

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22791144

研究課題名（和文）新しい薬物治療を目指した神経性食欲不振症の病態でのグレリンと CRF の役割の解明

研究課題名（英文）The investigation of pathophysiological role of ghrelin and CRF on anorexia nervosa and discovery of a new therapeutic medication.

研究代表者

眞野あすか（MANO ASUKA）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50343588

研究の概要（和文）：本研究では視床下部のストレス応答における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRF）とグレリンの役割について明らかにするとともに神経性食欲不振症の病態におけるこれらペプチドの関与をあきらかにすることを目的とした。ストレスによる摂食抑制はストレス後にグレリンを投与することで阻止されることが明らかとなったが、その神経機構を明らかにするまでには至らなかった。また内因性にグレリン受容体遺伝子発現を抑制したラットでは摂食量の低下や活動性の亢進といった神経性食欲不振症と類似した表現型を示すことが明らかとなり、今後の研究の発展によりストレスによる摂食抑制における CRF とグレリンの役割や神経性食欲不振症の病態生理が明らかとなることが期待される。

研究の概要（英文）：Corticotropin-releasing factor (CRF), the most important regulator of the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to stress, mediates stress-induced inhibition of food intake, and ghrelin, an endogenous ligand for growth hormone secretagogue receptor, stimulates food intake. Anorexia nervosa (AN) is an eating disorder characterized by immoderate food restriction and irrational fear of gaining weight. Therefore CRF and ghrelin may be involved in pathophysiology of AN. The goal of this study is to clarify important roles of CRF and ghrelin on pathophysiology of AN. Stress-induced inhibition of food intake was decreased by administration of ghrelin after stress. Suppression of the expression of endogenous ghrelin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus decreased food intake and increased spontaneous activity in rats. These results show that ghrelin is effective on stress-induced inhibition of food intake, and impairment of the function of ghrelin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus induces anorectic effect in rats. Further experiment is needed to clarify an important role of CRF and ghrelin in stress-induced anorexia, and a participation of CRF and ghrelin with pathophysiology of AN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：ストレス、生理学、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRF)は視床下部室傍核(PVN)の神経細胞に発現し、ストレス時にはその分泌が亢進する。摂食抑制作用を有する CRF は、ストレスによる摂食抑制機序に関与しているのみならず、情動調節に関与している扁桃体を活性化し、不安を惹起し、活動性を亢進する作用も有している。中枢性摂食異常症の一つである神経性食欲不振症患者(AN)では摂食障害に加え強い不安感などの精神症状や過活動が認められる。これらに加え AN では視床下部-下垂体-副腎(HPA)系の異常と脳脊髄液中の CRF 濃度が上昇していることが知られていることから、AN の病態の解明において CRF の関与様式を明らかにすることは必要不可欠である。

1999 年に児島らにより胃から単離・同定されたグレリンは成長ホルモン分泌惹起物質(GHS)受容体(GHS-R)の内因性のリガンドであり、強力な摂食促進作用を有する。慢性的な摂食制限により血中グレリン値が上昇したマウスや、グレリンを投与したマウスでは不安行動が減弱することから、グレリンは不安を緩和する作用を有することが明らかとなってきた。急性ストレスにより血中グレリン値が上昇することに加え、グレリンにより CRF の分泌が亢進することが報告されていることから、強力な摂食促進作用を有しているにも関わらず、ストレス時にはグレリンの摂食促進作用が CRF により阻害されている可能性が推測される。さらに野生型マウスでは絶食により視床下部弓状核(Arc)においてニューロンの活性化の指標である Fos 蛋白発現が増加するが、CRF 過剰発現マウスでは Fos 蛋白発現増加の抑制が認められるとの報告があり、AN では CRF 分泌の増加が摂食調節中枢である視床下部弓状核でのニューロンの活動性を低下させ、摂食障害を引き起こしている可能性が推測される。

グレリンは摂食行動や脂肪蓄積を促進することでエネルギーバランスを正に導くと考えられているが、AN では血中グレリン値が高いにもかかわらず食欲は減弱しており、AN の病態の一因として中枢神経系においてグレリン抵抗性を来している可能性が考えられる。CRF が摂食抑制作用や不安惹起作用を示すことやこれまでの知見から、グレリン

抵抗性の機序の一部に CRF が関与していることが推測される。しかしながら、これまでストレスによる摂食抑制における CRF とグレリンの作用に対する相互の関与様式については明らかではない。

AN の病態に CRF が強く関与していること、さらに最近グレリンが AN の治療薬として有用である可能性が示されたことから、AN の病態である摂食障害や不安行動における CRF とグレリンの相互作用の解明は必須であると考え、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

AN の血中グレリン値は高いにも関わらず摂食が障害されていることから、AN の病態形成においてグレリンの作用が障害されている可能性が考えられる。グレリンが CRF の分泌を増すことは報告されているが、CRF がグレリン分泌に影響するとの報告は無く、またグレリンが CRF の作用を、CRF がグレリンの作用を、それぞれどのように修飾しているかについての報告も無い。ストレスによる摂食抑制がグレリンおよびその受容体の作用に影響しているかについても明らかではない。これらを明らかにすることにより AN の病態における CRF とグレリンの役割が新しい薬物治療の開発の一助になることを目指して、本研究では非ストレス時やストレス負荷に対する視床下部の反応性における CRF とグレリンの役割について明らかにするとともに神経性食欲不振症の病態におけるこれらペプチドの関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) グレリンによる摂食促進作用におけるストレスの影響

ウィスター系オスラットの脳室内へあらかじめ薬物投与用のカニューレを留置し、実験当日 90 分の拘束ストレスを与えた後にそのカニューレを介してグレリン (100 pmol) を脳室内へ投与した。その後 30 分毎、投与から 120 分間の摂食量を測定した。生理食塩水を脳室内へ投与した群を対照群とし、ストレスの有無やグレリン投与の有無による摂食量の違いを比較した。

(2) グレリンが拘束ストレスによる Fos 発現に及ぼす影響

ウィスター系オスラットに 90 分の拘束ストレスを負荷した後、グレリン (100 pmol) をあらかじめ脳室内へ留置した薬物投与用のカニューレを介して投与し、90 分後にパラホルムアルデヒドにて灌流固定した。この脳を用いて視床下部の Fos 発現について解析した。Fos の免疫染色は浮遊法にて冠状断の脳切片にて行った。抗体は Oncogene 社の抗 c-fos 抗体を 10,000 倍の濃度にて使用し、既報の ABC 法を用いて免疫複合体を作成した後に DAB にて茶褐色に発色した。視床下部室傍核全域の Fos 陽性細胞数は画像解析装置にて定量し各群を比較した。

(3) グレリン受容体機能抑制ラットの行動解析

AN では摂食促進作用を持つグレリンの血中濃度は高いにも関わらず摂食が抑制されていることから、視床下部においてグレリン受容体のグレリンに体する反応性が減弱している可能性は考えられる。そこでグレリン受容体の機能抑制が AN の病態を示すか否かを明らかにするために、グレリン受容体発現抑制トランスジェニックラットとグレリン拮抗薬である D-Lys-GHRP6(10 μ g)を脳室内へ投与したラットの行動解析を行った。

(4) グレリン受容体発現抑制トランスジェニックラットの HPA 系の機能解析

AN では脳脊髄液中の CRF 濃度が上昇しており、病態の一因として CRF が過剰に分泌していることが示唆されていることから、グレリン受容体発現抑制トランスジェニックラットにおいても CRF の遺伝子発現および機能障害が存在することが推測される。そこでグレリン受容体発現抑制ラットにおいて視床下部室傍核の CRF の mRNA 発現量と血中 ACTH およびコルチコステロン濃度の解析を行った。CRF の mRNA 発現量は CRF の遺伝子配列の全長を持ちジゴキゲンでラベルしたプローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーション法にて CRF mRNA 陽性細胞数を画像解析装置にて定量した。血中 ACTH およびコルチコステロン濃度は市販のラジオイムノアッセイキットを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) グレリンによる摂食促進作用におけるストレスの影響

ストレスの有無に関わらずグレリン投与群の摂食量は生理食塩水投与群と比較して有意に多かった。ストレス負荷後生理食塩水を投与した群では摂食行動は認められなかった。CRF 過剰発現マウスでは絶食による弓状核での Fos 発現増加が抑制されていることから、ストレス負荷がグレリンによる摂食促進作用を阻害することが期待されたが、上述の通りストレスがグレリンの摂食促進作用を抑制する効果は認められなかった。

(2) グレリンが拘束ストレスによる Fos 発現に及ぼす影響

ストレス後にグレリンを投与した群の視床下部室傍核における Fos 発現は、非ストレス下にグレリンを投与した群と比較して有意に増加していた。しかしながらストレス後に生理食塩水を投与した群と比較すると Fos 発現は少ない傾向を示したことから、ストレスにより活性化する室傍核のニューロンの活動をグレリンが抑制している可能性が推測された。

(1) と同様の手順を用いたが、摂食量と Fos 発現量はパラレルではなかった。摂食を促進するグレリン投与により Fos が発現するニューロンと、摂食抑制を惹起するストレスにより Fos が発現するニューロンは、それらを活性化する神経機構も異なり有しているペプチドの種類も異なる可能性が考えられ、Fos 発現ニューロンの種類の同定や室傍核以外の神経核における Fos 発現についても解析する必要がある。

(3) グレリン受容体機能抑制ラットの行動解析

グレリン拮抗薬を投与したラットの摂食量は生理食塩水を投与した対照群と変わらないが、投与後の活動量は抑制されていた。グレリンの血中濃度は摂食前に上昇し、摂食により低下することが知られており、体内のエネルギー容量に依存して摂食を調節すると考えられることから、この結果は非ストレス下においてグレリンは摂食を持続的には調節していないことを示唆しており、外因性にグレリン受容体発現を抑制したラットでは AN に類似した行動は示さなかったと考えられる。しかしながらラットにおいて摂食量は暗期に多いことが知られており、本実験を施行した明期には摂食量が少ないことから抑制効果が見られなかった可能性もあり、暗期においても本実験を行う必要があると考えられた。

内因性のグレリン受容体を抑制したトランスジェニックラットでは程度は弱いもの

の一日の摂食量は野生型と比較し少なく、また一日の運動活動量は野生型に比べ増加していた。これらの表現型は AN の病態と類似していた。

(4) グレリン受容体発現抑制トランスジェニックラットの HPA 系の機能解析

グレリン受容体発現抑制トランスジェニックラットの室傍核における CRF mRNA 発現量は野生型ラットと比較し減少していた。血中 ACTH およびコルチコステロン濃度には差が認められなかった。本結果はグレリン受容体発現抑制トランスジェニックラットの CRF の機能が野生型ラットと異なることを予想させる結果であると考えられるが、AN の病態におけるグレリンと CRF の役割を解明するためには今後さらなる解析が必要である。

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 3 件)

- ① Sakurazawa N, Mano-Otagiri A, Nemoto T, Shibasaki T. Effects of intracerebroventricular ghrelin on food intake and Fos expression in the arcuate nucleus of the hypothalamus in female rats vary with estrous cycle phase. *Neurosci Lett*. 2013 ;541:204-8. 2. 査読有り
doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.006.
- ② Nemoto T, Mano A, Shibasaki T. Increased expression of miR-325-3p by urocortin 2 and its involvement in stress-induced suppression of LH secretion in rat pituitary. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(7):E781-7. 査読有り
doi: 10.1152/ajpendo.00616.2011.
- ③ Nemoto T, Sugihara H, Mano A, Kano T, Shibasaki T. The effects of ghrelin/GHSs on AVP mRNA expression and release in cultured hypothalamic cells in rats. *Peptides*. 2011;32(6):1281-8. 査読有り
doi: 10.1016/j.peptides.2011.04.007.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 眞野あすか、根本崇宏、芝崎 保、視床下部および扁桃体における CRF1 型受容体の局在について、第 85 回内分泌学会学術総会、2012 年 4 月 21 日、名古屋

- ② 眞野あすか、根本崇宏、芝崎 保、下垂体における CRF1 型受容体様免疫活性に関する免疫組織化学的解析、第 38 回神経内分泌学会学術総会、2011 年 11 月 26 日、東京

- ③ 眞野あすか、根本崇宏、山内直子、芝崎保、ストレスによる視床下部正中隆起におけるウロコルチン 2 免疫活性の変化について、第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011 年 4 月 22 日、神戸

- ④ 眞野あすか、岩寄 あずさ、根本 崇宏、芝崎 保、加齢に伴う体脂肪蓄積機序におけるグレリンの役割について、第 37 回日本神経内分泌学会学術集会、2010 年 10 月 23 日、京都

[その他]

ホームページ等

<http://college.nms.ac.jp/page/155.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞野あすか (ASUKA MANO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：22791144