

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591083

研究課題名 (和文) 摂食調節ネットワークの再構築と新規肥満制御因子の探索

研究課題名 (英文) Re-construction of the network involved in feeding and search for novel factors to control obesity

研究代表者：伊達 紫

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授

研究者番号：70381100

研究成果の概要：

1) 肥満症と神経系の関連

肥満発症への神経系の関与を、中脳切断ラットを用いて検討した。同ラットでは、末梢の満腹シグナルであるCCKやPYY、空腹シグナルであるグレリンの作用が完全にキャンセルされるだけでなく、摂食抑制に機能するレプチンの効果も有意に減衰していた。これらの結果から、神経系を介した中枢への情報入力エネルギー恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。

2) 高脂肪食耐性ラットの解析

高脂肪食ラットの約 10%に普通食摂取群の平均体重を下回る高脂肪食耐性(DR)ラットが存在することを明らかにした。DR ラットは、内臓脂肪の蓄積がきわめて少なく、脂肪合成系に関与する分子の遺伝子発現が低下している一方、脂肪酸β酸化に関わる分子の発現は増加傾向にあった。また、インスリン感受性がきわめてよいという特徴が認められた。これらの基礎データを基に、現在、DR ラットの脂肪組織で特異的に変動する分子に着目し、in vitro および in vivo での機能解析を進めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

1. 研究開始当初の背景

肥満は、糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化などの生活習慣病の成因に深く関与した臨床医学上の重要なテーマであり、また社会的にも関心の深い問題

である。近年のライフスタイルの変化に伴い、1977年以降、男性ではすべての年齢層で、女性では50歳以上で、BMI (body mass index) の増加傾向が認められている。このように増加する肥満、それに伴

う生活習慣病を克服するためには、その基礎となる摂食およびエネルギー代謝調節系の分子機構の解明や新規肥満制御因子の探索が重要課題である。本研究では、末梢の摂食・エネルギー代謝関連物質の中枢への情報伝達機構の解明、さらには肥満制御に関与する新たな因子の探索を行い、肥満の病態解明や治療薬のターゲット分子の探索を進める。

2. 研究の目的

1999年に申請者を含む研究グループにより発見された消化管ペプチド;グレリンは、末梢で産生される唯一の摂食亢進ペプチドである。私たちは、グレリンのエネルギー代謝調節に関する研究を通じて、摂食関連ホルモンの中には血行性に脳に移行し受容体と結合することで摂食行動を制御するシステムに加え、グレリンを含むいくつかの消化管ホルモン; peptide YY (PYY)、cholecystokinin (CCK)、glucagon like peptide-1 (GLP-1) のように、迷走神経を介して空腹あるいは満腹情報を速やかに中枢に伝達する機構を持つものが存在することを証明している。本研究では、髄液あるいは血行性に中枢に移行することで摂食抑制に作用する末梢ホルモン;レプチンのエネルギー代謝調節における神経系の役割を検討し、末梢と中枢の機能連関について明らかにする。神経遮断動物のエネルギー代謝機構を検討し、神経遮断による肥満発症の分子メカニズムについて解明する。さらに現在飼育している自然発症高脂肪食耐性ラットのエネルギーホメオスタシスに関わるパラメーターを解析し、それらに関与する遺伝子の動向をDNAマイクロアレイにて網羅的に探索する。

3. 研究の方法

(1) レプチンおよびインスリンシグナルの迷走神経を介する作用機構

脂肪細胞で産生分泌される摂食抑制ホルモン;レプチンは、血行性に脳に到達し、その作用を発揮すると考えられてきた。私たちは予備実験の結果から、レプチン受容体がグレリン、PYY、CCKに対する受容体と同様、迷走神経で発現していることを見出した。神経遮断ラットにレプチンを末梢投与し、レプチンの摂食抑制作用における神経系の役割を明らかにする。迷走神経求心細胞にレプチンを添加し、STAT3のリン酸化を検討する。

(2) 空腹・満腹シグナルに対する迷走神経求心線維の電気活動

グレリン、PYY、CCK、レプチンを末梢

投与後、迷走神経求心線維(胃枝、肝臓枝、腹腔枝)の firing rate を記録し、これらの末梢摂食関連ホルモンに対する求心神経路の電気生理学的特性を評価する。

(3) 迷走神経遮断および中脳遮断ラットの肥満発症のメカニズム

迷走神経遮断や中脳遮断ラットでは、術後10日以降、過食による顕著な肥満を呈する。これら神経遮断肥満ラットと高脂肪食による肥満ラットでの血糖、インスリン、レプチンの基礎値をモニターし、耐糖能、インスリン感受性、レプチン感受性、摂食リズムを比較する。さらに、酸素消費や運動量を測定し、神経遮断による肥満症の特性を検討する。

(4) 自然発症高脂肪食耐性ラットのエネルギー代謝調節機構および肥満制御因子の同定

3週齢の雄性SDラットを高脂肪食(蛋白質23%、糖質35.5%、脂質35.8%)群と普通食(蛋白質24%、糖質65%、脂質9%)群とに分けて飼育したところ、高脂肪食群の中で摂取カロリーには差がなく、高レプチン血症や高インスリン血症を呈するにも拘わらず、普通食群に比べ体重増加の少ない群、所謂、高脂肪食耐性ラットが存在することを見出した。これらのラットの末梢摂食関連ホルモンや受容体発現を検討し、耐糖能、インスリン感受性、レプチン感受性を評価する。さらに、酸素消費、運動量、体温などのパラメーターをモニターし、エネルギー代謝調節系における特性を検討する。高脂肪食肥満ラット、コントロールラット、高脂肪食耐性ラットの肝臓、内臓脂肪、皮下脂肪、褐色脂肪、筋肉、延髄、視床下部からRNAを抽出し、*in vitro* transcriptionにてcRNAを合成する。断片化したcRNAをラットDNAマイクロアレイにhybridizationさせ、糖代謝や脂質代謝、摂食調節に関連する酵素、ホルモン、転写調節因子などの発現を網羅的に解析し、高脂肪食耐性に関連する因子を同定する。

4. 研究成果

(1)迷走神経遮断や中脳遮断ラットにグレリン、CCK、PYYを投与すると、摂食亢進あるいは抑制作用が完全にキャンセルされた。一方、同ラットにレプチンを投与すると、摂食抑制作用は見られるものの、コントロールラットに比べ抑制の程度は明らかに減弱していた。迷走神経求心神経細胞の初代培養系を確立し、各ホルモン受容体の発現を免疫組織化学で検討した。グレリン、CCK、PYYの受容体に加え、レプチン受容体の発現も確認された。この培養細胞を用いてレプチンのシグナル伝達について検討したところ、レプチン添加20分後に

は、STAT3 の細胞質および核でのリン酸化が認められた。

- (2) 摂食亢進に作用するグレリンを末梢投与すると迷走神経求心線維の発火頻度が減少した。また、摂食抑制に作用するCCKやPYYでは発火頻度は増加した。摂食抑制の起こる濃度のレプチンを腹腔内投与すると、迷走神経肝臓枝求心線維の発火頻度はCCKやPYY同様に増加した。一方、高濃度レプチンを静脈や門脈内に投与すると、肝臓枝の発火頻度は減少した。この知見は、肥満により起こるレプチン抵抗性の機序に神経系が関与している可能性を示すものである。
- (3) 中脳切断ラットを長期飼育すると過食による肥満を呈する。この肥満ラットは、脳内の摂食関連物質の発現やエネルギー消費には異常を認めないものの、インスリン抵抗性およびレプチン抵抗性を示していた。神経遮断により末梢情報の伝達が障害されエネルギーホメオスタシスの維持に異常を来たしたものと推測された。
- (4) 高脂肪食で飼育したラットの約10%に普通食ラットの体重を下回る高脂肪食耐性ラットが存在した。同ラットは内臓脂肪の蓄積が少なく、インスリン感受性がきわめてよいという特性を有していた。酸素消費や行動量には異常はなく、内臓脂肪では脂肪合成に関与する遺伝子群の発現が減少傾向を示し、脂肪酸β酸化酵素の遺伝子発現は増加していた。DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析からいくつかの特徴ある遺伝子発現の変動が確認され、現在、培養細胞での機能解析を行っている。

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8件)

- ① Shibata M, Mondal MS, Date Y, Nakazato M, Suzuki H, Ueta Y: Distribution of orexins-containing fibers and contents of orexins in the rat olfactory bulb. *Neurosci Res* 61, 99-105 (2008) (査読有)
- ② Toshinai K, Kawagoe T, Shimbara T, Tobina T, Nishida Y, Mondal MS, Yamaguchi H, Date Y, Tanaka H, Nakazato M: Acute incremental exercise decreases plasma ghrelin level in healthy men. *Horm Metab Res* 39, 849-351 (2008) (査読有)
- ③ Mondal MS, Yamaguchi H, Date Y, Tsuruta T, Shimbara T, Toshinai K, Shimomura Y, Mori M, Nakazato M:

Ontogeny of a new enteric peptide, neuropeptide W (NPW), in the developing rat stomach. *Regul Pept* 145, 141-146 (2008) (査読有)

- ④ Seki M, Kageyama H, Takenoya F, Hirayama M, Kintaka Y, Inoue S, Matsuno R, Itabashi K, Date Y, Nakazato M, Shioda S: Neuropeptide W is expressed in the noradrenalin-containing cells in the rat adrenal medulla. *Regul Pept* 145, 147-152 (2008) (査読有)
- ⑤ Takenoya F, Kitamura S, Kageyama H, Nonaka N, Seki M, Itabashi K, Date Y, Nakazato M, Shioda S: Neuronal interactions between neuropeptide W- and orexin- or melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat hypothalamus. *Regul Pept* 145, 159-164 (2008) (査読有)
- ⑥ Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, González LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N: Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem* 282, 26354-26360 (2007) (査読有)
- ⑦ Toshinai K, Mondal MS, Shimbara T, Yamaguchi H, Date Y, Kangawa K, Nakazato M: Ghrelin stimulates growth hormone secretion and food intake in aged rats. *Mech Ageing Dev* 128, 182-186 (2007) (査読有)
- ⑧ Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Nakazato M, Date Y, Bowlus CL, Ishino Y, Watanabe E, Shiiya T, Ueno H, Hoshino H, Satoh K, Sugano K: Changes in plasma ghrelin levels, gastric ghrelin production, and body weight after *Helicobacter pylori* cure. *Mech Ageing Dev* 28, 182-186 (2007) (査読有)

[学会発表] (計10件)

- ① Yukari Date: A role for NPW as a substitute for leptin in feeding behavior. *ENDO2008*, 2008.6.17, サンフランシスコ
- ② Yukari Date: The role of ghrelin in energy metabolism. *The International Symposium on Neuropeptides and Neuroendocrinology*, 2008.8.29, 東京
- ③ 伊達 紫: 摂食調節系における雌雄差とその分子メカニズムに関する検討。

- 日本内分泌学会, 2008. 5. 17, 青森
- ④幸田修一、伊達 紫: 中脳切断ラットのエネルギー代謝調節機構の特性. 日本内分泌学会, 2008. 5. 16, 青森
- ⑤伊達 紫: ホルモンと視床下部摂食・エネルギー代謝調節. 内分泌サマーセミナー, 2008. 7. 11, 名古屋
- ⑥伊達 紫: 消化管ホルモンの摂食調節機構. 歯科基礎医学会学術大会・総会, 2008. 9. 24, 東京
- ⑦伊達 紫: NPW とレプチンの相互作用. 日本肥満学会, 2008. 10. 17, 大分
- ⑧伊達 紫: メタボリック症候群克服への道. 日伊科学技術 宮崎国際会議, 2008. 10. 11, 宮崎
- ⑨Yukari Date: Regulation of feeding behavior by gastrointestinal hormones. 日伊科学技術 宮崎国際会議, 2008. 10. 10, 宮崎
- ⑩伊達 紫: レプチンの摂食調節作用における神経系の役割. 日本肥満学会, 2007. 10. 19, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

日本肥満学会学術奨励賞、2007 年 10 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊達 紫

(2) 研究分担者

宮里幹也 (国立循環器病センター研究所
生化学部 部長)

(3) 連携研究者