

201024010A

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22年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 佳宏

平成23(2011)年3月

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 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 佳宏

平成 23 (2011) 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
	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	
II.	研究者名簿	6
III.	分担研究報告書	
1.	飢餓適応におけるレプチンの病態生理的意義	7
	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	
2.	CRF 2型受容体に対する siRNA を用いた同受容体の機能解析：神経性食欲不振症の病態における CRF の役割の解析	11
	日本医科大学大学院医学研究科生体統御科学 芝崎 保	
3.	f-MRI を用いた食欲異常と脳神経活動の解析－脂肪萎縮症における検討－	15
	京都大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科 中尾 一和	
4.	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	17
	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.	摂食異常症におけるエネルギー欠乏と大脳辺縁系機能	21
	大分大学医学部総合内科学第一 吉松 博信	
6.	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	25
	東京大学医学系研究科ストレス防御心身医学 赤林 朗	
7.	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開始	28
	和歌山県立医科大学内科学第一講座 赤水 尚史	
8.	中枢性摂食異常症の全国疫学調査のためのパイロット研究	31
	政策研究大学院大学保健管理センター 鈴木（堀田） 眞理	
9.	神経性食欲不振症患者における低栄養が心身に及ぼす影響	33
	九州大学病院心療内科 久保 千春	
10.	神経性食欲不振症の性腺補充療法	39
	国立成育医療研究センター内分泌代謝科 堀川 玲子	
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	41
V.	研究成果の刊行物・別刷	43

中枢性摂食異常症に関する調査研究

平成 22 年度

I. 総合研究報告書

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

研究代表者	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
研究分担者	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
	中尾 一和	京都大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科 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	大分大学医学部総合内科学第一 教授
	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
	赤水 尚史	和歌山県立医科大学内科学第一講座 教授
	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
	久保 千春	九州大学病院 病院長
	堀川 玲子	国立成育医療研究センター内分泌代謝科 医長
研究協力者	遠藤 由香	東北大学病院心療内科 助教
	横山 伸	長野赤十字病院精神科 部長
	岡本 百合	広島大学保健管理センター 准教授
	間部 裕代	熊本大学大学院医学薬学研究部小児発達学 助教

研究要旨 本調査研究の目的は、中枢性摂食異常症の成因・病態に関する基礎研究と臨床研究を組み合わせ、本症の新しい対処法・治療法の開発することである。このため、分子生物学あるいは発生工学的手法を駆使した中枢性摂食調節機構に関する基礎研究、中枢性摂食異常症の病因・病態解明のための基礎研究と臨床研究、臨床現場に有効な対処法・治療法に関する臨床研究を遂行した。基礎研究では、絶食時の骨髄 B 細胞分化障害におけるレプチンの病態生理的意義、中枢性摂食異常症や関連病態における CRF や神経ヒスタミンあるいはグレリンの生理的・病態生理的意義を明らかにした。臨床研究では、f-MRI を用いた食欲異常と脳神経活動の解析、神経性食欲不振症患者の低栄養状態が心身へ及ぼす影響、日常生活下における神経性食欲不振症患者の代償行動に関する検討、消化管障害に対するグレリンの新たな臨床試験、中枢性摂食異常症の全国疫学調査のためのパイロット研究（小学生・中学生・高校生）を計画・開始した。摂食障害のプライマリケアを援助する基幹医療施設のネットワーク形成を目指した WG により、平成 22 年度に宮城県全域において中学 3 年生を対象として実施したアンケート調査を平成 16 年度調査分と比較した。

研究目的

本調査研究の目的は、中枢性摂食異常症の成因・病態に関する基礎研究と臨床研究を組み合わせ、本症の新しい治療法と予防法の開発を推進することである。このため、中枢性摂食異常症の病因・病態解明のための基礎研究と臨床研究、臨床現場に有効な対処法・治療法の開発のための臨床研究を推進した。更に、摂食障害のプライマリケアを援助する基幹医療施設のネットワーク形成に向けたワーキンググループを通じて、将来の臨床

疫学研究の予備調査を開始した。本研究の推進により、難治性疾患としての中枢性摂食異常症の克服に向けて有効な予防法と治療法に関する基盤データの集積とインフラの整備が推進し、患者自身の QOL の向上のみならず、本症患者と予備軍の減少により医療福祉行政における経済損失の抑制につなげたい。

研究方法

基礎研究では、摂食・エネルギー代謝調節関連

分子あるいはそれらの受容体の遺伝子改変動物を用いて、中枢性摂食異常症の成因と病態に関する摂食・エネルギー代謝調節の分子機構と中枢性摂食異常症における主要な中枢性神経伝達分子の病態生理的意義を検討した。臨床研究では、新しい方法論による摂食障害の病態の解析とともに、本症の有効な治療薬としてグレリンの消化管運動増進と摂食亢進の作用に関する新たな臨床試験を開始した。中枢性摂食異常症の全国疫学調査のために小学生・中学生・高校生を対象としたパイロット研究を実施した。「摂食障害のプライマリケアを援助する基幹医療施設のネットワーク形成を目指したWG」において、専門家による各施設の現状報告と意見交換し、全国レベルの大規模疫学調査の可能性を議論した。

(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進めた。疫学調査のパイロットスタディーでは集計担当の分担研究者が所属する施設の倫理委員会の承認を得た上で、被験者と保護者から同意を得た。実験動物を用いた基礎研究は、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。

研究結果と考察

<飢餓適応におけるレプチンの病態生理的意義> 飢餓適応におけるレプチンの病態生理的意義を解明する目的で、骨髄Bリンパ球分化に及ぼすレプチンの作用を検討した。絶食した野生型マウスでは血中レプチン濃度の著しい低下とともに骨髄Bリンパ球の分化障害が認められ、これはレプチンの脳室内投与により抑制された。レプチンを欠損する *ob/ob* マウスにおいても絶食した野生型マウスと同様の成績が得られた。この作用機序として絶食時や *ob/ob* マウスで上昇する血中コルチコステロンの関与が示唆された。以上より、レプチンが中枢神経系を介して骨髄Bリンパ球の分化を制御することが明らかになり、個体の食欲やエネルギー代謝のみならず全身の炎症状態あるいは免疫

機能が中枢神経系により制御されることが示唆された。飢餓における全身の免疫機能障害の分子機構の解明は神経性食欲不振症の身体的な合併症に関する新しい診断法や治療法の手掛かりになると考えられる。(小川)

<神経性食欲不振症の病態におけるCRFの役割の解析> 受容体拮抗薬投与実験により外側中隔(LS)のCRF2型受容体が急性ストレスによる摂食抑制に関与することを既に証明したが、慢性心理ストレスが関与する神経性食欲不振症の病態生理的意義を解析した。慢性的にLSのCRF2型受容体発現が抑制されているラットの作出を試みた。CRF2型受容体に対するsiRNAを発現する組換えアデノウイルスをLSに局所投与することにより同部位のCRF2型受容体発現抑制を確認したが、急性拘束ストレスによる摂食抑制は変化しなかった。CRF2型受容体発現抑制が不十分であった可能性、持続する同受容体発現抑制が受容体拮抗薬投与とは異なった変化をもたらした可能性などが考えられた。(芝崎)

<摂食異常症におけるエネルギー欠乏と大脳辺縁系機能> エネルギー欠乏状態では食行動促進とともに摂食抑制系である神経ヒスタミンの活性化が認められる。本研究では、エネルギー欠乏時の食行動促進応答における1) 神経ヒスタミン機能制御機構、2) 神経ヒスタミンの扁桃体機能制御機構を検討した。中枢性AMPK活性化は食行動を有意に促進する一方、神経ヒスタミン機能を活性化した。扁桃体内ヒスタミン直接投与は、ラットの絶食後再摂食時の食行動促進反応を有意に抑制した。以上より、1) エネルギー欠乏状態ではAMPKを介して食行動促進系と食行動抑制系(神経ヒスタミン機構)が同時に活性化されること、2) 扁桃体のヒスタミン投与はエネルギー欠乏状態における食行動促進反応を有意に抑制することが明らかとなった。(吉松)

<グレリンによる自律神経と体温の調節> 中枢性摂食異常症患者ではしばしば自律神経機能の異常が認められる。昨年度の研究では、グレリンは体温を低下させてエネルギーの消費を抑制することを明らかにした。今年度はこの分子機構を検討した。グレリンは褐色脂肪組織(BAT)に入力する

交感神経を抑制することあるいはBATにおいてグレリン受容体に直接結合することにより、BATにおけるcAMP産生を抑制して熱産生に關与する転写因子や転写補助因子の発現を抑制することが明らかになった。以上より、グレリンのエネルギー消費抑制作用の一部にBATにおけるUCP1発現を抑制して熱産生を抑制することが關与することが示唆された。(児島)

< fMRI を用いた食欲異常と脳神経活動の解析ー脂肪萎縮症における検討ー > 中枢性摂食異常症において脳の摂食関連領域における神経活動の評価は病態解明や治療法および診断法の開発につながる可能性がある。近年、機能的磁気共鳴画像法 (f-MRI) による脳神経活動に関する解析結果が報告されている。今回、低レプチン血症と過食を呈する脂肪萎縮症を対象に f-MRI を用いて食欲刺激に対する脳神経活動を解析した。空腹時には健常者、脂肪萎縮症ともに多くの摂食関連領域で反応が認められた。これらの反応は、健常者では食後に消失したが、脂肪萎縮症では残存が認められた。脂肪萎縮症と健常者の食後の神経活動の差は扁桃体、島、尾状核、被殻、淡蒼球などに認められた。以上より、f-MRI を用いる脳神経活動の解析は非侵襲的なヒトの食欲制御機構の解明や本症の新しい診断法の確立につながると考えられた。(中尾)

< 神経性食欲不振症患者の低栄養状態が心身へ及ぼす影響 > ①身体的要因による緊急入院の予測と②低栄養と体組成の変動を検討した。①身体的要因で緊急入院したANの入院前1年間のBMIの変動は、罹病期間や年齢を調節後も、外来治療あるいは治療目的で予定入院するAN患者と比べて、BMI値は低く、BMI値低下の程度(約3倍)も大きいことが明らかになった(反復測定分散分析)。②除脂肪体重が27.5kg以下のAN患者における4週間後の体重増加は、除脂肪(筋肉・内蔵・結合組織)の合成・回復が優位であった。ANの入院治療において脂肪組織は4週間後に増加するが、血清レプチン濃度は4週間後では変化がなく8週間後に増加することが明らかになった。現在、血液パラメータを解析中である。中枢性摂食異常症患者の緊急入院の予測指標により患者の生命危機を予防とともに緊急医療費の節減につながるとも

に、やせの程度が著しい場合には除脂肪組織の合成につながる栄養療法が効果的であることが示唆された。(久保)

< 神経性食欲不振症の代償行動に関する検討 > Ecological Momentary Assessment法に基づいて、摂食障害の病態把握・治療に重要な過活動と排出行為を加速度計による客観的な指標を用いて解析した。昨年度に引き続き、健常者、摂食障害患者をリクルートし、身体活動度に関するデータを収集し、健常者12名に加えて神経性食欲不振症の制限型患者(AN-R)15名、むちゃ食い/排出型患者(AN-BP)13名のデータを測定した。2種類の加速度計のデータを用いて日常生活下における過活動および排出行動の病態評価を客観的に解析したところ、体重あたりの消費エネルギーに関して、AN-R群が統計学的に有意に健常群よりも大きく($P = 0.01$)、AN-BP群が健常群よりも大きい傾向($P = 0.096$)が認められた。以上より、客観的な方法によりAN群が健常者よりも日常生活下において過活動であることが確認できた。代償行動としての過活動は十分な評価ができたが、自己誘発性嘔吐による代償行動は、対象者の嘔吐の頻度が低かったため、更なる検討が必要と考えられた。一方、従来、摂食障害の代償行動に関する研究の多くは質問票やインタビューなどの患者の記憶に頼る方法によるものであったが、世界で初めて長期間(14日間)の日常生活下での客観的な身体活動のデータ測定を得るとともに、本症患者の日常生活下の身体活動状況を明らかにした点で今後の治療介入への応用が期待される。(赤林)

< 全身性強皮症患者における消化管障害に対するグレリンの新たな臨床試験 > 神経性食欲不振症患者においては、食欲低下のみならず胃排泄能も低下していることが知られており、食欲と消化管運動の改善が求められる。グレリンは食欲増進と胃腸運動亢進作用を有するホルモンであり、消化管運動促進作用に関する臨床試験を計画した。対象疾患は消化管障害を有する全身性強皮症患者とした。現在、本疾患に対する有効な治療は存在せず、末梢投与したグレリンが食欲促進作用・胃腸運動亢進作用を有することより、全身性強皮症の胃腸障害や体重減少に対する臨床効果を期待し、

臨床試験「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」を開始した。現在、全身性強皮症患者の胃腸機能障害に対するグレリン投与も順調に推移しており、約50%近くに達成している。グレリンの摂食亢進作用に関する学術的関心は高く、有効な治療法がない本症における臨床応用が大きく期待される。(赤水) <中枢性摂食異常症の全国疫学調査のためのパイロット研究：小学生・中学生> 近年わが国で問題になっている摂食障害の若年化の実態を調査し、予防と早期発見体制の確立を目指す。パイロット研究として、研究協力に同意の得られた首都圏の私立と公立の小・中学校(計40~50校)の学童・生徒(小学校5年~中学3年)を対象とし、1) 養護教諭への質問紙調査(各校の背景、摂食障害経験数、学年毎の発症数、医療機関受診の実態)、2) 過去2年間の全生徒の身長体重データ、3) 学童・生徒に対する質問紙調査(EAT26を使用)を行い、摂食障害やその予備軍の人数を調査する。今年度は質問紙、依頼状の作成と倫理申請、参加校のリクルートを進めた。パイロット研究後、同様の調査を全国で実施し、全国の状況の把握とともに地域性の比較などを実施する予定である。(堀川)

<中枢性摂食異常症の全国疫学調査のためのパイロット研究：高校生> 東京都の高校生における摂食障害の有病率を検討する疫学調査を全国レベルの大規模疫学調査のためのパイロット研究として開始した。都立高校の旧10学区内から選択した都立および私立高校の校長宛に本研究への協力を文書で依頼し、各区1校以上の協力が得られた学校で実施する。養護教諭に質問紙による摂食障害実態調査を、高校2年生を対象に質問紙による調査(EAT26)を施行し、過去2年間の当該生徒の身長体重のデータを得て、摂食障害と有病率を算出し、最近の発症の動向を把握する。現在、都立高校1校で実施済である。平成23年度に終了の予定である。(鈴木)

<摂食障害のプライマリケアを援助する基幹医療施設のネットワーク形成WG> 「摂食障害のプライマリケアを援助する基幹医療施設のネットワーク形成を目指したWG」において、専門家による各施設の現状報告と意見交換により全国レベルの大規

模疫学調査の可能性を議論した。特に、平成16年度と平成22年度に宮城県全域において中学3年生を対象として実施したアンケート調査を比較した。平成16年度の摂食障害の有症状率は4.0%(男子2.5%、女子5.3%)、平成22年度は5.6%(男子3.5%、女子7.4%)とやや増加していたが有意差はなかった。摂食障害で医療機関を受診している者はいなかった。各年の有症状者の平均BMIは、 20.9 ± 3.0 、 21.6 ± 3.5 と後者で高かったものの有意ではなかった。有症状者は無症状者に比較して睡眠障害が多く、健康関連QOLも低下し、トラウマ的体験や自覚ストレスが有意に多かった。トラウマ的体験の内容は、学校問題が40%、家庭問題が40%であり、これらの障害は男子よりも女子で強い傾向にあった。

全国レベルの疫学調査は1992年以降実施されていない上、従来、医療機関の受診患者を対象にした調査であるため、有病率が過少統計になると指摘されてきたが、本研究により、学校を対象とした実態調査により正確な有病率が得られ、医療政策の基盤データになることが期待される。(小川、鈴木、堀川、遠藤)

<本調査研究の研究活動の紹介> 小川が企画した「特集：やせとアディポサイエンス」(アディポサイエンス 平成23年3月号)において「中枢性摂食異常症」を取り上げ、「飢餓におけるストレス反応」(芝崎)、「飢餓における骨格筋代謝調節」(小川)、「脂肪萎縮症の病態と治療」(中尾)、「神経性食欲不振症の病態：内分泌障害・骨粗鬆症など」(堀川)、「神経性食欲不振症の治療：グレリンなど」(赤水)として、本調査研究の基礎研究・臨床研究の成果を紹介した。

E. 結論

臨床現場において有効な中枢性摂食異常症に関する対処法・治療法の開発を目指して、本症の成因・病態に関する基礎研究と臨床研究を推進した。基礎研究により中枢性摂食異常症に関連する病態と中枢性摂食調節の分子機構が明らかになり、臨床研究により中枢性摂食異常症の病因・病態の臨床的理解が進んだ。摂食障害のプライマリケアを援助する基幹医療施設のネットワーク形成を目指し

た WG を立ち上げ、本症の実態把握に向けた将来の大規模疫学調査のための予備調査を計画・開始した。

F. 健康危険情報

特になし

平成 22 年度

II. 研究者名簿

中枢性摂食異常症に関する調査研究

区分	氏名	所属	職名
主任研究者	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
分担研究者	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
	中尾 一和	京都大学大学院医学研究科 内分泌・代謝内科	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 総合内科学第一	教授
	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
	赤水 尚史	和歌山県立医科大学 内科学第一講座	教授
	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
	久保 千春	九州大学大学病院	病院長
	堀川 玲子	国立成育医療研究センター 内分泌・代謝科	医長
研究協力者	遠藤 由香	東北大学病院 心療内科心身医学	助教
	岡本 百合	広島大学保健管理センター 精神医学	准教授
	間部 裕代	熊本大学医学部附属病院 小児発達学	助教
	横山 伸	長野赤十字病院 精神科精神医学	部長
事務局	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	助教

平成 22 年度

III. 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

飢餓適応におけるレプチンの病態生理的意義

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
	田中 都	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	
	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	
	西條 美佐	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 レプチンは、体脂肪量に比例して脂肪細胞より産生され、中枢神経系を介してエネルギー代謝調節に働く代表的なアディポサイトカインである。本研究では、飢餓適応におけるレプチンの病態生理的意義を解明する目的で、骨髄Bリンパ球分化に及ぼすレプチンの作用を検討した。野生型マウスを絶食させると、経時的に骨髄Bリンパ球の分化障害が認められたが、レプチンを末梢（腹腔内）投与することにより骨髄Bリンパ球の分化障害はほぼ完全に抑制され、更に、レプチンの中枢（脳室内）投与においても同等の効果が認められた。遺伝的にレプチンを欠損する*ob/ob*マウスは、絶食野生型マウスと同様の骨髄Bリンパ球分化障害を認めたが、レプチン脳室内投与により分化障害は抑制された。その作用機序として、絶食時や*ob/ob*マウスで上昇するコルチコステロンが骨髄Bリンパ球の分化障害を惹起する可能性が見出された。レプチンは中枢神経系を介して骨髄Bリンパ球の分化を制御することが明らかになり、個体の食欲やエネルギー代謝のみならず全身の炎症あるいは免疫機能が中枢神経系により制御されている可能性が示唆された。

研究目的

神経性食欲不振症では、性腺ホルモンの低下、コルチゾールの増加などを始め、種々の代謝異常が認められる。レプチンは脂肪細胞から分泌される代表的なアディポサイトカインであり、体脂肪量に比例して産生が増加して食欲やエネルギー代謝調節に働くが、神経性食欲不振症では、体脂肪量の減少を反映し、血中レプチン濃度が著しく低下している。一方、実験動物を用いた検討においても、絶食の際には内分泌・代謝系や免疫系が大きく変化し、ヒトの神経性食欲不振症と類似の変化が生じるが、レプチンの補充によりその一部が抑制されることが報告されている。即ち、絶食時に生じる身体機能の変化は、エネルギー状態の悪化により生じる変化とレプチンの低下により生じる変化があると考えられる。

本研究では、飢餓時におけるレプチンの病態生理的意義を明らかにする目的で、免疫系、特に骨髄におけるBリンパ球分化に対する作用を検討した。

研究方法

- 骨髄 B リンパ球分化に及ぼす絶食の影響**
野生型マウスを、24 時間、48 時間絶食させた状態で骨髄細胞を採取し、フローサイトメトリーで解析した。B リンパ球の分化状態を、pro B 細胞、pre B 細胞、immature B 細胞、mature B 細胞の 4 分画の比率で検討した。
- 絶食時の骨髄 B リンパ球分化障害に及ぼす末梢レプチン投与の影響**
野生型マウスを 48 時間絶食させ、絶食期間中 12 時間おきに、レプチンを腹腔内投与した。48 時間後に骨髄細胞を採取して、B リンパ球の分化状態をフローサイトメトリーで解析した。
- 絶食時の骨髄 B リンパ球分化障害に及ぼす中枢レプチン投与の影響**
野生型マウスを 48 時間絶食させ、絶食期間中 12 時間おきに、レプチンを脳室内投与した。48

時間後に骨髄細胞を採取して、Bリンパ球の分化状態をフローサイトメトリーで解析した。

4. レプチン欠損マウスの骨髄Bリンパ球分化異常に及ぼす中枢レプチン投与の影響

レプチン欠損 *ob/ob* マウスに対し、レプチンを持続脳室内投与した。1週間後に骨髄細胞を採取して、Bリンパ球の分化状態をフローサイトメトリーで解析した。

5. 絶食時の骨髄Bリンパ球分化障害に及ぼすグルココルチコイド拮抗薬の影響

野生型マウスを48時間絶食させ、絶食期間中12時間おきに、グルココルチコイド拮抗薬であるRU486を経口投与した。48時間後に骨髄細胞を採取して、Bリンパ球の分化状態をフローサイトメトリーで解析した。

(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

- 24時間、48時間の絶食により、経時的に骨髄Bリンパ球分化障害が認められた。即ち、pre B細胞の低下、mature B細胞の増加が顕著に認められた(図1)。
- 絶食期間中12時間おきにレプチンを腹腔内投与すると、絶食マウスの体重や血糖値には影響を及ぼさなかったが、骨髄Bリンパ球の分化障害は、ほぼ完全に抑制された(図2)。
- 絶食期間中12時間おきにレプチンを脳室内投与すると、腹腔内投与時と同様に、絶食による骨髄Bリンパ球の分化障害はほぼ完全に抑制された(図3)。
- レプチン欠損 *ob/ob* マウスに対し、レプチンを持続脳室内投与すると、*ob/ob* マウスで認められる骨髄Bリンパ球分化異常が正常化された(図4)。
- 絶食期間中12時間おきにグルココルチコイド拮抗薬RU486を経口投与すると、血中コルチコステロン濃度には影響を及ぼさなかったが、骨髄Bリンパ球分化障害は、ほぼ完全に抑制さ

れた(図5)。

考察

これまでに、野生型マウスに対する絶食負荷により、胸腺が萎縮し、Tリンパ球が減少することが報告されていたが、本研究により、骨髄Bリンパ球分化も絶食負荷により障害されることが明らかとなった。また、骨髄Bリンパ球の分化障害はレプチンの補充により抑制され、さらに、そのレプチン作用が中枢神経系を介する作用であることが明らかとなった。作用機序については、グルココルチコイド受容体拮抗薬の投与により絶食による骨髄Bリンパ球分化障害が抑制されたことから、絶食時に上昇するグルココルチコイドが関与することが示唆された。また、レプチン欠損 *ob/ob* マウスを用いた検討より、慢性のレプチン欠損状態においても、骨髄Bリンパ球分化が障害されることが明らかとなった。以上より、レプチンは中枢神経系を介して、個体のエネルギー状態のみならず、免疫機能をも調節することが明らかとなった。

結論

本研究により、脂肪細胞由来ホルモンであるレプチンが、正常な骨髄Bリンパ球分化の維持に必須であることが明らかとなり、飢餓や絶食時における免疫機能の低下に及ぼすレプチンの病態生理的意義が示唆された。

*健康危険情報

なし

研究発表

論文発表

- M. Tanaka, T. Suganami, S. Sugita, Y. Shimoda, M. Kasahara, S. Aoe, M. Takeya, S. Takeda, Y. Kamei, Y. Ogawa. Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration under unilateral ureteral obstruction. *Endocr. J.* 57: 61-72, 2010.
- T. Yamamoto, T. Suganami, M. Kiso-Narita, P. A. Scherle, Y. Kamei, M. Isobe, S. Higashiyama, Y. Ogawa. Insulin-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in adipocytes in vitro: role of a disintegrin and metalloproteinase 17. *Obesity* 18: 1888-1894, 2010.
- Y. Yamazaki, Y. Kamei, S. Sugita, F. Akaike, S. Kanai, S. Miura, Y. Hirata, B.R. Troen, T. Kitamura, I.

Nishino, T. Suganami, O. Ezaki, Y. Ogawa. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in the skeletal muscle. **Biochem. J.** 427: 171-178, 2010.

4. T. Suganami, Y. Ogawa. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **J. Leukoc. Biol.** 88: 33-39, 2010.
5. K. Yamashiro, T. Sasano, K. Tojo, I. Namekata, J. Kurokawa, N. Sawada, T. Suganami, Y. Kamei, H. Tanaka, N. Tajima, K. Utsunomiya, Y. Ogawa, T. Furukawa. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 398: 284-289, 2010.
6. Y. Okazaki, N. Ohshima, I. Yoshizawa, Y. Kamei, S. Mariggio, K. Okamoto, M. Maeda, Y. Nogusa, Y. Fujioka, T. Izumi, Y. Ogawa, Y. Shiro, M. Wada, N. Kato, D. Corda, and N. Yanaka. A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE5 controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. **J. Biol. Chem.** 285: 27652-27663, 2010.
7. A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes** 59: 2495-2504, 2010.
8. Ichioka M, Suganami T, Tsuda N, Shirakawa I, Hirata Y, Satoh-Asahara N, Shimoda Y, Tanaka M, Kim-Saijo M, Miyamoto Y, Kamei Y, Sata M, Ogawa Y. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and

humans. **Diabetes** 2011 Jan 31. [Epub ahead of print]

学会発表

1. 田中 都, 菅波孝祥, 小川佳宏:「シンポジウム 5 アピタイトカインの分子基盤と肥満 レプチン」: 第 31 回日本肥満学会学術大会 2010.10.1-2 前橋
2. 田中 都, 菅波孝祥, 西條美佐, 築地信, 亀井康富, 小川佳宏:「骨髄 B リンパ球分化に及ぼす中枢レプチン作用」: 第 31 回日本肥満学会学術大会 2010.10.1-2 前橋
3. 市岡誠之, 菅波孝祥, 津田直人, 田中 都, 白川伊吹, 平田陽一郎, 宮本恵宏, 佐田政隆, 亀井康富, 小川佳宏:「肥満の脂肪組織における新たな炎症関連因子の探索」: 第 31 回日本肥満学会学術大会 2010.10.1-2 前橋
4. 伊藤美智子, 菅波孝祥, 中川信貴, 田中都, 亀井康富, 小川佳宏:「新しい NASH モデルとしての MC4R 欠損マウス」: 第 31 回日本肥満学会 2010.10.1-2 前橋
5. 佐藤歩美, 伊藤美智子, 中久木正則, 河野浩之, 水口清, 菅波孝祥, 小川佳宏:「エイコサペンタエン酸の抗肥満作用と抗肝脂肪酸合成作用の関連」: 第 31 回日本肥満学会 2010.10.1-2 前橋

知的財産権の出願・登録状況

なし

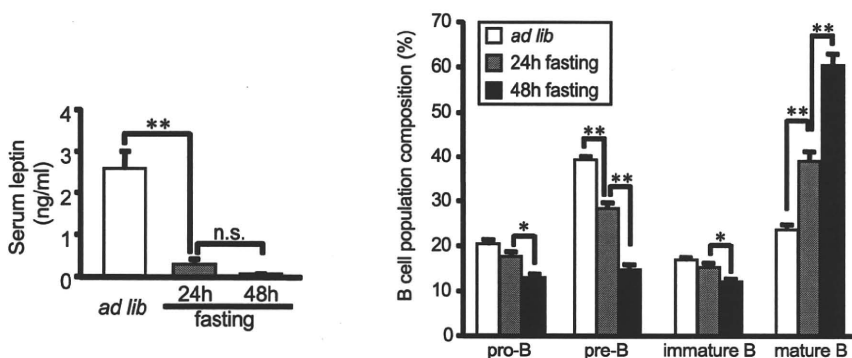


図1. 絶食時の血中レプチン濃度と骨髄 B リンパ球分化

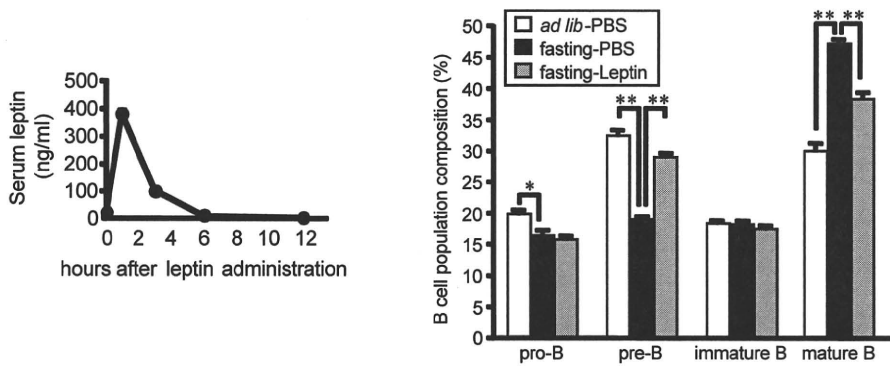


図 2. 絶食時のレプチン末梢投与時の血中レプチン濃度と骨髄 B リンパ球分化

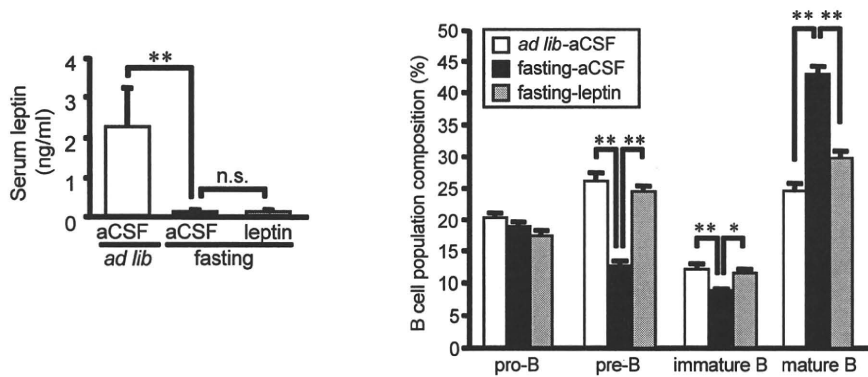


図 3. 絶食時のレプチン中枢投与時の血中レプチン濃度と骨髄 B リンパ球分化

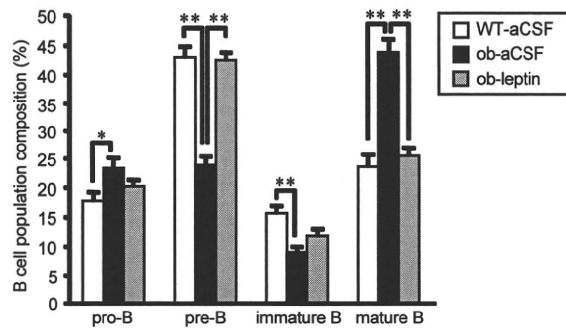


図 4. *ob/ob* マウスに対する中枢レプチン投与と骨髄 B リンパ球分化

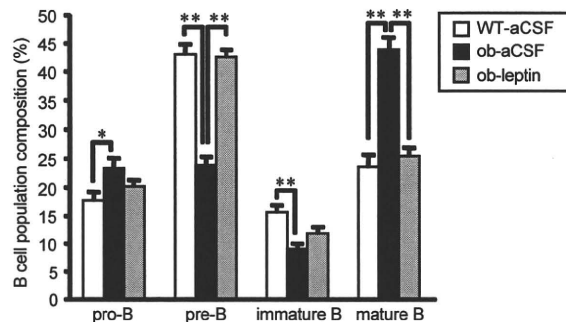


図 5. 絶食時におけるグルココルチコイド受容体拮抗薬投与と骨髄 B リンパ球分化

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

CRF 2型受容体に対する siRNA を用いた同受容体の機能解析：
神経性食欲不振症の病態における CRF の役割の解析

分担研究者	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
	大島 久幸	日本医科大学生理学講座（生体統御学）	
	根本 崇宏	日本医科大学生理学講座（生体統御学）	

研究要旨 外側中隔(LS)のCRF2型受容体が急性ストレスによる摂食抑制に関与することを受容体拮抗薬投与実験で明らかにしているが、神経性食欲不振症の発症には慢性心理ストレスが関与していると考えられるため、その病態をより詳細に解析する目的で、慢性的にLSのCRF2受容体発現を抑制したラットの作成を試みた。CRF2型受容体に対するsiRNAを発現する組換えアデノウィルスをLSに局所投与し、同部位のCRF2型受容体発現抑制を確認できたが、同ラットの急性拘束ストレスによる摂食抑制は影響されなかった。CRF2型受容体発現抑制が不十分であった可能性、持続する同受容体発現抑制が受容体拮抗薬投与とは異なった変化をもたらした可能性等が考えられ、今後は同ラットへの慢性ストレス負荷実験等を試みる。

研究目的

神経性食欲不振症(AN)の病因・病態には慢性的な心理ストレスが関与しており、ストレス反応発現に重要な神経ペプチドである corticotropin-releasing factor (CRF)は AN の病因・病態に深く関与していると考えられている¹⁾。我々はこれまでに、脳内のどの部位の CRF 1型、CRF 2型受容体のいずれの CRF 受容体サブタイプがストレスによる摂食抑制に関与するかを検討し、急性ストレスによる摂食抑制に分界条床核(BNST)と外側中隔(LS)の CRF 2型受容体が関与することを明らかにし、本症の病態解析に努めてきた。しかしながら、これらの研究は急性ストレスおよび CRF 受容体拮抗薬の単回投与でなされたものであり、本症の病態の解明をさらに進めるためには慢性ストレス下における解析が必要である。慢性ストレス下での摂食抑制における CRF 受容体の関与様式を検討するためには、CRF 受容体の機能を持続的に阻止することが必要であり、そのために CRF 1型あるいは CRF 2型受容体に対する siRNA を発現する組換えアデノウィルスを作成した。本年度は作成した siRNA 発現組換えアデノウィルスの in vivo での効果を検証するとともに、同ウィルスを用いてストレスによる摂食抑制での CRF 2型受容体の機能に関する検討を行った。LSは脳内のなかでも特に CRF 2型受容体が広くかつ多く発

現する部位であり、siRNA 発現組換えアデノウィルスの in vivo での効果の検証に適切な部位である。また LS の CRF 2型受容体はストレス反応の惹起に関与しており²⁾、LS の CRF 2型受容体を薬理的に刺激した研究では摂食抑制やストレス様行動の促進が報告されている³⁾。

本研究では、LS に CRF 2型受容体に対する siRNA を発現する組換えアデノウィルスを局所投与し、CRF 2型受容体発現への同アデノウィルスの効果、およびストレスに対する摂食行動の変化について検討した。

研究方法

ペントバルビタール麻酔下でWistar系雄ラットを脳定位固定装置で固定し、両側の LS に 26G のステンレス製のガイドカニューレを留置し、片側に CRF2 型受容体に対する siRNA を発現する組換えアデノウィルスを、対側に対照として EGFP に対する siRNA を発現する組換えアデノウィルスを局所投与した。投与1週間および3週間後にウィルスの局所投与と同様の方法で色素を注入した後に断頭し、LS のウィルス局所注入部位をパンチアウトし、同組織の CRF2 型受容体 mRNA 発現を定量的リアルタイム RT-PCR 法にて測定した。

次に同様に両側の LS に 26G のステンレス製のガ

イドカニューレを留置する手術を行い、両側に CRF2 型受容体に対する siRNA を発現する組換えアデノウイルスを投与した。対照群のラットには両側の LS に EGFP に対する siRNA を発現する組換えアデノウイルスを局所投与した。手術後 1 週間以降にラットを自動行動解析装置に 24 時間以上馴化させ、続いて 24 時間のラットの摂食行動および運動活動量を測定した。次に粉末餌への馴化を行った後、24 時間の絶食後、90 分の拘束ストレスを負荷し、ストレス負荷後 1 時間の摂食量を測定した。その後さらにラットを自動行動解析装置に入れ、ラットの摂食行動および運動活動量を測定した。アデノウイルス投与後 3 週目にすべてのラットを麻酔下で色素を注入後断頭し、カニューレ刺入位置を確認した。

本実験計画は日本医科大学動物実験委員会の承認を得た後に遂行された。

研究結果

投与 1 週間後の動物では CRF2 型受容体に対する siRNA を発現するアデノウイルスを局所注入した場合、CRF1 型受容体 mRNA 発現に対側との有意差は認められなかったが、CRF2 型受容体 mRNA 発現は対側の $82.7 \pm 2.0\%$ ($p < 0.05$, $n = 5$) に有意に低下していた。また、投与 3 週間後のラットにおいても同様に CRF2 型受容体の発現が対側の $82.5 \pm 2.7\%$ ($p < 0.05$, $n = 5$) に有意に低下していた (図 1)。暗期全体あるいは 24 時間の摂食量および活動量に、CRF2 型受容体ノックダウン群と対照群の間で有意な変化見られなかった (図 2)。CRF2 型受容体ノックダウン群において 24 時間絶食後の 90 分の拘束ストレスによる摂食抑制が阻止されるかを検討したが、その効果は認められなかった (図 3)。しかしながら、24 時間絶食後のストレス負荷実験終了後からその日の暗期の摂食量および運動活動量をさらに測定したところ、対照群ではストレスによる摂食量の有意な減少が認められた ($p < 0.05$) が、CRF2 型受容体ノックダウン群ではこの差が認められなかった (図 4)。運動活動量についてはストレスの主効果に有意差が認められたことから ($F_{1,15} = 5.98$)、CRF2 型受容体ノックダウン群では対照群と同様にストレス負荷による影響があったと考えられる (図 4)。

考察

本研究の結果から、我々が作成した CRF2 型受容体に対する siRNA を発現する組換えアデノウイルスの

LS への局所投与により、同部位での CRF2 型受容体の発現が少なくとも 3 週間は抑制されることを確認した。我々は急性ストレスによる摂食抑制に LS の CRF2 型受容体が関与することを明らかにしてきたが、慢性的に CRF2 型受容体発現が抑制されたラットでは急性拘束ストレス負荷直後の摂食抑制は阻止されなかった。これら結果の乖離に関しては、CRF2 型受容体発現抑制が不十分であったこと、慢性的な同受容体発現抑制が同受容体拮抗薬投与の急性効果と異なる変化をもたらした可能性等が推測される。しかしながら、CRF2 型受容体ノックダウンラットではストレス負荷後 12 ~ 16 時間後に認められる摂食抑制への阻止効果が認められた。今後は同ラットの慢性ストレス負荷での摂食量の変化を解析する。

結論

外側中隔の CRF2 型受容体は、既報の急性ストレスによる摂食抑制機序に加え、ストレス後に持続する摂食抑制にも関与している可能性が考えられ、神経性食欲不振症の病態にも同部位の CRF2 型受容体の異常が関与している可能性が推測された。

参考文献

1. Hotta M, Shibasaki T, Masuda A, Imaki T, Demura H, Ling N, Shizume K. The response of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* 62(2):319-324,1986
2. Bakshi VP, Newman SM, Smith-Roe S, Jochman KA, Kalin NH. Stimulation of lateral septum CRF2 receptors promotes anorexia and stress-like behaviors: functional homology to CRF1 receptors in basolateral amygdala. *J Neurosci*. 2007 27, 10568-10577.
3. Bakshi VP, Smith-Roe S, Newman SM, Grigoriadis DE, Kalin NH. Reduction of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing hormone 2 (CRH2) receptors in lateral septum or CRH1 receptors in amygdala. *J Neurosci*. 2002 22, 2926-2935.

* 健康危険情報

なし

研究発表

論文発表

1. Nemoto T, Iwasaki-Sekino A, Yamauchi N, Shibasaki T. Role of urocortin 2 secreted by the pituitary in the stress-induced suppression of luteinizing hormone secretion in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010 299, E567-575.

2. 根本 崇宏、芝崎 保 Pituitary Ucn 2 inhibits LH secretion in stress. 第 88 回日本生理学会大会 第 116 回日本解剖学会総会 全国学術集会 平成 23 年 3 月 横浜

知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

なし

学会発表

1. 根本 崇宏、芝崎 保 ストレスによる性腺機能低下への視床下部 CRF-下垂体 Ucn 2-LH 軸の関与 第 24 回 間脳下垂体副腎系研究会 平成 23 年 3 月 東京

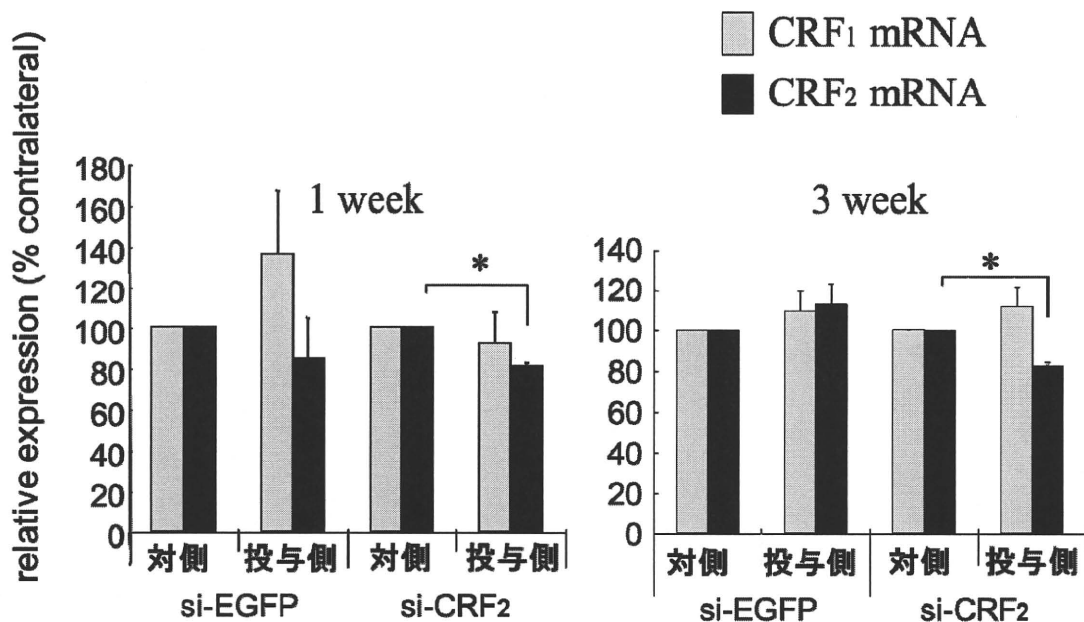


図 1. CRF2 型受容体に対する siRNA 発現組換えアデノウィルスのラット外側中隔投与による CRF2 型受容体 mRNA 発現への影響

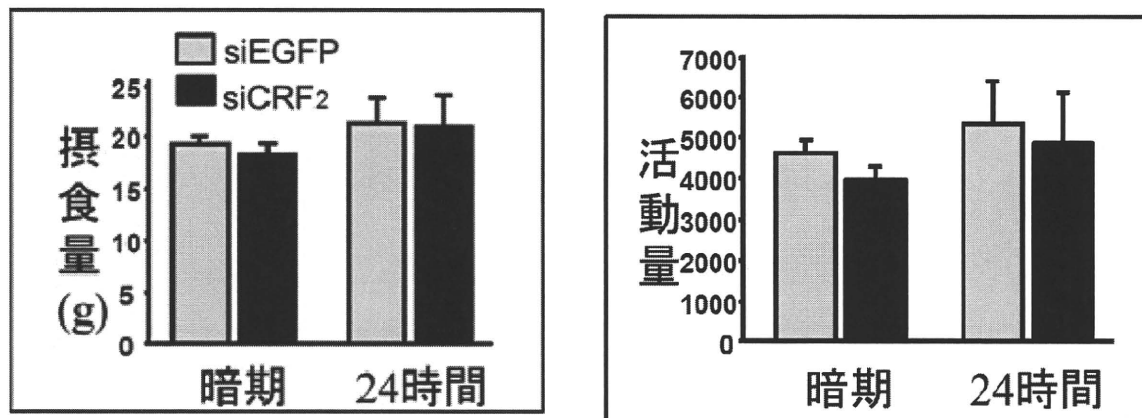


図 2. siRNA CRF2 両側外側中隔投与ラットの摂食行動と運動活動量

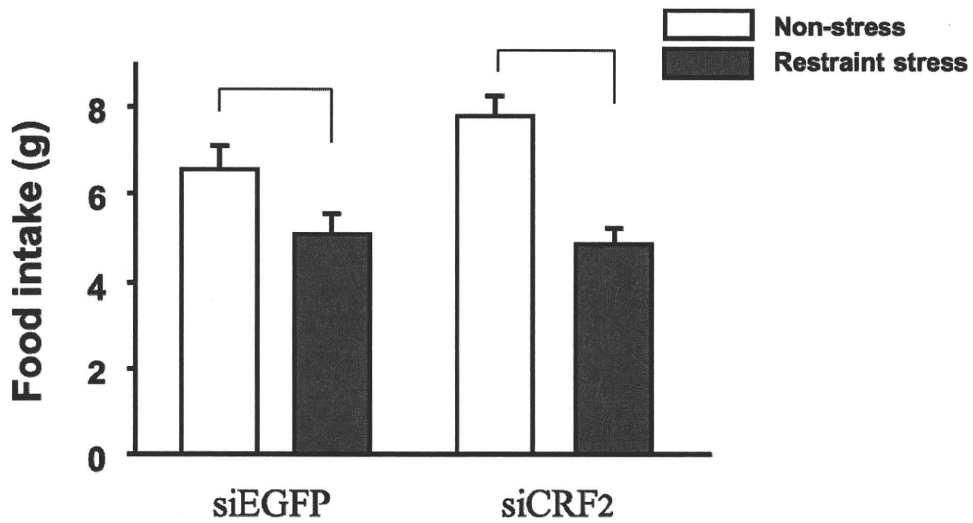


図3. 拘束ストレスによる摂食抑制へのCRF2型受容体に対するsiRNA発現組換えアデノウィルスの両側外側中隔投与の効果

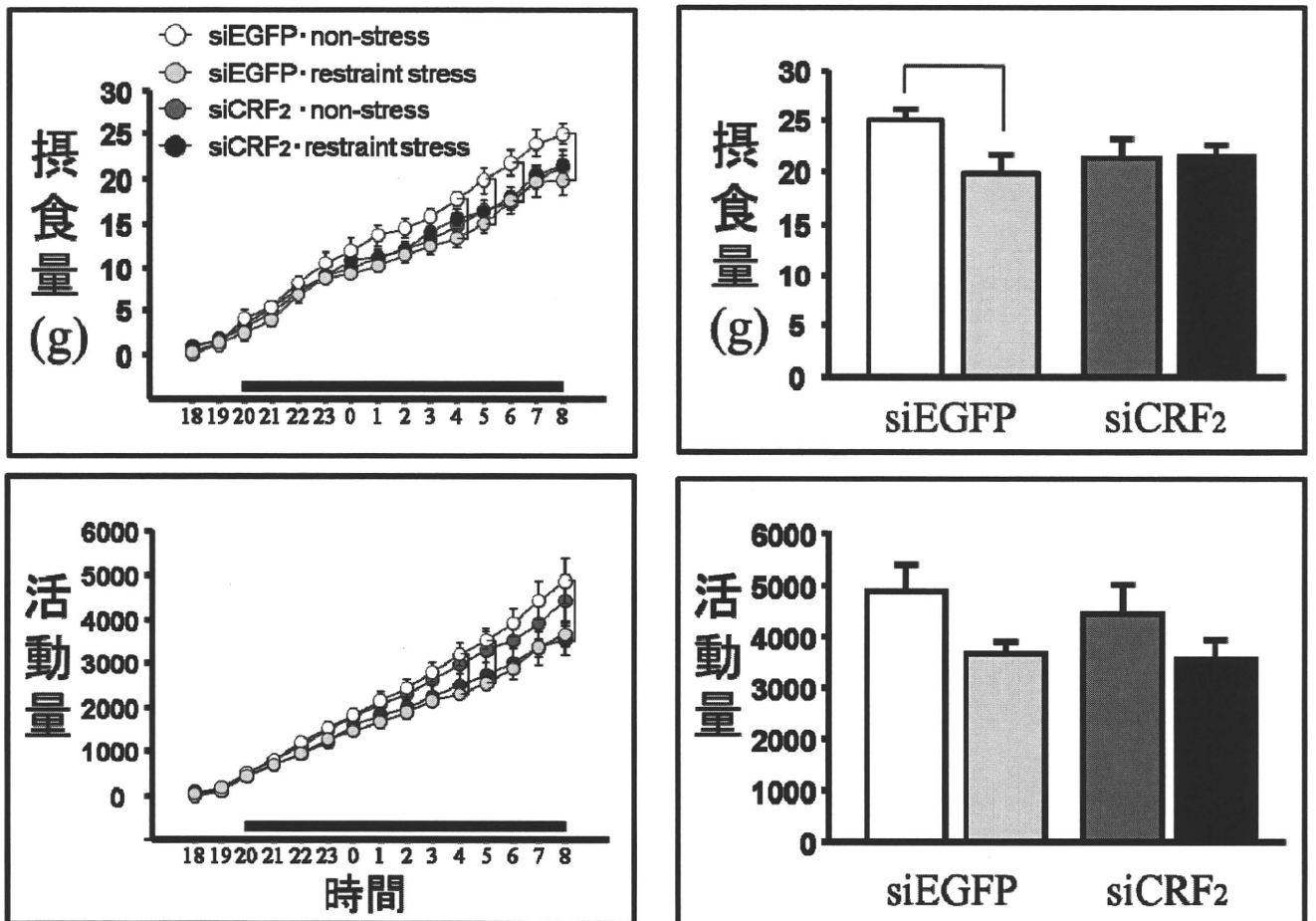


図4. 拘束ストレス摂食抑制の実験後のsiRNA CRF2 両側外側中隔投与ラットの摂食行動と運動活動量