

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500975

研究課題名(和文) エストロゲンによる摂食抑制と摂食行動日内リズム調節の関連の機序解明

研究課題名(英文) Involvement of circadian feeding rhythm regulation in the mechanism for estrogen-induced hypophagia

研究代表者

鷹股 亮 (TAKAMATA, AKIRA)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：00264755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： エストロゲンは、ラットにおいて明期に特異的に摂食を抑制する。本研究では、エストロゲンの明期に特異的な摂食抑制作用は、光に対する反応性の亢進を伴っており、光依存性であることが明らかになった。また、エストロゲンは糖利用低下に対する摂食行動とORX-Aニューロンの活性化を明期に特異的に抑制し、エストロゲンによる糖利用低下時のORX-Aニューロン活動の抑制にセロトニンが関与している事が示された。従って、エストロゲンの摂食抑制作用は、光依存性であり、脳内セロトニンが重要な役割を果たしている可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： Estrogen attenuates food intake and enhances c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus specifically during the light phase. In the present study, we found that light exposure during the light phase is required to elicit an anorectic effect of estrogen. We also found that estrogen attenuates food intake and orexin A neuron's responses to reduced glucose availability, which was possibly mediated by serotonergic neurons. Thus, estrogen enhances serotonergic neurons response to light, and the serotonergic neurons attenuate orexin-A neuron's activity, which is, at least in part, a mechanism for the estrogen-induced hypophagia.

研究分野：食生活学 食行動

キーワード：エストロゲン 摂食調節 概日リズム 視交叉上核 オレキシンAニューロン セロトニン 短期の摂食
調節 光環境

1. 研究開始当初の背景

閉経後、女性の肥満の発生頻度が増加することが報告されている。肥満は、心臓血管疾患、代謝疾患のリスクファクターであるため、閉経後肥満を予防できれば、生活習慣病予防を介して閉経後女性の健康維持に貢献することができると考えられる。閉経後の肥満予防のためには、肥満形成のメカニズムを明らかにすることが不可欠である。

女性ホルモンであるエストロゲンには、摂食抑制・抗肥満作用があることが古くから報告されているが、そのメカニズムは十分解明されていない。

これまででは、個々の摂食関連ペプチドやモノアミンなどに及ぼすエストロゲンの影響についての研究がほとんどであり、エストロゲンの摂食調節に及ぼす研究は断片的な報告であり、それぞれの連関については十分に理解されていなかった。

我々は、ラットを用いてエストロゲンの摂食抑制作用のメカニズムの解明を目指した研究を行ってきた。一連の研究より、卵巣摘出ラットへのエストロゲン補充による摂食抑制作用は、ラットにおける休眠期である明期に特異的であることを明らかにした(図1)。

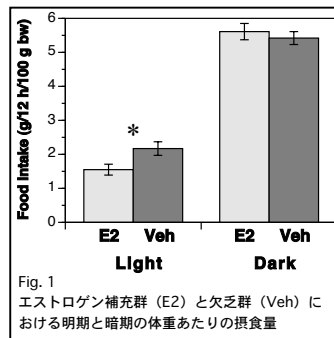


Fig. 1 エストロゲン補充群 (E2) と欠乏群 (Veh) における明期と暗期の体重あたりの摂食量

また、概日リズム形成の中核である視交叉上核 (SCN) は、明期にその活動が亢進し、暗期に活動が低下することが知られているが、c-Fos タンパク質の発現を指標として SCN の活動を評価したところ、卵巣摘出ラットへのエストロゲン補充は、SCN における c-Fos 発現を明期に特異的に亢進させることが明らかになった(図2) (Takamata, et al., Brit J Nutr, 2011)。

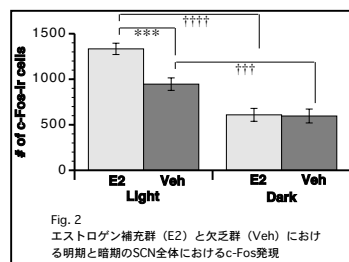


Fig. 2 エストロゲン補充群 (E2) と欠乏群 (Veh) における明期と暗期のSCN全体におけるc-Fos発現

これらの事実は、エストロゲンが摂食行動の日内リズムを変化させ、ラットにおいては明期に特異的に摂食抑制することによって摂食抑制をしていることを示す。しかし、エストロゲンの摂食抑制作用メカニズムに関して、概日リズムとの関連に注目して行われた研究は全くなく、そのメカニズムも不明であった。そこで、本研究ではエストロゲン欠乏時の摂食行動の日内リズムの乱れによる過食のメカニズムを明らかにするための研

究を行うことを計画した。

2. 研究の目的

我々は、ラットにおいてエストロゲンによる明期に特異的な摂食抑制作用のメカニズムを日内リズム調節との関連から明らかにすることを目的として研究を行うこととした。特にエストロゲンの摂食抑制作用が、摂食行動のリズム調節に影響が関連している可能性が高かったため、リズム調節に影響する因子である、光環境の影響がエストロゲンの摂食抑制作用に及ぼす影響について検討した。

次に、エストロゲンによる摂食抑制にセロトニンニューロンが関与しているという仮説を立ててその検証を行った。エストロゲンの摂食抑制作用における作用部位としてセロトニンニューロンに注目したのは、以下の事実に基づく。1) セロトニンには摂食抑制作用がある。2) セロトニンニューロンが存在する縫線核には、エストロゲン受容体が密に存在する。3) セロトニンニューロンは、SCN に投射し、光の影響を受けて SCN の神経活動を介して日内リズム調節に重要な役割を果たしている。

さらに、エストロゲン及びセロトニンを介する摂食調節に摂食亢進ペプチドであるオレキシンが関与しているかについても検討した。

3. 研究の方法

(1) エストロゲンの摂食抑制作用に及ぼす光環境の影響

7週齢のWistar雌ラットの卵巣を摘出し、シリコンチューブにエストロゲンとコレステロールの粉の混合したもの(1:4)を補充したエストロゲン補充群(E2群)とコレステロール(Vehicle)のみを補充したエストロゲン欠乏群(Veh群)の2群に分けた。その後ラットは、1匹ずつ12時間/12時間の明暗サイクル(LD条件;約250ルクス)の環境で飼育した。卵巣摘出・補充手術後10日間の回復期間の後、2日間摂食量を自動摂食量測定装置で連続的に測定した後、2日間にわたり恒常暗環境(DD条件)に曝露し、その際の摂食量を測定した。また、実験終了日の明期の初期(CT3)と暗期の初期(CT15)に灌流固定を行ない、脳を取り出して切片を作成し、免疫組織化学染色により視交叉上核におけるc-Fosの発現細胞を同定し、活動したニューロンの数を定量化した。

(2) エストロゲンの摂食抑制作用と抗うつ作用における脳内セロトニンの関与

7週齢のメスラットの卵巣を摘出してE2またはVehを補充し、それぞれ群を更に選択的セロトニン取り込み阻害薬であるフルオキセチンを投与した群(FLX群)と生理食塩投与群(SAL群)に分けた。フルオキセチンまたは生理食塩水の投与は、卵巣摘出・補充手術後1週間後より行ない、1週間にわたって

明期開始時刻 (ZT0) と暗期開始時刻 (ZT12) に行った。投与開始後摂食量を連続的に測定し、摂食量および摂食行動の日内リズムを 4 群間で比較した。

(3) 糖利用低下時の摂食調節メカニズムとセロトニン、エストロゲンの影響

8 週齢の雌ラットに静脈カテーテルを留置し、全身性インスリン投与による低血糖負荷、または、2-deoxy-D-glucose (2DG) 投与による糖利用低下刺激を負荷し、その際の摂食行動を測定した。更に同様の投与を行った後に灌流固定を行ない、脳を取り出してオレキシン A (ORX-A)、メラニン凝集ホルモン(MCH)、c-Fos の 3 重染色を行ない、糖利用低下時に見られる短期の摂食調節における ORX-A ニューロン及び MCH ニューロンの関与について検討した。

短期の摂食調節におけるセロトニンの影響を明らかにするために、同様の実験を 2DG 投与前の 2 日間フルオキシセチンを投与したラットと生理食塩水を投与したラットで比較した。

更に、短期の摂食調節におけるエストロゲンの影響を明らかにするために、7 週齢の雌ラットの卵巣を摘出後、E2 群と Veh 群に分け、手術後 2 週間後の明期初期と暗期初期に同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) エストロゲンの摂食抑制作用に及ぼす光環境の影響

LD 環境では、E2 群の摂食量は Veh 群に比べて明期に有意に少なく、暗期には両群間で差が無かった。DD 曝露により、E2 群では、主観的明期に摂食量が増加したが、Veh 群では変化が無く、両群の差が無くなった。主観的暗期の摂食量は両群とも DD 曝露の影響を受けなかった (図 3)。

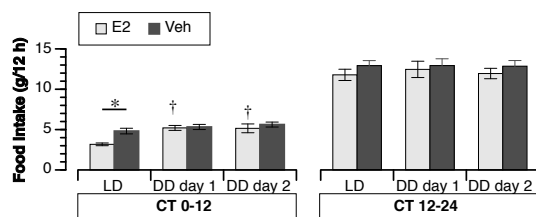


Fig. 3 卵巣摘出エストロゲン補充ラット(E2)とエストロゲン欠乏ラット(Veh)の明期(左パネル)と暗期(右パネル)における摂食量に及ぼす恒常暗環境(DD)曝露の影響

SCN における c-Fos 発現は、LD 環境では、明期に特異的に E2 群で Veh 群よりも多かった。DD 曝露により E2 群では、主観的明期の SCN (特に光の影響を受ける腹外側) における c-Fos 発現が増加したが、Veh 群では DD 曝露の影響を受けなかった。また、主観的暗期の SCN における c-Fos 発現は、両群とも DD 曝露の影響を受けなかった (図 4)。以上より、エストロゲンの摂食抑制作用は光依存性であり、エストロゲンによる光に対する感受性の上昇が関与している可能性が強く示

された。

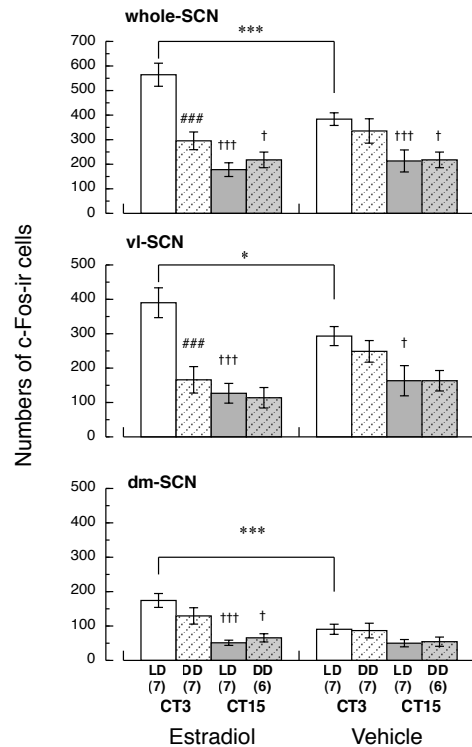


Fig. 4 SCNにおけるc-Fos発現に及ぼすエストロゲンと恒常暗環境曝露の影響(上段:SCN全体、中段:SCN腹外側、下段:SCN背内側)

(2) エストロゲンの摂食抑制作用と抗うつ作用における脳内セロトニンの関与

FLX 群では、E2 群、Veh 群のいずれでも明期に選択的に摂食量が減少した (図 5)。

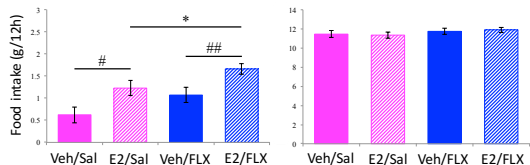


Fig. 5 卵巣摘出ラットへのエストロゲン補充/フルオキシセチン投与が明期(左パネル)と暗期(右パネル)の摂食量に及ぼす影響

また、FLX 投与群では、Veh 群において強制水泳時の無動時間 (うつ様行動) の短縮が見られた。

また、SCN における c-Fos 発現は、Veh 群では E2 群に比べて、明期に特異的に c-Fos 発現が少ないことが確認されたが、Veh 群でのみ明期の SCN における c-Fos 発現が FLX 投与群でコントロールよりも有意に多くなり、E2 群との差がなくなった (図 6)

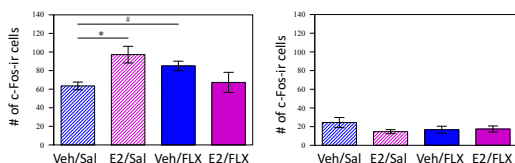


Fig. 6 卵巣摘出ラットへのエストロゲン補充/フルオキシセチン投与が明期(左パネル)と暗期(右パネル)のSCNにおけるc-Fos免疫陽性細胞数に及ぼす影響

以上より、エストロゲンによる明期の摂食抑制作用と抗うつ作用にはセロトニンが関わっている可能性が示された。更に、Veh群においてFLXは、視交叉上核のc-Fos発現を明期に特異的に増加させた。以上より、セロトニンは、明期にSCNの光感受性を増加させる作用がある可能性が示され、これが明期の摂食抑制作用と関連している可能性が示された。

(3) 糖利用低下時の摂食調節メカニズムとセロトニン、エストロゲンの影響

ラットに2DGまたはインスリンを投与すると、摂食量は、有意に増加し、これらの刺激が短期の摂食調節メカニズムを介して摂食量を亢進させる事が確認された。同様の刺激を用いて、視床下部外側野・脳弓周囲のORX-AニューロンとMCHニューロンにおけるc-Fos免疫陽性細胞数の割合を定量化した結果、糖利用低下時に、ORX-Aニューロンではc-Fos発現の増加が見られた

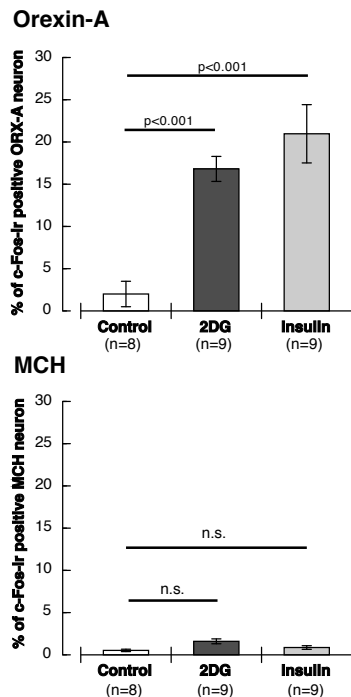


Fig. 7
2DGまたはインスリン投与後の視床下部・脳弓周囲のORX-AニューロンとMCHニューロンにおけるc-Fos発現細胞の割合

が、MCHニューロンでは、見られなかった(図7)。また、Neuropeptide Y (NPY)ニューロンが多く存在する弓状核の内側においてもc-Fos発現の増加が見られた。

以上のことからORX-A、MCHのいずれも摂食亢進ペプチドであるが、短期の摂食調節にORX-Aニューロン及びNPYニューロンが関与するが、MCHニューロンは関与しないことが明らかになった。

そこで、エストロゲン及びフルオキセチンが短期の摂食行動に及ぼす影響を検討した。

2DG、インスリン投与のいずれも摂食量を増加させたが、摂食量の増加は、E2群でVeh群に比べて明期にのみ抑制された。また、2DGまたはインスリン投与で誘発される視床下部外側野・脳弓周囲のORX-Aニューロンにおけるc-Fos発現、弓状核におけるc-FosもE2群ではVeh群に比べて明期にのみ有意

に抑制された。

この結果は、エストロゲンの明期に特異的な摂食抑制は、短期の摂食調節におけるORX-Aニューロンの活性化の抑制を介することを示唆する。

更に、フルオキセチンが短期の摂食調節に及ぼす影響について検討した結果、フルオキセチンは、E2群、Veh群のいずれでも2DGによって誘発される摂食行動を抑制した。

この実験で、エストロゲンが2DGによるORX-Aニューロンの活性化を抑制することが確認された(図8)。更に、フルオキセチンは、E2群ではORX-Aニューロンの活性化に影響せず、Veh群でのみORX-Aニューロンにおけるc-Fos発現を抑制した(図8)。

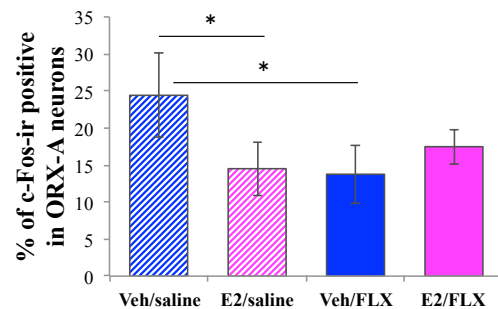


Fig. 8
2DG投与後の視床下部・脳弓周囲のORX-Aニューロンにおけるc-Fos発現細胞の割合に及ぼすエストロゲン及びフルオキセチンの影響

以上より、エストロゲンによる糖利用低下時のORX-Aニューロン活性化の抑制には、セロトニンニューロン活動の亢進が関わっている可能性が示された。

(4) まとめ

我々は、本研究でエストロゲンの明期に特異的な摂食抑制のメカニズムを解明することを目的として研究を行ない、以下のことを明らかにした。

- 1) エストロゲンの摂食抑制作用は、光に対する反応性の亢進を伴っており、光依存性である。
- 2) エストロゲンの摂食抑制作用に脳内セロトニンが重要な役割を果たしている可能性がある。
- 3) エストロゲンは糖利用低下に対する摂食行動とORX-Aニューロンの活性化を明期に特異的に抑制することから、ORX-Aニューロン活動のエストロゲンによる抑制がエストロゲンの摂食抑制作用の少なくとも一部であると考えられる。
- 4) エストロゲンによる糖利用低下時のORX-Aニューロン活動の抑制にセロトニンが関与している事が示された。

以上のことを明らかにしたが、今後はエストロゲンによる明期に特異的なSCN神経活動の亢進と摂食抑制との神経経路を明らかにすることにより、エストロゲンの明期に特異的な摂食抑制作用のメカニズムが明らかになると考えられる。

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 5 件)

① Nisimura Y, Mabuchi K, Taguchi S, Ikeda S, Aida E, Negishi H, Takamata A. Involvement of orexin-A neurons but not melanin-concentrating hormone neurons in the short-term regulation of food intake in rats. *J Physiol Sci*. 64: 203-211, 2014. (査読あり) DOI: 10.1007/s12576-014-0312-0.

② Seo Y, Satoh K, Morit H, Takamata A, Watanabe K, Ogino T, Hasebe T, Murakami M. Mn-citrate and Mn-HIDA: Intermediate-affinity chelates for manganese-enhanced MRI. *Contrast Media and Molecular Imaging*. 8: 140-146, 2013. (査読あり) DOI: 10.1002/cmml.1510.

③ 鷹股亮. 摂食/体重コントロールと性ホルモン. *体育の科学* 62: 942-945, 2012. (査読なし)

④ 鷹股亮. 温熱発汗に及ぼす体液調節系からの抑制. *発汗学* 19: 56-59, 2012. (査読あり)

⑤ Takamata A. Modification of thermoregulatory response to heat stress by body fluid regulation. *J Phys Fitness Sports Med*. 1: 479-489, 2012. (査読あり)

[学会発表] (計 17 件)

① Takamata A, Omura N, Nishimura Y, Igarashi A, Morimoto K. Estradiol-modification of blood pressure regulatory response to systemic and central angiotensin II administration in rats. *Experimental Biology* 2015, Boston, 2015 年 3 月.

② Igarashi A, Omura N, Miura M, Mima N, Nishimura Y, Mabuchi K, Takamata A. Effect of estradiol replacement on diurnal sleep/wake pattern in ovariectomized rats measured with a subcutaneously implanted acceleration sensor. *Experimental Biology* 2015, Boston, 2015 年 3 月.

③ Omura N, Nishimura Y, Igarashi A, Takamata A. Estradiol replacement attenuates central body fluid regulatory responses to hyperosmolality and central angiotensin II in ovariectomized rats. *Experimental Biology* 2015, Boston, 2015 年 3 月.

④ 大村夏美、西村友里、鷹股亮. エストロゲンによる浸透圧・アンギオテンシ II 誘発性中枢体液調節反応の抑制. 第 92 回日本生理学会大会 神戸 2015 年 3 月.

⑤ 五十嵐理子、大村夏美、三浦萌、美馬なな子、西村友里、馬淵香織、鷹股亮. 皮下埋

め込み型加速度センサーを用いたラットの簡易睡眠評価法の開発. 第 92 回日本生理学会大会 神戸 2015 年 3 月.

⑥ 鷹股亮、馬淵香織、西村友里. 糖利用低下時の摂食行動とオレキシンニューロン活動に及ぼす男性ホルモンの影響. 第 68 回栄養・食糧学会大会 札幌 2014 年 5 月.

⑦ 西村友里、馬淵香織、鷹股亮. エストラジオールによる明期選択的な摂食抑制効果におけるセロトニンの役割. 第 68 回栄養・食糧学会大会 札幌 2014 年 5 月.

⑧ 西村友里、馬淵香織、森本恵子、鷹股亮. エストロゲンの摂食抑制作用におけるセロトニンの関与. 第 91 回日本生理学会大会 鹿児島 2014 年 3 月.

⑨ 鷹股亮、馬淵香織、西村友里、森本恵子. エストロゲンによる摂食抑制作用と摂食行動の日内リズム. 第 91 回日本生理学会大会 鹿児島 2014 年 3 月.

⑩ 馬淵香織、鷹股亮. エストロゲンの摂食抑制・抗肥満作用は恒常暗環境で抑制される. 第 52 回日本生気象学会大会 米子 2013 年 11 月.

⑪ 馬淵香織、高野梓、原弥生、森本恵子、上野友美、内山成人、鷹股亮. 大豆イソフラボンの代謝活性物質エクオールが卵巣摘出ラットの摂食・体重調節に及ぼす影響. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 名古屋 2013 年 5 月.

⑫ 鷹股亮、三宅加奈、馬淵香織、森本恵子. エストロゲンは糖利用低下時の摂食行動と視床下部脳弓周囲のオレキシンニューロン活動を抑制する. 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 名古屋 2013 年 5 月.

⑬ Nishimura Y, Mabuchi K, Negishi H, Morimoto K, Takamata A. Serotonin is possibly involved in the anorexigenic and antidepressant effects of estrogen in ovariectomized rats. *Experimental Biology* 2013, Boston, 2013 年 4 月.

⑭ Takamata A, Miyake K, Mabuchi K, Morimoto K. Orchietomy increases food intake and perifornical orexin A neuron's activity during glucoprivation. *Experimental Biology* 2013, Boston, 2013 年 4 月.

⑮ 馬淵香織、高野梓、原弥生、森本恵子、鷹股亮. エストロゲンの摂食抑制作用は暗環境で消失する. 第 90 回日本生理学会大会 東京 2013 年 3 月.

⑯ 馬淵香織、鷹股亮. エストロゲンの摂食抑制・抗肥満作用は光依存性である. 第 51 回日本生気象学会大会 松本 2012 年 11 月.

⑰ 鷹股亮、三宅加奈、田口朝優姫、馬淵香織、森本恵子. エストロゲンによる摂食抑制作用は光依存性である. 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 仙台 2012 年 5 月.

[図書] (計 1 件)

① 鷹股 亮、馬淵香織：環境と体液 「ニ
ユ一運動生理学 II」宮村実晴 編、真興交易
(株) 医書出版部 2014, pp. 235-244.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷹股 亮 (TAKAMATA, Akira)

奈良女子大学・生活環境科学系・教授

研究者番号：00264755