

図4. グレリンノックアウトマウスの外貌と臓器重量/体重

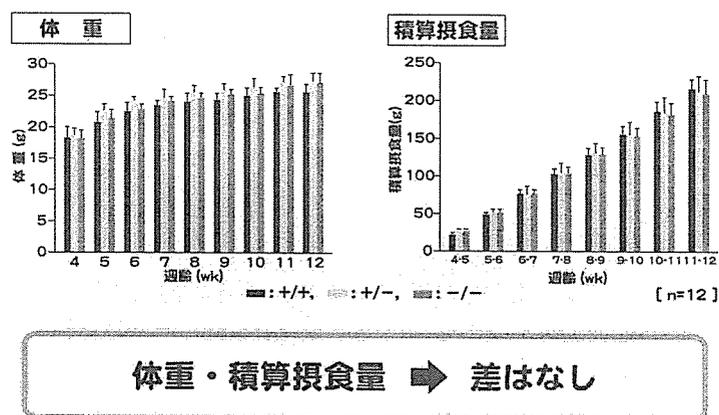


図5. グレリンノックアウトマウスの成長に伴う体重・摂食量の推移

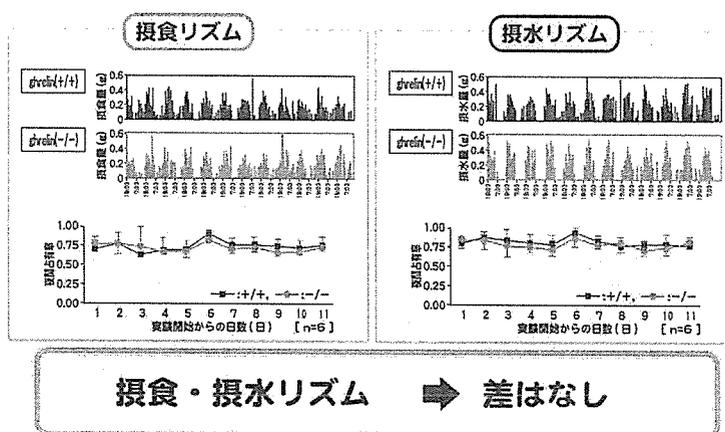
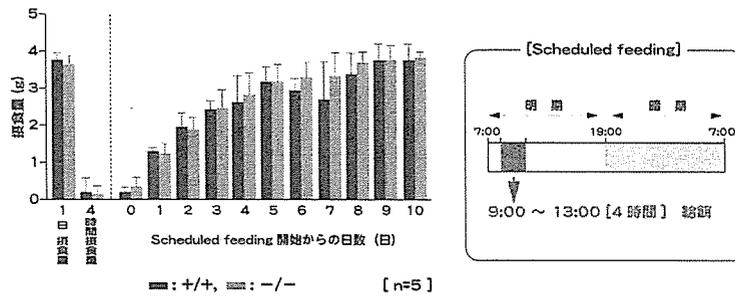
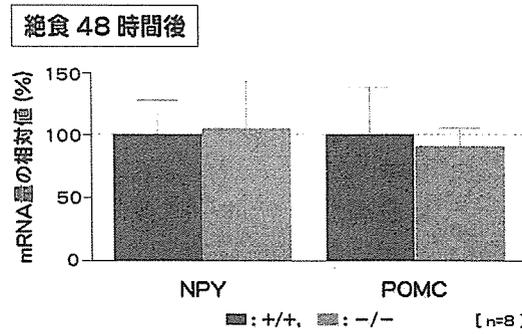


図6. グレリンノックアウトマウスの摂食・摂水リズム



Scheduled feeding ➡ 差はなし

図7. グレリンノックアウトマウスの scheduled feeding に伴う摂食量の推移



摂食調節ペプチドの遺伝子発現量 ➡ 差はなし

図8. グレリンノックアウトマウスにおける摂食調節ペプチドの遺伝子発現量

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

摂食行動に関与する視床下部神経細胞に対するレプチンの作用について

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、エネルギーバランスが負に傾いたときにレプチンレベルの低下やグレリンレベルの上昇、血糖値の低下がオレキシン産生神経を活性化することにより、摂食行動を支えるために適切な覚醒レベルを保つために働くことを明らかにしている。今年度はレプチンが、オレキシン神経のみならずエネルギーホメオスタシスの維持機構にかかわる他の視床下部神経へ及ぼす作用とその細胞内機構の解明を目的に解析を行った。スライスパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析により、レプチンはオレキシン神経と NPY 神経に対して JAK2 および PI3K の活性化を介して K-ATP チャネルを活性化することにより抑制的に働いていることを明らかにした。一方、POMC 神経に対しては JAK2 および MAPKK の活性化を介して非選択的のカチオンチャネルを活性化することにより神経興奮を引き起こすことを見いだした。

研究目的

オレキシン、ニューロペプチド Y(NPY)、プレオピオメラノコルチン(POMC)、メラニン凝集ホルモン(MCH)を産生する視床下部の神経細胞は摂食行動の制御に重要な役割をしている。これらの神経細胞の活動に対するレプチンの作用および作用機構を明らかにし、その生理的意義を解明する。このことにより、レプチンが視床下部神経細胞の活性を制御する機構を明らかにし、特に摂食行動の制御系における役割を解明するための一助にする。

研究方法

オレキシン、NPY、POMC、MCH を産生する各視床下部神経に GFP を特異的に発現するトランスジェニックマウスを用いた。NPY、POMC、MCH はそれぞれのマウスの遺伝子に EGFP をノックインした BAC によるトランスジェニックマウスであり、オレキシンは、前年度まで用いていたヒトオレキシンプロモーターで EGFP をドライブするトランスジェニックマウスである。これらのマウスの脳から調整した視床下部のスライス標本を用い、蛍光を指標にパッチクランプを行い、レプチンがそれぞれの神経の活動に与える影響を調べ、薬理的な手法をもちいてそれらの作用機構について考察した。

研究結果

パッチクランプ実験により、記録したすべてのオレキシン神経 (n=29) はレプチンによって抑制された(図1)。この作用は K-ATP チャネル阻害剤(トルブタミド)、PI3K 阻害

剤(Ly294002)、JAK2 の阻害剤(AG490)によってそれぞれ完全に阻害されることが明らかになった。また、NPY 神経においても同様に、レプチンによって膜の過分極反応が起こり、その作用が、K-ATP チャネル阻害剤(トルブタミド)、PI3K 阻害剤(Ly294002)、JAK2 の阻害剤(AG490)によってそれぞれ完全に阻害されることが明らかになった。

一方、オレキシン神経の近傍、視床下部外側野に散在する MCH 神経に対しては、脱分極、過分極反応どちらも観察されず、レプチンは MCH 神経に対して、電気生理学的な作用は及ぼさないことが明らかになった。

摂食抑制作用をもたらす POMC 神経に対しては、レプチンにより、膜の脱分極反応(活性化)を引き起こすことが明らかとなった。またこの反応は、非選択的のカチオンチャネル阻害剤(La³⁺)、MAPKK 阻害剤(PD98059)、JAK2 の阻害剤(AG490)によって完全に阻害されることが明らかになった。

考察

レプチンによる視床下部神経の活動に、オレキシン、NPY 神経では JAK2、PI3 キナーゼと K-ATP チャネルが、POMC 神経では JAK2、MAPKK と非選択的カチオンチャネルが関与することが明らかになった(図 2)。これまで、レプチンによる視床下部神経細胞の調節機構はほとんど解明されていなかった。今回明らかになった機構は、エネルギーホメオスタシスを司る視床下部神経調節機構として大変重要である可能性がある。

結論

レプチンはいわゆる“アディポサイトカイン”であるが、オレキシン神経に対する抑制作用は、末梢からの情報を視床下部に伝え、摂食行動や睡眠・覚醒を制御する機構の一部である可能性が高い。今回、レプチンによる視床下部神経への作用機構として JAK2 キナーゼ依存的に、オレキシン、NPY 神経を抑制し、POMC 神経を活性化することを明らかにした。また、エフェクター分子として KATP チャネル、非選択的のカチオンチャネルを活性化することを明らかにした。これらの機構は、レプチンの作用機序を考察する上で重要な知見であると思われる。

研究発表

論文発表

1. Sakurai T. Neural Circuit of Orexin (Hypocretin): Maintaining Sleep and Wakefulness. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 171–181, 2007.
2. Kitamura Y, Tanaka H, Motoike T, Ishii M, Williams SC, Yanagisawa M, Sakurai T. Distribution of neuropeptide W immunoreactivity and mRNA in adult rat brain. *Brain Res.* 2006 Jun 6;1093(1):123–34.
3. Takayasu S, Sakurai T, Iwasaki S, Teranishi H, Yamanaka A, Williams SC, Iguchi H, Kawasawa YI, Ikeda Y, Sakakibara I, Ohno K, Ioka RX, Murakami S, Dohmae N, Xie J, Suda T, Motoike T, Ohuchi T, Yanagisawa M, Sakai J. A neuropeptide ligand of the G protein-coupled receptor GPR103 regulates feeding, behavioral arousal, and blood pressure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 103(19):7438–43.
4. Xie X, Crowder TL, Yamanaka A, Morairty SR, Lewinter RD, Sakurai T, Kilduff TS. GABAB receptor-mediated modulation of hypocretin/orexin neurones in mouse hypothalamus. *J Physiol.* 2006 Jul 15;574(Pt 2):399–414.
5. Sakurai T. Roles of orexins and orexin receptors in central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006 Jun;5(3):313–25.
6. Fujiki N, Yoshida Y, Zhang S, Sakurai T, Yanagisawa M, Nishino S. Sex difference in body weight gain and leptin signaling in hypocretin/orexin deficient mouse models. *Peptides* Sep;27(9):2326–31. Epub 2006 Apr 19.
7. Yamanaka A, Muraki Y, Ichiki K, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T. Orexin neurons are directly

and indirectly regulated by catecholamines in a complex manner. *J Neurophysiol.* 2006 Jul; 96(1):284–98. Epub 2006 Apr 12.

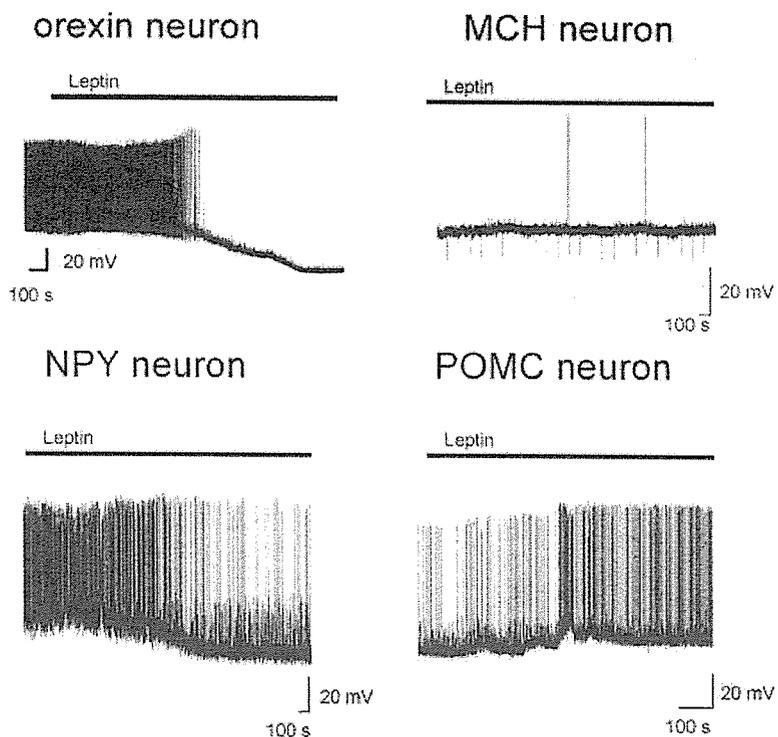
8. Mochizuki T, Klerman EB, Sakurai T, Scammell TE. Elevated body temperature during sleep in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Sep;291(3):R533–40.
9. Nakamachi T, Matsuda K, Maruyama K, Miura T, Uchiyama M, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S. Regulation by orexin of feeding behaviour and locomotor activity in the goldfish. *J Neuroendocrinol.* 2006 Apr;18(4):290–7.
10. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M. Des-acyl Ghrelin Induces Food Intake by a Mechanism Independent of the Growth Hormone Secretagogue Receptor. *Endocrinology.* 2006 May;147(5):2306–14.
11. Zhang W, Sakurai T, Fukuda Y, Kuwaki T. Orexin neuron-mediated skeletal muscle vasodilation and shift of baroreflex during defense response in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Jun;290(6):R1654–63.
12. Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T. Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci.* 2006 Jan 11;26(2):398–405.

学会発表

1. Sakurai, T. Neural circuit of orexin neurons: a mechanism that maintains proper sleep/wakefulness states according to inner and outer environments of animals. Plenary Symposium World Association of Sleep Medicine, 2nd World Congress, Bangkok, Thailand, February 4–8, 2007.
2. 桜井 武 reverse pharmacology による新規神経ペプチドの研究 第 13 回秋田疼痛研究会 2007 年 1 月 秋田県保健センター
3. 桜井 武 オレキシンによる睡眠・覚醒状態の安定化機構 阪大蛋白研セミナー 2007 年 1 月 蛋白質研究所講堂

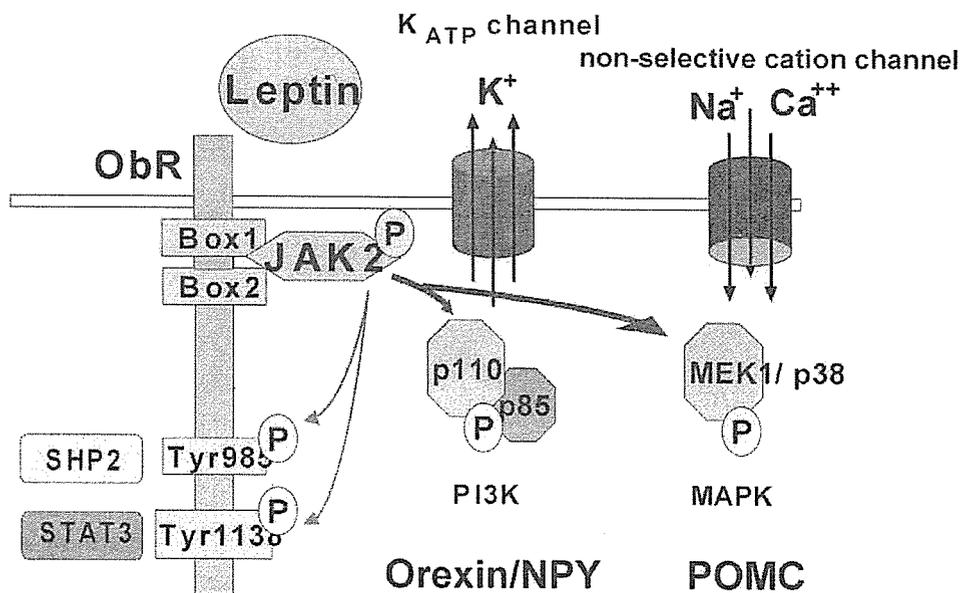
4. T. Sakurai, Neural Circuit of Orexin Neurons: A Mechanism that Maintains Proper Sleep/wakefulness States According to Inner and Outer Environments of Animals BSI Forums RIKEN Brain Science Institute 2006年12月27日
5. 桜井 武 「睡眠と覚醒の制御機構における視床下部オレキシン産生神経の役割」第16回神経科学の基礎と臨床 大阪 日本シェーリング株式会社 2006年12月16日
6. 桜井 武 「オレキシン」第31回比較内分泌学会シンポジウム「比較内分泌学の世紀」早稲田大学国際会議場「伊深ホール」2006年12月7日
7. T. Sakurai. Roles of Orexins in Regulation of Sleep/Wakefulness 第28回日本生物学的精神医学会、第36回日本神経精神薬理学会、第49回日本神経化学会大会 合同年会 2006年9月14日～9月16日
8. T. Sakurai. Homeostatic and emotional regulation of sleep/wakefulness by orexin neurons, Satellite Symposium of REGPEP'06 Half-Day Symposium on GPCRs Hakone Prince Hotel, September2, 2006
9. Nagata, R., Hara, J., Ishii, M., Kitamura, Y., Yanagisawa, M., Sakurai, T. Abnormal anxiety-related behavior in GPR7-knockout mice. Satellite Symposium of REGPEP'06 Half-Day Symposium on GPCRs Hakone Prince Hotel, September2, 2006
10. Matsuki, T., Yamanaka, A., Yanagisawa, M., Sakurai, T. Leptin inhibits orexin-producing neurons through opening of K-ATP channels. Satellite Symposium of REGPEP'06 Half-Day Symposium on GPCRs Hakone Prince Hotel, September2, 2006
11. Kitamura, Y., Yanagisawa, M., Sakurai, T. Distribution of NPW mRNA and immunoreactivity in rat brains. T. Satellite Symposium of REGPEP'06 Half-Day Symposium on GPCRs Hakone Prince Hotel, September2, 2006
12. 桜井 武「オレキシン産生神経による覚醒と睡眠の安定化機構」第18回 21世紀COEセミナー「脳の新規ホルモンと記憶・情動・睡眠の制御:アクチビン・オレキシン・性ホルモン」東京大学駒場キャンパス アドバンスラボラトリー 2006年7月29日
13. T. Sakurai. Roles of orexin/hypocretin neurons in the regulation of sleep/wakefulness states. SRI division seminar, Stanford Research Institute, Palo Alto, CA, 23 June, 2006.
14. 桜井 武 オレキシン神経による睡眠・覚醒の制御機構 第1回関東睡眠懇話会 2006年2月3日 アルカディア市ヶ谷
15. T. Sakurai. Homeostatic and emotional regulation of sleep/wakefulness by orexin neurons, Satellite Symposium of REGPEP'06 Half-Day Symposium on GPCRs Hakone Prince Hotel, September2, 2006
16. Junko Hara, Taizo Matsuki, Katsutoshi Goto, Masashi Yanagisawa, Takeshi Sakurai: Effects of inflammatory cytokines on orexin neurons 第29回 日本神経科学大会 国立京都国際会館 2006年7月20日
17. 辻野なつ子、山中章弘、市来加奈子、村木暢、桜井武、後藤勝年 コレシストキニンによるオレキシン神経の活性化 第79回日本薬理学会年会 パシフィコ横浜 2006年3月
18. 松木大造、山中章弘、村木暢、後藤勝年、柳沢正史、桜井 武 レプチンによるオレキシン神経抑制作用機構の解析 第79回日本薬理学会年会 パシフィコ横浜 2006年3月
19. 永田ルビー、石井誠、北村洋二、原 淳子、後藤勝年、桜井 武 GPR7ノックアウトマウスにおける不安関連の行動異常 第79回日本薬理学会年会 パシフィコ横浜 2006年3月5

図 1. 視床下部神経に対するレプチン作用



オレキシン神経、MCH 神経、NPY 神経、POMC 神経に対するレプチンの作用を電流固定法にて示した。レプチンの投与により、オレキシン神経、NPY 神経は抑制され、POMC 神経は活性化された。MCH 神経はレプチンによる電気生理学的な変化を生じなかった。

図 2. オレキシン・NPY 神経、POMC 神経に対するレプチン作用の要約



レプチンは JAK2 および PI3K の活性化を介して、オレキシン神経、NPY 神経に対し、抑制性的の影響をあたえる。一方、POMC 神経に対しては、JAK2 および MAPK の活性化を介して活性化の影響を与える。

カロリー制限とリバウンドにおける生体反応の網羅的解析

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
山崎 芳浩 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 カロリー制限により体重減少したマウスの内臓脂肪組織において増加する遺伝子のうちペルオキシソームに関連する遺伝子 X を選別した。マウスの内臓脂肪組織において遺伝子 X の mRNA 発現量はカロリー制限により増加し、肥満では減少することが明らかになった。3T3-L1 脂肪細胞においてレトロウイルスベクターによる遺伝子 X の過剰発現あるいは RNAi 法によるノックダウンすることにより、遺伝子 X が脂肪細胞肥大化抑制作用を有することが証明された。以上より、カロリー制限により脂肪細胞において変化する脂質代謝において遺伝子 X は重要な役割を果たす可能性があると考えられた。

研究目的

カロリー制限による体重減少は、インスリン抵抗性の改善、抗炎症作用、抗酸化作用、寿命の延長をもたらすことが知られている。一方、急激なカロリー制限後にはしばしば体重増加（リバウンド）を生じるが、その分子機構は不明である。カロリー制限による減量後の体重の維持に伴う全身のエネルギー消費低下には、脂肪組織におけるレプチン産生低下による骨格筋のエネルギー利用効率の増加、交感神経活動の低下や神経内分泌機能変化が関与する可能性があり、中枢性摂食調節における脂肪組織の変化の重要性が示唆される。以上の背景を踏まえて、本研究では、カロリー制限の脂肪組織において遺伝子発現が増加する遺伝子のうちペルオキシソームに関連する遺伝子 X の脂肪組織における遺伝子発現と機能的意義を検討した。

研究方法

1. カロリー制限および肥満マウスにおける遺伝子 X の mRNA 発現量: 2 週間のカロリー制限により 10 週齢雄性 C57BL6/J マウスの内臓脂肪組織と副睾丸周囲脂肪組織における遺伝子 X の mRNA 発現量を real-timePCR 法にて検討した。14 週齢雄性 ob/ob マウスあるいは 8 週齢雄性 C57BL6/J マウスに 6 週間高脂肪食負荷後（14 週齢）の内臓脂肪組織を用いて同様に検討した。

2. 遺伝子 X 過剰発現による脂肪細胞分化と細胞内脂肪蓄積に及ぼす効果: レトロウイルスベクターにより遺伝

子 X 安定過剰発現させた 3T3-L1 脂肪細胞を用いて脂肪細胞分化と脂肪滴蓄積に及ぼす影響を検討する。分化誘導後の 3T3-L1 脂肪細胞を経時的に Oil Red O 染色にて解析し、脂肪蓄積量を定量した。

3. 遺伝子 X ノックダウンによる脂肪細胞分化と細胞内脂肪蓄積に及ぼす効果: RNAi 法により通常の 3T3-L1 脂肪細胞あるいは遺伝子 X 過剰発現する 3T3-L1 脂肪細胞における遺伝子 X ノックダウンを施行し、脂肪細胞の分化と脂肪滴蓄積に及ぼす影響を検討した。RNAi 導入 24 時間あるいは 48 時間後に real-timePCR 法とウエスタンブロット法により遺伝子 X の mRNA 発現量と蛋白質発現を定量し、RNAi 導入 5 日後の Oil Red O 染色により脂肪蓄積量を定量した。

（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

1. カロリー制限および肥満マウスにおける遺伝子 X の mRNA 発現量:

カロリー制限により 10 週齢雄性 C57BL6/J マウスの内臓脂肪組織において遺伝子 X の mRNA 発現量が約 4 倍程度増加した。副睾丸周囲脂肪組織では明らかな変化は

認められなかった。14 週齢雄性 ob/ob マウスあるいは 6 週間高脂肪食負荷後の 14 週齢雄性 C57BL6/J マウスの内臓脂肪組織において遺伝子 X の mRNA 発現量の減少が確認された。

2. 遺伝子 X 過剰発現による脂肪細胞分化と細胞内脂肪蓄積に及ぼす効果:

レトロウイルスベクターにより遺伝子 X を安定過剰発現する 3T3-L1 脂肪細胞は対照 3T3-L1 脂肪細胞と比較して、分化 8 日、15 日、21 日後の脂肪蓄積量は明らかに減少していた。

3. 遺伝子 X ノックダウンによる脂肪細胞分化と細胞内脂肪蓄積に及ぼす効果:

RNAi 法によるノックダウンにより 3T3-L1 脂肪細胞における遺伝子 X の mRNA 発現量は RNAi 用量依存性に減少し、50 nM では約 90%の抑制効果が得られ、蛋白発現量も明らかに減少していた。この時、遺伝子 X の mRNA 発現量の減少に伴って脂肪蓄積量は増加していた。上記の遺伝子 X を安定過剰発現する 3T3-L1 脂肪細胞を用いて RNAi 法によるノックダウンを施行したところ、同様に脂肪蓄積量の増加が認められた。

考察

カロリー制限により内臓脂肪組織において脂肪燃焼と脂肪合成に関与する遺伝子発現がいずれも亢進しており再摂食によりこれらの回復傾向が認められるが、本研究では、ペルオキシソームに関連する遺伝子 X の脂肪組織における遺伝子発現と機能的意義に焦点を当てて検討した。培養 3T3-L1 脂肪細胞を用いた検討により、遺伝子 X は脂肪細胞肥大化抑制作用を有することが明らかになった。ペルオキシソームは細胞毒性を有する鎖長の長い脂肪酸の脂肪酸・酸化に関与することが知られており、ミトコドリアにおける脂肪酸・酸化を効率よく進める可能性がある。遺伝子 X は脂肪細胞においてカロリー制限により変化する脂質代謝において重要な役割を果たす可能性がある。

結論

カロリー制限により脂肪組織において発現が増加する遺伝子のうちペルオキシソームに関連する遺伝子 X が脂肪細胞肥大化抑制作用を有することが明らかになった。

研究危険情報

なし

研究発表

論文発表

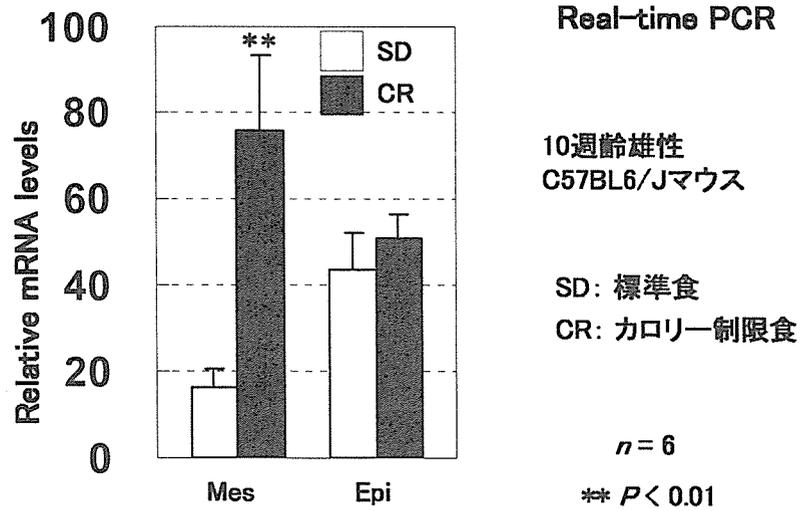
1. J. Park, S. S. Choe, A. H. Choi, K. H. Kim, M. J. Yoon, N. Houstis, E. D. Rogen, T. Suganami, Y. Ogawa, J. B. Kim. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signal. *Diabetes* 55: 2939-2949, 2006.
2. Y. Kamei, T. Suganami, T. Kohda, F. Ishino, K. Yasuda, S. Miura, O. Ezaki, Y. Ogawa. Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. *FEBS Lett.* in press, 2007.
3. L. Miyamoto, T. Toyoda, T. Hayashi, S. Yonemitsu, M. Nakano, S. Tanaka, K. Ebihara, H. Masuzaki, K. Hosoda, Y. Ogawa, G. Inoue, T. Fushiki, K. Nakao. Effect of acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase on glycogen regulation in isolated rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* in press, 2007.

学会発表

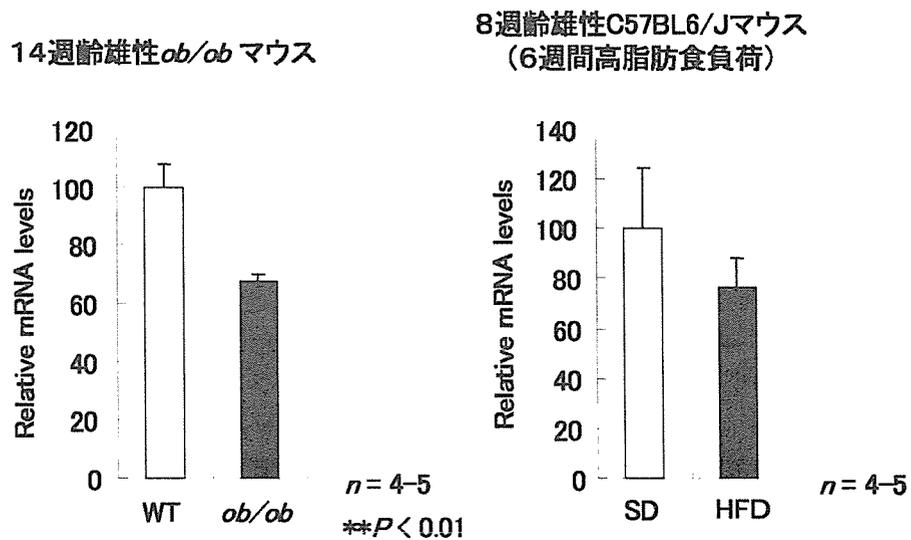
1. Y. Ogawa A paracrine loop involving FFAs and TNF α between adipocytes and macrophages. 5th Congress of Asian Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. 4.12-15, 2006 Jeju, Korea
2. 小川佳宏 脂肪細胞とマクロファージのパラクリン調節の分子機構 第 20 回日本糖尿病動物研究会年次学術集会(シンポジウム)2006.2.9-10 東京
3. 小川佳宏 アディポサイトカインと代謝調節 第 83 回日本生理学会大会(シンポジウム)2006.3.28-30 前橋
4. 小川佳宏 A paracrine loop between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue 第 20 回日本糖尿病学会年次学術集会(シンポジウム)2006.5.25-27 東京
5. 小川佳宏 脂肪組織からみたメタボリックシンドローム 第 6 回日本内分泌学会四国地方会(シンポジウム)2006.9.9. 徳島
6. 小川佳宏 脂肪細胞とマクロファージのクロストーク 第 41 回糖尿病医学の進歩(レクチャー)2006.9.29-30 札幌
7. 小川佳宏 肥満と炎症 第 4 回肥満症研究班班会議(基調講演)2006.5.27 東京
8. 小川佳宏 脂肪組織の驚異とメタボリックシンドローム 平成 18 年度産学官連携交流会(特別講演)2006.12.5. 千葉

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



(図1) カロリー制限により遺伝子XのmRNA発現量の増加



(図2) 肥満マウスにおける遺伝子XのmRNA発現量の減少

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

メラノコルチンアゴニストによるレプチン抵抗性の克服
—骨格筋 AMP キナーゼ活性を指標とした病態モデルマウスにおける解析—

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
田中 智洋 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学
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
平田 雅一 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学
日下部 徹 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学
宮永 史子 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学
細田 公則 京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学

研究要旨 私達は中枢性摂食異常症のメカニズムの解明において、脂肪細胞由来ホルモン、レプチンの作用に注目し、遺伝子操作マウスをはじめとする種々の病態モデルマウスの解析やヒト脂肪萎縮症患者に対するレプチン補償治療を実践してきた。肥満者における過食の制御を考える上で、視床下部におけるレプチン感受性低下（レプチン抵抗性）のメカニズムを解明することは極めて重要である。そこで本年度はレプチン過剰発現トランスジェニックマウス、高脂肪食負荷肥満マウス、アグーチマウスなどを用いて骨格筋 AMPK を指標とするレプチン抵抗性の分子機構の解析を試みた。その結果、骨格筋 AMPK の活性化の減弱が高脂肪食によって誘導されるレプチン抵抗性とよく相関すること、メラノコルチンアゴニストは高脂肪食で誘導されたレプチン抵抗性の状態にも効果を発揮することが明らかとなり、過栄養による中枢性摂食異常の機序解明に寄与することが期待される。

研究目的

脂肪細胞由来ホルモン、レプチンは強力な摂食抑制作用と体重調節とは独立したユニークな糖脂質代謝活性化作用を併せ持つ(1)。しかし米国を中心に実施された肥満者に対するレプチン投与は必ずしも強力な減量効果を示さず、肥満の中心病態がレプチンの作用不全（レプチン抵抗性）であることが早くから認識されてきた(JAMA 282:1568, 1999)。肥満や生活習慣病の病態把握や新規治療法の創成に向けてレプチン抵抗性の分子機構の解明が長い間、待望されてきたが見るべき大きなブレイクスルーのないままに数年が経過しているのが実情であった。このような状況の中、私達は脳室内カニューレ留置手術を施したマウス病態モデルを用い、非拘束下の状態で骨格筋における AMP キナーゼ活性を精密に測定する系を樹立することに成功し、骨格筋 AMP キナーゼ活性が視床下部におけるレプチン感受性を鋭敏に反映する生化学指標であることを世界で初めて突き止めた(Diabetes 54:2365-2374, 2005)。本研究では私達が確立に成功した新しい評価系を活用し、独自に開発したレプチン過剰

発現トランスジェニックマウス(Diabetes 48:1615, 1999, Diabetes 50:1440, 2001, Diabetologia 46:1329, 2003) や高脂肪食肥満マウス、遺伝性肥満モデルマウスを用いて、骨格筋 AMP キナーゼ活性をアウトプットとする初めての解析手法によって糖脂質代謝調節における視床下部メラノコルチン系の意義を検討した(図1)。

研究方法

1週間をかけてマウス脳室内カニューレ、皮下カニューレを留置・馴化させ、カニューレより以下に述べる薬剤を脳室内投与(一日2回、5日間)し、皮下カニューレからの過剰量抱水クロラール投与にて麻酔後、骨格筋のサンプリングを行う。この方法は実験上の様々なストレスや飼育環境によって容易に変動する骨格筋 AMP キナーゼ活性を極めて安定的かつ再現性をもって評価することが出来る画期的な方法であり、私達が最近、確立に成功したものである(図2)。骨格筋 AMP キナーゼ活性化の評価にはリン酸化 AMP キナーゼ抗体、AMP キナーゼの直下流に位置する ACC(アセチル CoA カルボキシラーゼ)リン酸化抗体、サ

ムスペプチドを用いた酵素活性の測定と骨格筋中性脂質含量測定を利用した。視床下部が制御する骨格筋 AMP キナーゼ活性化の経路におけるメラノコルチン系の関与を明らかにする目的で、骨格筋 AMP キナーゼ活性化が持続的に上昇しているレプチン高感受性遺伝子操作マウス(Masuzaki H et al. Diabetes 48:1615, 1999, J. Clin. Invest. 105: 749, 2000, J. Clin. Invest. 105: 1243, 2000)に対するメラノコルチン受容体アンタゴニスト(SHU9119)あるいはメラノコルチンアゴニスト(MT-II)の脳室内投与を行い、骨格筋 AMP キナーゼ活性化を解析した。内因性メラノコルチン拮抗物質、agouti 蛋白を視床下部で異所性に高発現する遺伝性肥満 KKA^y マウスや高脂肪食肥満マウスに対する同様の検討を行い、“視床下部メラノコルチン系のどのステップが骨格筋 AMP キナーゼ活性化の作用に関わるのか”を種々の病態モデルマウスで検討した。

研究結果

メラノコルチン受容体アゴニスト(MT-II)の脳室内投与は骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化を顕著に亢進させた(図3)。レプチンによる骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化の増加はメラノコルチン受容体アンタゴニスト(SHU9119)の脳室内共投与(図4)、あるいは内因性メラノコルチン拮抗物質、agouti 蛋白を視床下部で異所性に高発現する遺伝性肥満 KKA^y マウスにおいて明らかに減弱していた。高脂肪食により骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化が低下していたレプチン過剰発現トランスジェニックマウスに対するメラノコルチン受容体アゴニスト(MT-II)の脳室内投与は骨格筋 AMPK および ACC のリン酸化を上昇させ、回復させた。

考察

標準食では痩せ、インスリン感受性亢進(2, 3)、糖脂質代謝の亢進を認めるレプチン過剰発現トランスジェニックマウスも4週間の高脂肪食負荷により野生型同胞と同程度の肥満とインスリン抵抗性、高中性脂肪血症(4)を示し、レプチン抵抗性を来す。この時、持続的亢進が認められていた骨格筋 AMP キナーゼ活性も著明に減弱し、骨格筋中性脂肪含量は明らかに増加するがマウスを標準食に戻すと一転、骨格筋 AMP キナーゼ活性の速やかな上昇に伴って対照よりも急峻な体重減少とインスリン感受性亢進の回復が認められる。私達の研究は高脂肪食によるレプチン抵抗性の誘導にはレプチン-骨格筋 AMP キナーゼ経路の可逆的障害を伴うことを世界で初めて実証したものであり、従来、レプチン感受性の程度はレプチン単回投与による摂食抑制の度合いをもって評価されてきた

が、この研究から骨格筋 AMP キナーゼ活性が視床下部におけるレプチン感受性を鋭敏に反映する新規の優れた生化学的指標となることが示された。本研究では、私達が確立に成功した“脳室内カニューレ留置手術により非拘束下の状態で骨格筋における AMP キナーゼ活性を精密に測定する系”を活用し、骨格筋 AMP キナーゼ活性をアウトプットとする世界で初めての解析手法によって視床下部メラノコルチン系の意義に関する新しい知見を提供するものであり、中枢性摂食異常症のメカニズムの解明、および治療法の開発に寄与することが期待される。

結論

骨格筋 AMPK の活性化の減弱が高脂肪食によって誘導されるレプチン抵抗性とよく相関すること、メラノコルチンアゴニストは高脂肪食で誘導されたレプチン抵抗性の状態にも効果を発揮することが明らかとなり、過栄養による中枢性摂食異常の機序解明に寄与することが期待される。

健康危険情報

特記事項はない。

研究発表

論文発表

1. Tomita T, Masuzaki H, Iwakura H, Fujikura J, Noguchi M, Tanaka T, Ebihara K, Kawamura J, Komoto I, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Doi R, Shimada Y, Hosoda K, Imamura M, Nakao K. Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. Diabetologia. 2006 49(5):962-968.
2. Ebihara K, Kusakabe T, Hirata M, Masuzaki H, Miyanaga F, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H, Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda K, Ogawa Y, DePaoli AM, Fukushima M, Nakao K. Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. J Clin Endocrinol Metab. 2007 92(2):532-541.

知的財産権の出願・登録状況(予定も含む。)

すべて準備段階であり、今後の申請予定である。

レプチン作用における中枢メラノコルチン系の意義

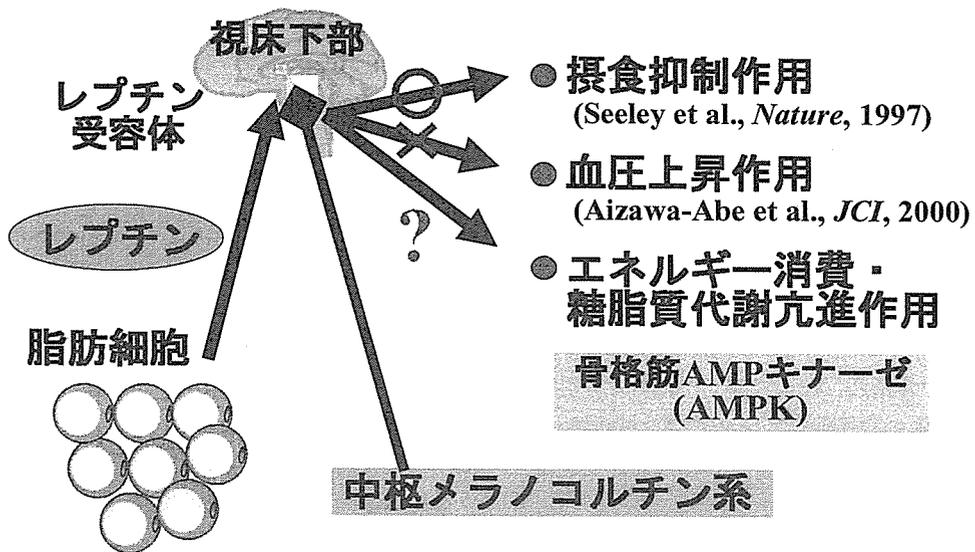
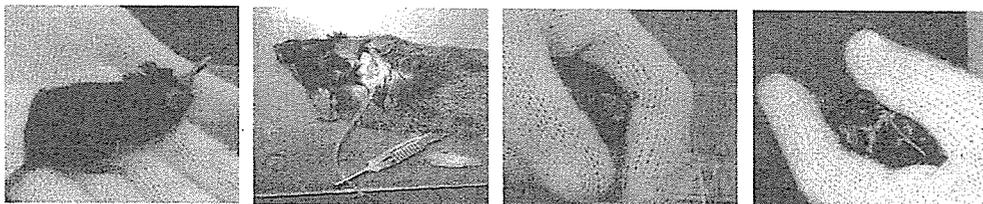
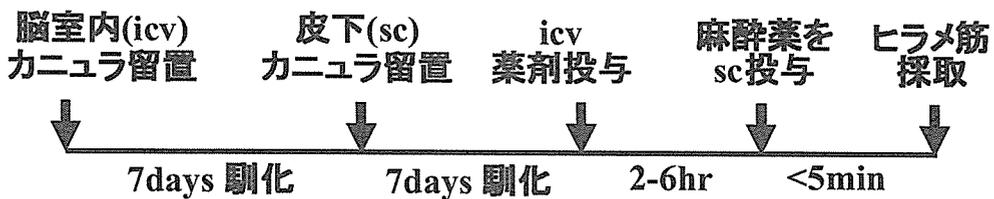


図1

プロトコル



8週齢雄性C57BL/6マウス

図2

MT-II 脳室内投与により骨格筋の AMPK、ACCのリン酸化は増加した

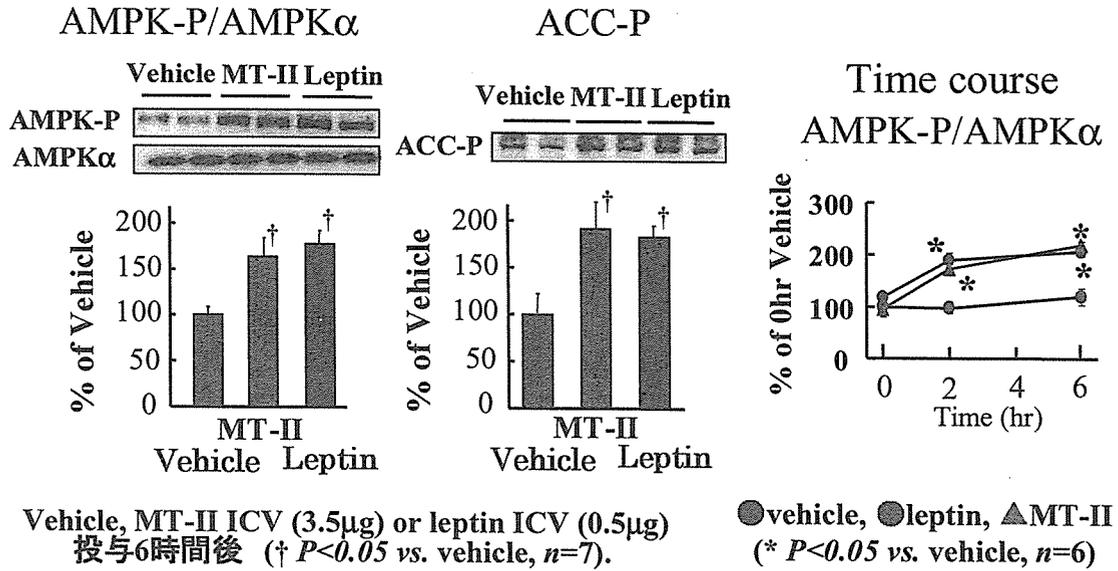


図3

レプチン脳室内投与によるAMPK、ACCリン酸化の亢進はSHU9119の共投与により減弱した

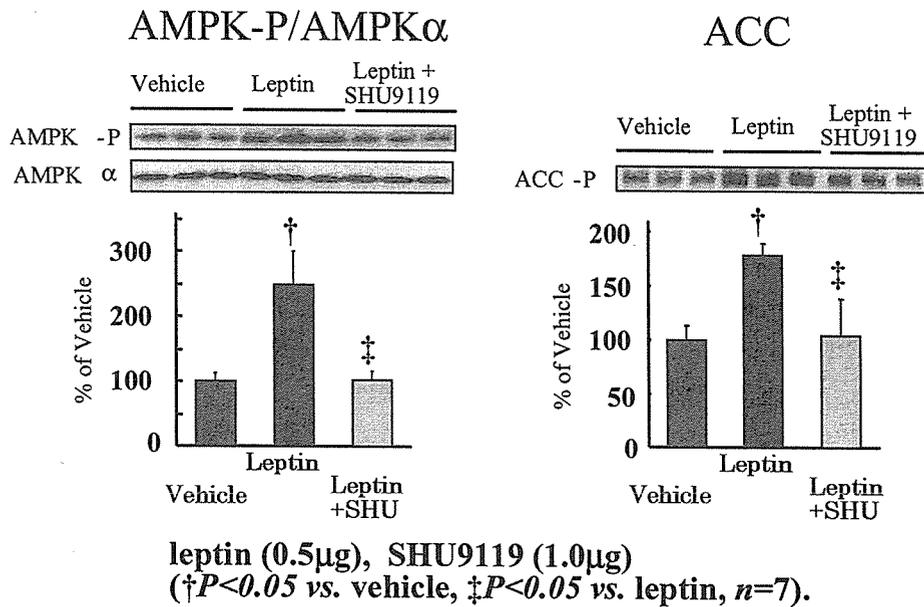


図4

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

PTHrP の食欲・体重調節に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 乾 明夫 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 社会・行動医学講座(心身医療科) 教授

研究要旨 平成18年度は、1)アシル及びデスアシルグレリンと摂食障害の病態、2)新たなグレリン遺伝子産物であるオベスタチンの作用、および3)悪液質にかかわる可能性のある副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)の作用を検討してきた。1)および2)の解析にはなお時間を要するために、次年度に報告し、今年度はPTHrPの作用を報告する。PTHrPは高Ca血症を引き起こす原因物質であるが、食欲・体重調節に及ぼす影響はよく知られていない。我々はPTHrP末梢投与がマウス、ラットにおいて、迷走神経を介して食欲を抑制し、空腹期の胃・十二指腸運動を食後期のパターンに変化させ、胃排出能を抑制すること、そしてPTHrP連続投与により、体重減少が生ずることを明らかにした。この作用は食に対する嫌悪によるものでないこと、また視床下部のウロコルチンを介する可能性が考えられた。以前の我々の検討成績とあわせ、PTHrPは高Ca血症を介さない特異的な食欲抑制効果を有し、悪液質の病態に深くかかわるものと考えられた。

研究目的

摂食障害を始めとする悪液質には、多くのペプチド、アミンの関与が想定されているが、副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)はその成因の一つと目されているが、未だ明らかではない。今回我々はこのPTHrPの食欲・体重調節及び消化管運動に及ぼす影響をマウス及びラットを用いて検討した。

研究方法

マウス及びラットの腹腔内/静脈内にPTHrPを投与し、摂食行動や消化管運動の検討を行った^{1,2}。消化管運動の詳細な解析はラットを用いて行ったが、この目的のためにバルーンカテーテルを胃及び十二指腸に挿入し、内圧法を用いて無麻酔下の条件で測定した²。迷走神経求心線維の神経活動は、既報のごとく^{1,2}、ラットを用いて麻酔下にて測定した。またPTHrPの食欲に及ぼす影響は、迷走神経切断下にて検討した。胃排出は既報¹の方法を用い、一定重量のペレットを与えた後の胃内の残存ペレットを乾燥重量であらわし、胃排泄能とした。

グレリン投与後の視床下部ペプチドの発現はRT-PCR法を用いて行い、一連の食欲促進系ペプチド(NPY, AgRP, orexin, MCH など)及び食欲抑制系ペプチド(CART, POMC, NMU, CRF, Urocortin など)の変化を測定

した¹。同時にc-fosの発現を免疫染色法を用いて検討した。

研究結果

PTHrP末梢投与は食欲を抑制し、この作用は迷走神経切断にて消失した(図1)。PTHrPは空腹期消化管運動を抑制し、食後期の運動パターンを誘発した(図2)。またPTHrPは、胃排泄能を抑制した。(図3)。PTHrP投与により、視床下部ウロコルチンの発現が増加した(図4)。c-fosの発現は、PTHrP投与により、視床下部室傍核などに認められた。

考察

PTHrPは高Ca血症の原因物質として知られているが、その作用の詳細は明らかではない。我々は尾形らとともに、PTHrPが食欲抑制作用を有すること、そしてその抑制効果は高Ca血症によるものでないことを認めてきた³。今回、PTHrPは末梢投与にて摂食抑制作用を発現すると同時に、消化管運動に影響を及ぼすことが判明した。すなわち、空腹期の胃・十二指腸運動を、食物の非存在下に食後期様の運動に変換し、胃排出能を抑制した。したがって、PTHrPの食欲抑制作用の一部は、消化管運動の抑制効果に基づく可能性が考えられる。PTHrPの食欲抑制作用は、迷走神経切断にて消失し、また迷走神経胃枝および肝枝の求心性神経活動を上昇させた(未発表)。P

THrPは視床下部のウロコルチン2及び3のmRNAの発現を増加させ、その食欲抑制作用はウロコルチンの抗体投与により、少なくとも一部解除された(未発表)。c-fosの発現は室旁核に認められることとあわせ、PTHrPの作用は迷走神経により視床下部に伝えられ、ウロコルチンを介して食欲抑制作用を発現させる機序が考えられた。PTHrPは食欲のみならず、連続投与にて体重を減少させるところから、PTHrPの絶対的及び相対的高値のみられる悪液質の成因や病態にかかわる可能性が考えられる。

結論

PTHrPは食欲や消化管運動は特異的な抑制効果を示し、悪液質の成因に関与する因子として重要である可能性が考えられた。

参考文献

1. Asakawa A et al.: Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120:337-345, 2001
2. Fujimiya M et al.: Neuropeptide Y induces fasted pattern of duodenal motility via Y2 receptors in conscious fed rats. *Am. J. Physiol.* 278:G32-G38, 2000
3. Ogata E.: Parathyroid hormone-related protein as a potential target of therapy for cancer-associated morbidity. *Cancer* 15;88(12 Suppl):2909-11, 2000

健康危険情報

なし。

研究発表

論文発表

1. Hsiao SH, Chung HH, Inui A, Tong YC, Cheng JT: Inhibitory effect of 5-hydroxytryptamine on hyperphagia in mice with genetic overexpression of neuropeptide Y. *Neurosci Lett* 394(3): 256-258, 2006
2. Yasuhara D, Kojima S, Naruo T, Inui A: Relationship between pretreatment laboratory-measured episodes of reactive hypoglycemia and short-term weight restoration in anorexia nervosa: A preliminary study. *Psychoneuroendocrinology* 31(4): 452-8, 2006
3. Inoue H, Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y,

Nishizawa A, Matsumoto M, Teshigawara K, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Notohara K, Katayose K, Okamura H, Kahn CR, Noda T, Takeda K, Akira S, Inui A, Kasuga M: Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. *Cell Metab* 3(4): 267-275, 2006

4. Perboni S, Mantovani G, Inui A: Leptin and des-acyl ghrelin: Their role in physiological body weight regulation and in the pathological state. Eds.: Mantovani G, Anker SD, Inui A, Morley JE, Fanelli FR, Scevola D, Schuster MW, Yeh SS. *Cachexia and Wasting. Fat Loss and Cachexia in Medicine*, Springer-Verlag 247-259, 2006
5. Perboni S, Inui A: Anorexia in cancer: role of feeding-regulatory peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1471): 1281-9, 2006
6. Tanaka M, Nakahara T, Muranaga T, Kojima S, Yasuhara D, Ueno H, Nakazato M, Inui A: Ghrelin concentrations and cardiac vagal tone are decreased after pharmacologic and cognitive-behavioral treatment in patients with bulimia nervosa. *Horm Behav* 50(2): 261-5, 2006
7. Asakawa A, Uemoto M, Ueno N, Katagi M, Fujimiya M, Fujino K, Kodama N, Nanba H, Sakamaki R, Shinfuku N, Meguid MM, Inui A: Peptide YY3-36 and pancreatic polypeptide suppress food intake. *J Gastroenterol Hepatol* 21(9):1501-1502; 2006

学会発表

1. Canadian Embassy (2006.1.18, アメリカ)
Akio Inui: A role for desacyl ghrelin in the regulation of appetite and GI motility
2. 第16回研究会 基礎と臨床の接点(2006.2.8, 大阪)
乾 明夫
グレリンペプチドと食欲・消化管運動調節
3. 第92回日本消化器病学会総会ランチョンセミナー(2006.4.21 福岡)
乾 明夫
脳腸相関からみた消化管ホルモンの作用
4. 日本平滑筋学会特別講座(2006.7.20 岡山)
乾 明夫
グレリン研究の現状
5. 名古屋消化管機能セミナー(2006.9.8 名古屋)
乾 明夫
グレリン研究の現状

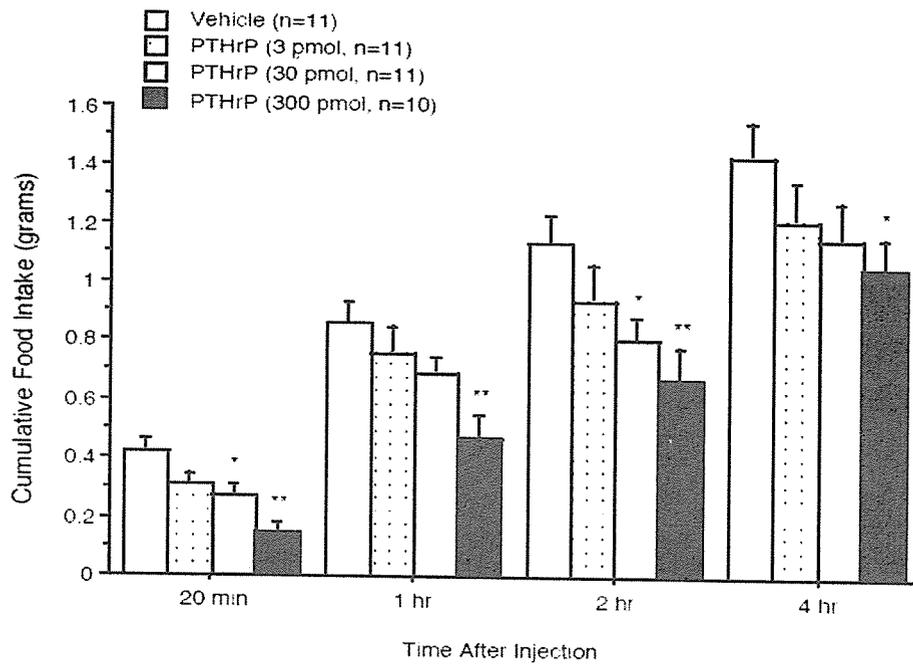


図1. PTHrP末梢投与は、食欲を抑制する

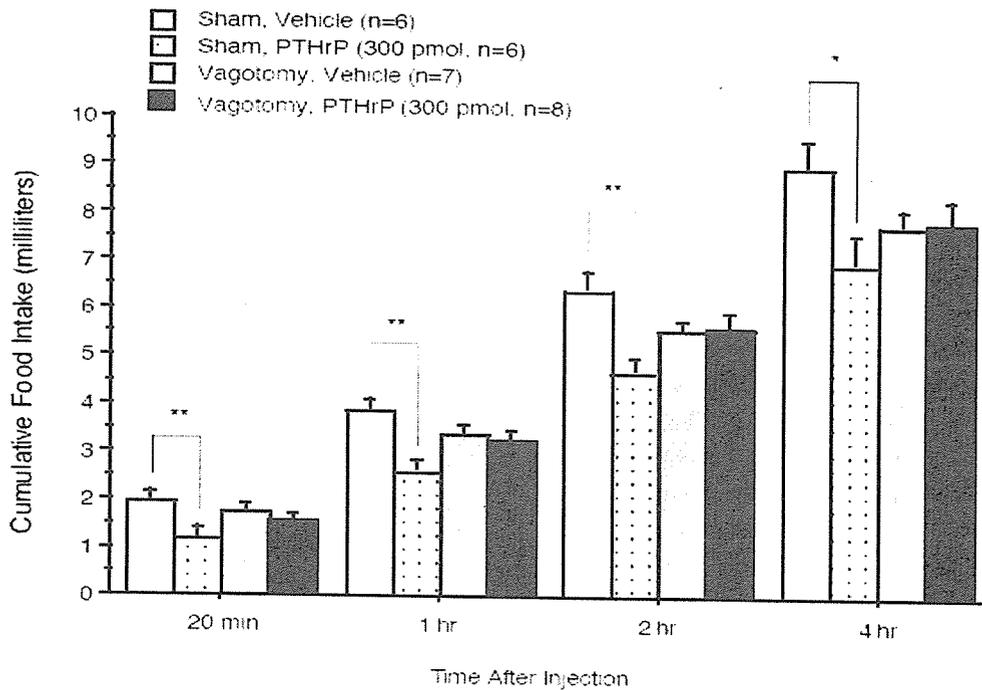


図2. PTHrP摂食抑制作用は、迷走神経切断により消費する

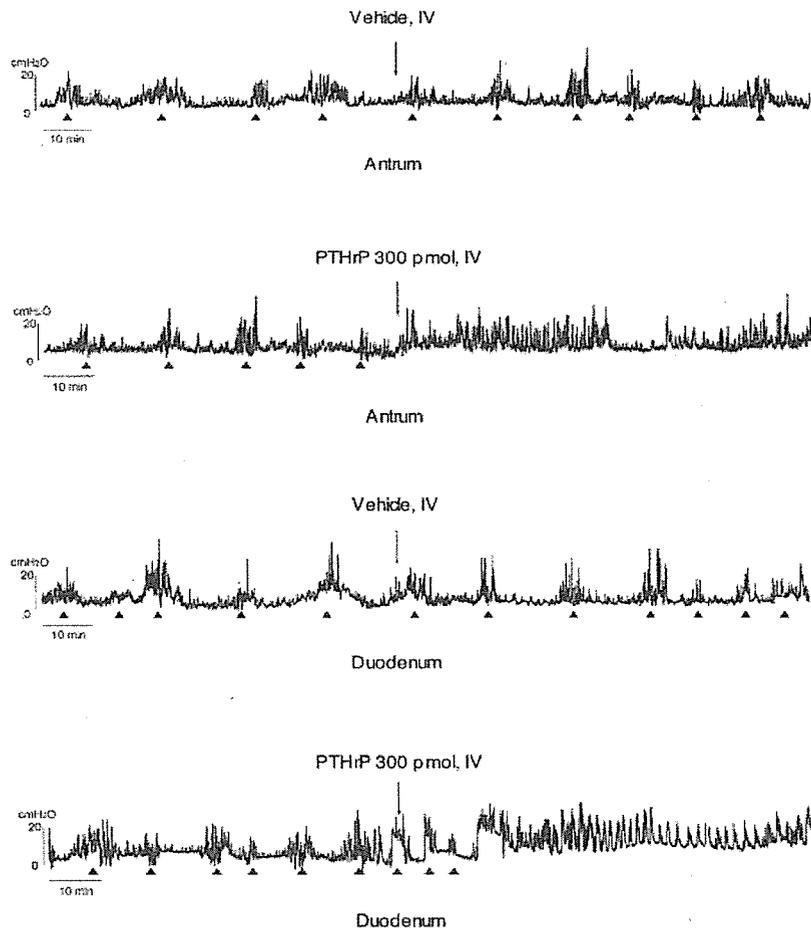


図3. PTHrP末梢投与は、食後期様の運動を誘発する

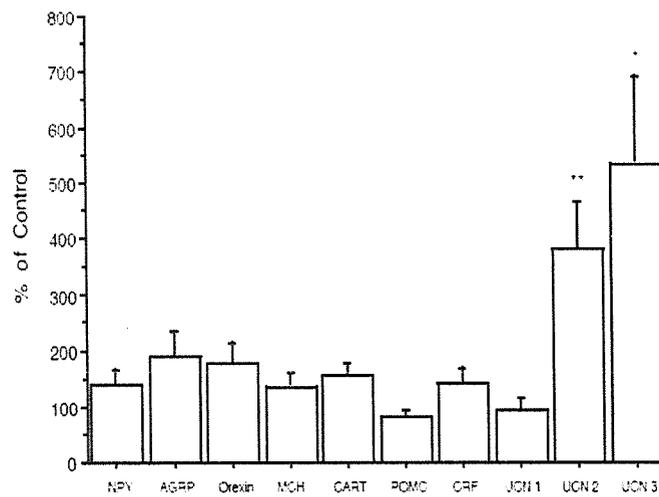


図4. PTHrPは、視床下部ウロコルチン^(2, 3)の m-RNA の発現を増加させる

催眠摂食イメージと空腹度・満腹度および摂食関連物質の検討

分担研究者 久保 千春 九州大学大学院医学研究院心身医学 教授
河合 啓介 九州大学大学院医学研究院心身医学
松原 慎 九州大学大学院医学研究院心身医学

研究要旨 催眠下での満腹イメージが、満腹感・空腹感・胃電図・摂食調節物質に与える影響について検討した。満腹感・空腹感は催眠下の満腹イメージで有意に変化していたが、摂食調節物質の変化を伴っていなかった。

研究目的

我々は催眠下における摂食イメージを用い、健常被験者の主観的な満腹感・空腹感が摂食調節物質や心理的因子からどのように影響を受けているかについて検討を行った。

研究方法

【実験1】対象は健常女性 22 名(平均年齢 20.6±0.99)。予め SDS, STAI, DES にてうつ・不安・解離傾向を測定し、病的水準の者を除外した。ハーバード集団催眠感受性尺度形式 A(HGSHSA)を行い、被験者の被暗示性を測定し、被験者を A.催眠摂食イメージ群, B.催眠リラクゼーション群, C.閉眼安静群に無作為に分類。被験者は前夜 21 時より絶食で実験に参加。実験は当日 9 時より開始し、60 分間安楽椅子上安静・読書とした。安静後に採血を行った後、A・B 群に対しては催眠誘導を行った。誘導後、A 群には摂食イメージを、B にはリラクゼーションイメージを暗示した。C 群は安楽椅子上閉眼安静を保持した。A 群は被験者の満腹感が十分出たら、催眠摂食イメージを終了し、採血後、解催眠した。B・C 群は介入開始 60 分後に採血した。

【実験2】対象は健常女性 6 名(22.2±1.6)、胃電図を装着の上、上記のプロトコルの A 群と同様の介入を行った。加えて、イメージ後の採血の後、サンドイッチ(約 300kcal)とミネラルウォーター200ml を 15 分以内に食べてもらい、安楽椅子安静 60 分とし、その後採血して終了した。実験 1,2 ともに患者血液中の ghrelin, leptin, insulin, glucose を測定した。

【統計】満腹感・空腹感についてはクラスカルウォリスの比較を行い、ボンフェローニの方法で下位検定を行った。各種摂食調節物質の変化については ANOVA で比較検

討した。また、満腹感・空腹感の変化に最も影響した因子を調べるために重回帰分析をステップワイズ法で行った。

(倫理面への配慮)

九州大学倫理委員会承認 全被験者は文書による説明をうけ、同意書に署名した。

研究結果

1. 満腹感は摂食イメージ群のみが有意に上昇していた【図 1】。
2. ghrelin, leptin, insulin, glucose は催眠下の摂食イメージの影響を受けなかった。【図 2 に ghrelin, leptin のみ示す】
3. 満腹感に最も寄与する因子は「摂食イメージ」の暗示であった。
4. 胃電図には、実食で不変・促進・停滞するタイプがある。
5. 催眠摂食イメージによる蠕動波は実食時の蠕動波と関連する傾向があるが、ghrelin との関連は明確ではない。
6. 催眠摂食イメージ後と実食後では有意差は認められなかったが、実食によって ghrelin は安静時と比べ有意に低下した。

考察

催眠摂食イメージは空腹感・満腹感に影響するが、定期的に胃電図の蠕動波の増強を伴わず、また、液性の摂食調節因子とは必ずしも一致していない。

空腹感・満腹感は大脳のレベルでも影響を及ぼすと思われる。

今後、胃電図の動きの分類や被暗示性と摂食調節因子について、症例を増やして検討することが必要である。

結論

催眠暗示による摂食イメージは、自覚症状は変化させたが、血漿 ghrelin などの摂食調節因子には有意差は認められなかった。

この結果から、暗示による空満感の変化は、ghrelin や leptin などの摂食調節因子を介さない pathway で引き起こされている可能性がある。

健康危険情報

特になし

研究発表

学会発表

1. Shin Matsubara, Keisuke Kawai, Takehiro Nozaki, Yuya Fujiwara, Yu Yamada, Masato Takii, Chiharu Kubo, Hypnotic imagery of eating (fullness) influences ghrelin secretion. 18th World Congress on Psychosomatic Medicine 2005/08/26 於 Kobe Convention Center (Kobe city)
2. 松原 慎, 河合啓介, 野崎剛弘, 藤原裕矢, 山田 祐, 瀧井正人, 久保千春 「催眠イメージが食調節ペプチドに与える影響」 第 1 回日本摂食障害学会

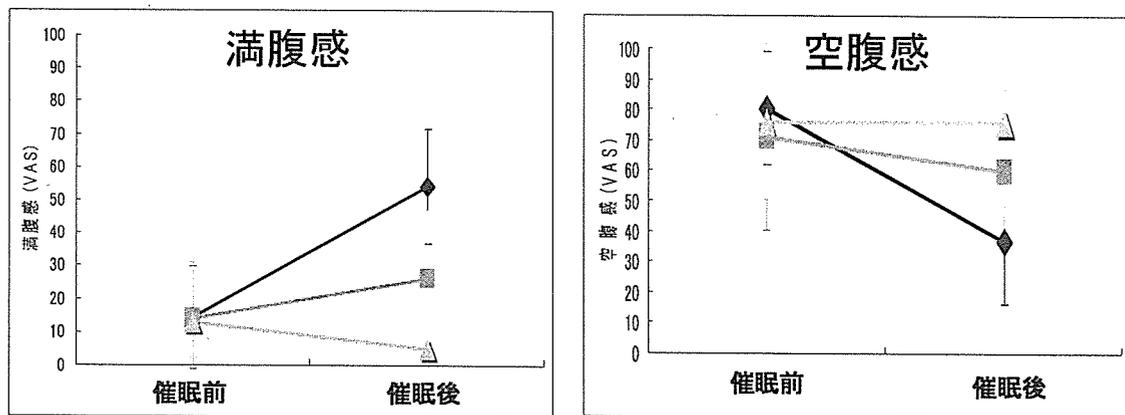
2005 年 10 月 22 日 於 大阪市(大阪市立大学阿倍野キャンパス)

3. 松原 慎, 河合啓介, 野崎剛弘, 藤原裕矢, 山田 祐, 瀧井正人, 久保千春「催眠下の摂食イメージは血漿グレリン濃度を上昇させる」日本臨床催眠学会第 7 回大会 2005 年 12 月 3 日 於 大阪府(大阪国際大学守口キャンパス)
4. 松原慎、河合啓介、山田祐、藤原裕矢、野崎剛弘、瀧井正人、久保千春 「催眠における摂食イメージは血漿グレリン濃度を上昇させる」 第 47 回日本心身医学総会 2006/05/31 於 東京都(日本教育会館)
5. 松原慎、河合啓介、山田祐、野崎剛弘、瀧井正人、久保千春 「催眠による摂食イメージは被暗示性の高い被験者において血漿グレリン値を高くする」第 52 回日本催眠医学心理学会&国際サイコセラピー会議インジャパン 2006/08/31 於 東京都(京王プラザホテル)

知的財産権の出願・登録状況

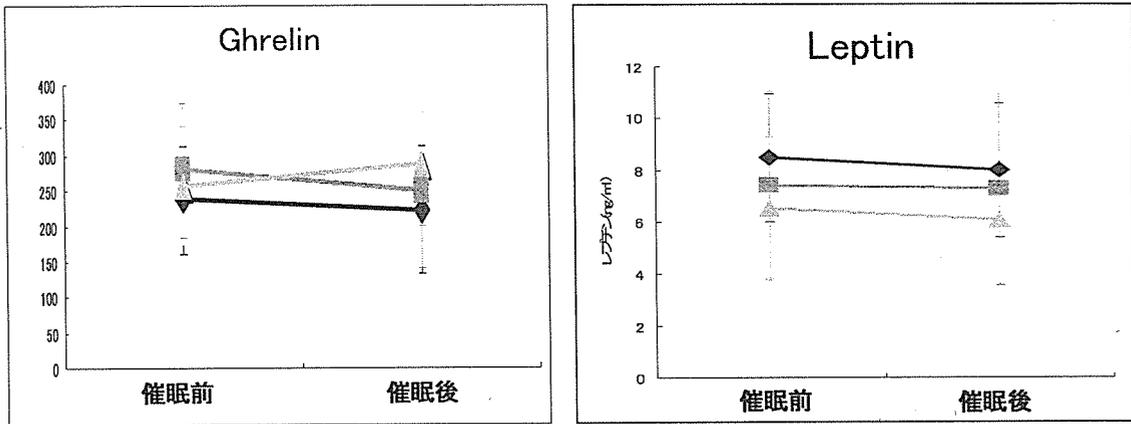
なし

図 1.空腹感・満腹感の催眠前後の変化



◆催眠摂食イメージ群
■催眠リラクゼーション群
▲対照群

図 2. 各群間における催眠前後の変化(血液)



◆ 催眠摂食イメージ群
■ 催眠リラクゼーション群
△ 対照群