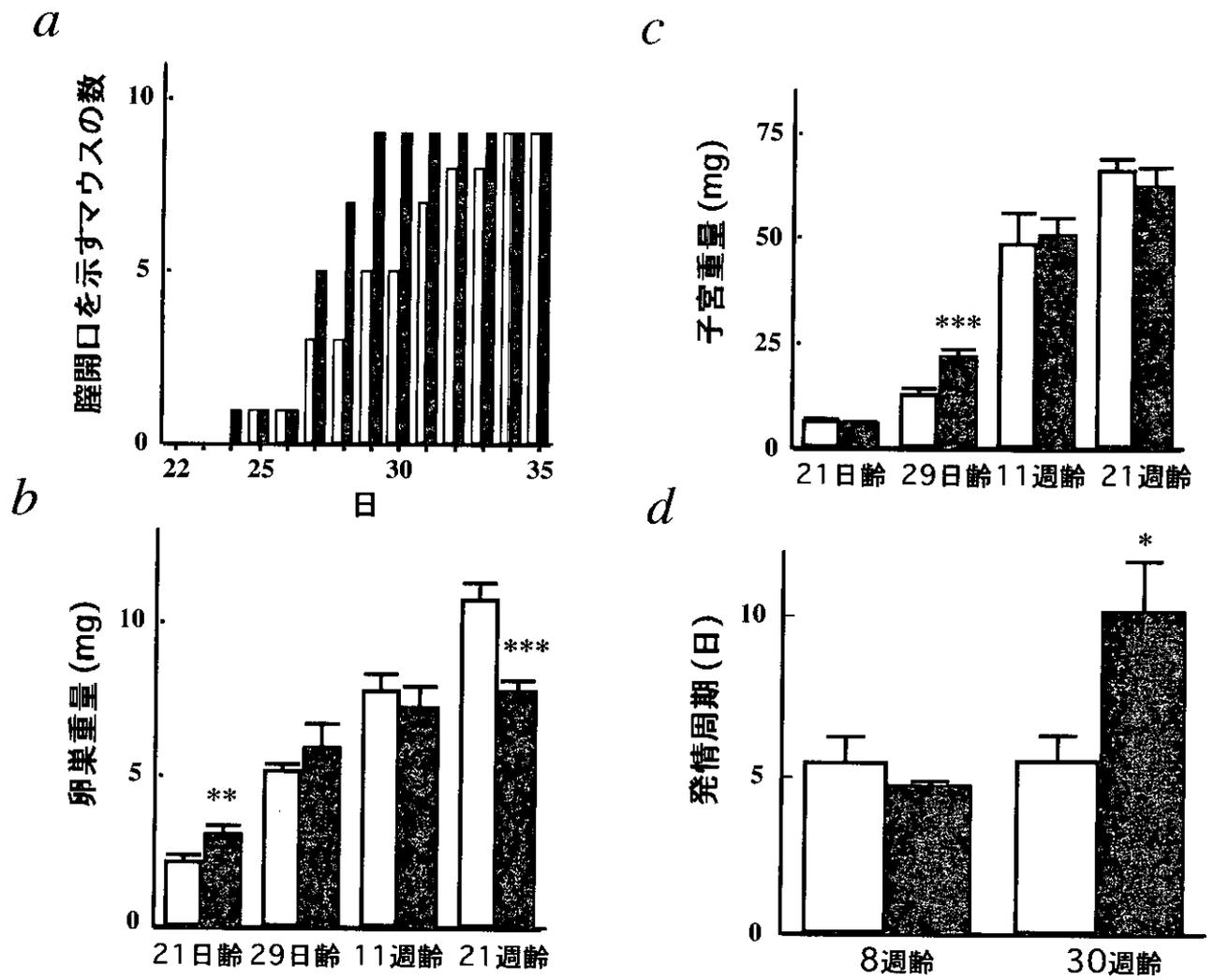


図 2

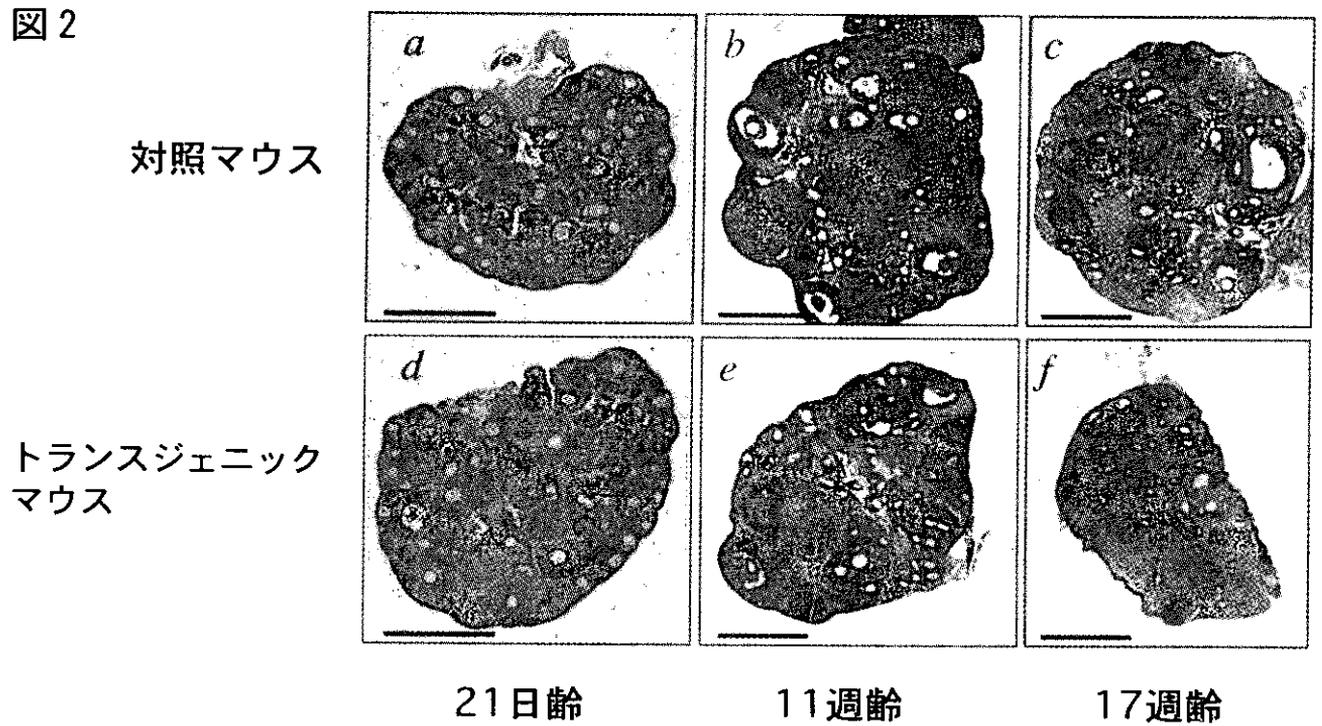
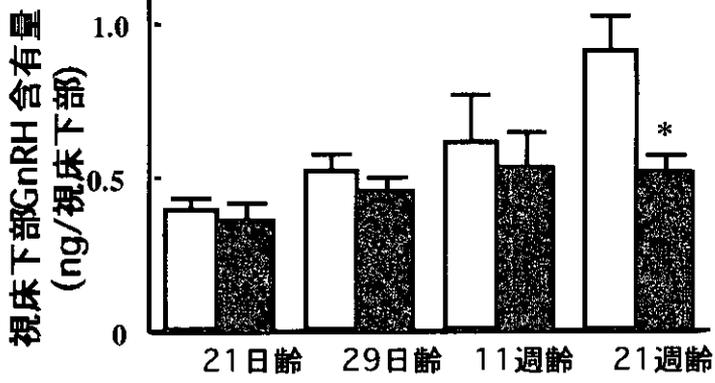
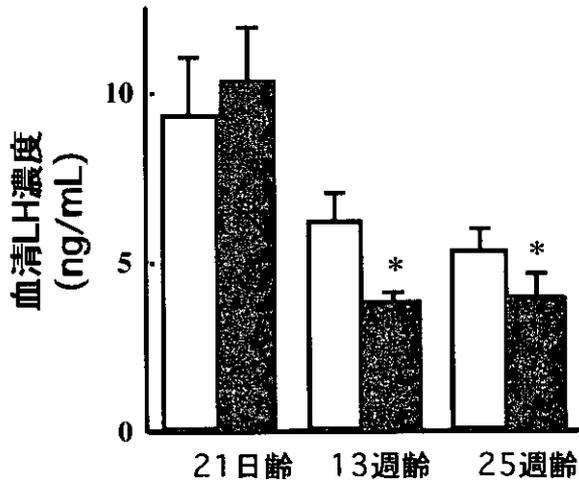


図 3

a



b



c

