

## 過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究

所 属 東北大学大学院医学系研究科  
研究者 野々垣勝則

研究要旨 選択的セロトニン再取込み阻害薬 (SSRI) の1種であるフルボキサミンの食欲抑制効果の機序を検討した結果、フルボキサミンの食欲抑制効果の発現には 5-HT<sub>2C</sub> 受容体と脳内メラノコルチン系のシグナル伝達系が重要な役割を果たすことが判明した。

### 分担研究者

- |                     |       |
|---------------------|-------|
| 1) 明治製菓 (株) 学術部     | 平岡秀一  |
| 2) 独立行政法人国立健康・栄養研究所 | 大賀英史  |
| 3) 東京大学大学院医学系研究科    | 久保木富房 |

### A. 研究目的

過食行動の制御は肥満、糖尿病など生活習慣病の予防や治療管理に重要な因子であるが、臨床現場で確立した治療法は未だない。現在、臨床的に有効性が示唆されているのは神経性過食症や無茶食い障害に対する選択的セロトニン再取込み阻害薬 (SSRI) の1種であるフルボキサミンの効果である。しかし、本剤が無効な神経性過食症や無茶食い障害もあり、その効果の差の原因は解明されていない。従ってフルボキサミンの抗過食効果発現に関与する因子の同定は過食の予防、治療の開発の糸口になる可能性がある。申請者らはフルボキサミンなど SSRI の食欲抑制機序の解明から過食病態の解明、抗過食薬の創薬に役立つ標的遺伝子の探索を本研究目的とする。

### B. 研究方法

- 1) フルボキサミンの食欲抑制効果における 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の役割:

C57BL/6J 雄性マウス (5 週齢) を用いて 24 時間絶食後に選択的セロトニン 5-HT<sub>2C</sub> 受容体選択的拮抗薬 (SB242084 ; 以下 SB と略す) (1 mg/kg) または生食水を腹腔内前投与した 30 分後に生食水またはフルボキサミン (3-30 mg/kg) を腹腔内投与し 30 分後から餌を与え 1 時間ごとの摂食量を測定した。

- 2) フルボキサミンの食欲抑制効果における脳内メラノコルチン (MC) 4 受容体と 3 受容体の役割:

脳内 MC 4 受容体と 3 受容体のシグナル伝達系に遺伝的障害を有する A<sup>y</sup>/a 雄性マウス (5 週) を用いて 24 時間絶食後 SB (1 mg/kg) を腹腔内投与した 30 分後に生食水、フルボキサミン (30 mg/kg) を腹腔内投与し 30 分後から餌を与え 1 時間後の摂食量を測定した。次に 雄性 A<sup>y</sup>/a マウスと野生群 (5 週) を用いて暗サイクルになる 30 分前に、生食水、フルボキサミン (30mg/kg) を腹腔内投与して暗サイクル後 1 時間の摂食量を測定した。

3) フルボキサミンによる視床下部の POMC と NPY 遺伝子発現の変化 :

前記 1) と同様に C57BL6J マウスに生食と各薬物を投与後、餌を与えず絶食のままで 1 時間後に断頭し、採血すると同時に視床下部を取り出し、液体窒素で瞬間凍結し、後に RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR で視床下部での摂食調節に関与する代表的神経ペプチドである POMC と NPY の遺伝子発現を定量した。

4) フルボキサミンによる血中活性型グレリン濃度の変化 :

前記 c) で断頭時に採血した血漿で各投与群の活性型グレリン濃度を ELISA で測定した。

5) 免疫組織化学的染色の抗体検討 :

マウスについて摂餌関連因子を解明する目的で、神経伝達物質のうち摂食関連因子である NPY、POMC、MC4 受容体、 $\alpha$ -MSH、AGRP について、抗体による免疫染色実験系の検討および構築を行った。

摂餌関連因子の探索では重要な脳部位組織は視床下部であるが、免疫染色実験系の構築を主眼におき、まず薬物未処置の ddY 系雄性マウスの脳組織で実験系の構築に取り組んだ。

マウスの脳を摘出し、厚さ 10  $\mu$  m の未固定凍結切片を作製し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、各々の 1 次抗体と反応させ、ABC (avidin-biotinylated peroxidase complex) 法で diaminobenzidine を基質とした酵素反応を行うことにより、各ターゲットの特異的な染色像が得られるか否かを検討した。検討に用いる抗体は、既報の論文等より入手可能な次の抗体を選択し試験に用いた。

- 抗体 -

- ① NPY : Santa Cruz, sc-14728, affinity purified goat polyclonal antibody against the carboxy terminus
- ② POMC : Santa Cruz, sc-20148, rabbit polyclonal antibody against full length of POMC
- ③ MC4 受容体 : Santa Cruz, sc-6880, affinity purified goat polyclonal antibody against the carboxy terminus
- ④  $\alpha$ -MSH : Biomol, MZ1111, rabbit polyclonal antibody
- ⑤ AGRP : Santa Cruz, sc-18634, affinity purified goat polyclonal antibody against the internal region of AGRP

## C. 研究結果

1) フルボキサミンの食欲抑制効果における 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の役割の同定 :

24 時間絶食にした C57BL6J mice にフルボキサミン単独を投与してもいずれの用量でも摂食抑制効果は認められなかった。また SB は生食水投与群と摂食量に差は認められなかった。しかし、SB を前投与後に、フルボキサミンを投与すると 3-30 mg/kg のいずれの用量でも同様に摂食抑制効果が発揮された。この摂食抑制効果は 2 時間持続した。これらの結果から、フルボキサミンが食欲を抑制する効果の発現には、5-HT<sub>2C</sub> 受容体のシグナル伝達障害が必要であることが示唆された。

2) フルボキサミンの食欲抑制効果における脳内メラノコルチン4受容体と3受容体の役割:

このSBを前投与後、フルボキサミンを投与する際に見られる摂食抑制は、遺伝的MC4受容体とMC3受容体のシグナル伝達系の障害をもつA<sup>y</sup>/aマウスでは消失したことから、その摂食抑制効果はMC4受容体とMC3受容体を介していることが示唆された。

またA<sup>y</sup>/aマウスとその野生群にフルボキサミン単独を投与しても摂食抑制効果は認められなかった。

3) フルボキサミンによる視床下部のPOMCとNPY遺伝子発現の変化

POMCについては、SB+フルボキサミン群の値が生理食塩水投与群およびフルボキサミン群と比較すると有意にPOMCの遺伝子発現の増強(約2倍)を認めた。NPYについては、いずれの薬物投与群も対照群と比較して有意な差を認めなかった。これらのことからSB前処理によるフルボキサミンの摂食抑制は視床下部のPOMCニューロンが活性化を伴うことが示唆された。

4) フルボキサミンによる血中活性型グレリン濃度の変化

フルボキサミン自体にはグレリン抑制効果は認められなかったが、SB前投与後にフルボキサミンを投与すると活性型グレリンの抑制効果が見られた。これらの結果からフルボキサミンの摂食抑制効果の末梢機序として血中活性型グレリン濃度の低下の関与が示唆された。

5) 免疫組織化学的染色

検討の結果、今回使用した抗体では、NPY (Santa Cruz, sc-14728, affinity purified goat polyclonal antibody against the carboxy terminus)のみ室傍核と大脳皮質に鮮明な染色像が得られ、その他のターゲットではAGRP (Santa Cruz, sc-18634, affinity purified goat polyclonal antibody against the internal region of AGRP)で抗体特異的ではあるものの微弱な染色像が得られた以外には、抗体特異的な染色像は得られなかった。NPYでは良好な染色像が得られているため、それ以外のターゲットについては、抗体の良否に関与していると考えられた。

#### D. 考察

従来のセロトニン作動薬の報告と異なり、フルボキサミンには食欲抑制効果が認められず、フルボキサミンの食欲抑制効果はセロトニン5-HT<sub>2C</sub>受容体の薬理的な不活化が必要とされることは新規な発見である。研究代表者は、5-HT<sub>2C</sub>受容体遺伝子ノックアウトマウスを産生して、過食から中年期肥満を発症させることを報告している。臨床的に海外でもフルボキサミンは神経性過食症、無茶食い障害の治療に有効性が認められている。これからの結果から、フルボキサミンが有効となる過食病態とは、5-HT<sub>2C</sub>受容体の刺激伝達系に障害をもつ病態であると想定できる。更に、今回の研究から、その食欲抑制効果は脳内メラノコルチン系を介していることから、メラノコルチン系のシグナル伝達系が正常である必要もあることが推測できる。

## E. 結論

フルボキサミンそれ自体には食欲抑制効果が認められないが、セロトニン 5-HT<sub>2C</sub> 受容体の薬理的な不活性化により食欲抑制効果を発揮する。その食欲抑制効果は脳内メラノコルチン系を介し、末梢では血中グレリン濃度の低下が関与することが示唆された。フルボキサミンが有効な過食病態とは 5-HT<sub>2C</sub> 受容体のシグナル伝達障害があり、メラノコルチン系が正常な過食病態であることが推測された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

・心療内科第 8 巻 5 号 P293-296, 2004

### 2. 学会発表

#### 国内学会

・2004年6月3日～5日 北九州国際会議場リーガロイヤル小倉

第45回日本心身医学会総会学術講演会

パネルディスカッション：情動・行動の脳内機序に関する研究の進展

演題：「摂食行動とストレス反応におけるセロトニン5-HT<sub>2c</sub> 受容体の役割」

野々垣勝則

(6月4日)

・第77回日本内分泌学会学術総会

2004年6月24日～26日 国立京都国際会館

領域別シンポジウム：「行動とエネルギー代謝におけるセロトニン5-HT<sub>2c</sub> 受容体の役割」

野々垣勝則

(6月24日)

一般演題：神経内分泌（基礎）42：「ストレス反応における5-HT<sub>2c</sub> 受容体の役割」

野々垣勝則

(6月24日)

#### 国際学会

Society for Neuroscience 34th Annual Meeting in San Diego, Oct.23-27, 2004

THE ANOREXIC ACTIONS OF FLUVOXAMINE REQUIRE BLOCKADE OF 5-HT<sub>2C</sub> RECEPTOR SIGNALING

K. Nonogaki, Y. Takahashi (Oct. 23)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無し

2. 実用新案登録 無し

3. その他

特許出願 野々垣勝則 糖尿病治療薬（特願2004-68732）