

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26350896

研究課題名(和文) 肥満症とメタボリック症候群における新規ストレス関連脳内因子の解析

研究課題名(英文) The relationship between stress-induced hyperphagia and obesity

研究代表者

正木 孝幸 (TAKAYUKI, MASAKI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：00423715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満症の発症に関してはイライラ食いなど精神的なストレスは重要な因子と考えられる。今回の研究ではストレスと肥満との関係について検討した。ストレスモデルとして、マウスへ高脂肪食を食べるストレスをかけない通常モデル群、マウスに一定時間足を寒冷水へつけるストレスの群を用いて解析した。マウスの足を一定時間寒冷水へつけるストレス群が有意に通常モデルに比較して過食と内臓脂肪量の増加所見を認めた。また血中インスリン値や中性脂肪値、視床下部NPYの上昇所見を認めた。これらの結果よりマウスに高脂肪食下でストレスを与えると視床下部NPYと関連して肥満や糖脂質の代謝異常を助長することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have examined that a stress-induced hyperphagia in diet-induced obese (DIO) mice might affect their body adiposity and related metabolic factors. DIO mice were divided into the group of feeding ad libitum and cold water stress groups. After stress, body adiposity, metabolic parameters were assessed. The group of cold water stress increased body adiposity compared to control groups. In addition, water stress also increased leptin levels in WAT. Furthermore, the group of cold water stress groups increased neuropeptide Y levels in hypothalamus compared to controls. In conclusion, cold water stress appeared to regulate body adiposity, metabolic factors in DIO obese mice.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

欧米諸国はもちろん我が国においても肥満症やメタボリックシンドローム患者は社会的にも医療的にも重要な問題である。一般に肥満症は食事の過剰摂取を主に発症すると考えられているがその過食の原因は様々である。食事量の増加は通常空腹感と併せて、ストレス社会等も反映しイライラ食いなど精神的なストレスが原因で起こることもしばしば見られる。しかしなぜストレスが加わることで食事量が増加するのか、また肥満症やメタボリックシンドロームにつながるのかその詳細な因子についての詳細な解析は未だである。

一般に各種モデル動物や人において、ある種のストレスが加わることで肥満やメタボリックシンドロームにつながる可能性が報告されている。併せてストレス負荷はCRHなど様々な視床下部由来因子を介して摂食調節や血圧調節など様々な生理作用に影響することが報告されている

我々は今までに末梢の脂肪由来因子であるレプチンが摂食調節やエネルギー代謝調節に関与していることを報告してきた。しかしストレスを負荷することで、実際にレプチンを含めどのような脂肪由来因子が変化するのか、またそれらの脂肪由来因子と併せて視床下部内のどのような神経因子がストレス性の肥満やメタボリック症候群に関連しているのかについての詳細な機序は未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

そこで今回の研究でストレスにより変化するレプチンを含めた脂肪由来因子等の解析を行い肥満症またメタボリックシンドロームを引き起こす機序について明らかにすべく以下の研究を進めた。本研究の特色、独創的な点は肥満症やメタボリックシンドロームに合併することの多いストレスに焦点

をあてその病態生理を脂肪由来因子や視床下部内のストレス負荷関連因子の変化を通して解析するという点にあった。

今回の実験ではストレス誘導肥満モデルを作成しストレス関連の脳内因子の解析を行いストレスが過食や肥満症またメタボリックシンドロームを引き起こす機序について解明することである。

特に本研究では肥満症、メタボリックシンドロームに合併するストレスモデルとして高脂肪食負荷に併せた寒冷水ストレスモデルを用いて、そのモデルにおける病態生理を関連因子の変化を通して解析する点に重きを置いた。

## 3. 研究の方法

マウスをストレスの種類により、通常モデル群、寒冷水足ストレス負荷に分け3ヶ月間解析した。実際の食事量と体重の測定を経時的自動摂食解析装置を用いて日々測定し、ストレス誘導肥満症モデルを確立する。更にストレス負荷後に末梢臓器と脳を摘出し各種糖脂質代謝関連因子と脳内因子の変化の解析を行った。表現形の確認と各生理学的な検査を施行した。摂取量、体重、を自動摂食飲水測定器、などを用いて測定した。血中、末梢組織中の糖脂質代謝因子の解析では肝臓および白色脂肪内の血糖、インスリン、中性脂肪やレプチンやアディポネクチンなどの血中、組織内のサイトカイン測定を行った。各サイトカイン測定は western blotting や ELISA 法で実施した。視床下部内因子の変化の解析ではストレス誘導肥満症モデルで視床下部内の neuropeptide Y 等について神経因子の変動解析を western blotting 法などを用いて解析した。

また通常モデル群と寒冷水足ストレス負荷群のマウスの視床下部における抽出した凍結サンプルの蛋白の発現量を比較検討した。その程度に応じた因子を相同性や機能性

も考慮し順位付けして検討した。ストレス負荷関連因子の系時的解析と肥満、糖脂質関連因子を相関解析した。また各ストレス誘導肥満症モデルでの時間軸にそった in vivo での発現変化を中心に検討した。

#### 4. 研究成果

まずマウスをストレスの種類により通常モデル群、物理的なストレスである 寒令水足ストレス負荷群に分け 15%脂肪量の通常の餌を用いて解析した。15%脂肪量の餌では両群ともに1日の摂食量や体重変化に著変は認めなかった。

次にマウスをストレスの種類により、通常モデル群、物理的なストレスである寒令水足ストレス負荷群に分け3ヶ月間解析した。また15%脂肪量の餌60%脂肪量の餌を用いて解析した。15%脂肪量の餌では両群ともに著変は認めなかったが、60%高脂肪食を摂取したときは、寒令水足ストレス負荷の群でストレス性の過食になる知見を得た(図1)。

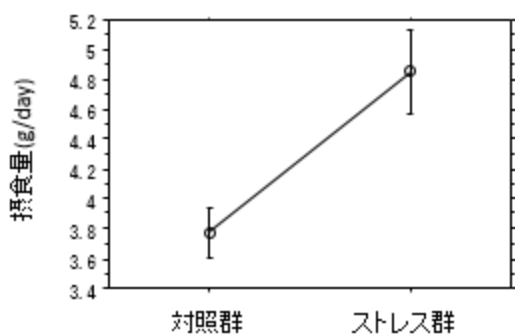


図1: 摂食量の変化について

対照群: 通常摂食群で 60%の高脂肪食を摂食しストレスは特に加えない群; ストレス群: 60%の高脂肪食を摂食し寒冷水に肢を浸ける群

またストレス負荷の2群では糖脂質代謝関連因子の変化の解析を行った所、血中のインスリン、中性脂肪濃度の上昇を認めた(図2)。

中性脂肪濃度の上昇所見を以下に示す。

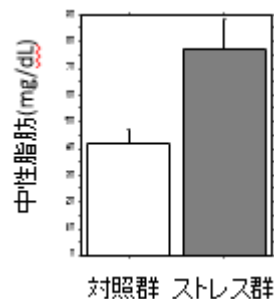


図2: ストレスによる血中の中性脂肪値の変化について

対照群: 60%の高脂肪食を摂食しストレスは特に加えない群; ストレス群: 60%の高脂肪食を摂食し寒冷水に肢を浸ける群、中性脂肪濃度は(mg/dL)で表記。

肝臓および骨格筋内の中性脂肪含量についても解析した。寒令水足ストレス負荷群が通常モデル群と比較して肝臓および骨格筋内の中性脂肪含量が有意に上昇していた。中性脂肪濃度と同様にストレス負荷の2群で、肥満遺伝子産物である血中レプチン濃度の変化の解析を行った所、血中のレプチンの上昇も認めた(図3)。レプチン濃度の上昇所見を以下に示す。また血液中的アディポネクチン濃度についても解析した。高脂肪食負荷でアディポネクチン濃度は有意に低下した。しかし通常モデル群、寒令水足ストレス負荷群の間では有意差は認めなかった。

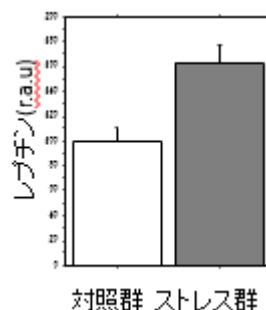


図3: ストレスによる血中のレプチンの変化について

対照群：60%の高脂肪食を摂食しストレスは特に加えない群；ストレス群：60%の高脂肪食を摂食し寒冷水に肢を浸ける群、レプチン濃度は対照群との相対値として(r.a.u)で表記。

臓器内の糖脂質代謝関連因子群の解析により、血液中の中性脂肪濃度とインスリン濃度の上昇と併せて肝臓および骨格筋内の中性脂肪含量の増加の知見が得られた。また白色脂肪内のレプチンの上昇を認めた。以上より高脂肪食とストレス負荷が、肥満や糖脂質異常につながりその関連因子としてレプチンが関与している可能性が示唆された。高脂肪食を摂取したときは、寒冷水足ストレス負荷の群で摂食量の増加とストレス性の過食と肥満症になる所見とまた寒冷水足ストレス負荷ストレス負荷の群では、血液中の肝臓中性脂肪含量の増加、中性脂肪濃度増加などメタボリック症候群様の所見を認めた。

次に通常モデル群、寒冷水足ストレス負荷群のマウスの各脳内視床下部における抽出した凍結サンプルより各神経因子の発現量を比較検討した。通常モデル群に比較して寒冷水足ストレス負荷群から視床下部内の NPY の上昇を認めた (図4)。

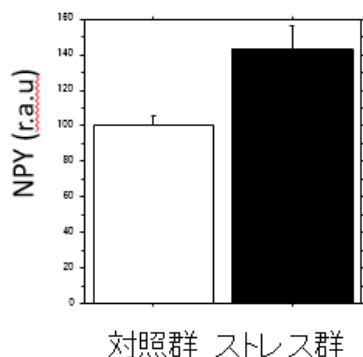


図4：ストレスによる視床下部の NPY の変化について

対照群：60%の高脂肪食を摂食しストレスは特に加えない群；ストレス群：60%の高脂肪食を摂食し寒冷水に肢を浸ける群、視床下部内 NPY 発現は WESTERN BLOTTING 法を用いて対照群との相対値として(r.a.u)で表記。

以上より高脂肪食とストレス負荷が、肥満や糖脂質異常につながりその関連因子の一つとして視床下部内の NPY が関与している可能性が示唆された。

#### 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 7 件)

Ando H, Gotoh K, Fujiwara K, Mitsutomi K, Shimasaki T, Itateyama E, Anai M, Chiba S, Masaki T, Seike M, Kakuma T, Shibata H. GLP-1 regulates beta-cell mass through brain-derived neurotrophic factor neurons in non-diabetic obese rats. Scientific Reports. 査読有 3:2017; 807-17. 10.1038/s41598-017-05371-4.

Gotoh K, Fujiwara K, Anai M, Okamoto M, Masaki T, Kakuma T, Shibata H. Role of spleen-derived IL-10 in prevention of systemic low-grade inflammation by obesity Endocr J. 査読有 64: 2017; 375-378. 10.1507/endocrj.EJ17-0060.

Fukui A, Ikebe-Ebata Y, Kondo H, Saito S, Aoki K, Fukunaga N, Shinohara T, Masaki T, Teshima Y, Takahashi N. Hyperleptinemia Exacerbates High-Fat Diet-Mediated Atrial Fibrosis and Fibrillation. J Cardiovasc Electrophysiol. 査読有 28:2017; 702-710. 10.1111/jce.13200.

Uemura K, Kondo H, Ishii Y, Kobukata M, Haraguchi M, Imamura T, Otsubo T,

Ikebe-Ebata Y, Abe I, Ayabe R, Saito S, Aoki K, Nagano-Torigoe Y, Akioka H, Shinohara T, Teshima Y, Masaki T, Yufu K, Nakagawa M, Takahashi N. Mast Cells Play an Important Role in the Pathogenesis of Hyperglycemia-induced Atrial Fibrillation. J Cardiovasc Electrophysiol. 査読有 27: 2016; 981-9. DOI: 10.1111/jce.12995

Aosa T, Chiba S, Kitamura H, Ina K, Tatsukawa S, Moriwaki C, Wei H, Gotoh K, Masaki T, Kakuma T, Shibata H, Fujikura Y. Pore alterations of the endothelial lining of rat fenestrated intestinal capillaries exposed to acute stress. Histol Histopathol. 査読有 31:2016;807-17. DOI: 10.14670/HH-11-716

Okamoto M, Okamoto M, Gotoh K, Masaki T, Ozeki Y, Ando H, Anai M, Sato A, Yoshida Y, Ueda S, Kakuma T, Shibata H. Fulminant type 1 diabetes mellitus with anti-programmed cell death-1 therapy. J Diabetes Investig. 査読有 7:2016; 915-918. DOI:10.1111/jdi.12531

Wei H, Chiba S, Moriwaki C, Kitamura H, Ina K, Aosa T, Tomonari K, Gotoh K, Masaki T, Katsuragi I, Noguchi H, Kakuma T, Hamaguchi K, Shimada T, Fujikura Y, Shibata H. A clinical approach to brown adipose tissue in the para-aortic area of the human thorax. PLoS One. 査読有 10:2015;e0122594. DOI:10.1371/journal.pone.0122594

正木孝幸、肥満における食行動異常、第 37 回日本肥満学会 10.9, 2016. 東京

正木孝幸、肥満症における神経ヒスタミンの病態生理、第 26 回日本病態生理学会シンポジウム、8.6, 2016. 金沢

正木孝幸、肥満症・糖尿病外科治療とインクレチン、第 34 回日本肥満症治療学会学術集会、7.1.2016.東京

正木孝幸、第 33 回日本肥満症治療学会学術集会ストップリバウンド/チーム医療としての取り組み、6.26.2015.千葉

正木孝幸、Metabolic Surgery の理論的根拠、第 33 回日本肥満症治療学会学術集会 6.26.2015.千葉

正木孝幸、肥満糖尿病と心身医療、第 54 回日本心身医学会九州地方会、1.24-25.2015.北九州

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

正木 孝幸 (TAKAYUKI Masaki)  
大分大学・医学部・講師  
研究者番号：00423715

### (2) 研究分担者

後藤 孔郎 (KORO gotoh)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：10457624

柴田 洋孝 (HIROTAKA shibata)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号：20245484

千葉 政一 (SEIICHI chiba)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号：20457633

加隈 哲也 (TETSUYA kakuma)  
大分大学・保健管理センター・准教授  
研究者番号：80343359