

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350914

研究課題名(和文) 摂食促進ホルモン・グレリンによる自発運動量制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism in control of voluntary exercise by ghrelin, a feeding-stimulating hormone

研究代表者

満園 良一 (MITSUZONO, Ryouichi)

久留米大学・健康スポーツ科学センター・教授

研究者番号：20200058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、グレリンの摂食・代謝リズムや自発運動量を制御するメカニズムおよび両者のクロストークにおけるグレリンの役割を明らかにすることを目的とし、1) グレリンによる摂食・エネルギー代謝リズム調節機構および摂食リズムと自発運動量制御機構を明らかにし、2) 肥満者の食行動異常と自律神経活動を解析した。本研究により、摂食リズム、体内エネルギー代謝の日内リズムの恒常性の維持および自発運動の動機付けにグレリンが関与し、グレリン・リズム(サージ)の重要性が示唆された。また、肥満者において夜間の副交感神経活動が減弱し、QOLの低下をきたしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was undertaken to clarify a mechanism for the control of feeding rhythm or voluntary exercise by ghrelin, an appetite-promoting hormone, and a putative role of hits peptide in the crosstalk of feeding and exercise. Furthermore, we evaluated autonomic nervous activity in obese patients in relation to abnormal binge eating behavior often observed in these subjects. As a result, we demonstrated a crucial role of ghrelin surge in the maintenance of diurnal rhythm of either feeding or energy metabolism and in the formation of motivation for voluntary exercise. In obese patients, parasympathetic activity was suppressed during night, suggesting a possible contribution to blunted quality of life in these subjects.

研究分野：健康スポーツ科学

キーワード：グレリン グレリン遺伝子欠損マウス 日内リズム 自発運動 時制限給餌 探索行動

## 1. 研究開始当初の背景

肥満症などの生活習慣病の予防や認知機能改善効果としての運動の有用性は広く知られており、最近では特に健康づくりへの運動の効果が着目され、乳児期から高齢に至るまでの様々なライフステージにおける運動習慣の必要性が啓発されているが、そもそもなぜ自発的に運動を好み良く走るのか、つまり運動に対するモチベーションのメカニズムに着目した研究は数少ない。

グレリンは、1999年に本研究課題の連携研究者である児島ら<sup>1)</sup>によりラットおよびヒトの胃から発見された28個のアミノ酸からなるペプチドであり、その生理活性として強力な成長ホルモン（GH）分泌促進作用を有するだけでなく、摂食促進作用、脂肪蓄積など代謝系に対する様々な作用がみられる。さらに我々はグレリンの病態・生理学的な新規役割を解明するためのモデル動物として、グレリン遺伝子欠損（GKO）マウスを作出・維持しており、このマウスは摂餌量や体重増加などにおいて野生型マウスと相違が認められず、目立った表現型は見つかっていなかった。しかし、我々はGKOマウスでは体温や血圧・心拍数の日内リズムに異常が認められ、交感・副交感神経日内リズムの恒常性が破綻していることを見出した[平成19～21, 22～24年度 基盤研究(C), 課題番号19590840, 22500361]。

一方、運動時にはGHが分泌され、骨格筋量・骨量の増加、脂肪重量の減少をもたらすことは広く知られている。その強力なGH分泌促進作用から、最近ではグレリンと運動の併用療法の糖尿病治療における有用性<sup>2)</sup>が報告されてはいるものの、一方ではグレリンの運動抑制効果<sup>3)</sup>などの相反する報告もあり、グレリンが生体内の自発運動量制御機構にどのように関与しているかは明確にされていない。運動習慣が肥満をベースとするメタボリック症候群や生活習慣病発症の予防や治療に有効であることは、数多くの実験・疫学的研究により示されているが、未だその運動制御機構に関しては不明な点も多い。特にグレリンのような末梢性シグナル因子による自発運

動時の運動意欲に与える影響などに関する基礎研究は、様々な生活習慣病の有効な予防法としての食事・運動療法に新たな側面からのアプローチ方法をもたらす可能性を秘めており、臨床的にも大変有意義でかつ急務な研究課題である。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、以下の二つの目的にて遂行した。

### (1-1) 動物実験 : グレリンによる摂食・エネルギー代謝リズム調節機構の解明

我々は、グレリン遺伝子欠損（GKO）マウスでは自発活動量や体内エネルギー代謝の日内リズムの恒常性が破綻していることを見出しており、自発活動とグレリンによる摂食リズムが同調する可能性が考えられる。GKOマウスに認められる自発活動や体内エネルギー代謝リズムの異常を多面的・総合的に理解し、摂食行動と自発活動のクロストークを日内リズムの観点より時間栄養学的に理解することが重要である。グレリンによる摂食・エネルギー代謝リズム調節機構を解明する目的で、GKOマウスにおける自発活動や体内エネルギー代謝リズムの異常を野生型（WT）マウスと比較検討し、本 GKO マウスのエネルギー代謝の日内リズム異常の病態特性を明らかにした。

### (1-2) 動物実験 : グレリンによる摂食リズムと自発運動量制御機構の解明

GKOマウスの自発活動や体内エネルギー代謝の日内リズムが破綻している事、探索行動（行動意欲）がWTマウスに比べ劣る（行動解析装置によるプレ動物実験にて）事などから、運動意欲と摂食リズムのクロストークにおけるグレリンの役割の重要性が考えられる。マウスなどの実験小動物の摂餌行動はヒトと異なり決められた時間での摂食行動は認められないが、制限給餌を施すことでヒトと同じような給餌前の摂食促進ホルモンのサージ現象が生じ、摂食リズムを意図的に作出可能となる。また、マウスでは制限給餌後、経日的に自発運動が増加する特性を利用し、自発運動量とグレリン摂食リ

ズムの相関を動物実験にて解析可能となる。そこで制限給餌後のWTおよびGKOマウスにおいて、1)探索行動の動機や回転かごによる自発運動量の相違を明らかにする。2)前記の動物実験の基礎データを踏まえ、グレリン agonist や antagonist 介入による自発運動に対するモチベーションの変化を探索した。

### (2) 臨床研究：肥満者における自律神経活動の特徴

肥満者には摂食リズム異常を認める場合が多く、肥満と食リズムなど身体活動リズム異常との関連は肥満治療を進めるうえで重要なキーワードであり、病態の解明に繋がることが期待される。しかし、肥満者の活動リズムを詳細に調査した報告は少なく、肥満者の自律神経活動に異常がみられ、健常者と比較して深夜の副交感神経活動が低下し、肥満者の副交感神経活動は日中と夜間に変化が認められないが、その機序は明らかではない。

一方、申請者らはグレリンが交感・副交感神経日内リズムの恒常性に関与していることを報告し[平成 19~20 年, 22~24 年度 基盤研究(C) 課題番号 19590840, 22500361], 肥満者の自律神経活動にグレリンが病態生理学的に関与していることが考えられ、肥満者の自律神経活動を評価し、その特徴を明確にした。

## 3. 研究の方法

### (1-1) 動物実験 : グレリンによる摂食・エネルギー代謝リズム調節機構の解明

グレリン動態と自発活動・エネルギー代謝の日内リズムの解析:

- 1) グレリン動態の日内変動; WTマウスの7時, 13時, 19時, 25時, 各時刻に採血・胃組織の採材によりグレリン動態の日内リズム(グレリン変動の振幅により評価)を以下の解析法にて明らかにした。
  - ・ラジオイムアッセイ(RIA); 血漿・胃内グレリン濃度をRIAにて測定し、胃内の活性型グレリン産生および血漿への分泌量を定量評価した。
  - ・RT-PCR; 胃組織内のグレリンおよび

ghrelin O-acyltransferase (GOAT: グレリンの脂肪酸修飾酵素)の発現量をRT-PCRにより測定し、胃組織内のグレリン合成・脂肪酸修飾酵素の変動を定性・定量解析した。

- 2) 摂食・自発行動量とエネルギー代謝リズムの解析; エネルギー代謝測定装置(アルコシステム)を用い、WTおよびGKOマウスにおけるエネルギー代謝(エネルギー消費量, 脂肪燃焼, 炭水化物燃焼量)と自発行動量を比較検討し、摂食・自発行動リズムとエネルギー代謝リズムとの相関を解析した。

グレリンKOマウスの摂食・エネルギー代謝リズムの解析: 迷走神経胃枝切除後(胃から分泌されるグレリンは迷走神経胃枝を介し中枢性に働く)のWTマウス, グレリン受容体 antagonist ([D-Lys3]-GHRP6, BACHEM社)を腹腔内にて浸透圧ミニポンプ(Model 1004, ALZET社)を用いて持続投与後のWTマウスおよびグレリン受容体 agonist (GHRP-6, BACHEM社)を腹腔内にて浸透圧ミニポンプ(Model 1004, ALZET社)を用いて持続投与後のGKOマウスと比較検討し、摂食・エネルギー代謝リズム調節機構としてのグレリンが神経あるいは体液性の因子なのかを明らかにした。

### (1-2) 動物実験 : グレリンによる摂食リズムと自発運動量制御機構の解明

回転かご自発運動量, エネルギー代謝とグレリン動態の解析:

- 1) 回転かご自発運動量およびエネルギー代謝; WTおよびGKOマウスの2週間時限給餌期間の自発運動量とエネルギー代謝(エネルギー消費量, 脂肪燃焼, 炭水化物燃焼量)の経日的変化を、マウス摂食行動・呼吸代謝解析システム(株シンファクトリー)にて測定した。
- 2) グレリン動態; 1)の結果を踏まえ、時限給餌初期, 自発運動ピーク期, 時限給餌後期(運動量減少期)のWTマウスの胃内, 血漿グレリン濃度, 胃内グレリンmRNA量などを給餌前

と給餌後において比較検討し、摂餌制限によるグレリン動態の特性を明らかにした。

探索行動動機の解析：WTおよびGKOマウスの2週間時限給餌期間の探索行動をマウス摂食行動・呼吸代謝解析システム（株）シンファクトリーにて解析した。自発運動および探索行動時のグレリンによる動機付け：グレリン受容体agonistの効果（GHRP-6, BACHEM社）をGKOマウスへ14週齢時から一日1回、午後18時30分に腹腔内連日投与し、持続投与群として13週齢から浸透圧ミニポンプ（Model 1004, ALZET社）にて腹腔内持続投与後、両群共に15週齢時の自発運動パターンをWTマウスと比較解析し、グレリン受容体agonist介入による自発運動に対するモチベーションの可能性を探索した。

#### （2）臨床研究：肥満者における自律神経活動の解析

対象：肥満または肥満歴を有する入院患者8例（男2例、糖尿病患者6例、 $50.8 \pm 16.8$ 歳、BMI  $34.9 \pm 10.3$ 平均 $\pm$ 標準偏差）を対象とした。

方法：自律神経活動の評価はActiHR4<sup>®</sup>（CamNtech社製）を24時間装着し、心拍周期変動の周波数成分のうち副交感神経活動を反映するHF成分と、交感神経と副交感神経の両者の活動を反映するLF成分を抽出し、HF成分を副交感神経活動の、LF/HF比を交感神経活動の指標とした。24時間を6時間毎に分け、深夜（0時～6時）と昼（12時～18時）のHF成分、LF/HF比を比較した。また、Quality of Life（QOL）評価としてSF-36（iHope International社製）を施行し、体組成測定をInBody720<sup>®</sup>（Biospace社製）を用いて行った。

#### 4．研究成果

- （1-1）動物実験：グレリンによる摂食・エネルギー代謝リズム調節機構の解明  
グレリン動態と自発活動・エネルギー代謝の日内リズムの解析；

- 1) グレリン動態の日内変動；野生型（WT）マウスの7時、13時、19時、25時におけるグレリン動態を比較検討した結果、25時に有意に高くなり、7時に有意に低値となる日内リズムが存在した（図1）。

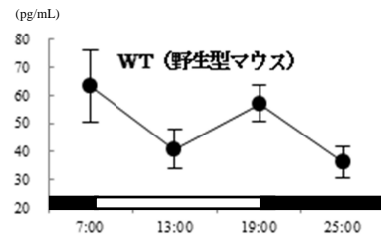


図1. 野生型マウスにおける血漿グレリン濃度は、7:00と19:00に上昇する日内リズムが認められる。

- 2) 摂食・自発行動量とエネルギー代謝リズムの解析；エネルギー代謝測定装置（アルコシステム）を用い、WTおよびGKOマウスにおけるエネルギー代謝（エネルギー消費量、脂肪燃焼、炭水化物燃焼量）と自発行動量を比較検討した結果、GKOマウスでは自発活動量や体内エネルギー代謝の日内リズムの恒常性に異常が認められた。

GKOマウスの摂食・エネルギー代謝リズムの解析；WTおよびKOマウスについて、迷走神経胃枝切除後のWTマウス、グレリン受容体antagonist投与後のWTマウスでは自発活動量や体内エネルギー代謝の日内リズムに乱れが生じ、一方、グレリン受容体agonist投与後のKOマウスではWTマウスと同様の摂食リズムや体内エネルギー代謝の日内リズムの恒常性が維持されていた。

- （1-2）動物実験：グレリンによる摂食リズムと自発運動量制御機構の解明  
回転かご自発運動量、摂餌行動とグレリン動態の解析；

- 1) 回転かご自発運動量および摂餌行動；自由摂餌におけるWTおよびGKOマウスの自発運動は、一日の間では主に暗期に認められ、WTの自発運動パターンは、暗期開始時後と暗期終了時前数時間の持続的な自発運動が主であり、その間に断続的な自発運動が散見されたが、KOでは、断続的な自発運動が暗期全体を通して生じる傾向にあった（図2）。

両マウスを2週間時限給餌(2回/日;5~7時,19~21時)すると,WTの自発運動は制限給餌時刻に同調した自発運動が認められるようになり,暗期開始時刻後の運動量が著しく増大し,GKOでは暗期開始時刻後の自発運動が明確に認められるようになったが,その後の断続的な自発運動は依然存在した。

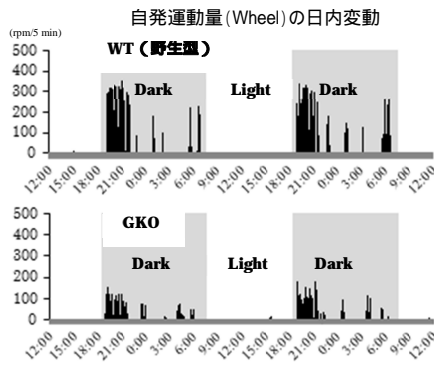


図 2. グレリン遺伝子欠損(GKO)マウスでは暗期開始後の連続的な自発運動量が少なく,暗期終了前の運動量増加も認められない。

- 2) 自発運動および探索行動時のグレリンによる動機付け; グレリン受容体 agonist (GHRP-6) をGKOマウスへ14週齢時から一日1回,午後18時30分に腹腔内連日投与するとWTマウスと同レベルの自発運動量の発現が認められたが,13週齢から浸透圧ミニポンプにて腹腔内持続投与しても無処置GKOマウスの運動量と同レベルであり,WTマウスに比べ有意に少なかった。
- (2) 臨床研究: 肥満者における自律神経活動の解析
- 1) 夜間(0時~6時)と昼(12時~18時)のHF成分,LF/HF比を比較した結果,LF/HF比については全例で夜間睡眠中の有意な低下が認められ(夜間  $2.81 \pm 4.29\text{ms}^2$  に対して昼  $5.14 \pm 7.28\text{ms}^2$ ),交感神経活動が夜間は低下している事を示していた。
  - 2) HFについては対象患者8例のうち5例では夜間の上昇(昼  $110.9 \pm 343.8\text{ms}^2$  に対して  $469.9 \pm 713.1\text{ms}^2$ )を認めたが,3例では認めなかった(夜間  $95.3 \pm 198.4\text{ms}^2$ , 昼  $104.6 \pm 288.0\text{ms}^2$ )。
  - 3) SF-36の結果,夜間HF成分の上昇が認められた5例は認められなかった3例

に比べて QOL のスコアが高かった(心の健康に関する点数が  $88.0 \pm 5.7\%$  vs  $55.0 \pm 13.2\%$  と有意に高値,全体的健康感においても高い傾向)。

以上の臨床研究により,肥満者において夜間の副交感神経活動の減弱は QOL の低下をきたしている可能性が示唆された。

本研究により,摂食リズム,体内エネルギー代謝の日内リズムの恒常性の維持や自発運動の動機付けにグレリンが関与し,グレリン・リズム(サージ)の重要性が示唆された。また,探索行動は暗期開始時刻後に生じることから,その動機付けには摂餌行動,明暗の光刺激以外にグレリンが関与していることが明らかとなった。

#### 引用文献

- 1) Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-60 (1999).
- 2) 椎屋智美: 成長ホルモン作用増強を介したグレリン併用運動療法の生理学的意義と臨床応用. 成長科学協会研究年報 33, 123(2010)
- 3) 二見明香里, 阪上 浩, 原田 永勝, 志内 哲也, 中屋 豊: 中枢神経系におけるグレリンの摂食と運動調節経路の解析, 糖尿病, Vol.55, No. Suppl. 1, S-300 頁(2012)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Hiroharu Mifune, Yuji Tajiri, Yoshihiro Nishi, Kento Hara, Shimpei Iwata, Ichiro Tokubuchi, Ryouichi Mitsuzono, Kentaro Yamada, Masayasu Kojima: Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rats. *Peptides* (査読有) 71, 2015,

[学会発表](計8件)

Yuji Tajiri, Kento Hara, Yusuke Sakai, Kentaro Yamada, Ryouichi Mitsuzono, Masayasu Kojima, Hiroharu Mifune: A surge of appetite regulating hormone, ghrelin, and its relevance to motivation for the initiation of voluntary exercise in mice. 52th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2016.9.12 ~ 9.16, Munich (Germany).

御船弘治, 原 健人, 坂井勇介, 岩田慎平, 西 芳寛, 田尻祐司, 児島将康, 満園良一: グレリン遺伝子欠損マウスの制限給餌下における自発運動について. 第89回日本内分泌学会学術総会, 2016.4.21 ~ 4.23, 国立京都国際会館(京都市).

御船弘治, 原 健人, 岩田慎平, 坂井勇介, 西 芳寛, 田尻祐司, 山田研太郎, 児島将康, 満園良一: グレリン遺伝子欠損マウスの摂餌行動と自発運動について. 第36回日本肥満学会, 2015.10.2 ~ 10.3, 名古屋国際会議場(名古屋市).

御船弘治, 原 健人, 西 芳寛, 岩田慎平, 徳淵市朗, 田尻祐司, 満園良一, 山田研太郎, 児島将康: 高脂肪食負荷マウスのグレリン日内リズムについて. 第35回日本肥満学会, 2014.10.24 ~ 10.25, 宮崎シーガイアコンベンションセンター(宮崎市).

田尻祐司, 原 健人, 西 芳寛, 岩田慎平, 満園良一, 児島将康, 御船弘治, 山田研太郎: 肥満モデルラットのグレリン動態や身体活動リズムおよび自発運動の効果. 第57回日本糖尿病学会年次学術集会, 2014.5.22 ~ 5.24, 大阪国際会議場(大阪市).

御船弘治, 原 健人, 西 芳寛, 岩田慎平, 大木 剛, 田尻祐司, 山田研太郎, 満園良一, 児島将康: 肥満モデルラットにおけるグレリン動態に及ぼす自発運動の効果. 第87回日本内分泌学会学術総会,

2014.4.24 ~ 4.26, 福岡国際会議場(福岡市).

田尻祐司, 原 健人, 西 芳寛, 岩田慎平, 山田研太郎, 満園良一, 児島将康, 御船弘治: 肥満モデルラットにおけるグレリン動態に及ぼす自発運動の効果. 第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 2014.2.14 ~ 2.15, 宮崎市民プラザ(宮崎市).

御船弘治, 原 健人, 岩田慎平, 田尻祐司, 山田研太郎, 満園良一, 児島将康: 高脂肪食負荷ラットのグレリン動態に及ぼす自発運動の効果. 第34回日本肥満学会, 2013.10.11 ~ 10.12, 東京国際フォーラム(東京).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

満園 良一 (MITSUZONO Ryouichi)  
久留米大学・健康スポーツ科学センター・教授  
研究者番号: 20200058

(2) 研究分担者

御船 弘治 (MIFUNE Hiroharu)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70174117

(3) 研究分担者

田尻 祐司 (TAJIRI Yuji)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80469361

(4) 連携研究者

児島 将康 (KOJIMA Masayasu)  
久留米大学・分子生命科学研究所・教授  
研究者番号: 20202062

(5) 研究協力者

原 健人 (HARA Kento)  
坂井 勇介 (SAKAI Yusuke)  
岡部 百合 (OKABE Yuri)