

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10462

研究課題名(和文)肥満外科手術マウスを用いた減量効果における視床下部NPYシステムの解析

研究課題名(英文)The role of hypothalamus Neuropeptide Y system in metabolic effect after sleeve gastrectomy.

研究代表者

金高 賢悟 (KANETAKA, Kengo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：10549570

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)：世界的に肥満人口は増加傾向となっており、今後、さらなる公衆衛生上の問題となることが予想される。日本においても有効な肥満症治療として外科手術が保険として認められた。今後、肥満症に対するよりよい治療の開発にはそのメカニズムの解明が重要であると考え、摂食中枢である視床下部にて食欲の調整に關与するNPY系に着目し、そのノックアウトマウスを用いた実験を行った。視床下部NPY系の発現のないマウスと野生型のマウスにそれぞれ肥満外科手術を行い、術後の摂食量の変化、体重の変化を検討したが、長期生存をなかなか得られず、検討が困難であったが、長期生存例の検討ではNPYと体重変化、摂食量の関係は明らかでなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満症手術を受けたマウスは食嗜好の変化を来すことが知られている。同様な現象はヒトでも経験される場所であり、肥満手術は中枢神経系も關与することが示唆されるが、その機序は不明である。NPY系は視床下部に存在し、カロリー摂取制限による生存寿命の延長や腫瘍発生の抑制に關与することが、マウスの系によって報告されている。肥満外科手術におけるNPY系の解明を行うことで、手術を行うことなく食欲を調整する治療法の開発を目指したが、今回の検討では手術手技が安定せず、明確な結果を得ることが出来なかった。しかし消化管と脳のネットワークが注目される昨今、肥満外科手術と視床下部の關連の研究は今後も重要な問題である。

研究成果の概要(英文)：Morbid obesity has been one of the important issues on public health. Its population has increasing worldwide and we can see same tendency in Japan. Metabolic surgery such as laparoscopic sleeve gastrectomy was introduced into Japan and this procedure has been standard option to cure patients with morbid obesity. However, the crucial mechanism of this kind of operation remains to be elucidated. Appetite is known to be controlled in hypothalamus which is involved in brain-gut circuit. Neuropeptide Y, NPY plays very important role in brain-gut circuit, and it seems to be key factor of the effect of sleeve gastrectomy. We conducted the animal experiment using NPY knock-out mice in order to elucidate the role of NPY. However, we could not obtain definitive result because we could not establish long-survival models after sleeve gastrectomy.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肥満外科手術 視床下部

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

病的肥満症は糖尿病や高血圧症などの生活習慣病を随伴することが多く、世界的に大きな問題となっている。日本においても肥満人口は増加傾向となっており、今後、さらなる公衆衛生上の問題となるとともに、その治療にかかる国民医療費は増加することが予想される(平成 22 年国民健康・栄養調査)。

すでに欧米では内科的な治療に抵抗の病的肥満症に対する肥満外科手術の効果が認められており、特にアメリカでは年間 2 万人以上が手術を行われている。一方、日本においては、2014 年 4 月に中等度肥満症(BMI35kg/m<sup>2</sup>)以上の糖尿病などを伴った病的肥満症に対して腹腔鏡下スリーブ状胃切除術がようやく保険収載され、今後手術症例数の増加が見込まれる。

すでに報告されている大規模な臨床研究の結果では、肥満症外科治療を行うことで、内科的治療に比較して持続的な体重減少効果が認められるだけでなく、興味深いことに手術症例における生存期間の延長と癌の発生率の低下が報告されており(Sjostrom L, NEJM, 2007)、肥満外科手術の効果は単に体重減少効果や糖尿病改善などにとどまらない可能性がある。

種々の肥満症手術が糖尿病や高血圧症を改善していく機序については現在までに Ghrelin や GLP-1 などの消化管由来ホルモンや、腸管内細菌叢の変化、血中胆汁酸などがその因子であると考察されている(Peterli R, Obes Surg, 2012)。

### 2. 研究の目的

肥満の一つの原因となる人の摂食行動には、単純に摂食量の増加というカロリー摂取過剰という一義的な問題だけでなく、消化管-中枢神経系の連関が関与していると考えられるが、その全容はまだ不明である。

一方で、肥満症手術を受けたマウスは食嗜好の変化を来すことが知られている。同様な現象はヒトでも経験されるところであり、肥満手術は中枢神経系も関与することが示唆されるが、その機序は不明である。Neuropeptide Y 系は視床下部に存在し、カロリー摂取制限による生存寿命の延長や、腫瘍発生の抑制に関与することが、マウスの系によって報告されている(Chiba E, Sci Rep, 2014)。またヒトにおいては、消化管より分泌される neuropeptide Y 受容体 agonist である peptide YY (PYY) 投与によって、食欲の減衰や食事摂取の減少が引き起こされることが知られている(Batterham RL, Nature, 2002)。

そこで、マウス肥満症手術モデルを作製し、特にカロリー制限モデルにて解析が進んでいる Neuropeptide Y 系との関連を中心に解析を行うことで、肥満外科手術の減量効果における視床下部などの中枢神経系の役割を明らかとする。

現在、肥満症手術のメカニズムは消化器を中心に解析が進んでおり、中枢神経系に関する解析はほとんど行われていないのが現状である。今後日本でも増加して病的肥満症と、それに対する治療効果を考える上で、現在もっとも有効な治療の一つである肥満外科治療による減量効果、生存延長効果、癌抑制効果のメカニズムを解明することは、当該分野を今後さらに発展させ、将来的に中枢神経系をターゲットとした治療法を開発する上で、必要不可欠であると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### 対象

対象は野生型マウス、および遺伝学的に neuropeptide Y を欠損したマウス(NPY<sup>-/-</sup>)マウスを対象に行った。マウスに対する動物実験に関しては、当大学医学部敷地内に動物実験施設を有しており、Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に沿った条件にて行った。

#### (1)

手技の修得のために、肥満外科手術の動物実験にて先進施設である大分大学へ見学に伺った。大分大学ではマウスではなくラットに対するスリーブ状胃切除術のモデルを確立していたため、その手技を参考としてマウスモデルを作成することとした。

#### (2)

NPY<sup>-/-</sup>マウスは長崎大学病理学教室より供与いただき、これを交配し野生型マウス(NPY<sup>+/+</sup>)、ヘテロマウス(NPY<sup>+/-</sup>)とともに育成した。育成には兄弟交配を避けヘテロマウス同士の交配を行うこととした。Genotype の確認として、それぞれの尾組織より NucleoSpin Tissue kit を用いて DNA を抽出し、PCR 法を行った。PCR には 3 種のプライマーセット(GAGCGGCAGTGGCTCCAG, CACTGGCGTCTGGGAGCC, GCAACTGTTGGGAAGGCGG)を用いた。

#### (3)

遺伝子非操作マウスを用いて、スリーブ状胃切除術のモデルの作成を行った。モデルは クリップ、縫合閉鎖、クリップ+縫合閉鎖 という 3 通りでの方法にて作成し長期の生存が得られた手術方法を当該マウスにて検討することとした。

#### (4)

繁殖したそれぞれのマウスに対して High fat diet (HFD, D12331 diet, 58% calories from fat, Research Diet Inc.) を 12 週間投与した。体重増加を観察しつつ、手術時期まで飼育を継続した。全身麻酔下のスリーブ状胃切除術を行い、術後の摂食量および体重減少割合を観察した。

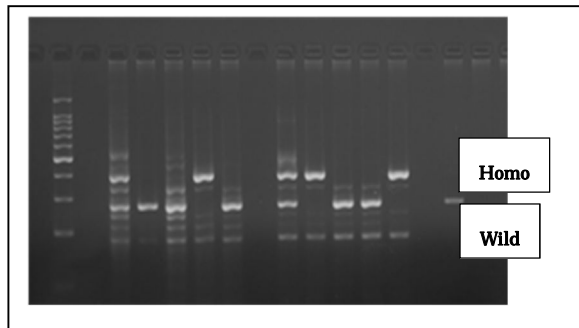
#### (5)

体重減少効果、血糖値減少効果とともに、Ghrelin や GLP-1 などの消化管ホルモンの測定、組織学的な検索を目的とした消化管粘膜の採取を行う。

#### 4. 研究成果

(1)

ヘテロマウス(NPY+/-)の交配にて 213 頭の F1 および F2 マウスを得た。それぞれより DNA を抽出しゲノタイプを確認した。代表的な PCR の結果を示す。結果として、ホモマウス(NPY-/-)23 頭、ヘテロマウス(NPY+/-)106 頭、野生型マウス(NPY+/+)84 頭を得た。

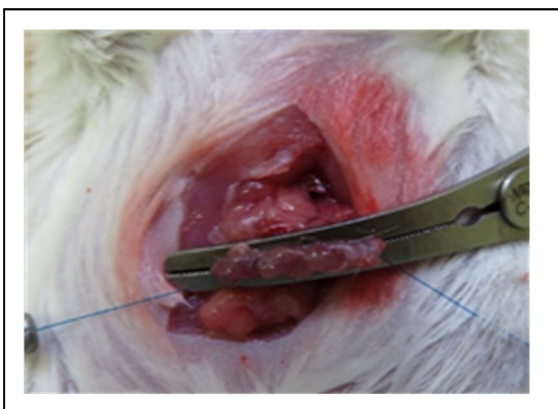


(2)

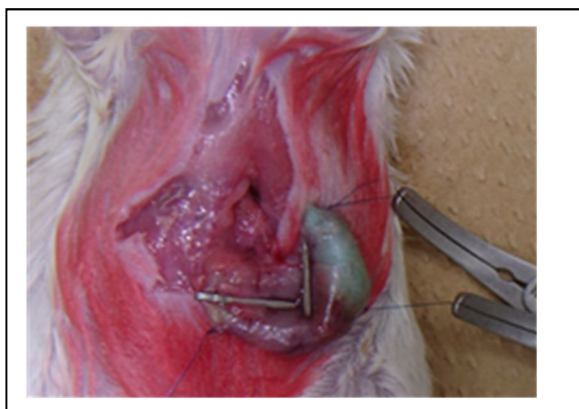
遺伝子非改変マウスを用いてスリーブ状胃切除モデルを作成した。手術は全身麻酔を行った後にルーペ下にて行った。各群 3~5 頭を用いて検討したが、いずれの術式においても術後 1~3 日目に死亡した。死亡後の検索では縫合不全などは起こっていなかったため、最終的には脱水が原因と判断し閉腹時に 5%ブドウ糖液 30ml を腹腔内に注入することとした。



モデル 結紮によるスリーブ状胃切除

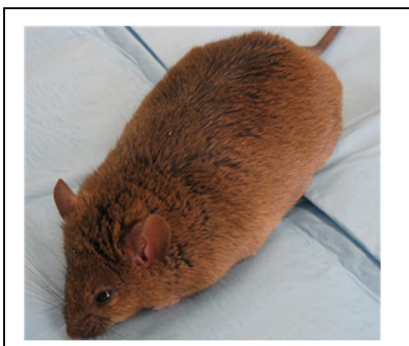


モデル クリップを用いたスリーブ状胃切除

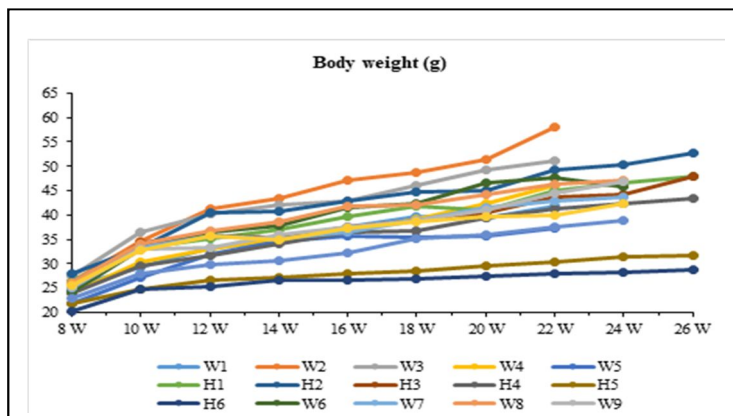


(3) NPY 遺伝子改変マウスを用いたスリーブ状胃切除術

繁殖したホモマウス、野生型マウスに高脂肪食を与え、体重の増加を観察したところ、それぞれのマウスにて体重の増加に差は見られず、NPY 遺伝子発現の有無と体重増加に関連はないものと思われた(H:ホモマウス、W:野生型マウス)。



NPY 遺伝子改変マウス



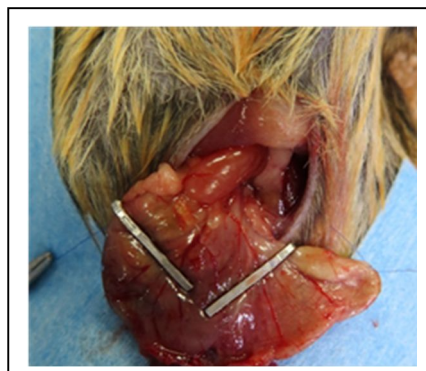
ホモマウス(NPY-/-), コントロールとして野生型マウス(NPY+/+), それぞれの群 5 頭にてスリーブ状胃切除術を行った。

術後 1 日目より経口摂取を再開とし、毎日摂食量および体重減少の確認を予定した。

しかし術後 7 日目までにそれぞれ 4 頭を失ったため、最終的な長期観察が出来たものはそれぞれ

れ1頭ずつとなっていました。

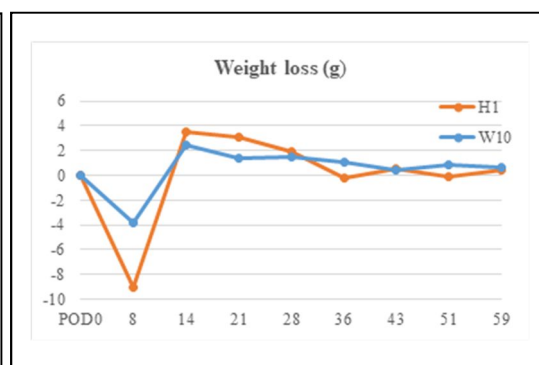
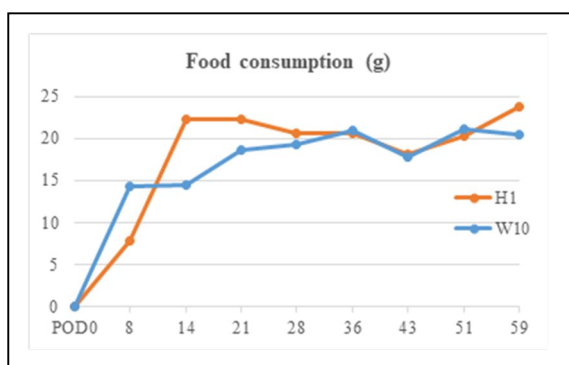
実際の手術は、麻酔に時間をかけず、手術侵襲を小さくする目的にて手技の簡便なクリップを用いたスリーブ状胃切除術を施行した。



今回、長期生存したマウスの検討では、NPY ホモマウス(NPY-/-)において術後1週間における摂食量の減少および体重の減少が示されたが、この差は1週間後は認められなくなった。

術後摂食量の変化 (H: ホモ、:野生型)

術後体重の変化 (H: ホモ、 W:野生型)



### 結論

多頭での観察が不可であったためスリーブ状胃切除術後の効果に対する視床下部 NPY 遺伝子発現の影響を検討することが不可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 金高 賢悟、江口 晋	4. 巻 436
2. 論文標題 肥満症と視床下部とくにNeuropeptideYの作用について	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 463-465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	江口 晋 (EGUCHI Susumu) (80404218)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授  (17301)	
研究分担者	小林 慎一郎 (KOBAYASHI Shinichiro) (80623363)	長崎大学・病院・助教  (17301)	