

Nakagawa T, Tsunoda K, Nishi M, Sasaki H, Takasu N, Nanjo K: Molecular scanning for mutations in the melanocortin-4 receptor gene in obese/diabetic Japanese. *Ann Hum Genet* 63:483-487, 1999.

【研究発表】

1. 論文発表

Kobayashi H, Ogawa Y, Shintani M, Ebihara K, Shimodahira M, Iwakura T, Hino M, Ishihara T, Ikekubo K, Kurahachi H, Nakao K: A novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (*MC4R*) in a Japanese woman with severe obesity. *Diabetes* 51:243-246, 2002.

2. 学会発表

小川佳宏、小林宏正、海老原健、林 達也、細田公則、井上 元、倉八博之、中尾一和
新規遺伝子異常症に伴う変異型ヒト4型メラノコルチン受容体 (*MC4R*) の機能解析
第38回日本糖尿病学会近畿地方会総会、2001.11.10、大阪

図1 2歳 (A)、3歳 (B)、23歳 (C) の患者の外観。
(A) と (B) は姉 (左) と一緒に撮影。

図2 健常人及び発端者の *MC4R* 遺伝子の塩基配列。

図3 野生型と変異型 *MC4R* を発現する HEK293 細胞を用いた α -MSH による cAMP 産生能 (A) と結合実験 (B)。

表 内分泌学的プロフィール

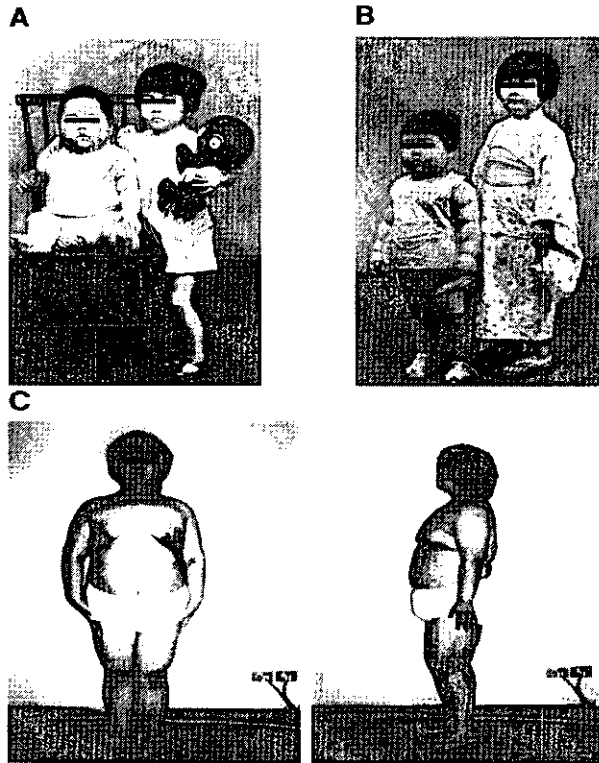
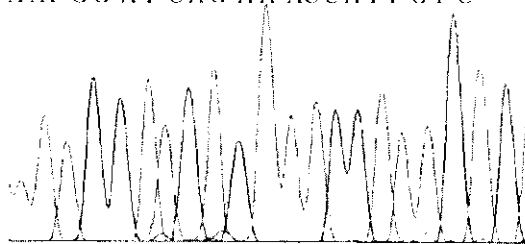


図1. 2歳(A)、3歳(B)、23歳(C)の患者の外観

コドン	97	98	99	100	101	102	103
アミノ酸	Asn	Gly	Ser	Glu	Thr	Ile	Val
	AAT	GG	AT	CAG	AA	ACC	ATT
						GT	T

健常人



コドン	97	98	99	100	101	102	103
アミノ酸	Asn	Arg	Ser	Glu	Thr	Ile	Val
	AAT	AG	AT	CA	GAA	ACC	ATT
							GT

発端者

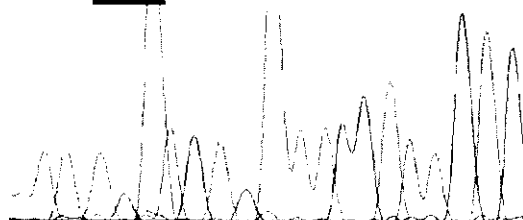


図2. 健常人及び発端者のMC4R遺伝子の塩基配列

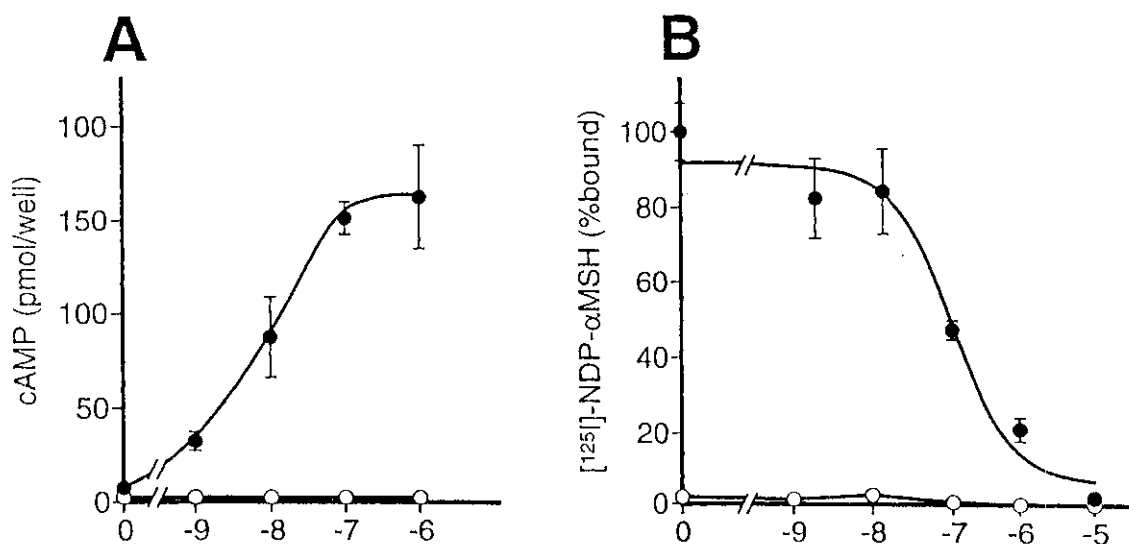


図3. 野生型と変異型MC4Rを発現するHEK293細胞を用いた α -MSHによるcAMP産生能(A)と結合実験(B)

表 内分泌学的プロフィール

	Proband	Normal range
Leptin (ng/ml)	58.4	6.3-10.0
Glucose (mmol/l)	4.8	3.5-5.5
Insulin (pmol/l)	164	12-48
LH (IU/l)	3.58	0.9-15.5 (follicular phase)
FSH (IU/l)	9.61	3.1-23.9 (follicular phase)
Estradiol (pmol/l)	239	51-826
Testosterone (ng/ml)	0.36	0.36-3.1
GH (μ g/l)	1.8	< 5.0
TSH (μ U/l)	1.3	0.5-4.2
FT4 (pmol/l)	16.4	11.5-21.2
ACTH (pmol/l) at 9:00 A.M.	4.2	< 13
Cortisol (nmol/l) at 9:00 A.M.	119	138-673
Prolactin (μ g/l)	24.6	< 30

FSH, follicle-stimulating hormone; FT4, free thyroxine; GH, growth hormone; LH, luteinizing hormone; TSH, thyrotropin-stimulating hormone.

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

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

分担研究者 細田 公則 京都大学大学院・人間・環境学研究所 助手

【研究要旨】

エネルギー代謝調節系は中枢性摂食異常症の病態で重要であり、摂食調節系とエネルギー消費調節系から成る。今回、我々は、エネルギー代謝調節系の分子の脱共役蛋白質3(UCP3)とグレリンに着目して、研究を行ったので、報告する。

摂食調節系の研究は急速に進展しているが、エネルギー消費調節系については β 3アドレナリン受容体の関与が指摘されているのみであり、未解明の部分が多い。UCP1は齧歯類の褐色脂肪組織で高濃度に発現しており、そのエネルギー消費調節における意義が確立しているが、ヒトでは褐色脂肪組織がほとんど存在せず、ヒトのエネルギー消費調節機構の解明が期待されている。特に、骨格筋は全身のエネルギー消費の約4割に相当するが、その分子機構は不明である。我々は骨格筋に高濃度に発現するUCPファミリーの分子としてUCP3を新規に同定した。本研究では骨格筋特異的UCP3過剰発現Tgマウスを作製・解析し、エネルギー消費調節におけるUCP3の意義の解明を行った。UCP3発現の最も高い系統は遺伝子発現レベルで18倍、蛋白レベルで15倍であった。通常食では体重は対照マウスと比較して有意な低下を示さず、その他に特に有意な形質を示さなかった。高脂肪食ではTgマウスの体重は対照マウスと比較して約15%の有意な減少を示し、高脂肪食負荷の4週間の体重増加は、Tgマウスで約50%低下していた。副精巣周囲白色脂肪組織重量は約20%低下していた。他の組織の重量には、有意差が認められなかった。高脂肪食下でも摂食量はTgマウスと対照マウスで有意差を認めなかった。Tgマウスの体温は有意差を示さなかったが、酸素消費量は約25%の有意な増加を示した。糖負荷試験およびインスリン負荷試験でTgマウスの耐糖能は対照マウスと比較して有意な改善を示した。通常食と高脂肪食の条件で、血中の糖、脂質の濃度は特に有意差を認めなかった。組織学的検討で特に異常を認めなかった。高脂肪食でのTgマウスの体重の低下は、有意なエネルギー消費の増加によるものであると考えられた。生理的刺激によるUCP3の発現誘導の範囲の誘導でも、肥満の条件では、エネルギー消費増加、体重減少の作用が認められることが示唆された。我々のTgマウスと同程度の発現誘導は薬剤でも可能と考えられるので、薬剤によりUCP3の活性を増強することの、肥満・糖尿病治療への応用の可能性が示唆された。

グレリンはGrowth hormone secretagogue receptor (GHS-R)に対する内因性リガンドとして胃から同定された28アミノ酸のペプチドであり、成長ホルモン分泌促進作用以外に、中枢を介して摂食促進作用、肥満を促進する作用を示し、グレリンがエネルギー代謝調節系に作用を及ぼすことが明らかになっている。しかし、エネルギー代謝調節系がグレリンの血中濃度調節に及ぼすについては、明らかになっていない。今回、エネルギー代謝調節系の破綻した状態である肥満における血中グレリン濃度の調節を明らかにする目的で、遺伝性肥満動物モデルのZucker fatty ratを用いて、その血中グレリン濃度を検討した。Zucker fatty ratで、対照ラットと比較して、二つのアッセイ系で血中グレリン濃度が著明に

低下していることが明らかになった。Zucker fatty rat の胃のグレリン遺伝子発現は、対照ラットと有意差を示さないため、血中グレリン濃度の著明な低下は生合成の低下ではなく、分泌の低下によるものと推定された。Zucker fatty rat における血中グレリン濃度低下の機序は不明であるが、有意な高血糖の関与の可能性がある。ヒト肥満者で血中グレリン濃度の低下が報告されているが、Zucker fatty rat が有用なモデル動物であることが明らかになった。

【研究目的】

エネルギー代謝調節系は中枢性摂食異常症の病態において重要である。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から成る。摂食調節系の分子機構の研究については、近年、レプチンの発見以降、急速に進展している。しかし、エネルギー消費調節系の研究については、 $\beta 3$ アドレナリン受容体の関与が、従来、指摘されているのみであり、未解明の部分が多い。脱共役蛋白質 1 (UCP1) は齧歯類の褐色脂肪組織で高濃度に発現しており、そのエネルギー消費調節における意義が確立しているが、ヒトでは褐色脂肪組織がほとんど存在せず、ヒトにおけるエネルギー消費調節機構の解明が期待されている。特に、骨格筋は全身のエネルギー消費の約 4 割に相当するが、その分子機構の研究が遅れている。我々は骨格筋に高濃度に発現する UCP ファミリーの分子として UCP3 を新規に同定した。本研究では骨格筋特異的 UCP3 過剰発現 Tg マウスを作製・解析し、通常食、高脂肪食の両方の条件で、体重、摂食量、エネルギー消費、体温の検討を行うことによりエネルギー消費調節における UCP3 の意義の解明を行った。

我々は、UCP3 以外の分子として、グレリンのエネルギー代謝調節系における意義に関しても検討を行っているため、報告する。グレリンは Growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) に対する内因性リガンドとして胃から同定された 28 アミノ酸のペプチドで、その活性にはグレリンのアシル化による修飾が必要である。グレリンは成長ホルモンの分泌促進作用以外に、中枢を介して、摂食促進作用、および肥満を促進する作用を示し、グレリンがエネルギー代謝調節系に作用を及ぼすことが明らかになっており、特に視床下部を介する作用が明らかになっている。また、木梢に投与したグレリンが、摂食促進、体重増加作用を示すことも明らかになっていて、その作用についても、視床下部を介するものと考えられている。しかし、エネルギー代謝調節系がグレリンの血中濃度調節に及ぼ

すについては、明らかになっていない。そこで、今回、我々は、エネルギー代謝調節系の破綻した状態である肥満における血中グレリン濃度の調節を明らかにする目的で、遺伝性肥満動物モデルの Zucker fatty rat を用いて、その血中グレリン濃度を検討した。

【研究方法】

mouse muscle creatinine kinase のプロモーターの下流にマウス UCP3cDNA を発現するベクターを用いて、骨格筋特異的 UCP3 過剰発現 Tg マウスを作製した。骨格筋における UCP3 の過剰発現の程度に関しては、ノザン法およびウエスタン法により検討した。骨格筋に過剰発現させた UCP3 が脱共役能を示すかどうかを検討する目的で、Tg マウスより骨格筋を取り出し、proton leak を測定した。通常食、及び、4 週間の高脂肪食の条件で飼育し、体重、摂食量、副精巣周囲白色脂肪組織重量、血中生化学プロフィール、体温、また、indirect calorimetry により酸素消費量を検討した。腹腔内投与による糖負荷試験、および、腹腔内投与によるインスリン負荷試験を行い、耐糖能を検討した。

8 週齢雄性 Zucker fatty rat 及び lean littermate (n=5) を用いて、24 時間の絶食後に採血し、グレリンの血中濃度の測定には、寒川らの開発した rat ghrelin (13-28) に対する C 端測の RIA 系 (C-RIA)、及びアシル化した 3 番目のセリン残基を含む rat ghrelin (1-11) に対する N 端側の RIA 系 (N-RIA) を用いた。(倫理面への配慮)

動物実験の動物愛護上の配慮については、京都大学の動物委員会にて定められた規定に従った。

【研究結果】

得られた Tg マウスの系統の骨格筋で UCP3 発現の最も高い系統は遺伝子発現レベルで 18 倍、蛋白レベルで 15 倍であり、次に高い系統は遺伝子発現レベルで 15 倍、蛋白レベルで 12 倍であった。最も高い発

現を示す系統について、骨格筋を取り出し、proton leak を測定したところ、Tg マウスでは増加している傾向が認められた (図1)。通常食では、両方の系統とも、体重は対照マウスと比較して、低下傾向を示したが、その低下は有意ではなかった。摂食量、酸素消費量は対照マウスと比較して有意差を示さなかった。糖負荷試験の検討では、Tg マウスの耐糖能は対照マウスと比較して有意差を示さなかった。そこで、最も高いUCP3 発現を示す系統を用いて、高脂肪食負荷を行った。高脂肪食ではTg マウスの体重は対照マウスと比較して約15%の有意な減少を示し (図2)、高脂肪食負荷の4週間の体重増加は、Tg マウスで約50%低下していた (図3)。副精巣周囲白色脂肪組織重量は、Tg マウスで約20%低下していた。他の組織の重量には、有意差が認められなかった。高脂肪食下でも摂食量はTg マウスと対照マウスで有意差を認めなかった。Tg マウスの酸素消費量は約25%の有意な増加を示した。糖負荷試験およびインスリン負荷試験の検討では、Tg マウスの耐糖能は対照マウスと比較して有意な改善を示した (図4)。

通常食と高脂肪食の飼育の条件で、24時間の絶食による血中の糖、脂肪酸の濃度を、Tg マウスと対照マウスで比較検討したが、特に有意差を認めなかった (表1、表2)。

通常食の条件のTg マウスで、骨格筋、心筋を含む全身臓器で、組織学的検討を行ったが、特に異常を認めなかった。

8週齢雄性 Zucker fatty rat は対照ラットと比較して、体重が顕著に重く、血糖が軽度高値、有意な高インスリン血症を認めた (表3)。血漿グレリン濃度はC-RIAで著明に約半分以下に低下していた (224.8 ± 14.6 fmol/ml vs. 480.8 ± 51.5 fmol/ml; $P < 0.0001$) (図5A)。またN-RIAの血漿グレリン濃度は、著明に約5分の1に低下しており、活性型の血漿グレリン濃度の低下を示した (図5B)。Zucker fatty rat の胃のグレリン遺伝子発現を検討したが、 $n=10$ の検討を行ったが、有意差は認められなかった (図6)。

【考察】

骨格筋特異的にUCP3の過剰発現を蛋白レベルで約15倍の過剰発現のTg マウスを作製し、高脂肪食で対照マウスと比較して、有意な体重の低下、有意な副精巣周囲白色脂肪組織重量の低下、高脂肪食期間中

の体重増加の著明な低下、有意なエネルギー消費の増加が認められ、摂食量、体温に関しては有意差を認めなかった。Tg マウスの有意な体重の低下は、副精巣周囲白色脂肪組織重量の有意な低下があり、白色脂肪組織以外の組織の重量の有意な変化が認められないので、白色脂肪組織の重量の低下によるものであることが示唆された。摂食量には有意差がないので、体重の低下は、有意なエネルギー消費の増加によるものと考えられた。通常食ではTg マウスは体重の低下傾向を示したが、有意な変化を示さず、また、それ以外の項目でも有意な変化を示さなかった。高脂肪食では、Tg マウスで対照マウスと比較して耐糖能の有意な改善が認められた。その機序としては、副精巣周囲白色脂肪組織重量の低下から、全身での白色脂肪組織重量の低下が予想され、それによるインスリン感受性の増加が考えられた。しかし、それ以外の機序の可能性が否定されている訳ではない。

昨年、グラキソのグループにより、骨格筋のUCP3 遺伝子発現の約66倍の過剰発現のTg マウスで、通常食および肥満誘導食の両方の条件で、摂食量とエネルギー消費の有意な増加、有意なエネルギー消費の増加、耐糖能の有意な改善が報告されている。生理的刺激による骨格筋のUCP3の遺伝子発現の亢進は既報では最大で約10-20倍程度であるので、生理的な刺激ではグラキソのグループのTg マウスのようなUCP3の約66倍の過剰発現は期待されない。しかし、我々のTg マウスのデータより、生理的刺激によるUCP3の発現誘導の範囲の誘導でも、肥満の条件では、エネルギー消費増加、体重減少の作用が認められることが示唆された。我々のTg マウスと同程度のUCP3の発現誘導は薬剤でも可能と考えられるので、本研究の結果から、薬剤によりUCP3の活性を増強することの、肥満・糖尿病治療への応用の可能性が示唆された。

UCP3 遺伝子発現が絶食により増加し、また、UCP3 が脂肪酸の消費に関与する可能性があるので、絶食後の血中の糖と中性脂肪と総コレステロールと脂肪酸の濃度をTg マウスと対照マウスで比較検討したが、有意差は認められず、UCP3 が絶食時の血中の脂肪酸濃度の増加を抑制している可能性は考えにくい。Tg マウスにおけるエネルギー消費の増加は、通常食では認められず、高脂肪食でのみ認められるが、その理由は不明である。

本研究により UCP3 が、生理的な発現誘導の範囲で、最高の発現誘導で、エネルギー消費調節に関与していることが明らかになった。

Zucker fatty rat で、対照ラットに比較して、C-RIA と N-RIA の二つのアッセイ系で血中グレリン濃度が著明に低下していることが明らかになった。Zucker fatty rat の胃のグレリン遺伝子発現は、対照ラットと有意差を示さないで、Zucker fatty rat の血中グレリン濃度の著明な低下は、グレリンの生合成の低下ではなく、グレリンの分泌の低下によるものと推定された。血中グレリン濃度の調節が生合成ではなく、分泌により調節されていることは、胃のグレリン産生細胞である X 細胞は、細胞内にグレリンを分泌顆粒として貯蔵していることと良く合致する。Zucker fatty rat における血中グレリン濃度低下の機序については、不明であるが、可能性のあるものとしては、Zucker fatty rat における有意な高血糖、血中インスリン濃度の増加、レプチン系の遮断などがある。血中インスリン濃度、およびレプチン系による血中グレリン濃度の調節機構については、明らかではないが、高血糖が血中グレリン濃度を低下させ、低血糖が血中グレリン濃度を上昇させることが知られている。Zucker fatty rat の血糖は対照ラットに比較して有意に高いので、血中グレリン濃度の低下は、有意な高血糖による可能性がある。ヒトで、Caucasian で、肥満者で血中グレリン濃度が低下していることが報告されている。今回の検討により、Zucker fatty rat が、ヒト肥満で血中グレリン濃度低下を検討するために有用なモデル動物であることが明らかになった。血中グレリン濃度の測定は、肥満を含めて、エネルギー代謝の状態を検討する上で有用な指標になると考えられる。生理的範囲の血中グレリン濃度が摂食調節や体重の調節に影響するかどうかは未だ不明であるので、今回の変化で認められた血中グレリン濃度の変化が、摂食調節や、体重の調節に影響するかどうかについても不明であり、今後の検討が必要である。

【結論】

生理的な範囲で最高レベルの発現誘導の UCP3 により、高脂肪食下で、エネルギー消費の増加を介して、白色脂肪組織の低下を伴う体重の低下が認められ、刺激でも認められる程度のもに対応する UCP3 の過剰発現により、エネルギー消費の有意な増加と体重の

有意な低下が認められた。

遺伝性肥満動物モデルの Zucker fatty rat において血中グレリン濃度の著明な低下が認められた。

【健康危険情報】

生理的な範囲の UCP3 の発現誘導では、エネルギー消費の有意な上昇と体重の有意な低下は認められたが、特に危険な程度ではない。また、それにより、骨格筋、心筋を含む全身臓器に特に異常を認めなかった。グレリンに関する危険情報は特に無い。

【研究発表】

1. C. Son, et al. Upregulation of UCP3 gene expression by fatty acids and agonists for peroxisome proliferator-activated receptors in L6 myotubes. *Endocrinology*, 142: 4189-4194, 2001.
2. H. Ariyasu, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 4741-4746, 2001.
3. N. Kanamoto, et al. Substantial production of ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 4984-4990, 2001.
4. M. Shintani, 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* 50: 227-232, 2001.
5. C. Son, et al. Amelioration of diet-induced obesity in mice overexpressing UCP3 in skeletal muscle. submitted
6. H. Iwakura, et al. Reduction of circulating ghrelin levels in a genetically animal model of obesity, Zucker fatty rats. submitted

図1 UCP3Tg マウスにおける proton leak の増加傾向

図2 高脂肪食下での UCP3Tg マウスの体重低下

図3 高脂肪食下での UCP3Tg マウスの体重増加の著明な低下

- 図4 A 糖負荷試験による Tg マウスでの UCP3Tg マウスの耐糖能の著明な改善
- 図4 B インスリン負荷試験による Tg マウスでの UCP3Tg マウスの耐糖能の著明な改善
- 図5 Zucker fatty rat における血中グレリン濃度 (C-RIA(a), N-RIA(b))
- 図6 Zucker fatty rat の胃におけるグレリン遺伝子発現 (代表的なノザンの図(a)と、統計的な解析(b))
- 表1 通常食での血中の糖、脂質の濃度 means \pm SE (n=5-7)
- 表2 高脂肪食での血中の糖、脂質の濃度 means \pm SE (n=5-7)
- 表3 Zucker fatty rat のプロフィール

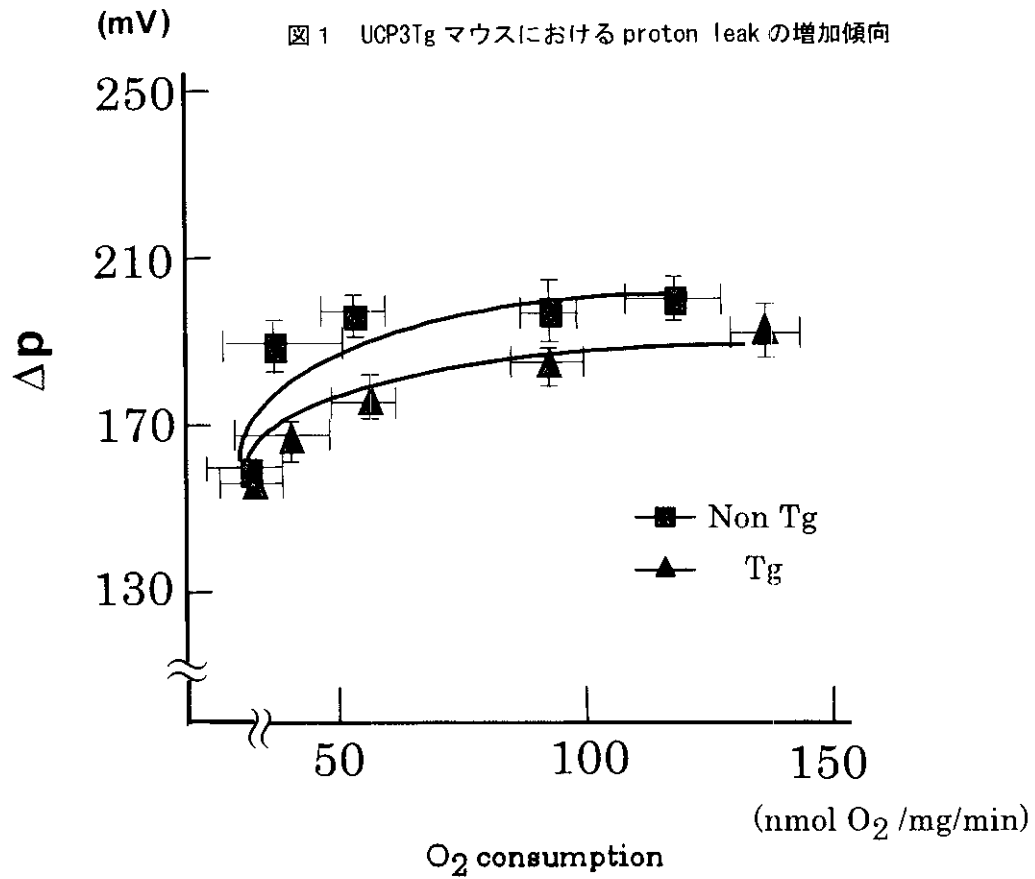


図2 高脂肪食下での UCP3Tg マウスの体重低下

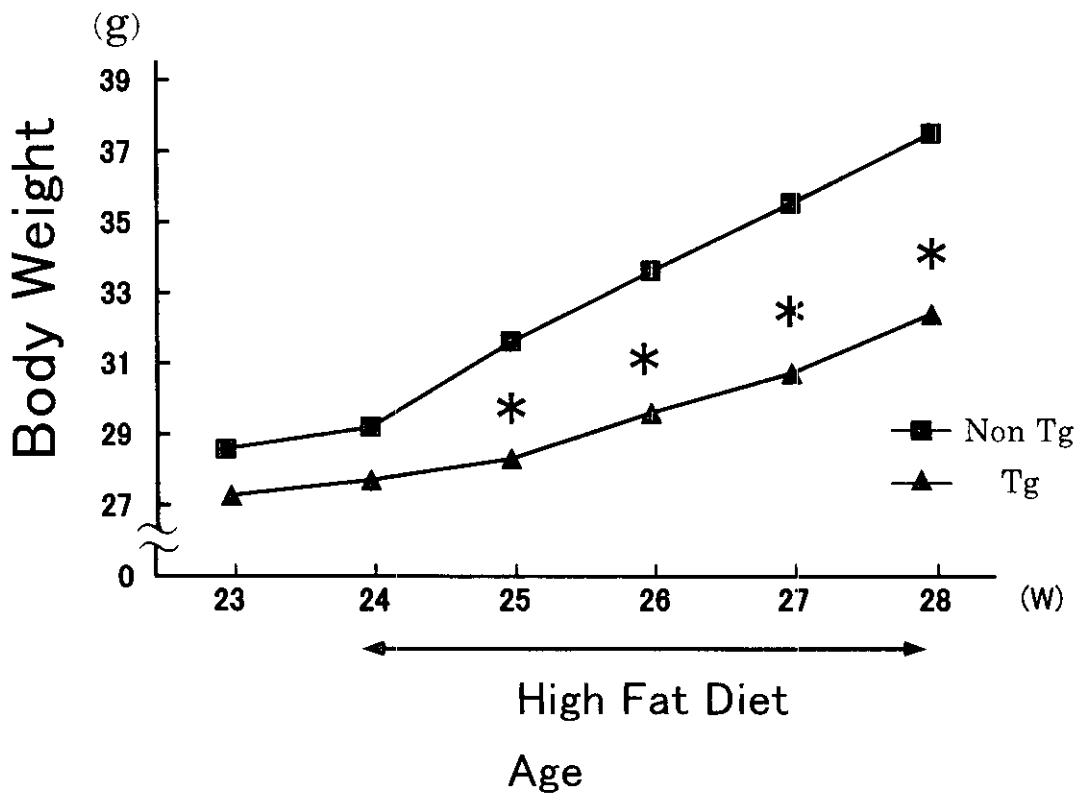


図3 高脂肪食下でのUCP3Tgマウスの体重増加の著明な低下

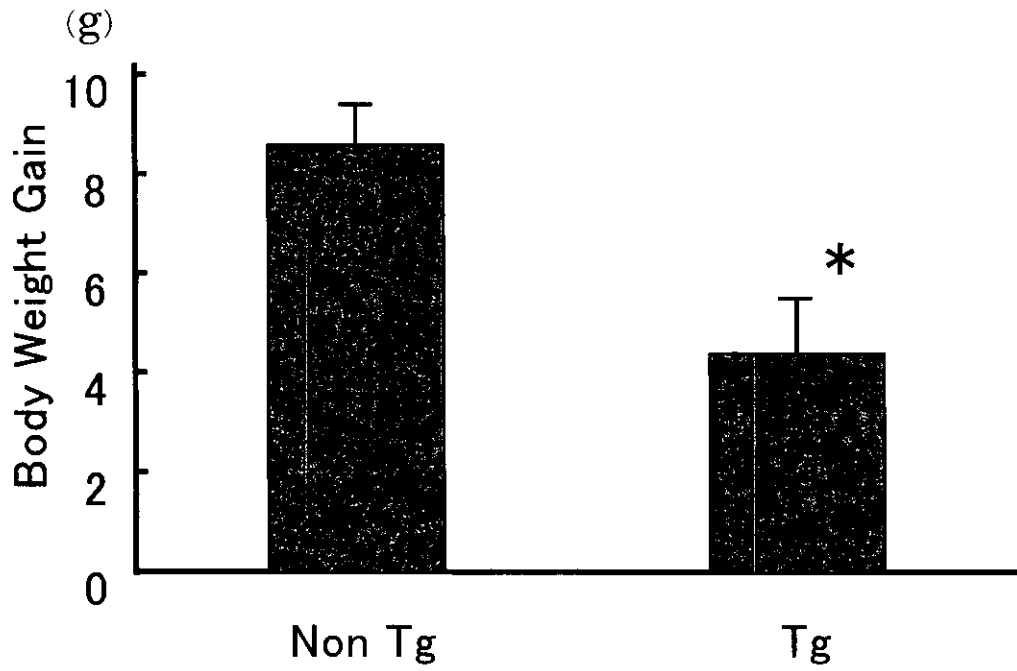


図4A 糖負荷試験によるTgマウスでのUCP3Tgマウスの耐糖能の著明な改善

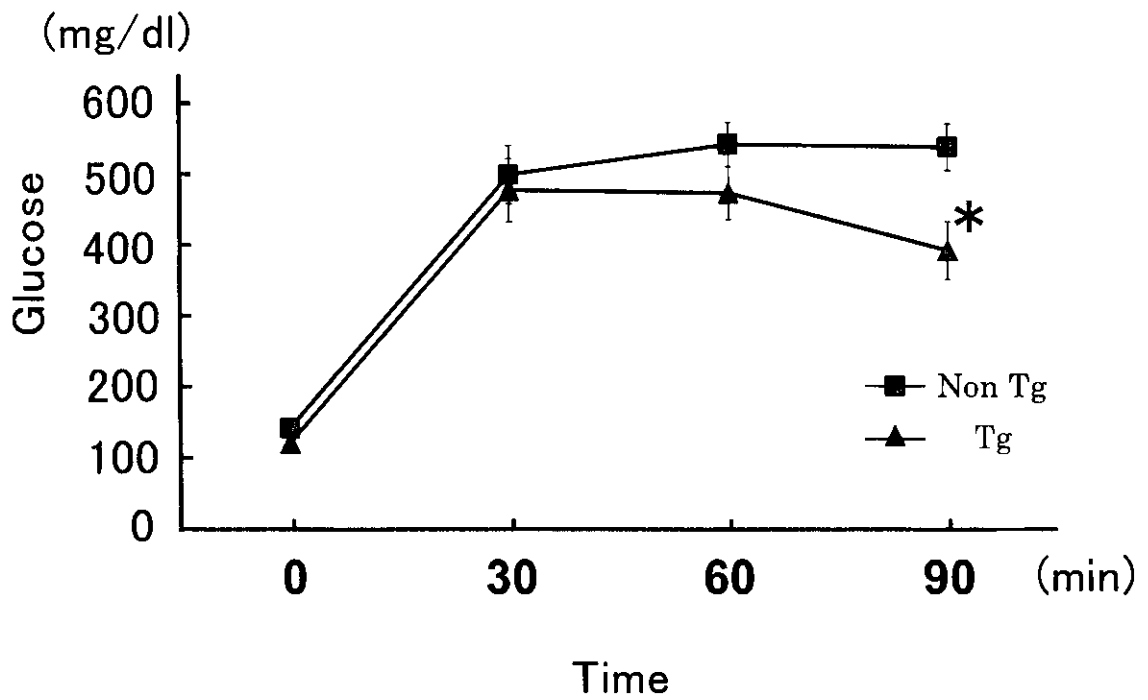


図 4B インスリン負荷試験による Tg マウスでの UCP3Tg マウスの耐糖能の著明な改善

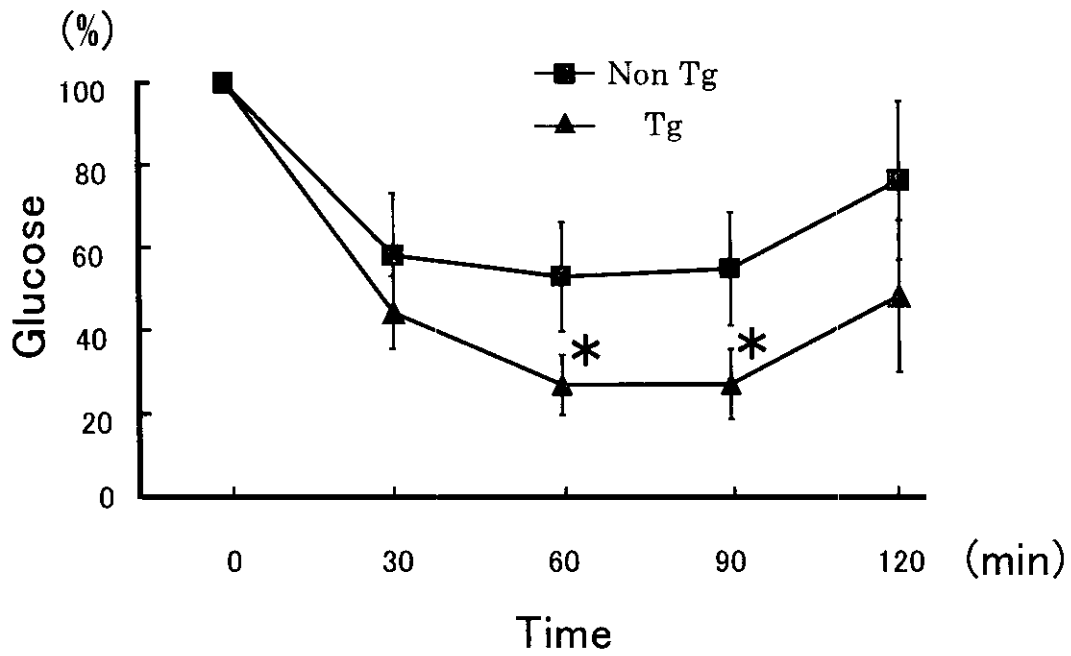


図 5 Zucker fatty rat における血中グレリン濃度 (C-RIA(a), N-RIA(b))

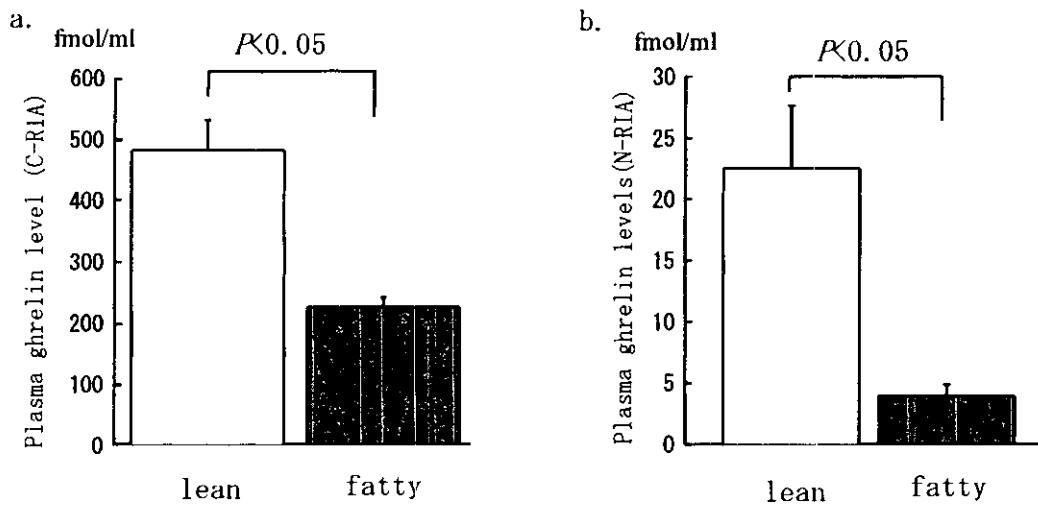


図6 Zucker fatty rat の胃におけるグレリン遺伝子発現 (代表的なノザンの図(a)と、統計的な解析(b))

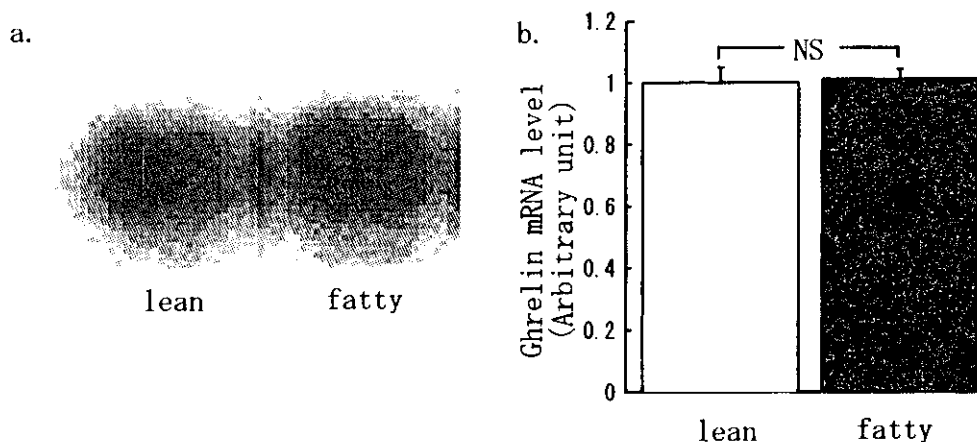


表1 通常食での血中の糖、脂質の濃度 means \pm SE (n=5-7)

	UCP3 transgenic mice	nontransgenic littermates	
Glucose (mg/dl)	fasting	115 \pm 3	122 \pm 8
	ad libitum	148 \pm 10	151 \pm 10
Insulin (pmol/l)	fasting	44 \pm 10	48 \pm 17
	ad libitum	95 \pm 20	91 \pm 13
Triglyceride (mg/dl)		24 \pm 4	32 \pm 6
Fatty acids (mEq/l)		1.27 \pm 0.14	1.25 \pm 0.23

表 2 高脂肪食での血中の糖、脂質の濃度 means \pm SE (n=5-7)

	UCP3 transgenic mice	nontransgenic littermates
Glucose (mg/dl) fasting	160 \pm 7	185 \pm 19
ad libitum	178 \pm 22	203 \pm 16
Insulin (pmol/l) fasting	215 \pm 32	224 \pm 99
Adlibitum	638 \pm 77	649 \pm 170
Triglyceride (mg/dl)	36 \pm 4	40 \pm 5
Fatty acids (mEq/l)	0.83 \pm 0.06	0.90 \pm 0.07

表 3 Zucker fatty rat のプロフィール

	lean	fatty
Weight (g)	224.4 \pm 4.7	323.6 \pm 3.7*
Glucose (mg/dl)	98.3 \pm 40.6	120.6 \pm 28.8*
Insulin (ng/ml)	0.1 \pm 0.2	6.6 \pm 1.2**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs. lean littermates

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

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

分担研究者 桜井 武 筑波大学基礎医学系 助教授

【研究要旨】

われわれは、オレキシン-A と -B を摂食行動を制御する神経ペプチドとして発表したが、その後、これらのペプチドは、覚醒の維持・調節にも重要な役割を持っていることが明らかになってきた。とくに、ナルコレプシー患者において、オレキシン神経が消失していることが示されていることから、オレキシン神経の覚醒・睡眠の制御に関わる役割に注目がされている。今年度、われわれは、オレキシンのもつ、「摂食行動の制御」と「睡眠・覚醒の制御」という2つの中心的な生理作用を密接な関係をもつものにとらえて、その相互関係を明らかにするべく研究を行ってきた。オレキシン神経に特異的に enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現するトランスジェニックマウスを作成し、蛍光を指標にオレキシン神経を単離して電気生理的な性質をしらべたところ、オレキシン神経は、細胞外グルコース濃度によって活性が変化し、また、グレリンによって活性化、レプチンによって抑制されることが判明した。このことから、動物の栄養状態によってオレキシン神経の活動は変化する、つまり、飢餓状態ではオレキシン神経の活性が上昇し、満腹時には低下する可能性が示された。

動物の行動は、栄養状態によって大きく影響を受けることが知られているが、脳が末梢の代謝情報を感知し、処理する経路については、未知の部分が多い。オレキシン神経は、動物の栄養状態によって活性を変化させることから、この系に関わっている可能性がある。そこで、オレキシン神経を特異的に変性させたマウスを絶食し、行動の変化を野生型マウスと比較したところ、野生型マウスでは、絶食時に著明に覚醒レベルが上昇するのに対し、オレキシン神経変性マウスでは、この反応が欠落していることが明らかになった。これらのことから、オレキシン神経は末梢の栄養状態をモニターし、それに応じて、摂食行動・覚醒を制御していることが示された。

【研究目的】

オレキシンのもつ、「摂食行動の制御」と「睡眠・覚醒の制御」という2つの中心的な生理作用を密接な関係をもつものにとらえて、その相互関係を明らかにするべく研究を行った。

【研究方法】

1. オレキシン神経を単離して電気生理的な性質をしらべた。ヒトオレキシン遺伝子の5'上流域を用いて、

オレキシン神経に特異的に EGFP を発現するトランスジェニックマウスを作成した(図1)。蛍光を指標にこのマウスの視床下部よりオレキシン神経を単離して、パッチクランプ法によりオレキシン神経の電気生理的な性質を調べた。

2. 上記1の系において、外液中に様々な生理活性物質(表1)を加えて、オレキシン神経の発火活動に影響を与える因子を同定することを試みた。

3. オレキシン神経を特異的に変性させたナルコレプ

シーモデルマウス (orexin/ataxin-3) マウスと野生型の littermate を絶食させ、行動量と睡眠・覚醒パターンの変化を調べた。

【結果】

1. オレキシン神経は、視床下部外側野から単離された他の神経に比べ、自発発火頻度が高かった (図 2 c)。また、グルタミンによって活性化され、GABA によって抑制された (図 2 d)。
2. オレキシン神経は外液のグルコース濃度を高くすると抑制され、低くすると活性化することが明らかになった (図 3 a)。
3. オレキシン神経はレプチンによって抑制され、グレリンによって活性化されることが明らかになった (図 2 b, c)。
4. 暗期の最初に餌をのぞいて、野生型のマウスを絶食させると、翌日の明期の後半に、コントロール群にくらべて有意な行動量の増加と、覚醒時間の増加が認められた。しかし、オレキシン神経変性マウスではこの変化が認められなかった (図 4)。

【考察】

動物の行動は、栄養状態によって大きく影響を受けることが知られているが、脳が末梢の代謝情報を感知し、処理する経路については、未知の部分が多い。本研究により、オレキシン神経はグルコース感受性神経であり、また、外液のレプチン濃度、グレリン濃度を感知して、活性を変化させていることが示された。オレキシン神経は、脳内に広範に投射しているから、オレキシン神経は、液性情報としてこれらの抹消からの代謝情報をうけとり、脳の各部に伝えている可能性が示された。絶食時には、レプチン濃度が下がり、グレリン濃度が上昇し、血糖値が下がるので、これらの液性情報を受けて、オレキシン神経は活性化されると思われる。初年度の研究において、われわれは、オレキシン神経が、視床下部の摂食に関与する核 (弓状核、腹内側核など) に投射して、それらの核を制御することによって、摂食量を亢進させることをしめしたが、オレキシン神経は、脳幹や視床下部の覚醒の制御に関与するモノアミン神経系にも密に投射しており、これらの核を制御すると思われる。絶食時には、オレキシン神経が活性化し、視床下部のメカニズムを介して、摂食を亢進させるとともに、覚醒レベルを上げて、さ

らに摂食行動をサポートする機能をもっていると考えられる。

【結論】

オレキシン神経は、動物の栄養状態に応じて活性を変化させ、摂食行動を制御するとともに、適切な覚醒レベルを維持する働きがあるということが示された。絶食時には覚醒レベルが上がり、満腹時には覚醒レベルが低下するが、このことにオレキシン神経が密接に関与していると思われる。

【研究発表】

1. 論文発表
 1. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yanagi K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Genetic Ablation of Orexin Neurons in Mice Results in Narcolepsy, Hypophagia and Obesity. *Neuron* 30:345-354 (2001)
 2. Muroya S, Uramura K, Sakurai T, Takigawa M, Yada T. Lowering glucose concentrations increases cytosolic Ca²⁺ in orexin neurons of the rat lateral hypothalamus. *Neurosci Lett.* 309, 165-8 (2001)
 3. Chou TC, Lee CE, Lu J, Elmquist JK, Hara J, Willie JT, Beuckmann CT, Chemelli RM, Sakurai T, Yanagisawa M, Saper CB, Scammell TE. Orexin (hypocretin) neurons contain dynorphin. *J Neurosci* 21, RC168 (2001).
 4. Iqbal J, Pompolo S, Sakurai T, Clarke IJ. Evidence that orexin-containing neurons provide direct input to gonadotropin-releasing hormone neurons in the ovine hypothalamus. *J. Neuroendocrinolog.* 13, 1033-1041 (2001)..
 5. Moriguchi T, Sakurai T, Takahashi S, Goto K, Yamamoto M. Human prepro-orexin gene regulatory region that activate gene expression in the lateral region and represses it in the medial region of the hypothalamus. *J. Biol. Chem.* In press
 6. Nanmoku T, Isobe K, Sakurai T, Yamanaka A, Takekoshi K, Kawakami Y, Goto K, Nakai T. Effects of orexin on cultured porcine adrenal

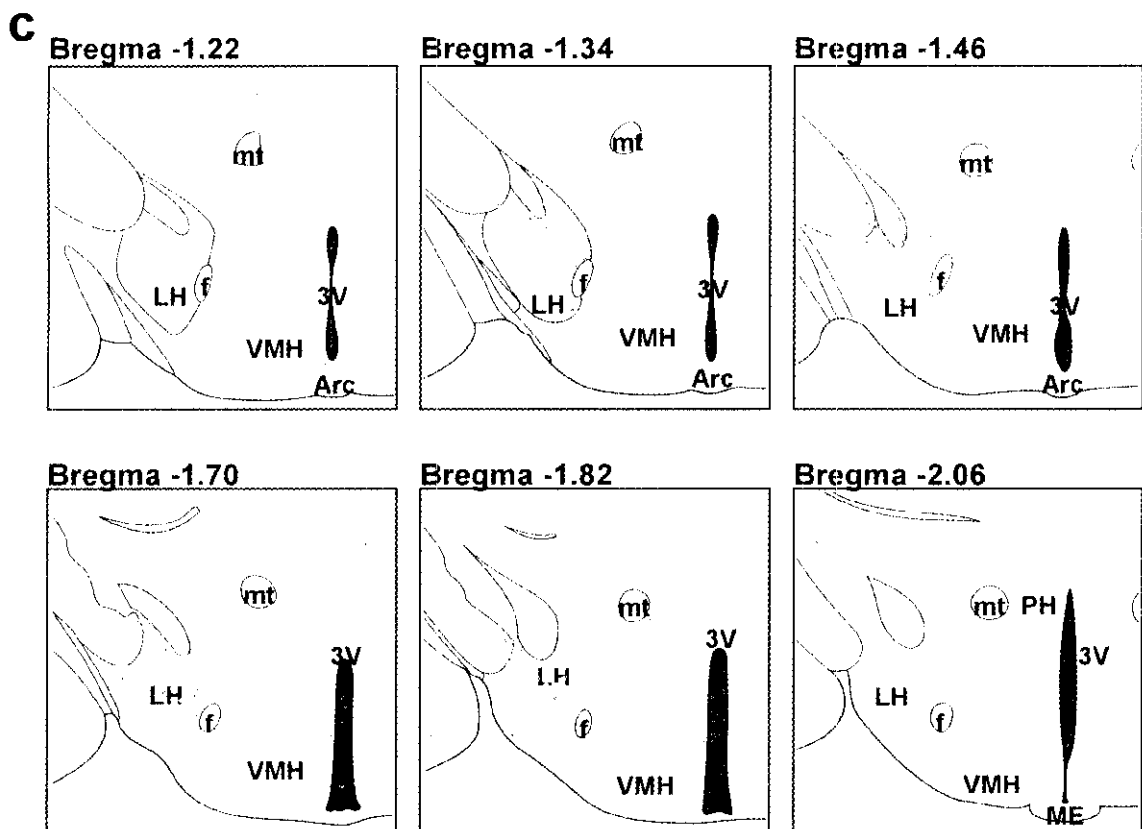
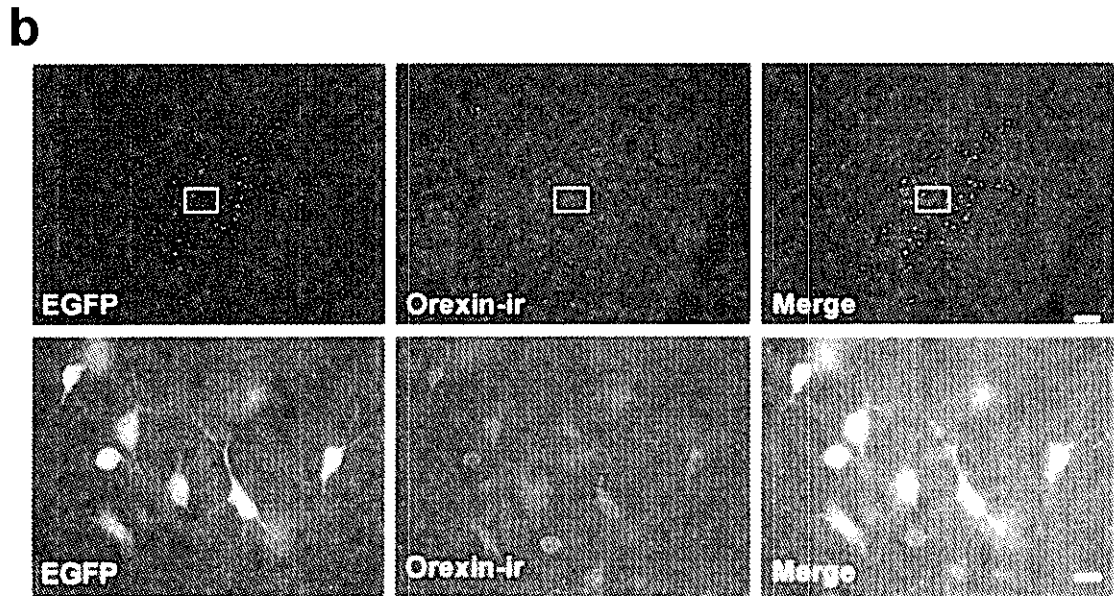
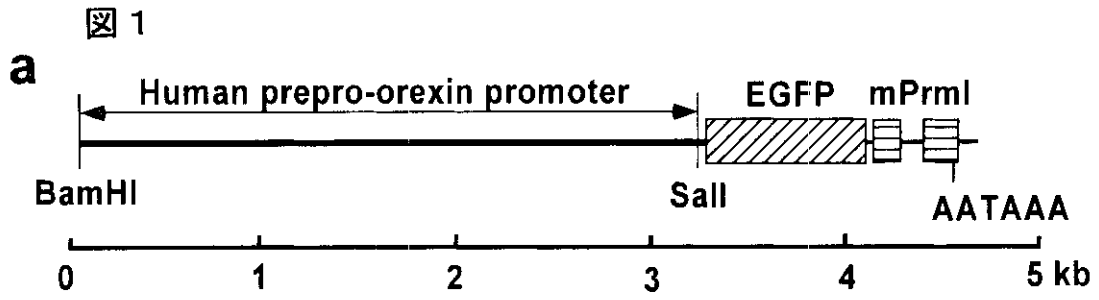
medullary and cortex cells. Reg. Peptides 2002, 104, 125-130.

2. 学会発表

1. 第78回生理学会大会シンポジウム S57 睡眠研究の現在と新しい展開について S57-5
桜井 武 睡眠・覚醒の制御における視床下部オレキシン神経の役割
2. APSS15th annual meeting T. Sakurai: Roles of orexin neurons in the regulation of wakefulness. Chicago, Illinois, USA 2001/6/7-6/9
3. Neuro2001 (第24回日本神経科学 第44回日本神経化学合同大会) シンポジウム S-13 桜井 武 「睡眠・覚醒と代謝系をつなぐオレキシン神経の

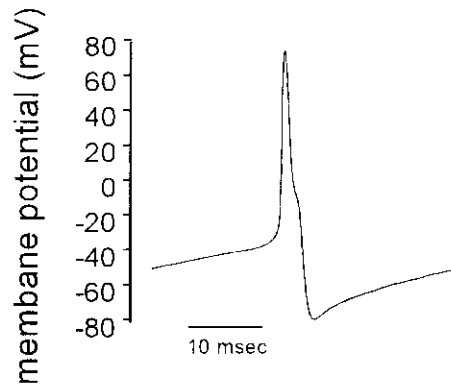
役割」平成13年9月26日

4. 桜井 武 「オレキシン神経変性マウスの解析」第18回日本疾患モデル学会総会名古屋大学シンポジオンホール
5. 桜井 武 「オレキシン神経系による摂食行動の制御機構」生理学研究所所長招聘セミナー平成14年3月8日
6. 第75回日本薬理学会年会ワークショップ4「神経疾患と行動薬理学」桜井 武、山中章弘、ボイクマン・カーステン、原 淳子、辻野なつ子、後藤勝年、柳沢正史 「オレキシン神経は、グルコース、レプチン、グレリンによって制御される。」

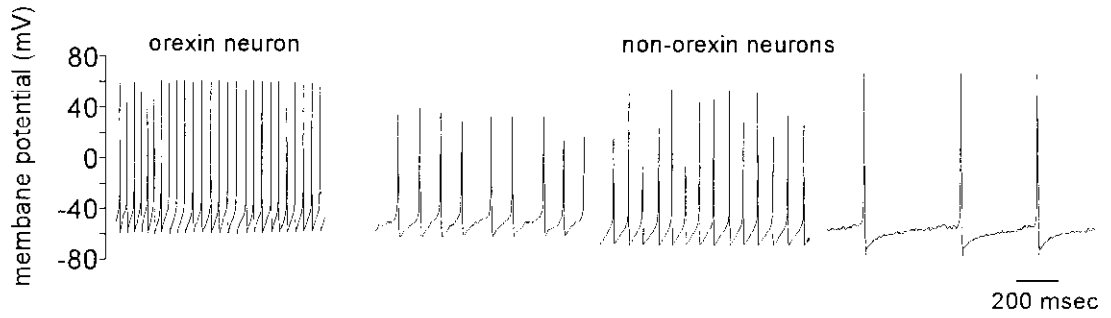


2

a



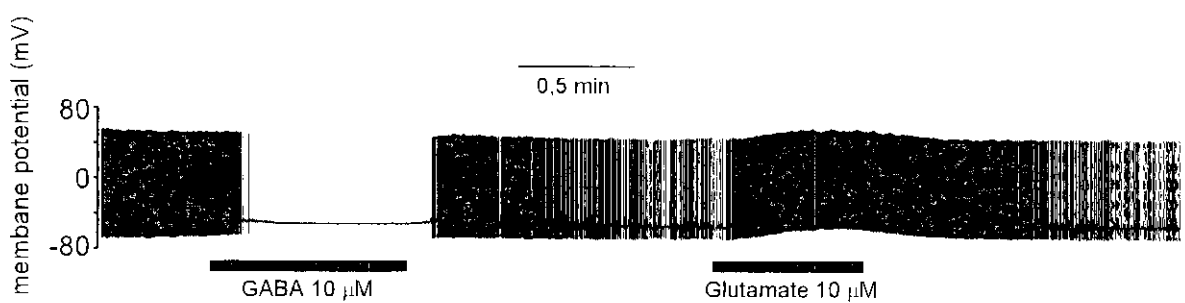
b



c

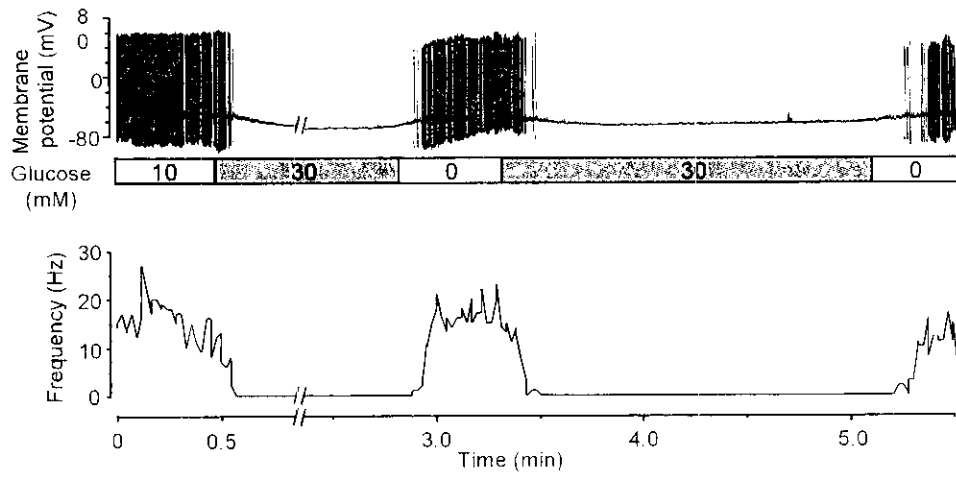
	orexin neurons (n=24)	other neurons (n=12)
Resting potential (mV)	-44.2 ± 1.2	-41.6 ± 1.1
Frequency (Hz)	$21.8 \pm 1.5^*$	14.1 ± 2.6
Membrane capacitance (pF)	6.3 ± 0.5	7.7 ± 1.9
Threshold (mV)	-29.2 ± 0.7	-27.5 ± 0.7
Amplitude (mV)	52.7 ± 2.1	51.4 ± 7.6
After hyperpolarization (mV)	-64.3 ± 2.6	-60.3 ± 3.2
Duration at half amplitude (msec)	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2
dV/dT raise (mV/msec)	82.4 ± 9.2	66.4 ± 6.7
dV/dT fall (mV/msec)	56.2 ± 7.6	61.2 ± 5.0

d

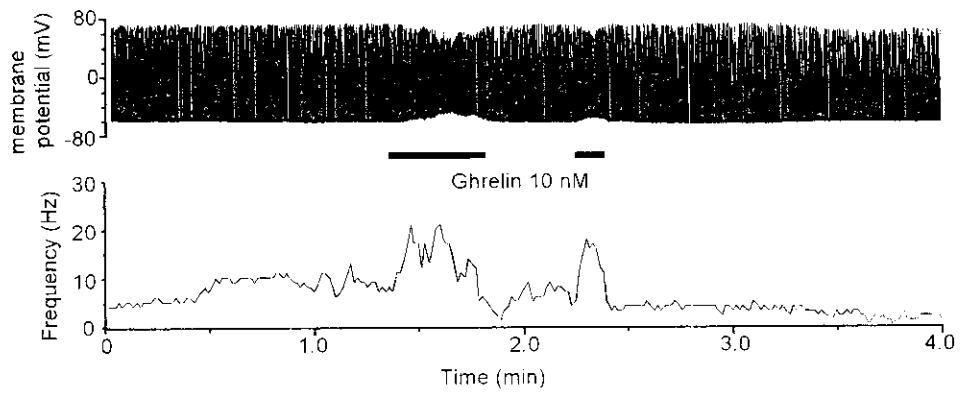


3

a



b



c

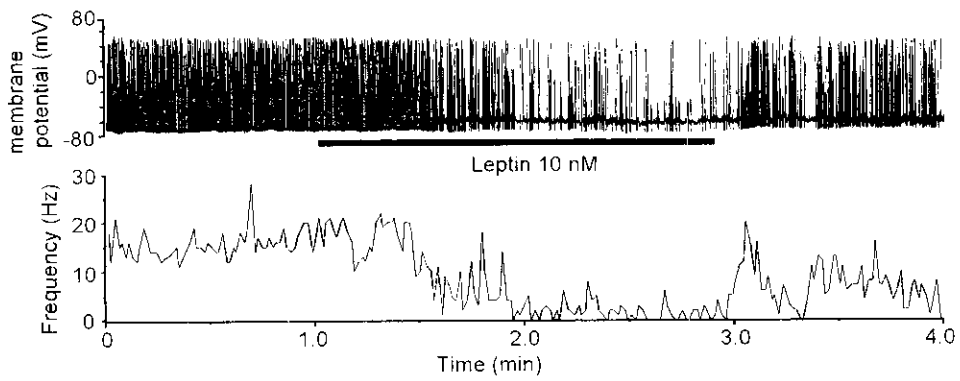


图 4

