
平成 25 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

飢餓適応における骨格筋代謝の分子機序解明

分担研究者	小川 佳宏	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 糖尿病・内分泌・代謝内科 教授
	亀井 康富	京都府立大学生命環境科学研究科分子栄養学研究室
	田中 都	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科糖尿病・内分泌・代謝内科
	菅波 孝祥	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科臓器代謝ネットワーク講座

研究要旨 中枢性摂食異常症の中でもやせを主体とする神経性食欲不振症（拒食症）では、身体的な栄養障害（飢餓状態）を呈することにより、重症例では体力や筋力の低下により転倒しやすくなり、運動や日常生活が困難となる。中枢性摂食異常症の病態は飢餓や低栄養と密接に関連しており、本研究では、中枢性摂食異常症において認められる全身の飢餓応答として、飢餓における骨格筋代謝と骨格筋萎縮に関連する遺伝子発現制御の分子機構を解析した。

飢餓や激しい運動、全身の代謝は大きく変動する。骨格筋においては、まずグリコーゲンが解糖系にて消費され、その後、筋タンパク質に由来するアミノ酸（特に分岐鎖アミノ酸(BCAA)）がTCA回路にて消費される。アミノ酸の分解に伴い、アミノ基由来のアンモニアが副産物として生成されるが、これは肝臓の尿素回路にて正しく処理される必要がある。一方、Forkhead protein-O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写因子であり、生体代謝の同化ホルモンであるインスリンと拮抗することが知られている。我々はこれまでに、飢餓や激しい運動等のエネルギー欠乏状態において転写因子FOXO1遺伝子の発現が骨格筋で著しく増加することを見出した。また、骨格筋特異的FOXO1過剰発現マウス（FOXO1マウス）では、骨格筋の萎縮が生じることを示した。本研究では骨格筋アミノ酸代謝の主要制御因子としてFOXO1を想定し、検証を行なった。本研究の遂行による、絶食や極端なダイエットにより誘導される骨格筋の量的・質的な変化の分子機構の解明は、中枢性摂食異常症の病態の理解につながると考えられる。

研究目的

中枢性摂食異常症の中でもやせを主体とする神経性食欲不振症（拒食症）では、身体的な栄養障害（飢餓状態）を呈することにより、重症例では体力や筋力の低下により転倒しやすくなり、運動や日常生活が困難となる。すなわち中枢性摂食異常症の病態は飢餓や低栄養と密接に関連している。

飢餓や激しい運動によって、全身の代謝は大きく変動する。骨格筋においては、まずグリコーゲンが解糖系にて消費され、その後、筋タンパク質に由来するアミノ酸（特に分岐鎖アミノ酸(BCAA)）がTCA回路にて消費される。アミノ酸の分解に伴い、アミノ基由来のアンモニアが副産物として生成されるが、これは肝臓の尿素回路にて正しく処理される必要がある。

一方、Forkhead protein-O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写因子であり、生体代謝の同化ホルモンであるインスリンと拮抗することが知られている。我々はこれまでに、飢餓や激しい運動等のエネルギー欠乏状態において転写因子FOXO1遺伝子の発現が骨格筋で著しく増加することを見出した。また、骨格筋特異的FOXO1過剰発現マウス（FOXO1マウス）では、骨格筋の萎縮が生じることを示した。本研究では骨格筋アミノ酸代謝の主要制御因子としてFOXO1を想定し、検証を行なった。そして、中枢性摂食異常症において認められる全身の飢餓応答として、飢餓における骨格筋代謝と骨格筋萎縮に関連する遺伝子発現制御の分子機構を解析した。

研究方法

1. 実験動物

野生型マウスとして C57BL/6J マウスを使用した。骨格筋特異的 FoxO1 ノックアウトマウス (myogenin-cre, FoxO1 flox/flox) は北村教授 (群馬大学) より供与された。コントロール群として flox/flox の同腹仔を使用した。

2. 遺伝子発現解析

細胞および組織からの Total RNA の抽出は、Trizol 1mL を使用した。cDNA の作製には QIAGEN Quanti test Reverse Transcription Kit を使用した。Fast SYBER Green Master Mix (Applied Biosystems) 5.0μL, primer forward (50μM) 0.1μL, primer reverse (50μM) 0.1μL cDNA (5.0ng/μL) 2.5μL 滅菌蒸留水 2.3μL の Total 10μL とした。Real-time PCR 反応は StepOnePlus (Applied Biosystems) を用いた。Internal control として 36B4 を使用した。

3. アミノ酸含有量解析

50mg 分取した組織にメタノール 0.6mL、滅菌蒸留水 0.24mL を加え遠心分離した。窒素ガスを用いて揮発させた後、沈殿物を滅菌蒸留水 0.2mL に溶解し、アミノ酸含有量の測定は SRL 社に依頼した。

4. Luciferase assay

C2C12 筋芽細胞を 12well plate に培養した。ルシフェラーゼプラスミド (pSP-GS あるいは pGL3-ALT2) 0.8μg、及び発現プラスミドの pCAG-FOXO1 (3A), pCMX-FOXO1, pCAG-PGC1α, empty pCAG/ pCMX (total 0.8μg), を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。internal control には phRL-TK 25ng (Promega) を使用した。トランスフェクションから 24 時間後、細胞を溶解し Dual Luciferase kit (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性 (internal control) に対するホタルルシフェラーゼ活性の比により計算した。

5. ChIP assay (クロマチン免疫沈降法)

C2C12-pLXSN-FoxO1 (3A)-ER 細胞にタモキシフェン 1μM を添加し 10 時間インキュベートし

た。対照として DMSO を使用した。細胞を 1% ホルムアルデヒド、37℃ で 10 分間処置後、グリシン 625mM で 5 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、protease inhibitor 入りの SDS lysis buffer で細胞を回収した。ソニケーションを 30 秒間隔で 30 回、冷却しながら行った。ProG (Dynabeads ProteinG (Invitrogen)) に抗体を結合させるため、混合物を室温で 10 分置き、その後 4℃ で 1 時間置いた。使用した抗体は FKHR (H-128) (sc-11350; SantaCruz Biotechnology) と Normal rabid IgG (sc-11350; SantaCruz) 2μg の抗体と 10 倍量の ChIP dilution buffer で溶解した Lysate 6μg を 4℃ で 2 時間置き免疫沈降した。High salt wash buffer, low salt wash buffer, LiCl wash buffer, TE による洗浄後、1% SDS で溶出した。5M NaCl による脱クロスリンク、ProK、フェノール・クロロホルム抽出により DNA を精製した。ChIP DNA 量は定量的リアルタイム PCR により測定した。結果は Normal rabid IgG に対する ChIP DNA の比により算出した。

6. 頸静脈アンモニア投与実験

FoxO1-KO マウスおよび野生型同腹仔のマウスを頸静脈カニューレレーションオペの 2 日後に 4 時間絶食を行い、ペントバルビタール麻酔下で実施した。アンモニア負荷を実施 (0, 50, 75, 100 μmol/hr、各 80min、各前後に採血実施、control 群には生理食塩水を infusion した)。PocketChem BA PA-4140 (アークレイ社) を使用し全血から NH3 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. 絶食により FOXO1 mRNA の発現が顕著に誘導された。またグルタミン合成酵素 (GS) の遺伝子発現が顕著に増加していた。分岐鎖アミノ酸代謝酵素 (BCKDH)、アラニンアミノ基転移酵素の遺伝子発現はわずかに増加した。

2. FOXO1 マウスの骨格筋内のグルタミン含有量はコントロールマウスに比して有意に増加していた。さらに、骨格筋内で重要なアミノ酸代謝遺伝子の発現量を検討した。すると、分岐鎖アミノ酸代謝酵素 (BCAT, BCKDH)、アラニンアミノ基転移酵素などの遺伝子発現は増加していなかったが、グルタミン合成酵素 (GS) の遺伝子発現が顕著に増加していた。
3. TAM 処理により FOXO1 の標的遺伝子として既知である Gadd45 のみならず GS mRNA を増加させた。TAM の非存在下の FOXO1 (3A) 細胞、または空のベクター (モック) を安定的に発現させたコントロール C2C12 細胞では GS mRNA の発現の変化は観察されなかった。これらの結果により、筋細胞において FOXO1 を活性化により GS の発現がすることが示唆された。
4. GS 遺伝子を解析したところ FoxO1 が結合し得る配列 TTGTTTAC (以下、DBE (daf-16 family protein-binding element)) を発見した。また、この DBE と DBE に類似した配列 FoxO1 DBE motif (AAACAA/TTGTTT) に対する FoxO1 の作用を in vitro で検討した。Luciferase assay 法を用いて FoxO1 による GS の転写促進作用を検討した。DBE の存在下で、FoxO1 (3A) 用量依存的に GS プロモーターを転写活性化させた。GS 遺伝子の 5'プロモーターの遺伝子を欠損させたいくつかの欠損体では、転写活性化が抑制されなかった。一方、3'側に存在する FoxO1 結合配列を欠損させたコンストラクトでは、転写活性化が抑制された。ChIP assay により GS 遺伝子の FoxO1 結合配列 (DBE) 特異的に FoxO1 が結合した。GS 遺伝子の exon 内やプロモーター領域には FoxO1 が結合することはなかった。GS 遺伝子での 3'UTR の重要性も報告されており、この結果より、3'側に存在する FoxO1 結合配列が重要であることが示唆された。
5. FoxO1-KO マウスの頸静脈にアンモニアを投与したところ、FoxO1-KO マウスにおいて野生型と比較し血中アンモニア濃度が有意に増加した。すなわち、FoxO1-KO において欠損している GS が生体内でアンモニア除去の役割を果たしていると考えられる。

考察

FOXO1 が骨格筋で顕著に増加している飢餓状態においては、骨格筋は萎縮が生じ、構成タンパク質を分解し糖新生に利用される。グルタミンは、糖新生の基質として利用されると共に、アミノ酸分解時に生成されるアンモニアの消去にも役割を果たすことが知られる。すなわち FOXO1 によるグルタミン合成は生体の飢餓適応の一序である可能性がある。一方、FOXO1 は、骨格筋アミノ酸代謝に重要な分岐鎖アミノ酸代謝酵素 (BCAT, BCKDH)、アラニンアミノ基転移酵素などの遺伝子発現は活性化せず、骨格筋アミノ酸代謝においての他の転写因子との役割分担があることが示唆される。

結論

本研究では、中枢性摂食異常症において認められる全身の飢餓応答として、飢餓における骨格筋代謝と骨格筋萎縮に関連する遺伝子発現制御の分子機構を解析した。本研究により、FOXO1 が摂食時の骨格筋でグルタミン合成酵素の遺伝子発現調節を行なうことが判明し、飢餓時のアミノ酸代謝およびアンモニア消去に役割を果たすことが示唆された。

研究発表

論文発表

1. Potter, R. A., DeLong, A. D., Smith, S. M., Erb, B. M., Renwand, B., Kamei, Y., Ogawa, Y., and McLoughlin, T. J. (2013) FoxO1 Inhibits skeletal muscle hypertrophy through mTOR-independent mechanisms. *J. Exercise Physiol.* 16, 32- 50.

学会発表

1. 畑澤幸乃、亀井康富、笠原知美、金井紗綾香、狩野理延、菅波孝祥、北村忠弘、小川佳宏：「FOXO1 は骨格筋のアミノ酸代謝を調節する」第33回日本肥満学会大会 2013年10月 東京

知的財産権の出願・登録状況

なし

低栄養母体出生児の推測される内分泌学的異常～追いつき成長を示さない出生時低体重ラット仔の GH-IGF-1 軸の変化～

分担研究者 根本 崇宏 日本医科大学大学院医学研究科生体統御科学 准教授

研究要旨 神経性食欲不振症患者では低体重児出産のリスクが高くなる。出生時低体重児の多くは思春期までに追いつき成長を示すが、一部には追いつき成長を示さず最終身長も低い児がみられる。まだ不明な点が多い追いつき成長を規定する内分泌的因子を明らかにするため、ラットを用いた解析を行った。妊娠中の摂取カロリーを対照群の 60%に制限した母ラットからの出生仔のうち、離乳時の 21 日齢までに対照ラットの平均体重-2SD 以内まで追いつき成長しなかった低体重ラット (SGA-NCG) 群では、肝 DNA のコード領域のメチル化の低下による miR-322 の発現量の亢進がみられた。その結果、GH 受容体発現量と IGF-1 産生量、血中 IGF-1 濃度の低下が生じ、短体長低体重を呈した可能性が示された。また、これら SGA-NCG ラットを父母に持つ出生仔は、母ラットを自由摂餌下で飼育しても出生時低体重ラット仔を出産し、それらの仔の中には同様の機序により追いつき成長を示さず短体長低体重となる仔がいることが明らかになった。以上より、やせ女性や神経性食欲不振症患者の妊娠中は胎児を良好な栄養状態に維持することが重要であると考えられる。

研究目的

神経性食欲不振症患者では低体重児出産のリスクが高くなる[9]ばかりでなく、その子が思春期に不食を呈するとの報告もある[10]。低出生体重児は注意欠陥多動性障害 (ADHD) や学習障害を呈する可能性が高い[11-13]。増加しているやせ女性や神経性食欲不振症患者の妊娠中の栄養状態は必ずしも良好であるとは限らない。そこで本研究では神経性食欲不振症の発症機序への胎児期の低栄養状態の関与の可能性を検討することを目的に、妊娠中に摂取カロリーを制限した母ラットからの出生仔のうち、離乳時までに対照ラットの平均体重の-2SD まで追いつき成長した群としなかった低体重ラット (SGA-NCG)を用いて、それらの血中 GH や IGF-1 濃度、肝臓での GH 受容体、IGF-1 発現量、GH 受容体の受容体の発現を負に制御する microRNA (miR-322)の発現、DNA のメチル化の比較を行った。さらに、雌雄の SGA-NCG ラットを交配し、出生した仔について、同様の解析も行った。

研究方法

1. 妊娠中の母ラットへのカロリー摂取制限からの短体長低体重仔

9 週齢のウイスター系雌ラットを正常雄ラットと交

配後、妊娠全期にわたり自由摂餌下で飼育した対照群と、対照群の摂餌量の 60%まで摂餌量を制限した (FR) 群との 2 群に分けた。出産後はいずれの群の母ラットも自由摂餌下で飼育し、出生仔は出産後 21 日目に離乳させた。離乳時に体重を測定し、FR 群からの出生仔のうち対照ラットの平均体重-2SD 以内まで追いつき成長した群を SGA-CG 群、追いつき成長しなかった群を SGA-NCG 群とし、6 週齢時まで自由摂餌下で飼育したそれらの雄ラットを用いて解析した。

2. 追いつき成長を示さない短体長低体重ラット仔の成長ホルモン-IGF-1 軸の変化

血中 GH および IGF-1 濃度は随時断頭採血したラット仔の血漿を用い、ELISA 法で測定した。肝の GH 受容体および IGF-1 の mRNA 発現量、miR-322 の発現量はリアルタイム PCR を用いて測定した。

3. 肝 DNA のメチル化の変化

肝より DNA を抽出し、バイサルフェートシーケンス法を用いて、メチル化の程度を定量した。

4. 次世代への影響の検討

雌雄の SGA-NCG ラットを交配し、自由飲水自由摂餌下で飼育し、出生仔を得た。仔は引き続き自由飲水、自由摂餌下で飼育した母ラットから授乳させ、3 週齢時に上記 2 と同様に解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は日本医科大学動物実験委員会の指針に従い、同委員会の承認を得た上で行った。

研究結果

1. 妊娠中の摂取カロリー制限母ラットからの出生時低体重仔は、自由摂餌下で飼育した母ラットからの出生仔よりも有意に軽かった。在胎期間および出生仔数には差はみられなかった。また、出生仔のうち離乳時までに追いつき成長を示さない短体長低体重ラット仔がみられた。(図1)
2. SGA-NCG 群の血中 GH 濃度は対照群との間に差はみられなかったが、IGF-1 濃度は有意に低下していた。SGA-NCG 群の肝での GH 受容体および IGF-1 の mRNA 発現量は、対照群のそれらより有意に低下していた。SGA-NCG 群のそれらには差はみられなかった。SGA-NCG 群 GH 受容体の発現を負に制御する miR-322 の発現量は、対照群に比べ有意に高かった。(図2)
3. 肝 DNA の miR-322 コード領域には 9 箇所の CpG 領域が存在するが、SGA-NCG ラットでは miR-322 の 5 領域における 2 箇所のメチル化が有意に低下していた。
4. 雌雄の SGA-NCG ラットを交配し、得られた仔は対照群の仔よりも有意に軽く、その一部には 3 週齢時に追いつき成長を示さない短体長低体重仔がみられた。(図3) これら短体長低体重仔も肝での miR-322 の発現量の増加と GH 受容体と IGF-1 の mRNA 発現量の低下、血中 IGF-1 濃度の低下がみられた。(図4)

結論

妊娠中にカロリー摂取制限した母ラットからの出生時低体重ラット仔のうち追いつき成長しない低体重ラットは、肝 DNA のメチル化の低下による miR-322 の発現量の上昇、miR-322 による GH 受容体発現の抑制、GH 受容体シグナルの低下による IGF-1 産生の低下、血中 IGF-1 濃度の低下により、短体長低体重を呈したと考えられる。さらに、SGA-NCG ラットを父母に持つ仔は、母ラットが自由摂餌下で飼育したにも関わらず、その一部には出生時の低体重と離乳時までに

追いつき成長を示さない短体長低体重ラットがみられること、これらの身体的変化は、miR-322 発現の上昇による GH 受容体発現の低下と血中 IGF-1 濃度の低下といった父母ラットと同様の機序により短体長低体重を呈した可能性が示されたことから、DNA のメチル化の変化は次世代にも遺伝する可能性が示された。以上より、やせ女性や神経性食欲不振症患者の妊娠中は胎児を良好な栄養状態に維持することが児の成長のみならず次世代の児の成長にも重要であると考えられる。

参考文献

1. Holland, A.J., et al., Anorexia nervosa: a study of 34 twin pairs and one set of triplets. *The British journal of psychiatry : The Journal of Mental Science*, 1984. 145: p. 414-9.
2. Kendler, K.S., et al., The genetic epidemiology of bulimia nervosa. *The American journal of psychiatry*, 1991. 148(12): p. 1627-37.
3. Bulik, C.M., P.F. Sullivan, and K.S. Kendler, Heritability of binge-eating and broadly defined bulimia nervosa. *Biological psychiatry*, 1998. 44(12): p. 1210-8.
4. Lilienfeld, L.R., et al., A controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: psychiatric disorders in first-degree relatives and effects of proband comorbidity. *Archives of general psychiatry*, 1998. 55(7): p. 603-10.
5. Strober, M., et al., Controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: evidence of shared liability and transmission of partial syndromes. *The American journal of psychiatry*, 2000. 157(3): p. 393-401.
6. Wade, T.D., et al., Anorexia nervosa and major depression: shared genetic and environmental risk factors. *The American journal of psychiatry*, 2000. 157(3): p. 469-71.
7. Kortegeard, L.S., et al., A preliminary population-based twin study of self-reported eating disorder. *Psychological medicine*, 2001. 31(2): p. 361-5.
8. Grice, D.E., et al., Evidence for a susceptibility gene for anorexia nervosa on chromosome 1. *American journal*

of human genetics, 2002. 70(3): p. 787-92.

なし

9. Koubaa, S., et al., Pregnancy and neonatal outcomes in women with eating disorders. **Obstetrics and gynecology**, 2005. 105(2): p. 255-60.
10. Negrete, J.C., Cocaine problems in the coca-growing countries of South America. **Ciba Foundation symposium**, 1992. 166: p. 40-50; discussion 50-6.
11. Heinonen, K., et al., Behavioural symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder in preterm and term children born small and appropriate for gestational age: a longitudinal study. **BMC pediatrics**, 2010. 10: p. 91.
12. Groen-Blokhuis, M.M., et al., Evidence for a causal association of low birth weight and attention problems. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, 2011. 50(12): p. 1247-54 e2.
13. Losh, M., et al., Lower birth weight indicates higher risk of autistic traits in discordant twin pairs. **Psychological medicine**, 2011: p. 1-12.

健康危険情報

なし

研究発表

論文発表

1. Nemoto T, Mano A, Shibasaki T. Increased expression of miR-325-3p by urocortin 2 and its involvement in stress-induced suppression of LH secretion in rat pituitary. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 302: E781-E787, 2012
2. Nemoto T, Mano A, Shibasaki T. miR-449a contributes to glucocorticoid- induced CRF-R1 downregulation in the pituitary during stress. **Mol. Endocrinol.** 27: 1593-1602, 2013.

学会発表（シンポジウム）

1. 根本崇宏、芝崎保：「低出生体重ラット仔でみられる内分泌学的異常」：第 86 回日本内分泌学会，2013.4.25-27，仙台

知的財産権の出願・登録状況

末梢栄養情報に应答した中枢神経系機能調節の生理と病態

分担研究者	中尾 一和	京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター	特任教授
	田中 智洋	京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター	特定准教授
	孫 徹	京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター	特定准教授
	日下部 徹	京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター	特定准教授
	青谷 大介	京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター	特定助教
	澤本 伸克	京都大学大学院医学研究科附属脳機能総合研究センター	講師
	福山 秀直	京都大学大学院医学研究科附属脳機能総合研究センター	教授

研究要旨 ヒトの食欲は視床下部や延髄孤束核などの摂食の恒常性中枢だけでなく、報酬系や大脳皮質を含む高次脳機能によっても制御されていると考えられており、中枢性摂食異常症においてはこの高次の摂食制御、もしくは、末梢、恒常性中枢と高次摂食中枢との機能連関に異常をきたしているのではないかと考えることができる。ヒトにおいて、高次脳領域の活動と食欲との関係、末梢の栄養状態を中枢神経系に伝達する機能を有するレプチンや GLP-1 等のホルモンによる高次脳領域の活動制御の可能性を明らかにする目的で、機能的磁気共鳴画像法（functional MRI：fMRI）による脳神経活動の測定を行った。レプチン欠乏により過食を呈する脂肪萎縮症患者 10 名と健常者 10 名の比較を行い、空腹時食欲スコア・fMRI シグナルに差は無いが健常者では食後に認められる食欲スコアの低下、fMRI シグナルの減少が患者では障害されていること、レプチン補償療法によりこの障害が解除されることを示した。2 型糖尿病に対する GLP-1（リラグルチド）治療が食後の満腹感を増強し、報酬・情動関連領域の脳神経活動を抑制することを示した。さらに、インスリン分泌不全と抵抗性を併せ持つ 2 型糖尿病モデルマウスにレプチンと GLP-1 を共投与することにより、それぞれ単独よりも強力な摂食抑制がもたらされることを示した。

研究目的

ヒトの食欲・摂食は、①視床下部や延髄孤束核などからなる恒常性中枢（homeostatic center）、②腹側被蓋や側坐核等からなる報酬系中枢（hedonic center）、③大脳辺縁系・新皮質等の機能による情動・認知依存性の中枢（emotional, external and restrained eating center）から構成される。中枢性摂食異常症では、大脳辺縁系・新皮質における高次の摂食調節機能の障害や、恒常性中枢と高次中枢との機能連関の障害がとりわけ重要であるが、げっ歯類を用いた研究ではこれらの実体に必ずしも充分迫れているとは言えない。

一方、近年のエネルギー代謝研究の進歩により、脂肪細胞や消化管から分泌されて恒常性中枢だけでなく報酬系中枢の機能をも調節するホルモンが多数同定されつつある。脂肪細胞に由来するレプチン、主に下部小腸で産生されるグルカゴン用ペプチド - 1（GLP-1）はいずれも食欲を抑制するホルモンであり、

ヒトにおいても食欲抑制効果が実証されている。

そこで本研究では、①ヒト症例に対する末梢組織由来摂食調節ホルモンの投与が、中枢神経活動に及ぼす影響の機能的核磁気共鳴画像法（functional MRI：fMRI）による解析、②ホルモンの作用機序に迫るためのマウスを用いた研究、の双方を実施した。これにより、恒常性中枢と報酬系中枢、さらには辺縁系や新皮質等の高次の中枢の間の機能的連関をヒトにおいて明らかにし、中枢性摂食異常症における高次中枢の機能破綻、脳内機能連関の破綻のメカニズムを解明するための基盤的情報の収集を目指した。

研究方法

1. **レプチンによるヒト中枢神経活動変化の解析**
血中レプチン濃度の減少により過食をきたすと考えられる脂肪萎縮症患者 10 名、年齢と男女比を適合させた非肥満非糖尿病健常者 10 名に対し、空腹時および食後の食欲スコアのデータと fMRI を用いた ROI 解析（視床下部、眼窩前頭前野、扁桃核、海馬、島、側坐核、尾状核、被殻、淡蒼球）のデータを採取、その後レプチン補償療法を実施し、データの変化を解析した。
2. **GLP-1 によるヒト中枢神経活動変化の解析**
60 歳女性の 2 型糖尿病患者に対し GLP-1（Liraglutide）による治療を開始し前後における食欲スコアの評価と fMRI による解析を行った。
3. **レプチンと GLP-1 の相互作用に関する解析**
マウスに対し高脂肪食（HFD）負荷と低用量ストレプトゾトシン（STZ）投与を併用することでインスリン抵抗性とインスリン分泌障害を併せ持つ 2 型糖尿病モデル動物が誘導できることを以前報告した（Kusakabe T et al. Diabetologia, 2009）。この STZ/HFD モデルではコントロールマウスと比較して約 30% の摂取カロリーの増大を認め、また同用量の STZ マウスと比しても摂食量が有意に多いことから、過食のモデルと考えることができる。そこで本研究では、このモデルにレプチン（0.5mg/kg/day）と GLP-1（Exenatide）（20µg/kg/day）を浸透圧ミニポンプにより 14 日間、皮下にそれぞれ単独ないしは併用持続投与し、摂食量、呼気ガス濃度、体重の推移を検討した。

（倫理面への配慮）

ヒトを対象とした fMRI の検討については、京都大学医学研究科・医学部および医学部附属病院医の倫理委員会の承認の下、十分な説明に基づく患者本人からのインフォームドコンセントが得られた症例を対象に実施した。

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. 健常者群と患者群の食欲スコアには空腹時では差を認めなかったが食後には患者群で食欲スコアが有意に高かった。この患者群で亢進を認めた食欲スコアはレプチン治療により低下を認めた。食欲刺激に対する神経活動は、空腹時の左尾状核における応答がレプチンにより抑制された一方、食後の左扁桃核、左島、両側尾状核、左被殻での応答がレプチンで抑制された。
2. GLP-1 投与により食後の食欲スコアの低下が認められた。神経活動については、全脳解析では GLP-1 により食後の中心前回、中心後回などでの活動の増強と帯状回などでの抑制を認め、ROI 解析では全般に抑制が認められた。
3. レプチン、GLP-1 はいずれも単独で明らかな摂食抑制作用、体重減少作用（投与開始後 5 日目までは GLP-1 の方がレプチンよりも体重減少作用が顕著であったがそれ以降は同等であった）を示した。さらに両者の併用は相加的な摂食抑制作用・体重減少作用を示し、実に 14 日間の投与で STZ/HFD マウスの体重を約 3.5g も低下させた。VO₂ はレプチン投与群で高い傾向が認められたが差は有意ではなく、呼吸商は併用投与群においてのみ有意に減少したことから脂質利用の亢進が示唆された。

考察

ヒトの摂食活動は、恒常性維持のための食欲（視床下部・延髄孤束核）、食物の報酬的価値の追求としての食欲（腹側被蓋、側坐核）、情動や知覚刺激に基づく食欲（大脳辺縁系、大脳新皮質）などが重層的に寄与して規定される。本研究では食欲スコア（VAS: visual analog scale）と fMRI による food 画像に対する脳神経活動評価により、げっ歯類を中心とした研究から詳細が明らかとなりつつある恒常性食欲中枢の活動を超越したヒトの食欲の総合的評価法としての fMRI の有用性を実証した。さらに、ホルモンによる摂食関連脳領域の活動性変化とホルモンの相互作用について fMRI によるヒトでの解析とげっ歯類における検討を行い、中枢性摂食調節の内分泌性制御機構の一端を明らかにした。

結論

本研究では、中枢性摂食異常症で特に障害されると考えられる、高次の食欲調節中枢の神経活動について、末梢組織のエネルギー過剰や枯渇情報を脳に伝達するホルモンに対する応答性の観点から解析を行った。本研究により、ヒトにおける客観的食欲評価法としての fMRI の意義が示された。さらには食欲調節ホルモン間の中枢神経系内におけるクロストークの可能性をマウスの個体レベルにおいて明らかにし、これらが視床下部等、恒常性中枢だけではなく、大脳辺縁系や新皮質などのより高次の脳神経活動をも統合的に制御することでヒトの食欲を調節している可能性を明らかにした。

研究発表

論文発表

1. S. Masuda, T. Tanaka, H. Masuzaki, K. Nakao, S. Taguchi. Overexpression of leptin reduces the ratio of glycolytic to oxidative enzymatic activities without changing muscle fiber types in mouse skeletal muscle. **Biol. Pharm. Bull.** 37:169-173, 2014.
2. N. Yamada-Goto, G. Katsuura, K. Ebihara, M. Inuzuka, Y. Ochi, Y. Yamashita, T. Kusakabe, A. Yasoda, N. Satoh-Asahara, H. Ariyasu, K. Hosoda, K. Nakao. Intracerebroventricular administration of C-type natriuretic peptide suppresses food intake via activation of the melanocortin system in mice. **Diabetes**. 62:1500-1504, 2013
3. M. Aizawa-Abe, K. Ebihara, C. Ebihara, T. Mashimo, A. Takizawa, T. Tomita, T. Kusakabe, Y. Yamamoto, D. Aotani, S. Yamamoto-Kataoka, T. Sakai, K. Hosoda, T. Serikawa, K. Nakao. Generation of leptin-deficient Lepmkyo/Lepmkyo rats and identification of leptin-responsive genes in the liver. **Physiol Genomics** 45:786-793, 2013
4. M. Noguchi, K. Hosoda, M. Nakane, E. Mori, K. Nakao, D. Taura, Y. Yamamoto, T. Kusakabe, M. Sone, H. Sakurai, J. Fujikura, K. Ebihara, K. Nakao. In vitro characterization and engraftment of adipocytes derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. **Stem Cells Dev.** 22:2895-2905, 2013
5. M. Ida, M. Hirata, S. Odori, E. Mori, E. Kondo, J. Fujikura, T. Kusakabe, K. Ebihara, K. Hosoda, K. Nakao. Early changes of abdominal adiposity detected with weekly dual bioelectrical impedance analysis during calorie restriction. **Obesity** (Silver Spring). 21:E350-353, 2013

学会発表

1. Toru Kusakabe, Ken Ebihara, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao : 「Leptin replacement therapy for various types of lipodystrophy」 第 18 回アディポサイエンスシンポジウム 2013 年 8 月 大阪
2. 酒井建、日下部徹、海老原健、青谷大介、片岡祥子、海老原千尋、阿部恵、藤倉純二、細田公則、中尾一和 : 「レプチンによる膵臓内脂肪蓄積の減少とインクレチン作用の増強」 第 34 回日本肥満学会 2013 年 10 月 東京

知的財産権の出願・登録状況

なし

誘導された褐色脂肪細胞様組織でのFABP3の役割

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
	中村 祐樹	久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門

要旨 近年、褐色脂肪細胞以外に白色脂肪組織に出現する Beige 細胞でも熱産生が行われていることや、成人のヒトにも熱産生能を有する Beige 細胞が存在することが明らかとなった。Beige 細胞における熱産生は、神経性食欲不振症における低体温、グレリンによる体温調節にも関与していると考えられるがその役割は未だ明らかでない。そこで本研究では、中枢からの交感神経刺激により Beige 細胞における熱産生、脂肪酸代謝がどのように変化するか検討を行うこととした。その結果、寒冷刺激や、交感神経系の活性化により末梢の白色脂肪組織中の Beige 細胞では、熱産生蛋白質である UCP1 の上昇とともにそのエネルギー源を供給する脂肪酸酸化に関連する蛋白質の発現が上昇することが明らかとなり、末梢脂肪組織における熱産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、初代培養細胞を用いた実験ではこれらの脂肪酸酸化関連蛋白質の遺伝子発現は $\beta 3$ アドレナリン受容体アゴニスト、cAMP 増強剤投与により上昇しなかった。このことから、Beige 細胞における脂肪酸酸化関連蛋白質の遺伝子発現は UCP1 とは異なる機序によって制御されている可能性、培養細胞作成過程で細胞の性質が変化した可能性などが考えられた。中枢からの自律神経制御により、末梢の白色脂肪組織における熱産生、脂肪酸酸化がどのように制御されているのかを解明することは、中枢性食欲不振症における低体温の病態解明、治療開発に応用されることが期待される。

研究目的

神経性食欲不振症では、性腺ホルモンの低下やコルチゾールの増加などに加え、グレリン高値を示すことが報告されている。

また、神経性食欲不振症に見られる症状の1つとして、低体温が知られているがその原因は明らかでない。

我々はこれまで、グレリンによる体温の調節機構が明らかになれば、神経性食欲不振症に見られる低体温などの病態生理学的意義を明らかにすることができると期待し、検討を行ってきた。結果、野生型マウスにグレリンを投与すると著しく体温が低下することや、グレリン遺伝子欠損マウスでは絶食時に見られる体温低下が認められないことなど、グレリンによる体温の調節を介した恒常性維持について示してきた。また、グレリンにより中枢からの交感神経系を介した刺激が抑制されることや、褐色脂肪組織への交感神経刺激が抑制されることが体温低下の一因であることを明らかにした。

近年、褐色脂肪細胞以外に白色脂肪組織に出現する Beige細胞でも熱産生が行われていることや、成人のヒ

トにも熱産生能を有する Beige細胞が存在することが明らかとなった。Beige細胞における熱産生は、神経性食欲不振症における低体温、グレリンによる体温調節にも関与していると考えられるがその役割は未だ明らかでない。そこで本研究では、中枢からの交感神経刺激により Beige細胞における熱産生、脂肪酸代謝がどのように変化するか検討を行うこととした。

研究方法

1) 寒冷時、 $\beta 3$ アゴニスト投与時の白色脂肪組織における遺伝子、蛋白発現変動の解析

8週齢の野生型C56BL6Jマウスを使用し、5日間の寒冷刺激（4℃）を行った群もしくは $\beta 3$ アゴニスト投与（CL:CL316, 243, 1mg/kg）を行った群と同週齢のコントロール群とを比較し、腰部皮下脂肪組織における遺伝子発現、蛋白発現を解析した。遺伝子発現解析はリアルタイム定量PCRを用いて行い、蛋白質発現解析にはウェスタンブロット法、ELISA法を使用した。

2) 脂肪組織中の成熟脂肪細胞の分離

8週齢の野生型C56BL6Jマウスを使用し、5日間の寒

冷刺激（4℃）を行った群もしくはβ3アゴニスト投与（CL, 1mg/kg）を行った群と同週齢のコントロール群とを比較した。腰部皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理後、遠心、洗浄により成熟脂肪細胞群（adipo）と間質血管細胞群（SV）とを分離し、それぞれの遺伝子発現、蛋白発現を解析した。遺伝子発現解析はリアルタイム定量PCR法を用い、蛋白質発現解析にはウェスタンブロット法、ELISA法を使用した。

3）初代培養細胞の作製方法

8週齢の野生型C56BL6Jマウスの腰部皮下脂肪組織から、コラゲナーゼ処置、遠心によりを分離した脂肪前駆細胞を用い初代培養を行った。分化誘導のためIBMX, Dexamethasoneを2日間添加し、脂肪細胞へと分化を誘導。その後、維持培地にて8日間培養した成熟脂肪細胞を用い実験を行った。

4）初代培養細胞における遺伝子発現変動の解析

4週齢の野生型C56BL6Jマウス腰部皮下脂肪組織から作製した初代培養細胞を用い、β3アゴニスト（CL316, 243）、cAMP増強剤（IBMX, Forskolin, Bt2cAMP）投与を行った。コントロールと比較し試薬投与6時間後の脂肪酸酸化関連蛋白質の遺伝子発現の解析を行った。遺伝子発現解析にはリアルタイム定量PCRを使用した。

（倫理面への配慮）

動物実験は久留米大学動物実験委員会の承認のもと行った。具体的には、苦痛をもたらす方法を適用する際は、動物愛護上の配慮として、しかるべき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）寒冷時、β3アゴニスト投与時の白色脂肪組織における遺伝子、蛋白発現変動の解析

まず、腰部皮下脂肪組織における熱産生蛋白質UCP1発現の検討を行った。その結果、寒冷刺激群、β3アゴニスト投与とともにコントロール群と比較し、UCP1mRNAの発現が顕著に増加していた（図1）。次に褐色脂肪細胞において熱産生へのエネルギー供給に大きく寄与していると考えられている脂肪酸酸化関連蛋白質（FABP3, ACSS1, ACSL5, CPT1b, ACADL, ACADM, ACADS, ACAA2）のmRNA発現を検討した。結果、寒冷刺激群、β3アゴニスト投与とともにコントロ

ール群と比較し、これら脂肪酸酸化関連蛋白質のmRNA発現が顕著に増加していた（図2, 3）。FABPは脂肪細胞以外での発現も報告されている。脂肪組織は脂肪細胞以外に血管やマクロファージといった間質血管細胞群（SV）により構成されている。そこでFABP3が成熟脂肪細胞群（adipo）とSVのどちらの細胞群に主に発現しているかどうか検討するため、adipoとSVとを分離しFABP3発現の検討を行った。結果、成熟脂肪細胞においてFABP3が顕著に増加していることを確認した（図2）。以上の結果から、C56BL6Jマウスの腰部皮下脂肪組織における脂肪細胞では、寒冷刺激、β3アゴニスト投与により熱産生蛋白質であるUCP1や脂肪酸酸化に関連する蛋白質の遺伝子発現が顕著に増加していることが明らかとなった。

2）初代培養細胞における遺伝子発現変動の解析

4週齢の野生型C56BL6Jマウス腰部皮下脂肪組織から作製した初代培養細胞を用い実験を行った。まず、β3アゴニスト（CL:CL316, 243）、cAMP増強剤（Forskolin）投与によるUCP1発現動態の検討を行った。結果、CL、Forskolin投与群では、コントロール群と比較し、投与後6時間においてUCP1mRNA発現は顕著に増加していた（図4）。この結果から、今回作製した初代培養細胞は、マウスの腰部白色脂肪組織におけるBeige細胞の反応を反映していると考え、次に脂肪酸酸化関連蛋白質（FABP3, ACSS1, ACSL5, CPT1b, ACADL, ACADM, ACADS, ACAA2）のmRNA発現の検討を行った。結果、CL、Forskolin投与群では、コントロール群と比較し、投与後6時間においてこれら脂肪酸酸化関連蛋白質mRNA発現の増加は認められなかった（図5, 6）。

考察

今回の検討では、in vivoにおける結果と初代培養細胞を用いた実験では異なる結果が観察された。原因は不明であるがいくつかの原因が推定される。第一に、Beige細胞における脂肪酸酸化関連蛋白質の遺伝子発現はUCP1とは異なる機序によって制御されている可能性である。予備的な検討では、脂肪酸、糖濃度変化、インスリン、レプチン添加では脂肪酸酸化関連蛋白質の遺伝子発現は変化せず、現在のこれらの遺伝子発現を上昇させ因子は同定できていない。

次にUCP1発現細胞と、脂肪酸酸化関連蛋白質発現細胞とが異なる可能性が考えられる。今後は脂肪組織中の脂肪前駆細胞、幹細胞における影響を検討する必要がある。最後に、培養細胞作成過程で細胞の性質が変化した可能性が考えられる。今回の実験結果から、初代培養細胞における結果が必ずしもvivoの結果を反映していない可能性が示唆され、今後も初代培養細胞の結果を解釈する際には、in vivoにおける作用と比較し十分に検討する必要があると考えられる。

本研究の成果は、中枢性食欲不振症における低体温の病態解明、治療開発に応用されることが期待される。

結論

本研究では、中枢性食欲不振症において認められる低体温の病態生理解明、治療法開発のため、末梢脂肪組織における熱産生蛋白質UCP1の発現や脂肪酸代謝に関連する遺伝子発現制御の分子機構を解析した。本研究により、寒冷刺激や、交感神経系の活性化により末梢の白色脂肪組織中のBeige細胞では、熱産生蛋白質であるUCP1の上昇とともにそのエネルギー源を供給する脂肪酸酸化に関連する蛋白質の発現が上昇することが明らかとなり、末梢脂肪組織における熱産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

しかし、初代培養細胞を用いた実験ではこれらの脂肪酸酸化関連蛋白質の遺伝子発現はβ3アドレナリン受容体アゴニスト、cAMP増強剤投与により上昇しなかった。このことから、Beige細胞における脂肪酸酸化関連蛋白質の遺伝子発現はUCP1とは異なる機序によ

って制御されている可能性、培養細胞作成過程で細胞の性質が変化した可能性などが考えられた。

中枢からの自律神経制御により、末梢の白色脂肪組織における熱産生、脂肪酸酸化がどのように制御されているのかを解明することは、中枢性食欲不振症における低体温の病態解明、治療開発に応用されることが期待される。

研究発表

論文発表

1. Nakamura Y, Sato T, Shiimura Y, Miura Y, Kojima M. FABP3 and brown adipocyte-characteristic mitochondrial fatty acid oxidation enzymes are induced in beige cells in a different pathway from UCP1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 441 (1) 42-46.

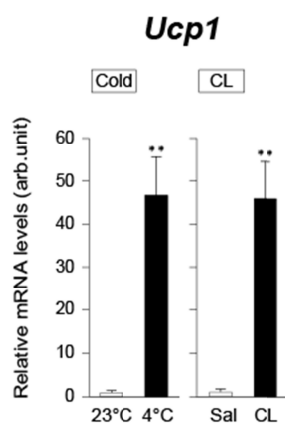
学会発表

1. 中村祐樹、佐藤貴弘、三浦芳樹、椎村祐樹、大楠英子、佐野浩子 児島将康:寒冷刺激時、皮下脂肪における脂肪酸酸化関連分子の変動について:第31回内分泌代謝学サマーセミナー2013.7.1 1-13 湯布院

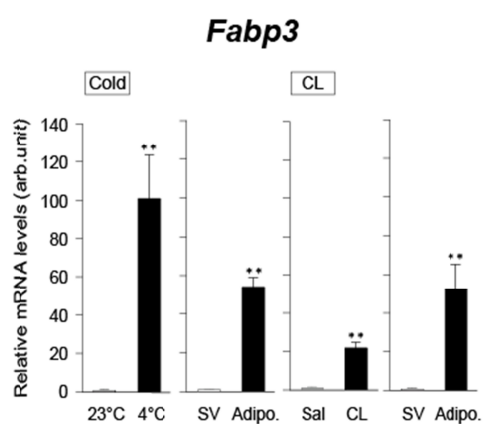
知的財産権の出願・登録状況

なし

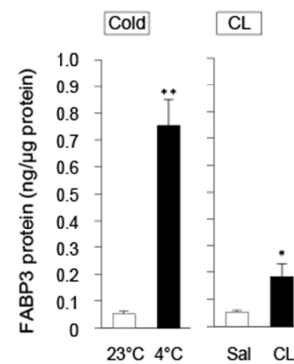
1



2

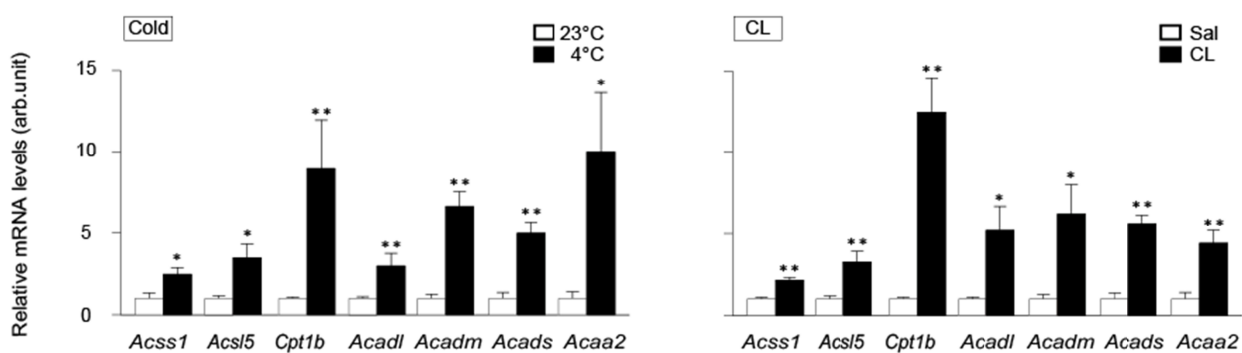


FABP3

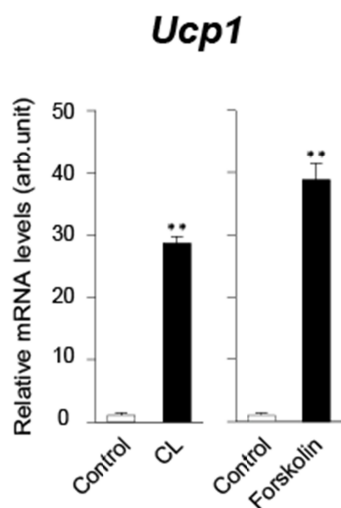


3

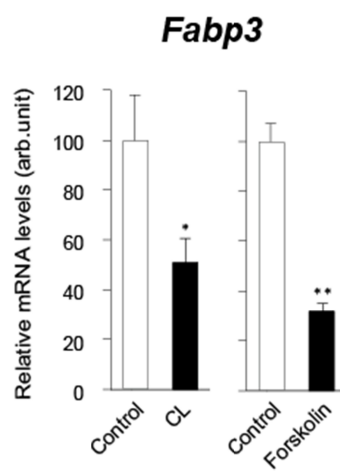
Mitochondrial FAO enzymes



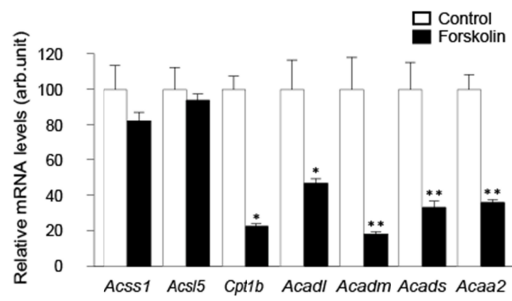
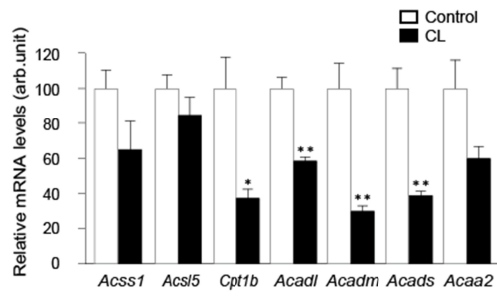
4



5



Mitochondrial FAO enzymes



飢餓を伴う中枢性摂食異常症病態生理モデル動物の検討

分担研究者	正木 孝幸	大分大学医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科
	千葉 政一	大分大学医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科
	野口 仁志	医療法人財団野口記念会野口病院内科

研究要旨 我々はこれまでに、飢餓条件で活性化される神経ヒスタミン（HA）が、視床下部で飢餓による体温低下を抑制し、扁桃体で情動反応を伴う強い食行動抑制反応に深く関与すること、前頭前野、背側海馬などの視床下部神経 HA と密に連携する神経核は飢餓時の食行動を調節的に制御することを報告してきた。今回我々は中枢性摂食異常症モデル動物作成を目標として、1）12 時間絶食におけるエネルギー調節における中枢性 HA 機能、2）飢餓シグナル AMPK 賦活化剤中枢性投与の食行動誘発応答におけるヒスタミン H1 受容体の役割、3）扁桃体への慢性 HA 負荷による影響について検討した。その結果、1）12 時間絶食負荷は中枢性 HA を介して低体温を抑制すること、2）飢餓時の食行動促進反応を中枢性ヒスタミン H1 受容体が抑制的に調節すること、3）扁桃体への HA 慢性作動は有意にラット体重、食行動を抑制し、一般活動量と視床下部 NPY 蛋白発現量を増加させることが判明した。以上より、飢餓時の食行動促進反応に対し、神経 HA が視床下部および扁桃体において食行動を抑制的に制御し、飢餓への適応を促進的に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 AMPK 活性が亢進するエネルギー欠乏状態で活性化され、ヒスタミン H₁ 受容体を介して、食行動を抑制し覚醒を促進する。末梢性には、交感神経活動を活性化し、白色脂肪組織での脂肪分解促進作用、褐色脂肪組織（Brown adipose tissue: BAT）での uncoupling protein（UCP）1 誘導にともなう熱産生促進作用を示す。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、視床下部神経ヒスタミンは、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）、扁桃体（amygdala; AMY）、海馬（Hippocampus）および側坐核（Nucleus accumbens; NAcc）と密な神経線維連絡を有しており、特に扁桃体の高次脳機能と視床下部神経ヒスタミンとの間に有意な機能連関が認められる。

平成 25 年度の研究では、飢餓などエネルギー欠乏情報処理における体温および食行動調節機構への神経ヒスタミンの関与および扁桃体へのヒスタミン慢性負荷による中枢性摂食異常症モデル動物の体重・行動変化および視床下部 NPY 発現量の変化について検討した。

研究方法

- 12 時間絶食時の体重・血糖・体温・褐色脂肪組織 UCP1 蛋白発現量に及ぼす中枢性ヒスタミンの役割**
c57bl6 雄性 10 週例マウスの側脳室に对照液 / FMH（ヒスタミン合成酵素阻害剤）を急性投与した後に 12 時間絶食を負荷し、各群間の体重・血糖・体温・褐色脂肪組織 UCP1 蛋白発現量（ウェスタンブロット法）の変化について検討した。
- 慢性留置カテーテルを介した無麻酔無拘束マウス側脳室への AMPK 活性急性操作による用量依存性の食行動変化**
c57bl6 雄性 10 週例マウスの側脳室にステンレスカテーテルを慢性留置し同部位より对照液 / AICAR

(AMPK 活性化剤) または CC (AMPK 活性阻害剤) を急性投与しマウス食行動変化を解析した。

3. 慢性留置カテーテルを介した無麻酔無拘束マウス側脳室への AMPK 活性急性操作による用量依存性の視床下部ヒスタミン代謝回転変化

c57bl6 雄性 10 週例マウスの側脳室にステンレスカテーテルを慢性留置し同部位より対照液 / AICAR (AMPK 活性化剤) または CC (AMPK 活性阻害剤) を急性投与しマウス視床下部ヒスタミン代謝回転を HPLC を用いて解析した。

4. 慢性留置カテーテルを介した無麻酔無拘束マウス側脳室への AMPK 活性急性操作による用量依存性の食行動変化

c57bl6 雄性 10 週例マウスの側脳室にステンレスカテーテルを慢性留置し同部位より対照液 / AICAR (AMPK 活性化剤) を急性投与しマウス食行動変化を解析した。

5. 慢性留置カテーテルを介した無麻酔無拘束 H1 受容体欠損マウス側脳室への AICAR 急性投与による食行動変化

c57bl6 雄性 10 週例マウスおよび同種同性同週令 HIKO マウスの側脳室にステンレスカテーテルを慢性留置し同部位より対照液 / AICAR (AMPK 活性化剤) を急性投与しマウス食行動を解析した。

6. 慢性留置カテーテルを介した無麻酔無拘束ラット扁桃体へのヒスタミン慢性投与による食行動の変化

Wistar ラット扁桃体へヒスタミンを Alzet mini-osmic pump を用いて 1 週間慢性投与し、対照液投与群との間で体重変化を比較検討した。

7. 慢性留置カテーテルを介した無麻酔無拘束ラット扁桃体へのヒスタミン慢性投与による食行動の変化

Wistar ラット扁桃体へヒスタミンを Alzet mini-osmic pump を用いて 1 週間慢性投与し、対照液投与群との間で食行動および一般活動量の変化を比較検討した。

8. 慢性留置カテーテルを介した無麻酔無拘束ラット扁桃体へのヒスタミン慢性投与による血清レプチン濃度および視床下部 NPY 蛋白発現量の変化

Wistar ラット扁桃体へ Alzet mini-osmic pump を用いてヒスタミンを 1 週間慢性投与し、血清レプチン濃度を ELISA 法を用いて、視床下部 NPY 蛋白発現量の変化をウェスタンブロット法を用いて、それぞれ対照液投与群との間で比較検討した。

ン濃度を ELISA 法を用いて、視床下部 NPY 蛋白発現量の変化をウェスタンブロット法を用いて、それぞれ対照液投与群との間で比較検討した。

(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

- 12 時間絶食負荷による顕著な体重減少は FMH 中枢性投与により有意に減弱した(図 1-1)が血糖降下反応には有意な影響を及ぼさなかった(図 1-2)。一方でマウスへの FMH 中枢性投与は 12 時間絶食負荷時の体温および褐色脂肪組織ウ CP 1 蛋白発現量を有意に低下させた (図 1-3) (図 1-4)。
- マウスへの AICAR 中枢性投与 (AMPK 活性化) は 3 時間食行動を有意に促進させ、CC の中枢性前投与 (AMPK 活性阻害) はこの反応を消失させた (図 2-1)。
- マウスへの AICAR 中枢性投与は視床下部ヒスタミン代謝回転を有意に促進させ、CC の中枢性前投与はこれを消失させた (図 2-2)。
- マウスへの AICAR 中枢性投与はマウス 3 時間食行動を用量依存性に有意に促進した (図 2-3)。
- マウスへの AICAR 中枢性投与はヒスタミン H1 受容体欠損マウス (HIKO) 3 時間食行動を有意に促進した (図 2-4)。
- 扁桃体にヒスタミンを 1 週間慢性投与したラットでは対照液投与ラットと比較して、体重および食行動に有意な抑制が認められた(図 3-1) (図 3-2)。この変化には一般活動量の有意な増加が共に観察された。
- 扁桃体にヒスタミンを 1 週間慢性投与したラットでは対照液投与ラットと比較して、血清レプチン濃度の有意な低下および視床下部 NPY 蛋白発現量の有意な増加がそれぞれ認められた(図 3-3) (図 3-4)。

考察

飢餓などのエネルギー欠乏条件が中枢神経系の

AMPK 活性化情報として処理され、NYP やグレリンなどの摂食促進神経ペプチドを介した食行動誘発反応を有意に促進する一方で、これらの摂食促進神経ペプチドらの多くは交感神経の活動性を抑制し褐色脂肪組織による産熱反応を抑制することが広く知られている。これまでの研究で、エネルギー欠乏情報で活性化された神経ヒスタミンが、前頭前野に作用して食行動選択を促進性に制御し、扁桃体に作用して恐怖の情動反応を伴って食行動を強く抑制する一方で、ヒスタミン H1 受容体を介して体温産生を活性化させる機構を駆動することが既に判明した。本研究によって新たに、1) エネルギー欠乏時の体温産生にはヒスタミンが中枢性に作動し飢餓時の体温低下を抑制すること、2) 飢餓に伴う視床下部ヒスタミン活性化は中枢性 AMPK 活性が促進性に関与し、飢餓時の食行動を抑制性に制御すること、3) 中枢性ヒスタミンの扁桃体での役割はエネルギーバランスが異化に傾く状態でも、視床下部 NPY 蛋白増加による食行動促進反応に拮抗して食行動を抑制性に制御する事が判明した(図4)。

結論

本研究により、飢餓で中枢性 AMPK を介して活性化された神経ヒスタミンが、H1 受容体を介して中枢性に褐色脂肪組織の UCP1 タンパク質を促進性に誘導し、飢餓による体温低下を抑制する一方、扁桃体では視床下部 NPY 誘導による食行動促進反応に拮抗して食行動を有意に抑制し、飢餓への生体の適応を更に促進させることが判明した(図4)。特に、この扁桃体慢性ヒスタミン負荷は一般活動量の有意な増加を伴うことから、中枢性摂食異常症のモデル動物として有用である可能性が強く示唆された。

健康危険情報

なし

研究発表

論文発表

1. Mitsutomi K, Masaki T, Shimasaki T, Gotoh K, Chiba S, Kakuma T, Shibata H: Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced

obesity. **Metabolism**;63:69-78, 2014.

2. Shimasaki T, Masaki T, Mitsutomi K, Ueno D, Gotoh K, Chiba S, Kakuma T, Yoshimatsu H: The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor des-fluoro-sitagliptin regulates brown adipose tissue uncoupling protein levels in mice with diet-induced obesity. **PLoS ONE**;8: e63626, 2013.
3. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Fujiwara K, Shimasaki T, Mitsutomi K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H: Brain-derived neurotrophic factor, corticotropin-releasing factor, and hypothalamic neuronal histamine interact to regulate feeding behavior. **Journal of neurochemistry**;125: 588-598, 2013.
4. Fukui A, Takahashi N, Nakada C, Masaki T, Kume O, Shinohara T, Teshima Y, Hara M, Saikawa T: Role of leptin signaling in the pathogenesis of angiotensin II-mediated atrial fibrosis and fibrillation. **Circulation Arrhythmia and electrophysiology**;6: 402-409, 2013.
5. Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shiraishi K, Shimasaki T, Matsuoka K, Ando H, Fujiwara K, Fukunaga N, Aoki K, Nawata T, Katsuragi I, Kakuma T, Seike M, Yoshimatsu H: Obesity-related chronic kidney disease is associated with spleen-derived IL-10. **Nephrology, dialysis, transplantation**;28: 1120-1130, 2013.
6. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Fujiwara K, Shimasaki T, Mitsutomi K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H: Hypothalamic brain-derived neurotrophic factor regulates glucagon secretion mediated by pancreatic efferent nerves. **Journal of neuroendocrinology**; 25:302-311, 2013.
7. Gotoh K, Masaki T, Chiba S, Ando H, Shimasaki T, Mitsutomi K, Fujiwara K, Katsuragi I, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H: Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. **Journal of neurochemistry**;124: 90-99, 2013.

学会発表

1. 千葉政一、魏会興、青佐泰志、重永雅美、北村裕和、伊奈啓輔、後藤孔郎、正木孝幸、加隈哲也、藤倉義久、柴田洋孝：「ヒト胸部大動脈周囲褐色脂肪組織の解剖学的・機能的特性」：第 109 回日本解剖学会 2014.3.27-29 栃木
2. 魏会興、千葉政一、青佐泰志、重永雅美、後藤孔郎、正木孝幸、加隈哲也、北村和裕、伊奈啓輔、藤倉義久、柴田洋孝：「必須アミノ酸ヒスチジン経口慢性摂取によりマウス肩甲骨間褐色脂肪組織の UCP 蛋白量は増加する」：第 34 回日本肥満学会 2013.10.11-12 東京
3. 青佐泰志、千葉政一、北村裕和、伊奈啓輔、魏会興、森脇千夏、後藤孔郎、正木孝幸、加隈哲也、藤倉義久、柴田洋孝：「持続的な照明ストレスが及ぼす生体応答と毛細血管構造の動態変化」：第 34 回日本肥満学会 2013.10.11-12 東京
4. 青佐泰志、千葉政一、魏会興、森脇千夏、北村和裕、伊奈啓輔、後藤孔郎、正木孝幸、加隈哲也、浜口和之、藤倉義久、柴田洋孝：「必須アミノ酸ヒスチジンの経口慢性摂取による抗肥満糖尿病効果」：第 56 回日本糖尿病学会 2013.5.16-18 熊本

知的財産権の出願・登録状況

なし

健常者と糖尿病患者に対する GLP-1 投与による摂食行動変化

分担研究者	中里 雅光	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	教授
	米川 忠人	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	
	山口 秀樹	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	
	上野 浩晶	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	
	土持 若葉	宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野	

要旨 ヒトにおいて、摂食抑制ペプチドのGLP-1投与による食欲、循環器系、消化管ホルモンへの急性作用を検討した。テストミール摂取後に糖尿病患者と健常者に対してGLP-1と生食の皮下投与を1週間間隔にて同一対象者に施行し、経時的に満腹感と空腹感のVAS (visual analogue scale)を観察した。糖尿病患者と健常者ともに単回投与ではGLP-1による摂食行動には影響を及ぼさなかった。糖尿病患者、健常者ともに食事後にかかわらずGLP-1投与により収縮期、拡張期血圧がともに上昇し、血中アドレナリン上昇を認めた。さらに糖尿病患者、健常者ともにインスリンの初期分泌増強を認め、活性型GIPの初期分泌抑制とグルカゴンとグレリンの後期分泌亢進を認めた。GLP-1の急性投与では摂食行動に影響を及ぼさなかった。

研究目的

末梢からの消化管ホルモン投与に対する摂食調節作用には、血液脳関門の通過と末梢神経（迷走神経）からの求心路が主たる役割を呈する。昨年、我々はラットにおいて摂食亢進ペプチドのグレリンと摂食抑制ペプチドのGLP-1との相互作用を検討した。グレリンによる急性投与は、摂餌を増加させ、迷走神経求心線維の発火頻度を抑制した。一方、GLP-1の先行投与によりグレリンの摂餌増加作用と迷走神経求心線維の発火頻度の抑制は消失した。迷走神経の求心線維は摂食量を調節することが明らかとなり、今回、ヒトにおいて、食後のGLP-1急性投与による満腹感と空腹感の変化、血圧調節を含めた自律神経と消化管ホルモン変動を検討した。

研究方法

糖尿病患者と健常者（非糖尿病）に対して、テストミール（450kcal; 炭水化物 52%, タンパク質 15%, 脂質 33%）を摂取開始 20 分後に GLP-1（7-36）amide 5μg/kg を皮下投与し、投与前、15,30,45,60,90,120,180 分後に以下の各項目について検査を施行した。同一対象者に対して、本試験 1 週間前にテストミール摂食後に生食の皮下投与を施行し、同一項目の検査を施行し、比較対照とした。

（倫理面への配慮）

本研究は宮崎大学倫理委員会（第 1074 号）で承諾を得た。

項目 1：テストミール摂食後の満腹感と空腹感の VAS（visual analogue scale）を経時的に観察した。

項目 2：循環器系の検査として、経時的に血圧、脈拍、血中カテコールアミン、ヒト心房性 Na 利尿ペプチド（hANP）、脳性 Na 利尿ペプチド（BNP）評価した。

項目 3. 消化管ホルモン関連検査として、経時的に血糖、インスリン、グルカゴン、活性型 GLP-1、活性型 GIP、グレリン、デスアシルグレリンを測定した。

測定方法：既報の RIA 法として、血中ノルアドレナリン、アドレナリン、hANP、BNP、インスリンを測定し、EIA 法として、グルカゴン、活性型 GLP-1、活性型 GIP、グレリン、デスアシルグレリンを測定した。

解析方法：同一対象者に対して、生食投与と GLP-1 投与間において、paired-T 検定を施行した。

対象者背景を表 1 に示す。

糖尿病患者

症例数(男性)	年齢	HbA1c (NGSP,%)	BMI
10(2)	62±6.7	7.3±1.4	25.2±4.4

健常者

症例数(男性)	年齢	HbA1c (NGSP,%)	BMI
9(2)	64±6.4	5.4±0.3	22.4±1.4

表1: 対象者背景を示す。糖尿病患者の内服状況は、内服なし3名、メトホルミン 500-750mg/日 7名。健常者(非糖尿病患者)の内服状況は内服なし5名、降圧剤内服4名、高脂血症薬1名。数値はmean±SEMを示す。

研究結果

1. 糖尿病患者、健常者ともに摂食後の GLP-1 投与による空腹感と満腹感のVAS変化はなかった。(図1)

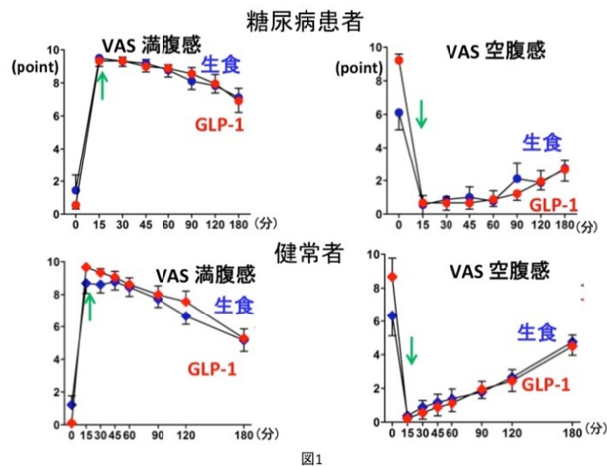


図1

図1: 上段は糖尿病患者、下段は健常者のVAS結果を示す。数値はmean±SEMを示す。↓はGLP-1投与時を示す。

2. 糖尿病患者、健常者ともに食事後にかかわらずGLP-1投与により収縮期、拡張期血圧が上昇した。糖尿病患者でのみ45分後に血中アドレナリン上昇を認めた。一方、hANP、BNPにおいては経時変化を認めなかった(図2a,b,c)

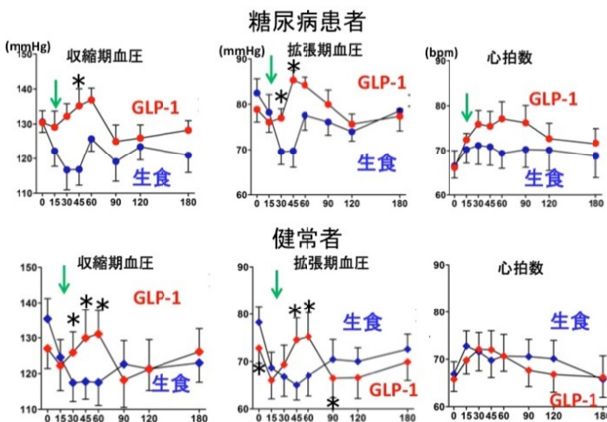


図2a

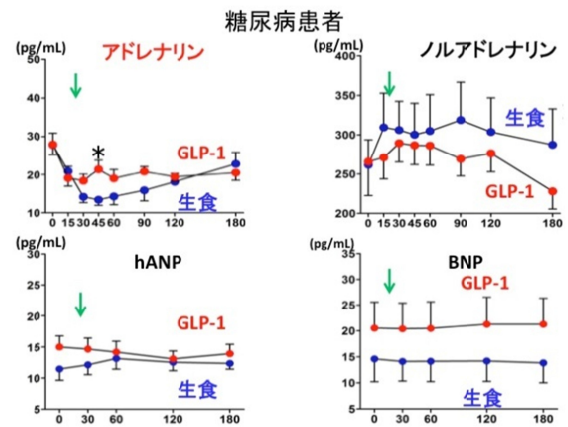


図2b

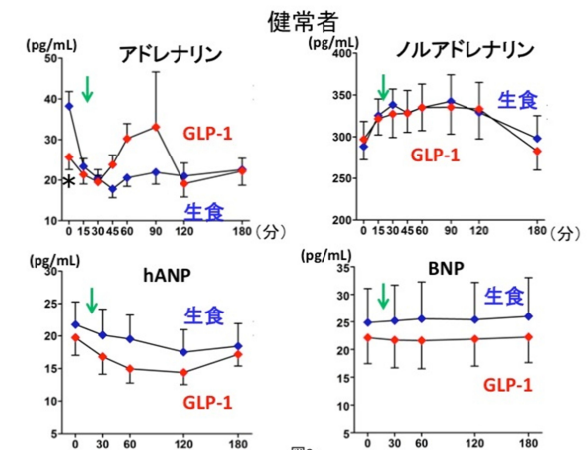


図2c

図2a,b,c: 循環器系検査の結果を示す。赤印はGLP-1投与、青印は生食投与を示す。*はp<0.05を示す。

3. GLP-1投与により糖尿病患者、健常者ともにインスリンの初期分泌増強を認めた。糖尿病患者、健常者ともに活性型GIPの初期分泌抑制とグルカゴンとグレリンの後期分泌亢進を認めた。(図3a,b)

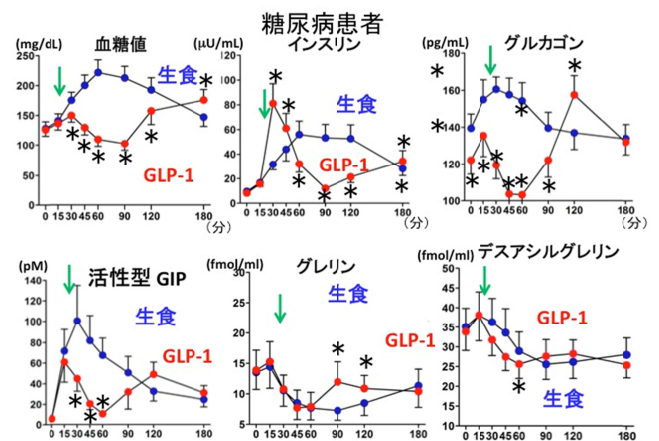


図3a

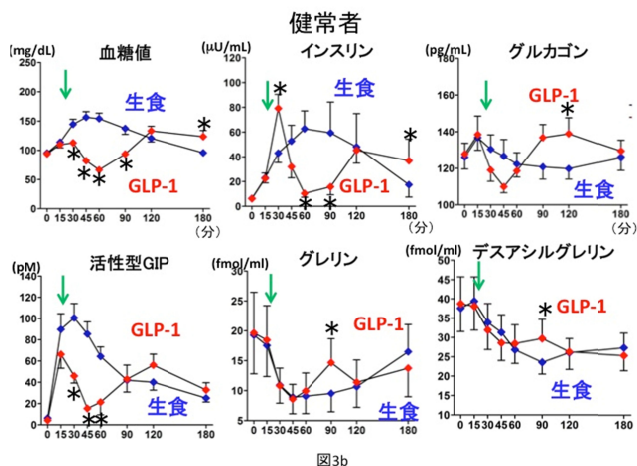


図 3b

図 3a,b:消化管ホルモン変化を示す。

考察

GLP-1 アナログ製剤は、すでに多くの糖尿病患者に投与され、患者の摂食行動が抑制され体重減少を生じるが、今回の GLP-1 急性投与において、糖尿病患者と健常者ともに摂食後の空腹感と満腹感の VAS 変化はなかった。VAS による満腹感、空腹感の評価感度が低いことと、長期投与でしか摂食抑制を生じないことが示唆された。

ヒトにおいて GLP-1 投与は交感神経活性を亢進し、心拍数の増加を認めることが報告されている。本試験においても、食後にかかわらず GLP-1 投与により血圧上昇が確認された。心拍変動では心臓への副交感、交感神経への作用は証明されていないが、血中アドレナリン上昇を認め、副腎髄質への間接作用が示唆された。GLP-1 投与による血中活性型 GIP とグルカゴンの減少はそれぞれの産生細胞に対する直接作用と考えられるが、後期相におけるグレリンならびにデスアシルグレリンの上昇のメカニズムに関しては不明である。

結論

糖尿病患者と健常者ともに GLP-1 の急性投与では満腹感、空腹感に影響を及ぼさなかった。

研究発表

論文発表

1. 土持若葉, 上野浩晶, 中里雅光: グレリンによる神経求心作用. **血管医学** 14: 17-21, 2013
2. 盛永裕太, 上野浩晶, 中里雅光: 肥満を伴う糖

尿病患者の管理の進めかた.

Medical Practice 30: 813-816, 2013

3. Ueno H, Mizuta M, Shiiya T, Tshuchimochi W, Noma K, Nakashima N, Fujihara M, Nakazato M.: Exploratory trial of intranasal administration of glucagon-like peptide-1 in Japanese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, in press

学会発表

1. 柴田博絵, 盛永裕太, 山下英一郎, 土持若葉, 椎屋智美, 水田雅也, 上野浩晶, 中里雅光: リラグルチドの血糖改善作用と体重への影響について. 第 56 回日本糖尿病学会総会, 2013. 5.16, 熊本.
2. 柴田博絵, 上野浩晶, 石川枝美, 坪内千佳子, 清水浩一郎, 山下英一郎, 山口秀樹, 米川忠人, 中里雅光: GLP-1 製剤が著効した抗精神病薬内服中の肥満 2 型糖尿病患者の 2 例. 西日本肥満研究会, 2013.7.21, 沖縄.

知的財産権の出願・登録状況

なし

神経画像を用いた神経性無食欲症の中枢神経機能障害探索

分担研究者	尾崎 紀夫	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野
	幸村 州洋	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野
	片山 寛人	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野
	河野 直子	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野
	今枝 美穂	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野
	加藤 咲	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野
	福田 奈菜	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野
	矢野 円郁	神戸女学院大学認知心理学研究室
	田中 聡	名古屋大学医学部付属病院精神科
	西岡 和郎	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野
	飯高 哲也	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学・親と子どもの心療学分野

研究要旨 神経性無食欲症（AN）は罹患率、死亡率ともに高く社会的に重大な疾患であるにもかかわらず、背景となる中枢神経系の高次機能ならびに構造の変化については未だ十分な知見は得られていない。そこで、本研究においては、近赤外線スペクトロスコピー（NIRS）および脳MRI構造画像を用いて成人AN患者の中枢神経系病態を探索した。NIRSを用いて、摂食障害（ED）群と健常被験者（CTL）群を対象として、測定された課題下前頭葉血流変化とEating Disorder Inventory-2との関係性を検討した。ED群ではCTL群に比べて有意に血流変化が小さく、対人不安定尺度（SIS）得点が高かった。両側眼窩前頭皮質（OFC）における血流変化とSIS得点は、ED群では正に相関し、CTL群では負に相関した。この結果から、ED群ではOFC活性が低いほど対人不安定の自覚が乏しくなると考えられた。また、MRI構造画像のVBM解析により、ED群ではCTL群に比し、年齢による補正後に前頭前野、頭頂連合野、帯状回で、年齢およびBMIによる補正後に左側視床枕で体積低下を認めた。視床枕の構造異常に起因する視覚情報処理の障害が元来あり、やせによる連合野、帯状回の萎縮が引き起こす認知・実行機能や視空間認知の障害が加わり、EDの病態が形成されると考えられた。

研究目的

近年、我が国の若い女性はBMIが年々低下しているが、BMIが低くても自分をやせていると考えていない女性が多いことが報告されている（厚生労働省平成16年国民健康・栄養調査）。この一般女性が持つ「過剰なやせ願望」傾向と深く関わる摂食障害、特に神経性無食欲症（AN）は、女性における生涯罹患リスクが0.3-1.0%に及び、5.1/1000人年と他の精神疾患よりも高い死亡率を呈する社会的に重大な疾患である。

また、ANに伴うボディイメージの障害や病態の失認、やせ願望など、AN患者は治療の必要性を認識しないことも多く、治療導入には大きな配慮が必要である。しかしANの背景となる中枢神経系の高次機能な

らびに構造の変化については未だ十分な知見は得られていないが現状である。

以上を踏まえ、本研究では、成人AN患者の中枢神経系病態を探索する目的で、以下の二つの検討を実施した。1）脳機能の検討のため、近赤外線スペクトロスコピー（NIRS）を用いて言語流暢性（VF）課題を実施中の前頭前野におけるoxy-Hbの変化を測定し健常コントロールと比較するとともに、認知機能検査、各種心理検査・質問紙検査を平行して行い、NIRSとの関連を検討した。2）脳構造の検討のため、脳MRI画像を用いてvoxel-based morphometry（VBM）法により、全脳を対象として局所体積の差異の検討を行った。

研究方法

患者群は、構造化面接法である SCID-I module H を用いて、アメリカ精神医学会の診断基準 DSM-IVTR による AN と診断された名古屋大学医学部附属病院精神科入院患者を対象とした。健常対照群として、SCID-NP を用いて精神疾患の既往を認めなかった成人女性被験者を対象とした。研究参加について文書による本人の同意が得られない者、主治医の同意が得られない者、非自発的入院患者、未成年者は除外した。被験者は全員 Edinburgh 利き手調査にて 右利きであることを確認した。

1. NIRS の施行

島津製作所製 FOIRE-3000 を使用した。プローブ 15 個 (3×5) を専用のホルダに装着し 22ch の計測を行った。

1-1. 前頭葉検査

プローブの最下列の中央が国際 10-20 法の Fpz に一致するようにホルダを前額部に取り付け、NIRS による測定をしながら VF 課題を行った。プレタスクとして被験者に「あいうえお」と 30 秒間繰り返し発声させた。次に、タスクとして「あ」「き」「は」「と」「せ」「い」「は」「か」「た」から試験者が選んだ頭文字より始まる言葉を 20 秒間でできるだけ多く言わせ、これを 3 回繰り返し続けた。最後に再び「あいうえお」を 70 秒間繰り返し発声させた。その後、Stanford 眠気尺度を調査した。また、NIRS の測定前後で血中酸素飽和度の測定も行った。

1-2. 質問紙・心理検査

i. 下記の質問紙を記入させた。

EDI-2 (摂食障害評価) 、Edinburgh 利き手調査

ii. 下記の心理検査を試験者が行った

患者群に SCID-I モジュール H 、健常対照群に SCID-NP、被験者全員に Stanford 眠気尺度、BDI

2. MRI

3T MRI T1 強調画像を全被験者から得た。VBM 法 (VBM8) により、患者群と対照群との大脳の局所体積の差異を検討した。解析は、VBM8 にて解析 (threshold 0.15 two sample t-test ; FWE ; $p < 0.05$) した。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学大学院医学系研究科及び医学部附属病院生命倫理審査委員会にて承認を得て、承認

事項に則り、参加者全員から文書による説明と同意を得て実施した。

研究結果

1. NIRS と質問紙・心理検査

- 1-1. ED 群は AN17 名、ED-NOS3 名 (3 名とも BMI < 14) であり神経性大食症は含まなかった。
- 1-2. ED 群は平均 BMI14.0 であり、これまでに行われた NIRS、fMRI、PET 等の研究と比較しても最も低かった。また、何度も入院を必要とした臨床中、中核的な重症例が中心だった (表 1)。
- 1-3. ED 群では Stanford 眠気尺度の点数が有意に高いにもかかわらず、VF 課題の得点も有意に高かった (表 1)。

表 1. NIRS 解析の対象

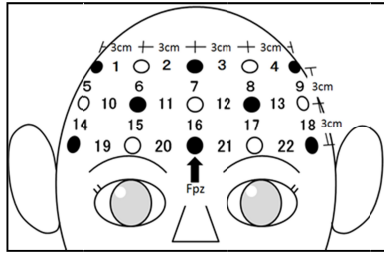
	AN [制限型:4 無茶食い排泄型:13 ED 特定不能: 3 (n = 20)]	CTL (n = 31)	p
年齢	28.7±7.5	29.2±7.8	0.824
教育年数	14.4±2.0	15.6±1.8	0.025
入院回数	3.6±4.8	N/A	N/A
累積入院日数	123.3±191.5	N/A	N/A
BMI (kg/m ²)	14.0±2.3	21.8±3.7	<0.001
言語流調整課題	15.5±5.2	12.6±3.5	0.024
対人不安定	11.3±4.3	4.9±3.2	<0.001

- 1-4. 質問紙検査では EDI-2 は全ての項目で患者群が有意に高得点であった (表 2)。

表 2. EDI-2 の結果

	ED (n = 20)	CTL (n = 31)	p	Cohen's d
Drive for thinness	9.0±5.7	3.7±4.0	< 0.001	1.09
Bulimia	5.7±6.5	1.1±1.7	0.006	1.06
Body dissatisfaction	13.8±5.3	8.9±6.5	0.007	0.81
Ineffectiveness	14.2±6.7	4.4±3.1	< 0.001	1.99
Perfectionism	5.8±3.8	1.1±1.7	< 0.001	1.72
Interpersonal distrust	8.3±4.6	3.4±2.9	< 0.001	1.31
Interoceptive awareness	11.9±7.7	1.4±2.3	< 0.001	2.00
Maturity fears	10.4±5.0	3.5±2.8	< 0.001	1.78
Asceticism	7.6±5.3	3.6±2.2	0.008	1.05
Impulse regulation	10.3±7.5	1.3±2.3	< 0.001	1.74
Social insecurity	11.3±4.3	5.0±3.2	< 0.001	1.69

- 1-5. VF 課題中の NIRS にて患者群の両側前頭葉眼窩皮質 (OFC) (下図の 10,11,12,14,15,16,18,21,22) で有意に反応低下が見られた。



- 1-6. VF 課題中の NIRS にて患者群では両側 OFC の反応性と対人不安定に逆相関が BMI 補正後も見られ (表 3)、CTL 群では正の相関が見られた。

表3：BMIを制御変数とした対人不安定得点と課題中Oxy-Hbの偏相関係数

	Ch20	Ch21	Ch22
偏相関係数	0.79	0.71	0.64
p	<0.01	<0.01	<0.01

2. MRI

年齢で補正して評価したところ、患者群で前頭前野、頭頂連合野、帯状回における体積低下が認められた³。年齢および BMI にて補正を行ったところ、左側視床枕が体積低下した領域として同定された。

考察

これまでに、摂食障害群の NIRS では両側前頭葉眼窩皮質 (OFC) と右前頭側頭葉で血流低下がみられることが報告されていたが、本研究でも同様の結果となった。一般に OFC は主観的評価に基づく意思決定や不測の事態における結果予測に関与していると言われており、OFC の機能が低い CTL 群は適応的に行動し対人不安定を生じず、OFC の機能がとりわけ低い ED 群では対人関係が不安定となるが自覚が乏しくなり、このことは病識の欠如と関連する可能性が示唆された。

MRI の結果からは、摂食障害において視覚情報の処理に関与する視床枕の障害が元来存在し、これにやせが加わることで、認知・実行機能や視空間認知に関わる連合野および帯状回の障害が加わり、病態が形成されることが示唆された。

結論

本研究により、成人 AN では両側前頭葉眼窩皮質の

機能が低下しており、対人不安定との関連が考えられ、また視覚情報の処理の障害や視空間認知の異常が認められることが示唆された。

研究発表

論文発表

- Shiino T, Koide T, Kushima I, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Aleksic B, Banno M, Kikuchi T, Kohmura K, Adachi Y, Kawano N, Okada T, Inada T, Ujiike H, Iidaka T, Suzuki M, Iwata N, Ozaki N: Common variants in bcl9 gene and schizophrenia in a Japanese population: Association study, meta-analysis and cognitive function analysis. **J Med Biochem** 32 (4):351-357, 2013
- Sasada K, Iwamoto K, Kawano N, Kohmura K, Yamamoto M, Aleksic B, Ebe K, Noda Y, Ozaki N: Effects of repeated dosing with mirtazapine, trazodone, or placebo on driving performance and cognitive function in healthy volunteers. **Hum Psychopharmacol** 28 (3):281-6, 2013
- Kohmura K, Iwamoto K, Aleksic B, Sasada K, Kawano N, Katayama H, Noda Y, Noda A, Iidaka T, Ozaki N: Effects of sedative antidepressants on prefrontal cortex activity during verbal fluency task in healthy subjects: a near-infrared spectroscopy study. **Psychopharmacology (Berl)** 226 (1):75-81, 2013
- Kawano N, Awata S, Ijuin M, Iwamoto K, Ozaki N: Necessity of normative data on the Japanese version of the Wechsler Memory Scale-Revised Logical Memory subtest for old-old people. **Geriatr Gerontol Int** 13 (3):726-30, 2013
- Iwamoto K, Kawano N, Sasada K, Kohmura K, Yamamoto M, Ebe K, Noda Y, Ozaki N: Effects of low-dose mirtazapine on driving performance in healthy volunteers. **Hum Psychopharmacol** 28 (5):523-8, 2013
- Aleksic B, Kushima I, Ohye T, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Koide T, Iritani S, Kurahashi H, Iwata N, Ozaki N: Definition and refinement of the 7q36.3 duplication region associated with schizophrenia. **Sci Rep** 3 2587, 2013
- Aleksic B, Kushima I, Hashimoto R, Ohi K, Ikeda M, Yoshimi A, Nakamura Y, Ito Y, Okochi T, Fukuo Y, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Ujiike H, Suzuki M, Inada T, Takeda M, Kaibuchi K, Iwata N, Ozaki N: Analysis of the

VAV3 as Candidate Gene for Schizophrenia: Evidences
From Voxel-Based Morphometry and Mutation Screening.
Schizophr Bull 39 (3):720-8, 2013

学会発表

1. Hiroto Katayama, Kunihiro Kohmura, Miho Imaeda, Satoshi Tanaka, Kazuo Nishioka, Naoko Kawano, Tetsuya Iidaka, Norio Ozaki : "Social insecurity associated with orbitofrontal function in eating disorder: A near-infrared spectroscopy (NIRS) study" : 11th World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP), 2013
2. Kunihiro Kohmura, Hiroto Katayama, Satoshi Tanaka, Miho Imaeda, Naoko Kawano, Kazuo Nishioka, Branko Aleksic, Tetsuya Iidaka, Norio Ozaki : "Decrease of thalamic volume in anorexia nervosa: Voxel-based morphometric MRI study": 11th World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP), 2013
3. 片山寛人、幸村州洋人、河野直子、矢野（松岡）円郁、今枝美穂、田中聡、西岡和郎、飯高哲也、尾崎紀夫 : 「近赤外線スペクトロスコピー（NIRS）を用いた神経性食思不振症の中樞神経機能障害探索」：第25回日本総合病院精神医学会総会, 2012

知的財産権の出願・登録状況

なし

神経性食欲不振症に合併した骨粗鬆症に対する エルデカルシトールの治療効果の検討

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 女性生涯健康センター内科
	浦野 綾子	さいたま石心会病院 内科
	荒木 まり子	永井ひたちの森病院 内科

研究要旨 骨粗鬆症は神経性食欲不振症の主な合併症で、骨密度の回復は体重に相関する。慢性遷延化した低体重患者では骨密度の低下に対する薬物療法の確立が必要である。本症患者の約半数で、骨代謝に重要なビタミンDの不足と診断され、我々はすでに活性型ビタミンD3製剤であるアルファカルシドールの腰椎骨密度低下に対する阻止効果を報告している。今回、新しい活性型ビタミンD3製剤であるエルデカルシトールの骨代謝に対する効果を前向きに検討した。低体重で骨密度の低下があり、血中25hydroxy VDが20mg/dl未満のビタミンD欠乏を有する女性患者12名にエルデカルシトール0.75μg/日を内服させた。1名は高カルシウム血症を併発し、2名は内服のコンプライアンスが不良であった。内服1ヶ月後から骨吸収マーカーである尿中型コラーゲン架橋N-テロペプチド（NTx）と骨形成マーカーである血清オステオカルシン（OC）の低下傾向を認め、投与後6カ月目にNTxは前値の58±18%、血清OCは前値の58±14%に低下し、1年後も維持していた。有意な体重増加はなかったが、1年後の腰椎骨密度は9.0±4.1%増加した。ビタミンD不足を伴う神経性食欲不振症患者では、エルデカルシトールは亢進した骨吸収を改善して腰椎骨密度の増加作用を示したので、本症に合併した骨粗鬆症の治療法として有用であると考えられた。

背景

骨粗鬆症は神経性食欲不振症の主な合併症で、かつ、後遺症である。低下した腰椎骨密度の回復は体重に相関し、低体重の慢性患者の骨密度はさらに低下する。日本人のビタミンD欠乏率は高く、本症でも約半数がビタミンD不足と診断され、我々は以前に、アルファカルシドールの腰椎骨密度の低下に対する阻止効果を報告している。新たな活性型ビタミンD3誘導体であるエルデカルシトールは既存の薬剤に比べて骨吸収と骨折抑制作用が高いので、本症に合併した骨粗鬆症に対する治療効果を検討し、薬物治療の一つとして確立したい。

目的

骨密度が低下し、ビタミンDが不足した神経性食欲不振症患者にエルデカルシトールを内服させ、骨代謝マーカーや骨マトリックスマーカーを測定し、1年後の腰椎骨密度の変化を前向きに検討した。

対象と方法

厚生労働省調査研究班の診断基準（1989年）を満たし、骨密度の低下を認める女性患者21名を対象とした。全員、無月経である。

骨代謝に影響を与える薬剤やサプリメントは使用していない。血中25hydroxy vitamin D（25OHVD）値が20mg/dl未満をVD不足と判断した。ビタミンD不足患者は12名で、病型は制限型4名とむちゃ食い/排出型8名で、年齢は31.2±4.3（Mean±SD）歳、発症年齢は19.7±1.4歳、病期期間は11.6±4.2年、Body mass index（BMI）は14.2±0.9 kg/m²、標準体重の64.7±6.1%であった。ビタミンDが正常の9名の病型は制限型5名とむちゃ食い/排出型4名で、年齢は29.4±5.3歳、発症年齢は18.7±3.2歳、病期期間は10.3±5.4年、BMIは12.6±1.3 kg/m²、標準体重の58.2±5.3%でビタミンD不足群と有意差を認めなかった。ビタミンD不足と正常群の腰椎骨密度とT-scoreはそれぞれ、0.68±0.09

g/cm²、 -3.1 ± 0.8 と 0.70 ± 0.11 g/cm²、 -2.9 ± 1.0 で有意差は認めず、骨粗鬆症と診断された。

ビタミンD正常患者を対照群として薬物投与は行わず、ビタミンD不足患者にはエルデカルシトール 0.75μg/日を内服させた(エルデカルシトール群)。エルデカルシトール群と対照群の患者はエントリー前、その後1か月、3か月、6か月、1年後に午前中の血液で骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)、オステオカルシン(OC)、骨マトリックスマーカー、骨代謝に関わるホルモンを、起床後二番尿で型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTx)を測定した。1年後に第2-4腰椎骨密度をDXA法で測定した。この臨床研究は東京女子医科大学倫理委員会の承認を得て行った。

結果

エントリー時の骨代謝マーカー、骨マトリックスマーカー、骨代謝に関わる生化学、および、内分泌データを表1に示した。骨形成マーカーのBAPは亢進しているが、成熟した骨芽細胞が生成するオステオカルシンは低下し、骨吸収マーカーである尿中NTxは亢進しており、低体重の本症患者の骨代謝と矛盾しない結果であった。ビタミンD欠乏群の血清intact PTH値は上昇し、対照群と統計学的有意差を認めた。これはビタミンD不足による変化と考えられた。エルデカルシトール群の血清低カルボキシル化オステオカルシン(ucOC)値が対照群より有意に上昇しており、ビタミンK不足と判断された。食物性ビタミンKの摂食を促した。

エルデカルシトール群では、1例が投与後1ヶ月目に血清カルシウム 11.7 mg/dlの高カルシウム血症を併発し、投与を中止した。2例は内服のコンプライアンスが不良であり、解析から除外した。

エルデカルシトール内服1ヶ月目から骨吸収マーカーである尿中NTx値と骨形成マーカーである血清OCの低下傾向を認め、投与後6ヶ月目にNTxは前値の $58 \pm 18\%$ 、血清OCは前値の $58 \pm 14\%$ に低下し、1年後も維持していた(図1)。

1年後の体重の変化は、対照群は 12.6 ± 1.3 kg/m²から 13.1 ± 1.5 kg/m²、エルデカルシトール群は 14.2 ± 0.9 kg/m²から 14.4 ± 1.7 kg/m²で有意差はなかった。対照群の1年後の骨密度は 0.68 ± 0.09 mg/cm²でエントリー時と有

意差を認めなかったが、エルデカルシトール群は 0.73 ± 0.10 mg/cm²に増加し、エントリー時に比べて $9.0 \pm 4.1\%$ 増加した。個々の患者の骨密度の変化を図2に示した。

考察

神経性食欲不振症に伴う骨密度の低下の予防と治療は、体重を増加させることである。著者らの検討では、BMIを 16.4 ± 0.3 kg/m²以上に増加させれば、更なる骨密度の低下を阻止することができる。しかしながら、慢性患者では迅速な体重増加が困難である。そこで、骨密度の低下を最小限する治療が必要である。ビスフォスフォネートは骨軟化症などの副作用があるので20~30歳代の患者には使用しない。エストロゲンの補充療法は理想体重の70%以下の低体重患者でのみ骨密度の低下を阻止する。我々は活性型ビタミンD3、あるいはビタミンK2の投与は骨密度の増加作用は弱い、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。しかし、骨密度を増加させる薬剤が望まれていた。

エルデカルシトールは活性型ビタミンD3誘導体で、既存の活性型ビタミンD3製剤に比べて骨吸収と骨折抑制作用が高いことが報告されている。アルファカルシドールを対照とした無作為二重盲検並行群間比較試験で、エルデカルシトール投与群がアルファカルシドール投与群に比べて、3年間の新規椎体骨折の発生頻度が統計学的に有意に低かった。

本症患者は一般に、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。

副作用は既存の性型ビタミンD3製剤と同様で、頻度も同程度と報告されている。本検討では、カルシウム製剤を併用しなかったが、1例に1カ月後に中等度以上の重症度の高カルシウム血症を併発し、脱水や食欲不振を呈した、使用後早期の血清カルシウムの検査は必須である。

結論

ビタミンD不足を伴う神経性食欲不振症患者では、エルデカルシトールは亢進した骨吸収を改善し、腰椎骨密度の低下の阻止ではなく増加作用を示した。

研究発表

論文発表

1. 鈴木（堀田）真理：摂食障害の身体管理． **精神神経医学** 42：537-545，2011.
2. 鈴木（堀田）真理：摂食障害の身体的治療． **別冊・医学のあゆみ** 62-67，2013．
3. 鈴木（堀田）真理、荒木まり子、浦野綾子、大和田里奈、市原淳弘：神経性食欲不振症患者への在宅中心静脈栄養法の導入の試み． **心身医学** 53：841-847，2013．
4. 鈴木（堀田）真理、大和田里奈、浦野綾子、荒木まり子、市原淳弘：身体的視点からみた最近の動向． **心身医学** 54：128-133，2014.

学会発表

1. 鈴木（堀田）真理、荒木まり子、浦野綾子、大和田里奈、市原淳弘：骨粗鬆症が主要な合併症である神経性食欲不振症患者における骨質マーカーの検討．第 86 回日本内分泌学会学術総会 仙台，2013．
2. 浦野綾子、鈴木（堀田）真理、大和田里奈、荒木まり子、市原淳弘：神経性食欲不振症患者におけるビタミンK摂取量と血清低カルボキシ化オステオカルシン（ucOC）の検討．第 17 回日本摂食障害学会 神戸，2013．

知的財産権の出願・登録状況

なし

飢餓状態における脂肪酸代謝 - 神経性食欲不振症における検討 -

分担研究者	久保 千春	九州大学病院 病院長
	河合 啓介	九州大学病院心療内科
	須藤 信行	九州大学大学院医学研究院心身医学分野 教授

研究要旨 神経性食欲不振症（Anorexia nervosa: AN）では、血中の必須脂肪酸は正常あるいは低下、飽和脂肪酸は、正常あるいは上昇するなど一定の結論が出ていない。本研究ではANの脂肪酸代謝の病態について詳細に検討するため、入院治療をおこなったAN患者39名（入院時Body mass index：BMI $12.93 \pm 1.83 \text{ kg/m}^2$ 、退院時BMI $15.86 \pm 1.82 \text{ kg/m}^2$ ）を食行動のパターンにより制限型（AN-R）とむちゃ食い排出型（AN-BP）に分類し、血漿中脂肪酸濃度（炭素数C:12～C:24）を入院時と入院3ヶ月時点で測定し、両群をそれぞれ健常コントロール群と比較した。

AN-R群とAN-BP群の入院時BMI、体脂肪量に有意差は見られなかった。AN-R群では入院時、極長鎖飽和脂肪酸を含むC（炭素数）:20～24までの脂肪酸濃度が上昇し、必須脂肪酸は正常範囲であった。AN-BP群では、C:14～24までの飽和脂肪酸の血中濃度の上昇と一部の必須脂肪酸の濃度の上昇が見られた。入院3か月後には、AN-R群AN-BP群とも、C:14～24までの広範囲にわたって脂肪酸濃度が上昇、 ω 3系必須脂肪酸も上昇していた。

慢性の飢餓状態であるMarasmusなどの飢餓時に必須脂肪酸の代替として働く、5-8-11エイコサトリエン酸の上昇はAN-R、AN-BPともに見られなかった。両群とも、Marasmusと異なり必須脂肪酸濃度は保持されていた。野菜や大豆の選択的な摂取によるリノール酸や α -リノレン酸上昇の関与が推察された。AN-Rで認められた極長鎖脂肪酸の上昇は、ミエリンの安定化を介しての生体の脳機能維持に関与している可能性がある。AN-BPでは、過食嘔吐によって、短時間に糖質や脂質が吸収され、糖からの脂肪酸合成が亢進していることが示唆された。

研究目的

脂肪酸はエネルギー代謝に重要な役割を果たすだけでなく、ホルモンや細胞膜の材料にもなる。さらに、脳・神経組織や免疫の機能にも影響があることが知られている。大きく飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸に分けられる。不飽和脂肪酸の中には、体内で合成できない必須脂肪酸が含まれる。タンパク質、脂質、炭水化物が不足した状態であるMarasmusでは必須脂肪酸は低下する。一方、神経性食欲不振症（Anorexia nervosa: AN）では、血中の必須脂肪酸は低下、その他の不飽和脂肪酸や飽和脂肪酸は、正常あるいはむしろ上昇するなど一定の結論が出ていない。本研究ではANの脂肪酸代謝の病態について詳細に調査し、異常値の発生するメカニズムを検討した。

研究方法

対象：治療目的で九州大学病院に2011年以降に入院した女性のAN患者のうち入院期間が3ヶ月以上の患者39名（年齢 $29.5 \pm 9.3 \text{ yr}$ ）入院時Body mass index：BMI $12.93 \pm 1.83 \text{ kg/m}^2$ 、退院時BMI $15.86 \pm 1.82 \text{ kg/m}^2$ ）。全例に、AN患者への統合的入院治療である＜行動制限を用いた認知行動療法＞を行った。食事は30-40kcal/kg/dayより開始して、2週間ごとに200kcal/dayの増量を目安に治療した。いずれも経口摂取に加え、経鼻経管栄養を併用した。対照群は：健常女性15名（年齢 $25.75 \pm 5.1 \text{ yr}$ BMI $20.16 \pm 1.58 \text{ kg/m}^2$ ）。

方法：病型により制限型（Anorexia nervosa restricting type:AN-R）22名とむちゃ食い排出型（Anorexia nervosa binge eating/purging type:AN-BP）17名に分類。

入院時及び入院 3 ヶ月目に身長、体重、体脂肪量 (dual-energy X-ray absorptiometry:DEXA 法) 生化学検査 (中性脂肪・総コレステロール) を測定し、入院時を AN-R 群と AN-BP 群間で比較した。さらに、血漿中の脂肪濃度プロファイル (ガスクロマトグラフィー法) を測定し、入院時と入院 3 ヶ月目の値をそれぞれ健常コントロール群と比較した。2 群間比較は Mann-Whitney 検定、3 群間の比較は one way ANOVA を用いた。P<0.05 を有意水準とした。

(倫理面への配慮)

全例、文章にて、研究の同意を取得した。九州大学病院倫理委員会承認 (番号 22 - 56)

研究結果

1. BMI, 体脂肪量

AN-R と AN-BP 間で BMI 値 (13.07 ± 1.92 vs. 12.43 ± 2.05 kg/m², AN-R vs. AN-BP) や体脂肪量 (3895.8 ± 2048.5 vs. 4590.7 ± 2343.9 g) に有意差は認められなかった。

2. 血中総コレステロール値、中性脂肪値

血中総コレステロール値は AN-BP (274.7 ± 57.7 mg/dl) が AN-R (164.2 ± 49.7) より有意に高値 (P<0.05) であった。血中中性脂肪値も AN-BP (274.7 ± 57.7 mg/dl) が AN-R (164.2 ± 49.7) より有意に高値 (P<0.05) であった。

3. 脂肪酸プロファイル (入院時): 図-1

AN-R では、極長鎖飽和脂肪酸を含む C20 ~ C24 の濃度が有意に上昇し、多くの必須脂肪酸は正常範囲であった。極長鎖脂肪酸 (炭素数 C22 以上) は、脳に多く、その大部分はミエリンに存在している。必須脂肪酸欠乏の代替としての 5-8-11 エイコサトリエン酸の上昇は認められなかった。

AN-BP では、C : 12 ~ C : 24 の範囲で、糖質から合成可能な飽和脂肪酸や一部の必須脂肪酸において血中濃度の有意な上昇が認められた。

4. 脂肪酸プロファイル (入院時: BMI13kg/m² 以下): 図-2

BMI 値を入院 BMI 値の中央値である 13kg/m² で二分し、より低栄養状態と考えられる 13kg/m² 以下の群で改めて評価した。脂肪酸値の変動がより明らか、さらに、AN-R では必須脂肪酸の欠乏が認められた。

5. 脂肪酸プロファイル (退院時): 図-3

AN-R 群と AN-BP 群ともに、入院 3 か月後には、C:14 から C:24 までの範囲にわたって脂肪酸濃度が上昇、 ω 3 系必須脂肪酸も上昇していた。

考察

AN では、慢性飢餓状態である Marasmus と異なり、一部の必須脂肪酸濃度は保持されていた。これには、野菜や大豆の選択的摂取によるリノール酸や α -リノレン酸の吸収が関与していると推察される。一般に、飢餓が長期に及ぶ場合は、カテコールアミンの上昇等により、脂肪組織中からの遊離脂肪酸の放出が高められる。さらに脂肪細胞のサイズが減少し、相対的に脂肪組織に対する血流が増加することで、遊離脂肪酸が保たれ (ことが報告されている。このような理由により血中脂肪酸濃度が保持、あるいは上昇していると推察される。

さらに、AN-R では極長鎖脂肪酸の高値が認められた。極長鎖脂肪酸は、はミエリンの安定化を介しての脳機能維持に必須である。生体は脂肪酸のなかでも、脳機能維持に関する脂肪酸をを優先して上昇させている可能性がある。また、AN-BP では、過食によって吸収された糖質をエネルギー消費だけではなく脂肪酸合成に利用している可能性がある。今回の検討では、特定の必須脂肪を重点的に補充する根拠は認められなかった。

結論

AN-R では極長鎖脂肪酸の高値が見られた。AN-BP では、過食嘔吐によって、短時間に糖質や脂質が吸収され、その糖質は脂肪酸の合成に利用されていることが示唆された。

研究発表

論文発表

- 河合啓介:「摂食障害治療最近の工夫-身体面の治療と心理療法について」**心身医学** 第 53 巻 834-840 (2013)
 - 河合啓介:「行動制限を用いた認知行動療法」**臨床精神医学** 第42巻 第5号 621-626 (2013)
- ### 学会発表
- K Kawai, M Nakashima, S Takakura, M Takii, C

Kubo. Ghrelin activation in response to medium chain fatty acid administration in patients with Anorexia nervosa. Sudo The 22st World Congress on Psychosomatic Medicine, September 12-15, Lisbon Portugal 25-28, 2013

5. 河合啓介：「摂食障害治療において管理栄養士にできること」第 17 回日本摂食障害学会, 2013.11.2-3, 神戸
6. 河合啓介, 中島めぐみ, 児島 将康, 山下さきの, 高倉 修, 瀧井 正人, 久保 千春, 須藤 信行:「中鎖脂肪酸投与によるグレリン活性化の研究—神経性食欲不振症患者における検討—」第 54 回心身医学会 横浜 2013,6.27-27

知的財産権の出願・登録状況

なし

小児・思春期中枢性摂食異常症の内分泌障害予後

分担研究者	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	生田 正憲	国立成育医療研究センター思春期心理科 医長
研究協力者	永井 章	国立成育医療研究センター小児期診療科 医長

研究要旨 思春期前後の児童・生徒の発症が増えていることが危惧されている。摂食障害は生命予後の問題や将来にわたる健康障害が危惧され、これを予防するために、早期発見が重要である。本研究では小児・思春期摂食障害における内分泌障害の回復過程を検討した。

対象は10歳から16歳までに発症した中枢性摂食障害(AN)女子14名、男子2名。いずれも発病前に二次性徴の進行を認めていた。最低体重は、標準体重に対する肥満度-30%～-46%であった。各症例において、ANの回復後から性腺機能回復までに要する時間を、検討した。AN発症（急激な体重減少開始）から体重の回復までの期間は14ヶ月から46ヶ月、中央値23ヶ月であった。二次性徴回復は、体重の回復と前後して同時期に認めたが、タンナーステージが進行するためには体重減少前の体重まで復することが必要であった。続発性無月経からの月経の自然再開は10名中4名で認め、体重の回復後さらに10ヶ月以上を要し、最長33ヶ月であった。

学童思春期発病のANでは、体重の回復後も性腺機能（視床下部-下垂体-性腺系）の障害は持続し、正常な二次性徴の進行に大きく影響することが明らかとなった。特に、ある程度のやせを維持しようとする症例では、回復にはより時間がかかるものと考えられた。急激な体重の変動は、正常な生殖能獲得に障害となり、社会的な啓発が必要と考える。

研究目的

神経性食欲不振症（AN）をはじめとする摂食障害の増加とその低年齢化は、先進国の共通の問題である。摂食障害の低年齢化は、現在の成長・成熟が妨げられるだけでなく、骨粗鬆症の予備軍になるなど将来にわたり身体が健康に障害され、さらには妊孕性の低下や胎児の成長が妨げられるなど、次世代への影響も懸念される。本邦でも、思春期前後の児童・生徒の発症が増えていることが危惧されている。

本研究では、小児・思春期発症の摂食障害における内分泌障害が、摂食障害回復に伴いどのような回復過程をとるか、その予後について検討した。

研究方法

対象

10歳から16歳までに発症した中枢性摂食障害(AN)女子14名、男子2名。いずれも発病前に二次性徴の進行を認めていた。最低体重は、標準体重に対する肥

満度-30%～-46%であった。

方法

各症例において、ANの回復後から性腺機能回復までに要する時間を、検討した。

ANの回復は、身長に対する標準体重(肥満度0%)の-10%に達するか、または急激な体重減少が始まる前の体重に服したものとした。性腺機能の回復は、①二次性徴が発病前のタンナーステージよりも進行、②LH/FSHおよびE2またはテストステロンの明らかな上昇を満たしたものとした。

研究結果

14名における治療開始前の性腺機能

14名のうち、10歳、11歳の女児2名は二次性徴は乳房腫大のみであった。12歳以上の女児10名は、初経が発来していたが、続発性無月経であった。血中LH、FSH、E2またはテストステロンはいずれも低値（思春期開始前のレベル）であった。

臨床経過

AN 発症（急激な体重減少開始）から体重の回復までの期間は14ヶ月から46ヶ月、中央値23ヶ月であった。

二次性徴回復は、体重の回復と前後して同時期に認めたが、タンナーステージが進行するためには体重減少前の体重まで復することが必要であった。続発性無月経からの月経の自然再開は10名中4名で認め、体重の回復後さらに10ヶ月以上を要し、最長33ヶ月であった。体重回復後24ヶ月以上無月経が持続し、本人の同意が得られた症例、および体重の回復が肥満度-10%より上昇せず本人の希望があった症例の計6例で、性腺補充療法を行った。性腺補充は、ゲスタゲン投与のみで月経再開が2例、エストロジェン貼付剤の併用でカウフマン療法に移行した例が4例であった。6例中3例は性腺補充療法中止後、自然月経が発来していたが、3例は無月経が持続している。

考察

若年者の摂食障害、特に AN では、二次性徴の進行が停止し、成長障害、社会性醸成の障害が起こることが知られている。二次性徴の回復には時間がかかり、将来の妊孕性低下にもつながるとされており、社会的にも問題である。

今回の研究では、小児・思春期発病の AN において、性腺機能の回復過程を追った。性腺機能回復は、体重の回復に依存していたが、体重が回復しても周期的な月経に至るまでには時間がかかった。また、一部の症例では、性ホルモンの上昇後月経発来に至るまでにさらに2年以上を要した。AN における無月経は、間脳視床下部障害による視床下部性無月経である。下垂体ホルモンが回復しても、視床下部の性周期回復にはさらに時間がかかることが示された。

さらに、今回は調査できなかったが、排卵周期の確立はさらに時間がかかるものと考えられる。一部の症例で基礎体温の推移を観察したが、月経回復後2年以上経過しても、基礎体温上排卵周期の確立を認めなかった。

以上より、学童思春期発病の AN では、体重の回復後も性腺機能（視床下部-下垂体-性腺系）の障害は持続し、正常な二次性徴の進行に大きく影響することが明らかとなった。特に、ある程度のやせを維持しようとする症例では、回復にはより時間がかかるものと考えられた。

無月経を主訴に外来受診する思春期女子の多くが、

体重の急激な変動、特に体重減少を認めており、AN の診断に至らなくても、安易なダイエットや過激な運動などが正常な生殖能獲得に障害となる。社会的な啓発が必要と考える。

結論

学童思春期発病の AN では、体重の回復後も性腺機能（視床下部-下垂体-性腺系）の障害は持続し、正常な二次性徴の進行に大きく影響することが明らかとなった。特に、ある程度のやせを維持しようとする症例では、回復にはより時間がかかるものと考えられた。急激な体重の変動は、正常な生殖能獲得に障害となり、社会的な啓発が必要と考える。

* 健康危険情報

なし

研究発表

論文発表

1. 堀川玲子：「＜園・学校検診実施上のポイント＞思春期の問題への対応-内分泌的問題」小児内科 2013;45(3):524-529. 東京医学社
2. 堀川玲子：「思春期の女性のやせ、摂食障害」臨床婦人科産科 2013; 67(7):663-670. 医学書院

学会発表

1. 高橋千恵, 服部淳, 内田登, 山本晶子, 内木康博, 堀川玲子：「1 歳児の脂質代謝マーカーと体格・乳児期の栄養法についての検討-母子コホート研究から」第 47 回日本小児内分泌学会学術集会（東京，2013 年 10 月 10 日）
2. 山本晶子, 服部淳, 高橋千恵, 内田登, 内木康博, 堀川玲子：「本邦乳児におけるビタミン D の充足状況とその影響」第 47 回日本小児内分泌学会学術集会（東京，2013 年 10 月 11 日）

知的財産権の出願・登録状況

なし

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

摂食障害の疫学調査

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
	堀川 玲子	国立成育医療研究センター 内分泌代謝科
	久保 千春	九州大学病院
	尾崎 紀夫	名古屋大学大学院医学系研究科精神医学 親と子どもの心療学分野
	中里 雅光	宮崎大学医学部内科学講座 神経呼吸内分泌代謝学分野
	遠藤 由香	東北大学病院 心療内科
	横山 伸	長野赤十字病院 精神科
	岡本 百合	広島大学 保健管理センター
	間部 裕代	熊本大学大学院医学薬学研究部 小児発達学

研究要旨 今年度は北海道、長野県、山口県、広島県、宮崎県の小学、中学、高等学校の養護教諭への質問紙法で摂食障害患者数の動向を把握し、これまでの他の地域の調査結果と比較検討した。北海道、広島県、山口県では初めての疫学調査であった。神経性食欲不振症は小学校 4 年生の男女児に認められ、中学 2～3 年生から患者数が急増する傾向が確認された。女子高校生では、疑い例を含む神経性食欲不振症の有病率の頂値を示す学年は一定しないが、有病率は 0.17～0.56%であった。男子の有病率は女子の 1/10 以下と報告されてきたが、0.08%で女子の 1/3 の有病率を示す地域を認め、男子にも増加していることがうかがわれた。患者の半数が受診していなかった。本邦の思春期女子の神経性食欲不振症の有病率は、患者が多い米国の有病率と同等かそれ以上であることが明らかになった。摂食障害の予防、早期発見、早期受診、学校での対応について指針を作成して普及させる施策が急務であると考えられた。

摂食障害の疫学調査で頻用されてきた摂食態度調査票（EAT-26）を用いて高校生を対象とした体型や食行動についての意識調査を行った。女子高生は標準体型であっても肥満体型と同レベルのやせ願望や食事制限を行っていることが明らかとなった。神経性食欲不振症の診断には EAT-26 と体重の実測値だけでは不十分で面接が必要であること、EAT-26 は摂食障害のハイリスク群のスクリーニングには有用であることが確認できた。また、自閉症スペクトラム指数総得点が高い群では EAT-26 得点も高く、自閉症スペクトラムの認知特性と摂食異常が関連していることが明らかになった。

背景

当調査研究班は、中枢性摂食異常症の全国レベルの疫学調査を 1992 年以降行っていない。神経性食欲不振症患者は病識が薄く、神経性大食症患者は過食が嗜癖化しているために医療機関を受診しない傾向があり、病院を対象にした有病率が過小統計になる可能性があった¹⁾。そこで、2010 年度にパイロット研究として東京都の小学、中学、高等学校（以下小中高校）の養護教諭を対象に疫学に関するアンケート調査を行った。小学生での調査は日本で初めてであり、神経性食欲不振症患者は

小学 3 年生から見られ、女子中高生の神経性食欲不振症の頻度は過去最高であった²⁾。2011～2012 年度は長野県と福岡県の高校、愛知県と広島県の大学、宮崎県中高校、熊本県小中高校で地域調査を行った³⁾。今年度は拡大して、北海道中高校、長野県小中校、山口県中高校、広島県小中高校で同様の方法で疫学調査を追加した。

従来、国内外で使用されている摂食態度調査票（EAT-26）は異常な摂食行動をスクリーニングするための本人が記入する調査票である。摂食障害の診断における EAT-26 の有効性とその限界について再評価が必要で

ある⁴⁾。最近、教育現場では自閉症スペクトラムを有する生徒・学生の支援の必要性が高まっている。高機能自閉症スペクトラムでは摂食障害傾向は合併しやすい⁵⁾。そこで、EAT-26 と自閉症スペクトラムの認知特性との関連について検討を加えた。

目的

北海道、山口県、長野県、広島県、宮崎県で地域調査を行い、日本各地での患者数の動向を把握し、比較検討することを目的とした。

さらに、EAT-26 の得点と Body mass index (BMI) や自閉症傾向の関連を検討した。

対象と方法

すべて、各施設の倫理委員会、当該道県の教育委員会の承認と各学校長の了解を得て行った。方法は養護教諭を対象にした摂食障害の確定診断と疑い例の数、医療機関への受診状況に関する質問紙である。

生徒や学生に EAT-26 を行い、実測値による BMI や各心理テストの得点との相関を検討した。未成年の場合は保護者の了解を取った。

結果

1. 疫学調査

1) 北海道

中学校は公立 646 校と私立 8 校に依頼し、それぞれ、298 校と 4 校から回答を得た(回答率 47%)。高校は、公立 244 校、私立女子 49 校、私立男子 43 校中、それぞれ 137 校、33 校、19 校から回答を得た(回答率 56%)。女子中学 1 年生から高校 3 年生までの神経性食欲不振症の有病率は 0.08%、0.09%、0.17%、0.06%、0.19%、0.19%であった。これらの患者では、中学生の 43%、高校生の 48%が未受診であった。

2) 長野県

2011 年度の県立高校を対象にした疫学調査に引き続き、公私立の小学校 386 校中 328 校(回答率 85%)の 5~6 年生と中学 197 校中 170 校(回答率 86%)を対象にして調査を行った。神経性食欲不振症は女子小学 5 年生から見られ、女子小学 5 年生から中学 3 年生までの有病率は 0.07%、0.10%、0.12%、0.15%、0.24%であった。

3) 広島県

広島市立小学 143 校中 120 校(回答率 84%)の小学 4~6 年生、同市立中学 64 校中 57 校(回答率 89%)、広島県内の公私立高校 134 校中 27 校(回答率 20%)から回答を得た。その結果、神経性食欲不振症は小学 4 年生の男女子に見られ、女子小学 4 年生から高校 3 年生までの有病率は 0.09%、0.07%、0.14%、0.17%、0.21%、0.34%、0.56%、0.42%、0.43%であった。

4) 山口県

中学は公立 157 校中 111 校、私立 8 校中 4 校から回答を得た(回答率 70%)。高校は県立 70 校、私立女子 20 校、私立男子 10 校中、それぞれ、57 校、12 校、10 校から回答を得た(回答率 84%)。女子中学 1 年生から高校 3 年生までの神経性食欲不振症の有病率は 0.14%、0.03%、0.19%、0.13%、0.28%、0.22%であった。これらの患者では、中学生の 63%、高校生の 46%が未受診であった。高校 2 年生の男子の有病率は 0.08%と女子の 1/3 であった。

5) 宮崎県

2012 年度の調査で東京都や他県より有病率が低かった³⁾、2013 年度は高校で再調査を行った。公立 36 校中 30 校、私立 16 校中 11 校から回答を得た(回答率 79%)。対象女子高校生数は人口統計では 16~18 歳の女子人口の 75%に相当する。疑い例を含めた神経性食欲不振症患者数は、女子 13 名、男子 1 名で、女子高校 1~3 年生の有病率は 0.05%、0.17%、0.09%で、2011 年度と同様で、調査した都道県中で最も低いことが再確認された。女子患者の 13 名中 5 名(38%)と男子の 1 名は受診していなかった。

2. EAT-26 と BMI や自閉症傾向との関連

高校生 1046 名(男 436 名、女 610 名)を対象に EAT-26 を実施し、得点が 20 点以上(高得点)は男 13 名(2.98%)、女 71 名(11.6%)であった。さらに、EAT-26 の下位項目として、やせ願望、食事制限、食事制御困難、周囲からの食事圧力の自覚、食後の嘔吐衝動の 5 因子に分類し、それぞれ BMI との関連を検討した。男子は、BMI が増加する程、体型へのこだわりや食事を制御することへの困難さが増加した。一方、女子では、標準体型でも肥満体型と同レベルのやせ願望や食事制限を行っていることが明らかとなった。

大学 1 年生 2471 名(男 1552 名、女 919 名)を対象に

EAT-26 を実施し、得点が 20 点以上（高得点）は男 10 名（0.64%）、女 22 名（2.4%）で、かつ、BMI18.5 kg/mm² 以下は 1 名であった。面接を行ったところ、EAT-26 高得点者は摂食障害のハイリスク群と判断された。ハイリスク群の数は 2002 年や 2010 年と比較すると増加していた。

大学 1 年生 2054 名（男 876 名、女 1178 名、平均年齢 18.4 歳）を対象に、EAT26 得点と、BMI、自閉症スペクトラム指数日本語版（AQ）総得点、抑うつ傾向、気質、ソーシャルサポートの関連を検討した。18.5kg/m² 以下で EAT26 得点が 11 点以上の者は男子 0.7%、女子 2.3% であった。この群では AQ 総得点が高くなると EAT-26 得点、すなわち、摂食障害傾向が高くなった。

考察

北海道、広島県、山口県においては初めての摂食障害の疫学調査で、広島県と長野県において小学生の結果が得られたことは貴重であった。

疑い例を含めた神経性食欲不振症の有病率をこれまでの結果³⁾とまとめて表 1 に示した。東京都では小学 3 年生から、広島県では小学 4 年生から男女共に患者が見られた。女子では中学 2～3 年生で急増する傾向は同じで、高校生の有病率の頂値は一定ではなかったが、0.17～0.56% であった。2012 年度の宮崎県のある有病率が他の都県より低かったため、今年度、高校を対象に再調査を行ったが、同様の低い結果であった。同じ九州という立地条件でありながら、熊本県と宮崎県のある有病率の差を現段階では説明できない。結果には示していないが、東京都と北海道では私立高校の有病率が公立高校より高く、一方、熊本県と山口県では私立より公立高校で有病率が高かった。愛知県の高校の調査では入学試験の偏差値の高さと有病率が相関しており⁶⁾、学業環境と関係があることが示唆された。

摂食障害は男子には少なく、女子の 1/10 以下と報告されてきたが、山口県の高校 2 年生男子の有病率は 0.08% と女子の 1/3 で、男子での患者数の増加がうかがわれた。

本研究と同様の手法で行われた 1993 年の千葉県公立中学（0.05%）、島根・鳥取県公立中学（0.07%）、1983 年の京都府立高校（0.15%）、1993 年の千葉県立高校（0.1%）、横浜市高校（0.03%）、京都府立高校（0.12%）の調査結果と比較して³⁾、本調査で得られた各地域の頻度は宮崎県を除くと、中学も高校も最も

高いと言える。

世界各国の若年女性の神経性食欲不振症の有病率と比較すると、本研究と診断基準や対象年齢が異なり単純に比較できないが、オランダの 2003 年の若年女性の有病率は 0.3%⁷⁾、ドイツの 2006 年は思春期の有病率が増加し 10 歳代女性が最高の 0.5% と報告されている⁸⁾。2011 年には米国の 13～18 歳女子が 0.2～0.3%⁹⁾ で、本調査で得られた有病率は同等かそれ以上と考えられる。これらの国では摂食障害の予防、早期発見の指針が普及し、治療施設の数も内容も本邦より充実している。東京都の調査では中学生の 34%、高校生の 40% が未受診であった²⁾。今回の調査でも、約半数が受診しておらず、養護教諭など学校側の対応に苦慮する実態が明らかになった。

以上より、本邦においても、摂食障害の予防、早期発見、早期受診、学校での対応について指針を作成して普及させる施策が急務であると考えられた。

この調査方法では、軽度の体重減少にとどまる神経性食欲不振症や申告していない神経性大食症や特定不能の摂食障害は把握が困難である。とはいえ、死亡率の高い神経性食欲不振症患者の有病率を日本の複数の地域で得られたことはこれまでにない成果である。

EAT-26 は異常な摂食行動をスクリーニングするための質問紙である。昨年度の検討で、単独で摂食障害のスクリーニングに使用するには限界があり、BMI の実測値と組み合わせ、さらに面談が必要であることが明らかになった¹⁰⁾。この現状を踏まえ、BMI 値と EAT-26 を合わせた観点から高校生の意識調査を行った。その結果、女子学生は標準体型でも、肥満体型と同様に、体型や食事量制御の困難さを自覚していることが明らかとなった。今後は、EAT-26 に体重の変動や BMI 値を考慮に入れた新たな心理テストを開発することで、従来の心理テストでは限界であった摂食障害予備群や発症早期群をより精度高くピックアップすることが可能か否かを検討したい。

大学 1 年生を対象にした EAT26 高得点者の面接では、これらの学生がやせはないものの摂食障害のハイリスク群であることが明らかになった。このハイリスク群の比率は 2002 年以降増加しており、EAT-26 は摂食障害のハイリスク群のスクリーニングには有用であると言える。

教育の現場では自閉症スペクトラムの生徒・学生が多くなり、その支援が急務である。EAT-26 得点と AQ 総得点が相関することから、EAT-26 得点が高い場合は、単に摂食障害だけでなく、自閉症スペクトラムの認知特性傾向を有する可能性も考える必要がある。今後、摂食障害の病型や BMI の変化による差、精神科診断用構造化面接による診断の妥当性検証、AQ の中でも Autistic trait と EAT-26 との関係を検討する必要があると考えられる。

結論

厚生労働省の施策には有病率や受診の実態は必須の情報である。特に死亡率が高い神経性食欲不振症の実態が得られたことは有益である。

患者数が多い米国や英国では予防教育が行われ、治療環境が整備されている。本邦でも同等かそれ以上の有病率を有することが明らかになり、約半数が未受診であることから、今後、予防教育や受診しない生徒に対する学校の対応への指針を作成することが急務である。

参考文献

1. 藤田利治、里見 宏：神経性食欲不振症についての中学校・高等学校での全国調査。
2. 厚生省特定疾患 神経性食欲不振症調査家研究班 平成 5 年度研究報告書 34-40, 1994。
3. 鈴木（堀田）眞理、小原千郷、堀川玲子、小川佳宏：東京都の高校の養護教諭へのアンケートによる神経性食欲不振症の疫学調査。日本心療内科学会雑誌 17：81-87, 2013。
4. 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：中枢性摂食異常症の病院・病態に関する臨床および疫学研究。
5. 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 24 年度 総括・分担研究報告書 43-49, 2012。
6. 中井義勝：Eating Attitude Test (EAT) の妥当性について。精神医学 45：161-165, 2003。
7. Coombs E, Brosnan M, Bryant-Waugh R et al. An investigation into the relationship between eating disorder psychopathology and autistic

symptomatology in a non-clinical sample. Br J Clin Psychol 50:326-38, 2011.

8. 神谷侑希香、今井正司、末松弘行：愛知県の高校生における摂食障害の疫学調査。第 17 回日本摂食障害学会・学術集会 プログラム・抄録集：95, 2013。
9. Hoek HW, van Hoeken D: Review of the prevalence and incidence of eating disorders. Int J Eat Disord 34:383-96, 2003.
10. Brunner R, Resch F. Eating disorders-a interesting problem in children and adolescents? Ther Umsch 63:545-9, 2006.
11. Swanson SA, Crow SJ, Le Grange D et al. Prevalence and correlates of eating disorders in adolescents. Results from the national comorbidity survey replication adolescent supplement. Arch Gen Psychiatry 68:714-23, 2011.
12. 岡本百合、三宅典恵、吉原正治：大学生の摂食態度について：EAT26 の意味するもの。心身医学 53：157 - 64, 2013。

研究発表

論文発表

1. 鈴木（堀田）眞理、小原千郷、堀川玲子、小川佳宏：東京都の高校の養護教諭へのアンケートによる神経性食欲不振症の疫学調査。日本心療内科学会雑誌 17：81-87, 2013。
2. 鈴木（堀田）眞理、大和田里奈、浦野綾子、荒木まり子：身体的視点からみた最近の動向。心身医学 54：128-133, 2014。

学会発表

1. 横山 伸、杉山-横山 英子：養護教諭へのアンケートを用いた長野県内の小中高等学校における神経性無食欲症の実態調査。第 17 回日本摂食障害学会 神戸, 2013。
2. 間部裕代、鈴木（堀田）眞理、堀川玲子、小川佳宏：中枢性摂食異常症の疫学調査研究—熊本県の小中高校生における疫学調査。第 17 回日本摂食障害学会 神戸, 2013。
3. 鈴木（堀田）眞理、小川佳宏：クリニカルアワー 8 厚生労働省難治性疾患克服事業各研究班トピックス発表 中枢性摂食異常症—調査研究班の業績

2012 . 第 86 回日本内分泌学会学術総会 仙台 ,
2013 .

4. 鈴木（堀田）眞理：女性の common disease としての摂食障害-最近の動向と新しい知見．第 12 回日本内分泌学会東海支部学術集会 静岡，2013.
5. 尾崎紀夫：精神疾患を性差の観点から考える：妊産婦のうつ病と摂食障害を中心に．社会神経科学研究会 生理学研究所 岡崎, 2013 .

知的財産権の出願・登録状況

なし

