

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09426

研究課題名(和文) エネルギーバランスにおける報酬系GABABシステムの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the rewards GABAB system in energy balance

研究代表者

有馬 寛 (Arima, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50422770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的GABAB受容体ノックアウトマウスに高脂肪食を間欠投与すると、高脂肪食の摂取が野生型マウスより増加した。またGABAB受容体アゴニストであるバクロフェンを投与すると高脂肪食の過剰な摂取は抑制された。しかし、ドーパミンニューロンおよび線条体ニューロン特異的GABAB受容体ノックアウトマウスでは高脂肪食の過剰摂取の抑制は来さなかった。以上の結果よりドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロンのGABABシステムはエネルギーホメオスタシスの調節には関与しないが、報酬系の活性化を伴う高脂肪食の過剰な摂取を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Knockout mouse of GABAB receptors in the reward system consumed a more high fat diet than wild-type mice when they were given the food intermittently. There were no significant differences in body weight or glucose tolerance between genotypes, suggesting that GABAB receptors in the reward system is not involved in the regulation of energy homeostasis. Baclofen, a GABAB agonist, decreased the consumption of the high fat diet when given just before the high fat diet was presented in wild-type, but not in the knockout mice in the intermittent high fat die protocol. These data indicate that the GABAB neurons in the reward system plays an inhibitory role in the binge eating of a high fat diet.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：報酬系調節 肥満症

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は2型糖尿病、脂質異常症のみならず多くの慢性疾患の原因となっており世界的な健康問題であるにも関わらず、未だ効果的な解決策は見出せていない。中枢レベルで制御されている満腹感や報酬系の調節異常は過食をきたし2型糖尿病や肥満症の発症および増悪に繋がることが指摘されている。

摂食行動は視床下部や脳幹の神経ネットワークを軸としたホメオスタシス調節系と、中脳皮質辺縁系による報酬系によって制御される。

報酬系はニコチンやアルコール、あるいはモルヒネなどの薬物の依存症の病態に深く関与しており、薬物の摂取により中脳腹側被蓋野のドーパミンニューロンが活性化され、側坐核に分泌されたドーパミンが快楽を生じさせる。こうしたドーパミンニューロンの活性化は食事の摂取によっても生じるが、肥満状態では薬物依存症と同様にドーパミンニューロンによる調節機構に異常をきたしていることが報告されており2型糖尿病および肥満症治療の根幹をなす食事療法に影響を及ぼしていると考えられている。しかし、詳細な機序および治療方法については未解明のままである。

中脳腹側被蓋野や側坐核に発現するGABA<sub>B</sub>受容体シグナルはドーパミンニューロンの活性を抑制することが報告されており、GABA<sub>B</sub>受容体アゴニストであるバクロフェンはニコチンやアルコール、あるいはモルヒネなどの薬物の依存症の治療に有効であることが動物実験や臨床試験で示されている。

我々は視床下部におけるGABA<sub>B</sub>システムが、摂食亢進作用を有するNPYニューロンの活性を抑制する一方で、食欲抑制作用を有するPOMCニューロンの活性を増強することを明らかにした(Sato I et al., 2008 FEBS Lett, Ito Y et al., 2013 J Neurosci)。またバクロフェンが抗肥満作用を示すことを肥満マウス用いた動物実験(Sato I et al., 2008 FEBS Lett)および肥満患者の臨床試験(Arima et al., 2010 Intern Med)で明らかにした。一方で、臨床試験ではバクロフェンは肥満患者の間食欲求を抑制しており、バクロフェンの抗肥満作用が報酬系のGABA<sub>B</sub>受容体を介している可能性が考えられる。しかしながら、これまでに報酬系特異的なGABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウスの報告はなく、報酬系のGABA<sub>B</sub>システムがエネルギーバランスに及ぼす影響は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究ではCre-loxPシステムを用いて報酬系で重要とされるドーパミンニューロンもしくは側坐核特異的にGABA<sub>B</sub>受容体を欠損させたマウスを作成し、報酬系のGABA<sub>B</sub>

受容体を介したシグナルが摂食行動に及ぼす影響を明らかにし、エネルギーバランスにおける役割について検討する。

## 3. 研究の方法

GABA<sub>B</sub>受容体をloxP配列ではさんだノックインマウス(GABA<sub>B</sub> fl/fl マウス)をドーパミンニューロン特異的にCreが発現するDopamine transporter (DAT)-Creマウス(Bäckman CM et al., 2006 Genesis)あるいは側坐核を含む線条体ニューロン特異的にCreを発現するGPR88-Creマウス(Hisatsune C et al., 2013 Transgenic Res)とそれぞれ交配しドーパミンニューロン特異的GABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウス(GBR fl/fl DAT Cre)あるいは線条体ニューロン特異的GABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウス(GBR fl/fl GPR88 Cre)を作成した。普通食または高脂肪食を野生型マウスおよびGABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウスのホモ接合型に投与し体重、内臓脂肪重量、血糖値、摂餌量および飼料効率を比較検討した。

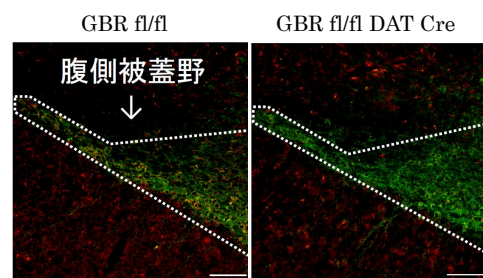
報酬系を評価する目的で野生型マウスおよびGABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウスに高脂肪食の間欠投与(1日2時間のみ普通食と高脂肪食の両方を自由に選択して摂取でき、残りの22時間は普通食のみを摂取する)を行った。また投与開始30分前にバクロフェンを腹腔内投与して投与後の摂食量を測定し野生型マウスおよびGABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウス間で比較検討した。

## 4. 研究成果

### ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的GABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウスにおけるエネルギーバランスの検討

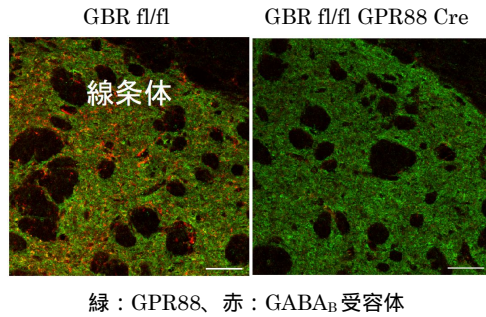
GABA<sub>B</sub>受容体遺伝子特異的なプライマーを用いたPCR法にて、ドーパミンニューロン特異的GABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウスでは腹側被蓋野において、線条体ニューロン特異的GABA<sub>B</sub>受容体ノックアウトマウスでは線条体において特異的loxP配列の組み換えを確認した。またノックアウトマウスと野生型マウスから腹側被蓋野あるいは線条体を含む脳切片を作成し、GABA<sub>B</sub>受容体の発現をノックアウトマウスと野生型マウスで組織学的手法により比較検討し、腹側被蓋野あるいは線条体特異的にGABA<sub>B</sub>受容体が欠損していることについても確認した(図1、図2)。

図1



緑：DAT、赤：GABA<sub>B</sub>受容体

図 2



### ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスにおけるエネルギーバランスの検討

高脂肪食を野生型マウスおよび GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスのホモ接合型に離乳時の 3 週齢より 13 週間投与したが、野生型マウスと GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスに有意な体重差は認めなかった (図 3)。また 16 週齢での内臓脂肪重量および血糖値においても両群間で有意な差を認めなかった。普通食においても同様の結果を認めた。高脂肪食投与下 8 週齢における摂餌量および飼料効率においても両群間で有意な差を認めなかった。

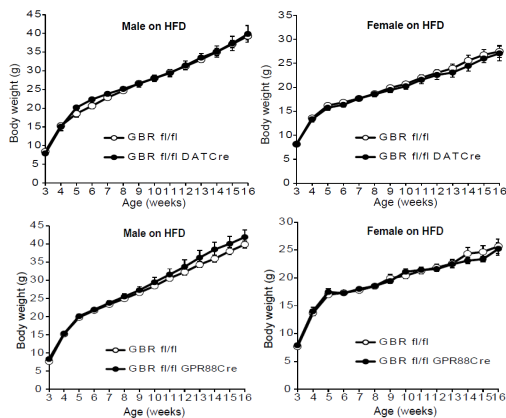


図 3. 高脂肪食投与下での GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスと野生型マウスの体重変化

### 高脂肪食の間欠投与モデルの確立

次に高脂肪食への報酬を評価する目的で、雄の野生型マウスに高脂肪食の間欠投与 (1 日 2 時間のみ普通食と高脂肪食の両方を自由に選択して摂取でき、残りの 22 時間は普通食のみを摂取する) を行い、高脂肪食を 24 時間慢性的に投与したマウスと比較検討を行った。間欠投与したマウスでは慢性投与マウスと比較して短時間での高脂肪食摂取量が有意に増加した (図 4)。また間欠投与モデルでは 2 時間にもかかわらず 1 日の総摂取カロリーの 6 割以上を高脂肪食より摂取し、繰り返すと漸増した (図 5)。一方で高脂肪食間

欠投与マウスは有意な体重増加を来さなかった (図 6)。雌の野生型マウスでも同様の結果を認めた。

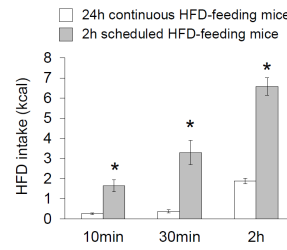


図 4. 高脂肪食間欠投与マウスと慢性投与マウスにおける摂取量

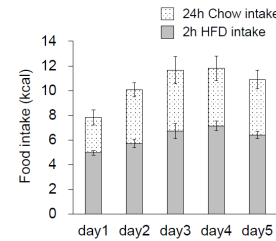


図 5. 高脂肪食間欠投与マウスにおける 1 日の高脂肪食および普通食の摂取カロリー

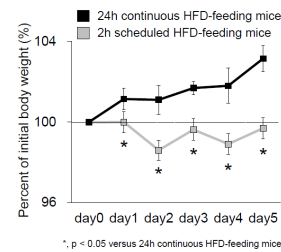


図 6. 高脂肪食間欠投与マウスと慢性投与マウスにおける体重経過

### ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスにおける高脂肪食間欠投与モデルの検討

GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスのホモ接合型に高脂肪食の間欠投与を行い野生型マウスと比較したところ、雌雄ともに線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスにおいて 2 時間における高脂肪食の摂取量が有意に増加した (図 7)。一方、ドーパミンニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスにおいては有意な増加を認めなかった。

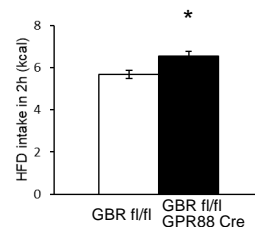


図 7. 間欠投与における雄の線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスの高脂肪食摂取量



## 高脂肪食の間欠投与モデルにおけるバクロフェンの効果

雄の野生型マウスにおいて、高脂肪食の間欠投与開始 30 分前にバクロフェン 3mg/kg 体重を腹腔内投与したところ、高脂肪食摂取量が有意に減少し、普通食摂取量には影響を与えなかった(図 8)。雌の野生型マウスにおいても同様の結果を認めた。

一方、ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスにおいて同様の検討を行ったところバクロフェンによる効果は消失した(図 9、図 10)。雌のノックアウトマウスにおいても同様の結果を認めた。

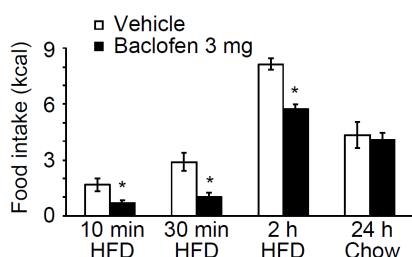


図 8. 高脂肪食の間欠投与モデルにおけるバクロフェンの効果

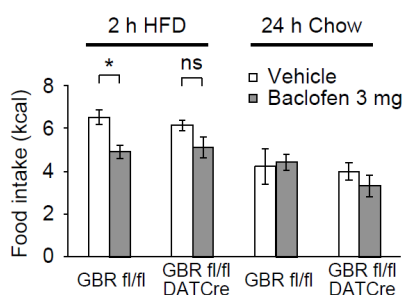


図 9. ドーパミンニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスにおけるバクロフェンの効果

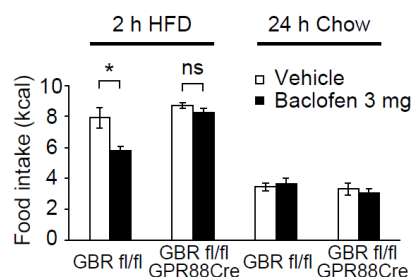


図 10. 線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスにおけるバクロフェンの効果

ドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスに普通食あるいは高脂肪食を慢性投与しても体重、内臓脂肪重量、血糖値、摂餌量および飼料効率に有意な差を認めなかった。

一方で高脂肪食を間欠投与すると、中脳腹側被蓋野のドーパミンニューロンが活性化し線条体ニューロンに作用し高脂肪食の過剰な摂取を引き起こすとされているが、線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスでは高脂肪食の摂取がさらに増加した。

また GABA<sub>B</sub> 受容体アゴニストであるバクロフェンを投与すると高脂肪食の過剰な摂取は抑制された。しかし、ドーパミンニューロンおよび線条体ニューロン特異的 GABA<sub>B</sub> 受容体ノックアウトマウスでは高脂肪食の過剰摂取の抑制は来さなかった。

以上の結果よりドーパミンニューロンあるいは線条体ニューロンの GABA<sub>B</sub> システムはエネルギーホメオスタシスの調節には関与しないが、報酬系の活性化を伴う高脂肪食の過剰な摂取を抑制する可能性が示唆された。この結果はバクロフェンが肥満患者の間食欲求の低下を来したメカニズムの一部を説明すると考えられる。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 恒川 卓、坂野 僚一、溝口 暁、杉山 摩利子、富永 隆史、尾上 剛史、伊藤 禎浩、後藤 資実、有馬 寛、線条体ニューロンにおける GABA<sub>B</sub> 受容体シグナルは高脂肪食に対する Binge like eating を抑制する、第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017 年 4 月 21 日、ロームシアター京都(京都府京都市)

2. 恒川 卓、坂野 僚一、滝 啓吾、溝口 暁、杉山 摩利子、高木 博史、伊藤 禎浩、有馬 寛、Baclofen はドーパミンニューロンにおける GABA<sub>B</sub> 受容体を介して高脂肪食の摂取を抑制する、第 38 回日本肥満学会、2017 年 10 月 8 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

3. 恒川 卓、坂野 僚一、滝 啓吾、溝口 暁、杉山 摩利子、高木 博史、伊藤 禎浩、有馬 寛、Baclofen は中脳辺縁系ニューロンの GABA<sub>B</sub> 受容体を介して高脂肪食の摂取を抑制する、第 44 回日本神経内分泌学会、2017 年 10 月 21 日、北里大学医学部(神奈川県相模原市)

4. Tsunekawa T, Banno R, Sugiyama M, Taki K, Mizoguchi A, Takagi H, Ito Y, Arima H. Baclofen suppresses food intake during scheduled feeding on a high fat diet in mice. Obesity Week 2017, 2017 年 11 月 1 日、ワシントン(米国)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有馬 寛 (ARIMA HIROSHI)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：50422770

### (2) 研究分担者

坂野 僚一 (BANNO RYOICHI)  
名古屋大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：80597865

後藤 資実 (GOTO MOTOMITSU)  
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号：00621632