

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K13050

研究課題名(和文) 脳内ドーパミン神経の脱落により生じる低体重の機序解明

研究課題名(英文) Study on the low body weight in young adult rats with neonatal dopamine depletion

研究代表者

石橋 仁 (Ishibashi, Hitoshi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：50311874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病は、高齢者に頻発する疾患で、脳内ドーパミン神経の脱落によって発症する。これまで、手や足が思い通りに動かないなどの運動障害に関しては多くの研究がなされ、ドーパミン不足による大脳基底核神経回路の機能変調が運動障害の原因であることがわかっている。しかし、パーキンソン病の運動以外の症状に関しては研究がほとんど進んでいない。本研究では、ドーパミン欠損モデルラットを用い、ドーパミン欠損により低体重となる機序を解明することを目的に研究を遂行し、低炭水化物食(ケトン食)を与えることによって低体重を改善することができることを発見した。今後、このメカニズムを解明する研究を遂行する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適切なモデル動物の開発は疾病の原因解明を急速に進めることが知られている。本研究で用いたモデル動物は、遺伝子改変動物ではなく、純粋に脳内ドーパミン神経だけを脱落したものであり、今後本モデル動物を用いて、脳内ドーパミンの機能のさらなる解明を続けることにより、今後の高齢者の健康およびQOL改善に貢献する知見が得られると考えられる。また、本研究で発見した、低炭水化物食の低体重改善作用は、未だそのメカニズムは解明できていないものの、今後研究を継続することによりパーキンソン病における低体重改善への新たな治療法の開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The dopaminergic neural system plays a crucial role in motor regulation as well as regulation of anxiety-related behaviors. Although rats with neonatal dopamine depletion exhibit motor hyperactivity and have been utilized as animal models of attention deficit hyperactivity disorder, characterization of their behavior is still lacking. Recently, we found that the body weight was lower in the dopamine-deficient mice than in normal mice. In the present study, therefore, we studied the characteristics of neonatal dopamine-depletion rats. Chronic administration using mini-osmotic pumps of various hormones including growth hormone, thyroxine and ghrelin did not significantly affects body weight of both control and dopamine-deficient mice. On the other hand, a low-carbohydrate, ketogenic diet improved the reduced body weight of dopamine-deficient rats. Further studied are needed to reveal the mechanism of action of low-carbohydrate diet.

研究分野：生理学

キーワード：生理学 神経科学 脳・神経 環境生理学 ドーパミン欠損

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢者、特にパーキンソン病などの神経疾患を有する患者では、悪性腫瘍などの疾患がないにも関わらず、食欲不振となり、その結果として体重減少、さらには低栄養状態に陥る場合が少なくない。これまで高齢者の食欲不振や低体重・低栄養状態をきたす原因としてはさまざまな要因が考えられており、小腸の絨毛の退化による栄養吸収能力の低下や、消化管の運動機能が低下することにより摂取した食物を物理的に処理出来ない可能性などが示唆されている¹⁾。

パーキンソン病は、高齢になると発病率が増加する疾病で、脳内ドーパミン神経の脱落によって発症する。これまで、手や足が思い通りに動かないなどの運動障害に関しては多くの研究がなされ、ドーパミン不足による大脳基底核神経回路の機能変調が運動障害の原因であることがわかっている²⁾。しかし、パーキンソン病の運動以外の症状に関しては研究がほとんど進んでいない。例えば、パーキンソン病患者の多くが便秘に悩み、また、多くの患者は体重が減少し、場合によっては数ヶ月で 10 kg も減少することがあるが、なぜこのような急激な体重減少が生じるのかも明らかになっていない³⁾。急激な体重減少は低栄養からサルコペニア(筋肉量低下)に進行するので、患者の QOL を考えると、パーキンソン病における体重減少は早急に解決すべき問題である。

研究代表者は、最近、脳内ドーパミン神経を脱落させたラットが低体重になることを見出した。これまでの予備実験で、このラットは、胃には正常ラットと同様に食塊が含まれているものの、腸に含まれる食塊・便が少なく排便量も少ないことから、胃腸の運動機能の低下が起こって低体重となっているのではないかと考えている。しかし、脳内ドーパミン神経の脱落が消化管機能に与える影響や、体重減少のメカニズムは全く不明である。

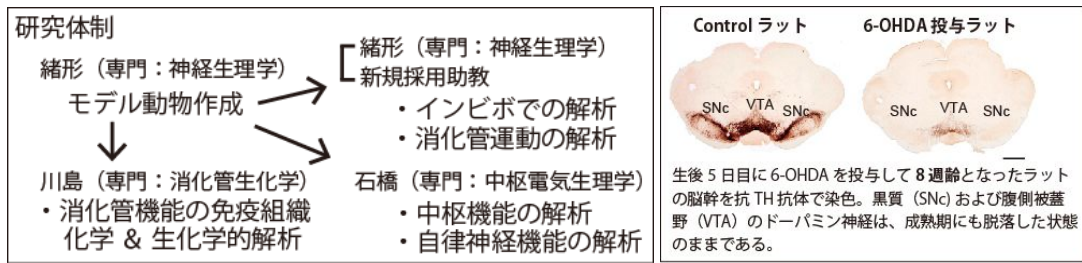
2. 研究の目的

本研究では、脳内ドーパミン神経を脱落させたラットを用い、ドーパミン神経の脱落が胃腸機能に与える影響を明らかにするとともに、体重減少のメカニズムを解明する。

本研究の成功は、パーキンソン病患者の体重減少に対する新たな治療法の開発につながるだけでなく、脳 - 腸連関に関する新たなメカニズムの解明にもつながると考えており、内分泌学、神経内科、病態生理や神経科学の分野にも有益な情報となり、高齢者の健康および QOL 改善にも貢献すると確信している。

3. 研究の方法

1 週齢以上のラットの脳内に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を投与すると致死性であるため、生後 5 日目以内に 6-OHDA を脳内に投与し、脳内ドーパミン神経を傷害した。なお、6-OHDA の投与にあたってはあらかじめ、デシプラミンを投与してノルアドレナリン神経系を保護した。このようにして作成したモデルラットは、成長後にドーパミン神経が脱落しているにもかかわらず、パーキンソン病の様な運動症状は示さなかった。なお、実験に使用したすべての動物は、すべての実験終了後、免疫染色により脳内ドーパミン神経の脱落程度を確認した。



成熟後に左右両方の大脳半球のドーパミン神経を同時に傷害するとラットやマウスは死に至る。そのため、パーキンソン病モデルとして、片側大脳半球のドーパミン神経を脱落させたモデルが用いられているが⁴⁾、片側半球のドーパミン神経の脱落だけでは運動障害は起こるものの体重減少はほとんど起こらない。また、遺伝子改変によるパーキンソン病モデル動物も存在するが、遺伝子改変自体の影響が胃腸にも現れる可能性があり⁵⁾、純粋に脳内ドーパミン神経の脱落だけの影響によって体重減少が生じるモデル動物は本研究のモデル動物だけである。

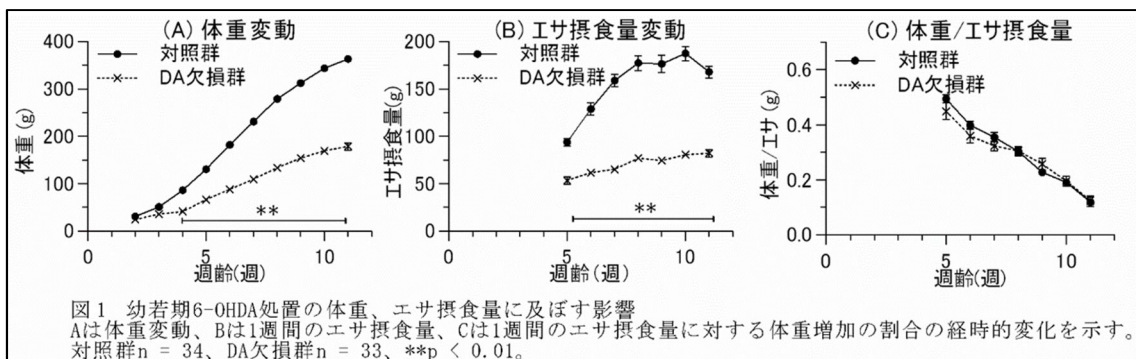
4. 研究成果

(1) 体重、エサ摂食量に及ぼす影響

生後 2 週 ~ 11 週における 1 週間ごとの対照群とドーパミン欠損群 (DA 欠損群) の体重変動を比較した。対照群とドーパミン欠損群ともに時間の経過に伴い体重の顕著な増加が認められた (図 1A ; 2-way ANOVA、 $p < 0.01$)。2 群間で比較すると、4 ~ 11 週において有意な減少がドーパミン欠損群で認められた (図 1A ; Bonferroni の多重比較、 $p < 0.01$)。

生後 5 週 ~ 11 週における 1 週間ごとの対照群とドーパミン欠損群のエサ摂食量を比較した。対照群とドーパミン欠損群ともに時間の経過に伴いエサ摂食量の顕著な増加が認められた (図 1B ; 2-way ANOVA、 $p < 0.01$)。2 群間で比較すると、5 週 ~ 11 週のいずれも有意な減少がドーパミン欠損群で認められた (図 1B ; Bonferroni の多重比較、 $p < 0.01$)。

生後 5 週 ~ 11 週における 1 週間ごとの対照群とドーパミン欠損群のエサ摂食量に対する体重増加の割合を比較した。対照群とドーパミン欠損群ともに時間の経過に伴いエサ摂食量に対する体重増加の割合は有意な減少を認めた (図 1C ; 2-way ANOVA、 $p < 0.01$)。2 群間で比較すると 5 週 ~ 11 週のいずれも有意な差が認められなかった。



(2) マイクロ浸透圧ポンプを用いた検討

生後7週目から浸透圧ポンプによる各種ホルモンの持続的投与を行い、低体重改善を試みた。はじめに、溶媒による影響がないことを確認するために溶媒のみを含んだポンプ処置を行い体重、エサ摂食量、エサ摂食量に対する体重増加の割合を調べた。その結果、DA欠損群で体重並びにエサ摂食量の有意な減少が確認された。また、エサ摂食量に対する体重増加の割合は2群間で有意な違いは認められなかった。これらの結果は溶媒による影響がないことを示している。次に、甲状腺ホルモン(T4)、成長ホルモン(GH)、グレリンの効果について検討した。その結果、3つのホルモン全てにおいて有意な効果は認められなかった。

今回、各種ホルモンの低体重改善効果が現れなかった。思春期にGHが欠乏していると短身長、骨成熟の遅延を示す小人症を生じる。GH補充により成長速度が増加する報告があることより、本実験でGHを投与した。GHの軟骨末端への作用には直接作用と間接作用がある。GHが直接、軟骨の形成速度を亢進させるとともに、間接作用としてより強く軟骨の成長促進にはたらくインスリン様成長因子-1の肝臓からの分泌を促進している。骨の形成は骨芽細胞によってヒドロキシアパタイトが構造蛋白質であるコラーゲンに沈着することによっておこる⁶⁾。GHが作用しても成長するために必要なカルシウム、リン、コラーゲンがなければ骨の形成が行われず、体重増加が促進しない。今後、これらの栄養素の体内量も確認する必要がある。

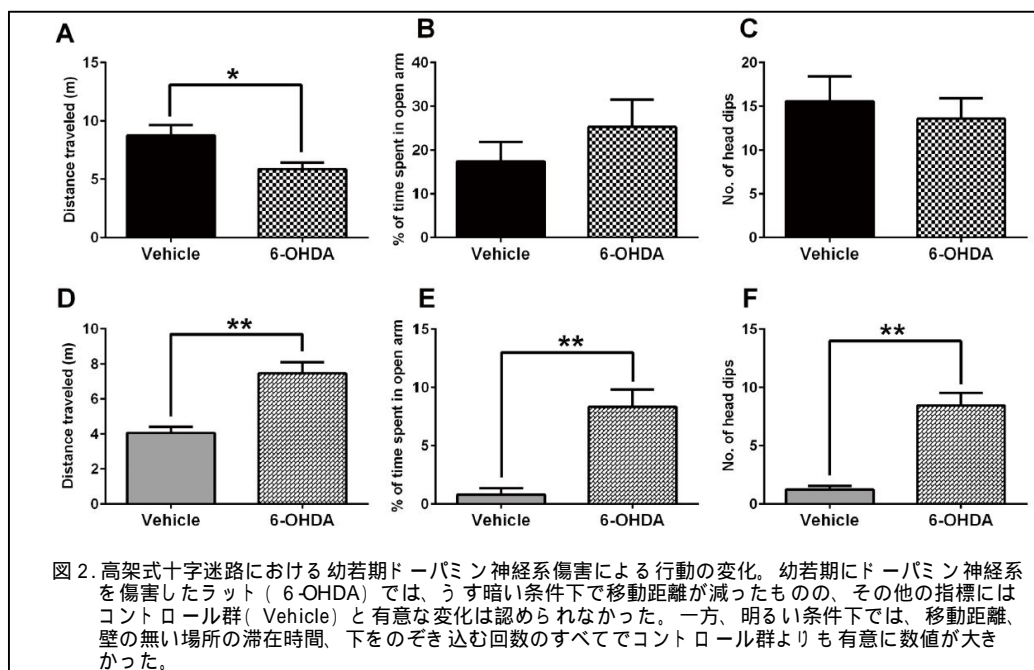
グレリンはGH分泌刺激作用や視床下部の弓状核にある摂食促進ペプチドのニューロペプチドY(NPY)やアグーチ関連ペプチド(AgRP)神経細胞を活性化することで摂食行動を促進させる⁶⁾。しかし、今回の結果ではグレリンによる低体重改善効果は認められなかった。その要因としてホルモンが弓状核に作用してもDA欠損によってNPYやAgRP神経細胞のグレリン受容体、またはさらに上位の中樞の神経細胞の機能低下のため、体重増加が促進しなかった可能性がある。

低体重の背景には摂食行動の低下があり、また腹側被蓋野のドーパミン神経細胞が摂食行動に関与していることや、血糖値が摂食行動発現に影響を及ぼすことが明らかになった。このことから体重と血糖値および腹側被蓋野のTH陽性細胞数との相関を調べた。しかし、それらの間には相関は見られず、腹側被蓋野のTH陽性細胞数や血糖値の本実験内での変動では体重変化に直接影響を及ぼさないと考えられる。

以上の結果より、幼若期ドーパミン神経系傷害は低体重を引き起こし、その背景にエサの摂食量の低下と低血糖があることが明らかとなった。さらに視床下部のドーパミン神経細胞の脱落がその低体重の直接的要因ではなく、腹側被蓋野あるいは黒質のドーパミン神経細胞の脱落の関与が考えられる。今後、摂食行動やエサの摂食量の増加を誘発する手段を検討し、それらが低体重改善に繋がるか調べていく必要がある。さらに今回、各種ホルモンによる効果が認められなかったが、今後、ホルモン投与時期を低体重発現前から行うことやホルモンの血中濃度を確認することなどの検討が必要である。

(3) 行動科学的検討

低体重の背景に摂食行動の低下がある可能性が示唆されたことから、幼若期ドーパミン神経系の傷害によって行動が変化するか否か検討を行った。高架式十字迷路を用いた実験結果を図2に示す。



ラットの活動期である夜の状態を再現した結果では(図2 A~C)、ドーパミン欠損群で、移動距離の低下がみられた。一方、ラットの睡眠期にあたる昼の条件下では、コントロール群に比べ、ドーパミン欠損群では行動量、オープンアーム滞在時間、下をのぞき込む回数が著明に増え、あたかも不安を感じていない様な行動をとることがわかった。従って、低体重の背景にも脳内の神経活動の状態が影響していると考えられた。

神経活動に炭水化物を制限したケトン食が影響を与えるということが言われるようになっており、本研究でもケトン食の効果を検討したところ、7週齢から体重が増加する傾向がみられた。ケトン食の効果およびそのメカニズムは今後の検討課題として残されたままとなっているので、今後さらに研究を継続していきたいと考えている。

<引用文献>

- Soenen S, Chapman IM. Body weight, anorexia, and undernutrition in older people. *J Am Med Dir Assoc.*, 14: 642-648, 2013.
- Grothe C, Timmer M. The physiological and pharmacological role of basic fibroblast growth factor in the dopaminergic nigrostriatal system. *Brain Res Rev.*, 54: 80-91, 2007.
- Cloud LJ, Greene JG. Gastrointestinal features of Parkinson's disease *Curr Neurol Neurosci Rep.*, 11: 379-384, 2011.
- Ganz J, Arie I, Buch S, Zur TB, Barhum Y, Pour S, Araidy S, Pitaru S, Offen D. Dopaminergic-like neurons derived from oral mucosa stem cells by developmental cues improve symptoms in the hemi-parkinsonian rat model. *PLoS One.* 9: e100445, 2014.
- Bichler Z, Lim HC, Zeng L, Tan EK. Non-motor and motor features in LRRK2 transgenic mice. *PLoS One.* 8: e70249, 2013.
- 中里雅光、肥満の科学、「胃から発見された摂食亢進ペプチド：グレリン」第124回日本医学会シンポジウム記録集, 45-52, 2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogata M, Akita H, Ishibashi H.	4. 巻 204
2. 論文標題 Behavioral responses to anxiogenic tasks in young adult rats with neonatal dopamine depletion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 10-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2019.02.006.	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Ishikawa T, Eto K, Kim SK, Wake H, Takeda I, Horiuchi H, Moorhouse AJ, Ishibashi H, Nabekura J.	4. 巻 159
2. 論文標題 Cortical astrocytes prime the induction of spine plasticity and mirror image pain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pain	6. 最初と最後の頁 1592-1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/j.pain.0000000000001248.	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Kanemoto-Kataoka Y, Oyama K, Oyama TM, Ishibashi H, Oyama Y	4. 巻 160
2. 論文標題 Ziram, a dithiocarbamate fungicide, exhibits pseudo-cytoprotective actions against oxidative stress in rat thymocytes: Possible environmental risks.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environmental Research	6. 最初と最後の頁 232-238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envres.2017.09.027	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Kanemoto-Kataoka Y, Oyama TM, Ishibashi H, Oyama Y	4. 巻 6
2. 論文標題 Zinc is a determinant of the cytotoxicity of Ziram, a dithiocarbamate fungicide, in rat thymic lymphocytes: Possible environmental risk	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Toxicological Research	6. 最初と最後の頁 499-504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7tx00052a.	査読の有無 有
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Arichi S, Hamada S, Ishibashi H
2. 発表標題 Bradykinin excites intracardiac ganglion neurons by activating non-selective cation channels and inhibiting M-currents
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Arichi S, Hamada S, Ogata M, Ishibashi H
2. 発表標題 Electrophysiological characterization of bradykinin B2 receptors in rat intracardiac neurons
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogata M, Akita H, Ishibashi H
2. 発表標題 Effects of neonatal dopamine depletion on behavioral responses to anxiogenic tasks in adult rats
3. 学会等名 The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有地志帆、濱田幸恵、石橋 仁
2. 発表標題 ブラジキニンは心臓神経節ニューロンを興奮させる
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 緒形雅則、秋田久直、石橋 仁
2. 発表標題 幼若期ドーパミン欠損ラットの発育並びに運動制御に関する特性
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔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	緒形 雅則 (Ogata Masanori) (20194425)	北里大学・医療衛生学部・講師 (32607)	
研究分担者	川島 麗 (Kawashima Rei) (70392389)	北里大学・医療衛生学部・講師 (32607)	
研究分担者	濱田 幸恵 (Hamada Sachie) (00399320)	北里大学・医療衛生学部・助教 (32607)	