

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292165

研究課題名(和文) 哺乳動物の中枢・末梢クロストークによる摂食と走行運動調節機構の分子生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular mechanism of relationship between food intake and running by the crosstalk of the central nervous system and peripheral nervous system in the mammal

研究代表者

村上 昇 (MURAKAMI, NOBORU)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80150192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラットに通常食と高脂肪食を選択させると圧倒的に高脂肪食を選択した。しかし、走行運動を可能にすると、高脂肪食は選択されず通常食を摂取した。すなわち走行運動の嗜好性が高脂肪食の嗜好性よりも優位に立ち、高脂肪食摂取が抑制されることが判明した。一方で、走行運動に慣れると高脂肪食への嗜好性は急激に回復した。非走行状態での高脂肪給餌によるレプチン上昇と体脂肪の蓄積は高カロリー摂取が原因ではなく、高脂肪食中に直接レプチンの上昇を引き起こす因子あるいは走行運動中枢を抑制する因子がある可能性が推測された。さらに、走行運動は高脂肪食給餌による視床下部や小腸の炎症を防止し、肝臓や筋肉のインスリン抵抗性を阻止した。

研究成果の概要(英文)：Rat selected predominantly high-fat meal rather than usual meal when rats can decide which to choose. However, rat selected usual meal but not the high-fat meal if rats were allowed to run by using the wheel running apparatus. In other words, the palatability of the running is superior than the palatability of the high-fat meal, and it showed that a high-fat meal intake was suppressed by the running behavior. On the other hand, the palatability of the high-fat meal was clearly restored when rats used to a run. The reason for both the increase of leptin and accumulation of body fat by high fat meal intake under the non-running condition was not high caloric intake. It may be that high fat meals contain the factors which cause the leptin increase or suppression of running behavior. Furthermore, the running behavior prevented the inflammation of hypothalamus and small intestinal by the high-fat meal feeding, and prevented the insulin resistance of liver and the muscle.

研究分野：農学

キーワード：摂食 グレリン 遺伝性肥満 ニューロメジンU ニューロメジンS

### 1. 研究開始当初の背景

あらゆる動物にとって摂食は生命の維持に不可欠な本能的機能である。下等な生物の摂食機構(捕食)は、単純な条件反射によるものであるが、高等動物では、複雑で巧妙な摂食調節機構が存在する。哺乳動物においては、中枢の満腹中枢(室傍核や腹内側核)と飢餓中枢(外側視床下部)の相対的支配により摂食が調節されていると古典的には考えられてきたが、近年では、摂食を調節する物質が中枢や末梢に存在し、神経性と体液性のクロストークにより、また中枢と末梢のクロストークにより制御されていると考えられている。特に脂肪から分泌されるレプチン、中枢や脊髄、あるいは小腸で生産されるニューロメジンU(以下NMU)やNMUと類似のNMSの摂食抑制機序については不明な点が多い。またレプチンについては、レプチン抵抗性が高カロリー食摂取時の肥満の一因として重要な社会問題となっているが、その機序も統一した見解が未だ得られておらず混沌としている。摂食機構の研究は人のみならず、産業動物や伴侶動物においても大変重要な研究課題であり、過食や拒食は伴侶動物の肥満や痩せ、家畜の成長(増体率)、あるいは乳量などに直結している。本研究は、これらの背景をもとに、摂食抑制物質に関する幾つかの疑問に答えることや、摂食-運動-肥満の関係とそれらの機序を検討する。

### 2. 研究の目的

本研究目的は、上記の背景をもとに、以下の4つの疑問に答え、それを通して肥満や過食などの問題解決の一助になることを期待するものである。

- (1) 摂食中枢および摂食調節中枢の摂食関連ペプチドに反応する神経活動の特性は?
- (2) 高脂肪食給餌による体脂肪蓄積をレプチンの慢性投与は阻止できるのか、高脂肪食給餌マウスにおけるレプチン抵抗性はいつ獲得されるのか、あるいは、高脂肪食給餌による体脂肪の蓄積は本当にレプチンの抵抗性によるものなのか?
- (3) ラットにおける走行運動と高脂肪食の優先的嗜好性はどちらか?
- (4) 高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性、レプチン抵抗性および小腸炎症反応に対する走行運動の効果は?

### 3. 研究の方法

(1) 摂食中枢および摂食調節中枢の摂食関連ペプチドに反応する神経活動の特性は? : 摂食中枢の室傍核、腹内側核および外側視床下部、あるいは摂食調節中枢の弓状核が、摂食抑制ペプチドのNMUやNMSあるいは摂食促進ペプチドのグレリンに対して、どのような神経活動を行うかについてはあまり詳細に調べられていない。神経の電気活動を測定することは、神経の活動が抑制的であるのか、あるいは促進的であるのかを知る上で極めて重要である。神経活動を測定する方法として、生体での神経活動を知る *in vivo* 法として多電極装着ラットでの神経活動記録が有効であり、任意の神経核に電極を装着すれば、その神経核の活動状態を無麻酔下で記録できる。また一方で、*in vitro* 法として脳スライスから電位を記録する方法がある。そこで、この両者の方法を用いて、NMU、NMSおよびグレリンの作用を検討した。

(2) 高脂肪食給餌による体脂肪蓄積をレプチンの慢性投与は阻止できるのか、高脂肪食給餌マウスにおけるレプチン抵抗性はいつ獲得されるのか、あるいは、高脂肪食給餌による体脂肪の蓄積は本当にレプチンの抵抗性によるものなのか?

高脂肪食給餌による体脂肪蓄積をレプチンの慢性投与は阻止できるのか? : 高脂肪食を給餌したマウスにおいて、給餌開始と同時にレプチンの末梢慢性投与を行い、肥満が防止されるか否かを調べた報告はほとんど無い。そこで今回、高脂肪食の給餌開始と同時に末梢性のレプチン慢性投与を行い肥満誘発に対する効果を調べた。5週齢のマウスを、通常食-生理食塩水(saline)投与群、通常食-レプチン投与群、高脂肪食-生理食塩水投与群、高脂肪食-レプチン投与群の4群に分け、それぞれに2週間、60%高脂肪食あるいは通常食を給餌し、また、それぞれにレプチン(1.25 $\mu$ g/h)あるいは生理食塩水を含む浸透圧ミニポンプを皮下に埋設し、慢性投与した。血中レプチン濃度、摂食量、体脂肪量、酸素消費量、二酸化炭素排出量を調べた。

高脂肪食給餌マウスにおけるレプチン抵抗性はいつ獲得されるのか? : 高脂肪食を給餌した後に、通常食へ戻す時期を段階的に変え、高脂肪食誘起肥満のレプチン抵抗性獲得時期や、高脂肪食から通常食へ戻したときの肥満の推移を調べた。5週齢のマウスをそれぞれ7群に分け、高脂肪食給餌期間を2,4,6,8,あるいは10週間に設定し、その後通常食に戻した。毎週、採血、摂食量、体脂肪測定を行った。17週齢時に屠殺後、精巣周囲脂肪量の測定を行った。

高脂肪食給餌による体脂肪の蓄積はレプチンの抵抗性によるものなのか? : 高脂肪食給餌が運動へ与える影響を調べるために、活動期(18:00-8:00)における輪回し回転数を計測した。5週齢のマウスを輪回し装置に入れ、3週間で回転数が5000以上のマウスを通常食給餌群と高脂肪食給餌群の2群に分けて回転数を計測した。次に、高脂肪食給餌から約3週間後に、高脂肪食給餌群には通常食を、また、通常食給餌群には高脂肪食給餌を行って回転数を計測した。

(3) ラットにおける走行運動と高脂肪食の優先的嗜好性はどちらか? : 運動は四足歩行を行うほとんどの動物が持っている本能的行

動である。げっ歯類においてその走行運動は摂食行動と密接に関係している。例としてラットでは輪廻し装置を導入すると摂食量と体重が減少し、その後、輪廻し装置を取り除くと摂食量は一時的に増加することや、ラットやマウスで高脂肪食や高スクロース食を与えることにより輪廻し走行運動が減少することが判明した。さらに、走行運動と摂食行動の相反的關係を明らかにした。この相反的制御機構には、高脂肪食(高カロリー食)と走行運動の嗜好性(報酬機構)が関与している可能性も示唆されている。そこでラットが高脂肪食摂取の報酬系と走行運動の報酬系のどちらを優先するかを検討し、走行運動中枢と摂食中枢の相反的調節においてどちらが上位にあるのかを推測した。

(4) 高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性、レプチン抵抗性および小腸炎症反応に対する走行運動の効果は？：近年、高カロリー食摂取後の腸内細菌叢の変化や小腸、脂肪組織および視床下部の炎症反応が挙げられている。そこで本研究では走行運動がこれらの炎症反応にどのような影響を及ぼすかを調べた。5週齢まで通常食を給餌した C57BL/6J 雄マウスを用い、その後、通常食と高脂肪食給餌群を設け、さらに両群にそれぞれ、走行運動を許容する群と許容しない群を設けた。インスリン、レプチン、アディポネクチンおよび炎症マーカーとしての SAP、IL-6 値を ELISA キットで測定した。また、視床下部での *Aif1*、*Tnfa*、肝臓での *Enho*、大腿筋での *Pparγ*、褐色脂肪での *UCPI* の mRNA 発現量を RT-PCR で定量した。次に肝臓でのインスリン抵抗性関連遺伝子の発現を PCR array 解析した。一部のマウスはホルマリン還流固定を行い、小腸で、マクロファージやミクログリアに特異的な Iba1 の抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 摂食中枢および摂食調節中枢の摂食関連ペプチドに应答する神経活動の特性は？：まず、弓状核の組織スライスにおいて、NMU および NMS は発火頻度の減少を招いた。この減少した部位はニューロペプチド Y(NPY) やアグーチ関連ペプチド (AGRP) の神経細胞が多く分布する第3脳室背側上部であり、基底部のプレオピオメラノコルチン(POMC) 細胞領域では発火頻度の減少は認められなかった。一方、グレリンは NMU と異なり、NPY や AGRP 細胞領域の発火頻度を増加させた。視交叉上核においてはグレリンに対する変化は認められなかったが、NMU と NMS では発火頻度に有意な増加が認められた。この時、主に VIP 細胞領域よりも AVP 領域、つまり体内時計の発信部の神経細胞が多く反応した。ニューロメジン類は主に弓状核 NPY や AGRP 神経細胞に作用して発火頻度を減少させたことから、これらの摂食促進系

細胞に作用して、その抑制的な効果を発揮すること、逆にグレリンはそれらの細胞で促進的作用を示す事が推測された。また視交叉上核に対して、NMU および NMS とともに、光同調機構ではなく時計の発信機構に対して、何らかの調節を行っているものと推測された。

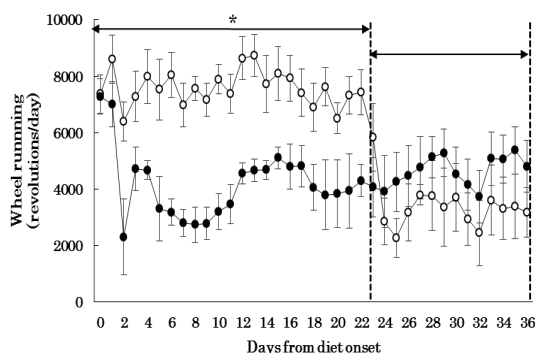
(2) 高脂肪食給餌による体脂肪蓄積をレプチンの慢性投与は阻止できるのか、高脂肪食給餌マウスにおけるレプチン抵抗性はいつ獲得されるのか、あるいは、高脂肪食給餌による体脂肪の蓄積は本当にレプチンの抵抗性によるものなのか？

高脂肪食給餌による体脂肪蓄積をレプチンの慢性投与は阻止できるのか？：高脂肪食給餌マウスでは、saline 投与や leptin 投与に関わらず、通常食給餌 saline 投与群と比較して、体脂肪量、精巣周囲脂肪量について、有意な増加を示した。また、通常食給餌では、レプチン慢性投与によって、通常食給餌 saline 投与群と比較して、体脂肪も精巣周囲脂肪も有意な減少を示した。レプチン濃度については、通常食給餌 saline 投与群と比較して、高脂肪食給餌 saline 投与群 leptin 投与群ともに、有意に高い値を示した。通常食給餌 leptin 投与群も通常食給餌 saline 投与群と比較して有意に高いレプチン値を示した。酸素消費量、消費カロリー、呼吸商については、高脂肪食給餌 saline 投与群、leptin 投与群間に有意な差は認められなかった。一方、高脂肪食給餌マウスは、通常食給餌群と比較して、摂食量の有意な減少を示した。カロリー計算を行うと、高脂肪食給餌群と通常食給餌群の間には摂取カロリーに差はなかった。以上のようにレプチンの慢性投与は高脂肪給餌の脂肪蓄積は阻止できないことが判明した。

高脂肪食給餌マウスにおけるレプチン抵抗性はいつ獲得されるのか？：2, 4, 6, 8, 10 週間高脂肪食給餌後に通常食に戻すと、どの群も体重および体脂肪率は直ちに正常に近い状態に回復した。同様に高脂肪食の際に認められたレプチン濃度の上昇も、通常食に戻すと、通常食のみを給餌した群と有意差が認められないほど低下した。精巣周囲脂肪量についても、通常食に戻さなかった群以外は、通常食のみを給餌した群と有意差は認められなかった。すなわち、高脂肪食給餌による肥満は可逆的に解消可能であるということが判明した。

高脂肪食給餌による体脂肪の蓄積はレプチンの抵抗性によるものなのか、あるいは他の要因が関与しているのか？：高脂肪食給餌を開始すると直ちに走行量の有意な減少が認められた。また、3週間後にそれぞれの食事を入れ替えた時、通常食給餌群は高脂肪食給餌へ移行すると走行量の有意な減少が認められたが、高脂肪食給餌から通常食給餌へ移行しても走行運動に変化は認められなかった(下図)。すなわち、高脂肪食給餌は明らかに走行運動を抑制し、その抑制された走

行運動は通常食に戻しても、なかなか回復しないことが判明した。このように高脂肪給餌による体脂肪の蓄積は、レプチン抵抗性によるものではなく、むしろ高脂肪食が運動でのエネルギー消費を直接抑制しているためと推測された。



(3) ラットにおける走行運動と高脂肪食の優先的嗜好性はどちらか？：最初の実験は雄ラットが6週齢に達した時から開始し、走行運動量は輪廻し装置の回転数で測定した。また通常食と高脂肪食のどちらを選択するかは、ケージ内に通常食と高脂肪食の餌箱を設置し摂取量で決定した。まず、走行不可能な条件下で通常食と高脂肪食を選択させると、すべてのラットが通常食よりも高脂肪食を優先して摂取した。一方、通常食と高脂肪食の選択と同時に走行運動を可能にすると、全てが走行運動を開始し、逆に通常食を優先して選択し、高脂肪食はほとんど摂取しなかった。ところが1週間あるいは2週間先に走行運動を可能にさせたラットで通常食と高脂肪食の選択を開始させると、今度は高脂肪食を優先的に摂取した。さらに走行可能条件と同時に高脂肪食を摂取した場合、走行運動開始時には高脂肪食の摂取を避ける傾向がみられた。

そこで次に高脂肪食の摂取が走行運動を抑制するかどうかを調べる為に、6~9週齢の雄ラットの胃にカニューレシオンを行った。麻酔から回復後すぐに、輪廻し装置付きのケージで飼育し走行運動に1週間慣らした。17時に絶食させ走行運動が促進された状態で、暗期開始の19時に胃に直接生理食塩水、脂肪、炭水化物を投与した。19時から20時までの投与後1時間の走行量を輪廻し装置の回転数で測定した。また何も投与しない群でも同様の実験を行った。その結果、生理食塩水や炭水化物を投与した群、あるいは何も投与しない群と比較して、脂肪を投与した群で投与後1時間の走行量は減少した。

以上の結果、ラットは通常食よりも高脂肪食に嗜好性があるが、走行運動を同時に可能にすると、走行運動の報酬系が優位に立ち、高脂肪食摂取が抑制される(嗜好性が下がる)こと、その一方で、走行運動に慣れると高脂肪食への嗜好性が回復することが判明した。また走行運動開始時には高脂肪食の摂取を避ける傾向にあり、胃に直接脂肪を投与すると

走行運動が急性的に抑制された。このことから高脂肪食摂取と走行運動のどちらにも報酬系は存在するが、走行運動の報酬系の方が高脂肪食摂取の報酬系よりも高いことが示唆された。さらに高脂肪食摂取は走行運動を急性的に抑制する為、恐らく走行運動を行う時には高脂肪食の摂取を避けていると推測された。すなわち走行運動と摂食行動の相反的制御機構には報酬系の優位性と、脂肪の走行運動への直接的な抑制作用などといった複雑な要因が絡み合っていると思われた。

(4) 高脂肪食誘導性のインスリン抵抗性、レプチン抵抗性および小腸炎症反応に対する走行運動の効果は？：非走行の高脂肪食給餌マウスは通常食群に比べ有意な体重増加と総コレステロール値の上昇を示し、また血中インスリン、レプチン値の著しい上昇とアディポネクチンの減少を示した。しかし、これらの上昇や減少は走行運動を許容することで、すべて緩和された。運動によって骨格筋の *Pparγ* mRNA の発現量は顕著に増えた。PCR array 解析の結果、高脂肪給餌マウスでは運動によって肝臓でのインスリン受容体やアディポネクチン受容体、*lipase E* 等の mRNA の増加や *Tnfa*、*IL-1* の mRNA の発現の減少を認めた。小腸における免疫組織化学染色では、高脂肪食によりマクロファージの浸潤が増加することを認めたが、これは走行運動によって減少した。すなわち、走行運動が肥満発症過程で様々な前段階原因を抑制していると推測された。特に骨格筋での発現量が走行運動により上昇したことから、骨格筋での脂肪蓄積は抑制されたと思われる。また、血液や小腸組織での一部の炎症反応マーカーが運動により減少したことも、運動が前段階原因を抑制したことを示唆している。すなわち走行運動は単にエネルギー消費促進のみならず、免疫系や内分泌系を通じた生体の恒常性維持に寄与していると思われた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

T Ensho, K Nakahara, Y Suzuki, N Murakami :

Neuropeptide S increases motor activity and thermogenesis in the rat through sympathetic activation. *Neuropeptides*. 65:21-27, 2017 (査読有り)

Y Suzuki, K Nakahara, T Ensho, N Murakami :

Sex difference of hyperinsulinemia in the C57BL/6J-Daruma (obese) mouse. *Journal of veterinary Medical Science*. 79(7):1284-1293, 2017 (査読有り)

K Mori, T Ida, M Mori, H Kaiya, J Hino, M Fudetani, K Nakahara, N Murakami, M Miyazato, K Kangawa : Identification of neuromedin U precursor-related peptide and its

possible role in the regulation of prolactin release. Scientific Reports. 7: 10468 (on line) DOI:10.1038/s41598-017-10319-9(査読有り)

T Ensho, K Maruyama, K Mori, M Miyazato, K Kangawa, K Nakahara, N Murakami : Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) exerts neuromedin U-like sympathetic nerve action in the rat. Biochemical and Biophysical Research Communications. 492(3):412-418, 2017 (査読有り)

Y Inoue, Y Hayashi, K Kangawa, N Murakami, K Nakahara : Des-acyl ghrelin prevents heatstroke-like symptoms in rats exposed to high temperature. Neuroscience Letters. 615:28-32, 2016 (査読有り)

K Nakahara, A Akagi, K Mori, M Miyazato, K Kangawa, S Shimizu, AW Qattali, N Murakami : Involvement of endogenous neuromedin U and neuromedin S in thermoregulation. Biochemical and Biophysical Research Communications. 470:930-935, 2016 (査読有り)

R.Okame, K.Nakahara, Y.Kato, M.Bannai, N.Murakami : Comparison of amino acid profiles between forced running exercise and voluntary running exercise in rats. J. Vet. Med. Sci. 77(6):661-668, 2015 (査読有り)

R.Okame, K.Nakahara, N.Murakami: Plasma amino acid profiles at various reproductive stages in female rats. J. Vet. Med. Sci. 77(7):815-821, 2015 (査読有り)

Y Suzuki, K Nakahara, K Maruyama, R Okame, Y Inoue, N Murakami: Changes in mRNA expression of hypothalamic appetite-regulating peptides during different phases of lactation in rats. J Mol Endocrinol. 52(2):97-109, 2014 (査読有り)

〔学会発表〕(計12件)

中山瑞紀、中原桂子、村上昇  
ラットにおける走行運動と高脂肪食の優先的嗜好性について、第160回日本獣医学会(鹿児島)2017.09.14

〔図書〕(計1件)

大・中・小動物実験プロトコール、宮崎大学動物実験プロトコール編集委員会、4-5. 体表体温の測定(村上昇、中原桂子) 73-75ページ、4-6. マウス・ラットの脳室内投与法(村上昇、中原桂子) 76-77ページ、2016年4月15日

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上昇(MURAKAMI NOBORU)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 80150192

(2) 研究分担者

中原桂子(NAKAHARA KEIKO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 90315359

保田昌宏(YASUDA MASAHIRO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 10336290

永延清和(NAGANOBU KIYOKAZU)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 90233949

西野光一郎(NISHINO KOITIROU)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号: 90508144