

厚生労働科学研究費補助金  
特定疾患対策研究事業

## 中枢性摂食異常症に関する調査研究

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 芝 崎 保

平成 15 (2003) 年 3 月

## 目 次

I.	総括研究報告書	
	中枢性摂食異常症に関する調査研究	1
	日本医科大学 生理学第二 芝崎 保	
II.	分担研究報告書	
1.	エネルギー収支に応じた適応行動の制御におけるオレキシン産生神経の役割	7
	筑波大学基礎医学系 薬理学 桜井 武	
2.	ノックアウト・マウスを使った摂食調節ペプチドの機能解析	9
	久留米大学分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門 児島 将康	
3.	レプチンのエネルギー代謝調節作用の分子機構	11
	—脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスを用いて—	
	京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学 中尾 一和	
4.	なぜ神経性食欲不振症患者はほとんどが女性か:ストレスによる摂食抑制の性差の検討	14
	日本医科大学 生理学第二 芝崎 保	
5.	メラニン凝集ホルモン(MCH)の薬理的機能解析	18
	東京大学大学院医学系研究科 ストレス防御・心身医学 久保木 富房	
6.	神経ヒスタミンとアディポネクチンの抗肥満作用	22
	中村学園大学大学院栄養科学研究科 坂田 利家	
7.	神経性食欲不振症患者における成長ホルモン分泌の機序 —グレリンとの関連—	30
	九州大学大学院医学研究院 心身医学 久保 千春	
8.	神経性食欲不振症患者における血漿 ghrelin 値とその動態に関する研究	36
	政策研究大学院大学 保健管理センター 鈴木(堀田) 眞理	
9.	摂食障害患者における食行動と血漿グレリンの検討に関する研究	38
	鹿児島大学医学部附属病院 心身医療科 野添 新一	
10.	大学と短大の女子学生を対象とした過去 20 年間における摂食障害の実態調査	45
	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	49
IV.	平成 14 年度 研究者名簿	55

# 中枢性摂食異常症に関する調査研究

平成 14 年度

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（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	芝崎 保	日本医科大学生理学第二 教授
分担研究者	中尾 一和	京都大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科学 教授
	桜井 武	筑波大学基礎医学系薬理学 助教授
	久保木 富房	東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学 教授
	鈴木 眞理	政策研究大学院大学保健管理センター 教授
	中井 義勝	京都大学医療技術短期大学部 教授
	久保 千春	九州大学大学院医学研究院心身医学 教授
	坂田 利家	中村学園大学大学院栄養科学研究科 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
	野添 新一	鹿児島大学医学部付属病院心身医療科 教授

**研究要旨** 我が国の文化、社会構造の変化は中枢性摂食異常症の病像にも影響を与え、患者数の増加、重症化、発症の低年齢化をもたらしている。本研究は中枢性摂食異常症の病因、病態を解明することにより、本症の有効な治療及び予防法を開発することを目的とし、分子生物学的、発生工学的研究による中枢性摂食調節機構と本症の病因、病態の解明と、本症患者の病像の20年間の変遷に関する調査を行った。中枢性摂食調節機構におけるグレリン、オレキシン、メラニン凝集ホルモン、レプチン、ニューロメジン U、ヒスタミン、アディポネクチンの役割の理解が深まり、本症が女性に多く認められる機序へのエストロジェンの関与、神経性食欲不振症の病態・病型とグレリンの分泌や代謝との関係を新たに明らかにすることができた。さらに本症患者がこの20年間に著増している深刻な実態が明らかになった。

**研究目的**

我が国の文化、社会構造の変化は中枢性摂食異常症の病像にも深刻な影響を与え、患者数の増加、重症化、発症の低年齢化をもたらしている。このような状況から本症の有効な治療法や予防法の早急な開発が望まれる。本研究の目的は中枢性摂食異常症の病因、病態を解明することにより、有効な治療及び予防法を開発することであり、この目的を達成するために前研究班の成果を発展させ、分子生物学的、発生工学的研究手法による中枢性摂食調節機構と本症の病因、病態の生物学的因子の解明と、本症患者の病像解析のための実態調査を行う。

**研究の概要と成果**

1. 中枢性摂食・エネルギー調節機構と中枢性摂食異常症に関与する生物学的因子解明のための基礎的研究  
平成14年度の具体的目標として、分子生物学的お

よび発生工学的研究手法を用いて摂食促進ペプチドであるグレリン、オレキシン、メラニン凝集ホルモン(MCH)、摂食抑制ペプチドであるレプチン、ニューロメジン U(NMU)、さらにヒスタミン、アディポネクチンの中枢性の摂食及びエネルギー代謝の調節機構における役割の解明と、本症が圧倒的に女性に見られることへの生物学的因子の関与の有無の解明を目標とした。

摂食促進ペプチドのグレリンと摂食抑制ペプチドであるニューロメジンU(NMU)のノックアウトマウスを作成することによりこれらペプチドの中枢性摂食調節機構における役割の解明を図った。グレリンノックアウトは組み換え ES 細胞が得られず、グレリンが ES 細胞の分化増殖に必要である可能性が示唆された。NMU ホモ欠損マウスの作成は成功し、同マウスが生後1ヶ月から摂食量の増加、肥満、運動量低下を示すことが判明し、NMUがエネルギー蓄積に抑制的に作用していることが明らかにされた。(児島)

視床下部オレキシンニューロンの活性調節機構とオレキシンニューロンの機能を明らかにする目的で作成したオレキシンニューロンに特異的にEGFPを発現するトランスジェニックマウスとオレキシンニューロンが特異的に変性するマウス(orexin/ataxin-3 マウス)を実験に用いた。蛍光を指標に単離したオレキシンニューロンの電気生理学的な検討で、同ニューロンはドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニンにより抑制され、アセチルコリンにより活性化されることが明らかになった。オレキシン変性マウスでは絶食負荷時の覚醒レベルの上昇が欠落していたことより、オレキシンニューロンはエネルギー摂取状態に応じ、摂食行動のみならず覚醒レベルの調節にも関与していると考えられた。(桜井)

レプチンの中枢性のエネルギー調節作用機序を明らかにするために、脂肪萎縮性糖尿病マウスとレプチン過剰発現トランスジェニックマウスの交配種マウスの作成を試みた。同交配種では耐糖能異常は改善し、その耐糖能は $\beta$ 交感神経遮断薬であるプロプラノロールにより悪化し、 $\alpha$ 交感神経遮断薬であるブナゾシンでは影響を受けなかった。脂肪萎縮性糖尿病マウスでは著明なコルチコステロン産生亢進が認められ、両側副腎摘出により耐糖能は改善した。以上から、脂肪萎縮性糖尿病マウスの耐糖能異常の一部には低レプチン血症による糖質コルチコイド産生亢進が関与し、レプチンの糖代謝改善作用の一部は $\beta$ 交感神経活動亢進を介していることが示唆された。(中尾)

神経性食欲不振症は圧倒的に若年女性に発症する。この機序への生物学的因子の関与の有無の解明を目的に、ストレスによるCRFが関与した摂食抑制を雌雄ラットで比較した。拘束、フットショックによる摂食抑制は雌雄間で差が認められなかったが、コミュニケーションボックスを用いた心理ストレスによる摂食抑制は雌ラットで有意に強く認められた。同心理ストレスによる摂食抑制は、血中エストロゲン値が最も高値を示す発情前期雌ラットで最も強く認められた。この抑制は両側卵巣摘除により減弱し、エストロゲンの補充で回復した。心理ストレスがその病態に関与していると考えられている神経性食欲不振症が女性に多く発症する機序にはエストロゲンが関与していると考えられた。(芝崎)

視床下部外側野に存在し摂食促進作用を示すメラニン凝集ホルモン(MCH)の行動への影響を明らかにする目的で、ラット側脳室内へ同ペプチドを投与して行動解析を行った。MCHはオープンフィールドでの移動行動の減少と行動を開始するまでの時間が延長し、運

動抑制作用と不安惹起作用が示唆された。Flinch-vocal testではMCHによる感受性の変化は認められず、Fear conditioningでは記憶障害作用を示唆する結果が得られた。中枢性摂食異常症の過食状態における病態解明に繋がる可能性が示唆された。(久保木)

ヒスタミン及びアディポネクチンのエネルギー消費作用を比較検討する目的で、肥満マウス(obese yellow (Ay/a) mice)に7日間それぞれを脳室内ないし腹腔内投与し、摂食量、蓄積脂肪量、褐色脂肪組織(BAT)のUCP1発現の変化を観察した。ヒスタミンの脳室内投与により肥満マウスの摂食量、体重、内臓脂肪量の減少と、BAT UCP1発現量の増加が認められた。アディポネクチンの末梢投与では体重増加の抑制、内臓脂肪および肝臓脂肪沈着の減少、BAT UCP1の発現亢進が認められたが摂食量には影響がなかった。アディポネクチンの中枢内投与では変化が認められなかった。ヒスタミンとアディポネクチンは共に抗肥満作用を示すが、作用に一部差異があることが明らかになった。(坂田)

## 2. 中枢性摂食異常症の病態、実態の解明のための臨床的研究

本症の病態・病型と摂食促進物質であるグレリンとの関係の解明および女子大学生を対象とした過去20年間の摂食障害の変遷の実態解明を目指した。

血中グレリンと栄養状態や食行動との関連を明らかにする目的で40名の神経性食欲不振症患者、31名の神経性過食症患者、15名の健常者を対象にグレリンを測定した。血漿グレリン値はBMIや体脂肪と有意な負の相関を示し、過食嘔吐の指標とされる血清アミラーゼと有意な正の相関を示した。排出型のグレリン値はBMIに有意差の無い非排出型と健常者より高値を示し、BMIに有意差のある制限型、無茶喰い/排出型と有意差が無かった。習慣性の過食嘔吐が認められた無茶喰い/排出型と排出型において血漿グレリン値は過食嘔吐回数や血清アミラーゼと正の相関を示した。これらの結果は血漿グレリン値が栄養状態のみならず過食嘔吐の頻度等によっても影響されることが示唆された。(野添)

神経性食欲不振症患者の血漿グレリンとGHとの関係を解析するために20名の患者の両ホルモンを始めとする幾つかのホルモンを測定した。入院時血漿グレリン値は血漿GHと正の相関を認め、GH分泌に最も独立して影響を与える因子はグレリンであった。体重回復

期にはグレリンと GH との関連性は認められなかった。従って本症患者の低体重時に上昇したグレリンが GH 分泌に寄与した可能性が考えられた。血漿グレリンと GH との相関関係は制限型で強く、無茶喰い/排出型ではみられなかったことから、過食嘔吐がそれらの相関関係に影響を与えることが明らかになった。(久保)

神経性食欲不振症患者の血漿グレリンの代謝、GH-IGF-I 系との関係、糖負荷へ反応を健常者と比較するために、インタクトグレリン、N 端側グレリン、C 端側グレリンのそれぞれを認識する抗体を用いたアッセイを行った。血漿インタクトグレリン値は健常者と比較して低下ないし同レベルであり、N 端側および C 端側フラグメントは高値を示したことから、本症患者のグレリンの代謝は健常者と異なっていると考えられた。血漿インタクトグレリン値は GH や IGF-I 値とは有意な相関を示さず、消化器症状を強く訴える患者で低い傾向があり、胃粘膜病変により分泌が低下している可能性が示唆された。糖負荷によりインタクトグレリンは健常者と同様に抑制された。(鈴木)

時代による摂食障害の実態の変化を明らかにする目的で、京都府下の女子大学生を対象に身体的背景、体重、体型に関する自己意識、食行動の実態調査を

行い、1982 年、1992 年の同調査結果と比較した。低 BMI 群 (18.5 kg/m<sup>2</sup> 以下) の比率が 2002 年には 17.7% で 1982 年の 11.7%、1992 年の 9.6% に比し多かった。低 BMI 群で自己の体重が多いと認識している割合は 2002 年で増加し、同群の理想とする体重は 1982 年での 45.8 kg、1992 年での 45.4 kg に比し、2002 年には 43.0 kg と減少していた。病的な食事制限は 2002 年に著増していた。神経性食欲不振症の推定頻度は 1982 年は 0.1%、1992 年は 0.15%、2002 年は 0.3%、神経性大食症のそれは 1992 年は 0.5%、2002 年は 1.9%、非定型の摂食障害は 1992 年は 4.6%、2002 年は 10.5% であり、摂食障害の推定頻度はこの 20 年間で著増していた。やせ志向と低 BMI にも関わらずさらなる食事制限がその一因であると考えられた。(中井)

以上、今年度の研究により、中枢性摂食調節機構におけるオレキシン、レプチン、NMU、MCH、ヒスタミン、アディポネクチンの役割の理解が深まり、本症が女性に多く認められる機序へのエストロジェンの関与、神経性食欲不振症の病態・病型とグレリンの分泌や代謝との関係を新たに明らかにすることができた。さらに本症患者がこの 20 年間に著増している深刻な実態が改めて明らかになった。

平成 14 年度

## Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

エネルギー収支に応じた適応行動の制御におけるオレキシン産生神経の役割

分担研究者 桜井 武 筑波大学基礎医学系薬理学 助教授

**研究要旨** 野生動物にとって、摂食行動など動機を必要とする行動には、高い覚醒レベルを維持することが不可欠となる。恒常性の維持のために適切な摂食行動をするためには、適切な時間に覚醒し、モチベーションをもって行動することが求められる。食餌が適切に得られず、エネルギーバランスが負に傾くと、動物は覚醒レベルが上昇し、自発運動量が増加することが知られている。このことは、食物を探すための適応行動に必要であると考えられるが、その分子メカニズムや、生理的な機構は解明されていない。われわれは、視床下部のオレキシン産生神経は、グルコース、レプチン、グレリンなど、エネルギーバランスの指標となる因子によって制御されていることを明らかにした。また、オレキシン神経を選択的に除去したマウスでは、野生型のマウスにみられる上記のような絶食下における適応反応がみられないことが明らかになった。これらのことから、オレキシン神経系はエネルギーバランスに応じて覚醒や適応行動を制御する役割をもっていることが推測された。

**研究目的**

視床下部のオレキシン産生神経の活性を制御する生理的機構を明らかにする。このことにより、オレキシン神経の入力系を明らかにし、摂食行動の制御系におけるオレキシン神経の役割を解明するための一助にする。

**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<sup>4)</sup>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。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、あるいはスライス標本をもちいて、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. オレキシン神経の入力系の生理的意義を明らかにするために、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、行動の変化と睡眠・覚醒パターンの変化を調べた。マウスの脳波・筋電図測定により、絶食下での睡眠・覚醒の変化を観察した。探索行動は、オープン・フィールドの実験系(Opto-Varimex 自動測定システム)によって観察し、行動量(水平・垂直)および常同行動の変化を測定した。

**研究結果**

1. オレキシン神経は、GABA、セロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミンによって抑制され、グルタミン酸、アセチルコリンによって活性化されることが明らかになった。
2. 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。また、野生型のマウスでは、自発運動量の増加、探索行動の更進と常同行動の増加がみとめられた。

**考察**

昨年度の研究において、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。また、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。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から、オレキシン神経は、液性情報としてこれらの末梢からの代謝情報をうけ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。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、この入力系にオレキシン神経が関わっ



ている可能性が示唆された。

本年度の研究では、オレキシン神経が、ドーパミン、アドレナリン、セロトニンなどのモノアミン系によって抑制され、アセチルコリンによって活性化されることが明らかになった。これらの神経伝達物質は、睡眠・覚醒や、感情・気分・動機付けなどに密接に関わっていることが知られている。また、オレキシン神経は、モノアミン系や、アセチルコリン作動性神経に密に投射し、これらの神経系を活性化することから、オレキシン神経は、モノアミン神経系やコリン作動性神経系と相互に機能的な関連をもっていることが示唆された。

これらのことから、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、モノアミン神経系やコリン作動性神経にも影響をあたえて、覚醒レベルや情動・気分・動機などに影響を与えることが示唆される。動物の栄養状態により、オレキシン神経の活性は、レプチンや血糖値の変化にもなって変化するが、このことが、動物の行動に影響を与えている可能性がある。このことを確かめるために、オレキシン神経を変性させたマウスを用いた。野生型マウスを絶食させると、覚醒時間が延長するとともに、自発行動の更進・常同行動の増加など、探索行動が活発になったが、オレキシン神経変性マウスではこれらの変化が見られなかった。この結果から、オレキシン神経は、動物のエネルギーバランスに応じて活性を変化させ、覚醒や情動の変化を引き起こしていると考えられる。神経性食思不振症患者や、食事制限時にはヒトでも覚醒レベルの上昇が伴うので、このメカニズムはヒトにおいても同様であると思われる。これらの知見は、拒食症や、食事療法の際の病態生理を考える上で重要であると考えられる。

#### 参考文献

1. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chimeili RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, McNulty DE, Terrett JA, Holmes SD, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* ;92, 573-585, 1998.
2. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chimeili 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.

3. 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.* 277:16985-92, 2002.
4. Li, Y., Gao, X.B., Sakurai, T., and van den Pol, A.N. (2002). Hypocretin/Orexin Excites Hypocretin Neurons via a Local Glutamate Neuron-A Potential Mechanism for Orchestrating the Hypothalamic Arousal System. *Neuron* 36, 1169-1181.

#### 研究発表

##### 論文発表

1. Sakurai T. Orexins activate histaminergic neurons via the orexin 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(4) 1237-1245. 2002
2. Sakurai T. Involvement of the serotonergic system in orexin-induced behavioral alterations in rats. *Regul Pept.* 104(1-3) 119-123 2002
3. Sakurai T. Effects of orexin on cultured porcine adrenal medullary and cortex cells. *Regul Pept.* 104(1-3) 125-130. 2002
4. Sakurai T. Plasma orexin-A is lower in patients with narcolepsy. *Neurosci Lett.* 318(2) 61-64. 2002
5. Sakurai T. The human prepro-orexin gene regulatory region that activates gene expression in the lateral region and represses it in the medial regions of the hypothalamus. *J Biol Chem* 277(19) 16985-16992. 2002
6. Sakurai T. Roles of orexins in regulation of feeding and wakefulness. *NeuroReport.* 13(8) 987-995. 2002
7. Sakurai T. Activation of orexin neurones after noxious but not conditioned fear stimuli in rats. *NeuroReport.* 13(10) 1351-1353. 2002
8. Sakurai T. Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiol Behav.* 77(2-3) 251-257. 2002
9. Sakurai T. Hypocretin/Orexin Excites Hypocretin Neurons via a Local Glutamate Neuron-A Potential Mechanism for Orchestrating the Hypothalamic Arousal System. *Neuron.* 36(6) 1169-1181. 2002
10. Sakurai T. Reciprocal synaptic relationships between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Internat. J Obesity* 26, 1523-1532. 2002

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

ノックアウト・マウスを使った摂食調節ペプチドの機能解析

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。一方、脳と腸管に多く存在するニューロメジン U (NMU) は摂食抑制作用を示す。これらの摂食調節ペプチドの生理的意義を解明する目的で、両ペプチドのノックアウト・マウスの作製を試みた。グレリン・ノックアウト・マウスは現在作製中である。NMU ノックアウトでは摂食亢進と肥満を示し、NMU が摂食抑制ペプチドとして作用していることを裏付けた。

**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。一方、脳と腸管に多く存在する NMU は摂食抑制ペプチドである。本研究ではグレリンと NMU の摂食調節機能を解明するため、ノックアウト・マウスの作製を試み、それぞれのペプチド欠損状態が、どのような異常を引き起こすのか探ることを計画した。

**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、グレリンおよび NMU 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、グレリンまたは NMU 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、サザーンプロット法にて、組み替え体を検索した。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。5、キメラマウスと野生型マウスの交配により、ヘテロ F1 マウスを作った。F1 ヘテロ同士のかけあわせで F2 ホモ欠損マウスを作製した。

**研究結果**

①グレリン・ノックアウト・マウスの作製

昨年度期間中に構築したベクターを ES 細胞に transfection し、G418 耐性細胞を得た。この耐性細胞の DNA を抽出し、サザーンプロット法にて、組み換え細胞をチェックした。その結果、約300個の耐性細胞を解析して

もグレリン遺伝子組み換え ES 細胞は得られなかった。

② NMU ノックアウト・マウスの作製

グレリン・ノックアウト・マウス作製と同様の手順を進め、こちらは NMU ホモ欠損マウスまで生まれた。NMU ホモ欠損マウスは外観の異常はなく、生後1ヶ月の発育・成長は正常であった。またホモ同士の交配で妊娠・出産できたため、ホモ欠損マウスの生殖機能は正常であることがわかった。

しかしながら生後約一ヶ月でホモ欠損マウスは体重増加が見られ、明らかに肥満傾向となった。

また NMU ノックアウト・マウスはサーカディアン・リズムの異常が見られ、周期的な運動は見られないことがわかった。

**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、約300個の耐性細胞で組み換え体が得られなかった。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・維持に必要なであることを示唆している。

一方、摂食抑制ペプチドである NMU のノックアウト・マウスは外見上、目立った異常は何もないが、生後1ヶ月くらいから野生型マウスよりも体重増加が大きくなり、肥満となる。なぜ肥満になるのか、そのメカニズムは現在検討している。また NMU 欠損マウスはサーカディアン・リズムの異常があることが明らかになった。

## 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ES細胞の生存・維持に機能している可能性が示唆された。NMU ノックアウト・マウスは肥満となり、NMU が内因性の摂食抑制ペプチドであることが確かめられた。

## 研究発表

### 論文発表

1. Kojima, M. & Kangawa, K. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol* 2, 665-8 (2002).
2. Ikezaki, A. et al. Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes* 51, 3408-11 (2002).
3. Sugino, T. et al. A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 785-8 (2002).
4. Iwakura, H. et al. Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4885-8 (2002).
5. Yoshimoto, A. et al. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 13, 2748-52 (2002).
6. Norrelund, H. et al. Ghrelin immunoreactivity in human plasma is suppressed by somatostatin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 57, 539-46 (2002).
7. Kaiya, H. et al. Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology* 143, 3454-63 (2002).
8. Ariyasu, H. et al. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology* 143, 3341-50 (2002).
9. Nakagawa, E. et al. Hyperglycemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci (Lond)* 103, 325-8 (2002).
10. Murakami, N. et al. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol* 174, 283-8 (2002).
11. Sugino, T. et al. A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 255-60 (2002).
12. Galas, L., Chartrel, N., Kojima, M., Kangawa, K. & Vaudry, H. Immunohistochemical localization and biochemical characterization of ghrelin in the brain and stomach of the frog *Rana esculenta*. *J Comp Neurol* 450, 34-44 (2002).
13. Yoshihara, F., Kojima, M., Hosoda, H., Nakazato, M. & Kangawa, K. Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 391-5 (2002).
14. Hayashida, T. et al. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol* 173, 239-45 (2002).
15. Makino, Y. et al. Alteration of plasma ghrelin levels associated with the blood pressure in pregnancy. *Hypertension* 39, 781-4 (2002).
16. Lu, S. et al. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 321, 157-60 (2002).
17. Hansen, T. K. et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56, 203-6 (2002).
18. Date, Y. et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51, 124-9 (2002).
19. Lee, H. M., Wang, G., Englander, E. W., Kojima, M. & Greeley, G. H., Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143, 185-90 (2002).
20. Murata, M. et al. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277, 5667-74 (2002).

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

レプチンのエネルギー代謝調節作用の分子機構

—脂肪萎縮性糖尿病モデルマウスを用いて—

分担研究者 中尾 一和 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学 教授

**研究要旨** 本研究では、脂肪萎縮性糖尿病モデルマウス(A-ZIPTg)を用いてレプチンの中枢性糖代謝改善作用の分子機構について検討した。15週齢雄性 A-ZIPTg とレプチン過剰発現トランスジェニックマウス(LepTg)を交配して得られる LepTg/A-ZIPTg に交感神経遮断薬を投与後、あるいは A-ZIPTg の両側副腎摘出後に糖代謝を評価した。LepTg/A-ZIPTg の耐糖能はプロプラノロールにより悪化した。ブナゾシンでは明らかな変化はなかった。A-ZIPTg における尿中コルチコステロン排泄量は著しく増加しており、耐糖能は両側副腎摘出により改善した。以上より、A-ZIPTg におけるレプチンの糖代謝改善作用は $\beta$ 交感神経活動亢進を介すること、A-ZIPTg における糖代謝異常は低レプチン血症による糖質コルチコイド産生亢進によることが示唆された。本研究により、脂肪萎縮性糖尿病におけるレプチンの中枢性糖脂質代謝改善作用の少なくとも一部は $\beta$ 交感神経活動亢進作用と糖質コルチコイド産生抑制作用によりもたらされることが示唆された。

**研究目的**

我々は既に、レプチンが主に中枢神経系を介して糖代謝調節に関与することを明らかにしてきた。脂肪萎縮性糖尿病は、脂肪組織の減少により低レプチン血症となるためレプチンの効果が最も期待できる糖尿病であり、レプチンの糖代謝調節作用の分子機構の解明に優れたモデルである。本研究では、脂肪萎縮性糖尿病モデルマウス(A-ZIPTg)を用いてレプチンの中枢性糖代謝改善作用の分子機構について検討した。

**研究方法**

15週齢雄性 A-ZIPTg とレプチン過剰発現トランスジェニックマウス(LepTg)を交配して得られる LepTg/A-ZIPTg に $\alpha$ 交感神経遮断薬であるブナゾシン(15 $\mu$ g/g)および $\beta$ 交感神経遮断薬であるプロプラノロール(6 $\mu$ g/g)を腹腔内に投与し、1時間後に腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った。又、15週齢雄性野生型マウス(+/+)および A-ZIPTg に両側副腎摘出術を施行し、1週間後に腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究において使用動物に対して長時間苦痛をもたらす方法を適応する場合には、動物愛護上の配慮として、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により用いる。又、使用動物の安楽死は頸椎脱臼法により施行する。

**研究結果**

腹腔内ブドウ糖負荷試験において A-ZIPTg と比較して LepTg/A-ZIPTg では良好な耐糖能が認められた。この LepTg/A-ZIPTg の耐糖能はプロプラノロール投与により悪化が認められたが、ブナゾシン投与では明らかな変化は認められなかった。一方、A-ZIPTg の耐糖能はブナゾシン投与においてもプロプラノロール投与においても明らかな変化は認められなかった(図1)。+/+および A-ZIPTg におけるコルチコステロン1日尿中排泄量を測定したところ+/+の 156ng/day に対し A-ZIPTg では 1120ng/day と著明な亢進が認められた。腹腔内ブドウ糖負荷試験において+/+と比較し A-ZIPTg では耐糖能不良が認められたが、両側副腎摘出により A-ZIPTg の耐糖能は+/+と同程度にまで改善が認められた(図2)。一方、+/+の耐糖能は両側副腎摘出前後で明らかな変化は認められなかった。

**考察**

A-ZIPTg におけるレプチンの糖代謝改善作用の一部は $\beta$ 交感神経活動亢進を介していることが示唆された。また A-ZIPTg の糖代謝異常の一部は低レプチン血症による糖質コルチコイド産生亢進によりもたらされていることが示唆された。

**結論**

脂肪萎縮性糖尿病におけるレプチンの中枢性糖代謝改善作用の少なくとも一部は、 $\beta$ 交感神経活動亢進作用

と糖質コルチコイド産生抑制作用によりもたらされることが示唆された(図3)。

#### 健康危険情報

なし

#### 研究発表

##### 論文発表

1. H. Kobayashi, Y. Ogawa, M. Shintani, K. Ebihara, M. Shimodahira, T. Iwakura, M. Hino, T. Ishihara, K. Ikekubo, H. Kurahachi, and K. Nakao. A novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (*MC4R*) in a Japanese woman with severe obesity. *Diabetes* 51: 243-246, 2002.
2. Y. Ogawa, H. Masuzaki, K. Ebihara, M. Shintani, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, and K. Nakao. Pathophysiological role of leptin in lifestyle-related diseases: studies with transgenic skinny mice overexpressing leptin. *J. Diabetes Complications* 16: 119-122, 2002.
3. K. Shimizu, K. Chin, T. Nakamura, H. Masuzaki, Y. Ogawa, R. Hosokawa, A. Niimi, N. Hattori, R. Nohara, S. Sasayama, K. Nakao, M. Mishima, T. Nakamura, M. Ohi. Plasma leptin levels and cardiac sympathetic function in patients with obstructive sleep apnoea-hypopnoea syndrome. *Thorax* 57: 429-434, 2002.
4. H. Ariyasu, K. Takaya, H. Hosoda, H. Iwakura, K. Ebihara, K. Mori, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, and K. Nakao. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: Evidenced by a specific radioimmunoassay for active form of ghrelin. *Endocrinology* 143: 3341-3350, 2002.
5. T. Miyawaki, H. Masuzaki, Y. Ogawa, K. Hosoda, H. Nishimura, N. Azuma, A. Sugawara, I. Masuda, M. Murata, T. Matsuo, T. Hayashi, G. Inoue, Y. Yoshimasa, and K. Nakao. Clinical implications of leptin and its potential humoral regulators in long-term low-calorie diet therapy for obese humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56: 593-600, 2002.
6. T. Nakagawa, Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Yamanaka, A. Tsuchida, M. Taiji, H. Noguchi, and K. Nakao. Antiobesity and antidiabetic effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent models of leptin resistance. *Int. J. Obes.* in press, 2003.

##### 学会発表

第 39 回日本臨床分子医学会学術総会 2002.3.1-3.2  
大阪

1. 宮永史子, 小川佳宏, 海老原健, 阿部恵, 日高周次, 雪岡日出男, 田中智洋, 益崎裕章, 林達也, 細田公則, 井上元, 中尾一和  
インスリン分低下型糖尿病のレプチン・インスリン併用療法

第 45 回日本糖尿病学会年次学術集会 2002.5.17-19  
東京

2. 田中智洋, 小川佳宏, 海老原健, 雪岡日出男, 宮永史子, 増田志帆子, 日高周次, 林達也, 細田公則, 井上元, Marc L Reitman, 中尾一和  
レプチンによる脂肪萎縮性糖尿病の脂肪肝改善における PPAR $\gamma$  の意義
3. 海老原健, 小川佳宏, 雪岡日出男, 宮永史子, 田中智洋, 林達也, 細田公則, 井上元, Marc L Reitman, 中尾一和  
脂肪萎縮性糖尿病におけるレプチンの糖、脂質代謝調節機構

第 75 回 日本内分泌学会学術総会 2002.6.28-6.30  
大阪

4. 有安宏之, 高屋和彦, 細田洋司, 小川佳宏, 篠谷雄二, 金本巨哲, 日高周次, 海老原健, 赤水尚史, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和  
肥満モデル動物における血漿グレリン濃度と血糖の変化によるグレリン分泌調節の検討
5. 雪岡日出男, 小川佳宏, 海老原健, 宮本恵宏, 宮永史子, 田中智洋, 林達也, 細田公則, 井上元, 吉政康直, Marc L Reitman 中尾一和  
マイクロアレイを用いた脂肪萎縮性糖尿病マウスにおけるレプチンの糖脂質代謝改善作用機構の解析
6. 海老原健, 小川佳宏, 雪岡日出男, 宮永史子, 田中智洋, 林達也, 細田公則, 井上元, Marc L Reitman 中尾一和  
脂肪萎縮性糖尿病の糖代謝改善におけるレプチンの作用メカニズム

第 23 回日本肥満学会 2002.10.3-4 京都

7. 田中智洋, 小川佳宏, 海老原健, 雪岡日出男, 宮永史子, 増田志帆子, 日高周次, 林達也, 細田公則, 井上元, 中尾一和  
脂肪萎縮性糖尿病の脂肪肝発症とレプチンによるその改善における PPAR $\gamma$  の病態生理的意義
8. 雪岡日出男, 小川佳宏, 海老原健, 宮本恵宏, 田中智洋, 宮永史子, 林達也, 細田公則, 井上元, 吉政康直, 中尾一和  
マイクロアレイによる脂肪萎縮性糖尿病の肝臓におけるレプチンの糖脂質代謝改善メカニズムの解明

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

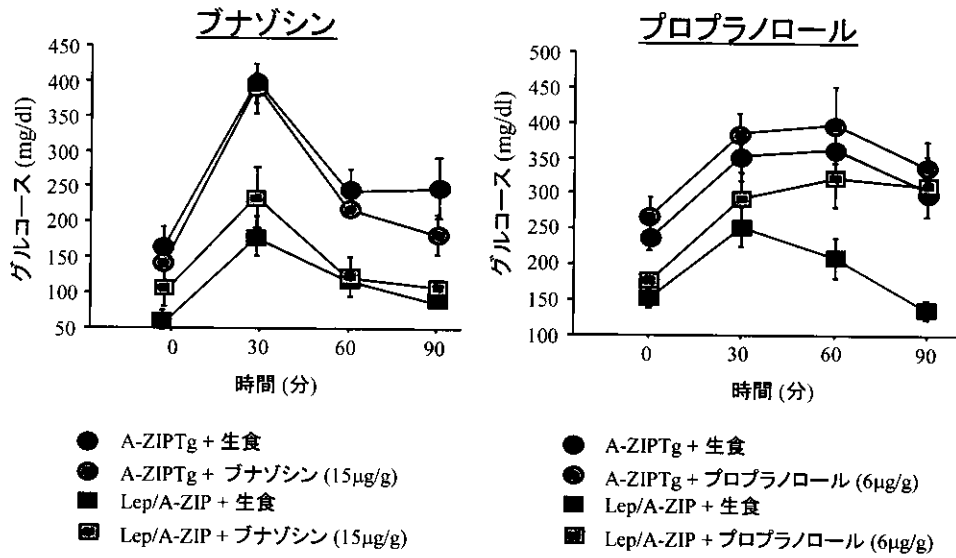


図1 A-ZIPTgマウスおよびLep/A-ZIPマウスのグルコース負荷試験におけるa及びb交感神経遮断薬の効果

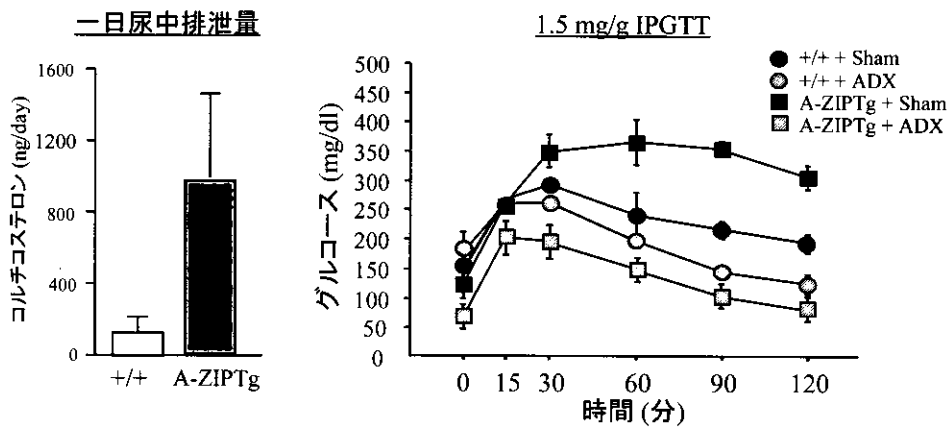


図2 A-ZIPTgマウスおよび野生型 (+/+) マウスのコルチコステロン一日尿中排泄量及びグルコース負荷試験における副腎摘出 (ADX) の効果

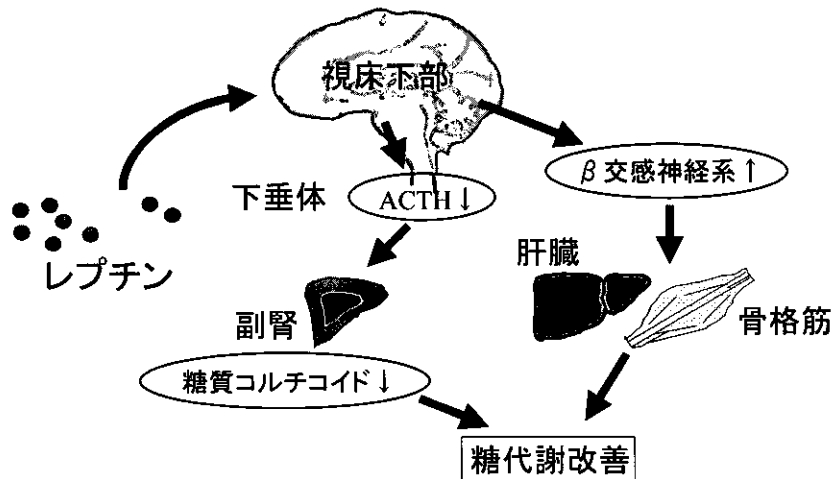


図3 レプチンの中枢性糖代謝調節作用の分子機構

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

なぜ神経性食欲不振症患者はほとんど女性か：

ストレスによる食欲抑制の性差の検討

主任研究者 芝崎 保 日本医科大学生理学第二 教授  
栗山秀樹 日本医科大学生理学第二  
大島久幸 日本医科大学生理学第二

研究要旨 神経性食欲不振症患者の殆どが女性である生物学的機序は不明である。本症の病因、病態には心理ストレスの関与例が多いことから、3種類のストレスによる摂食抑制を雌雄のラットで比較することにより、その生物学的機序に考察を加えた。拘束、フットショックストレスによる摂食抑制には雌雄差が認められなかったが、心理ストレスによる摂食抑制は雌が雄に比べ有意に大であった。この雌における心理ストレスによる摂食抑制は、発情前期で最も強く、卵巣摘除により減弱しエストラジオールの補充で回復した。以上の結果から、雌ラットで心理ストレスによる摂食抑制が著明な機序にはエストロゲンが関与しており、さらに心理ストレス下にある神経性食欲不振症が殆ど女性に発症する生物学的機序にはエストロゲンが関与していると考えられる。

研究目的

神経性食欲不振症患者の殆どが女性であるという機序への生物学的因子の関与の有無は不明である。本症には心理ストレスがその病因、病態に強く関与していると考えられている。本研究ではラットにおけるストレス誘発摂食抑制を雌雄間で比較して、本症が女性で多いという機序への生物学的因子の関与を考察する。

研究方法

実験I 自由摂食下の8週齢のウイスター系雌雄ラットに拘束、コミュニケーションボックスを用いてフットショック、あるいは心理ストレスをそれぞれ1時間負荷し、その直後から1時間の摂食量を測定した。

実験II 発情前期、発情後期、発情休止期の雌ラットに心理ストレスを実験Iと同様にかけ、1時間の摂食量を測定した。

実験III 両側卵巣摘除ラットおよび両側卵巣摘除後に2μgのestradiol benzoateを実験2日、3日前に皮下投与したラットに心理ストレスを負荷して同様の実験を行った。

以上の実験計画は本学動物実験倫理委員会にて審議され承認されている。

研究結果

実験I 拘束、フットショック、心理ストレスはそれぞれ雌雄ラットにおいて有意な摂食抑制をもたらした(図1-3)。拘束、フットショックによる摂食抑制の程度には雌雄間で差が認められなかったが、心理ストレスによる摂食抑制は雄ラットに比べ雌ラットにおいて有意に大であった(図3)。

実験II 発情前期、発情後期、発情休止期の雌ラットで心理ストレスによる摂食抑制の比較では、発情前期で最も抑制の程度が他の2期に比べ強かった(図4)。

実験III 卵巣摘除ラットでは心理ストレスによる摂食抑制は認められるものの減弱し、estradiol benzoateの補充により摂食抑制は回復した(図5)。

考察

神経性食欲不振症患者のほとんどが女性であることの一因として、やせを賞賛し、やせていることが女性の付加価値であるかの如くの社会的背景がある。また思春期女性には肉体的変化の受容に困難を伴うことからの心理ストレスが男性より強く、さらに女性は食生活に敏感であることなどが、本症の発症がほとんど女性である要因として考えられている。本症の発症には心理ストレスが強く関与していることから、ストレスによる摂食抑制を雌雄ラットで比較し、本症がほとんど女性に発症する生物学的因子の関与の

有無を検討した。

拘束、フットショックは、それぞれ雌雄ラットにおいて同程度に摂食抑制を示した。これに対して、心理ストレスは雄ラットに比べ雌ラットで有意に強い摂食抑制を示した。異なった性周期の雌ラットを用いた実験では、血中エストロゲン値が最も高い発情前期のラットでの心理ストレスによる摂食抑制が発情後期、発情休止期のラットに比べ有意に強かった。これらの結果は雌ラットにおいて心理ストレスによる摂食抑制が雄ラットより強く生じる機序にエストロゲンが関与していることを示唆するものと考えられる。この推測をさらに確認するために両側卵巣摘除ラットでの心理ストレスによる摂食抑制を検討した結果、同ラットでは摂食抑制が認められるものの、雄ラットと同程度の抑制となった。そして発情前期に相当する血中エストラジオール値に達する量の estradiol benzoate で補充した両側卵巣摘除ラットでは心理ストレスによる摂食抑制が発情前期雌ラットと同程度に強まった。これらの結果も心理ストレスが雄ラットより雌ラットで強い摂食抑制を示す機序にエストロゲンが関与していることを示すものと考えられる。

心理ストレスによる摂食抑制には CRF が関与していることが明らかになっている<sup>1)</sup>。CRF の投与実験で視床下部室傍核に投与した時にのみ摂食抑制が認められることから<sup>2)</sup>、室傍核の CRF ニューロンがストレス下の摂食抑制に関与していることが推測される。視床下部室傍核の CRF ニューロンにはエストロゲンβ受容体の発現が認められており<sup>3)</sup>、同核の CRF mRNA 発現は血中エストロゲン値が最高値を示す発情前期に上昇することも発表されている<sup>4)</sup>。さらにヒト CRF 遺伝子のプロモーター領域には estrogen response element の存在が確認されており<sup>5)</sup>、エストロゲンが視床下部室傍核 CRF の発現を促進することも報告されている。これらの知見は視床下部室傍核の CRF ニューロンの機能がエストロゲンの影響を受けていることを示し、本実験結果を支持するものと考えられる。扁桃体中心核の CRF 発現が心理ストレスで上昇することが報告されている<sup>6)</sup>。また扁桃体中心核にエストロゲン受容体が存在することが報告されていることから<sup>3,7)</sup>、同核の CRF ニューロンの機能がエストロゲンにより修飾されている可能性も否定できない。

以上、心理ストレスによる摂食抑制に雌雄差があり、その機序にエストロゲンが関与していることが明らかになった。この結果から、神経性食欲不振症がほとんど女性に発症する生物学的機序に、エストロゲンが関与していると考えられる。

## 結論

心理ストレスによる摂食抑制が雄ラットに比べ雌ラットで有意に強く、さらにこの雌ラットにおける抑制は、発情後期、発情休止期に比べ発情前期で最も強かった。心理ストレスによる摂食抑制は両側卵巣摘除により減弱し、エストロゲン補充により回復した。これらの結果はエストロゲンが心理ストレスによる摂食抑制を増強していることを示しており、心理ストレス下にある神経性食欲不振症が圧倒的に女性に発症することの機序にエストロゲンが関与していると推測される。

## 参考文献

1. Hotta M, Shibasaki T, Arai K, Demura H 1999 Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. *Brain Res* 823:221-225
2. Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE 1988 Behavioral effects of corticotrophin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res* 443:63-69
3. Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S 1998 Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol* 36:367-378
4. Bohler Jr HCL, Thomas ZR, King JC, Rubin BS, Weber R, Merriam GR 1990 Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of proestrus in the parvocellular nuclei of the female rat. *Mol Brain Res* 8:259-262
5. Vamvakopoulos NC, Chrousos GP 1993 Evidence of direct estrogenic regulation of human corticotrophin-releasing hormone gene expression. *J Clin Invest* 92:1896-1902
6. Makino S, Shibasaki T, Yamauchi N, Nishioka T, Mimoto T, Wakabayashi I, Gold PW, Hashimoto K 1999 Psychological stress increased corticotrophin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdale but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res* 850:136-143
7. Osterlund M, Kuiper GGM, Gustafsson J-A, Hurd YL 1998 Differential distribution and regulation of



estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  mRNA within the female rat brain. *Mol Brain Res* 54:175-180

### 研究発表

#### 論文発表

1. Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I 2002 Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* 109:1429-1436.
2. Ohata H, Arai K, Shibasaki T 2002 Effect of chronic administration of a CRF1 receptor antagonist, CRA1000, on locomotor activity and endocrine response to stress. *Eur J Pharmacol* 457:201-206.
3. Samarghandian S, Yamauchi N, Ohata H, Shibasaki T 2003 Corticotropin-releasing factor as well as opioid and dopamine are involved in tail pinch-induced food intake of rats. *Neuroscience* 116:519-524.

#### 学会発表

1. Ohata H, Shibasaki T Effects of urocortin II and urocortin III on motor activity in rats. 第84回米国

内分泌学会(San Francisco)

2. 稲田詩乃、小田切あすか、山内直子、芝崎 保 新規 corticotropin-releasing factor (CRF)ファミリーペプチド urocortin III(UCN III)の脳室内投与による Fos 発現について 第75回日本内分泌学会学術総会(大阪)
3. 大島久幸、芝崎 保 Urocortin III と corticotropin-releasing factor の脳室内投与の摂食量および活動量への影響の比較 第75回日本内分泌学会学術総会(大阪)
4. 小田切あすか、周東祐仁、杉原 仁、芝崎 保 Growth hormone secretagogue (GHS)受容体アンチセンス導入トランスジェニックラットにおける GHS-R、NPY、GRF の発現について 第75回日本内分泌学会学術総会(大阪)
5. 芝崎 保、大島久幸、小田切あすか、池谷光江、稲田詩乃、関野あずさ、山内直子 CRF ファミリーペプチドとストレス シンポジウム「ストレスと遺伝子」第18回日本ストレス学会学術総会(東京)
6. 小田切あすか、大島久幸、山内直子、芝崎 保 Urocortin (Ucn II)と Ucn III の作用機構の検討 シンポジウム「CRH、urocortin 及び関連ペプチドの最近の進歩」第29回日本神経内分泌学会(高知)

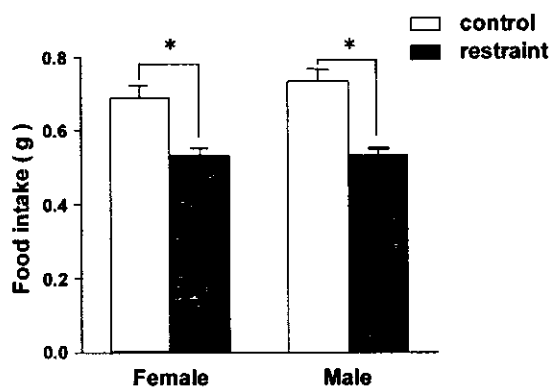


図1 雌雄ラットでの拘束による摂食抑制の比較

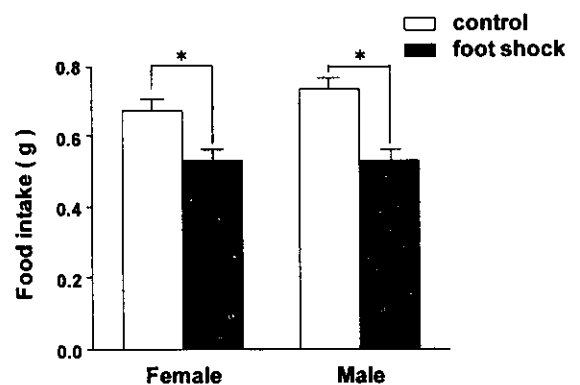


図2 雌雄ラットでのフットショックによる摂食抑制の比較

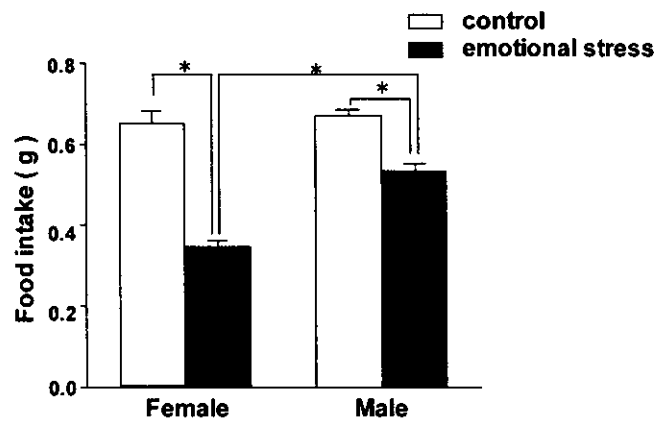


図3 雌雄ラットでの心理ストレスによる摂食抑制の比較

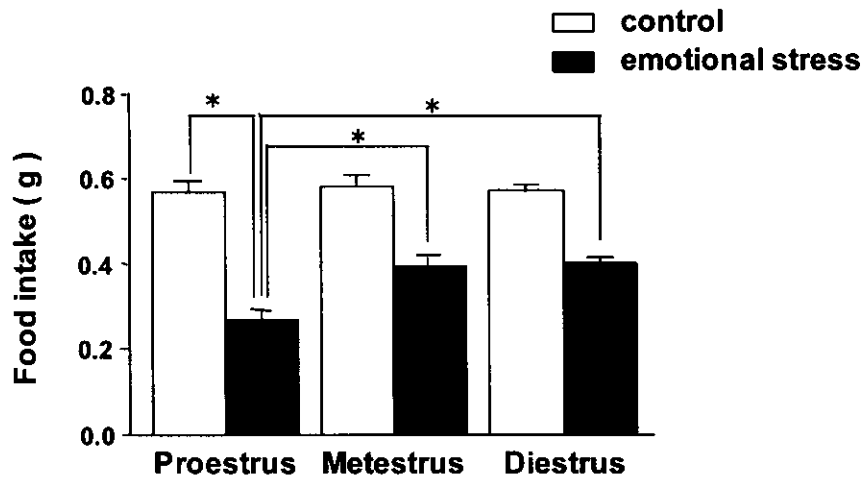


図4 心理ストレスによる摂食抑制への性周期の影響

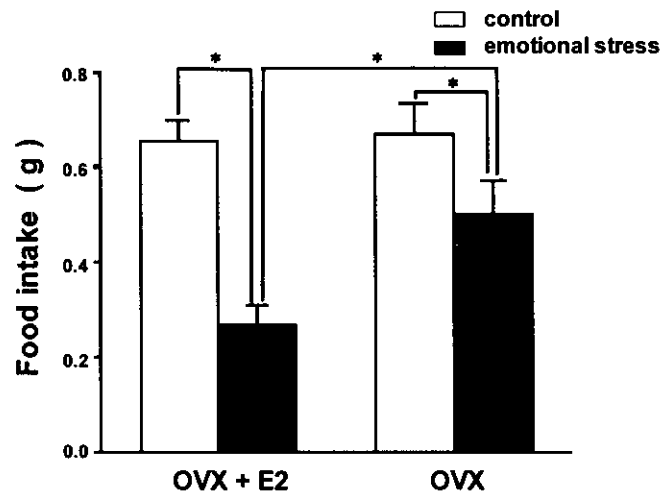


図5 心理ストレスによる摂食抑制への卵巣摘除及びエストロゲン補充の影響

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

メラニン凝集ホルモン(MCH)の薬理的機能解析

分担研究者 久保木 富房 東京大学大学院医学系研究科 ストレス防御・心身医学 教授  
瀧本 禎之 東京大学医学部附属病院 心療内科

**研究要旨** 現在多くの視床下部性のペプチドが内分泌・代謝的に摂食行動に関係していることが知られている。さらには、摂食行動の認知的側面にも関係している可能性が考えられる。視床下部性ペプチドの記憶・学習に対する影響を、ラットへの側脳室投与の系を用いて fear conditioning 法にて測定、検討を行った。その結果、摂食促進系のペプチドにて記憶・学習が阻害する結果が示された。

**研究目的**

メラニン凝集ホルモン(Melanin concentrating hormone: MCH) は、摂食促進作用をもつ視床下部に存在するペプチドである。そのトランスジェニックマウスは obesity を呈し、ノックアウトマウスは lean を呈することから、視床下部性の摂食エネルギー代謝調節において重要な役割を担っていると考えられる。また、MCH はその神経繊維を広範囲に投射しており、また受容体もほぼ投射エリアに一致して存在することから、摂食作用以外の脳高次機能への作用をもつと考えられる。そもそも、摂食行動は、自律神経系や内分泌系はもとより、学習・記憶・認知・情動など様々な要因により引き起こされると考えられる。このことから、MCH の脳高次機能作用がその摂食促進作用へ影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、今回 MCH を側脳室投与したラットを用いて、薬理的行動解析を行いその作用を検討した。

**研究方法**

対象動物: SD ラット雄8週齢(250-350g)を使用した。7週齢時点で側脳室投与の為のカニューレ固定の ope を行い、ope 後は恒温・恒湿で照明時間が午前7時から午後7時までの動物舎にて飼育し、実験前後共に、水および固形飼料は自由に与えた。

ペプチドの投与: あらかじめ予備実験として各ペプチドを側脳室に投与し、摂食量と体重に影響を与える濃度を確認して投与濃度を決定した。その後 conditioning を行う15分前に、予備実験にて確認された量を投与した。

Open field: 周囲が60cmの壁に囲まれた、16分割された円形の床の装置を使用した。観察時間は5分間。線を越

える移動を ambulation としてカウントし、その他に rearing と中心円から移動するまでの時間(latency)も合わせて測定した。

Flinch-Vocal test: 床グリッドから電撃を1秒間与え、それに対する反応、Flinch, Vocalization, Jump が出現する閾値を検討した。

Fear conditioning: context 刺激による fear conditioning についてはペプチドを側脳室内投与後、ラットをホームケージから高さ27cm、幅30cm、奥行き25cmのショック箱に移し、2分間の探索時間後、2秒間の0.5mAの電撃を60秒間隔で5回負荷した。その後ラットをホームケージに戻した。24時間後に同じショック箱に再び戻し、電撃ストレスを加えず静置し、freezing behavior の観察を行った。tone 刺激による fear conditioning については、ペプチドを側脳室投与後、ラットをホームケージから同様のショック箱に移し、2分間の探索時間後、30秒間の音の条件提示後に2秒間の0.5mA電撃負荷を与えることを、60秒間隔で5回繰り返した。その後ラットをホームケージに戻した。24時間後に全く条件の異なる観察箱にいれ、電撃ストレスを加えずに tone による条件提示のみを行い、freezing behavior の観察を行った。freezing behavior の観察については、呼吸に関するものを除いて観察しうる骨格筋とひげの動きがないことを freezing とした。観察時間を1分間隔にわけ、freezing behavior がみられた時間が占める割合を計算して比較した。

上記の実験過程において、電撃によるショックは実験系として成立する最小限のショックを使用し、また非常に短時間であるため実験対象動物の苦痛は小さいと考えられた。カニューレ固定のための ope 時には麻酔を使用す

るなど、飼育状態などで対象動物の苦痛が最小限になるよう最大限に配慮を行った。

### 研究結果

Open field: MCH6nmol を投与したラットでは、ambulation が control と比べて著しく低下していた。また、著しい latency の延長が見られた。

Flinch-Vocal test: MCH6nmol を投与した場合も、統制群との有意差は認めなかった。(Fig. 1)

Fear conditioning: MCH 6nmol 投与によって context 刺激に対する freezing 反応が統制群と比較して有意に低下した。Tone 刺激に対する freezing 反応は統制群と比較して大きな変化を認めなかった。(Fig. 2, 3)

### 考察

今回は特に視床下部外側野に存在する MCH を投与した際、自発運動や記憶・学習など脳高次機能への影響が見られる結果となった。MCH を投与することにより ambulation が低下し latency が延長したことから、強い運動抑制作用と、不安誘発作用を有すると考えられた。過去、MCH は open field での自発運動亢進作用、plus-maze での抗不安作用が指摘されているが、今回は逆の結果を得ることとなった。Sensitivity をみる flinch-vocal test では特に変化はみとめず、強い sedation 効果や NPY などのペプチドでみられる痛覚刺激閾値の低下作用は認めなかった。このことから、fear conditioning は成立していると考えられたが、context に対する freezing 反応が低下していたことから海馬由来の記憶を傷害する作用が考えられた。MCH を含むニューロンは、海馬や扁桃体などの辺縁系や大脳皮質に投射していることが解剖学的に指摘されていることと、その受容体が海馬や扁桃体に高密度に存在していることから、特にその認知機能に対する影響をもっとも考えられているペプチドでひとつで

ある。今回の結果はこれらのことを支持するものとなった。

### 結論

今回摂食促進系ペプチド、特に視床下部外側野に存在する MCH において記憶・学習障害が引き起こされる可能性が示唆された。このことは過食状態における心理状態との関連も考えられ、ヒトにおける中枢性摂食異常症のメカニズム解明の一助となるかもしれない。

### 参考文献

1. Phillips, R.G., LeDoux, J.E.: *Behav. Neuroscience*, 106, 274-285, 1992
2. Zola-Morgan, S.M., Squire, L.R.: *Science*, 250, 288-290, 1990
3. Kim, J.J., Fanselow, M.S.: *Science*, 256, 675-677
4. Abel, T et al.: *Cell*, 88, 615, 1997
5. Rotenberg, A., T. Abel, Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Muller, R.U.: *J. Neurosci*, 20, 8096, 2000
6. Kawano, H., Honma, T., Honma, A. et al.: *Anatom Sci Int*, 77, 149-160, 2002
7. Casatti, C.A., Elias, C.F., Sita, L.V. et al.: *Neuroscience*, 115, 899-915, 2002
8. Monzon, M.E., Souza, M.M., Izquierdo, L.A. et al.: *Peptides*, 20, 1517-1519, 1999
9. Monzon, M.E., Barioglio, S.R.: *Physiol Behavior*, 67, 813-817, 1999

### 研究発表

#### 論文発表

1. Miyasaka, N., Yoshiuchi, K., Yamanaka, G., Sasaki, T., Kumano, H. and Kuboki, T. Relations among premorbid weight, referral weight, and psychological test scores for patients with anorexia nervosa. *Psychological Report*, 2003, 92, 67-74.