

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

## 中枢性摂食異常症に関する調査研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 芝 崎 保

平成 16 (2004) 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.   | 視床下部オレキシン産生神経の入力系に関する研究                      | 7  |
|      | 筑波大学基礎医学系 薬理学 桜井 武                           |    |
| 2.   | 視床下部グレリン受容体の機能:同受容体発現抑制トランスジュニクテラットを用いた検討    | 9  |
|      | 日本医科大学 生理学第二 芝崎 保                            |    |
| 3.   | 肥満発症におけるアンジオテンシン受容体の病態生理的意義に関する研究            | 14 |
|      | 東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子代謝医学分野 小川 佳宏               |    |
| 4.   | 中枢神経系におけるレプチン、インスリン、脂肪酸シグナルのクロストーク機構         | 17 |
|      | 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学 中尾 一和                 |    |
| 5.   | 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                  | 20 |
|      | 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                |    |
| 6.   | 視床下部神経ヒスタミンとオレキシンの機能連関                       | 23 |
|      | 大分大学医学部 生体分子構造機能制御講座・第一内科 吉松 博信              |    |
| 7.   | 摂食障害患者における late potential の検討                | 30 |
|      | 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             |    |
| 8.   | 神経性食欲不振症患者における低身長と骨粗鬆症の予防と治療                 | 32 |
|      | 政策研究大学院大学 保健管理センター 鈴木(堀田) 眞理                 |    |
| 9.   | 中学生、高校生を対象とした身体像と食行動および摂食障害の実態調査:過去 20 年間の比較 | 35 |
|      | 京都大学医学部 保健学科 中井 義勝                           |    |
| 10.  | 中枢性摂食異常症の生物学的病因因子に基づいた治療法の開発                 | 41 |
|      | 国立循環器病センター研究所 生化学部 寒川 賢治                     |    |
| 11.  | 神経性食欲不振症患者における月経の再開に関する因子                    | 44 |
|      | 九州大学大学院医学研究院 心身医学 久保 千春                      |    |
| 12.  | 負荷試験における摂食障害患者の血漿グレリン値の検討                    | 50 |
|      | 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 社会・行動医学 心身医療科 野添 新一         |    |
| III. | 研究成果の刊行に関する一覧表                               | 55 |



中枢性摂食異常症に関する調査研究

平成 15 年度

## I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
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 | 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           |
|       | 小川 佳宏  | 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野 教授     |
|       | 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       |
|       | 中井 義勝  | 京都大学医学部保健学科 教授                 |
|       | 寒川 賢治  | 国立循環器病センター研究所生化学部 部長           |
|       | 久保 千春  | 九州大学大学院医学研究院心身医学 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      |
|       | 吉松 博信  | 大分大学医学部生体分子構造機能制御講座・第一内科 教授    |
|       | 野添 新一  | 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科社会行動医学心身医療科 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、本症の有効な治療および予防法を開発することである。この目的のため、分子生物学的、発生工学的基礎研究による中枢性摂食・エネルギー調節機構と本症の病因、病態の本質の解明を試み、さらに本症患者の病像の20年間の変遷に関する実態調査を行った。基礎研究では、視床下部でのグレリン受容体とⅠ型アンジオテンシン受容体のエネルギー蓄積機能、ニューロメジン U のエネルギー消費促進作用、視床下部における摂食調節因子のシグナル伝達系での相互作用、オレキシンニューロンへの入力ニューロン系、ヒスタミンニューロンのオレキシン作用への関与等を明らかにした。臨床研究では、神経性食欲不振症の若年発症例では BMI が 16.4 kg/m<sup>2</sup> 以下の罹病期間が長いと最終身長が有意に低値に留まること、合併症の骨粗鬆症の改善には BMI を 16.4 kg/m<sup>2</sup> 以上に維持することの重要性を明らかにした。また、神経性食欲不振症の既往が催不整脈性に関連している可能性、本症患者の無月経の改善にレプチンが関与している可能性、慢性的食行動異常がグレリン分泌に影響を与えている可能性、女子中・高生で中枢性摂食異常症患者が著増していること等が明らかになった。グレリンを健常人に投与し、空腹感スコアの上昇傾向と安全性が確認でき、グレリンの神経性食欲不振症の治療薬としての開発の準備が進んだ。

**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おり、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、このために分子生物学的、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

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

遺伝子改変動物等を用いてグレリン、アンジオテンシン II、ニューロメジン U、レプチン、オレキシン、ヒスタミンの摂

食・エネルギー調節機構での役割の解明を行った。

破傷風毒素のC末端部分とGFPの融合蛋白質がオレキシン神経特異的に発現し、融合蛋白質が逆行性にオレキシン神経の入力系神経細胞に取り込まれるトランスジェニックマウスを解析し、オレキシン神経が前脳基底部のコリン作動性神経、視索前野の GABA 作動性神経、脳幹のセロトニン作動性神経、孤束核のアドレナリン作動性神経等からの入力を受けていることを明らかにした。オレキシン神経は覚醒時には前脳基底部のコリン作動性神経により活性化され、睡眠時には視索前野の GABA 作動性神経により抑制されると推測される(桜井)。

Tyrosine hydroxylase のプロモーターを用いてグレリン受容体遺伝子のアンチセンスを発現するトランスジェニッククラットを作成した。同ラットでは視床下部弓状核でのグレリン受容体発現が抑制されており、その表現型を解析して、弓状核のグレリン受容体が、成長ホルモンの分泌に関与するのみならず、エネルギー蓄積機能、体脂肪蓄積機能を有することを明らかにした。したがってグレリンが神経性食欲不振症の治療薬になりうる可能性が示された(芝崎)。

アンジオテンシン II のエネルギー代謝調節作用の分子機構を明らかにするために、1型アンジオテンシン受容体欠損マウス(AT1a-KO)を作成した。AT1a KO マウスと野生型 C57BL/6 マウスに 8 週間の高脂肪食を負荷し肥満の誘導を試みた。AT1a-KO マウスは高脂肪食負荷時に対照マウスと比較し摂食量に差はなかったが、体重と脂肪組織重量の増加の抑制が認められた。以上より、レニン・アンジオテンシン系によるエネルギー代謝調節の少なくとも一部に AT1a がエネルギーを蓄積するように機能していることが明らかになった(小川)。

普通食あるいは高脂肪食負荷マウスにレプチン、インスリン、脂肪酸を腹腔内あるいは脳室内投与し、視床下部における STAT3、PKB/Akt および PI3 キナーゼの活性化を検討し、それらの機能的連関について解析した。高脂肪食誘導性の肥満病態には中枢へのレプチン移行障害とレプチン下流シグナルとしての視床下部 PKB/Akt シグナル活性化障害が関与することが示唆された。また、長鎖不飽和脂肪酸の中枢投与が摂食を強力に抑制し、視床下部におけるレプチンシグナルに対する増強効果を持つことが明らかとなり、中枢性摂食異常症の病態における意義が示唆された(中尾)。

ニューロメジン U (NMU)は摂食抑制作用およびストレス反応を調節する神経ペプチドである。NMU の生理機能を探るために、NMU ノックアウト・マウス(NMU-KO)を作製し、

その表現型を解析した。NMU-KO は生後1ヶ月位から過食、摂食リズム異常、自発活動量低下、エネルギー代謝低下、体重増加が明らかになり、脂肪組織増大と脂肪肝を呈した。以上より、NMU がエネルギー消費促進作用を有することが明らかになった。さらに NMU はレプチンとは異なる経路を介して摂食を抑制することを明らかにした(児島)。

神経性食欲不振症の病態へのエネルギー欠乏による神経ヒスタミンの活性化の関与が示唆されるため、視床下部外側野のオレキシン神経系と神経ヒスタミンの機能連関について解析した。視床下部神経ヒスタミンは、オレキシン2型受容体を介して主にオレキシンBによって活性化され、オレキシンBによる褐色脂肪組織交感神経活動促進作用の介在物質として機能していること、オレキシン神経変性マウスでは、絶食負荷による神経ヒスタミンの代謝回転増加反応が有意に減弱されることが明らかになった。以上より、エネルギー欠乏によるオレキシン神経とヒスタミン系神経ネットワークの駆動が神経性食欲不振症の病態に関与している可能性が示唆された(吉松)。

## 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

神経性食欲不振症の重大な合併症である成長障害、骨粗鬆症の病態、催不整脈性の背景、無月経の病態、摂食行動のグレリン分泌への影響、女子中高生を対象とした過去 20 年間の摂食障害の変遷の実態等の解明とグレリンによる治療開発の準備を目指した。

摂食障害患者の突然死の原因として不整脈が考えられており、心電図の late potential を評価することにより摂食障害患者の催不整脈性を評価した。神経性大食症患者では健常者と比較して、LAS40 が有意に増加しており、late potential 陽性の割合が有意に多かった。同患者のなかでも神経性食欲不振症歴のあるもので late potential 陽性が有意に多くみられた。この結果から、治療過程において神経性食欲不振症の低体重から回復したとしても、経過観察を慎重に行う必要性が考えられた(久保木)。

神経性食欲不振症の発症年齢が低年齢化し、罹病期間の遷延化に伴い低身長や骨粗鬆症が後遺症として患者の QOL に影響を及ぼしている。そこで予防と治療法を確立する目的で、14 歳未満で発病し 18 歳までに治癒した 22 名の患者について最終身長、病歴、低身長の危険因子を検討した。低身長群は BMI<16kg/m<sup>2</sup> の低体重期間が有意に長かった。低身長の予防は血清 IGF-1 の低下

をきたす BMI $16 \text{ kg/m}^2$  の低体重期間を短縮することである。本症における骨代謝異常は BMI $16 \text{ kg/m}^2$  で認められる骨形成の低下と骨吸収の亢進からなり、骨粗鬆症の危険因子は BMI $16 \text{ kg/m}^2$  の低体重期間であるため、BMI を  $16 \text{ kg/m}^2$  以上にすることで骨粗鬆症の合併、悪化を阻止できることが明らかになった(鈴木)。

京都府下の中学生と高校生を対象に、1982、1992、2002 年の 3 回にわたって BMI、体重や体型に関する自己意識、食行動の実態を調査した結果から摂食障害の実態を推定した。2002 年に女子中学生で神経性食欲不振症 (AN) は 0.5%、神経性大食症 (BN) は 0.3%、特定不能の摂食障害 (EDNOS) は 17.1%、女子高校生で AN は 0.2%、BN は 2.2%、EDNOS は 9.1%。やせ過ぎ ( $18.5 \text{ kg/m}^2$  以下の BMI) の人のやせ願望は、1982 年は女子中学生、女子高校生、各々 12.9% と 13.4% であったが、2002 年には各々 51.0%、52.9% に著増していた。2002 年はむちゃ食いとやせ薬の使用が著増していた。現在、女子中・高・大学生の  $1/3 \sim 1/2$  に食行動の異常が見られ、やせ志向とやせすぎの頻度および摂食障害の推定頻度はこの 20 年間で著増していた(中井)。

グレリンは GH 分泌促進作用、食欲促進作用、正のエネルギー代謝作用を有している。そこで神経性食欲不振患者に対する治療薬としてグレリンの臨床応用を図ることにした。臨床第 I 相試験として、18 人の健常人ボランティアに対してヒトグレリン ( $1, 5 \mu\text{g/kg}$ )、プラセボを投与するランダム化二重盲検試験を施行した。グレリン  $1$  ないし  $5 \mu\text{g/kg}$  の投与によって、血清 GH はそれぞれ  $124, 153 \text{ ng/ml}$  ( $30, 45$  分)まで増加した。また、グレリンの投与により用量依存的な空腹度スコア上昇傾向が観察された。少数例において軽度のほてり感、軽度の腹部症状、発汗を自覚したのみで、その他に特記すべきものは認められな

かった。これによって、神経性食欲不振症を対象とした臨床第 II 相試験への準備が整った(寒川)。

神経性食欲不振症 (AN) 患者における月経の再開に関与する因子について解析した。月経再開群の月経再開時血中レプチンと TSH は、無月経群に比べて各々有意に高値および低値、無月経群の入院時コルチゾールは月経再開群より高値であり、月経再開に最も有意に関連する因子は月経再開時のレプチンであった。月経の再開にレプチンの増加が重要な因子であると考えられ、AN 患者でのレプチンの代謝や分泌機序の詳細が明らかになれば、無月経の遷延を防ぐことが可能になると期待される(久保)。

神経性食欲不振症患者 (AN) において、グレリンの摂食直後の反応ならびにサブタイプ別の違いの有無を検討した。糖負荷テストでのグレリン値は、AN-制限 (R) 群でゆるやかに減少し続け、AN-無茶食い排出型 (BP) 群では 120 分値が、健常群では 60 分が最低値であった。食事負荷テストでのグレリン値は、AN-R 群で糖負荷とはほぼ同様なパターンを呈し、AN-BP 群と健常群では 120 分後に最低値を示し、AN のサブタイプで相違が認められた。慢性的食行動異常がグレリン分泌に影響を与えていると考えられた(野添)。

以上、本年度の研究により、中枢性摂食・エネルギー調節機構におけるグレリン、アンジオテンシン II、ニューロメジン U、レプチン、オレキシン、ヒスタミンの役割の詳細、さらに神経性食欲不振症の病態や、合併症である成長障害、骨粗鬆症の危険因子、グレリンの健常人投与での効果、女子中・高生における中枢性摂食異常症の増加が明らかになった。

平成 15 年度

## Ⅱ. 分担研究報告書



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

視床下部オレキシン産生神経の入力系に関する研究

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** 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として、その相互関係を明らかにするべく研究を行ってきた。本研究では、オレキシン産生神経の活動を制御する機構を解明するために、神経性の入力系を明らかにした。

**研究目的**

視床下部のオレキシン産生神経への神経性入力を明らかにする。このことにより、オレキシン神経の活性を制御する機構を明らかにし、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**

ヒトオレキシンプロモーターを用いて、破傷風毒素のC末端部分とGFPの融合蛋白質をオレキシン神経特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスの脳では、融合蛋白質が逆行性にオレキシン神経の入力系の神経細胞に取り込まれ、オレキシン神経の入力系が明らかになった。また、オレキシン神経にGFPを発現するマウスをもちいて、視床下部のスライス標本を用い、神経伝達物質がオレキシン神経の活動に与える影響を調べた。

**研究結果**

作製したトランスジェニックマウスにおいて、トランスジェンはオレキシン神経特異的に発現していた。GFPの免疫染色により逆行性のトレースを行った結果、オレキシン神経は前脳基底部のコリン作動性神経、視索前野のGABA作動性神経、脳幹のセロトニン作動性神経によってイナベーションされていることが明らかになった。また孤束核のアドレナリン作動性神経からの入力も確認された。

**考察**

これらのことから、オレキシン神経は、覚醒時には前脳基底部のコリン作動性神経によって活性化され、睡眠時には視索前野のGABA作動性神経による抑制を受けていることが推測された(図)。

**研究発表**

**論文発表**

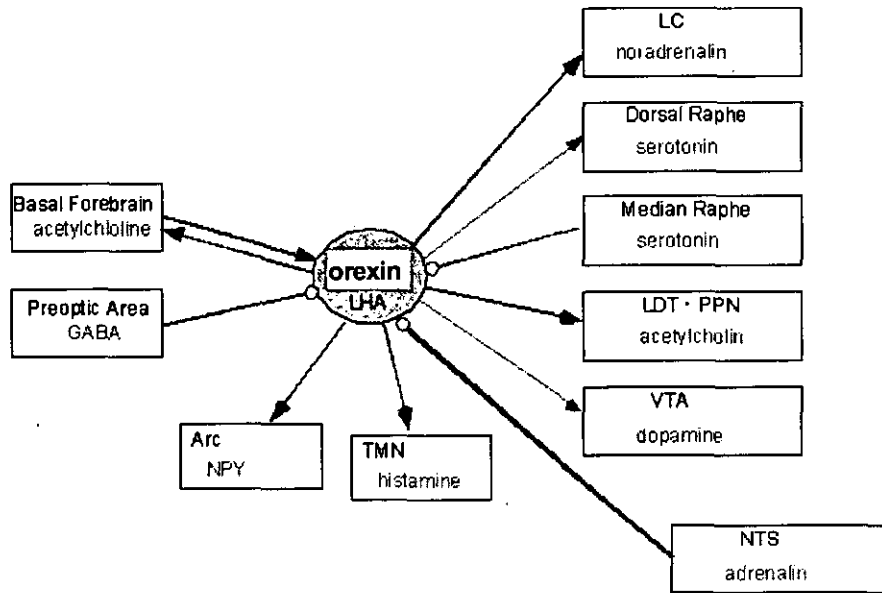
1. Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T. Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Mar 28;303(1):120-9
2. Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP. Induced, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003 Apr;144(4):1506-12
3. Tanaka H, Yoshida T, Miyamoto N, Motoike T, Kurosu H, Shibata K, Yamanaka A, Williams SC, Richardson JA, Tsujino N, Garry MG, Lerner MR, King DS, O'Dowd BF, Sakurai T, Yanagisawa M. Characterization of a family of endogenous neuropeptide ligands for the G protein-coupled receptors GPR7 and GPR8. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):6251-6. Epub 2003 Apr 28.
4. Zyu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, and Goto K. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J. Pharmacol. Sci.* 2003 April 92:259-266
5. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, and Sakurai T. Hypothalamic Orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*. 2003 Jun 38:701-713

学会発表

1. Sakurai, T. Regulation of orexin neurons by energy balance 最新の睡眠研究:国際シンポジウム 大阪バイオサイエンス研究所 2003年3月20-21日
2. 桜井 武:摂食と睡眠・覚醒の制御におけるオレキシンの役割国立遺伝学研究所の研究集会「新時代のペプチドバイオロジー」2003年3月19日
3. 桜井 武:エネルギー恒常性の維持におけるオレキシン産生神経の役割 第76回日本薬理学会年会 シンポジウム40 摂食関連ペプチドの生理
4. 桜井 武:エネルギーバランスに応じた適応行動の制御におけるオレキシン神経系の役割 3月28日 日本薬学会(長崎)シンポジウム28
5. 桜井 武:エネルギー代謝の調節におけるオレキシン神経の役割 第26回 日本医学会総会 シンポジウム

柱04-11-S11肥満症の病因・病態と治療H15年4月4日 第26回日本医学会総会 福岡シーホークリゾート

6. 桜井 武、山中章弘、原 淳子、後藤勝年:エネルギー代謝の調節におけるオレキシン神経の役割 第76回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム2 オープンレセプターとリガンド研究 平成15年5月9日~5月11日 パシフィコ横浜
7. T.Sakurai Hypothalamic Orexin Neurons Regulate Arousal According to Energy BalanceS16-2第26回日本神経科学学会総会 平成15年7月23-25日、名古屋
8. T.Sakurai The 6th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides (Plenary lecture)箱根プリンスホテル H16/9/4



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

視床下部グレリン受容体の機能：  
同受容体発現抑制トランスジェニックラットを用いた検討

主任研究者 芝崎 保 日本医科大学生理学第二 教授  
真野 あすか 日本医科大学生理学第二  
根本 崇 宏 日本医科大学生理学第二  
関野 あずさ 日本医科大学生理学第二

**研究要旨** グレリンは成長ホルモン分泌促進、摂食促進作用、エネルギー蓄積作用を有することが知られているが、内因性グレリンの作用機構の詳細は不明である。本研究では視床下部でのグレリンの作用を明らかにするために、視床下部グレリン受容体発現抑制トランスジェニック(Tg)ラットを作製し、エネルギー調節機構の変化について解析した。8週齢の Tg ラットと対照(WT)ラットに普通食または高脂肪食を 14 日間与え、毎日の摂食量と体重変化、血漿レプチン濃度、褐色脂肪組織(BAT)と白色脂肪組織(WAT)の重量、褐色脂肪細胞の大きさ、UCP1 遺伝子発現量を定量した。体重、総摂取カロリーは Tg、WT ラットともに高脂肪摂取群で多く、WAT 重量、血漿レプチン濃度は高脂肪食摂取 WT ラットで高値を示した。BAT 重量は高脂肪食摂取の Tg ラットで最も多かった。褐色脂肪細胞は、高脂肪食摂取 WT ラットにおいて有意に大きかったが、高脂肪食摂取 Tg ラットでは有意な増大は認められず、脂肪蓄積が Tg ラットでは抑制されたと推測された。Ucp1 mRNA 発現量は高脂肪食摂取の Tg ラットにおいて高値を示したことから、高脂肪食摂取 Tg ラットでは BAT での熱産生が増大していると考えられた。視床下部グレリン受容体の発現量が低下している Tg ラットはエネルギー消費の促進により痩せを呈している可能性が示唆されたことから、内因性グレリンはエネルギー蓄積機序に促進的に関与していると考えられ、グレリンの神経性食欲不振症の治療薬としての応用の可能性が示唆された。

**研究目的**

グレリン投与は強力な成長ホルモン (GH) 分泌促進作用や摂食促進作用以外に(1,2)、エネルギー蓄積作用を示すことが知られている(3)。しかしながら内因性グレリンの作用機構の詳細は未だ明らかではない。我々は視床下部におけるグレリン受容体(GHS-R)の生理的役割を明らかにするために、GHS-R 発現抑制トランスジェニック (Tg)ラット(4)を作成し、この Tg ラットでは弓状核の GHS-R の発現が選択的に抑制され、GH 分泌抑制、体脂肪の減少、痩せを呈していることを報告している。本研究では、この Tg ラットのエネルギー代謝調節機構の変化を解析し、グレリン/GHS-R の神経性食欲不振症(anorexia nervosa;AN)における病態への関与についての考察を加えた。

**研究方法**

8週齢のGHS-R発現抑制Tgラットと対照(WT)ラットに普通食(脂肪量 12%、4.3 kcal/g)ないし高脂肪食(脂肪

量 45%、6.0 kcal/g)を14日間与え、24時間摂食量、体重を測定した。血漿レプチン濃度をELISA法にて測定し、褐色脂肪組織 (BAT)、皮下、大網、後腹膜、副睾丸周囲の白色脂肪組織 (WAT)を採取し、重量を測定した。採取したBATの厚さ8 $\mu$ mの凍結切片を作製し、マイヤーのヘマトキシリン溶液にて核染色を行い、単位面積(0.13mm<sup>2</sup>)当たりの細胞数を定量した。BATのUncoupling protein (Ucp)1 mRNAおよびタンパク質発現量をノーザンブロット法およびウェスタンブロット法によりそれぞれ定量した。

以上の実験計画は本学動物実験倫理委員会で審議され、承認されている。

**研究結果**

体重増加と摂取カロリー

14日間の総摂取カロリーはWT、Tgラット共に高脂肪摂取群において高値であった(表1)。WT、Tgラット共に高脂肪摂取により体重は有意に増加し、14日間を通して高脂肪摂取WTラットの体重が最も多かった(図1)。

### 脂肪組織重量と血漿レプチン濃度

WAT重量は他の3群と比較して高脂肪摂取WT群で有意に多く、BAT重量は高脂肪摂取Tg群で著明に多かった(図2)。血漿レプチン濃度は高脂肪摂取WT群が他の群に比べ著明に高く、WAT重量を反映した結果であると考えられた(表1)。

### BATの組織像

単位面積あたりの細胞数は高脂肪摂取のWTラットにおいて有意に減少した。この変化は、高脂肪摂取WTラットにおいては細胞内の脂肪滴が増大したことにより個々の細胞が大きくなったため、単位面積あたりの細胞数が減少したと考えられた。Tgラットでは高脂肪負荷による有意な変化は認められなかった(図3)。

### UCPI遺伝子の発現量

Ucp1mRNA発現量は脂肪摂取の多少にかかわらずWTラットと比較しTgラットにおいて高値を示した。Ucp1タンパク質の発現量は高脂肪摂取Tgラットにおいて有意に高値を示した(図4)。

### 考察

本研究に用いたTgラットはWTラットに比較し視床下部弓状核のGHS-Rが有意に減少し、低体重や低体長を呈することが明らかになっている。グレリンの投与は脂肪蓄積を促進することから(5)、Tgラットに認められたWATの増加の抑制は視床下部における内因性グレリンの作用が抑制された結果によると考えられ、視床下部弓状核GHS-Rが脂肪蓄積機序に関与していることを示唆するものと推測される。

UCPI遺伝子の発現量が高脂肪摂取Tgラットにおいて高値であった。グレリンの投与によりBATへ投射している交感神経の活動が抑制されることが報告されていることから(6)、Tgラットではグレリンの交感神経抑制作用が減弱し、BATにおけるUCPI遺伝子の発現量が増していると考えられる。UCPI遺伝子の発現量が高値であったことは、BATでの熱産生が増大していることを示しており、この変化にも視床下部弓状核のGHS-Rが関与していると推測される。

AN患者の血中グレリン濃度は健常者と比較し有意に高く、BMIと負の相関を示すことが報告されている(7,8,9,10)。AN患者と同程度のBMIの健常者を比較すると、AN患者の血中グレリン濃度は有意に上昇しており(10)、低体重が血中グレリンの上昇の原因ではないことが示唆されてい

る。他方、ANでは胃粘膜の萎縮、腎機能の低下等のため血中の代謝型グレリンは増加しているが完全型グレリンは減少しているという報告もあり(11)、測定に用いる抗体の特異性等を考慮し、慎重に解析する必要があると考えられる。

グレリンを海馬、縫線核、扁桃体に投与すると不安行動が減り、さらに海馬、縫線核への投与では摂食促進作用が認められていることから(12)、心理的ストレス下にあるANの病態に視床下部、辺縁系でのGHS-Rの機能障害が関与している可能性も考えられる。

本研究結果より、視床下部GHS-Rがエネルギー消費抑制機序に関与していることが明らかになり、ANの治療にグレリンが有効である可能性が示唆された。

### 結論

視床下部グレリン受容体発現を抑制したTgラットでは、褐色脂肪組織でのUCPI遺伝子発現を増し、エネルギー消費を促進することにより脂肪蓄積を抑制している可能性が考えられた。以上の結果からエネルギー蓄積作用を有するグレリンはANの病態を改善するための有効な治療薬として利用される可能性が考えられた。

### 参考文献

1. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K. 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660.
2. Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H. and Kangawa, K. 2001 A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409:194-198.
3. Tshöp, M., Smiley, L. D. and Heiman, M.L. 2000 Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407:908-913.
4. Shuto, Y., Shibasaki, T., Otagiri, A., Kuriyama, H., Ohata, H., Tamura, H., Kamegai, J., Sugihara, H., Oikawa, S. and Wakabayashi, I. 2002 Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J. Clin. Invest.* 109:1429-1436.
5. Lee, H., Wang, G., Englander, E.W., Kojima, M. and Greeley G.H. 2002 Ghrelin a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology*

143:185-190.

6. Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T. and Yoshimatsu, H. 2003 Centrally Administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neurosci. Lett.* 349:75-78.
7. Tanaka, M., Naruo, T., Tasuhara, D., Tatebe, Y., Nagai, N., Shiiya, T., Nakazato, M., Matsukura, S. and Nozoe, S. 2003 Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinol.* 28:829-835.
8. Leandro, S.G., Vicente, B., Angel, C.B. and Jesús A. 2004 Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J. Pediatr.* 144:36-42.
9. Akai, Y., Hosoda, H., Nin, K., Ooya, C., Hayashi, H., Akamizu, T. and Kangawa, K. 2003 Plasma levels of active form of ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur. J. Endocrinol.* 149:R1-R3.
10. Tolle, V., Kadem, M., Bluett-Pajot, M.T., Frere, D., Foulon, C., Lang, F., Eprlbaum, J. and Estour, B. 2003 Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:109-116.
11. 鈴木(堀田)眞理 2003 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 p36-37 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
12. Carlini, P.V., Varas, M.M., Cragnolini, B.A., Schiöth, B.H., Scimonelli, N.T. and Barioglio, R. S. 2004 Differential role of hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313:635-641.

#### 健康危険情報

特記すべきものなし。

#### 研究発表

##### 論文発表

1. Ohata, H., Shibasaki, T. The CRF peptide family in appetite regulation and energy balance. 2003 *Curr. Med. Chem.* 3:243-255.
2. Arai, K., Soga, T., Ohata, H., Otagiri, A., Shibasaki, T. Effects of food restriction on peroxisome proliferators activated receptor- $\gamma$  and glucocorticoid receptor signaling in adipose tissues of normal rats. 2004 *Metabolism* 53:28-36.
3. Kuriyama, H., Shibasaki, T. Sexual differentiation of the effects of emotional stress on food intake in rats. 2004 *Neuroscience* 124(2):459-465.

##### 学会発表

1. 大島久幸、芝崎 保 Corticotropin-releasing factor の脳室内投与による摂食抑制に及ぼす CRA1000 と antisauvagine-30 の効果 第76回日本内分泌学会学術総会 (横浜)
2. 関野あずさ、大島久幸、小田切あすか、芝崎 保 拘束ストレスによる摂食抑制に CRF (corticotropin-releasing factor)1 型受容体及び2型受容体拮抗薬が及ぼす影響 第76回日本内分泌学会学術総会 (横浜)
3. 小田切あすか、関野あずさ、大阪寿雅、根本崇宏、稲田詩乃、杉原 仁、及川眞一、芝崎 保 GHS 受容体(GHS-R)発現抑制トランスジェニックラットにおけるエネルギー代謝について 第30回日本神経内分泌学会(横浜)

知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む。)  
なし

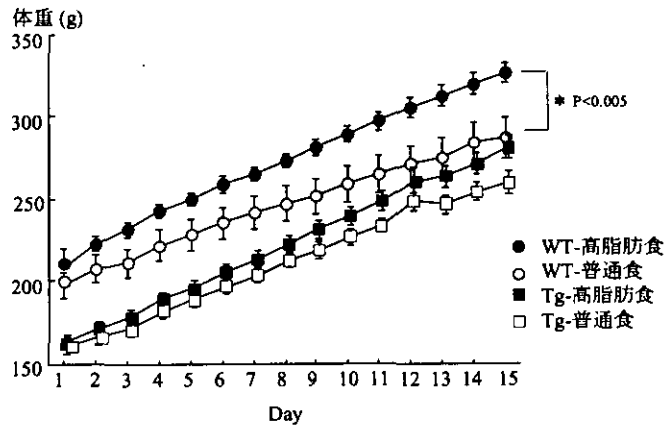


図1 高脂肪食摂取による体重増加曲線

表1 14日間総摂取カロリー、血漿レプチン濃度

|         | 総摂取カロリー (kcal)               | 血漿レプチン濃度 (pg/ml)               |
|---------|------------------------------|--------------------------------|
| WT-普通食  | 1223.46 ± 55.93              | 787.91 ± 152.99                |
| WT-高脂肪食 | 1395.90 ± 46.93 <sup>a</sup> | 2391.33 ± 249.07 <sup>a</sup>  |
| Tg-普通食  | 1032.65 ± 27.09 <sup>b</sup> | 196.96 ± 43.21 <sup>a,b</sup>  |
| Tg-高脂肪食 | 1287.17 ± 58.55 <sup>a</sup> | 816.00 ± 143.03 <sup>a,b</sup> |

a ; それぞれの普通食群と比較して  
b ; 同じ食事のTg群と比較して  
a, bともにp<0.05を示す。

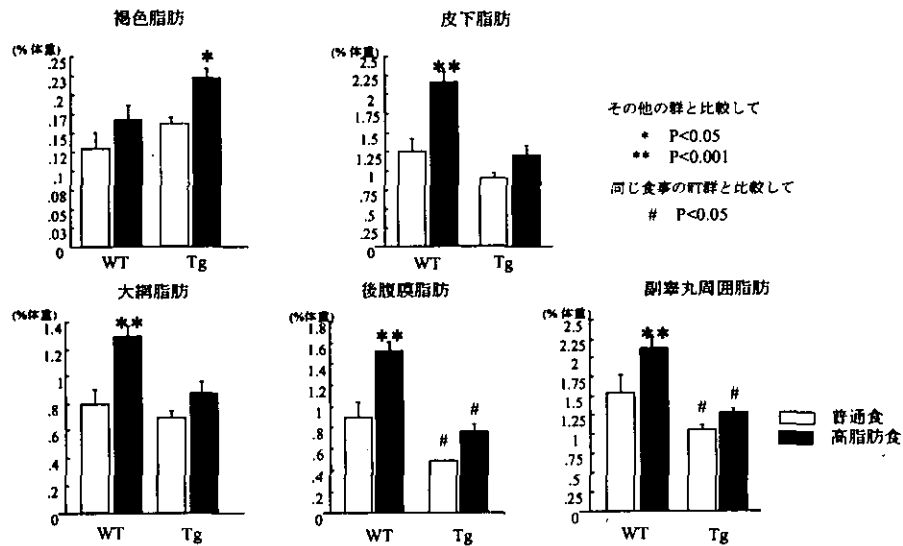


図2 高脂肪食摂取による脂肪組織重量

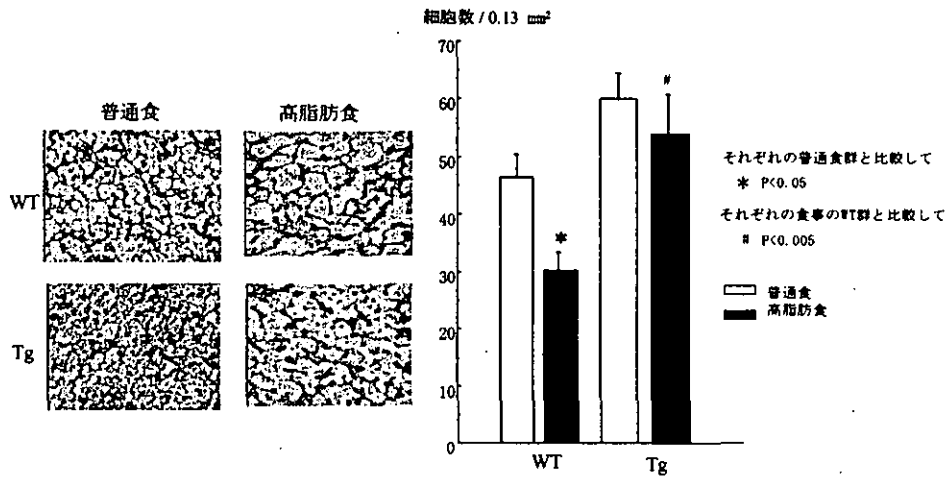


図3 単位面積あたりの褐色脂肪細胞数

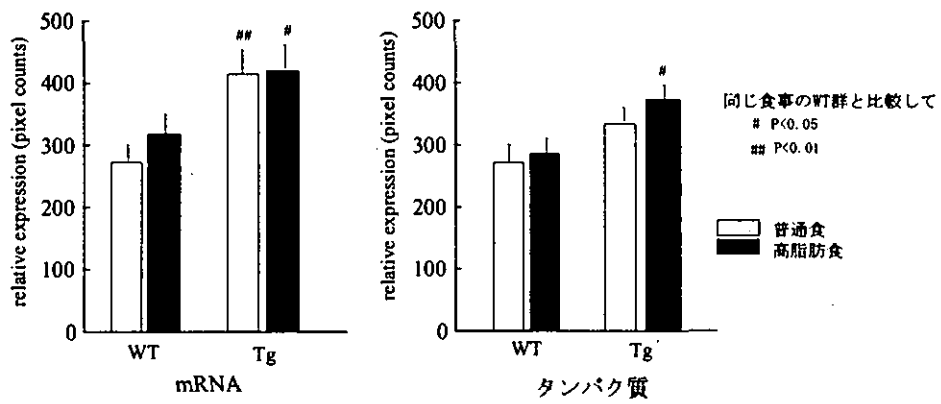


図4 褐色脂肪組織におけるUCP1発現量

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

肥満発症におけるアンジオテンシン受容体の  
病態生理的意義に関する研究

分担研究者 小川 佳宏 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野 教授  
菅波 孝祥 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子代謝医学分野

**研究要旨** アンジオテンシンIIのエネルギー代謝調節作用の分子機構を明らかにするために、1型アンジオテンシン受容体欠損マウス(AT1a-KO)を用いて、レプチン抵抗性として知られる高脂肪食負荷における摂食量と体重の変化を検討した。AT1a-KO マウスでは対照マウスと比較して、高脂肪食誘導性肥満症の発症が抑制されていた。以上より、レニン・アンジオテンシン系によるエネルギー代謝調節の少なくとも一部にAT1aが関与することが明らかになり、肥満発症におけるAT1aの病態生理的意義が示唆された。

#### 研究目的

アンジオテンシンIIのエネルギー代謝調節作用の分子機構を明らかにするために、1型アンジオテンシン受容体欠損マウス(AT1a-KO)を用いて、レプチン抵抗性として知られる高脂肪食負荷における摂食量と体重の変化を検討した。

#### 研究方法

6週齢雄性 AT1a-KO マウスと野生型 C57BL/6 マウスに8週間の通常食(脂質 12%、3.57kcal/g)あるいは高脂肪食負荷(脂質 60%、5.56kcal/g)により肥満の誘導を試みた。マウスの摂食量と体重の経時変化を検討し、高脂肪食負荷前と負荷8週間後に副腎丸周囲、腹壁皮下および腸間膜脂肪組織の重量を測定した。画像解析装置を用いて副腎丸周囲脂肪組織の脂肪細胞面積と細胞径を定量化した。

#### (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、あるいは適切な麻酔剤を用いて安楽死させた。

#### 研究結果

標準食では、AT1a KO マウスの摂食量は、対照マウスと比較して有意な増加が認められた。しかしながら、高脂肪食負荷時には両者の間に摂食量に明らかな差は認め

られなかった。又、標準食の場合には、AT1a-KO マウスでは対照マウスと比較して、体重や脂肪組織重量に明らかな差を認めなかった。一方、高脂肪食負荷では標準食の場合と比較して、対照マウスの体重と脂肪組織重量の著しい増加が認められたが、AT1a-KO マウスではそれぞれ約40%と約80%に抑制されていた(図)。脂肪細胞面積と細胞径に関しては、標準食ではAT1a-KO マウスと対照マウスの間に明らかな差を認めなかった。一方、高脂肪食負荷時では、対照マウスにおいて著しい脂肪細胞肥大が認められたが、AT1a-KO マウスでは明らかに抑制されていた。

#### 考察

アンジオテンシンノーゲン欠損マウス(AGT-KO マウス)では、標準食と高脂肪食負荷時のいずれにおいても対照マウスと比較して、体重と脂肪組織重量の低下が報告されている。本研究では、AT1a-KO マウスでは対照マウスと比較して、高脂肪食負荷時による体重、脂肪組織重量の増加が著しく抑制されることが明らかになり、レニン・アンジオテンシン系によるエネルギー代謝調節の少なくとも一部にAT1aが関与することが示唆された。今後、遺伝子欠損マウスのみならずAT1受容体拮抗薬などを用いた薬理学的検討が必要であると考えられた。

#### 結論

AT1a-KO マウスでは、高脂肪食誘導性肥満症の発症が抑制されることが明らかになり、肥満症におけるAT1aの



病態生理的意義が示唆された。

#### 参考文献

1. Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K, Fukamizu A, Murakami K: Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J. Biol. Chem.* 269: 31334-31337, 1994.
2. Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A, Uchida H, Sugiura M, Fukata K, Fukamizu A, Murakami K: Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J. Biol. Chem.* 270:18719-18722, 1995.
3. Massiera F, Bloch-Faura M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulangue A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M: Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J.* 15:2727-2729, 2001.
4. Massiera F, Seydoux J, Geloën A, Quignard-Boulangue A, Turgban S, Saint-Marc P, Fukamizu A, Negrel R, Ailhaud G, Teboul M: Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alterations in adipose tissue development and locomotor activity. *Endocrinology* 142:5220-5225, 2001.

#### 研究危険情報

なし

#### 研究発表

##### 論文発表

1. Miyanaga F, Ogawa Y, Ebihara K, Hidaka S, Tanaka T, Hayashi S, Masuzaki H, Nakao K: Leptin as an adjunct of insulin therapy in insulin-dependent diabetes. *Diabetologia* 46:1329-1337, 2003.
2. Satoh N, Ogawa Y, Usui T, Tagami T, Kohno S, Uesugi H, Sugiyama H, Sugawara A, Yamada K, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K: Antiatherogenic effect of pioglitazone in type 2 diabetic patients irrespective of the responsiveness to its antidiabetic effect. *Diabetes Care* 26:2493-2499, 2003.
3. Yamahara K, Itoh H, Chun T-H, Ogawa Y, Yamashita J, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yurugi-Kobayashi

T, Miyashita K, Tsujimoto H, Kook H, Feil R, Garbers DL, Hofmann F, Nakao K: Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3404-3409, 2003.

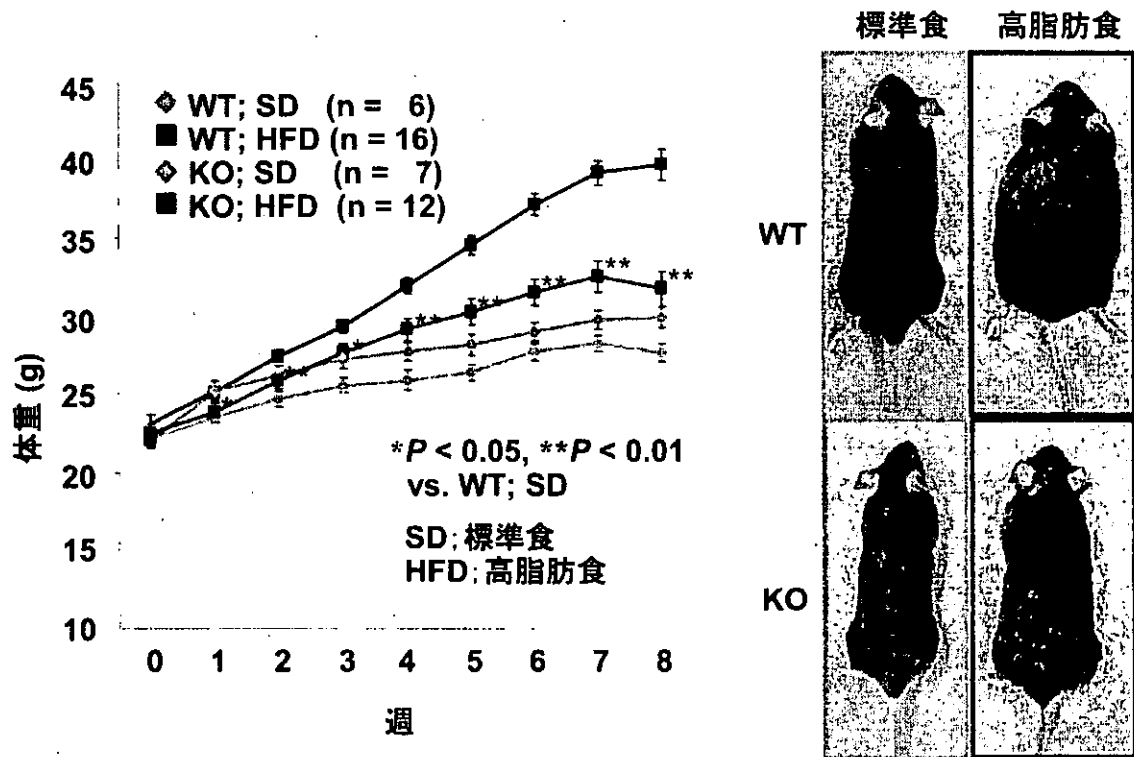
4. Nakagawa T, Ogawa Y, Ebihara K, Yamanaka M, Tsuchida A, Taiji M, Noguchi H, Nakao K: Anti-obesity and anti-diabetic effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent models of leptin resistance. *Int. J. Obes.* 27:557-65, 2003.

#### 学会発表

1. 宮永史子、小川佳宏、海老原健、中所英樹、宮澤崇、田中智洋、日下部徹、小林望美、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マウスの過食におけるレプチンの意義 第76回日本内分泌学会学術総会 2003.5.9-11, 横浜
2. 海老原健、小川佳宏、雪岡日出男、宮本恵宏、田中智洋、林達也、細田公則、井上元、吉政康直、中尾一和 マイクロアレイを用いた脂肪萎縮性糖尿病におけるレプチンの糖、脂肪代謝改善作用の分子機構 第46回日本糖尿病学会年次学術集会 2003.5.22-24, 富山
3. 日下部徹、小川佳宏、海老原健、宮永史子、田中智洋、小林望美、中所英樹、宮澤崇、林達也、細田公則、井上元、中尾一和 ヒト脂肪萎縮性糖尿病におけるレプチンの糖・脂質代謝改善効果 第46回日本糖尿病学会年次学術集会 2003.5.22-24, 富山
4. 菅波孝祥、向山政志、永江徹也、横井秀基、澤井一智、吉岡徹朗、越川真男、菅原照、小川佳宏、中尾一和 新しい糖尿病腎症モデルとしての脂肪萎縮性糖尿病マウスの解析と腎障害の可逆性に関する検討 第7回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2003.11.21-22, 札幌

#### 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



(図) 高脂肪食負荷による肥満の誘導 WT:対照マウス、KO: AT1a-KO マウス

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

中枢神経系におけるレプチン、インスリン、脂肪酸シグナルのクロストーク機構

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  
益崎 裕章 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
海老原 健 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学  
中所 英樹 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学

**研究要旨** 脂肪細胞由来ホルモン、レプチンは視床下部において JAK2/STAT3 シグナル系を活性化し、強力な摂食抑制やエネルギー消費亢進をもたらす。インスリンも中枢において PI3 キナーゼ経路を介する摂食抑制効果を発揮することが知られ、長鎖脂肪酸の脳内投与においても摂食抑制、肝糖放出の抑制が惹起されることから、中枢性エネルギー代謝調節因子としてのレプチン、インスリン、脂肪酸シグナルの機能的連関、クロストークの重要性が注目される。私達は正常マウス、あるいは高脂肪食誘導肥満マウスの視床下部に対するレプチン、インスリン、脂肪酸の単独あるいは共投与を行い、この分子機構の解明を進めている。本年度は、マウスを用いた側脳室内投与、視床下部を用いた食欲調節シグナルの評価法を確立し、高脂肪食誘導性肥満におけるレプチン抵抗性に中枢へのレプチン移行障害とレプチン下流シグナルとしての視床下部 PKB/Akt シグナル活性化障害が関与することを明らかにした。更に、長鎖脂肪酸が中枢性摂食調節に対して抑制的に働くこと、視床下部におけるレプチンシグナルに対する強力な増強効果を持つことを明らかにした。

研究目的

中枢性エネルギー代謝調節因子としてのレプチン、インスリン、脂肪酸シグナルの機能的連関、クロストークの重要性が注目されている(図1)。このような機構が中枢性摂食異常症の病態に関与する可能性について動物投与モデルを用いて検討する。

研究方法

標準食(S)あるいは高脂肪食(H)を負荷したマウスにレプチン、長鎖不飽和脂肪酸を腹腔内あるいは側脳室内に単独に、あるいは同時投与し、視床下部における STAT3 活性化(レプチンシグナル活性化の指標)、PKB/Akt 活性化および PI3 キナーゼの活性化(インスリンシグナル活性化の指標)をそれぞれ、特異的リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法、フォスファチジルイノシトールを基質としたインビトロカイネースアッセイ法にて検討した。実験動物の使用に当たっては、適切な麻酔により苦痛を与えないこと、不必要なストレス、恐怖を与えないことなど、動物愛護上の配慮を十分に行った。

研究結果

H 群ではレプチン腹腔内投与による視床下部 STAT3 の活性化が減弱していたが中枢投与では減弱を認めなかった。S 群ではレプチン中枢投与により視床下部 PKB/Akt 活性の亢進を認めたが H 群では認めなかった。また、長鎖脂肪酸(オレイン酸)の側脳室投与に摂食量が明らかに抑制された(図2)。脂肪酸の単独投与では Stat3、PI3 kinase、PKB/Akt の活性化に対する有意な変化を認めなかったが、レプチンとの共投与によりレプチン単独群に比べて Stat3 活性化の明らかな亢進が認められた(図3)。

考察

レプチンは視床下部において JAK2/STAT3 シグナル系を活性化し、強力な摂食抑制やエネルギー消費亢進をもたらす。インスリンも中枢において PI3 キナーゼ経路を介する摂食抑制効果を発揮することが知られ、長鎖脂肪酸の脳内投与においても摂食抑制、肝糖放出の抑制が惹起されることから、中枢性エネルギー代謝調節因子としてのレプチン、インスリン、脂肪酸シグナルの機能的連関、クロストークの重要性が注目されている。今回の研

究結果は、中枢性摂食異常症の病態におけるレプチンと長鎖脂肪酸シグナルの機能的連関、およびその破綻の意義を示唆している。

### 結論

高脂肪食誘導性の肥満病態には中枢へのレプチン移行障害とレプチン下流シグナルとしての視床下部PKB/Aktシグナル活性化障害が関与することが示唆された。また、長鎖不飽和脂肪酸の中枢投与が摂食を強力に抑制すること、視床下部におけるレプチンシグナルに対する増強効果を持つことが明らかとなり、中枢性摂食異常症の病態における意義が示唆された。

### 健康危険情報

特記すべきものなし。

### 研究発表

#### 論文発表

1. F. Miyanaga, Y. Ogawa, K. Ebihara, S. Hidaka, T. Tanaka, S. Hayashi, H. Masuzaki, K. Nakao. Leptin as an adjunct of insulin therapy in insulin-deficient diabetes. *Diabetologia* 46:1329-1337, 2003

2. K. Ebihara, T. Kusakabe, H. Masuzaki, N. Kobayashi, T. Tanaka, H. Chusho, F. Miyanaga, T. Miyazawa, T. Hayashi, K. Hosoda, Y. Ogawa, K. Nakao. A Novel Homozygous Nonsense Mutation Of Seipin in Japanese Patients with Congenital Generalized Lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* in press, 2004.
3. C. Son, K. Hosoda, K. Ishihara, L. Bevilacqua, H. Masuzaki, T. Fushiki, M.E. Harper, K. Nakao. Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. *Diabetologia* 47:47-54, 2004
4. A. Takahashi-Yasuno, H. Masuzaki, T. Miyawaki, Y. Ogawa, N. Matsuoka, T. Hayashi, K. Hosoda, G. Inoue, Y. Yoshimasa, K. Nakao. Leptin receptor polymorphism is associated with serum lipid levels and impairment of cholesterol lowering effect by simvastatin in Japanese men. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 62:169-175, 2003

知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）  
特記すべきものなし。

