

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 芝 崎 保

平成 20 (2008) 年 3 月

# 目 次

I.	総括研究報告書	
1.	中枢性摂食異常症に関する調査研究	1
	日本医科大学大学院医学研究科生体統御科学 芝崎 保	
II.	分担研究報告書	
1.	神経性食欲不振症の無月経の生じる機序の考察: 下垂体ウロコルチン2のゴナドトロピン分泌調節機構への関与の解明	7
	日本医科大学大学院医学研究科生体統御科学 芝崎 保	
2.	摂食異常症における前頭前野機能に関する研究	12
	大分大学医学部 生体分子構造機能制御講座・内科学第一 吉松 博信	
3.	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	17
	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.	グレリン・ノックアウトマウスの解析	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	
5.	レプチンによる視床下部ニューロンの制御機構に関する研究	23
	金沢大学大学院医学系研究科 分子神経科学・総合生理学 桜井 武	
6.	視床下部メラノコルチン系の活性化によるレプチン抵抗性の改善と 骨格筋AMPキナーゼ作用の回復に関する研究	27
	京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科学 中尾 一和	
7.	グレリンファミリーペプチドの食欲・体重調節に及ぼす影響に関する研究	31
	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 社会・行動医学講座行動医学分野 乾 明夫	
8.	神経性食欲不振症患者の入院中のエネルギー摂取と体重や体組成の変化に関する研究	35
	九州大学大学院医学研究院心身医学 久保 千春	
9.	血圧計一体型携帯心電図計を用いた神経性食欲不振症患者の循環器機能の評価	40
	東京大学大学院医学系研究科 ストレス防御・心身医学 熊野 宏昭	
10.	神経性食欲不振症患者家族に対する心理教育のためのDVDの作成	44
	政策研究大学院大学 保健管理センター 鈴木(堀田) 眞理	
11.	機能的摂食不振患者に対するグレリンの有用性に関する研究	46
	国立循環器病センター研究所 寒川 賢治	

12. 神経性食欲不振症におけるグレリンの栄養状態の改善効果に関する第Ⅱ相試験に関する研究	50
政策研究大学院大学 保健管理センター 鈴木(堀田) 眞理	
13. 神経性食欲不振症のプライマリケアのためのガイドライン(2007年)	53
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	59
IV. 平成19年度 研究者名簿	67

中枢性摂食異常症に関する調査研究

平成 19 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	日本医科大学大学院医学研究科生体統御科学 教授
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・行動医学講座行動医学分野 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
	寒川 賢治	国立循環器病センター研究所 所長
	久保 千春	九州大学大学院医学研究院心身医学 教授
	熊野 宏昭	東京大学大学院医学系研究科ストレス防御・心身医学 准教授
	児島 将康	久留米大学分子生命科学研究科遺伝情報研究部門 教授
	桜井 武	金沢大学大学院医学系研究科分子神経科学・統合生理学 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
	吉松 博信	大分大学医学部生体分子構造機能制御講座・内科学第一 教授

**研究要旨** 本研究の目的は、患者数が増加している中枢性摂食異常症の病因、病態の解析を行い、その成果に基づいた本症の治療法を開発することである。この目的のため、摂食・エネルギー代謝調節機構の解明、本症の病因・病態の基礎及び臨床的解明と共に治療開発研究を行った。基礎的研究では、中枢性摂食異常症の発症や病態に関与していると考えられている視床下部、前頭前野の機能の解析が進んだ。グレリンノックアウトマウスの表現型の解析、視床下部のレプチンに対する感受性調節機構とレプチンの作用機序の解明、エネルギー摂取制限で脂肪細胞に発現する遺伝子の特定とその機能解析等を行い、摂食・エネルギー代謝調節機構の詳細が明らかになった。また神経性食欲不振症の無月経の生じる機序の解明も進んだ。臨床的研究では神経性食欲不振症におけるオベスタチンの分泌パターンや循環器系の解析、神経性食欲不振の摂取カロリーと体重増加パターンとの関係の解析を行った。治療開発研究では、機能性胃症を対象としたグレリンの臨床試験でグレリンの空腹度増加作用と摂食量増加作用が、神経性食欲不振症の臨床試験でもグレリンの空腹度と摂食量の増加作用、さらにその後の経過観察中の体重増加効果等が、それぞれ重篤な有害事象をもたらすこともなく、認められた。家族に神経性食欲不振症に対する理解と治療への協力を得るために患者の家族を対象とする心理教育プログラム用の DVD を作製した。一般医を対象とした神経性食欲不振症のプライマリケアのためのガイドラインを完成させた。

研究目的

本研究の目的は摂食・エネルギー代謝調節機構の解明と中枢性摂食異常症の病因、病態の基礎的・臨床的解析の成果に基づいた中枢性摂食異常症の新たな治療法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、発生工学的手法を主として用いた中枢性摂食調節機構の基礎的研究、中枢性摂食異常症の病因・病態解明のための基礎及び臨床的研究、さらに神経性食欲不振症の治療開発に関する研究を行った。

研究方法

基礎的研究として、摂食・エネルギー代謝調節物質およびそれらの受容体の遺伝子改変動物を用いた摂食・エネルギー代謝調節機構の解析と、中枢神経系内の神経伝達物質を基にした中枢性摂食異常症の病態に関する解析を行った。病態解析に関する臨床的研究として、食欲イメージの摂食調節物質への影響、循環器機能の解析を行った。治療開発のため、グレリンの神経性食欲不振および機能性食欲不振における臨床試験を行った。さらに神経性食欲不振患者の家族の心理教育プログラム用の

DVD と、エビデンスに基づいた神経性食欲不振症のプライマリケアのためのガイドラインを作成した。

(倫理面への配慮)

健常者及び中枢性摂食異常症患者を対象とした臨床的研究は、その意義を十分に説明し、同意を得た上で、各研究施設で定められた臨床研究の規定に従って慎重かつ注意深く行った。実験動物を用いた研究は、実験動物飼育及び保管に関する基準、各研究施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

## 研究成果および考察

<infralimbic cortexの機能と中枢性摂食異常症> 中枢性摂食異常症発症への前頭前野の関与を明らかにするために前頭前野のinfralimbic cortexの機能解析を行い、同部の体重、活動量、体温、食行動、活動量の日内リズムの調節への関与、同部でのオレキシンAおよびBの食行動誘発作用を明らかにしてきた。今年度は同部の破壊実験により、同部がストレス情報の受容と処理を行い、ストレスにより誘発される摂食行動抑制機序に関与していることを明らかにした。これより同部の中枢性摂食異常症発症への関与の可能性が推測される。(吉松)

<神経性食欲不振症の無月経が生じる機序の解析> 神経性食欲不振症の主要症状の一つである無月経は体重減少後のみならず体重減少前にも生じる。この機序にはcorticotropin releasing factor(CRF)によるゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)の分泌抑制が関与していると考えられている。CRFファミリーペプチドであるurocortin2(Ucn2)が下垂体ACTH分泌細胞に発現し、その遺伝子発現、分泌がCRFにより亢進し、Ucn 2はゴナドトロピン分泌細胞に作用してゴナドトロピンの発現と分泌を抑制することを明らかにした。従って、本症で過剰分泌されているCRFは視床下部からのGnRH分泌を抑制するばかりでなく、下垂体レベルでもUcn2を介して性腺抑制、無月経をもたらすと考えられる。(芝崎)

<グレリン欠損マウスの表現型> 摂食促進ホルモンであるグレリンの欠損マウスは致死性でなく、形態的異常、体重、摂食量、行動に変化はなかったことを前年度に報告した。今年度はさらに詳細に解析し、同欠損マウスは血圧不安定、体温維持機構の異常、消化管運動の低下、血圧・体温の日内リズムの異常など、自律神経系の機能異常を呈することが明らかになった。中枢性摂食異常症で認められる循環器系、体温、消化管機能の異常の出現機序へのグレリン作用の異常の関与の有無の解析が必要である。(児島)

<レプチンによる視床下部神経の活性制御機序> 摂

食抑制物質であるレプチンの摂食促進機能を有する視床下部オレキシン神経やNPY神経への作用機構をdb/dbマウスやSTAT3コンディショナルKOマウスのオレキシン神経を用いて解析した。その結果、レプチンはこれらの神経に対し、PI3KやATP感受性Kチャネルの活性化を介して電気生理学的な影響を与えるが、この系にはSTAT3の活性化は必要でないことが明らかにされた。しかしながら、in vivoの慢性実験結果からレプチンによる長期的な体重制御にはSTAT3の活性化経路が必須であることも明らかになり、レプチンの急性作用と慢性作用の機序に差異があることが明らかにされた。(桜井)

<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> 神経性食欲不振で見られる極端なダイエットにより生じる脂肪組織と骨格筋の代謝変化に関する研究を進めている。カロリー制限により体重が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Xを選別し、昨年度は遺伝子Xが脂肪細胞肥大化抑制作用を有することを証明したが、今年度は遺伝子Xを過剰発現するトランスジェニックマウスの作成に成功し、現在代謝関連表現型の解析中である。絶食や摂取カロリー制限で骨格筋にFOXO1の遺伝子発現が誘導され、これが骨格筋萎縮に関連することを明らかにした。これらの物質の変化を通して中枢性摂食異常症の病態解析を進める。(小川)

<レプチン抵抗性機序の解明> 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。高脂肪食負荷のレプチントランスジェニックマウスやagoutiマウスにメラノコルチン4型受容体(MC4R)アゴニストを脳室内投与すると摂食量が減少し、低下していた骨格筋AMPK活性が回復した。以上より、高脂肪食により生じたレプチン抵抗性の原因はMC4Rより上位のシグナル伝達障害である可能性が示され、MC4Rの活性化がレプチン抵抗性を解除することから同アゴニストが過食の治療に応用される可能性が期待される。(中尾)

<神経性食欲不振症の血中オベスタチン> 摂食促進作用を有するグレリンと同じ遺伝子から合成されるオベスタチンの分泌状態を神経性食欲不振症において検討した。健常対照群と比較し神経性食欲不振症の血中オベスタチン濃度は有意に高く、糖負荷にてグレリンと同様にその抑制は遷延化した。血中オベスタチンは肥満者では有意に低値を示し、BMIと逆相関関係を呈した。血中オベスタチン濃度が体重により異なることはオベスタチンがエネルギー代謝に関与する可能性を示唆するものと推測される。(乾)

<エネルギー摂取量が入院中の神経性食欲不振症患者

者の体重、体組成の変化に及ぼす影響>4ヶ月以上の入院中に行動制限を用いた認知行動療法を行い規則正しい体重増加が認められた神経性食欲不振症患者の、1kg体重あたりのエネルギー摂取量と体重増加量の間には正の相関が認められ、入院中のBMIが14 kg/m<sup>2</sup>未満の群は14 kg/m<sup>2</sup>以上の群に比べ、治療開始1ヶ月間は余剰1 Kcalで増える体重増加量は有意に多かった。また別の入院神経性食欲不振症患者を対象に行ったDXA法を用いた解析では、入院時のBMIが14 kg/m<sup>2</sup>未満の群は、BMIが14 kg/m<sup>2</sup>以上の群に比べて治療経過中に有意に除脂肪体重の増加する割合が高かった。以上より、入院時にBMIが極端に低下した症例は余剰エネルギーあたりの体重増加量は多く、体重増加に占める除脂肪体重の増加する割合が高いことが示された。(久保)

<神経性食欲不振症患者の循環器機能の評価> 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いる。昨年度から引き続き神経性食欲不振症患者(AN)の24時間ホルター心電図と24時間血圧測定解析を進めた。AN(n=20)において健常者と比較し、QT variability index (QTVI)が増加しており、健常者で認められる夜間のQTVIの低下がみられなかった。血圧に関しては日中、夜間共にAN(n=10)では平均血圧が健常女性と比較して低値である傾向が見られ、夜間/昼間血圧比の低下が消失しているものの割合が多く見られた。以上よりANにおいては心臓電気生理学的指標の日内リズムや血圧動態が変化しており、これらの変化と自覚症状や突然死との関連が考えられた。(熊野)

<グレリンの機能性摂食不振患者での臨床試験> 機能性摂食不振患者における摂食量低下や体重減少に対するグレリンの臨床効果と安全性について検討する目的で平成16年7月より、京都大学医学部附属病院・探索医療センターにおいて第II相臨床試験を開始し、平成18年11月に機能性胃症患者6例で試験終了した。その解析の結果、主要エンドポイントである一日摂食量はグレリンにより増加傾向を示した。副次エンドポイントでは、Visual Analogue Scale (VAS)による空腹度がグレリン投与直後に有意に上昇し、体重の変動はなかったが体脂肪率の減少傾向と除脂肪率の増加傾向が認められた。重篤な有害事象は認められなかった。以上より、グレリンの安全性と食欲亢進作用が示された。今後、食欲不振に対するグレリンの臨床応用の更なる検討が必要とされる。(寒川)

<神経性食欲不振症でのグレリン臨床試験> グレリンの神経性食欲不振症の治療への応用を目的に、昨年度より施設での倫理委員会で承認された後に文書による承諾を得た入院本症制限型症例に臨床試験を行った。

昨年度の4例のその後の経過と新たな1例の結果の詳細を報告する。3μg/kg体重のグレリンの朝食、夕食前の1日2回静注を連日14日間行った。5例中4例でグレリン投与後の胃蠕動運動の亢進、腹部膨満感や便秘の改善、VASによる空腹感の一過性亢進を認めた。5例の摂食量は8-36%増加し、三大栄養素の全ての摂取が有意に増加した。5例で血中栄養マーカーの改善が認められた。重篤な有害事象は無く、心理テストでもやせ願望、体型への不満、成熟恐怖、過食等の変化も認められなかった。退院後の体重は2例において6kg、1例で3kg、1例で1.6kgとそれぞれ自力による増加が認められ、1例は退院時の体重が維持されていた。社会活動の向上、月経再来もそれぞれ1例ずつ認められた。以上の結果は、グレリンが本症の病態改善薬として使用できる可能性を示すものと考えられた。(鈴木、芝崎、寒川)

<神経性食欲不振症患者家族に対する心理教育のためのDVD作成> 神経性食欲不振症の治療には家族の疾患への正しい理解と有効な協力が不可欠であるため、情報提供を中心とした短期間の集団家族心理教育(家族教室)を継続実施し、その有効性を確認してきた。そこで、家族教室に参加が困難な家族を対象にしての心理教育ツールとして同家族教室の内容をまとめたDVDを作成した。内容は疾患の理解、家族の対処指針、治療法であり、DVDを視聴した家族へのアンケート調査で、手軽に複数の家族メンバーで同時に視聴し、話し合うことが出来るとの意見が多く得られた。個別例への対応が出来ないという限界もあるが、DVDは家族の心理教育のための有益なツールの一つになり得ると考えられる。(鈴木)

<一般医のための重症度に応じたプライマリケアのガイドラインの作成> 神経性食欲不振症患者の約7割は一般医を受診する。しかしながら一般医が本症に適切かつ速やかに対応できるためのガイドラインは国内外に見当たらない。そこで、本研究班は一般医のための本症の重症度に応じたプライマリケアのガイドラインの作成に昨年度より取り組み、分担研究者の施設で蓄積された体重別の重篤な合併症の頻度等のエビデンスを基にそのガイドラインを完成させた。今後は多くの一般医に利用されるべく、普及に努めていく。(主任・分担研究者全員)

## 結論

中枢性摂食調節機構の基礎的研究、中枢性摂食異常症の病因・病態に関する基礎的、臨床的研究が引き続き行われ、さらにそれらの詳細が明らかにされた。治療法の開発研究において、①神経性食欲不振症患者の家族のための家族心理教育用DVDが作成された。②グレリンの神

経性食欲不振症における臨床試験が実施され、グレリンの本症における病態改善効果が示された。③神経性食欲不振症患者の重症度に応じたプライマリケアのガイドラインが作成された。

## 健康危険情報

特になし。



平成 19 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

神経性食欲不振症の無月経の生じる機序の考察：  
下垂体ウロコルチン 2 のゴナドトロピン分泌調節機構への関与の解明

主任研究者 芝崎 保 日本医科大学大学院医学研究科 生体統御科学 教授  
根本 崇宏 日本医科大学生理学(生体統御学)

**研究要旨** 神経性食欲不振症の主症状の一つに無月経がある。この機序には本症で過剰分泌されている CRF(corticotropin-releasing factor)による視床下部レベルでの GnRH(gonadotropin-releasing hormone)の分泌抑制作用が関与していると考えられる。我々は CRF ファミリーペプチドの一つとして発見された Urocortin 2 (Ucn 2)がラット下垂体の副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞に発現し、その遺伝子発現及び分泌が CRF により亢進することを明らかにしている。Ucn 2 の受容体である CRF2 型受容体がゴナドトロピン分泌細胞に存在することから Ucn 2 のゴナドトロピンの遺伝子発現と分泌への影響を検討し、ラット下垂体単層培養系で Ucn 2 が LH と FSH の分泌を抑制し、GnRH 刺激下での LH と FSH の分泌とそれぞれの 8 鎖の遺伝子発現を抑制することを明らかにした。抗 Ucn 2 抗体と CRF 2 型受容体特異的拮抗薬はゴナドトロピンの分泌とそれぞれの 8 鎖の mRNA 発現量を有意に増加させた。未成熟雄ラットの腹腔内への抗 Ucn2 抗体の投与は LH と FSH の分泌とそれぞれの 8 鎖の mRNA 発現量を増加させた。以上より、下垂体の Ucn 2 はゴナドトロピンの遺伝子発現・分泌を抑制的に制御していると考えられることから、神経性食欲不振症では心理ストレスにより分泌が亢進した CRF が視床下部レベルのみならず、下垂体レベルにおいても Ucn 2 の分泌を促進し、それがパラクリン的にゴナドトロピン分泌細胞に作用し、LH と FSH の合成・分泌を抑制することにより性腺系の抑制すなわち無月経をもたらしていると推測される。

### 研究目的

神経性食欲不振症の主症状の一つに無月経があり、無月経の生じる時期は体重減少後のみならず、体重減少と共に、さらには体重減少前にも生じる。従って本症における無月経が生じる機序は体重減少のみでは説明できず、その機序には心理ストレスに伴い分泌が亢進した CRF(corticotropin-releasing factor)が視床下部レベルで GnRH(gonadotropin-releasing hormone)の分泌を抑制する結果、無月経が生じると推測されている。我々は CRFファミリーペプチドの一つとして発見された Urocortin 2 (Ucn 2)がラット下垂体の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)分泌細胞に発現し (Yamauchi, et al. J Neuroendocrinol. 17, 656-663, 2004)、その遺伝子発現及び分泌が CRF により亢進することを明らかにしている (Nemoto, et al. J Endocrinol. 192, 443-452, 2007)。しかし、下垂体から分泌される Ucn 2 量は少なく、その作用部位、作用、生理的意義は全く不明であった。そこで、Ucn 2 の受容体である CRF2 型受容体がゴナドトロピン分泌細胞に多く発現していること (Kageyama, et al. Endocrinology 144, 1524-1532, 2003) に着目し、Ucn

2 のゴナドトロピンの遺伝子発現と分泌への影響を検討した。

### 研究方法

**細胞培養** 160 g ウィスター系雄ラットから摘出した下垂体を前葉、中後葉に分け、ディスパーゼにより細胞を分離後、10% ドナーウマ血清、5% ウシ胎児血清、ペニシリン G (100 units/ml)、ストレプトマイシン (100 mg/ml) を添加した DMEM/F12 メディウム中で、5% CO<sub>2</sub>、37°C 湿潤環境下で 4 日間培養した。実験当日、Ucn 2, GnRH, antisauvagine-30 (CRF2 型受容体拮抗薬)、抗 Ucn2 抗体 (Yamauchi, et al. J Neuroendocrinol. 17, 656-663, 2004)、正常ウサギ IgG を添加した培養液に置換し 4-24 時間インキュベーションした。培養液は LH, FSH の定量に、細胞は AGPC 法による全 RNA 抽出に用いた。

**ラットへの抗 Ucn 2 抗体の投与** 生後 3 週齢のウィスター系雄ラットの腹腔内に 50 あるいは 150µg の抗 Ucn 2 抗体あるいは正常ウサギ IgG を投与し、8 あるいは 24 時間後に断頭採血および下垂体摘出を行った。

**血中ホルモンの定量** LH は Amersham 社の Rat

LH [125I] Biotrak assay system、FSHはBiocode社のRat FSH ELISA kitを用いて測定した。

リアルタイムPCR 細胞・組織から抽出した全RNAはオリゴ(dT)20を用いて42°C 30分、99°C 5分、5°C 5分の条件で逆転写反応を行った。プライマーを用い94°C 5秒、60°C 30秒を40サイクル繰り返す条件でTakara thermal cycler diceで遺伝子を増幅し、2nd derivative max法を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は日本医科大学動物実験指針に従い、実験計画の申請・承諾を得た上で行った。

## 研究結果

### Ucn 2によるゴナドトロピン発現と分泌の抑制

ラット下垂体初代培養細胞へのUcn 2の添加は3, 10, 30pMでLHの分泌を、10pMでFSHの分泌をそれぞれ有意に抑制した(図1)。しかし、それぞれのβ鎖mRNA発現量には有意な変化は見られなかった。

GnRH (1pM)はLHおよびFSHの分泌とそれぞれのβ鎖のmRNA発現量を有意に増加させ、Ucn 2の同時添加はGnRHによるそれらの分泌量とmRNA発現量の増加を有意に抑制した(図2)。

### CRF2型受容体拮抗薬および抗Ucn 2抗体によるUcn 2作用の抑制

Antisauvagine-30は4, 8時間後にFSHの分泌量を、8, 24時間後にFSHのβ鎖のmRNAを有意に増加させた(図3)。抗Ucn 2抗体は24時間後からFSHの分泌量とβ鎖のmRNAを有意に増加させた(図示せず)。

GnRHパルスの出現していない3週齢オスラットの腹腔内への抗Ucn 2抗体の投与は正常ウサギIgG投与ラットに比べ24時間後の血中LHおよびFSH分泌量と下垂体でのLHおよびFSHのβ鎖のmRNA発現量を有意に増加させた(図4)。

## 考察

我々はこれまでにUcn 2がラット下垂体前葉および中葉のPOMC細胞に発現し、その発現がCRFによって促進的に、グルココルチコイドによって抑制的に制御されることを明らかにしてきた。下垂体から分泌されるUcn 2はACTHに比べ少なく、その作用も不明であった。下垂体単層培養系でUcn 2は添加4時間でゴナドトロピン分泌抑制作用を示したが、それぞれのβ鎖のmRNA発現量には変化が見られなかった。Ucn 2はGnRHによるゴナドトロピンの分泌とそれぞれのβ鎖のmRNA発現量促進作用を減弱させた。抗Ucn 2抗体やCRF2型受容体拮抗薬は培養

液中および血中へのゴナドトロピンの分泌と下垂体でのそれぞれのβ鎖のmRNA発現量を増加させたことから、下垂体POMC細胞から分泌されたUcn 2は傍分泌的にゴナドトロピン分泌細胞に作用し、ゴナドトロピンの合成・分泌を持続性に抑制調節している可能性が示された。

神経性食欲不振症では過剰分泌されたCRFが性腺機能を抑制し、無月経や月経異常を引き起こすと推測されている。この機序には、CRFが内側視索前野のGnRHニューロンを抑制してLHおよびFSHの分泌低下を引き起こす経路、CRFが弓状核のPOMCニューロンに作用しβエンドルフィンの分泌を増し、それがGnRHニューロンのμオピオイド受容体を介してGnRHニューロンの活性低下をもたらす経路、さらにCRFがGnRHニューロンに投射しているPOMCニューロンの神経終末にも作用し、βエンドルフィンの分泌を増しGnRHニューロンの活性抑制をもたらす経路等が考えられる(Rivier, and Rivest. Biol. Reprod. 45, 523-532, 1991)。これらのCRFによる視床下部レベルでの性腺系抑制作用に加え、本実験結果から、CRFが下垂体レベルでUcn 2の分泌を刺激し、それが下垂体のゴナドトロピンの合成分泌を抑制して性腺機能抑制、無月経をもたらす機序の可能性が示された。

## 結論

下垂体POMC細胞から分泌されるUcn 2がLH、FSHのmRNA発現と分泌を持続性に抑制調節している可能性を示した。神経性食欲不振症での無月経の発現機序は体重減少のみでは説明できず、ストレスによるCRF分泌の増加の関与が考えられ、CRFにより合成分泌が促進する下垂体Ucn 2がゴナドトロピン分泌を抑制している可能性が示唆された。

## 研究発表

### 論文発表

1. Nemoto T, Iwasaki-Sekino A, Yamauchi N, Shibasaki T. Regulation of the expression and secretion of urocortin 2 in rat pituitary. J Endocrinol. 192 443-452 2007
2. 芝崎 保 摂食異常および栄養障害における難病の現況とその対策 - 中枢性摂食異常症の現況とその対策 - ホルモンと臨床 56 91-95 2008
3. 眞野 あすか、芝崎 保 グレリンのエネルギーマイグレーション調節機構における役割 内分泌・糖尿病科 25. 32-36 2007
4. 根本 崇宏、芝崎 保 摂食調節機構 33. 1105-1108 2007

学会発表

1. 根本 崇宏、山内 直子、芝崎 保 Physiological role of pituitary urocortin 2, a CRF family peptide, in regulatory mechanism of gonadotropin secretion 第 85 回 日本生理学会大会 シンポジウム
2. 根本 崇宏、山内 直子、芝崎 保 下垂体ウロコルチン 2 は LH、FSH の分泌と mRNA 発現を抑制する 第 34 回 日本神経内分泌学会 2007 年 8 月(前橋)

日本内分泌学会雑誌 (2007) 83: 410.

3. 根本 崇宏、山内 直子、芝崎 保 下垂体ウロコルチン 2 の性腺刺激ホルモン三歳細胞への作用 第 80 回 日本内分泌学会総会 2007 年 6 月(東京) 日本内分泌学会雑誌 (2007) 83: 198.

知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)  
なし

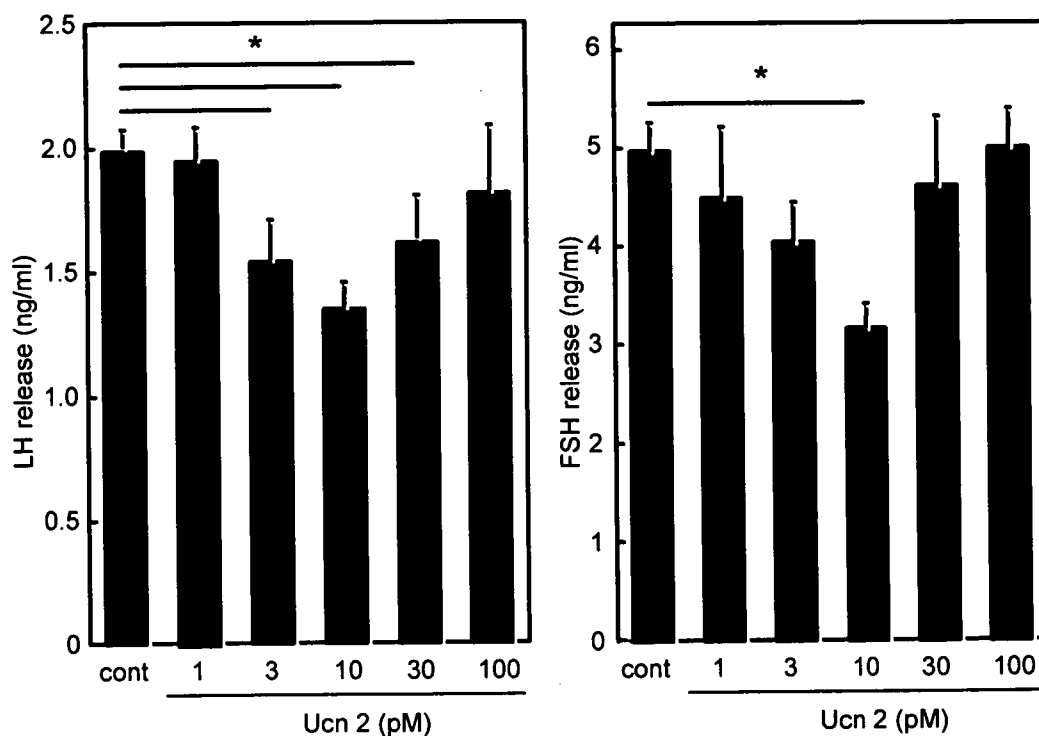


図1 Ucn 2によるゴナドトロピン分泌の抑制

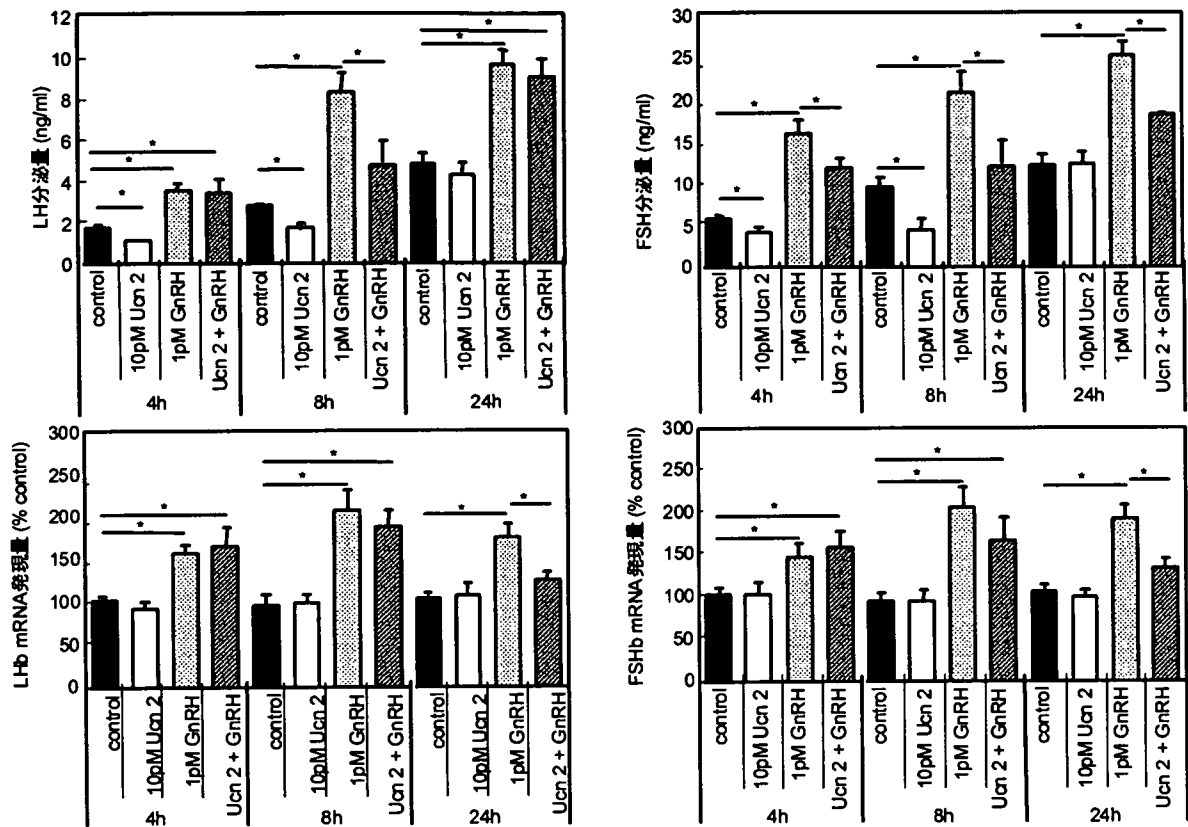


図2 Ucn 2はGnRHによるゴナドトロピン分泌とmRNA発現量を抑制する

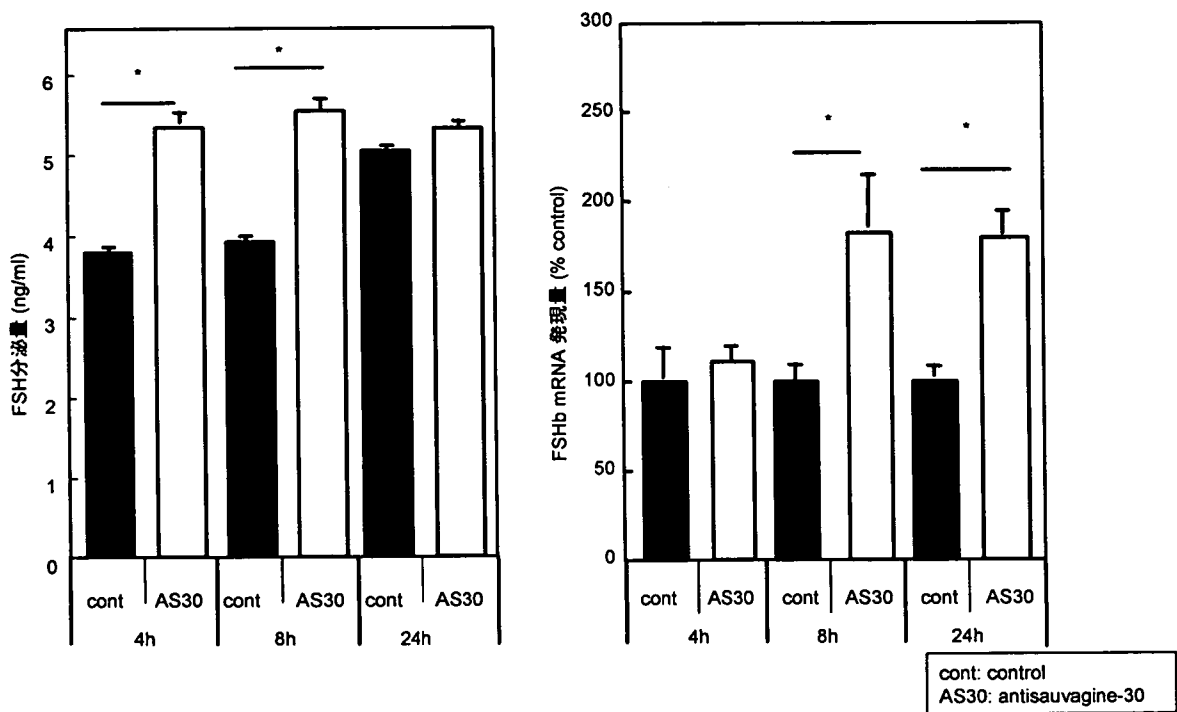


図3 CRF2型受容体拮抗薬のゴナドトロピンの分泌とmRNA発現への影響

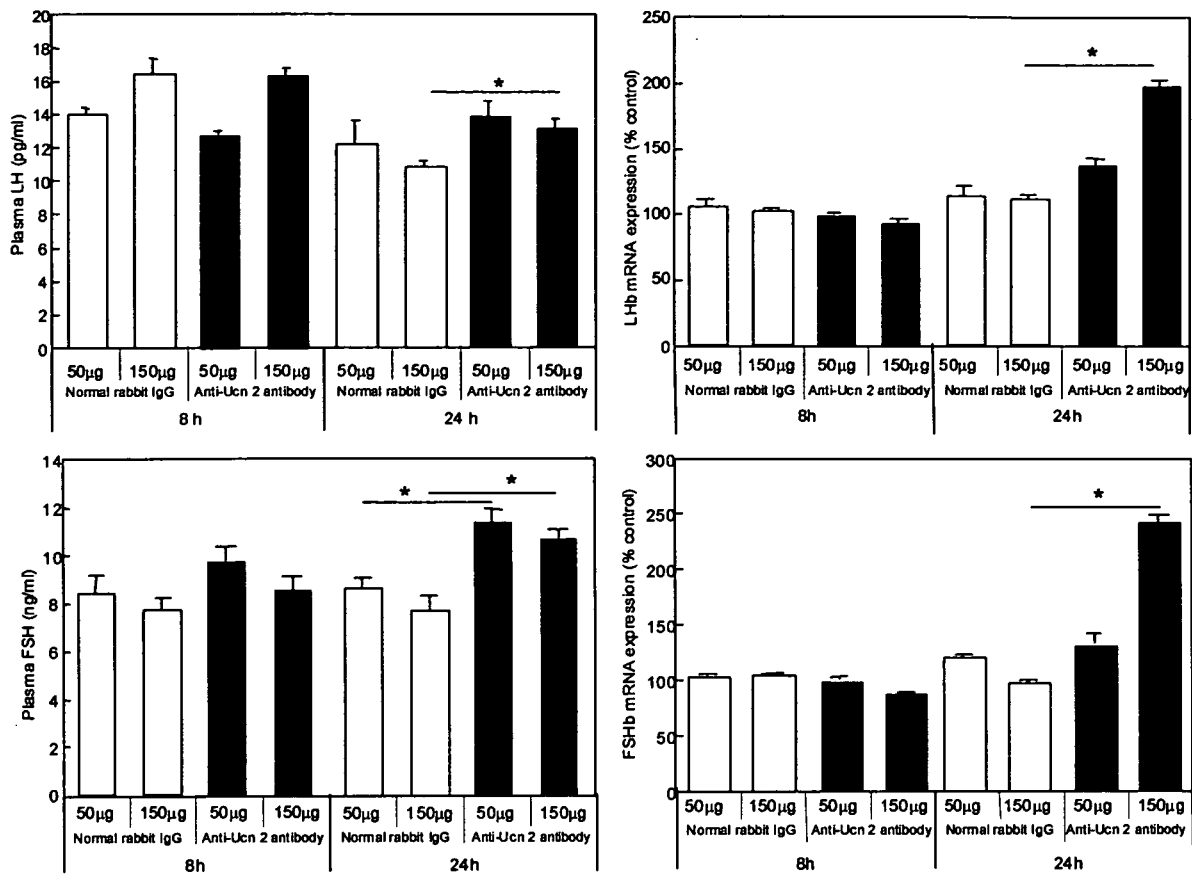


図4 抗Ucn 2抗体の腹腔内投与によるゴナドトロピンの分泌とmRNA発現への影響

費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

摂食異常症における前頭前野機能に関する研究

分担研究者 吉松 博信 大分大学医学部生体分子構造機能制御講座・内科学第一 教授  
千葉 政一 大分大学医学部生体分子構造機能制御講座・内科学第一

**研究要旨** 前頭前野辺縁下皮質(infralimbic cortex; IL)はストレス情報処理に関与するとともに、視床下部と連携して食行動を調節している。一方、摂食異常症の患者ではストレス応答としての食行動反応を制御する脳内機構に、何らかの障害が存在する可能性がある。我々は平成19年度の本研究において、ストレス誘発性の食行動反応におけるILの機能的意義についてラットを用いて検討した。ストレス負荷として、電撃ショックを用いた痛覚ストレス、コミュニケーションボックスを用いた情動ストレス、4時間の拘束ストレス、72時間の飢餓ストレスを用い、ストレス負荷による食行動の変化についてIL破壊の影響を解析した。痛覚ストレスと情動ストレスについては、条件づけによる記憶学習能に対するILの関与を解析した。またエネルギー欠乏モデルとして、インスリン誘発性低血糖による食行動反応に対するIL破壊の効果を調べた。その結果、痛覚ストレス、情動ストレス、拘束ストレスおよび飢餓ストレスによって生じる食行動抑制反応が、IL破壊群では有意に減弱していた。また痛覚および情動ストレスによる条件づけ行動としてのすくみ行動もIL破壊群で減少していた。一方、急性低血糖によって生じる食行動誘発反応は、IL破壊群と対照群の間に有意差を認めなかった。以上より、ILはストレス情報処理およびストレスによる食行動反応の調節に深く関与していることが示唆された。

**研究目的**

中枢性摂食異常症の発症および進展をエネルギー代謝調節系としての視床下部機能異常だけで説明するのは困難である。認知や情動に関与する大脳皮質連合野および大脳辺縁系の機能異常がその病態形成に深く関与しているからである。特に前頭前野辺縁下皮質(infralimbic cortex:IL)は visceral cortex とよばれ、視床下部および自律神経系を介して食行動および末梢内臓機能を調節している。我々はこれまでの本研究において、ILと神経ヒスタミンの細胞体が存在する視床下部結節乳頭核との間に神経連絡が存在し、IL破壊によって視床下部ヒスタミン含有量が低下することを明らかにした。同時にIL破壊ラットでは、遅発性の体重増加、活動量の低下、食行動および活動量の日内リズムの乱れ、体温変動の平坦化が観察され、それらの現象に神経ヒスタミンの機能低下が関与している可能性があることを報告した。さらにILへのオレキシンの微量注入により食行動が誘発され、食行動の日内リズムが変化することも判明した。神経ヒスタミンおよびオレキシンは食行動や体重の調節の他にも、体温やリズム調節に関与していることから、前頭前野と視床下部機能の連携に両物質が関与していることが考えられる。

一方、摂食異常症の患者ではストレス応答としての食行

動反応をどう制御するか、その脳内調節機構が障害されている可能性がある。特に、前頭前野はストレス情報処理に関与しており、摂食異常症の発症や病態への関与が示唆される。事実、摂食異常症患者では、様々な体形の提示に伴う嫌悪感によって前頭前野が活性化されることが機能的MRI検査によって観察されている。しかし、ストレスの認知、ストレス情報の処理、食行動反応誘発といった過程に前頭前野がどのように関わっているのかについてはまだ不明である。本年度研究では、これらを明らかにする目的で、様々なストレス負荷による食行動抑制反応に対するIL破壊の影響をラットを用いて解析した。また飢餓ストレス時のエネルギー欠乏要因が及ぼす影響についても、IL機能との関係を調べた。

**研究方法**

(実験動物)

動物は雄性10週齢のWistar ratを用いた。各実験群の使用した個体数は5匹とした。照明条件を朝7時から19時とする12時間明暗周期および室温21±1℃、湿度55±5%の恒温恒湿防音環境下で実験を行った。飼料はクレア社製通常飼料を用い自由摂食飲水条件で飼育した。

(実験方法)

IL破壊: IL破壊は、脳定位装置固定下で Bregma より前方 3.0mm、両側方 0.6mm、大脳表面より腹側 4.0mm の位置に ibotenic acid を微量投与して作成した (IL-lesion)。また、sham operation として同容量の PBS を投与した群を設けた (control)。脳破壊の位置確認は実験終了後に脳切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色法を用いて確認した。

ストレス負荷: 痛覚ストレスとして、電撃グリッドを有するテストチャンバーを用い、0.5 mA、0.5 sec の電撃を被検ラット四肢へ負荷した (foot shock)。情動ストレスとして、透明板に仕切られた 2 部屋からなるコミュニケーションボックスを用い、被検ラットには電撃を与えず、電撃ストレスを与えられた隣室のラットを間近に観察させ、情動的な恐怖を負荷した。拘束ストレスは、拘束チューブを用い被検ラットに 4 時間の身体拘束を負荷した。飢餓ストレスとして、72 時間の絶食負荷を行った。

インスリン誘発性低血糖: 被検ラットに 0.4U/kg regular insulin を皮下投与し、血糖値を測定した。

行動観察: 食行動、飲水行動および一般活動量は、遠隔自動行動測定装置を用いて解析した。痛覚、情動および拘束ストレス負荷前後の食行動、飲水行動、体重変化の経時的変化について、IL 破壊群と control 群で比較検討した。低血糖による食行動変化については、インスリン投与後 2 時間の摂食量を IL 破壊群と control 群で比較検討した。

記憶学習能: 上記痛覚ストレスおよび情動ストレス負荷に加え、条件刺激としての単音 (1000 Hz, 70 dB) を聞かせることで条件づけを行った。記憶学習能の評価は、条件づけ時と 24 時間後の条件刺激に対するラットすくみ行動の発現率を測定し評価した。

統計: 群間の差の検定は分散分析を用い、 $p < 0.05$  を有意と判定した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は National Insutitute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals を元に作成した Oita Medical University Guideline に沿って行われた。

## 研究結果

1) 痛覚および情動ストレスに伴うすくみ行動反応の変化

IL 破壊群では sham operation (sham) 群と比較して、痛覚ストレスおよび情動ストレス負荷から 24 時間後の条件刺激 (単音) へのすくみ行動反応がそれぞれ有意に低下していた (図 1)。

2) 痛覚および情動ストレスに伴う食行動の変化

痛覚ストレスおよび情動ストレスは負荷後 24 時間の 1 日摂食量を減少させた (図 2)。IL 破壊群では sham 群と比較して、痛覚ストレスおよび情動ストレスによる摂食量減少反応が有意に減弱した (図 2)。同様に IL 破壊群では痛覚および情動ストレスによる体重減少も有意に減弱していた (図 3)。

3) 拘束ストレスに伴う食行動の変化

4 時間拘束ストレスは負荷後 24 時間の 1 日摂食量を減少させた (図 4)。IL 破壊群では sham 群と比較して、拘束ストレスによる 1 日摂食量の抑制反応が有意に減弱していた (図 4)。

4) 飢餓ストレスに伴う再摂食行動の変化

72 時間の飢餓負荷後、再摂食行動時の摂食量は負荷前と比べ有意に低下した (図 5)。IL 破壊群では sham 群と比較して、飢餓ストレス後の 1 日摂食量の抑制が有意に減弱していた (図 5)。

5) 急性低血糖による食行動変化

インスリン誘発性低血糖により、インスリン投与後 2 時間の摂食量が PBS 投与群に比べ有意に増加した (図 6)。低血糖による摂食量増加反応は IL 破壊群と sham 群との間で有意な差は認められなかった (図 6)。

## 考察

本研究の結果、痛覚ストレス、情動ストレス、拘束ストレスおよび飢餓ストレスによる摂食行動抑制反応が IL 破壊によって減弱することが明らかになった。すなわち、IL はストレスの種類にかかわらず、ストレスの認知や食行動調節系へのストレス情報伝達などに重要な役割を果たしていることが示唆される。またストレス刺激に対する記憶学習能も IL 破壊によって低下することから、ストレス負荷による食行動変化に IL による記憶学習能が関与していることも考えられる。一方で、飢餓ストレスによる食行動変化やそれに対する IL 破壊の効果については、エネルギー欠乏に関する情報の関与も考えられる。これまでの研究で、IL との関係を示唆してきた神経ヒスタミンやオレキシンが低血糖によって駆動される調節系でもあることも、IL と代謝情報の機能的関係を示唆している。しかし、今回インスリン誘発性低血糖による食行動誘発反応については IL の関与は認められなかった。すなわち低血糖情報は IL のレベルではなく、視床下部レベルで処理されている可能性が強い。以上より飢餓ストレス下の IL 機能は、エネルギー欠乏という代謝情報よりはストレス情報によって駆動されていることが考えられる。

今回の IL 破壊実験ではストレスによる食行動抑制反応が減弱した。このことから、IL 機能亢進時にはストレス反



応としての摂食抑制作用がさらに増強されることが考えられるが、不明である。また今回のストレスは食行動抑制系のもので、食行動促進系のストレス反応における IL 破壊の影響も解析する必要がある。さらに摂食異常症の病態形成において IL がどう関わっているかについて明らかにするために、以下の事項は今後解明されるべき課題であると考えられる。

1. 前頭前野よるストレス情報処理に関わる神経修飾物質
2. エネルギー欠乏情報処理における前頭前野機能
3. 前頭前野よるストレス情報処理の摂食異常症における意義
4. 扁桃核や側座核など大脳辺縁系における神経ヒスタミン機能とストレス応答
5. 摂食異常症における前頭前野、辺縁系、視床下部の連携

### 結論

今回の研究の結果より、前頭前野辺縁下皮質は、物理的ストレスや情動ストレスなどの情報処理と、それにもなう記憶学習能に部分的に関連した食行動調節機能に深く関与している可能性が示唆された。ヒト摂食異常症の病態生理にもストレス負荷時の食行動調節機構の障害が関与している可能性が高く、今後ストレス応答における前頭前野機能についてさらに解析が必要であると考えられる。

### 研究発表

#### 論文発表

1. Endo M, Masaki T, Seike M, Yoshimatsu H. Involvement of stomach ghrelin and hypothalamic neuropeptides in tumor necrosis factor-alpha-induced hypophagia in mice. *Regul Pept.* 140(1-2) 94-100, 2007.
2. Chiba S, Sakata T, Yoshimatsu H. Chikuyou-Sekkou-To, a Traditional Chinese Herbal Medicine, Modulates Eating Behavior and Thermal Response Induced by Tumor

Necrosis Factor-alpha in Rats. *Am J Chin Med.* 35(5) 821-11, 2007.

3. Gotoh K, Fukagawa K, Fukagawa T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *J Neurochem.* 103(3) 102-12, 2007.
4. Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T, Yoshimatsu H. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology.* 148(6) 2690-9, 2007.

#### 学会発表

1. 千葉政一, 島田達生, 高木雅広, 金子憲一郎, 足立育子, 和田知益, 姜正広, 佐藤仁一, 正木孝幸, 葛城功, 加隈哲也, 浜口和之, 吉松博信. ヒト褐色脂肪組織の画像診断学的評価とその機能的意義. 第 57 回日本体質医学会総会, 2007. 大分. 日本体質医学会雑誌(1347-7137)69 巻 2 号 170(2007.09)
2. 吉道剛, 吉松博信, TsoPatrick. 摂食調節における CCK と apolipoprotein A-IV の相互作用. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2007. 仙台. 糖尿病 (0021-437X)50 巻 Suppl.1 S-286(2007.04).

#### 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 |

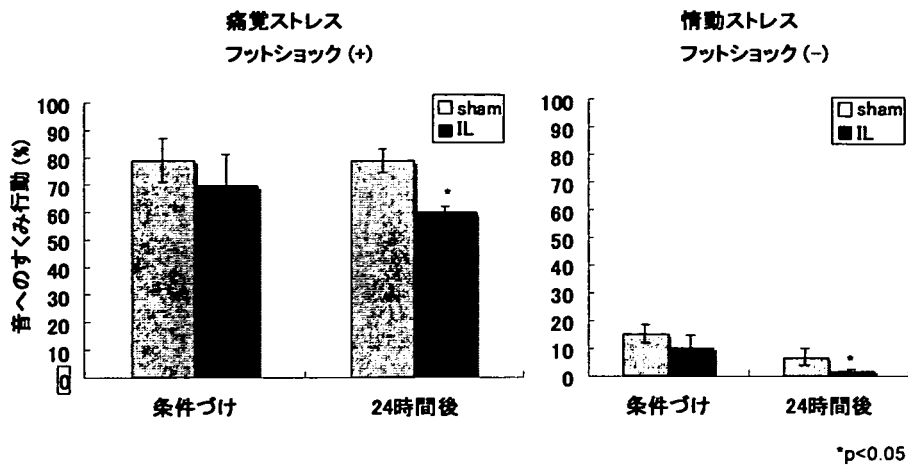


図1 ストレス反応と前頭前野(すくみ行動)

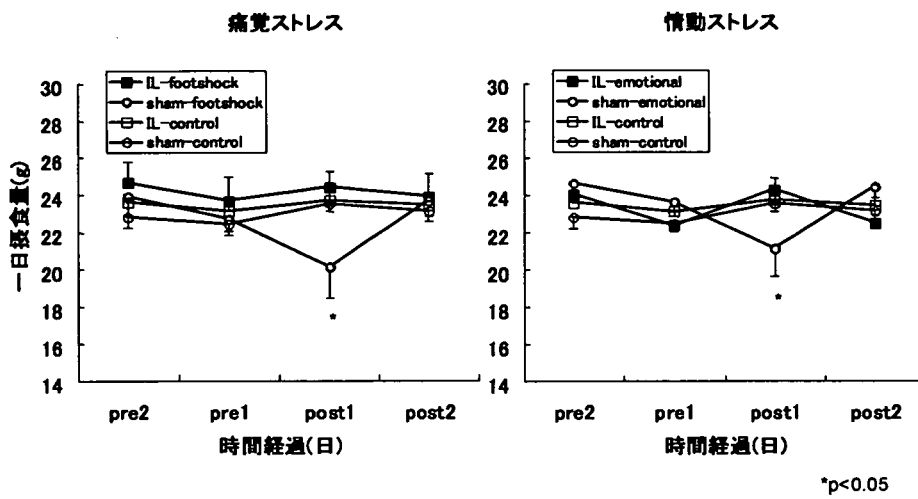


図2 ストレス反応と前頭前野(食行動)

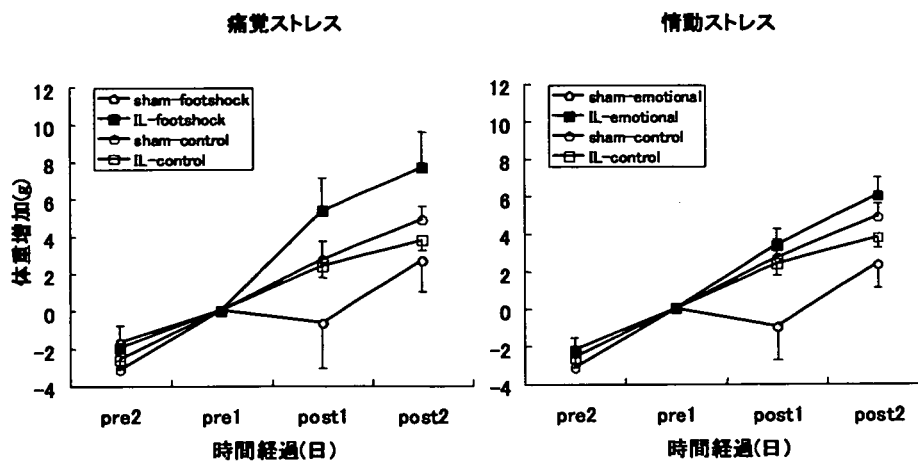


図3 ストレス反応と前頭前野(体重変動)

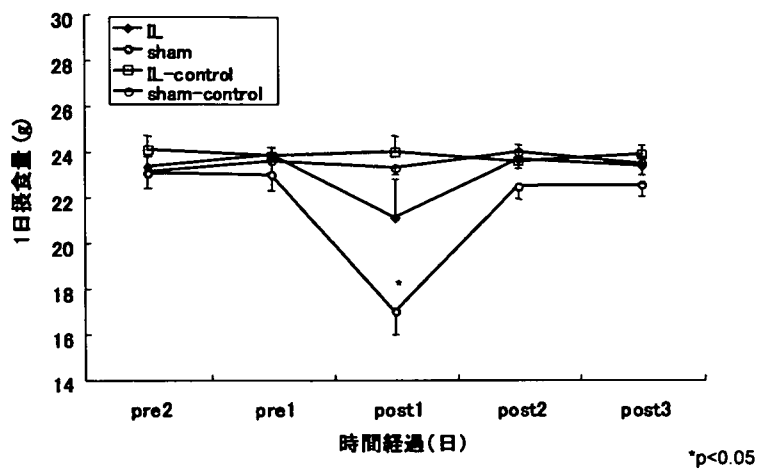


図4 ストレス反応と前頭前野(拘束ストレスと食行動)

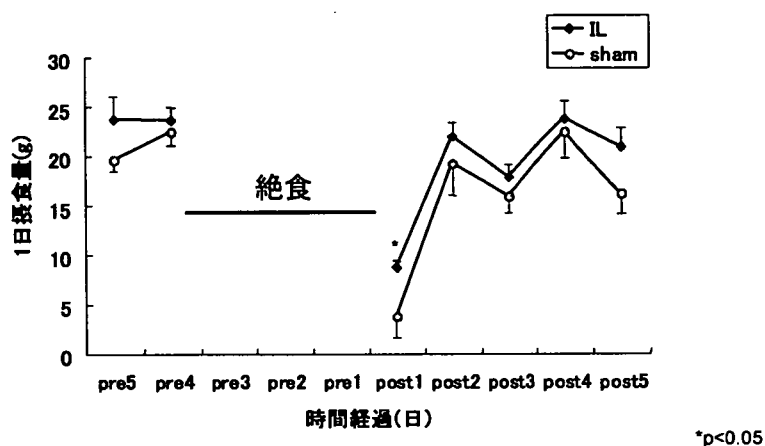


図5 絶食後摂食抑制と前頭前野

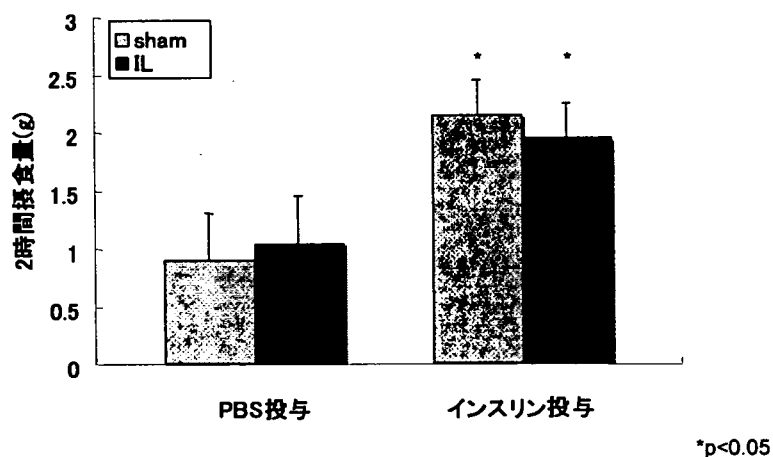


図6 低血糖による食行動誘発と前頭前野

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

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  
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  
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  
亀井 康富 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** 本研究では、中枢性摂食異常症においてしばしば経験される極端なダイエットと過食に対する生体反応の分子機構を明らかにするものである。昨年度には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 を同定し、これが脂肪細胞肥大化抑制作用を有することを明らかにした。今年度は、個体レベルにおける遺伝子 X の機能的意義の解明に向けて、脂肪組織特異的に遺伝子 X を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。現在、このトランスジェニックマウスを用いて代謝関連表現型の解析を進めつつある。一方、我々は既に、絶食やカロリー制限により骨格筋においてフォークヘッド型転写因子 FOXO1 の遺伝子発現が著しく誘導されることに注目し、骨格筋特異的に FOXO1 を過剰発現するトランスジェニックマウス(FOXO1 マウス)が著しい骨格筋萎縮を呈することを報告した。今年度は、骨格筋萎縮モデルである FOXO1 マウスは、野生型マウスと比較して高脂肪食負荷による体脂肪量増加がより著しいことを明らかにした。以上より、極端なダイエットやその後の過食により誘導される脂肪組織あるいは骨格筋の量的あるいは質的な変化の解明が中枢性摂食異常症の病態の理解につながると考えられた。

**研究目的**

中枢性摂食異常症においてしばしば認められる極端なカロリー制限(ダイエット)は著しい筋萎縮、除脂肪体重の減少あるいは基礎代謝の低下をもたらすことが知られている。この時生体は少量のエネルギーにより身体活動を維持するために生存に必要なエネルギー消費を減少させるが(飢餓適応反応)、低体重後の過食によりしばしば体重増加(リバウンド)を生じる。しかしながら、カロリー制限とリバウンドにおける生体反応の分子機構は不明である。以上の背景を踏まえて、本研究では、カロリー制限後の脂肪組織において遺伝子発現が増加する遺伝子 X の脂肪組織における機能的意義とカロリー制限後にもたらされる筋萎縮による生体の代謝変化の解明を目的とした。

**研究方法**

1. 脂肪組織特異的に遺伝子 X を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製

脂肪組織において特異的に発現する aP2 プロモーターの下流に遺伝子 X を連結した導入遺伝子を用いて、脂肪組織特異的に遺伝子 X を過剰発現するトランスジェニック

クマウスを作製した(図 1)。

2. 骨格筋萎縮モデルマウスにおける高脂肪食負荷の影響

I 型筋線維(赤筋)遺伝子発現の減少を伴う骨格筋萎縮モデルマウスである FOXO1 マウス(低発現群および高発現群各 10 匹ずつ)(J. Biol. Chem. 279:41114-41123, 2004)と野生型マウス 10 匹ずつを生後 4 週において離乳後標準食により飼育し、12 週齢から 12 週間高脂肪食負荷(脂肪エネルギー比 60%)を施行した。経時的に体重を測定し、24 週齢において脂肪組織と骨格筋組織の重量を測定した。

(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. 脂肪組織特異的に遺伝子 X を過剰発現するトランスジェニックマウスの作製