

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461789

研究課題名(和文) 神経性食欲不振症の病態進行機序における視床下部CRFの役割の解明

研究課題名(英文) A role of hypothalamic CRF on the progression of anorexia nervosa

研究代表者

眞野 あすか (Mano, Asuka)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50343588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経性食欲不振症(AN)は、ストレスに関連した摂食障害や過活動を示す疾患である。ストレスホルモンであるCRFは摂食抑制、不安惹起、活動性の亢進などの作用を持ち、ANの病態解明においてCRFの関与様式の解明は必要不可欠である。しかしながらANのモデル動物の過活動性拒食症(ABA)モデルラットのCRFニューロンの活性化の有無については明らかではなく、これらを明らかにすることを目的とした。

ABAラットでは視床下部のCRFニューロンは過度の活性化を示し、ストレスの指標となる血中コルチコステロンも高値を示した。以上の結果からABAラットの行動の表現型の一部はCRF過剰分泌に起因することが推測された。

研究成果の概要(英文)：Anorexia nervosa is a severe life-threatening eating disorder characterized by self-starvation, hyper activity. Exogenous corticotropin-releasing factor (CRF) causes behavioral changes including decreased feeding and increased activity. These behavioral changes are also seen in anorexia nervosa. However, the role of hypothalamic CRF in the progression of anorexia nervosa has not been investigated fully. We examined whether the activation of hypothalamic CRF is caused in a rat of activity-based anorexia, they are given access to a running-wheel in combination with food restriction, they will be hyperactive and decrease their food intake. In ABA model rats, neuronal activity of CRF was potentiated and plasma corticosterone levels were elevated. These results indicate that hyper secretion of CRF from hypothalamus may partially induced feeding impairment or hyper activity of activity-based anorexia.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：神経性食欲不振症 視床下部 摂食障害 ストレス 過活動

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経性食欲不振症(AN)と副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRF)

精神的ストレスが発症に関与していると考えられている AN は、その病態形成に脳内ストレス伝達物質である CRF の過剰分泌が関与していることが示唆されている。CRF は視床下部室傍核の神経細胞に存在し、ストレス時には CRF の正中隆起から下垂体前葉への分泌が亢進することがきっかけとなり視床下部-下垂体-副腎軸が活性化される。CRF は摂食抑制作用を有し、ストレスによる摂食抑制機序に関与しているのみならず、不安を惹起し活動性を亢進する作用も有している。中枢性摂食異常症の一つである AN では摂食障害に加え、強い不安感などの精神症状や過活動が認められる。これらに加え AN では視床下部-下垂体-副腎軸の異常と脳脊髄液中の CRF 濃度が上昇していることが知られていることから、AN の病態の解明において CRF の関与様式を明らかにすることは必要不可欠である。

(2) 活動性拒食症(activity-based anorexia, ABA)モデルラット

ABA モデルラットは摂食抑制、活動性の亢進、基礎代謝の亢進が認められ、AN の表現型を再現可能であることから、AN のモデル動物として注目されている。しかしながら ABA ラットの摂食抑制機序における CRF 分泌促進機構の関与の有無は明らかではない。ABA ラットの摂食抑制機序を解析することで AN の病態形成機序の一端が明らかになることが期待される。AN の病態である摂食障害における CRF の新しい関与様式を明らかにすることは、難治性疾患である AN の治療の前進に必須であることから本研究を行うことを考えた。

2. 研究の目的

AN において CRF 過剰分泌が摂食を抑制していると考えられているが、CRF が過剰に分泌する神経機構、および AN の病態における CRF の関与様式の詳細は不明である。これらの点を明らかにすることで AN の病態における摂食調節障害機序が明らかとなり、難治性疾患である AN の治療の一助となることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ABA ラットの作出方法

以下 1 から 3 に示した既報の手順に従って ABA ラットを作出する。

1. 回転かご式自発運動測定装置を備えた飼育ケージにてラットを飼育し、一週間馴化させる。

2. 毎日の摂食を午後 3 時から午後 4 時 30 分までの 90 分間のみに制限する。

3. 毎日の摂食量、体重、回転かごでの運動量を測定する。

上述のように一日の摂食時間を制限することにより、摂食抑制、運動量の増加といった AN 様の表現型を示すラットを作成することが可能である。摂食制限は 5 日間とし、重篤な拒食(一日の摂食量が 4g 以下)や過度の体重減少(自由摂食時の 75%以下)を示した個体については実験を途中で中止して除外する。

対照群として以下の - を設けて常に ABA ラットを含めた 4 群について実験を行う。

コントロール : C
回転ケージ : 非稼働、自由摂食
エクササイズ : Ex
回転ケージ : 稼働、自由摂食
Pair-fed : PF
回転ケージ : 非稼働、摂餌制限

5 日目の午後 3 時よりペントバルビタールおよびセレクター麻酔下、心尖部より採血後血漿を分離した。その後、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行い、脳を取り出した。

(2) 免疫染色

灌流固定した脳を用いて凍結冠状切片を作成し、浮遊法により免疫染色を行った。内因性ペルオキシダーゼ阻害のため 0.3%過酸化水素含有 PBS にて 30 分処理を行った。次に、非特異的抗原抗体反応を抑えるために 3%正常ヤギ血清添加 PBS にて 2 時間処理した後、家兔にて作成した抗 Fos 一次抗体と室温にて一晚反応させた。翌日、ビオチン化抗ウサギ IgG(Vector 社)と 1 時間反応させた後、ペルオキシダーゼ標識アビジン - ビオジン複合体を形成させ、ペルオキシダーゼ基質であるジアミノベンチジンにて陽性細胞を茶褐色に発色させた。Fos と CRF の二重染色は、Fos 蛋白の免疫染色後、家兔にて作製した抗 CRF 抗体を用いて CRF ニューロンを VectorSG(Vector 社)にて青色に染色した。

(2) 血中コルチコステロン濃度の測定

血中コルチコステロン濃度はカイマン社製のラットコルチコステロン EIA キットを用い、添付のプロトコールに従って測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際してはその愛護に留意し、屠殺の際に苦痛を最小限に留めるように十分配慮した。

4. 研究成果

図1に毎日の摂食量(A)、活動量(B)、体重変化(C、D)を示す。ABA群の4日目から5日目の間の摂食量は他の群に比べ摂食量は有意に少なく、活動量は自由摂食のエクササイズ群と比較して5日目に有意に多かった。また、4日目から5日目の体重減少量は摂食制限時間が等しいpair-fed群と比較してもABA群で有意に多かった。

コルチコステロン濃度(図1E)は、ABA群が他の群と比較して有意に高値を示した($p < 0.05$)。

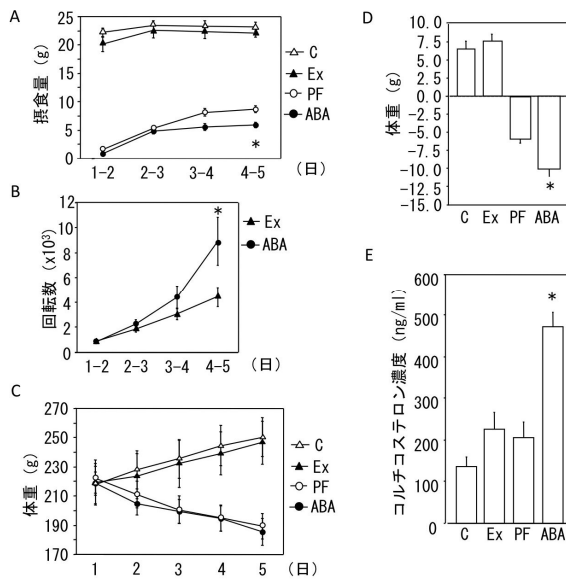


図1 A: 毎日の摂食量
B: 活動量
C: 体重変化量
D: 4日目から5日目の体重変化量
E: コルチコステロン濃度
*印: $p < 0.05$

ABAラットでは対照3群(コントロール群、エクササイズ群、PF群)と比較して室傍核のCRFニューロンにおけるFos発現が有意に多かった(図2、3)。

今回ABAラットの摂餌制限時間を90分としたが、既報の文献毎に30分から3時間の間と様々であった。摂餌時間が短いと必然的に摂食量は少なくなり、AN様の表現型が容易に発現されるが、早期に死に至る個体もあり倫理的観点から不適当であると考えられた。しかしながら軽度の摂食時間制限では摂食量に差が認められず作出が失敗することとなり、摂餌時間を決めるまでに多くの時間を要した。

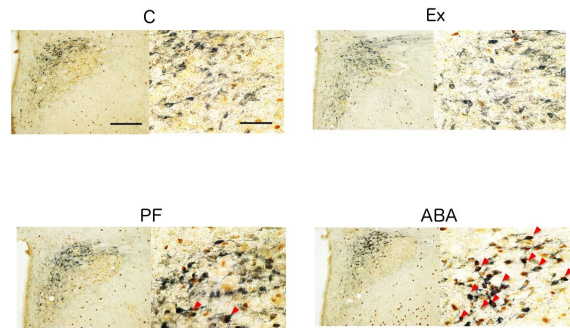


図2 室傍核のCRFニューロンにおけるFos発現

Fos: 茶色、CRFニューロン: 青色
矢印: Fos陽性CRFニューロン
左: 低倍率: 100 μm 、右: 高倍率: 200 μm

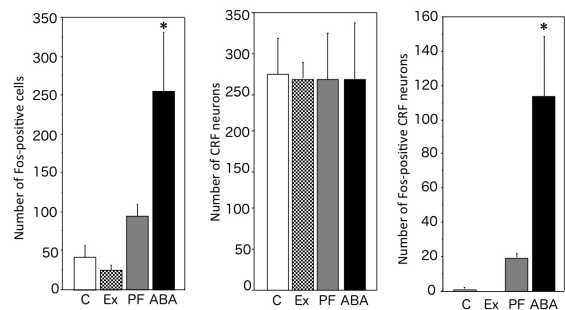


図3 室傍核のCRFニューロンにおけるFos発現の定量結果

左: 室傍核におけるFos発現量
中央: 室傍核におけるCRFニューロン数
右: 室傍核のCRFニューロンにおけるFos発現量
*印: $p < 0.05$

今回の研究からABAラットでは室傍核のCRFニューロンが活性化していることが示唆された。また、ABAラットでは視床下部のCRF mRNA発現量が増すと報告があることから²⁾、2つの負荷を同時に行うことにより行動に違いが生じる機序は明らかではないが、その機序の一部としてCRFが関与している可能性が推測された。ABAラットでは血中コルチコステロン濃度が他の群と比較して約2倍も高値を示していたが、室傍核のCRFニューロン活性化により視床下部-下垂体-副腎軸が

活性化され、コルチコステロン濃度が上昇した可能性が考えられた。摂食時間制限を続けても血糖値は対照群と同レベルに維持されるとの報告もあることから³⁾血中コルチコステロンの上昇は血糖維持に寄与していると考えられた。

CRF 受容体拮抗薬投与による摂食抑制および活動性亢進の解除について検討する必要があると考え試みたが、摂餌開始に薬効が出現するように摂餌開始30分前に CRF1 型受容体拮抗薬であるアンタラミンを腹腔内へ投与したが摂食抑制や過活動が阻止および減弱されることはなかった。薬物の投与によるストレスの影響や投与時間の選択が不適切であったことなどが原因として考えられる、また、CRF2 型受容体も摂食抑制機序に関与しているとの報告もあることから非選択的 CRF 拮抗薬を用いて抑制作用を確認した後、受容体拮抗薬を用いる必要があると考えられた。

以上から ABA ラットの摂食抑制および活動性の亢進の一部は室傍核の CRF ニューロンの活性化が関与している可能性が考えられ、本研究結果は神経性食欲不振症の治療の一助と成ると推測される。

<引用文献>

Hotta M, Shibasaki T, Masuda A et al. The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotrophin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. J Clin Endocrinol Metab 1986;62:319-324.

Diane A, Vine DF, Russell JC et al. Interrelationship of CB1R and OBR pathways in regulation of metabolic, neuroendocrine, and behavioral responses to food restriction and voluntary wheel running. J Appl Physiol 1985;117:97-104.

Hillebrand JJ, Kas MJ, Adan RA. alpha-MSH enhances activity-based anorexia. Peptides 2005;26:1690-1696.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

眞野あすか、柿沼由彦、芝崎 保、過活動性拒食症モデル動物における CRF の機能異常の解明、第 89 回日本内分泌学会学術総会、2016 年 4 月 21 日、京都国際会館(京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://college.nms.ac.jp/page/155.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

眞野 あすか (MANO, Asuka)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50343588

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：