

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19591089

研究課題名（和文） Aromatase は摂食調節および食欲の男女差に関連するか？

研究課題名（英文） Dose aromatase regulate the feeding behavior and induce the sexual difference on appetite?

研究代表者

西 芳寛 (NISHI YOSHIHIRO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20352122

研究成果の概要：Aromatase はアンドロゲン（男性ホルモン）をエストロゲン（女性ホルモン）に変換する酵素である。本研究では、摂食調節中枢である視床下部弓状核において、アンドロゲン受容体が摂食抑制ホルモンであるレプチンの作用を増強する機序を解明した。また、卵巣顆粒膜細胞でのアロマトラーゼ活性が、摂食促進ホルモンであるグレリンによって調節されていることを発見した。以上の結果から、生体のアンドロゲン・エストロゲン環境を左右するアロマトラーゼが、摂食調節・食欲の男女差にも関連している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：生殖内分泌学

### 1. 研究開始当初の背景

視床下部・摂食中枢を介したエストロゲンの摂食抑制効果が報告され、一方でアンドロゲンによる摂食亢進作用が報告されている。アロマトラーゼはアンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素であり性腺組織のほか脳内にも同活性が存在する。さらに、レプチンによるアロマトラーゼ活性の調節、エストロゲンによるグレリン分泌の調節が報告されている。以上から、アロマトラーゼを介したアンドロゲン・エストロゲン・摂食調節ペプチドホルモン（レプチン、グレリン）の相互作用による摂食行動・食欲の調節が推定される。

### 2. 研究の目的

アロマトラーゼを介した生体内でのアンドロゲン・エストロゲン・摂食調節ペプチドホルモン（レプチン、グレリン）の相互作用について解明するために、以下の4点を検討する。

- ①. 卵巣組織内のアロマトラーゼ活性に対するグレリンの作用を検討する。
- ②. アンドロゲンによるレプチン作用の修飾に関して、視床下部レベルで検討する。
- ③. 中脳辺縁系ドパミン回路（摂食報酬系）に対するグレリンの作用を検討する。
- ④. グレリンの活性調節における性差（性成熟との関連）について検討する。

### 3. 研究の方法

①. 卵巣組織内のアロマターゼ活性に対するグレリンの作用: 培養卵巣顆粒膜細胞 (KGN) を用いて、同細胞のアロマターゼ活性およびアロマターゼ遺伝子の発現に対するグレリン ( $0 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ) の作用について検討した。アロマターゼ活性の測定には  $^3\text{H}$ -標識 Androstenedione を用いた Ackerman の方法を用いた。アロマターゼ遺伝子の発現については RT-PCR 法を用いて半定量化した。

②. アンドロゲンによるレプチン作用の修飾 (視床下部・弓状核 etc.): アンドロゲン受容体ノックアウトマウス (ARKO) を用いて、レプチンの脳室内投与による摂食抑制効果 (摂餌量) を測定し、コントロールマウスと比較・検討した。遺伝子導入により培養細胞にアンドロゲン受容体・レプチン受容体・STAT3 を発現させて、アンドロゲン受容体の有無によるレプチン・STAT3 シグナルに対するアンドロゲンの効果について検討した。具体的には、STAT3 結合領域を reporter plasmid のプロモータ領域に導入して構築した luciferase Assay に対するアンドロゲン受容体の効果, GFP-STAT3 融合蛋白の核内移行に対するアンドロゲン受容体の効果を検討した。

③. 中脳辺縁系ドパミン回路 (摂食報酬系) に対するグレリン作用の検討: 食餌性の報酬反応に対するグレリンの作用を確認する目的で、食餌の「有り」「無し」の状態でのグレリンを末梢・中枢投与して、ラット中脳辺縁系 (側坐核) へのドパミン放出を測定した。側坐核へのドパミン放出量の測定には、同領域に透析プローブを留置した微小灌流法を用いた。

④. 性成熟に伴うグレリンの活性調節に関する検討: グレリンは自身が脂肪酸修飾されることで活性型となり生理機能を発揮する。活性型グレリンには、オクタン酸で脂肪酸修飾された Octanoyl-Ghrelin (O-Ghrelin) とデカン酸で修飾された Decanoyl-Ghrelin (D-Ghrelin) が存在する。胃内および血中には、この他に脂肪酸修飾されていない Des-Acyl-Ghrelin (des-Ghrelin) が存在する。本報告書では、脂肪酸修飾型・非修飾型のグレリンを合わせて総グレリン (Total Ghrelin : T-Ghrelin) と呼称する。

マウスの性成熟ともなう血中、胃内グレリンの活性状態の変動を、活性型グレリン (O-Ghrelin, D-Ghrelin) と総グレリン (T-Ghrelin) の比率を指標にして解析した。O-, T-Ghrelin の測定には既報の RIA を用い、D-Ghrelin の測定には、D-Ghrelin を特異的

に認識するポリクローナル抗体 (自家作成) を用いて、新たに作成した D-Ghrelin RIA を使用した。

### 4. 研究成果

①. 卵巣組織内のアロマターゼ活性に対するグレリンの作用: 培養 KGN 細胞のアロマターゼ活性は、グレリンの添加により濃度依存性に ( $0 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ) 亢進した。hMG, A-kinase 系の刺激の共存下では、グレリン添加 ( $10^{-7}, 10^{-8} \text{M}$ ) によるアロマターゼ活性の抑制が認められた。KGN は卵巣の非黄体化顆粒膜細胞 (NLGC) の性格を保持することから、NLGC のアロマターゼ活性に対するグレリンの作用は、生体の FSH (A-kinase) 環境により変化する可能性が示唆された。

②. アンドロゲン受容体によるレプチン作用の修飾 (視床下部・弓状核と培養細胞による検討): アンドロゲン受容体ノックアウトマウス (ARKO) では、レプチン脳室内投与による摂食の抑制効果が減弱していた。ARKO では、レプチンの脳室内投与後に起こる弓状核細胞での STAT3 の核内移行率が低下していた。レプチン受容体を発現した培養細胞 (HEK, SH-SY5Y) では、アンドロゲン受容体が STAT3 の核内移行を促進することで、レプチン作用を増強することが確認された。以上から、アンドロゲン受容体の存在自体が、弓状核 (視床下部摂食中枢) でのレプチンの作用を増強する事が確認された。視床下部でのアンドロゲン受容体の発現量は、雄が雌より有意に高いことから、アンドロゲン受容体によるレプチン作用の増強効果が、摂食行動の雌雄差に関与していると考えられた。

③. 中脳辺縁系ドパミン回路 (摂食報酬系) に対するグレリン作用の検討: ラットを用いて、中脳辺縁系の腹側被蓋野 (VTA : A10) からのドパミン (DA) 神経の主な投射先である側坐核 (NAc) に微小透析プローブを留置。VTA から NAc 領域への DA 放出に対するグレリン ( $3.0 \text{ nmol/body}$ , 経静脈投与) の影響を検討した。グレリン投与下での NAc における DA 分泌は、自由摂食のラットでは亢進し、摂食制限下 (food deprived) では DA 分泌が低下した。摂食亢進ペプチドホルモンであるグレリンの摂食報酬系 DA 回路への作用は、食餌の有無により二相性に調節されている事が判明した。

④. 性成熟に伴うグレリンの活性調節: ICR マウス (♂, ♀) の血漿中および胃内のグレリン量 (T-, O-, D-Ghrelin) の生後発育に伴う変化を、日齢 10, 20, 30, 60, 90, 120 日で測定し、比較検討した。活性型 O-Ghrelin の血中濃度は、測定した全日齢で♀ > ♂の傾向

を示した。一方で活性型・非活性型グレリンを共に測定する T-Ghrelin の血中濃度は、思春期 (60 日齢) 以降では♂>♀の傾向を示した。この結果、血中におけるグレリンの活性化率は (O-Ghrlin / T-Ghrelin Ratio : O/T-ratio)、思春期以降の♀で、有意に高い結果となった。グレリンの主産生部位である胃内での O/T-ratio は、日齢とともに徐々に低下する傾向を認めたが、雌雄差は認められなかった。胃内の D-Ghrelin 含量については、日齢 10, 20, 30 において若干♂>♀の傾向があるものの有意差は認められなかった。以上の結果から、血中に分泌された活性化グレリンの不活化 (脱アシル化) する調節機構に、雌雄差が存在す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 5 件)

- ①. Hiejima H \*, Nishi Y \*#, Hosoda H, Yoh J et.al., Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon fasting in rodents., *Regulatory Peptides*, Accepted: 6 May, 2009, (DOI: 10.1016/j.regpep.2009.05.003) (#, Corresponding Author; \*, these authors contribute equally to this work)、(査読あり)
- ②. Kawahara Y, Kawahara H, Kaneko F, Yamada M, Nishi Y, Tanaka E, Nishi A, Peripherally administrated ghrelin induces bimodal effects on mesolimbic dopamine system depending on food-consumptive states., *Neuroscience*, Accepted: 28 March, 2009, (DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.03.086)、(査読あり)
- ③. Jääskeläinen M, Kyrölahti A, Anttonen M, Nishi Y, Yanase T et.al., TRAIL pathway components and their putative role in granulosa cell apoptosis in the human ovary., *Differentiation* 77, 369-376, 2009. (DOI: 10.1016/j.diff.2008.12.001)、(査読あり)
- ④. Fan WQ, Yanase T, Nishi Y, Chiba S, Okabe T et. al., Functional potentiation of leptin -Signal transducer and activator of transcription 3 signaling by the androgen receptor., *Endocrinology* 149 (12): 6028-6036, 2008. (DOI: 10.1210/en.2008-0431)、(査読あり)
- ⑤. Woods DC, Liu H-K, Nishi Y, Yanase T,

Johnson AL., Inhibition of proteasome activity sensitizes human granulosa tumor cells to TRAIL-induced cell death., *Cancer Letters* 260, 20-27, 2008. (DOI: 10.1016/j.canlet.2007.10.016) (査読あり)

### 【学会発表】(計 15 件)

- ①. 西 芳寛、比江島啓至、細田洋司 ほか、デカン酸修飾型グレリンの産生・分泌動態とその生理作用、第 80 回日本内分泌学会学術総会 (2007 年 6 月 15 日、東京)
- ②. 野々下晃子、西 芳寛、永山祥代 ほか、Dahl-S ラットを用いた子宮内胎児発育遅延におけるグレリンの動態についての検討、第 80 回日本内分泌学会学術総会 (2007 年 6 月 14 日、東京)
- ③. 葉 純子、西 芳寛、比江島啓至 ほか、デカン酸修飾型グレリンの産生・分泌動態の解析：特異的な測定系の開発、第 58 回西日本生理学会 (2007 年 10 月 19 日、福岡)
- ④. 西 芳寛、葉 純子、比江島啓至 ほか、デカン酸修飾型グレリンの産生分泌動態の検討：特異的測定系の開発とその応用、第 81 回日本内分泌学会学術総会 (2008 年 5 月 16 日、青森)
- ⑤. Kawahara Y, Kawahara H, Kaneko F, Yamada M, Nishi Y et.al., Bimodal effect of peripherally-administrated ghrelin on the mesolimbic dopamine system is dependent on the food consumption., 12<sup>th</sup> International conference on *In vivo* Methods. (August 12, 2008, British Columbia, Canada)
- ⑥. 御船弘治、西 芳寛、矢 吹映 ほか、絶食時のマウスにおけるデカン酸修飾型グレリンの分泌動態について、第 146 回日本獣医学会学術集会 (2008 年 9 月 24 日、宮崎)
- ⑦. 葉 純子、西 芳寛、比江島啓至 ほか、デカン酸修飾型グレリンの産生・分泌動態と生理活性についての検討、第 29 回日本肥満学会総会 (2008 年 10 月 17 日、大分)
- ⑧. 西 芳寛、葉 純子、田尻祐司 ほか、デカン酸修飾型グレリンの分泌動態：肥満度・インスリン抵抗性との関連、第 46 回日本糖尿病学会九州地方会 (2008 年 10 月 11 日、久留米)
- ⑨. 柳瀬敏彦、範呉強、西 芳寛 ほか、アンドロゲンの抗肥満作用：アンドロゲン受容体によるレプチンシグナルの増強作用、第 46 回日本糖尿病学会九州地方会 (2008 年 10 月

11 日、久留米)

⑩. 西 芳寛、摂食調節ホルモン「グレリン」のアンチエイジング薬としての可能性、日本抗加齢医学会九州研究会(2008年10月13日、福岡)

⑪. 西 芳寛、柳瀬敏彦、御船弘治 ほか、アンドロゲン受容体ノックアウトマウスの中枢性肥満発症機序の解明、第 26 回九州実験動物研究会総会(2008年11月15日、佐賀)

⑫. 柳瀬敏彦、Fan WQ、西 芳寛、加藤茂明 他、アンドロゲンとメタボリックシンドローム、第 16 回日本ステロイドホルモン学会学術総会(2008年11月22日、福井)

⑬. 佐藤元康、西 芳寛、杉本博之、ウシ胎児血清におけるグレリン脱アシル化酵素の同定、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会(2008年12月9-12日、神戸)

⑭. 西 芳寛、葉 純子、田尻祐司 他、培養ヒト卵巣顆粒膜細胞癌細胞株 KGN のアロマターゼ活性に対するグレリン作用の検討、第 82 回日本内分泌学会学術総会(2009年4月23日、群馬)

⑮. Nishi Y, Yoh J, Hiejima H, Hosoda H et.al.、Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin.、26<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences (IUPS 2009) (July 31, 2009, Kyoto, Japan)

#### 〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

①. 名称:デカン酸修飾型グレリン測定方法および前記測定に使用する抗体  
発明者:西 芳寛、細田洋司、寒川賢治  
権利者:学校法人久留米大学  
種類:特許権  
出願番号:特願 2008-183966  
出願年月日:2008年7月15日  
国内外の別:国内

②. 名称:グレリンの生理学的機能のレギュレーター及びその機能  
発明者:児島将康、西 芳寛、  
権利者:学校法人久留米大学  
種類:特許権  
出願番号:11/628743  
出願年月日:2008年7月25日  
国内外の別:外国(PCT 米国移行)

③. 名称:デカン酸修飾型グレリン抗体、デ

カン酸修飾型グレリン測定方法、および、デカン酸修飾型グレリン分離回収方法

発明者:西 芳寛  
権利者:学校法人久留米大学  
種類:特許権  
出願番号:特願 2008-241277  
出願年月日:2008年9月19日  
国内外の別:国内

#### 〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.kurume-u.ac.jp>  
<http://research.kurume-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

西 芳寛 (Yoshihiro Nishi)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号:20352122

(2)研究分担者

河原幸江 (Yukie Kawahara)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号:10279135

野々下晃子 (Akiko Nonoshita)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号:00309832

石原陽子 (Yoko Ishihara)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号:50203021

田尻祐司 (Yuji Tajiri)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号:80469361

御船弘治 (Hiroharu Mifune)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号:70174117

田中永一郎 (Eiichiro Tanaka)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号:80188284

(3)連携研究者

村井恵良 (Yoshinaka Murai)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号:40322820

永山祥代 (Nagayama Masayo)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号:20309834