

厚生労働省
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 12 年度研究報告書

主任研究者 中 尾 一 和

平成12年度研究報告書

目 次

I. 総括研究報告 ······ ······ ······ ······ ······ ······ ······ ······	1
II. 分担研究報告 ······ ······ ······ ······ ······ ······ ······ ······ ······	5
初代培養ラット視床下部ニューロンを用いたレプチンの 細胞内情報伝達機構の解析 ······ ······ ······ ······ ······ ······ ······	7
京都大学大学院医学研究科 臨床病態医科学・第二内科 中尾 一和	
新しい摂食調節ペプチドの単離・精製（グレリンと NMU） ······ ······ ······	12
久留米大学分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門 呂島 将康	
グレリンの中枢性摂食調節作用 ······ ······ ······ ······ ······ ······	16
京都大学大学院医学研究科 臨床病態医科学・第二内科 小川 佳宏	
中枢性摂食異常症におけるエネルギー消費調節に関する研究 ······ ······	22
京都大学大学院 人間・環境学研究科 細田 公則	
摂食行動におけるオレキシン産生神経の役割の解明 ······ ······ ······	25
筑波大学 基礎医学系 桜井 武	
単純性肥満児における黒色表皮腫の検討 インスリン抵抗性および adipocytokine との関連 ······ ······ ······	30
東京女子医科大学第二病院 小児科 村田 光範	
レプチンによるヒスタミン神経活性化機構の解析 ······ ······ ······	33
大分医科大学医学部 第一内科教室 坂田 利家	
神経性食欲不振症患者における血清エストラジオール（E2）値と 骨代謝マーカーの関係 ······ ······ ······ ······ ······ ······	44
日本医科大学 第二生理 芝崎 保	

摂食障害患者の QT 間隔、QT dispersion	49
東京大学医学部 心療内科 久保木 富房	
中枢性摂食異常症患者における各種ホルモンレベルと 骨密度に関する研究	51
国立京都病院 葛谷 英嗣	
神経性食欲不振症患者の専門施設受診を検討するための ガイドライン作成	56
鹿児島大学医学部附属病院 心身医療科 野添 新一	
神経性食欲不振症患者における中枢セロトニン機能と 心理的特性との関連	61
九州大学医学研究院 心身医学 久保 千春	
摂食障害の疫学・臨床像についての全国調査	67
京都大学医療技術短期大学部 中井 義勝	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	77
IV. 平成 12 年度研究者名簿	87

I . 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	国立京都病院院長
	村田 光範	東京女子医科大学附属第二病院小児科名誉教授
	児島 将康	久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門教授

【平成12年度における研究目標】

中枢性摂食異常症調査研究班は、近年の文化、社会的環境の変化に伴い、病態、発症様式、予後を変貌させつつある中枢性摂食異常症の予防、診断、治療の確立を目的としている。近年、摂食調節の分子機構を始めとして、エネルギー代謝調節の分子機構に関する研究は、著しく進展し、それに関与する多くの新しい関連分子が同定され、同時に精力的にそれらの新関連分子の生理的意義の追究が進められている。それらの研究で得られた新知見を基に、中枢性摂食異常症の成因及び病態生理の解明に関する新たな展開が期待される。

上述の背景を踏まえ、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て、平成12年度は、以下のことを目標とした。

1) 基礎生物学的研究としては、中枢性摂食調節に関与するレプチン、オレキシンに加え、新規食欲亢進物質のグレリン、AG-RP(agouti関連蛋白)、MCH、ヒスタミンを中心に、中枢性摂食異常症における成因及び病態生理学的意義を解明する。特に、既に開発中の遺伝子欠損マウス、トランスジェニックマウスを用いて、新規開発、新規導入マウスをかけあわせてモデル動物を開発し、その表現型の解析を通じ、中枢性摂

食異常症の成因、病態をさらに解明する。2) 臨床的研究として、動物モデルで解明された摂食調節因子の中枢性摂食異常症における病態生理的意義を明らかにする。3) 平成8年～平成10年に実施した中枢性摂食異常症の疫学調査を、昨年度に引き続き、全国的規模に拡大して行い、我が国における中枢性摂食異常症の臨床像、予後をより明確にして、診断基準を完成する。

基礎生物学的研究は中尾、桜井、坂田、芝崎、細田、新たにグレリン発見者の1人である児島、小川らが担当し、臨床的、疫学研究は中尾、久保木、中井、野添、久保、芝崎、村田、葛谷らが担当する。

【概要及び成果】

以下に平成12年度の研究成果を示す。

1) 中枢性摂食異常症の成因解明、病態把握、新しい治療法の開発を促進するために、成因、病態に関する基礎的研究をグレリンを含め、一層飛躍させた。

レプチンは脂肪組織において生合成・分泌され、主に視床下部に作用して強力な摂食抑制とエネルギー消費亢進をもたらすと考えられるが、血中レプチン濃度は、体脂肪率と正の相関を示し、肥満者において著しい上昇が認められ、肥満の病態発症におけるレプチン抵抗性の関与が示唆される。そのレプチン抵抗性の分

子機構の解明を目指して、ラット胎仔視床下部より調整した初代培養ニューロンを用いてレプチンの細胞内情報伝達機構を解析し、初代培養ラット視床下部ニューロンはレプチンの細胞内情報伝達機構の解析に有用なモデル系であることが明らかにされた。今後この系を用いてレプチン抵抗性の病態解明の進展が期待される。(中尾)

トランスジーンの導入により、オレキシン神経を特異的に除去したマウスを作成し、摂食量の低下を観察した。また、ニューロペプチドYの拮抗薬を用いて、オレキシンが摂食行動を亢進させる系に一部ニューロペプチドYを介する系があることを明らかにした。一方、オレキシン神経に特異的にgreen fluorescent protein (GFP) を発現するマウスを作成し、視床下部からGFPを指標に、オレキシン神経を単離し、パッチクランプ法によってオレキシン神経の活性に影響を与える因子の同定を試みた結果、オレキシン神経の活性はレプチンによって活性化され、グレリンによって促進されることが明らかになり、オレキシン神経の活性は外液のグルコース濃度によって強い影響を受けることが明らかになった。オレキシン神経は、レプチン、グレリン、血糖値などの因子によって制御を受けており、ニューロペプチドYの系を一部介して摂食行動の制御に関与していると考えられた。(桜井)

リガンド不明なオーファン受容体のうち、GHS-R (growth hormone secretagogue receptor) とGPR66 (FM3) に対する内因性リガンドを単離・精製し、GHS-Rの内因性リガンドは胃から単離され、グレリンと名付けられた。グレリンはアミノ酸28個のペプチドで、3番目のセリン残基が脂肪酸のオクタン酸で修飾されていた。しかもこのオクタン酸の修飾が、グレリンの活性発現には必要であった。グレリンは主に胃に存在するが、視床下部の弓状核にも存在していた。このことはグレリンが摂食調節に関与することを示唆しており、グレリンをラットの脳室内に投与すると、摂食が亢進した。GPR66の内因性リガンドは、これまで機能不明であったニューロメジンU (NMU) であった。NMUのラット脳室内投与によって、摂食活動は抑制された。NMU抗体の脳室内投与によって、逆に摂食は亢進することから、NMUが内因性の摂食抑制ペプチドであることが明らかになった。(児島) また、グレリンの側脳室内投与は視床下部NPY遺伝子発現を亢進し、ラットの摂食量及び体重を用量依存的に増

加した。グレリンの摂食亢進作用はY1受容体特異的拮抗薬 (J-115814) により用量依存的に減弱され、更に、レプチンの側脳室内投与により減少する視床下部NPY遺伝子発現と摂食量は、グレリンを同時投与することにより用量依存的に減弱した。以上より、グレリンは NPY/Y1受容体系を活性化することにより摂食促進をもたらし、レプチンの摂食抑制作用に拮抗することが明らかになった。(小川)

CRHのヒスタミン (HA) 神経系に及ぼす作用は不明であり、レプチンによるHA神経系の賦活化とCRHの関係を検討した。神経HA枯渇下、更にはH1受容体ノックアウトマウスでは、CRHの摂食抑制作用が減弱した。レプチン投与で結節乳頭核(TMN)のHA含有量が増加し、 α -helical CRHの前処置はその増加を抑制した。CRHの中中枢投与は、TMN、PVN、VMHの HA代謝回転を亢進した。CRHタイプ1受容体がTMNのヒスタミン神経細胞上に存在することを証明できた。以上より、レプチンによるヒスタミン神経の賦活化は、CRH神経を介して作動していると考えられた。(坂田)

エネルギー代謝調節は摂食調節とエネルギー消費調節から成る。骨格筋は全身エネルギー消費の約4割を占め、骨格筋のエネルギー消費調節に関与する可能性のある分子として骨格筋で高濃度である脱共役蛋白質3 (UCP3) が同定されている。骨格筋特異的にUCP3を約18倍に過剰発現するトランスジェニックマウス (Tgマウス) において、通常食の条件では、Tgマウスの体重は対照マウスに比べて低下傾向にあったが、有意差を示さなかった。しかし、肥満誘導食のpalatable dietでは、Tgマウスの体重は対照マウスに比べて、有意差を示し、UCP3の体重増加抑制作用が示唆された。(細山)

2) 臨床的研究として、本症の精神病理、自律神経異常(久保木)、骨代謝動態(柴崎、葛谷)、小児肥満症(村田)の臨床的特徴などに関する研究を行った。

神経性食欲不振症(AN)患者の中枢セロトニン機能と精神病理との関連を明らかにするため、低体重時の女性AN患者(n=6)に選択的セロトニン再吸収阻害剤(fluvoxamine)を経口投与し、脳内セロトニン機能の指標と推定されている血清プロラクチン(PRL)の他、各種内分泌ホルモンを測定し、さらに、自己記入式心理テストを用いて、AN患者の精神病理を評価し、中枢セロトニン機能との関連性を検討した。AN患者のfluvoxamine負荷後の血清PRL反応は、対

照群に比して、0，1，2，時間値で有意に低値であった。fluvoxamine濃度を考慮したPRL反応は、うつ、不安、ヒステリー、妄想性、精神分裂病性、軽躁性、内界への気づきのなさ、無力感の各尺度との間で有意な単相関を示した。重回帰分析では、特性不安と軽躁性が独立して影響した。以上より、ANでは、中枢セロトニン機能と気分、不安との間に関連性が示唆された。(久保)

摂食障害患者は病識の欠如等、受療行動上の問題を有し、治療介入が遅れて重篤な合併症を招来する危険性があり、重症例増加の背景として専門医療機関との連携体制の立ち遅れが考えられる。そのため、専門機関へのconsultationを図る際に有用となる重症度スコア(試案)の作成が試みられ、その有用性が示された。(野添)

3)摂食障害の疫学・臨床像を明らかにするために、疫学調査研究班(班長 稲葉裕)と共同で全国調査(2000年調査)を実施した。23施設から1006人についての調査票が回収された。神経性食欲不振症(AN)が、48.7%、神経性大食症(BN)が39.3%であった。1993年調査

でANが74.4%、BNが25.6%であったことと比べて、2000年調査ではBNの割合が著しく多くなっていた。しかし、発症時には、ANが66.5%、BNが24.7%であった。摂食障害の35.4%に発症時から初診時までに病型の変化があった。現在のBMI、食行動異常、月経状況に加えて、以下の点でANとBNの間に有意の差があった。ひきこもり、盗癖、自殺念慮等の問題行動はBNがANより多く見られた。うつ病性障害や不安障害もBNがANより多く見られた。このようにANのみならずBNの食行動、心理行動状況、身体症状、関連疾患、発症要因について全国調査を行いその特徴を明らかにした。(中尾、中井、野添、久保木)

以上、平成12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ことができ、中枢性摂食異常症の臨床病態の理解のための基礎がさらに深まった。また、本症の全国的規模での疫学調査の集計が進行し、その結果、現在の本症の臨床像が明らかにされるとともに、診断基準の作成のための新しい問題点が明らかとなり、今後の調査研究の方向性が見出された。

II. 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

初代培養ラット視床下部ニューロンを用いたレプチンの 細胞内情報伝達機構の解析

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
海老原 健 京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科
井上 元 京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科

【研究要旨】

レプチンは脂肪組織において生合成・分泌され、主に視床下部に発現するレプチン受容体を介して強力な摂食抑制とエネルギー消費亢進をもたらすと考えられている。最近、肥満の病態発症においてレプチン抵抗性の関与が注目されている。本研究では、レプチン抵抗性の分子機構の解明を目指して、ラット胎仔視床下部より調整した初代培養ニューロンを用いてレプチンの細胞内情報伝達機構を解析した。レプチン添加により初代培養ラット視床下部ニューロンにおいてSTAT3のチロシンリン酸化および摂食抑制因子であるPro-opiomelanocortin (POMC)遺伝子の発現亢進が認められた。STAT3のチロシンリン酸化を阻害することによりレプチンによるPOMC遺伝子の発現亢進作用が著しく減弱することから、レプチンは視床下部においてSTAT3のチロシンリン酸化を介してPOMC遺伝子の発現を亢進させることができた。以上より、初代培養ラット視床下部ニューロンはレプチンの細胞内情報伝達機構を解析に有用なモデル系であることが明らかとなった。

【研究目的】

血中レプチン濃度は、体脂肪率と正の相関を示すことが知られており、肥満者において著しい上昇が認められる。すなわち肥満者では高レプチン血症にもかかわらず体重が増加することから、肥満の病態発症におけるレプチン抵抗性の関与が示唆されている。レプチン受容体は視床下部において高濃度に発現し、レプチンの主な作用部位は視床下部と考えられていることから、レプチン抵抗性発症の分子機構の解明には視床下部ニューロンにおけるレプチンの細胞内情報伝達機構の解析が必要不可欠である。レプチン受容体は一回膜貫通型の1型サイトカイン受容体ファミリーに属し、レプチンの結合により細胞内領域のチロシン残基がリン酸化を受けるとJAK-STAT系、なかでも特にJAK2およびSTAT3がリン酸化され、さらにリン酸化STAT3はダイマーを形成してレプチン標的遺伝子の転写調節

に関与するものと考えられている。しかしながらこれまでのレプチン受容体による細胞内情報伝達機構に関する報告は神経細胞以外の培養細胞を用いた検討に限られてきた。そこで本研究では、初代培養ラット視床下部ニューロンを用いた実験系を確立し、レプチンの細胞内情報伝達機構を解析することによりレプチン抵抗性発症の分子機構の解明を目指す。

【研究方法】

妊娠17日目SDラット胎仔視床下部を細切およびトリプシン処理したのちB27添加Neurobasalメディウムにて培養した。培養4日目から6日目まで星状細胞をはじめとする神経細胞以外の細胞の除去を目的としてAra-Cを添加した。実験はAra-C除去後、培養7日目から10日目に行った。図1Aに培養10日目の初代培養ラット視床下部ニューロンの光顕像を示す。蛋白の定

量は細胞溶解液を用いてウエスタンプロット法にて検討した。STAT3のDNA結合能はSTAT3認識配列を含むオリゴDNA、human serum inducible element (hSIE)をプローブに核抽出物を用いてゲルシフト法にて検討した。遺伝子発現はtotal RNAを用いてRT-PCR法またはノーザンプロット法にて検討した。(倫理面への配慮) 動物愛護上の配慮として動物は適切な麻酔剤を用いて安楽死させた後、実験に使用した。

【研究結果】

RT-PCR法を用いて初代培養ラット視床下部ニューロンにおいてラット視床下部と同程度にレプチン受容体が発現していることを確認した(図1B)。初代培養ラット視床下部ニューロンにレプチン100μMを添加すると20分後を頂値としてリン酸化STAT3は約4倍に増加した(図2A)。この時、全STAT3量に明らかな変化は認められなかった(図2B)。ゲルシフト法を用いてSTAT3のDNA結合能を検討した(図3)。レプチン100μMの添加により初代培養ラット視床下部ニューロン核抽出物中にhSIEとDNA蛋白複合体を形成する蛋白の増加が確認され、レプチンはSTAT3をリン酸化するとともにSTAT3のプロモーター領域への結合を促進することが明らかになった。またレプチン100μMの添加により初代培養ラット視床下部ニューロンにおいて摂食抑制因子であるPOMC遺伝子の発現は2時間後を頂値として約2.5倍に増加することが確認された(図4)。次にレプチンのPOMC遺伝子発現亢進作用がSTAT3を介した作用であることをSTAT3のドミナントネガティブ体であるY705Fをアデノウイルスベクターを用いて初代培養ラット視床下部ニューロンに発現させ検討した(図5A, B)。初代培養ラット視床下部ニューロンにおけるレプチンによるSTAT3のリン酸化はY705Fにより完全に消失した。この時、レプチンによるPOMCの遺伝子発現亢進作用もY705Fによりほぼ完全に消失した。

【考察】

初代培養ラット視床下部ニューロンにおいてレプチンはSTAT3のリン酸化を介してPOMCの遺伝子発現を亢進させることが明かになった。レプチン抵抗性の発症機構に関してはレプチンの脳内移行性の問題、細胞内情報伝達の問題、中枢における作用経路の問題が想定されるが、初代培養ラット視床下部ニューロンは

レプチン抵抗性における細胞内情報伝達の問題を検討する上で有用なモデル系であると考えられた。

【結論】

初代培養ラット視床下部ニューロンはレプチンの細胞内情報伝達機構の解析に有用なモデル系であることが明かとなった。

【参考文献】

1. Hosoda K, Masuzaki H, Ogawa Y, et al. Development of radioimmunoassay for human leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 234-239.
2. Tartaglia LA, Dembrski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83:1263-1271.
3. Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, et al. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 1993; 35: 567-576.
4. Twardy DJ, Wright TM, Ziegler SF, et al. Granulocyte colony-stimulating factor rapidly activates a distinct STAT-like protein in normal myeloid cells. *Blood* 1995; 86: 4409-4416.
5. Friedman JM. The alphabet of weight control. *Science* 1997; 385: 119-120.
6. Kaptein A, Paillard V and Saunders M. Dominant negative Stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J Biol Chem* 1996; 271: 5961-5964.

【研究発表】

学会発表

1. 海老原健、小川佳宏、益崎裕章、新谷光世、宮永史子、中尾一和 レプチンの視床下部作用の分子機構 第73回日本内分泌学会学術総会、2000.6.16-18、京都
2. 海老原健、小川佳宏、中尾一和 中枢におけるレプチン作用の分子機構 第27回日本神経内分泌学会、2000.10.13-14、神戸

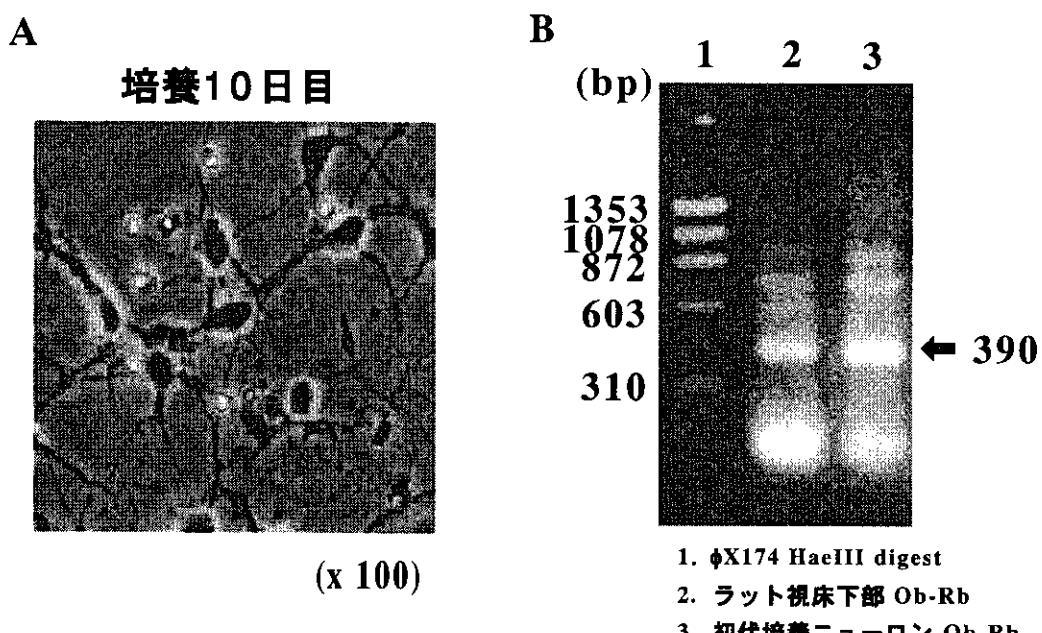


図1. 初代培養ラット視床下部ニューロンの光顕像と
レプチン受容体(Ob-Rb)遺伝子発現

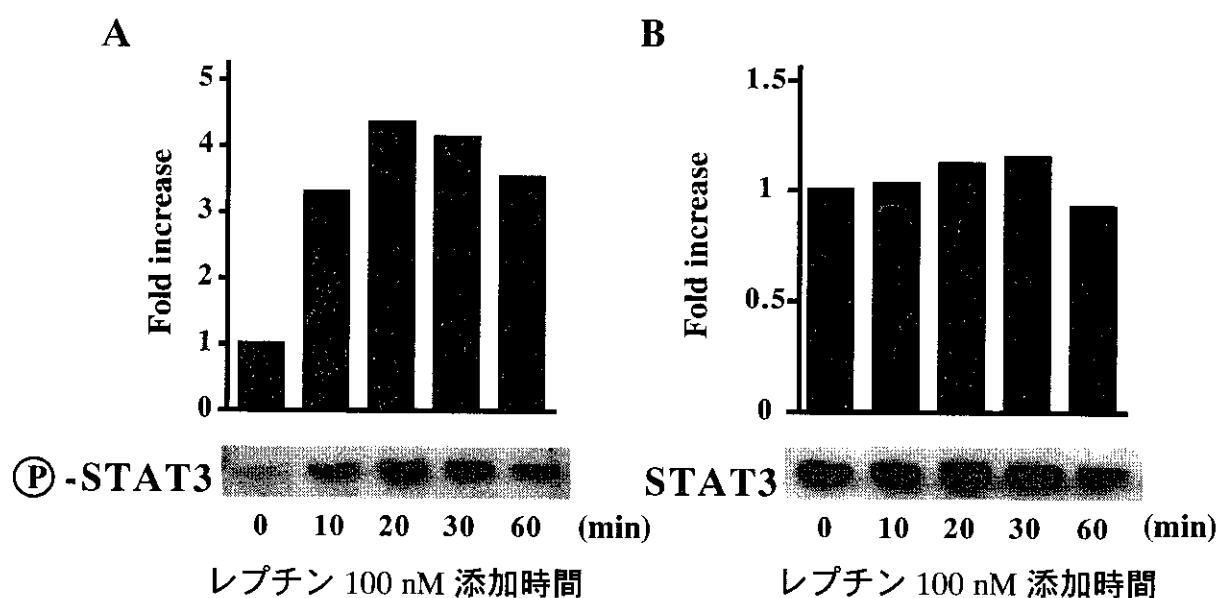
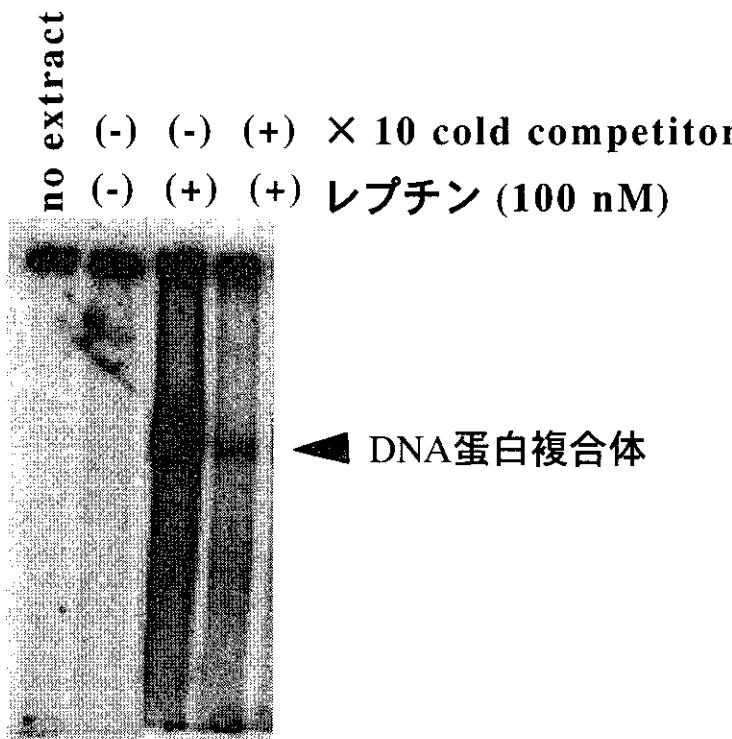


図2. 初代培養ラット視床下部ニューロンにおけるレプチンの
STAT3リン酸化に及ぼす影響



probe: hSIE (human serum inducible element)

図3. 初代培養ラット視床下部ニューロンにおけるレプチニンのSTAT3のDNA結合に及ぼす影響

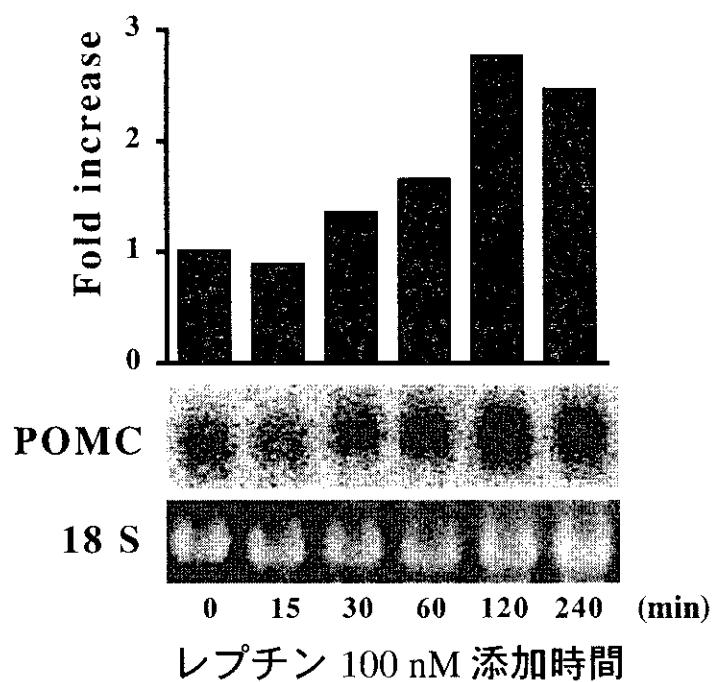


図4. 初代培養ラット視床下部ニューロンにおけるレプチニンのPOMC遺伝子発現に及ぼす影響

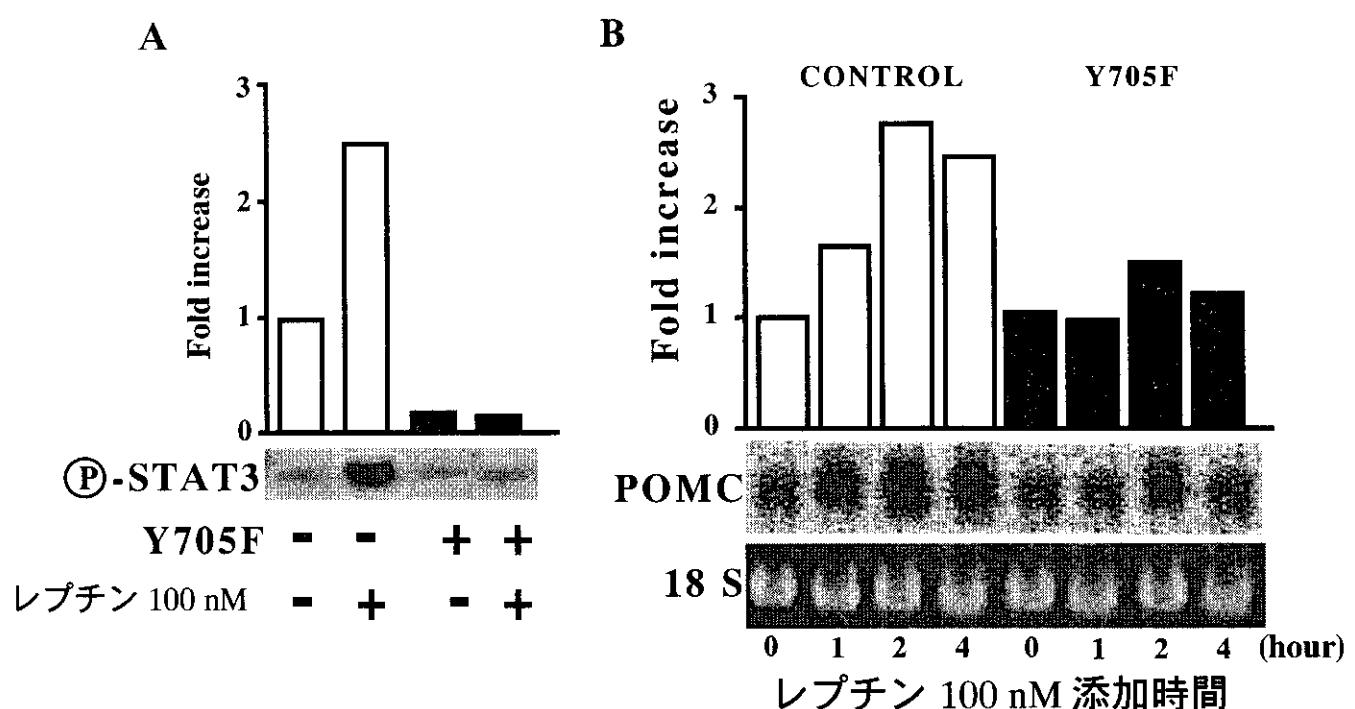


図5. 初代培養ラット視床下部ニューロンにおけるレプチンの STAT3リン酸化およびPOMC遺伝子発現亢進作用に及ぼす STAT3ドミナントネガティブ体の影響

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

新しい摂食調節ペプチドの単離・精製 (グレリンとNMU)

分担研究者 児島 将康 久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門 教授

【研究要旨】

オーファン受容体の内因性リガンドとして同定した2種類のペプチド、グレリンとニューロメジンU(NMU)は視床下部の弓状核に存在することから、摂食調節作用が考えられた。グレリンは摂食刺激ペプチドであり、NMUは摂食抑制ペプチドである。それぞれの抗体の脳室内投与によって、これらペプチドの作用は阻害された。

【研究目的】

近年、生理活性ペプチドによる摂食行動の調節が明らかになってきており、生活習慣病とくに肥満との関連が指摘されている。われわれがオーファン受容体の内因性リガンドとして精製・構造決定した2つのペプチド、グレリンとニューロメジンU(NMU)は共に視床下部の弓状核に存在し、摂食調節作用に関与する可能性が示唆された。そこで、グレリンとNMUのラット摂食行動に及ぼす影響について検討した。

【研究方法】

グレリンとNMUのラット摂食行動に及ぼす影響について調べるため、2ヶ月齢の雄ラットの脳室内にペプチドを投与し、摂食行動を観察し、摂食量を測定することを計画した。ラット頭部にカニューレの設置手術を施し、外部から脳室内にペプチド溶液を投与できるようにした。手術から回復後、グレリンあるいはNMUをカニューレから脳室内へ投与し、その摂食量を測定した。

（倫理面への配慮）

ラットのカニューレ設置手術の実験手技では、日本生理学会の実験動物取扱のガイドラインに基づいて、麻酔下において処置した。他の実験においても、動物愛護の面での十分な配慮を行っている。

【研究結果】

1. グレリンの摂食行動促進作用（図1）

グレリンは胃から単離精製された成長ホルモン分泌促進活性を持つペプチドで、脳内では視床下部の弓状核に限局して存在する。このことからグレリンの摂食行動調節作用が考えられた。

われわれはラット脳室内にグレリンを投与し、摂食量を測定した。脳室内グレリンの投与後、ラットは摂食を開始し、2時間の摂食量はグレリン 3 pmolの投与量から容量依存的に増加した。グレリンの摂食量増加作用は、GHS受容体（グレリン受容体）のアンタゴニストとの同時投与により抑制された。また抗グレリン抗体を脳室内に投与すると、摂食量は抑制された。このことからグレリンは内因性の摂食亢進ペプチドであることが確かめられた。

次にグレリンの連続投与による効果を調べた。グレリン250pmol/日の脳室内投与の間、ラットの摂食量は増加し、12日目の体重はコントロール・ラットに比べて増加した。

グレリンの脳室内投与によって反応する神経細胞をFos蛋白の発現で調べた。その結果、グレリン投与後にラット脳内では、視床下部（arcuate, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei）、帯状回、

海馬などでFos蛋白の発現がみられた。このことから、グレリンは摂食行動と密接な関係がある部位の神経細胞を刺激するとともに、学習や記憶に関連する部位も刺激することがわかった。

摂食を調節する神経ペプチドにNPY、AGRP (agouti-related protein)が知られているが、グレリンとこれらの神経ペプチドとの関係を調べた。グレリンの摂食量増加は、抗NPY抗体や、NPY受容体阻害剤の投与によって抑制された。逆にNPYの摂食量増加は、抗グレリン抗体の投与によって抑制されなかった。またグレリンの摂食量増加は、抗AGRP抗体や α -MSHによって抑制された。このことから、NPYやAGRPはグレリンの摂食刺激作用を調節していると考えられた。

2. NMUの摂食行動抑制作用（図2）

NMUはブタ脊髄より平滑筋収縮活性を指標として単離精製された生理活性ペプチドであるが、その受容体や生理作用については長い間不明であった。われわれはオーファン受容体GPR66 (FM3)の内因性リガンドがNMUであることを見いだした。NMUの脳内分布では、視床下部弓状核にあるNMU神経細胞から神経纖維が伸びている。このことからNMUの摂食調節作用が考えられた。NMUの脳室内投与によって、NMUは強力な摂食行動抑制を示した。逆に抗NMU抗体の脳室内投与によって、摂食量は増加した。このことから、NMUは内因性の摂食抑制ペプチドであることが明らかになった。

またNMUの脳室内投与によって、運動量増加、体温上昇、熱産生亢進などの作用が見られた。このことから、NMUは代謝活動を活発化するペプチドであると考えられた。

【考察】

オーファン受容体の内因性リガンドとして見いだされたグレリンとNMUは、共に視床下部弓状核の神経細胞に存在し、摂食調節作用が考えられた。われわれは合成したペプチドをラット脳室内に投与し、摂食行動を調べた。その結果、グレリンは強力な摂食促進ペプチドであり、逆にNMUは強力な摂食抑制ペプチドである。

【結論】

新規成長ホルモン分泌促進ペプチドのグレリンは、

脳内において作用する強力な摂食促進ペプチドであり、平滑筋収縮ペプチドのNMUは摂食抑制ペプチドである。

【健康危険情報】

予備的な血中グレリン濃度の測定結果から、グレリン濃度は体重と負の相関があるようである。つまり、肥満者では血中グレリン濃度は低めで、逆にやせている人では血中濃度は高めの傾向にある。今後さらに例数を増やして検討していきたい。

【研究発表】

1. 論文発表

1. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409:194-8.
2. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K Ghrelin and Des-acyl Ghrelin: Two Major Forms of Rat Ghrelin Peptide in Gastrointestinal Tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279:909-13.
3. Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141:4255-61.
4. Nakazato M, Hanada R, Murakami N, et al. Central effects of neuromedin U in the regulation of energy homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277:191-4.
5. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276:905-8.
6. Kojima M, Haruno R, Nakazato M, et al. Purification and identification of neuromedin U as an endogenous ligand for an orphan receptor GPR66 (FM3). *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276:435-8.
7. Date Y, Murakami N, Kojima M, et al. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem*

- Biophys Res Commun* 2000; 275:477-80.
8. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K
Purification and characterization of rat
des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand
for the growth hormone secretagogue receptor.
J Biol Chem 2000; 275:21995-2000.
2. 学会発表
1. 第11回国際内分泌学会（シドニー、オーストラリア）

Masayasu Kojima Identification and characterizaiton of ghrelin, a novel growth hormone releasing peptide from stomach.

【知的財産権の出願・登録状況】

1. 特許取得

新規ペプチド（出願中）

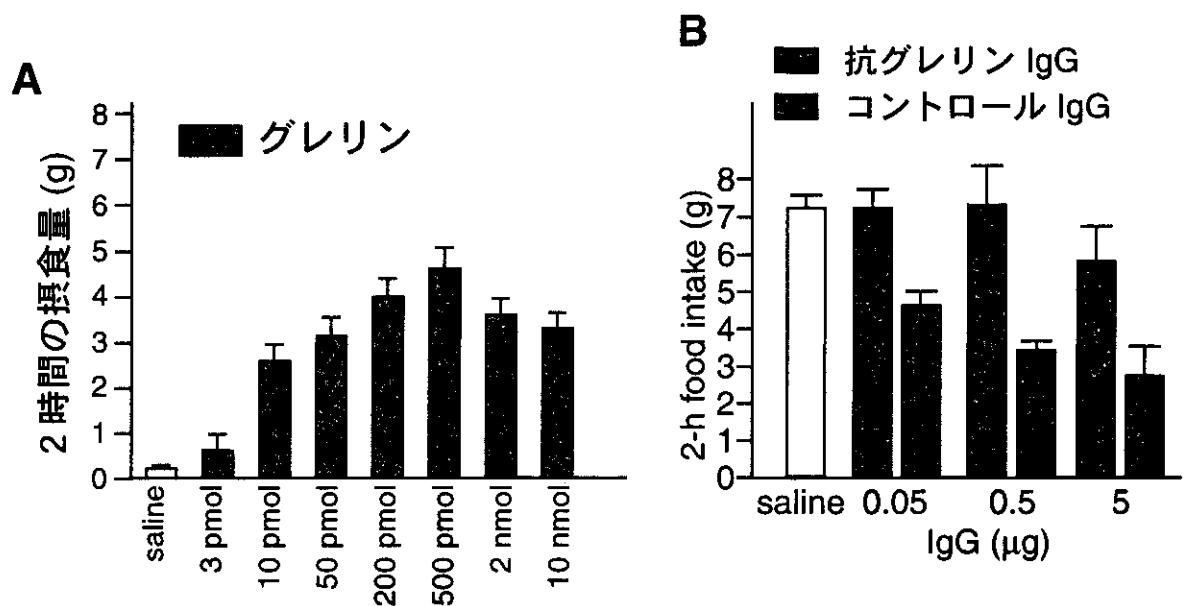


図1 (A)ラット脳室内へのグレリン投与による摂食量の変化
(自由行動のラット、2時間の摂食量) (B) 抗グレリン抗体の脳室内投与により摂食行動は抑制される(絶食ラットでの2時間の摂食量)

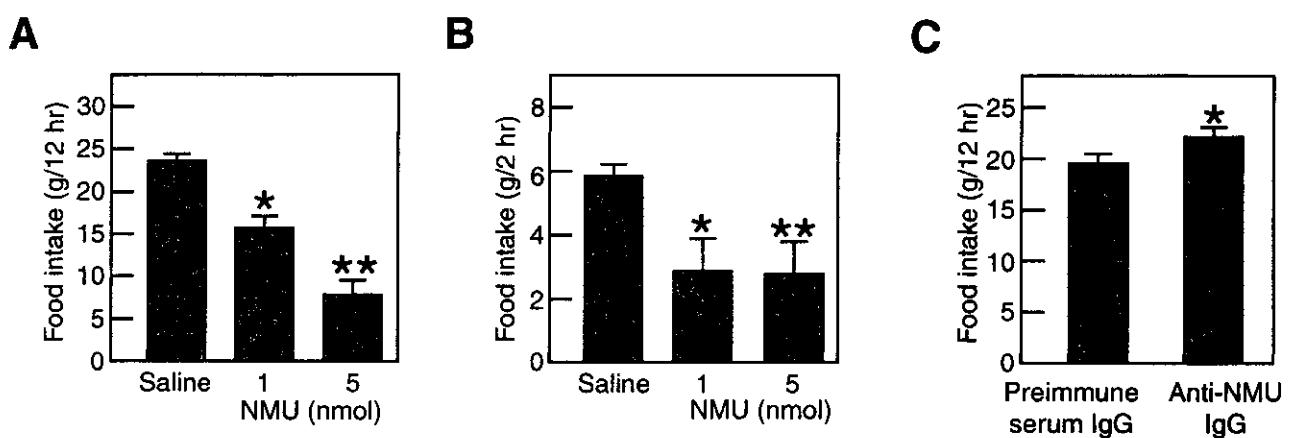


図2 ニューロメジンUの脳室内投与による摂食抑制 (A)NMU投与自由摂食ラットでの摂食量(12時間) (B)8時間絶食ラットでの摂食量(2時間) (C)抗NMU-IgGは暗期の摂食量を増加させる。

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

グレリンの中枢性摂食調節作用

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

【研究要旨】

最近ラットの胃より単離同定されたグレリンはGrowth hormone secretagogue(GHS)受容体の内因性リガンドであるが、視床下部弓状核にも発現しており摂食調節作用を有する可能性がある。本研究では、グレリンの中中枢性摂食調節作用について検討した。グレリンの側脳室内投与は視床下部NPY遺伝子発現を亢進し、ラットの摂食量及び体重を用量依存的に増加した。又、グレリンの摂食亢進作用はY1受容体特異的拮抗薬(J-115814)により用量依存的に減弱された。更に、レプチニンの側脳室内投与により減少する視床下部NPY遺伝子発現と摂食量は、グレリンを同時投与することにより用量依存的に減弱した。以上より、グレリンはNPY/Y1受容体系を活性化することにより摂食促進をもたらし、レプチニンの摂食抑制作用に拮抗することが明らかになった。

【研究目的】

Growth hormone secretagogue(GHS)は視床下部弓状核NPYニューロンを活性化し摂食促進作用をもたらすことが示唆されている。ラットの胃より単離同定されたGHS受容体の内因性リガンドであるグレリンは、視床下部弓状核においても発現が認められ、中枢性摂食調節作用に関与すると考えられている。一方、脂肪細胞より分泌されるレプチニンは摂食調節作用を有し、少なくとも一部は視床下部弓状核に存在するNPYの産生を低下することによると報告されている。本研究では、グレリンの中中枢性摂食調節作用の分子機構について検討し、レプチニンの摂食調節作用に対する影響も検討した。

以上の検討により、グレリンの中中枢性摂食調節作用が明らかになり、肥満や神経性食欲不振症等の中中枢性摂食異常症におけるグレリンの病態生理的意義が明らかになる可能性がある。

【研究方法】

8週齢雄性SDラット、10-11週齢雄性GH遺伝子変異を有するSDR(Spontaneous dwarf rats)を用いた。

ラットの側脳室内に留置したよりカテーテルよりグレリン、NPY/Y1受容体特異的拮抗薬J-115814、レプチニンを単独あるいは同時投与し、4時間の累積摂餌量、体重変化及びノーザンプロット法にて視床下部NPY遺伝子発現を検討した。

(倫理面への配慮) 実験に用いた動物に対しては、動物愛護上の配慮として、長時間にわたり強い苦痛をもたらす方法を適用する時には、しかるべき鎮痛、鎮痛剤、または麻酔剤を、獣医学的に認められた方法を用い、また、適切な麻酔剤を用いて安楽死させた。

【研究結果】

グレリンは、用量依存的(5-5000ng)にSDラットの累積摂餌量及び体重を増加させ、500ngで最大効果が認められた(累積摂食量: 1.25±0.32 vs. 5.12±0.38g、P<0.01; 体重変化: -4.87±0.96 vs. 1.39±0.84g、n=10、P<0.01) (図1)。また、500ngのグレリンは、SDRにおいても同様に摂食及び体重増加作用を示した(累積摂食量: 0.70±0.19 vs. 1.66±0.08g、P<0.01; 体重変化: -2.00±0.55 vs. -0.17±0.48g、n=10、P<0.05) (図2)。グレリン投与により、視床下部NPY及び遺伝子

発現は約1.6倍上昇した ($P<0.05$) (図3)。J-115814 (30 μg) 単独では摂餌量、体重に変化を与えたかったが、グレリンによる摂食量及び体重増加を完全に抑制した (累積摂食量: 5.12 ± 0.38 vs. 1.22 ± 0.71 g, $P<0.01$; 体重変化: 1.39 ± 0.84 vs. -6.00 ± 0.63 g, n=10, $P<0.01$) (図4)。レプチニン (2 μg) (暗期に投与) はSDラットの摂食量及び体重を減少させたが、この減少はグレリンにより用量依存性に抑制された (累積摂食量: 1.03 ± 0.21 vs. 2.19 ± 0.23 g, $P<0.01$; 体重変化: -4.46 ± 0.46 vs. -0.14 ± 0.53 g, n=12, $P<0.01$) (図5)。また、レプチニンにより視床下部NPY遺伝子発現は65%低下した ($P<0.01$) が、この低下はグレリンにより抑制された ($P<0.01$) (図6)。

【考察】

グレリンは、GH分泌促進作用とは独立に摂食促進作用を有し、少なくとも一部はNPY/Y1受容体系を介することにより強力な摂食促進作用を有することが明らかとなった。また、グレリンは視床下部NPY遺伝子発現を亢進させることによりレプチニンの摂食抑制作用に拮抗することも明らかになった。以上より中枢性摂食調節作用におけるグレリンの生理的、病態生理的意義が示唆された。

【結論】

中枢性摂食調節におけるグレリンの生理的、病態生理的意義が示唆された。

【参考文献】

- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974-977.
- Kamegai J, Hasegawa O, Minami S, et al. The growth hormone-releasing peptide KP-102 induces c-fos expression in the arcuate nucleus. *Mol Brain Res* 1996; 39: 153-159.
- Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD: Alteration of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 1996; 274: 1704-1707.
- Dickson SL, Luckman SM. Induction of *c-fos* messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y

and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 1997; 138: 771-777.

- Torsello A, Luoni M, Schweiger F, et al. Novel hexarelin analogs stimulate feeding in the rat through a mechanism not involving growth hormone release. *Eur J Pharmacol* 1998; 360: 123-129.
- Shibasaki T, Yamauchi N, Takeuchi K, et al. The growth hormone secretagogue KP-102-induced stimulation of food intake is modified by fasting, restraint stress, and somatostatin in rats. *Neurosci Lett* 1998; 255: 9-12.
- Friedman JM, Halaas JL: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-770.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
- Date Y, Murakami N, Kojima M, et al. Central effect of a novel acylated peptide ghrelin on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 477-480.

【研究発表】

1. 論文発表

- M. Shintani, Y. Ogawa, K. Ebihara, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001; 50: 227-232.

2. 学会発表

- 新谷光世、小川佳宏、海老原健、阿部恵、宮永史子、高屋和彦、細田公則、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和 摂食調節に与えるグレリンの影響 第21回日本肥満学会、2000.10.19,20、名古屋
- 新谷光世、小川佳宏、海老原健、宮永史子、宮澤崇、阿部恵、中所英樹、益崎裕章、林達也、井

上元、吉政康直、細田公則、児島将康、寒川賢治、
中尾一和 胃におけるghrelin遺伝子発現に及ぼす

レプチンの影響 第73回日本内分泌学会学術総会、
2000.6.16-18、京都