

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13年度研究報告書

主任研究者 中 尾 一 和

# 平成 13 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  |
| インスリン分泌低下型糖尿病モデルマウスの中枢性摂食調節における<br>レプチンの意義                  | 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                             |    |
| グレリン・ノックアウト・マウスによる摂食調節機構の解明                                 | 13 |
| 久留米大学分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門 見島 将康                               |    |
| 新規 MC4R 遺伝子変異により発症する肥満症                                     | 17 |
| 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                                     |    |
| オレキシン産生神経の摂食行動の制御における役割に関する研究                               | 32 |
| 筑波大学 基礎医学系 桜井 武   |    |
| 単純性肥満児における血中グレリンの検討   | 40 |
| 東京女子医科大学 村田 光範  |    |
| 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンによる<br>ヒスタミン神経活性化機構の解析                       | 43 |
| 大分医科大学医学部 内科学第一講座 坂田 利家                                     |    |
| 神経性食欲不振症における Corticotropin-releasing hormone 1<br>受容体遺伝子の解析 | 56 |
| 日本医科大学 生理学第二 芝崎 保   |    |

|   |     |
|---|-----|
| 摂食関連ペプチドの認知機能への影響に関する研究                       | 61  |
| 東京大学医学系大学院 ストレス防御・心身医学講座 久保木 富房               |     |
| 中枢性摂食異常症患者における成長ホルモン刺激因子<br>「グレリン」の病態意義に関する研究 | 64  |
| 国立京都病院 内分泌代謝性疾患センター 葛谷 英嗣                     |     |
| 摂食障害の実態調査（地域間較差を含めて）に関する研究                    | 71  |
| 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<br>心理的特性との関連         | 78  |
| 九州大学大学院医学研究院 心身医学 久保 千春                       |     |
| 摂食障害の転帰調査                                     | 85  |
| 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                             | 95  |
| Ⅳ. 平成13年度研究者名簿                                | 103 |

# 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 | 児島 将康  | 久留米大学分子生命科学研究科遺伝情報教授       |
|       | 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 |
|       | 細田 公則  | 京都大学大学院人間・環境学研究科助手         |
|       | 桜井 武   | 筑波大学基礎医学系助教授               |
|       | 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      |
|       | 坂田 利家  | 大分医科大学内科学第一講座教授            |
|       | 芝崎 保   | 日本医科大学生理学第二教授              |
|       | 久保木 富房 | 東京大学医学系大学院ストレス防衛・心身医学講座教授  |
|       | 葛谷 英嗣  | 国立京都病院院長                   |
|       | 野添 新一  | 鹿児島大学医学部附属病院心身医療科教授        |
|       | 久保 千春  | 九州大学大学院医学研究院心身医学教授         |
|       | 中井 義勝  | 京都大学医療技術短期大学部教授            |

#### 【平成 13 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、予後を変容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 13 年度は、以下のことを目標とした。

基礎生物学的研究としては、1) 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、転帰調査を追加して全国的規模で行い、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、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 13 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。一方、脂肪萎縮症では、脂肪の萎縮とともに血中レプチン濃度の低下が認められ、レプチン作用の低下によって過食など多彩な病態が形成されると考えられる。そこで一般に1型糖尿病患者においても、インスリン分泌低下とともに血中レプチン濃度の低下と過食が認められるため、ストレプトゾトシンによりレプチントランスジェニックマウスにインスリン分泌低下型糖尿病を誘導して摂食行動について検討した。しかしながらストレプトゾトシン投与によりレプチントランスジェニックマウスにおいても野生型マウスと同程度の摂食量増加が観察されたことから、1型糖尿病における摂食亢進にはレプチン以外の摂食調節因子が関与している可能性が示唆された。(中尾)

メラノコルチン4受容体(MC4R)は視床下部に発現するG蛋白共役7回膜貫通型受容体であり、中枢性摂食調節における重要性が示唆されている。今回、新規ホモ接合体MC4R遺伝子異常症を見出した。症例は39歳女性。身長161cm、体重160kg、BMI162kg/m<sup>2</sup>、出生時体重は3360gで生後10ヶ月より肥満が認められた。遺伝子解析の結果、MC4R遺伝子コドン98においてGGA(Gly)→AGA(Arg)のホモ接合体変異を認めた。両親はコドン98のヘテロ接合体であった。この異常を有するMC4Rを強制発現したHEK293細胞ではαMSHによるcAMP産生が著しく低下し、αMSHのMC4Rへの結合能も著しく低下していた。以上より、MC4R遺伝子変異が高度肥満の原因になることが証明された。(小川)

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。その生理的な意義を個体レベルで調べるために、オレキシン神経を特異的に脱落させたマウスを絶食させて、行動の変化を野生型のマウスと比較した結果、このマウスでは、絶食時にみられる覚醒レベルの上昇や行動の変化が見られなくなっていることが明らかになった。以上の結果から、オレキシ

ン神経は、全身の栄養状態に応じて、覚醒、行動、自律神経機能制御し、摂食行動を調節していることが示唆された。(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グレリンと名付け、GPR66の内因性リガンドは、ニューロメジンU (NMU)であった。グレリンとNMUはともに視床下部弓状核に存在し、グレリンは強力な摂食行動促進ペプチドであり、NMUは逆に摂食行動を抑制する。マウスのグレリン遺伝子は4つのエキソンから構成されており、グレリン・ペプチドは第2エキソンと第3エキソンに存在する。一方、NMU遺伝子は10のエキソンから構成されており、NMUペプチドは第7エキソンから第9エキソンに存在する。これらの情報からターゲティング・ベクターを構築し、グレリンとNMU摂食調節機能を調べる目的で、ノックアウトマウスの作製を行っている。(兎島)

TRHの脳室内投与によりラットの食行動が抑制されるが、この摂食抑制作用は、ヒスタミン合成酵素の阻害薬を用いて視床下部ヒスタミンを枯渇させることで減弱した。さらにTRHの投与により、神経ヒスタミンの細胞体が存在する結節乳頭核(TMN)とその投射部位である室傍核(PVN)において神経ヒスタミンの代謝回転が亢進した。TMNのヒスタミン神経細胞体にTRH受容体type2が存在することも判明した。以上よりPVNに存在するTRHニューロンはTMNのヒスタミン神経系へ投射しており、同部のTRH受容体2を介してヒスタミン神経系を賦活化し、食行動を抑制的に調節していることが示唆された。(坂田)

中枢性摂食異常症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の約4割を占める。骨格筋のエネルギー消費調節に関わると考えられる非共役蛋白(UCP)3について、骨格筋特異的UCP3過剰発現トランスジェニックマウスを作製し、解析した。UCP3トランスジェニックマウスは対照マウスに比較して、通常食で有意な変化を示さなかったが、高脂肪食で体重増加の低下、副精巣周囲白色脂肪組織重量の低下、エネルギー消費の増加を示し、高脂肪食下の高発現のUCP3の体重低下、エネルギー消費増加の作用が明らかになった。(細川)

2) 臨床的研究として、本症の中枢セロトニン機能と心理特性との関連（久保）、摂食関連ペプチドによる記憶・学習機能への影響（久保木）、本症とCRF受容体遺伝子多型との関連（芝崎）、本症や小児肥満症におけるグレリンの臨床的意義（葛谷、村田）などの研究を行った。

3) 摂食障害の疫学・臨床像を明らかにするために、厚生省特定疾患中枢性摂食異常症分科会で作成した摂食障害調査表を用い、全国の専門病院に依頼し、2000年度の3ヶ月間に限定した実態調査を行った。その結果、病型の割合が変化し、遷延化例の割合が増加し、さらに学生を除く就労可能な年齢の患者の61.3%が無職であることが判明した。また、疾病状況、発病前のストレス状況について大都市圏と地方、病型別、食行動異常の有無、及び誘発因子としてのダイエットの有無で比較検討し、地域間較差の存在が明らかとなった。（野添）

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、23施設から1006人についての調査票が回収された。

その結果、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。

平成13年度は、初診から4-10年経過した摂食障害患者234名を対象に転帰調査を実施した。その結果、初診時診断でANの転帰は治癒82名、軽快16名、不変37名、BNの転帰は治癒51名、軽快12名、不変23名であった。その調査結果を、発症年齢、病前体重、初診時年齢、初診時BMI、最小BMI、罹病期間、臨床所見、食行動異常、身体像異常、家族病理、社会適応、comorbidity、問題行動、入院歴等との相関およびこれらを独立変数とする多変量解析を実施し、予後予測因子を検索した。その結果ANでは、社会適応、comorbidity、罹病期間、問題行動、過食と嘔吐、初診時年齢、最小BMIが転帰と相関した。またBNでは社会適応、問題行動、comorbidity、親依存、初診時BMIが転帰と相関した。また多変量解析の結果ANでは、社会適応、comorbidity、罹病期間が、BNでは社会適応が予後予測因子と考えられた。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13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基礎が確立された。

## 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

### インスリン分泌低下型糖尿病モデルマウスの 中枢性摂食調節におけるレプチンの意義

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  
宮永 史子 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】

インスリン分泌低下型糖尿病では体重減少とともに血中レプチン濃度の低下と過食が認められる。そこでインスリン分泌低下型糖尿病の摂食調節におけるレプチンの意義を検討するために、ストレプトゾトシン（STZ）によりレプチン過剰発現トランスジェニックマウス（LepTg）と同胞野生型マウスにインスリン分泌低下型糖尿病を誘導した。STZ投与により野生型マウスでは血中レプチン濃度の低下にともない視床下部における POMC 遺伝子の発現減弱と NPY、AGRP 各遺伝子の発現亢進が認められたが、LepTg マウスでは高レプチン血症が持続し STZ 投与前後での視床下部における遺伝子発現変化は認められなかった。しかしながら STZ 投与により LepTg マウスにおいても摂食量増加が観察されたことから、1 型糖尿病における摂食亢進にはレプチン以外の摂食調節因子が関与している可能性が示唆された。

#### 【研究目的】

インスリン分泌低下型糖尿病ではインスリン作用の減少により体重減少とともに血中レプチン濃度の低下と過食が認められる。レプチンは主に視床下部に作用して摂食抑制因子であるプロオピオメラノコルチン（POMC）遺伝子の発現を亢進させ、摂食促進因子である Agouti 関連蛋白質（AGRP）やニューロペプチド Y（NPY）遺伝子の発現を抑制することにより摂食を抑制すると考えられている。ヒトのインスリン分泌低下型糖尿病と同様にストレプトゾトシン（STZ）投与により誘導したインスリン分泌低下型糖尿病モデルラットにおいても摂食亢進が認められ、低レプチン血症とともに視床下部における POMC 遺伝子の発現低下と AGRP および NPY 遺伝子の発現亢進が報告されている（Diabetes 49:244, 2000）。インスリン分泌低下型糖尿病で認められる過食がレプチンの視床下部を介した摂食抑制作用の減弱によりもたらされる

可能性を検討するために、レプチン過剰発現トランスジェニックマウス（TGM）に STZ を用いてインスリン分泌低下型糖尿病を誘導し解析を行った。

#### 【研究方法】

14 週齢雄性 TGM および同胞野生型マウス（WT）に対し 200 mg/kg・BW の STZ あるいは生食を腹腔内投与し、2 週間後に血中グルコース、インスリン、レプチンの各濃度、摂食量、体重を測定した。また屠殺後、視床下部を採取し RNA を抽出後、ノーザンブロット法を用いて各種摂食調節ペプチドの遺伝子発現を検討した。さらに STZ を投与した TGM および WT に対し 0.2~1.6 mU/g・BW のインスリンを 1 日 2 回腹腔内投与し、血中グルコース、インスリン、レプチン濃度および摂食量、体重を測定した。

## 【研究結果】

STZ 投与前の TGM および WT の血中グルコース濃度に有意差は認められなかったが、血中インスリン濃度は TGM において低下が認められ、TGM ではインスリン感受性が亢進しているものと考えられた。しかしながら STZ の投与により TGM および WT の両者において血中インスリン濃度は著しく低下し、血中グルコース濃度も両者において同様の上昇が認められた (図 1)。STZ 投与により体重は TGM および WT の両者において減少が認められたが、摂食量は体重の減少に反して TGM および WT の両者において増加が認められた (図 2)。血中レプチン濃度は STZ 投与により WT では低下が認められたが、TGM では高レプチン血症が持続し STZ 投与による血中レプチン濃度の変化は認められなかった (図 3)。STZ 投与により WT の視床下部では POMC 遺伝子の発現低下が認められ、NPY および AGRP 遺伝子の発現亢進が認められた。しかしながら、TGM では摂食量が増加しているにもかかわらず POMC や NPY、AGRP の発現に変化は認められなかった (図 4)。つぎに STZ 投与により糖尿病を発症した TGM および WT に対しインスリン治療を行った。3.2 mU/g・BW/day のインスリン投与では WT の血中グルコース濃度の低下は認められなかったが、TGM では血中グルコース濃度の明らかな低下が認められた (図 5)。このとき、WT の体重に変化は認められなかったが TGM の体重は有意に増加した。一方、摂食量は両者において明らかな減少が認められた (図 6)。しかしながら、血中レプチン濃度は TGM および WT の両者において 3.2 mU/g・BW/day のインスリン投与による有意な変化は観察されなかった (図 7)。

## 【考察】

STZ 投与により WT および TGM の両者において摂食量の増加が認められたが、WT では STZ 投与により血中レプチン濃度の低下と視床下部における POMC の発現低下、NPY および AGRP の発現亢進が認められたのに対し、TGM では STZ による血中レプチン濃度、視床下部における POMC、NPY、AGRP の発現に変化は認められなかった。一方、WT の血中グルコース濃度が変化しない低用量のインスリン投与により WT と TGM の両者において摂食量の減少が認められたことから、インスリン分泌低下型糖尿

病における過食発症にはインスリンをはじめとするレプチン以外の因子が関与しているものと考えられた。

## 【結論】

インスリン分泌低下型糖尿病における過食には血中レプチン濃度の低下以外にもインスリンなどの複数の因子が関与している可能性が示唆された。

## 【参考文献】

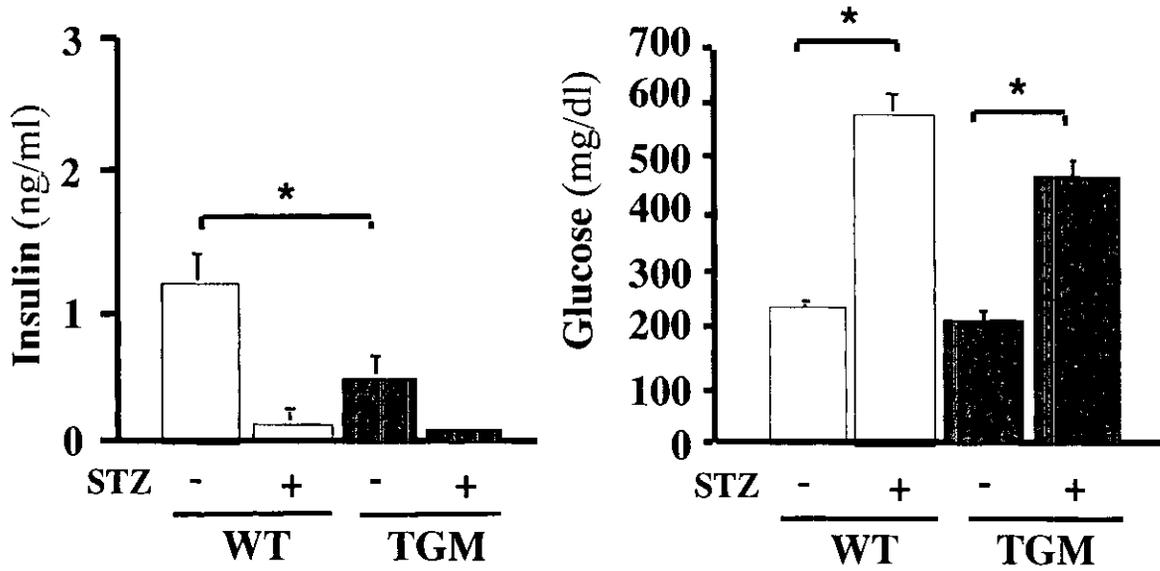
1. Ogawa Y, Masuzaki H, Hosoda K, et al. Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. *Diabetes* 1999; 48: 1822-1829.
2. Ebihara K, Ogawa Y, Katsuura Goro, et al. Involvement of Agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* 1999; 48: 2028-2033.
3. Sindelar DK, Havel PJ, Seeley RJ, et al. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* 1999; 48: 1275-1280.
4. Havel PJ, Hahn TM, Sindelar DK, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *Diabetes* 2000; 49: 244-252.

## 【研究発表】

学会発表

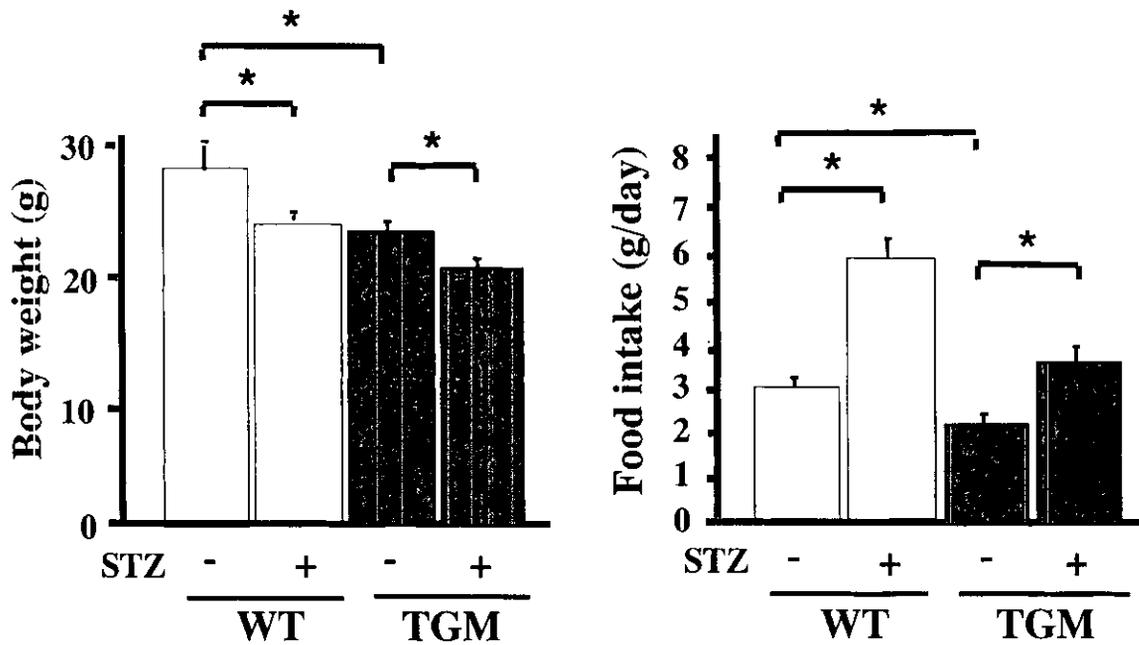
1. 宮永史子、小川佳宏、海老原健、新谷光世、阿部恵、益崎裕章、林達也、細田公則、井上元、中尾一和 インスリン分泌低下型糖尿病におけるレプチンの治療薬としての意義 第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会、2001.4.16-18、京都
2. 宮永史子、小川佳宏、海老原健、日高周次、新谷光世、阿部恵、田中智洋、中野英樹、宮澤崇、益崎裕章、林達也、細田公則、井上元、中尾一和 インスリン分泌低下型糖尿病におけるレプチンの病態生理的意義と治療薬としての可能性 第 6 回アディポサイエンス研究会、2001.8.18、大阪
3. 小川佳宏 肥満・糖尿病におけるレプチンの臨床応用の可能性 第 23 回日本臨床栄養学会学術講演会、2001.11.1-2、名古屋

図1. STZ投与による血中インスリンおよび  
グルコース濃度の変化



\*  $P < 0.001$

図2. STZ投与による体重および摂食量の変化



\*  $P < 0.01$

図3. STZ投与による血中レプチン濃度の変化

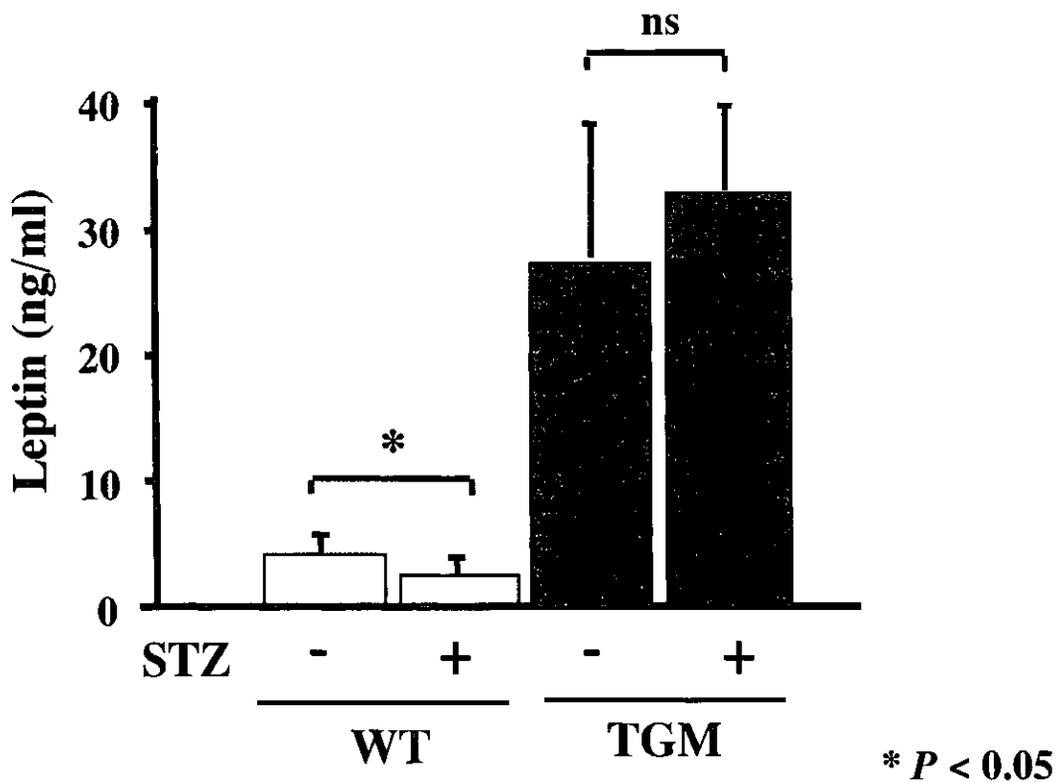


図4. STZ投与による視床下部遺伝子発現の変化

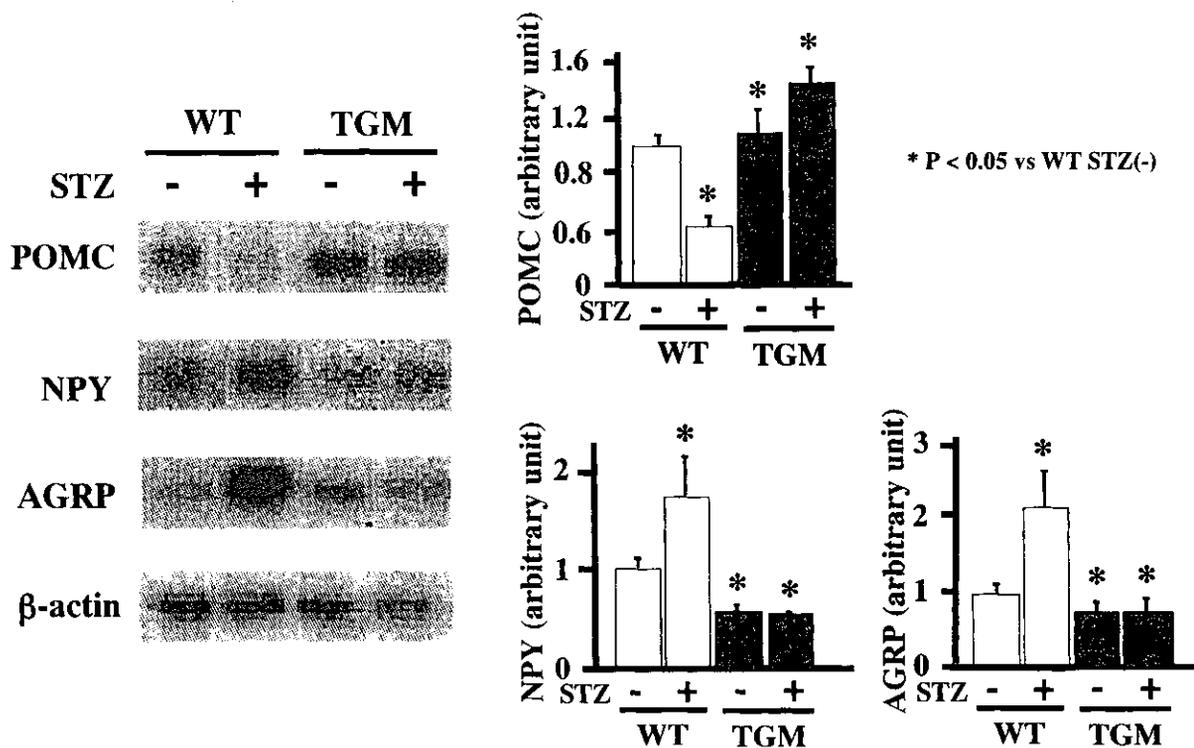


図5. インスリン治療による血中グルコース濃度の変化

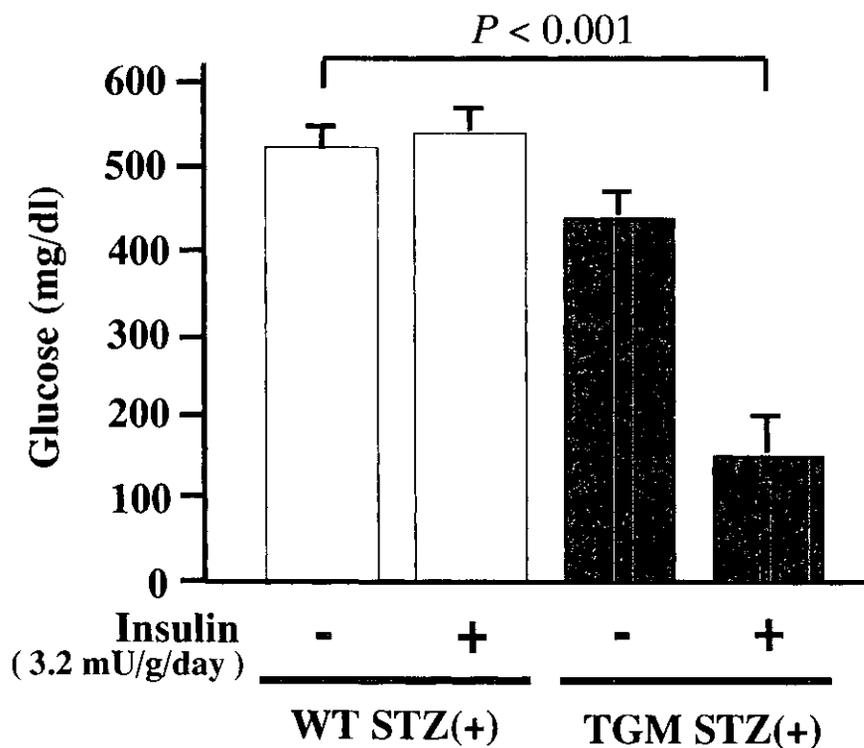


図6. インスリン治療による体重および摂食量の変化

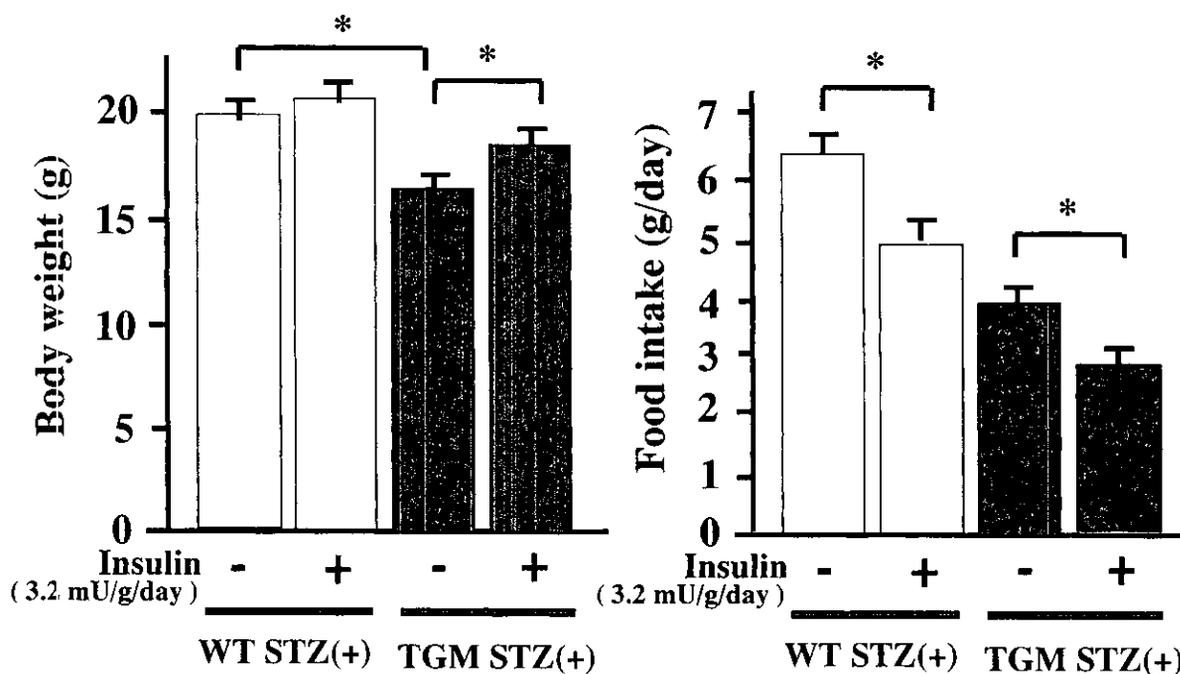
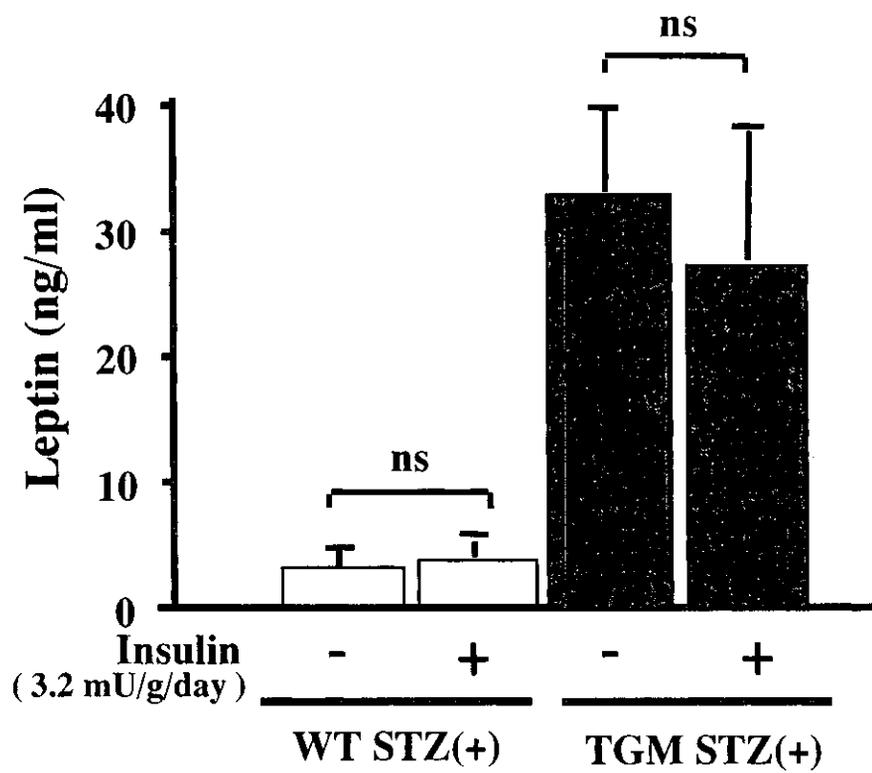


図7. インスリン治療による血中レプチン濃度の変化



# 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・ノックアウト・マウスによる 摂食調節機構の解明

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】

胃から発見されたグレリンは成長ホルモン分泌促進活性をもつとともに、脳室内投与によって強力な摂食亢進作用を示す。グレリンの生理的意義を解明する目的で、グレリンのノックアウト・マウスの作製を試みた。マウスグレリン遺伝子を単離し、その構造を決定し、ノックアウト・ベクターを構築した。現在キメラマウスを得て、F1ヘテロマウスの解析を行っている。

#### 【研究目的】

グレリンは胃から分泌される成長ホルモン分泌促進ペプチドであり、視床下部弓状核においては強力な摂食促進作用を示す。本研究ではグレリンの成長ホルモン分泌調節機能や摂食調節機能などを解明するため、グレリン・ノックアウト・マウスの作製を試み、グレリン欠損状態がどのような異常を引き起こすのか探ることを計画した。またグレリンは摂食亢進ペプチドであるが、その逆の作用を示す摂食抑制ペプチドであるニューロメジン U (NMU) についても、その生理的機能を明らかにするためにノックアウト・マウスの作製を試みた。

#### 【研究方法】

摂食調節ペプチドのノックアウト・マウス作製にあたっては定法どおり進めた。1, グレリンのマウス遺伝子をマウスゲノムライブラリーからスクリーニングし、その構造を決定した。2, グレリン遺伝子を含んだノックアウト用のベクターを作製した。3, ベクターをES細胞に transfection し、G418耐性クローンを選択し、PCR法、サザンブロット法にて、組み換え体を検索した。4, 得られた2種類の組み換えES細胞を injection し、キメラマウスを作製した。

NMU ノックアウト・マウスも同様に作製を進めた。  
(倫理面への配慮)

マウスの実験手技では、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処理した。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, マウス・ゲノム・ライブラリーをマウス・グレリン cDNA を用いてスクリーニングし、マウス・グレリン遺伝子のクローンを得た。塩基配列の解析の結果、マウス・グレリン遺伝子は4つのエキソンからなり、グレリン・ペプチドは第1エキソンと第2エキソンとにまたがって存在することが明らかになった。(他グループの報告では、この第1エキソンよりも5'サイドにごく短いエキソンが存在するともいわれている。) グレリン遺伝子は約4 kb の領域にコードされていた。一方、ヒト・グレリン遺伝子も4つのエキソンからなり、染色体3p25-26に存在していた。
- 2, グレリン遺伝子全体を含む計5 kb の領域を相同組み換えによって欠失させるため、5'アームを3.5 kb、3'アームを3.6 kb 含み、欠失領域にNeo耐性遺伝子を組み込んだベクターを構築した。

- 3, 構築したベクターを ES 細胞に transfect し、G418 耐性細胞を得た。この耐性細胞の DNA を抽出し、サザンブロット法にて、組み換え細胞をチェックした。その結果、約 400 個の耐性細胞から 2 種類の組み換え細胞が得られた。
- 4, 得られたグレリン遺伝子の組み換え細胞を卵細胞にインジェクションし、キメラマウスを作製した。

一方、NMU は生理活性ペプチド遺伝子では珍しく多数のエキソンに分かれていた。NMU は 10 個のエキソンからなり、NMU ペプチドも 3 つのエキソンにまたがって存在していた。NMU 遺伝子全長は約 10kb の長さであった。ヒト NMU 遺伝子は 4q13.1 に存在し、近傍の遺伝子には生体内時計遺伝子の clock が存在していた。

#### 【考察】

マウス・グレリン遺伝子の構造を解明し、グレリン・ノックアウト・マウスの作製を試みた。ノックアウト用のベクターを ES 細胞に transfect し、G418 耐性細胞を selection したが、400 個の耐性細胞で組み換え体はわずかに 2 個であった。このようにグレリン組み換え ES 細胞が得られにくいことは、グレリンが細胞の生存・維持に必要なことを示唆している。またキメラマウスも得られにくく、グレリンが胎児の成長・発育に関与している可能性を示唆している。一方、NMU ノックアウト・マウスは順調に生育し、目立った外形の異常は見られなかった。

#### 【結論】

摂食調節ペプチドであるグレリンと NMU についてノックアウト・マウスの作製を試みた。グレリンは細胞の生存・維持や、胎児の成長・発育に機能している可能性が示唆された。

#### 【研究発表】

##### 1. 論文発表

- 1, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K; Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res* 2001; 56, Suppl 1:93-7
- 2, Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki

K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S; Ghrelin Is Present in Pancreatic alpha-Cells of Humans and Rats and Stimulates Insulin Secretion. *Diabetes* 2002; 51:124-129

- 3, Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K; Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:5854-9
- 4, Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K; Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001; 104:1430-1435
- 5, Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morozumi N, Minamitake Y, Tanaka S, Matsuo H, Kojima M, Hayashi Y, Kangawa K; Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287:142-146
- 6, Matsumoto M, Kitajima Y, Iwanami T, Hayashi Y, Tanaka S, Minamitake Y, Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K; Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:655-659
- 7, Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K; Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280:R1483-1487
- 8, Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K; Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuro peptide Y/Y1

receptor pathway. *Diabetes* 2001; 50:227-232

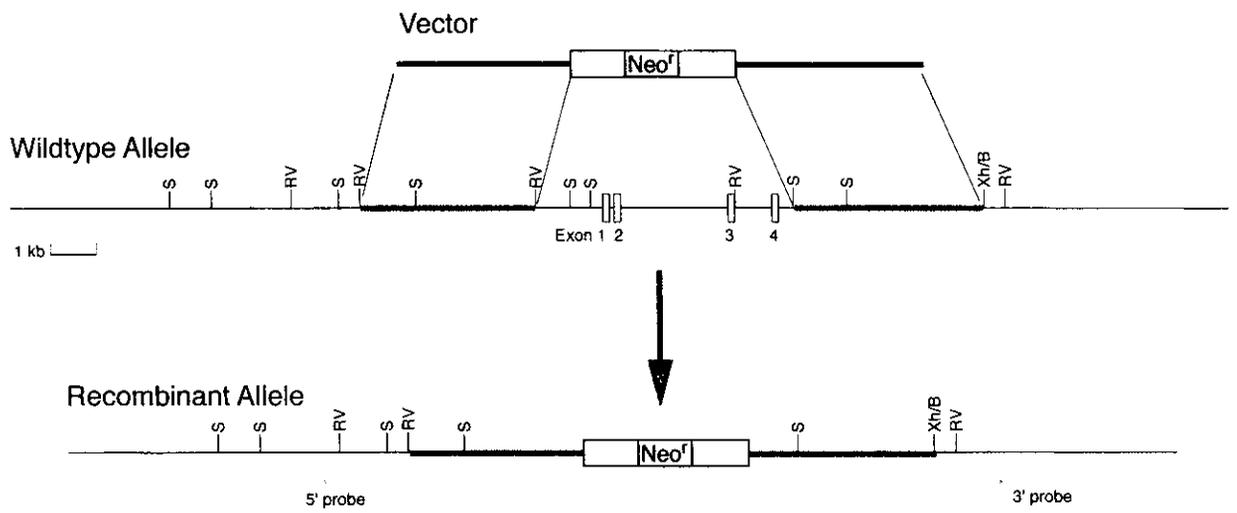
9, Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S; Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281:1220-1225

10, 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. 学会発表

1. 見島 将康、寒川 賢治、細田 洋司 グレリンの発見とその生理的意義 第5回心血管内分泌代謝学会、2001.11.23-24、東京



マウス・グレリン遺伝子の構造とノックアウト・マウス作製のストラテジー

# 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

### 新規 MC4R 遺伝子変異により発症する肥満症

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】

A型メラノコルチン受容体(MC4R)は視床下部に発現するG蛋白共役型7回膜貫通型受容体であるが、MC4R ノックアウトマウスが過食を伴う遅発性肥満を発症することから、摂食調節におけるMC4Rの重要性が示唆されている。今回我々は新規のホモ接合型MC4R 遺伝子異常症を見出したので報告する。症例は39歳女性。身長161cm、体重160kg、BMI62、出生時体重は3360kgで生後10ヶ月より肥満が認められた。遺伝子解析の結果、MC4R 遺伝子コドン98においてGGA(Gly)→AGA(Arg)のホモ接合体変異(G98R変異)を認めた。両親のMC4R 遺伝子はコドン98のヘテロ接合型であった。この変異MC4Rを293細胞に発現させるとα-MSHによるcAMP産生が著しく低下し、α-MSHのMC4Rへの結合能も著しく低下していた。以上の結果より今回新たに同定したGly98Arg変異がMC4Rの機能低下をきたし、高度肥満症の原因になることが示唆された。

#### 【研究目的】

肥満は環境因子と遺伝素因の複雑な相互作用によって発症する代表的な多因子疾患であり、高血圧症、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病の主要な危険因子として注目されている。近年の分子遺伝学の進歩により、稀ではあるが単一遺伝子変異により発症する肥満症例が報告されている。いずれの場合も、レプチン/レプチン受容体/視床下部メラノコルチン系を構成する分子の遺伝子変異であることが証明されており、これらが中枢性摂食調節において重要な役割を果たしていると考えられている。今回我々は、新規MC4R 遺伝子異常により発症する重症肥満症の一症例を経験したので報告する。

#### 【研究方法】

発症者及び両親の末梢血より白血球より染色体DNAを抽出し、PCR法にてMC4R 遺伝子全長をクローニングした。発症者に関しては全長の塩基配列を決定し、両親に関してはAho Iを用いたRFLP法に

よりG98R変異の有無を検討した。

野生型及び変異受容体遺伝子全長をpcDNA3.1ベクターにサブクローニングし、HEK293細胞にトランスフェクションしてα-MSH添加による細胞内cAMP濃度の変化の検討と<sup>125</sup>I]NDP-MSHを用いた結合実験を施行した。

(倫理面での配慮)

本研究に関しては患者本人と家族のインフォームドコンセントを得た。

#### 【研究結果】

症例は39歳女性。身長161cm、体重160kg、BMI 62kg/m<sup>2</sup>、出生時体重は3360kgであった。2歳頃より肥満傾向が認められた(図1)。患者は乳児期よりミルクの摂取量が著しく多く、学童期には食欲抑制できず嘔吐をしながらも食べ続けることもあった。夜間には“食べなさい”という命令が聞こえて摂食抑制ができなかったという。23歳時の体重は115kgであった。

入院時の一般検査成績では、総蛋白量、アルブミン、コリンエステラーゼは低値であり、肝機能障害と考えられた。空腹時血糖も低値の傾向であった。内分泌学的には、エストラジオール、コルチゾール、ソマトメジンCは低値、甲状腺ホルモンは軽度低下、空腹時インスリン値とCペプチドは肥満のため高値であった(表)。血中レプチン濃度はBMIに比例して上昇していた。IQは67と低下していた。頭部CT所見では視床下部、下垂体に明らかな異常は認められなかった。

本例の幼少時からの過食と高度肥満の発症にMC4R遺伝子変異が関与するかどうかを明らかにするために、患者の同意を得た上で、翻訳領域全長の塩基配列を直接シーケンス法にて決定したところ、コドン98のグリシン残基がアルギニン残基に変化するホモ接合体変異(G98R変異)を認めた(図2)。PCR-RFLP法にて両親の遺伝子型を検討したところ、いずれもG98R変異のヘテロ接合体であった。患者の両親はBMIが26kg/m<sup>2</sup>、27kg/m<sup>2</sup>と軽度の肥満であったが、両親の血縁関係は明らかではなかった。日本人健常者100人の検討では同部位の変異は認められなかった。

HEK293細胞に野生型と変異型MC4R遺伝子をトランスフェクションし、α-MSHによるcAMP産生能と結合実験を行った(図3)。変異型MC4RではcAMP産生とリガンド結合が全く認められなかった。

#### 【考察】

レプチンの摂食調節作用の少なくとも一部は視床下部メラノコルチン系を介することが証明されている。本症例は世界でも2例目のMC4R遺伝子変異ホモ接合体であり、本症例の肥満症の発症には視床下部メラノコルチン系の主要な構成因子であるMC4Rが機能的に欠如していることによりもたらされるレプチン抵抗性が関与すると考えられる。又、本研究で解析した肥満家系は、今後の我が国におけるMC4R遺伝子変異症の解析において極めて示唆に富んだ症例と思われる。

#### 【結論】

新規4型メラノコルチン受容体遺伝子異常により発症する重症肥満症の一症例を経験した。

#### 【参考文献】

1. Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S: A frameshift mutation in *MC4R* associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20:111-112, 1998.
2. Vaisse C, Clément K, Guy-Grand B, Froguel P: A frameshift mutation in human *MC4R* is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20:113-114, 1998.
3. Gu W, Tu Z, Kleyn W, Kissebach A, Duprat L, Lee J, Chin W, Maruti S, Deng N, Fisher SL, Franco LS, Burn P, Yagaloff KA, Nathan J, Heymsfield S, Albu J, Pi-Sunyer X, Allison DB: Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes* 48:635-639, 1999.
4. Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J: Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1483-1486, 1999.
5. Sina M, Hinney A, Ziegler A, Neupert T, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J: Phenotypes in three pedigrees with autosomal dominant obesity caused by haplo-insufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene. *Am J Hum Genet* 65:1501-1507, 1999.
6. Vaisse C, Clément K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P: Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 106:253-262, 2000.
7. Farooqi IS, Yeo GSH, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S: Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106:271-279, 2000.
8. Ohshiro Y, Sanke T, Ueda Y, Shimajiri Y.