

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

グレリンによる食欲調節およびエネルギー代謝のメカニズムについて

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
佐藤 貴弘 久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門

研究要旨 中枢性摂食異常症の患者さんではしばしば自律神経機能の異常が認められる。それは循環器機能（血圧・心拍の異常）、消化管運動の機能障害、体温調節機能の異常などである。われわれはこれまで、グレリンが自律神経機能の恒常性維持に必要なホルモンであり、その欠損は血圧・心拍数の日内リズム消失や不安定化、消化管運動不全、体温調節不全などの自律神経機能異常の表現型を示すことを報告してきた。今年度の研究によって、グレリンによる自律神経機能異常は、交感神経と副交感神経のバランスの崩れ、そしてこれらの日内変動リズムの消失によって生じるものであると考えられた。またグレリン KO マウスへのカテコールアミンブロッカーの投与実験で、 β ブロッカーがある程度グレリン KO マウスの血圧を低下させることがわかった。一方、 α ブロッカーの効果はあまり認められなかった。こういった結果から、グレリン欠損の影響は β アドレナリン受容体が大いに関与していると推察された。事実、グレリンによる体温低下作用に関する研究から、グレリンが BAT において $\beta 3$ アドレナリン受容体を抑制して、交感神経機能を抑制することがわかった。さらに心拍変動の周波数解析から、グレリン KO マウスの自律神経活動は、交感神経抑制で副交感神経が亢進であることを示している。このようにグレリンは自律神経の恒常性維持に重要であることがわかった。

研究目的

摂食障害の患者さんではしばしば自律神経機能の異常を伴う。生体にとって最も基本的な循環、呼吸、消化、代謝、分泌、体温維持、排泄、生殖などの機能は自律機能と呼ばれ、自律神経は平滑筋、心筋および腺を支配し、自律機能を協調的に調節している。自律神経は生体の恒常性（ホメオスターシス）の維持に重要な役割を果たすが、われわれのこれまでの研究で摂食行動を促進するホルモンのグレリンが自律神経の恒常性維持に必要であることを明らかにした。グレリンの欠損マウスの解析から、このマウスでは血圧・心拍数の日内リズムが消失し、また不安定になっていることを見いだした。また消化管の運動機能も低下しており、消化物の腸管内輸送に障害を受けている。

このグレリンの自律神経機能の恒常性維持機構を明らかにするため、下記の3項目について検討した。

- ①グレリン KO マウスにおける循環器系の機能解析
- ②グレリン KO マウスにおける消化管運動の解析

③グレリンによる体温調節機能

研究方法

1. グレリン KO マウスの血圧・心拍数の日内リズムの欠如および不安定性については昨年度報告した。本年度はそのメカニズムの解明を試みた。無線テレメトリーでマウスの血圧・心拍数を連続モニターして、KO マウスにグレリンあるいはグレリン受容体アゴニストの GHPR6 を投与して、血圧・心拍数の変動を調べた。さらに β ブロッカーのプロプラノロールと α ブロッカーのブナゾシンを投与したときのグレリン KO マウスの血圧変化を調べた。
2. グレリン KO マウスでは自律神経機能のうち、消化管運動も異常を示すことを昨年度報告した。すなわち、グレリン KO マウスでは餌を与えた後の一定時間後に胃残留物重量は野生型マウスよりも多く、腸管輸送能は低かった。本年度はこのグレリンの腸管運動作用について、さらに検討した。グレリンの腸管運動の作用が直接的なも

のか、あるいは神経を介した間接的な効果なのかを調べた。

3. グレリン KO マウスでは体温調節機能が異常を示し、体温の日内リズムの消失や基礎値の不安定性などが認められる。本年度、われわれはグレリンに体温低下作用があることを見つけ、そのメカニズムを調べた。

(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. グレリン KO マウスにおける循環器系の機能解析

グレリン KO マウスにグレリンを投与すると、暗期開始直後では血圧がわずかに低下した。野生型マウスでは暗期から明期に移行する午前7時前に活動量が増加するが、グレリン欠損マウスでは、活動量はあまり増えなかった。グレリン受容体アゴニストの GHRP6 投与では血圧の低下はあまり認められなかった。暗期から明期への移行期の活動量はここでも野生型マウスで大きく、グレリン KO マウスではあまり認められなかった。

プロプラノロールの投与でグレリン KO マウスの血圧はわずかに低下した (図1)。暗期と明期のどちらでもグレリン KO マウスの方が野生型マウスよりも血圧低下の作用が強かった。このことは β アドレナリン受容体がグレリンの循環器作用に関与していることを示している。グレリン KO マウスは血圧がやや高めになるが、これは β アドレナリン受容体がグレリン KO マウスで機能亢進していることを示している。事実、後に記載するようにグレリン KO マウスでは交感神経機能の亢進が認められる。

次に α ブロッカーのブナゾシンを投与した。ブナゾシン投与に直後ではグレリン KO マウスおよび野生型マウスのどちらも血圧が一時的に低下した。血圧の低下は暗期から明期に移行する午前7時の投与時に顕著だった。しかし明期の血圧はグレリン KO マウスの方が野生型よりも

優位に高い傾向があり、 α ブロッカーの効果は明期ではあまりないと考えられた。

2. グレリン KO マウスにおける消化管運動の解析

まずグレリン KO マウスの腸管では腸管神経の発生が異常であるかどうかを検討するために組織像を調べた。その結果、調べた限りにおいて、グレリン KO の腸管組織像は、野生型のものとはまったく変化はなかった。腸管神経についても変化はなかった。

グレリンを野生型マウスに腹腔投与すると、胃残留物重量はコントロールに比べて低下し、また腸管輸送能は増加した。グレリンが確かに腸管運動を刺激することが確認されたが、自律神経機能に関するグレリンの作用から、おそらくグレリンは腸管の平滑筋に直接作用するのではなく、神経を介した間接的な作用だと考えられる。今後のさらなる検討が必要だと考える。

3. グレリンによる体温調節機能

マウスにグレリンを投与すると体温が下がる (図2)。投与後数分して体温は下がり始め、投与2時間でもとの体温よりも2度以上の低下を認めた。もちろんこの体温低下は室温よりも下がることはないことから、言い換えれば体温低下は「熱産生の抑制」のためと考えられる。予備的な実験ではこの体温低下はヒトにおいても認められる。

末梢 (胃) からのグレリンがどのような経路で体温調節に関与するのか、われわれは順行性の神経トレーサーである micro-ruby を用いて、その神経連絡路を調べた。その結果、胃から分泌されたグレリンは迷走神経を刺激し延髄孤束核に到達、そこから延髄縫線核に至ることがわかった (図3)。

この延髄縫線核はグレリン投与によって神経活性化のマーカー c-Fos タンパク質の発現が上昇することからも裏付けられた。延髄縫線核においてはグレリン反応性神経は延髄孤束核からの神経と連絡し、またそれはセロトニン神経とは別の神経である。

一方、迷走神経を切断するとこの延髄縫線核での c-Fos タンパク質誘導は抑制されるため、

確かに胃から延髄縫線核への神経ルートが存在する。また興味深い現象は迷走神経切断によって、体温の日内リズムが消失し、またベースラインも不安定になるなど、ちょうどグレリン欠損マウスの表現型と似たものになる。

このグレリンによる体温低下のメカニズムを探るために、まずわれわれは生体内の熱産生の主要組織である褐色脂肪組織（以下、BAT: brown adipose tissue）について調べた。BATに入力する交感神経の電気活動をモニターすると、グレリン投与によってBAT入力神経は抑制される。このことはグレリンが交感神経抑制作用を持つことから裏付けられる。

また、血中カテコールアミン濃度を測定すると、グレリン欠損マウスでは36時間の絶食によってアドレナリンとノルアドレナリン濃度の上昇が認められた。野生型マウスでは上昇は見られない。このことはグレリンがないと、交感神経の抑制機能が失われ、生体内のエネルギー消費を抑制すべき絶食時でも、交感神経活動が活発になって、エネルギーの消費が持続することを示している。

BATでの酸素消費（それはすなわちエネルギー消費である）を調べてみると、グレリン投与によってBAT培養液中の放出酸素濃度の低下がコントロールに比べて抑制され、それはBAT細胞内の酸素消費量が抑制されることを示している（図4）。つまりグレリンはBATにおいてエネルギー消費を抑制している。

予備的なグレリン欠損マウスの絶食実験とグレリン投与マウスでの結果を考えると、グレリンはミトコンドリアでの熱産生に重要な転写因子や転写補助因子の発現を抑制して、熱産生タンパク質のUCP1機能を低下させ、その結果、熱産生抑制、体温低下につながると考えられる。

考察

今年度の研究によって、グレリンによる自律神経機能異常は、交感神経と副交感神経のバランスの崩れ、そしてこれらの日内変動リズムの消失によって生じるものであると考えられた。またグレリンKOマウスへのカテコールアミンブロッカーの投与実験で、 β ブロッカーがある程度グレリンKOマウスの血圧を低下させることがわかった。一方、 α ブロッカーの効果はあまり認められな

かった。こういった結果から、グレリン欠損の影響は β アドレナリン受容体が大いに関与していると推察された。事実、グレリンによる体温低下作用に関する研究から、グレリンがBATにおいて $\beta 3$ アドレナリン受容体を抑制して、交感神経機能を抑制することがわかった。さらに心拍変動の周波数解析から、グレリンKOマウスの自律神経活動は、交感神経抑制で副交感神経が亢進であることを示しており、これらの結果は一致する。

今後検討すべき課題として、自律神経機能（交感神経、副交感神経を含めて）の日内リズムの消失が、視交叉上核（SCN）の生体内時計の機能不全によるものなのか、あるいは自律神経リズムはSCNによるコントロールとは別の制御を受けているのかを明らかにする必要がある。それによって、生体リズムと自律神経リズムの乖離を是正する方法が見いだされるのではないかと期待される。

またグレリンはBATに入力する交感神経活動を抑制して、最終的にはUCP1の発現や機能を抑制して体温低下をもたらすと考えられる。

結論

生体内にエネルギーを蓄えることは健康であるために非常に重要なことであり、摂食障害患者さんではこの生体内へのエネルギー蓄積がうまくいかない。体内のエネルギーの蓄えを増やすには①摂食量を増やすことと、②エネルギー消費を抑えること、の2つがある。グレリンは強力な摂食亢進ホルモンであることが、これまでの多くの研究で明らかにされてきたが、今回われわれの研究によって摂食亢進作用以外に、グレリンにはBATに作用してエネルギー消費を抑制することで、体内に貯蔵するエネルギー量をキープすることがわかった。このようなグレリンの2つの作用が補い合っ、総合的に体内にエネルギーを蓄えるのだと思われる。

またグレリンは自律神経機能の恒常性維持に必要なホルモンであり、摂食異常症の患者さんでしばしば認められる自律神経の機能異常にグレリンが関与しているのかもしれない。こういったことから摂食障害による自律神経機能異常の治療にグレリンが応用できるかもしれない。

研究発表

論文発表

1. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: From Gene to Physiological Function. Results Probl Cell Differ. In press (2009).
2. Takahashi T, Ida T, Sato T, Nakashima Y, Nakamura Y, Tsuji A, Kojima M. Production of n-octanoyl-modified ghrelin in cultured cells requires prohormone processing protease and ghrelin O-acyltransferase, as well as n-octanoic acid. J Biochem. 146(5):675-82 (2009).
3. Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, Kojima M. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. Biochem Biophys Res Commun. 386(1):153-8 (2009).
4. Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoecur C, Gueorguiev M, Khalaf S, Davies D, Grossman AB, Kojima M, Petersenn S, Froguel P, Korbonits M. The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. Eur J Endocrinol. 161(2):307-15 (2009).
5. Hiejima H, Nishi Y, Hosoda H, Yoh J, Mifune H, Satou

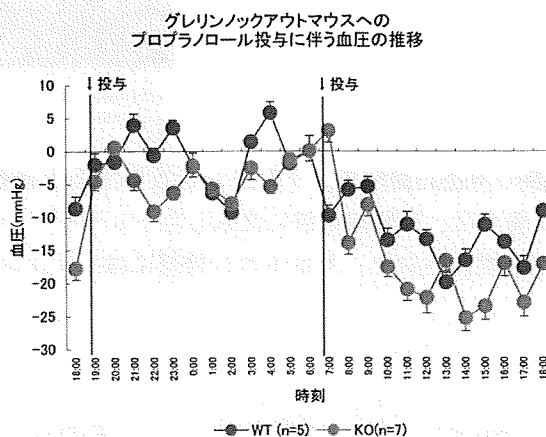
M, Sugimoto H, Chiba S, Kawahara Y, Tanaka E, Yoshimatsu H, Uchimura N, Kangawa K, Kojima M. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon fasting in rodents. Regul Pept. 156(1-3):47-56 (2009).

学会発表

1. 児島将康: Peptide hunting: from Drosophila to Human: Satellite Symposium of 9th VIP/PACAP Symposium in Yakushima, 2009.10.2, 屋久島
2. 児島将康: グレリンによる摂食調節と自律神経機能: 第30回日本肥満学会、2009.10.10、浜松
3. 児島将康: Phenotypic analysis of ghrelin knockout mouse: 第82回日本生化学会大会, 2009.10.21、神戸
4. 児島将康: Phenotypic analysis of ghrelin knockout mouse: 2009 International Symposium on Ghrelin, 2009.11.18、東京

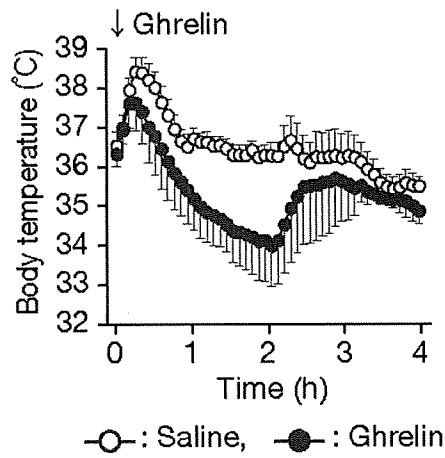
知的財産権の出願・登録状況

なし

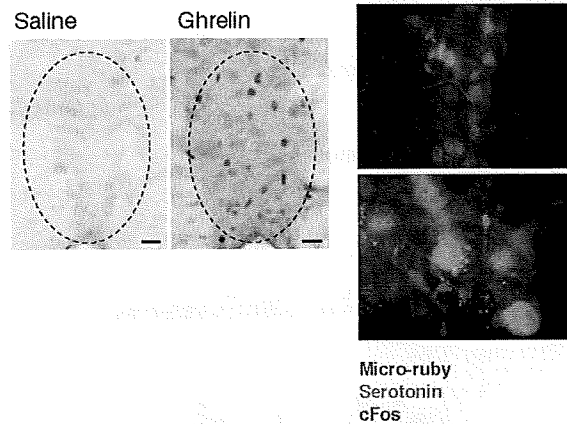


(図1) グレリン KO マウスにβブロッカーのプロプラノロールを投与したときの血圧変化。

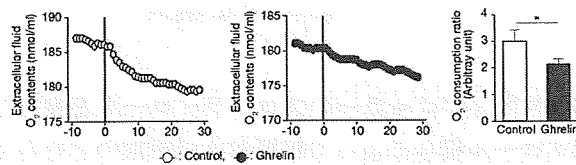
グレリン KO マウスではプロプラノロール投与によって暗期および明期のどちらでも野生型よりも血圧がやや低下した。グレリン KO ではβブロッカーに対する感受性が高まっていると考えられた。



(図2) グレリンは体温を低下させる作用がある。
マウスにグレリンを投与すると体温が2時間にわたって低下した。



(図3) グレリンによる体温調節の神経回路解析。グレリンを投与すると延髄縫線核の c-Fos 発現が増える。Micro-ruby を用いたトレーサー実験では、延髄孤束核に注入したトレーサーが延髄縫線核に達し、グレリン神経とシナプスを形成していることが視覚化された。セロトニン神経にはシナプス形成はないようだ。



(図4) グレリン投与後のBATの分化培養細胞系における酸素消費量。BAT細胞培養液中の酸素濃度はグレリン添加によって減少幅が抑制される(左と中央)。すなわちグレリンによってBAT細胞内の酸素消費量は抑制される(右)。

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

摂食異常症における大脳辺縁系と神経ヒスタミン機能

分担研究者 吉松 博信 大分大学医学部総合内科学第一 教授
正木 孝幸 大分大学医学部総合内科学第一
千葉 政一 大分大学医学部総合内科学第一

研究要旨 摂食異常症の患者では、ストレス応答としての食行動調節機構に何らかの機能異常が生じている可能性が示唆される。我々はこれまでの研究で、前頭前野辺縁下皮質(infralimbic cortex:IL)は、視床下部神経ヒスタミンと直接的な神経連絡を有し、物理的ストレスや情動ストレスなどともなう記憶学習能および反応性食行動の調節に深く関与していること、IL はストレスによる食行動抑制メカニズムにおいて情報入力の一部として機能し、神経ヒスタミンに情報を伝達することで摂食抑制作用を發揮していること、またその神経ヒスタミンの作用部位は、摂食抑制作用に関してはILではなく視床下部を含む他の部位であることなどを報告してきた。平成21年度の研究においては、扁桃体(amygdala; AMY)において、神経ヒスタミンがストレス情報処理にどう関与するかを明らかにするために、情動行動の調節中枢である、ラットAMYの神経ヒスタミン支配、ラットAMYへのヒスタミン投与によるラット食行動および情動行動の変化を解析した。また、四肢への電撃ストレスを負荷し、AMYヒスタミン枯渇条件下での食行動や情動行動の変化を解析した。その結果、ラットAMY中心核にヒスタミン神経系が密に投射していること、AMYへのヒスタミン直接投与は食行動を抑制し情動反応を促進すること、AMYの神経ヒスタミン枯渇化はストレス負荷による食行動抑制作用および情動反応を有意に抑制することが判明した。以上より、ストレス情報によって駆動された神経ヒスタミンは扁桃体中心核において食行動を抑制的に、情動反応を促進的に、それぞれ制御する可能性が示唆された。

研究目的

神経性食欲不振症では、摂食量および体重の減少が認められるが、日常生活での活動性や覚醒レベルは亢進していることが多い。また、神経性食欲不振症患者の脳脊髄液中では、ヒスタミン含有量の増加が観察される。視床下部神経ヒスタミンは飢餓などエネルギー欠乏状態で活性化される。神経ヒスタミンにはH1受容体を介する食行動抑制作用や覚醒レベル亢進作用がある。また交感神経活性化を介して、白色脂肪組織での脂肪分解を促進し、褐色脂肪組織でのuncoupling protein (UCP) 1誘導ともなう熱産生を促進する¹⁻⁴⁾。これらのことから、神経性食欲不振症の病態生理には、視床下部神経ヒスタミンの動態が深く関与することが示唆される。一方、ヒスタミンニューロンの起始細胞が密に存在する結節乳頭核(TMN)へは、ストレス情報処理や情動行動調節に関与する前頭前野辺縁下皮質(infralimbic cortex; IL)からの直接的な神経投射がある。また、ILや扁桃体(amygdala; AMY)に対しTMNから神経投射があり、これらの

神経核群は何らかの機能連関を有することが示唆される^{5,6)}。事実、ヒスタミンH1受容体(H1R)結合性の[(11)C]ラベル doxepin を用いた Positron emission tomography (PET)検査により、神経性食欲不振症患者のAMYではH1Rが非常に密に発現することが報告され、神経性食欲不振症の病態形成において、神経ヒスタミンと扁桃体等の辺縁系が関与する可能性が示唆されている⁷⁾。我々はこれまでの研究により、ILとTMNの直接的な繊維連絡、IL破壊ラット(IL-lesion)におけるストレス応答の減弱および視床下部ヒスタミン代謝回転の低下、ILにおけるオレキシンの食行動誘発作用およびヒスタミンの行動変容促進作用について、それぞれ報告してきた。本年度の研究では特にAMYに注目し、神経ヒスタミンのAMYにおける神経支配とその生理学的意義について、ラットを用いて検討した。

研究方法

(実験動物)

動物は雄性10週齢280-320gのWistar ratを用いた。各実験群の使用した個体数は5匹とし、1個体を1実験にのみ使用した。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 度、湿度 $55\pm 5\%$ 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下で飼育した。

(実験方法)

試薬は、ヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)に対する抗体(抗HDC抗体)を用いた(PROGEN社製)。外因性にヒスタミンを負荷する目的でヒスタミン(Sigma社製)を、ヒスタミンを枯渇させる目的でalpha-fluoromethyl histidine(FMH)を、人工脳脊髄液(aCSF)としてアートセレブ(大塚製薬)をそれぞれ用いた。AMYへのステンレスカテーテル慢性留置は、脳定位固定下でBregmaより後方3.0mm、右側方4.2mm、大脳表面より腹側7.0mmの位置に23Gのガイドカテーテルを留置し、術後1週間の回復期間を経て同ガイドカテーテルより、29Gの注入用ステンレスカテーテルを無麻酔下で装着し、同カテーテルより試薬を微量投与した。実験終了後に脳切片を作成し、AMYへの注入を確認した。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。行動変化はビデオに撮影し、行動解析ソフトを用いて解析した。ストレス負荷はストレスボックスを用い、四肢への電撃負荷(Foot shock stress; FS)(0.5mA, 0.5sec, 5分間に5回施行; 無条件刺激)を単音刺激(条件刺激)と組み合わせで行った。免疫組織学的実験では、ラット脳を4%パラホルムアルデヒド還流固定しAMYにおける抗HDC抗体陽性ニューロンについて検討した。行動実験では、AMY中心核にステンレスカテーテルを慢性留置したラットについて、暗期直前にヒスタミン $30\mu\text{g}/1\mu\text{L}/\text{rat}$ または同容量のaCSFをそれぞれ微量投与し、ラット行動変化について検討した(図1)。ストレス応答実験では、慢性留置カテーテルよりAMY中心核にFMH $167\mu\text{g}/1\mu\text{L}/\text{rat}$ または同容量のaCSFをそれぞれ微量投与し、その30分後にストレスボックスを用いて無条件刺激としてFSストレスを、条件刺激として単音刺激を、それぞれ負荷し、

食行動、情動反応の変化について検討した(図2)。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 Insitute 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. AMYにおける神経ヒスタミン支配

ラットAMY中心核において、抗HDC抗体強陽性ニューロンの点状集簇が観察された(図3)。

2. AMYへのヒスタミン微量投与による行動変化
暗期直前のAMYへのヒスタミン微量投与はラット食行動12時間及び24時間レベルで抑制した($p < 0.05$)(図4)。同様にAMYへのヒスタミン微量注入はラットの探索行動を有意に抑制し、すくみ行動を有意に促進した($p < 0.05$)(図5)。

3. AMYへのFMH微量投与によるストレス応答変化

暗期直前のAMYへのFMH微量投与は、無条件刺激であるFSストレス負荷によるラット食行動抑制反応を有意に減弱した(図6)。また、FSストレス負荷24時間後での単音刺激負荷(条件刺激)によるラットすくみ反応を有意に抑制した(図7)。

考察

本研究により、AMY中心核は神経ヒスタミンの密な投射を受けること、ヒスタミンはAMY中心核において食行動を抑制的に制御する一方ですくみ反応(情動反応)を促進的に制御すること、電撃ストレス負荷によるストレス応答としての食行動抑制反応およびすくみ反応(情動反応)は、あらかじめAMYにFMHを微量投与して神経ヒスタミンを枯渇させた条件下では有意に減弱することが、それぞれ判明した。これらの実験結果より、AMYにおける神経ヒスタミン機能はストレス応答性の食行動抑制反応および情動反応に深く関与する可能性が示唆された。

神経ヒスタミンはILからの神経投射を受けるとともに、逆にAMYやILへ投射する。このこと

から、ストレス負荷によって活性化された神経ヒスタミンが AMY や IL など大脳皮質-辺縁系に作用し、食行動や情動を制御していることが示唆される。

一方で、これまでの研究から、前頭前野はストレスによる食行動抑制メカニズムにおいて高次脳から視床下部への情報入力部位として機能し、神経ヒスタミンに情報を伝達することで摂食抑制作用を発揮していることが示唆されるが、AMY へのヒスタミン微量投与による食行動抑制反応における IL の役割について、不明である。また、AMY へのヒスタミン直接投与がどのような機序で massive な情動反応を惹起するのか現時点では不明であるが、神経性食欲不振症患者の AMY において H1R が密に発現している事実より⁷⁾、AMY の神経ヒスタミンが神経性食欲不振症患者における摂食障害の病態形成に深く関与する可能性が考えられる。本研究による実験結果は、ストレス応答における食行動と情動行動の連動、神経ヒスタミンの投射部位別の機能分担を考える上で、非常に興味深い実験結果であると考えられる。

一方、以下の事項については今後、解明されるべき課題であると考えられる。

1. AMY へのヒスタミン投与による食行動および情動行動変化に対する IL 破壊の影響
2. AMY ニューロンにおけるヒスタミン作用のメカニズム
3. 扁桃体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
4. 摂食異常症における前頭前野、辺縁系、視床下部の機能連携とその破綻

結論

今回の研究結果から、扁桃体中心核は視床下部ヒスタミン神経系と連動し、両者で構成される神経ネットワークがストレスにともなう食行動や情動反応の調節・統合に深く関与する可能性が示唆された(図8)。本調節系がヒト摂食異常症の病態生理にどのように関わっているのか、さらに解析が必要である。

参考文献

1. Masaki T, Yoshimatsu H, Chiba S, Watanabe T, Sakata T: Targeted disruption of histamine H1-receptor attenuates regulatory effects of leptin on feeding,

adiposity, and UCP family in mice. *Diabetes* 50:385-391, 2001

2. Masaki T, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Watanabe T, Sakata T, Yoshimatsu H: Involvement of hypothalamic histamine H1 receptor in the regulation of feeding rhythm and obesity. *Diabetes* 53:2250-2260, 2004
3. Yasuda T, Masaki T, Sakata T, Yoshimatsu H: Hypothalamic neuronal histamine regulates sympathetic nerve activity and expression of uncoupling protein 1 mRNA in brown adipose tissue in rats. *Neuroscience* 125:535-540, 2004
4. Yoshimatsu H, Itateyama E, Kondou S, Tajima D, Himeno K, Hidaka S, Kurokawa M, Sakata T: Hypothalamic neuronal histamine as a target of leptin in feeding behavior. *Diabetes* 48:2286-2291, 1999
5. Ericson H, Blomqvist A, Kohler C: Origin of neuronal inputs to the region of the tuberomammillary nucleus of the rat brain. *J Comp Neurol* 311:45-64, 1991
6. Brown RE, Stevens DR, Haas HL: The physiology of brain histamine. *Progress in neurobiology* 63:637-672, 2001
7. Yoshizawa M, Tashiro M, Fukudo S, Yanai K, Utsumi A, Kano M, Karahasi M, Endo Y, Morisita J, Sato Y, Adachi M, Itoh M, Hongo M: Increased brain histamine H1 receptor binding in patients with anorexia nervosa. *Biological psychiatry* 65:329-335, 2009

研究発表

論文発表

1. R. Hanada, A. Leibbrandt, T. Hanada, S. Kitaoka, T. Furuyashiki, H. Fujihara, J. Trichereau, M. Paolino, F. Qadri, R. Plehm, S. Klaere, V. Komnenovic, H. Mimata, H. Yoshimatsu, N. Takahashi, A. von Haeseler, M. Bader, SS. Kilic, Y. Ueta, C. Piffl, S. Narumiya, and JM. Penninger. Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature* 462:505-9. 2009
2. F. Anan, T. Masaki, T. Shimomura, M. Fujiki, Y. Umeno, N. Eshima, T. Saikawa, and H. Yoshimatsu. Abdominal visceral fat accumulation is associated with hippocampus volume in non-dementia patients with type 2 diabetes mellitus. *Neuroimage* 49:57-62, 2010
3. K. Gotoh, T. Masaki, S. Chiba, K. Higuchi, T. Kakuma, H. Shimizu, M. Mori, T. Sakata, and H. Yoshimatsu.

Hypothalamic neuronal histamine signaling in the estrogen deficiency-induced obesity. J Neurochem 110:1796-805, 2009

4. F. Anan, T. Masaki, T. Shinohara, K. Yufu, N. Takahashi, M. Nakagawa, N. Eshima, T. Saikawa, and H. Yoshimatsu. White matter lesions are associated with the results of ¹²³I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in type 2 diabetes mellitus patients. Metabolism 58:696-703, 2009.
5. S. Chiba, E. Itateyama, T. Sakata, and H. Yoshimatsu. Acute central administration of immapip, a histamine H3 receptor agonist, suppresses hypothalamic histamine release and elicits feeding behavior in rats. Brain Res Bull 79:37-40, 2009

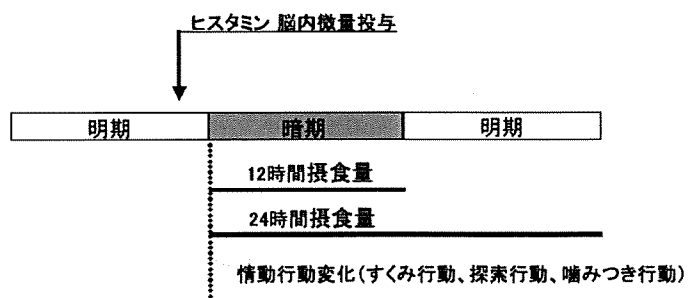
学会発表

1. 後藤孔郎, 千葉政一, 井上恵, 藤原貫為, 正木孝幸, 葛城功, 加隈哲也, 吉松博信: 肥満における脳由来神経栄養因子(BDNF)と視床下部神経ヒスタミンとの関連. 第82回日本内分泌学会学術総会, 2009. 東京. 日本内分泌学会雑誌. 85巻1号. 2009
2. 吉松博信: 肥満症の最新薬物療法. 第82回日本内分泌学会学術総会, 2009. 東京. 日本内分泌学会雑誌. 85巻1号. 2009.
3. 藤原貫為, 後藤孔郎, 千葉政一, 正木孝幸, 加隈哲也, 吉松博信: Dipeptidyl peptidaseIV(DPPiV)阻害薬門脈内投与による求心性迷走神経を介した神経ヒスタミンおよび摂食行動に対する影響. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009.大阪. 糖尿病. 52巻 Suppl.1. 2009
4. 後藤孔郎, 千葉政一, 井上恵, 藤原貫為, 正木孝幸, 葛城功, 加隈哲也, 吉松博信: 肥満における脳由来神経栄養因子(BDNF)と視床下部神経ヒスタミンとの関連. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009. 大阪. 糖尿病. 52巻 Suppl.1. 2009.
5. 千葉政一, 島田達生, 姜正広, 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糖利用能/脂肪蓄積と糖代謝の関連. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009.大阪. 糖尿病. 52巻 Suppl.1. 2009.
6. 吉松博信: 食欲調節と肥満. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009.大阪. 糖尿病. 52巻 Suppl.1. 2009.
7. 吉松博信: 特定保健指導に有効な介入法についての検討 肥満症・メタボリックシンドロームの行動療法. 第82回日本産業衛生学会総会, 2009. 福岡. 産業衛生学雑誌. 51巻 臨増. 2009.
8. 吉松博信: 日本における肥満症治療の未来 統合的な肥満症治療の展望 内科的治療の課題と可能性. 第2回日本肥満症治療学会学術集会, 2009. 東京. 日本肥満症治療学会学術集会プログラム・抄録集. 2回. 2009.
9. 吉松博信: 食と健康障害 肥満糖尿病と食. 第1回日本心身医学5学会合同集会, 2009. 東京. 心身医学. 49巻6号. 2009.
10. 正木孝幸, 吉松博信: 食欲調節の molecular mechanism 中枢性の食欲調節と神経ヒスタミン. 第30回日本肥満学会, 2009 . 浜松. 肥満研究. 15巻 Suppl. 2009.
11. 正木孝幸, 吉松博信: 肥満症治療の進歩と今後の展望 肥満症治療としての行動療法の最近の進展. 第30回日本肥満学会, 2009 . 浜松. 肥満研究. 15巻 Suppl. 2009.
12. 吉松博信: ヒトの肥満・摂食異常のためのモデル動物 肥満症治療からみた神経ヒスタミンとその受容体機能. 第30回日本肥満学会, 2009 . 浜松. 肥満研究. 15巻 Suppl. 2009.

知的財産権の出願・登録状況

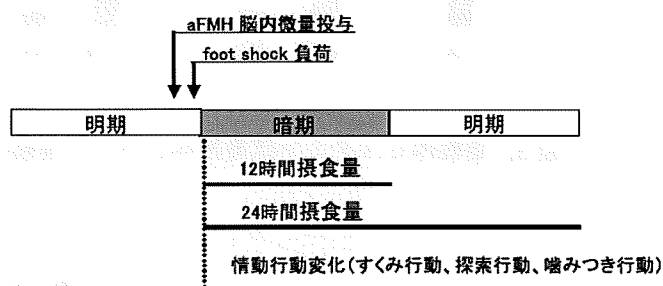
なし

- ・動物: Wistar系雄性10週令ラット
- ・薬液: ヒスタミン(30 μ g/ μ L/rat)、aCSF(人工脳脊髄液)
- ・手術: 脳固定術下ステンレスカテーテル脳内慢性留置術(Paxinos & Watson)
扁桃体 (amygdala) AP -3.0, L+4.2, V 6.0
- ・実験系: 食行動定量評価 情動行動解析

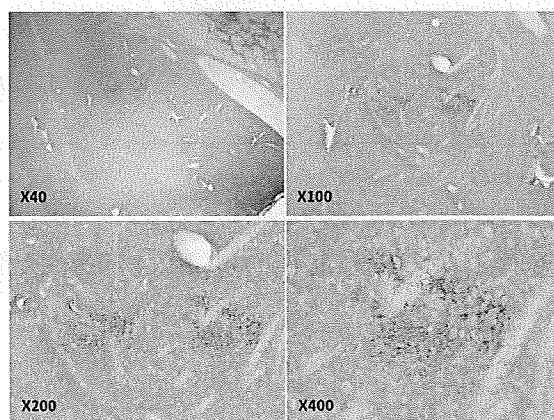


(図1) 扁桃体ヒスタミン微量投与による行動変化

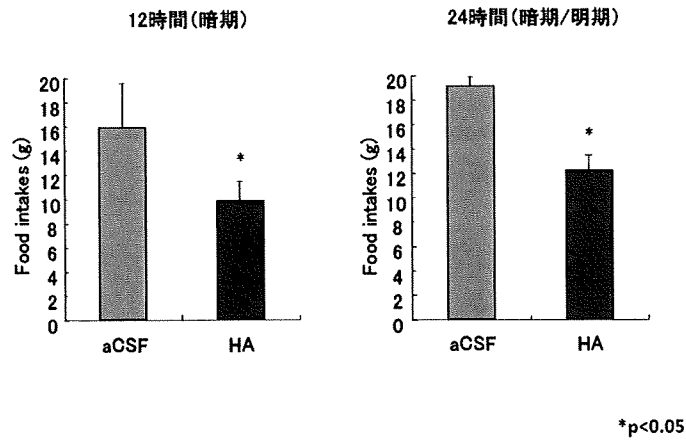
- ・動物: Wistar系雄性10週令ラット
- ・薬液: aFMH(20 μ g/ μ L/rat)、aCSF(人工脳脊髄液)
- ・手術: 脳固定術下ステンレスカテーテル脳内慢性留置術(Paxinos & Watson)
扁桃体 (Central Amygdaloid Nucleus) AP -3.0, L+4.2, V 7.0
- ・実験系: Foot shock (0.5mA, 0.5秒, 5回/5分) 食行動定量評価 情動行動解析



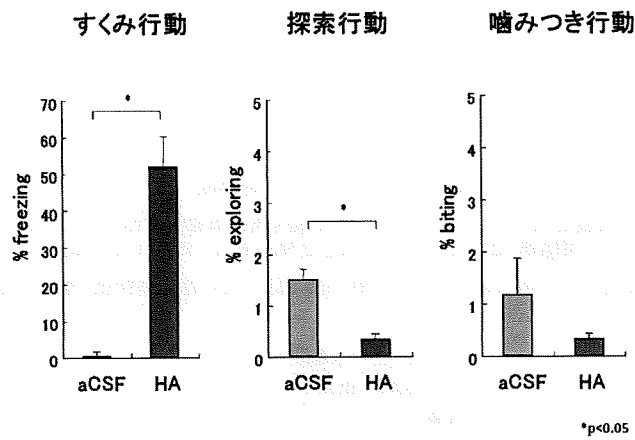
(図2) 扁桃体神経ヒスタミン枯渇下のストレス反応



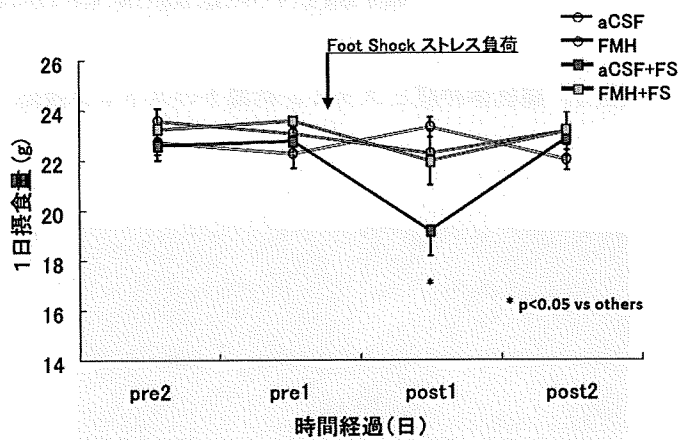
(図3) 扁桃体中心核 HDC 陽性ニューロン(抗HDC抗体、PROGEN社)



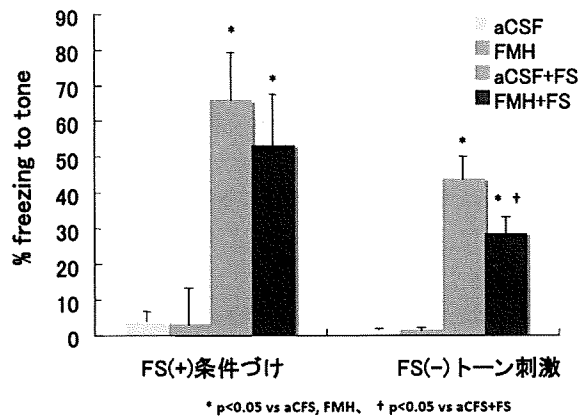
(図4) 扁桃体ヒスタミン微量投与とラット食行動



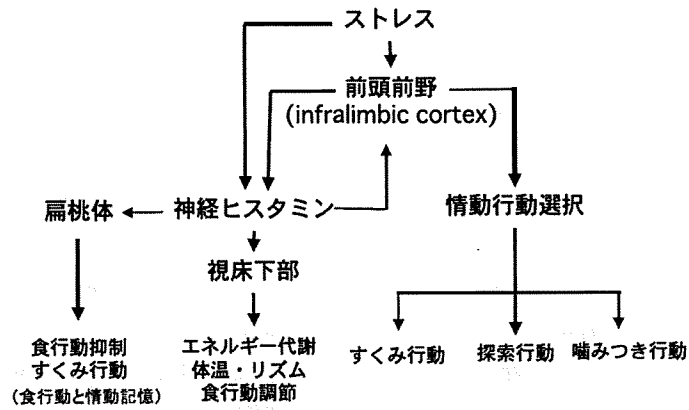
(図5) 扁桃体ヒスタミン微量投与とラット情動行動



(図6) 扁桃体ヒスタミン枯渇下でのストレス誘発性食行動抑制反応



(図7) 扁桃体ヒスタミン枯渇下でのストレス誘発性情動反応(すくみ反応)



(図8) ストレス情報処理と神経ヒスタミン

摂食障害患者の日常生活下における過活動・排出行為などの代償行動の検討

分担研究者 赤林 朗 東京大学医学系研究科ストレス防御心身医学 教授

研究要旨 摂食障害の病態把握・治療に重要な過活動と排出行為を、Ecological Momentary Assessment法に基づき、加速度計による客観的な指標を用いて解析を行う。今年度は、初年度に引き続き、摂食障害患者のリクルートを行い、身体活動度に関するデータ収集を行った。これまでのところ、健常者8名に加え、神経性食欲不振症の制限型患者12名、むちゃ食い/排出型患者9名のデータの測定を行った。来年度も摂食障害患者および健常者のリクルートを行い、年度末までには、日常生活下における過活動および排出行為の病態評価を行う。

研究目的

摂食障害は主に、神経性食思不振症と神経性過食症、特定不能の摂食障害（むちゃ食い障害など）からなるが、最近の調査では生涯有病率は、神経性食欲不振症で0.9%、神経性過食症で1.5%、むちゃ食い障害で3.5%と報告されている¹⁾。摂食障害の病態理解・治療においては、過活動や排出行為などの不適切な代償行為が重要となるが、過活動や排出行為を正確に捉えることは難しく、これまで重要性が指摘されながらも実態が十分には明らかにされてこなかった。過去の研究の問題点としては、症状の記録が回顧的であったということと、身体活動が質問票に基づく主観的な方法であったことである。従って、本研究においては、日常生活下でリアルタイムに症状等を評価・記録する Ecological Momentary Assessment^{2, 3)} (EMA) (図1) に基づく評価方法を用い、さらに、アクチグラフやライフコーダなどの加速度計を用いて身体活動度を客観的な指標により評価することにより、信頼性の高い方法で過活動と排出行為の実態を明らかにすることを目的とする。

研究方法

(1) 対象

疾患群：東大病院心療内科外来に通院中の摂食障害患者で、15歳以上35歳未満の女性。除外規定は設けない。

健常群：15歳以上35歳未満の健常女性。通院や内服のある者は除外する。

(2) 手続き

60秒毎の測定が可能な腕時計型アクチグラフ（AMI 社製）と4秒毎の強度測定可能なライフコーダの2種類の加速度計を装着する。微細な身体活動度の記録を行うために、アクチグラフは、利き腕でない方の腕に装着する。また、消費カロリーを記録するために、ライフコーダは、腰に装着する。また、行動を記録するためのブックレットを携帯する。上記を、2週間装着し、加速度による活動パターン、消費カロリー、排出行為の状況（頻度、時刻、時間）などのデータを採取する。

（倫理面への配慮）

研究参加者には事前に十分な説明を行い、同意を取得し、参加後の取り止めがしやすいように配慮を行う。また、本研究は東京大学医学系研究科倫理委員会の承認を得て行われる。

研究結果

今年度は、初年度に引き続き、摂食障害患者のリクルートを行い、現在までのところ、健常者 8名（年齢：23.3 +/- 2.0歳、BMI： 21.4 +/- 3.8 kg/m²）に加え、神経性食欲不振症（制限型）患者12名（年齢：24.3 +/- 7.0歳、BMI： 14.9 +/- 1.7 kg/m²）、神経性食欲不振症（むちゃ食い/排出型）患者9名（年齢：27.3 +/- 7.1歳、BMI： 15.0 +/- 1.9 kg/m²）の記録が得られた。

得られたデータの例として、神経性食欲不振症（むちゃ食い/排出型）患者のむちゃ食い

および自己誘発性嘔吐時のアクチグラフおよびライフコーダによるデータを示す（図2）。過食中は、ライフコーダの測定値が低値を示しているが、アクチグラフによる測定値が漸増していくというパターンが認められ、両者の測定値のパターンが乖離していることが読み取れる。

考察

神経性食欲不振症患者的制限型およびむちゃ食いや排出型のいずれの患者においても、腕へのアクチグラフ装着および腰へのライフコーダの装着を2週間継続してもらうことは、十分可能であることが示された。

日常生活下における行動をアクチグラフとライフコーダの両方で評価することにより、過活動や過食・排出行動などの行動を評価するための糸口が示された。次年度に対象数を増やすことにより、統計学的手法を用いて検証することが可能であると考えられる。

結論

現在、リクルート中であるが、EMAに基づいた摂食障害患者の過活動と排出行為の病態評価は有意義であると期待される。

参考文献

1. Hudson JI, Hiripi E, Pope HG Jr, Kessler RC. The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Biological Psychiatry* 61:348-358, 2007
2. Stone AA, Shiffman SS. Ecological momentary assessment (EMA) in behavioral medicine. *Ann Behav Med* 1994, 16:199-202
3. Yoshiuchi K, Yamamoto Y, Akabayashi A. Application of ecological momentary assessment in stress-related diseases. *BioPsychoSoc Med* 2008, 2:13
4. Kikuchi H, Yoshiuchi K, Ohashi K, Yamamoto Y, Akabayashi A. Tension-type headache and physical activity: an actigraphic study. *Cephalalgia* 2007, 27:1236-1243

研究発表

論文発表

1. Fukuo W, Yoshiuchi K, Ohashi K, Togashi H, Sekine R, Kikuchi H, Sakamoto N, Inada S, Sato F, Kadowaki T, Akabayashi A. Development of a Hand-Held Personal Digital Assistant-Based Food Diary with Food Photographs for Japanese Subjects. *Journal of the American Dietetic Association* 109:1232-1236, 2009.

学会発表

1. Moriya J, Takimoto Y, Yoshiuchi K, Hayano J, Akabayashi A. Correlation between autonomic nervous system function and plasma leptin levels in anorexia nervosa during inpatient treatment. 20th World Congress of Psychosomatic Medicine 2009.9.26 (Turin, Italy)
2. Moriya J, Takimoto Y, Yoshiuchi K, Hayano J, Akabayashi A. Prospective investigation of autonomic nervous system function and resting energy expenditure in patients with anorexia nervosa. 67th Annual Scientific Meeting of American Psychosomatic Society 2009.3.5 (Chicago, USA) <Psychosomatic Medicine 2009; 71: A46>
3. 下平智史、宮崎信行、瀧本禎之、吉内一浩、赤林朗. 自己誘発性嘔吐から摂食障害が疑われた、腸回転異常の1例. 第1回日本心身医学5学会合同集会 2009.6.6 (東京)
4. 森屋淳子、瀧本禎之、吉内一浩、早野順一郎、赤林朗. 神経性食欲不振症患者的入院加療における自律神経機能と安静時基礎代謝量の変化. 第1回日本心身医学5学会合同集会2009.6.6 (東京)

知的財産権の出願・登録状況

なし

研究協力者

- | | |
|------|----------------------|
| 下平智史 | 東京大学医学系研究科ストレス防御心身医学 |
| 瀧本禎之 | 東京大学医学系研究科ストレス防御心身医学 |
| 吉内一浩 | 東京大学医学系研究科ストレス防御心身医学 |

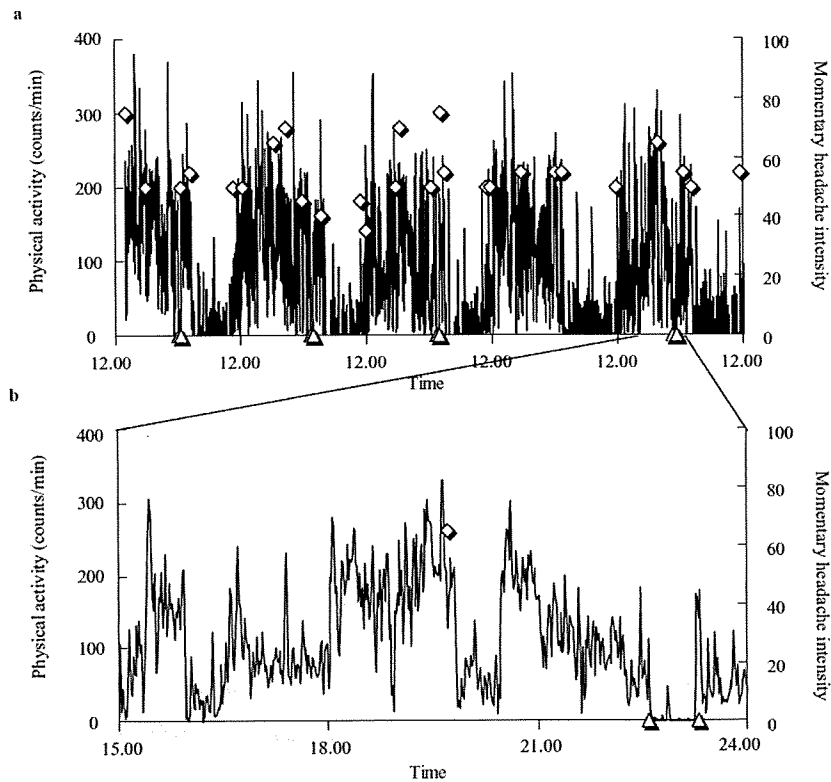
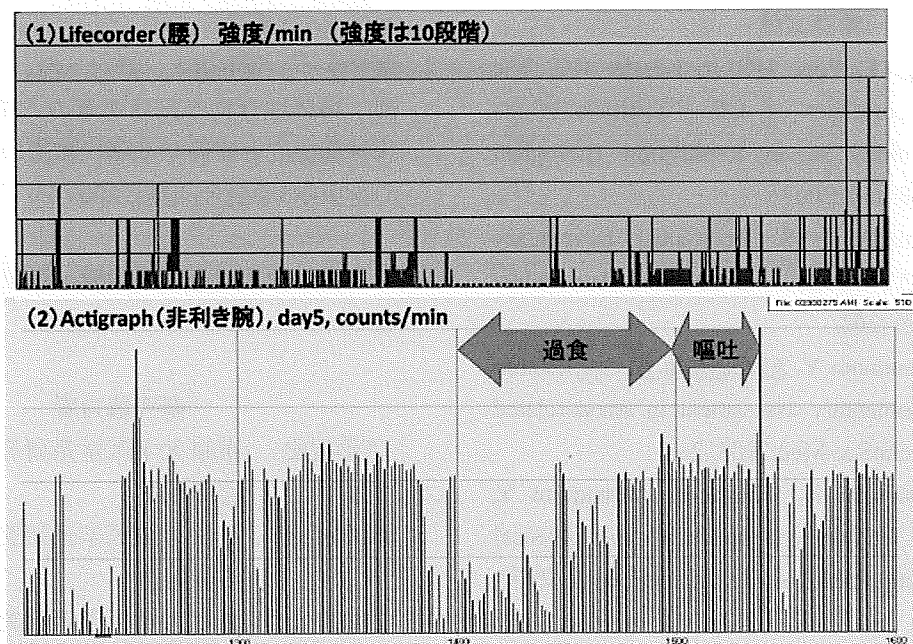


Figure 1 Example of data for momentary headache intensity and physical activity in a patient with tension-type headache: (a) for 5 days and (b) for 9 h, which are part of the data shown in (a). Line graph shows physical activity counts per minute. Open diamond shows momentary headache intensity and open triangle shows time of taking off and putting on the computers. (b) Headache was exacerbated and the patient added an event-contingent recording around 19.30 h (open diamond). It seems that physical activity was decreased after the headache exacerbation. —, Physical activity.

(図 1) 研究分担者らのアクチグラフを併用した Ecological Momentary Assessment の例 (文献 4)



(図 2) 神経性食欲不振症 (むちゃ食い/排出型) 患者の過食・嘔吐時の身体活動度の例

グレリンの消化管運動増進と摂食亢進の作用を利用した新たな臨床試験の探索

分担研究者

赤水 尚史

京都大学医学部附属病院 探索医療センター

教授

研究要旨 グレリンは中枢を介した食欲増進と胃腸運動亢進の作用を有している。全身性強皮症の多くは胃腸障害が出現し、食欲低下や体重減少が問題となる。前者はQOL上重要であり、後者は同症の重症度を規定している。しかしながら、これらに対する治療薬は胃腸運動改善薬や栄養補給したないのが現状である。一方、グレリンは中枢投与のみならず末梢投与によっても食欲促進作用・胃腸運動亢進作用を発揮し、全身性強皮症の胃腸障害や体重減少に対する臨床効果が期待される。そこで、グレリンの臨床応用を図る試験として、「全身性強皮症患者の胃腸機能障害に対するグレリンの臨床効果に関する検討」の実施計画を策定した。

研究目的

グレリンは食欲促進作用・GH分泌促進作用を有するホルモンであり、その効果は中枢投与のみならず末梢投与によっても発揮される。これらの作用に加えて、グレリンは消化管の蠕動運動を亢進させる作用を有していることが明らかになっている。この蠕動運動亢進作用は、健常人のみならず、糖尿病性胃腸障害患者や特発性胃腸症患者においても発揮されることが報告されており、その報告によると、グレリン投与によって胃からの食物排出速度が約30-40%早まり、腹部膨満感の改善も併せて認めたとされている。京都大学医学部附属病院探索医療センターにおける臨床第I相試験でも、健常人におけるグレリン投与試験により、グレリンが空腹度上昇や胃運動促進作用を有することが確認できている。一方、全身性強皮症（systemic sclerosis: SSc）は、自己免疫的機序によって全身の皮膚や血管、内臓の平滑筋組織がコラーゲン線維に置き換わり、多臓器に病変が及ぶ疾患であり、厚生労働省からは難病（特定疾患）に認定されている。全国に約10,000人以上の罹患者がいると推定されている。全身性強皮症患者には、(1)レイノー現象、(2)皮膚症状（皮膚硬化・潰瘍・色素異常）、(3)関節炎・変形、(4)肺線維症、(5)腎症状（強皮症腎）、(6)消化管障害等の多彩な症状が出現する。特に消化管障害は、90%の患者が有しているといわれており、病変は食道から肛門まで広く及ぶ。強皮症患者の43%は消化管症状により脂肪吸収障害を示し、その50%の症

例は栄養吸収不良を示す。特に再発を繰り返す偽性腸閉塞は患者のQOLを低下させ生命予後を悪化させる原因の一つである。我が国では、全身性強皮症の重症度は体重減少の程度で規定されているが、消化管障害の寄与するところは大きい。現在のところ、強皮症そのものを治癒させる薬剤は存在せず、諸症状に対して(1)ステロイド少量内服（皮膚硬化に対して）、(2)シクロホスファミド（肺線維症に対して）、(3)プロトンポンプ阻害剤（逆流性食道炎に対して）、(4)プロスタサイクリン（血管病変に対して）、(5)ACE阻害剤（強皮症腎クリーゼに対して）、(6)エンドセリン受容体拮抗剤（肺高血圧症に対して）などが用いられているのみである。しかしながら、その効果は限定的である。消化管障害に対しても、(1)メトクロプラミドやドンペリドンといった消化管運動促進剤(2)抗菌薬による腸内細菌の制御、(3)栄養補給などの治療が行われているが、その効果は不十分であり、有効な治療の開発が待たれている。食欲亢進作用と消化管運動促進作用を併せ持つグレリンは、その候補となりうるのではないかと我々は考えている。全身性強皮症患者における消化管運動障害に対してグレリンの有効性を検討した報告は、現在のところ国内外とも未だない。そこで我々は、消化管運動障害を有する全身性強皮症患者にグレリンを投与して消化管運動機能が改善しうるか否かを検討することとした。

研究方法

全身性強皮症の専門家である京都大学・医学部附属病院・膠原病免疫内科の三森経世教授と臨床試験実施に関するミーティングを行う。また、全身性強皮症胃腸障害や胃腸機能検査の専門家とのミーティングを行う。臨床試験に関するプロトコルを作成する。

(倫理面への配慮)

臨床試験の実施に際しては、京都大学医学研究科医の倫理委員会の承認を受ける。

研究結果

京都大学・医学部附属病院・膠原病免疫内科の三森経世教授と臨床試験実施に関するミーティングを複数開催した。

また、全身性強皮症胃腸障害や胃腸機能検査の専門家を一同に集めたセミナーを以下の内容で開催した。

「 ^{13}C 呼気試験による消化管機能の評価」

7月15日(水) 3-7PM

京都大学病院・探索医療センターにて

1. 強皮症消化器障害とその評価法

東邦大学医療センター大森病院

リウマチ膠原病センター膠原病科

遠藤 平仁

2. ^{13}C 呼気試験の原理と実際一標準化を含めて

慈恵会医科大学青戸病院外科

中田 浩二

3. 消化管機能評価における ^{13}C 呼気試験の有用性

東邦大学医療センター大森病院 総合診療・急病科学講座総合診療科

瓜田 純久

上記のセミナー後、臨床試験に関するプロトコル(臨床試験実施計画書)を本格的に作成開始し、9月と11月に2度プロトコル委員会を開催した。

考察

プロトコルの完成度はほぼ9割に達している

と考えており、来年度実施開始を目指している。

結論

グレリンの消化管運動増進と摂食亢進の作用を利用して、全身性強皮症の胃腸障害や体重減少に対する治療への応用を図っている。そのための臨床試験のプロトコルを作成中である。

研究発表

論文発表

1. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K: Ghrelin Increases Hunger and Food Intake in Patients with Restricting-type Anorexia Nervosa: A Pilot Study. *Endocr J*. 2009, in press.
2. Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford JL, Hosoda H, Theil J, von Hörsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kangawa K, Yamamura T. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol*, 183(4):2859-66, 2009.
3. Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Yamada Go, Hosoda H, Hosoda K, Shimatsu A, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T: A mouse model of ghrelinoma exhibited activated growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 297(3):E802-11, 2009.

学会発表

1. H Iwakura, H Ariyasu, T Murayama, S Teramukai, H Akiyama, K Kawanabe, T Nakamura, K Kangawa, T Akamizu: Effects of Three Weeks Treatment of Ghrelin on Body Composition and Metabolic Parameters in Patients Undergoing Total Hip Replacement for Osteoarthritis. 91st The Endocrine Society's Annual Meeting. Washington DC. June 10-13, 2009.
2. 山田豪、有安宏之、岩倉浩、荒井宏司、寒川賢治、赤水尚史、中尾一和：遺伝子改変動物を用いて検討した Des-acyl Ghrelin の糖代謝への影響。第82回日本内分泌学会学術総会。平成21年4月23日～25日。群馬県民会館。
3. 岩倉浩、有安宏之、細田公則、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史：グレリン細胞腫瘍化トランスジェニックマウスの解析。第82回日本内分泌学会学術総会。平成21年4月23日～25日。群馬県民会館。

4. 有安宏之、岩倉浩、赤水尚史、寒川賢治：人工股関節置換術を受けた高齢者患者の機能回復に対するグレリンの臨床効果と安全性についての検討. 第82回日本内分泌学会学術総会. 平成21年4月23日～25日. 群馬県民会館.
5. 岩倉浩、有安宏之、寒川賢治、赤水尚史：グレリン投与がヒトの糖代謝に与える影響の検討－人工股関節置換周術期患者に対するグレリン無作為二重盲検偽薬対照比較試験より. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪. ホテルNCB. 平成21年5月21日～24日.
6. 赤水尚史、佐倉伸夫、但馬剛、細田洋司、岩倉浩、有安宏之、寒川賢治：脂肪酸酸化異常症における血中グレリン濃度の変動. 第51回日本先天代謝異常学会. 京王プラザホテル. H21年11月5日～7日.
7. Akamizu T: Clinical applications of ghrelin to disorders related to feeding and GH secretion. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Nov. 18-20, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo.
8. Yamada G, Ariyasu H, Iwakura H, Kangawa K, Akamizu T, Nakao K: The analysis of transgenic mice over-expressing ghrelin derivatives. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Nov. 18-20, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo.
9. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K: Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Nov. 18-20, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo.
10. Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Hosoda H, Hosoda K, Kangawa K, Akamizu T, Nakao K: Establishment of a mouse model of ghrelinoma. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Nov. 18-20, 2009, Tokyo International Forum, Tokyo.
11. Chin K, Takahashi K, Akamizu T, Oga T, Chihara Y, Harada Y, Handa T, Tsuboi T, Mishima M, Kanagawa K: Ghrelin level in patients with obstructive sleep apnea before and after CPAP treatment.
12. Miyake S, Theil MM, Hosoda H, Akamizu T, Kangawa K, Yamamura T: Ghrelin suppresses microglial activation and the development of EAE.

知的財産権の出願・登録状況

なし

研究協力者

有安宏之 京都大学医学部・探索医療センター
 岩倉 浩 京都大学医学部・探索医療センター
 寒川賢治 国立循環器病センター

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

神経性食欲不振症患者の血中低カルボキシ化オステオカルシン値の検討

分担研究者	鈴木（堀田） 眞理	政策研究大学院大学 保健管理センター	教授
	大和田 里奈	東京女子医科大学内分泌疾患総合医療センター内科	
	浦野 綾子	東京女子医科大学内分泌疾患総合医療センター内科	
	荒木 まり子	東京女子医科大学内分泌疾患総合医療センター内科	
	高野 加寿恵	東京女子医科大学内分泌疾患総合医療センター内科	教授

研究要旨 本研究は、神経性食欲不振症における主要な合併症・後遺症である骨粗鬆症に対するビタミンKによる薬物治療を確立するために、本症患者におけるビタミンK2の動態を検討することを目的とした。本症患者と年齢をマッチさせた健常人において、骨におけるビタミンK充足状態を血中カルボキシル化オステオカルシン（ucOC）で評価した。本症患者では、血中 ucOC 値は健常群と比べて、有意に低下していた。患者群では血中の活性型ビタミンDが低下し、骨形成マーカーの低下と骨吸収マーカーの亢進していた。われわれは本症患者にビタミンK2を投与して骨密度の低下を阻止できることを報告しているが、オステオカルシンのカルボキシル化促進作用が治療効果の一因であることが示唆された。

研究目的

骨粗鬆症は神経性食欲不振症における主要な合併症・後遺症である。その病因は体重に依存した骨形成の低下と骨吸収の亢進であり、体重を増加させることが、その予防と治療である。しかし、体重増加を受け入れない患者では治療薬の確立が必要である。骨芽細胞で合成される骨基質蛋白であるオステオカルシン（OC）は、ビタミンK不足状態では、グルタミン酸残基（Glu）が γ -カルボキシルグルタミン酸残基に変換（Gla化）されないため、骨基質に取り込まれず低カルボキシル化オステオカルシン（ucOC）として血中に放出される。ucOCは骨におけるビタミンK充足状態を反映する。

患者の血清中 ucOC 値を測定し、神経性食欲不振症の骨代謝におけるビタミンKの動態を検討した。

研究方法

対象は、DSMIVと厚生労働省研究班の診断基準を満たす女性のAN患者10名（制限型6例、むちゃ食い／排出型4例）（年齢； 27.2 ± 1.8 （Mean \pm SEM）歳、BMI； 14.9 ± 0.6 kg/m²）と、年齢性別をマッチさせた10名の健常女性（年齢； 24.6 ± 1.5 歳、BMI； 19.9 ± 0.3 kg/m²）

を対照群とした。DXA法で測定した患者群の第2-4腰椎骨密度は 0.786 ± 0.422 g/cm²、T-scoreは -2.167 ± 0.452 と低下していた。

方法は、午前中に採血した血液でucOCを電気化学発光免疫測定法（キット名；ピコルミ ucOC、三光純薬）で、さらに、OC、血中25-ヒドロキシビタミンD（25OHD）、 $1\alpha, 25$ -ジヒドロキシビタミンD（ $1, 25(\text{OH})_2\text{D}$ ）、骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）、インスリン様成長因子（IGF）-1、エストラジオール（E2）、インタクトPTH（iPTH）、レプチン、アディポネクチンを測定した。起床後二番尿でI型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）とC-テロペプチド（CTx）を測定した。

各データの二群の平均値の有意差の検討はマンホイットニーのU検定を、ucOCと他の因子との相関係数はSpearmanの順位相関法で検討した。

（倫理面への配慮）

研究参加者には事前に十分な説明を行い、同意を取得し、参加後の取り止めがしやすいように配慮を行う。また、本研究は政策研究大学院大学および東京女子医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

研究結果

結果を表1に示した。患者群と健常群では、血清CaとP値やiPTHに有意差を認めなかった。患者群は25OHDと1,25(OH)₂Dはいずれも有意に低下していた。血中骨形成マーカーでは、健常群と比べて、血中OCとucOC値が低下していた。

患者群のucOC値はOCと正の相関($r = 0.812$, $p < 0.05$)を認めた一方、BAPは有意差を認めなかった。骨吸収マーカーのNTxとCTxは患者群で亢進していたが、NTxのみ統計学的有意差を認めた。

栄養状態のマーカーである血清IGF-IやE2は患者群で有意に低下していた。また、患者群で、脂肪組織由来のレプチンは低下し、アディポネクチンが増加していた。

考察

血中ucOCは骨におけるビタミンK充足状態を反映し、ucOC高値は骨密度とは独立した大腿骨頸部骨折の危険因子であることが老年者で報告されている。

神経性食欲不振症患者の血中ucOCは健常群より有意に高値であることから、本症におけるビタミンK2の低下が明らかになった。著者らは、すでに、ビタミンK2の投与は低体重患者の骨密度のさらなる低下を有意に阻止できることを明らかにしているが、その機序の一部はビタミンK2の充足に伴うGla化による骨形成の促進と推測される。AN患者は一般に、薬によって体重を増加させられることを恐れて内服薬のコンプライアンスが悪いが、これらのビタミン剤に対しては抵抗が少ないので、治療薬として適切である。

今後、ビタミンK2によって本症患者のucOCが正常化するかどうかの検討が必要である。

また、神経性食欲不振症患者における血中ビタ

ミンD値の低下が明らかになった。1, 25(OH)₂Dも低下していることから、腎での1 α 水酸化酵素活性の低下があり、活性型ビタミンD₃製剤の投与の必要性が示された。

結論

神経性食欲不振症患者の骨代謝においてビタミンK2が不足しており、ビタミンK2の本症に伴う骨粗鬆症の治療薬としての可能性が示唆された。

研究発表

論文発表

1. 鈴木(堀田)眞理 摂食障害、治療 91巻4号 1286-90、2009
2. Mari Hotta, Rina Ohwada, Takashi Akamizu, Tamotsu Shibasaki, Kazue Takano, Kenji Kangawa. Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: A pilot study. Endocrine Journal 56(9):1119-28, 2009

学会発表

1. 鈴木(堀田)眞理 摂食障害の合併症と治療 シンポジウム：食と健康障害 第1回日本心身医学5学会合同集会 プログラム・抄録集 p85 2009年6月6-7日
2. 鈴木(堀田)眞理他 内科における神経性食欲不振症の治療 特別セミナー 第13回日本摂食障害学会学術集会 プログラム・抄録集 p36 2009年9月12-13日

知的財産権の出願・登録状況

なし