

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501018

研究課題名(和文) 肥満の食行動異常における摂食促進ホルモン・グレリンの役割と食事制限・運動の効果

研究課題名(英文) Putative effects of energy restriction and exercise on abnormal feeding behavior and ghrelin production in obese diabetic model

研究代表者

田尻 祐司(TAJIRI, YUJI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：80469361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：過食は肥満における体重や代謝異常のコントロールを困難なものとする。本研究は肥満2型糖尿病モデルであるSDT-fattyラット(fa)を用いて、摂食促進ホルモンであるグレリンと過食の関連を調査する事を目的として行われた。本ラットは過食と肥満を認め、16週齢において胃でのグレリン産生能は軽度増加していた。グレリン血中濃度はSDラットでは7:00および19:00に上昇する明確な日内リズムを呈していたが、faではその振幅が著しく低下しており、リズムのずれも認められた。faは明期の摂食量が特に増加しており、グレリンリズム異常との関連が示唆された。さらに、高脂肪食肥満ラットにおける運動の有用性を報告した。

研究成果の概要(英文)：Abnormal eating behavior is often observed in patients with obesity and type 2 diabetes, making controls of body weight and metabolic parameters more difficult. In the present study, we investigated a putative relationship between overeating and ghrelin, an appetite promoting hormone in SDT-fatty rats (fa) as a model of obese type 2 diabetes. At 16 weeks old, fa showed massive overeating, especially during light phase, with a concomitant but slight increase of stomach ghrelin production. Although a clear diurnal rhythm of plasma ghrelin concentration was observed with peaks at 7:00 and 19:00 in control SD rats, such rhythm was obscure and peaks had shifted in fa. This abnormal rhythm of ghrelin, not an abnormal production, might well explain feeding behavior during light phase in this obese model. Furthermore, we evaluated effects of voluntary exercise on rhythms of feeding and locomotor activity in relation to an amelioration of ghrelin production in high fat diet-induced obese rats.

研究分野：内分泌代謝・糖尿病

キーワード：肥満 摂食ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

我が国では約 3500 万人が BMI 25 以上の肥満を有すると推計されており、その背景には食の欧米化や運動不足による肥満人口の増加が大きな要因として考えられている。メタボリック症候群 (MetS) は内臓肥満を基盤として糖尿病、高血圧、脂質異常症などの代謝異常が集積した病態であり、肥満人口とともに増加傾向にある。肥満者には“食行動のずれとくせ”すなわち食リズム異常などが多く見られ、この特徴的な食行動のずれは“むちゃ喰い障害 (binge eating)”と表現され<sup>1)</sup>、近年の MetS や 2 型糖尿病患者など肥満をベースとした代謝異常においてその治療を妨げる大きな原因となっているが、その詳細なメカニズムに関しては明らかでない部分が多い。

本研究課題の連携研究者である児島ら<sup>2)</sup>により発見された摂食促進ホルモンであるグレリンは、主に胃で産生され視床下部の摂食中枢に作用し、他の摂食関連ホルモンと共に食欲を調節する代表的なペプチドホルモンである。申請者らは、これまでに非肥満糖尿病モデルである SDT (Spontaneously Diabetic Torii) ラットにおいて、血漿グレリン濃度の上昇および胃での産生亢進 (グレリン mRNA の増加など) を報告しているが<sup>3)</sup>、肥満や MetS におけるグレリンの摂食調節メカニズムには未だ不明な点も多い。肥満時や高脂肪食によりグレリンの機能が低下し<sup>4)</sup>、そのようなエネルギー代謝異常時にグレリンの摂食促進作用が抑制されているにも関わらず過食などの食行動異常が認められる事に関しては、単にグレリン産生能や感受性のみでは説明できない現象である。

日本においても近年 2 型糖尿病の半数以上は肥満を伴っており、日本人 2 型糖尿病の病態に近い動物モデルでのグレリン動態と摂食に関する基礎研究は、体重・食事コントロールを含めた今後の治療において大変有意

義かつ急務な研究課題である。また、肥満糖尿病モデルにおいてグレリン動態に異常を認めた場合、食事や運動などの介入によりこれらの改善とともに肥満を是正する事ができれば、今や国民病ともいわれる MetS の特定保健指導をはじめとする生活習慣指導において新しい概念を提供できる可能性が期待される

## 2. 研究の目的

肥満の原因の一つである過食は生活習慣病における体重や代謝異常のコントロールを困難なものとする要因である事が多い。本研究では、肥満における食行動異常の有無およびそのメカニズムとしてのグレリンの関与を明らかにすることを目的とする。具体的な研究項目は肥満糖尿病モデル動物における以下の解析である。

(1) 肥満 2 型糖尿病におけるグレリン動態や体組成、代謝パラメーターの解析:

肥満患者において食行動異常はその病態の形成に重要である事が予想される。上記の通り我々は、非肥満 2 型糖尿病モデル SDT ラットにおけるグレリン分泌動態の異常を指摘し、2 型糖尿病における過食のメカニズムとしての可能性を示した。しかしながら肥満患者やモデル動物におけるグレリン分泌動態に関しては未だ一定の見解は得られていない。そこで、肥満を伴う 2 型糖尿病における過食とそれに対するグレリン分泌異常の関連を明らかにする事を目的として以下の検討を行う。

肥満 2 型糖尿病モデル動物として SDT-fatty ラットを用いてにおいて代謝パラメーター (血糖値、インスリン値、コレステロール値など) および体重や内臓脂肪量の測定などを行う。SDT-fatty ラットは、Zucker fatty ラットの肥満遺伝子であるレプチン受容体変異 (*Lepr<sup>fa</sup>*) を SDT ラットの遺伝背景に導入した肥満 2 型糖尿病モデ

ル動物である。離乳直後より過食を呈し糖尿病や肥満を発症し、脂肪肝・脂質異常症・高血圧も呈する事より、MetS のモデルとして適していると考え<sup>5)</sup>。

SDTfatty ラットのグレリン動態の変化を解析し、同モデルの肥満や過食におけるグレリンの病態生理学的意義を明確にする。

(2) 肥満モデルラットのグレリン動態や身体活動リズムにおよぼす自発運動の効果：

運動療法は生活習慣病の予防や治療において有効であり、末梢性の様々な生理活性物質に影響を及ぼすと言われている。その一つである摂食促進ホルモン・グレリンの分泌動態が運動負荷前後において短期的に変化することが報告されているが、長期の運動習慣導入後のグレリン動態に関しては不明な点も多い。一方肥満者には“食行動のずれとくせ”すなわち食リズム異常がしばしば認められ肥満治療を困難なものとしているが、その詳細なメカニズムに関する研究はこれまでほとんどなされていない。肥満の食リズム異常に対する運動の効果およびグレリンの関与を調査する事を目的として以下の検討を行う。

高脂肪食 (HFD) 負荷後の肥満モデルラットを用いて、食リズムや身体活動リズムの異常の有無およびグレリン動態の変化を調査する。

これらの肥満モデルに対して自発運動を導入し、体組成、代謝パラメーター、グレリン動態および摂餌や身体活動リズムに対する効果を調査する。

### 3. 研究の方法

(1) 肥満 2 型糖尿病におけるグレリン動態や体組成、代謝パラメーターの解析：

雄性 SDT fatty ラットあるいは SD ラット (対照群) を 4 週齢から 16 週齢まで普通餌にて飼育した。体重、摂餌量は毎週測定し、摂餌量は、明期 (7:00 ~ 19:00) と暗期 (19:00

~ 7:00) に分けてそれぞれ測定した。8, 16 週齢時に実験動物用マイクロ X 線 CT 装置 (R\_mCT2, 株リガク) により体組成を測定した。4, 5, 6, 8, 16 週齢の時点でイソフルラン吸入麻酔下にて大動脈穿刺により採血、および胃、視床下部組織を採取した。血漿活性型グレリンは RIA 法にて測定した。胃底部組織内のグレリンおよびグレリン活性化酵素 (GOAT) の mRNA を RT-PCR 法にて測定し、胃内グレリン産生能とした。視床下部組織内のグレリン受容体 (GHSR) の mRNA を RT-PCR 法にて測定した。

グレリン分泌の日内リズムを調査する目的で、10 週齢の SDT fatty ラットおよび SD ラットを 7:00, 13:00, 19:00, 25:00 の 4 時点で sacrifice し、血漿および胃の活性型グレリン濃度を測定した。

(2) 肥満モデルラットのグレリン動態や身体活動リズムにおよぼす自発運動の効果：

雄性 SD ラットを用い、4 週齢時から 12 週間高脂肪食 (HFD; 60 kcal%fat) を給与した肥満モデルラットおよびコントロール食 (CD; 10 kcal%fat) を同期間給与した正常ラット各々に対して、6 週齢時から週に 3 日間、1 週間おきに回転かご付エネルギー代謝測定用チャンバー内にて飼育した自発運動群 (HFD-Ex, CD-Ex) あるいは通常ケージ内で飼育した非運動群 (HFD-S, CD-S) の 4 群を作成した。体重および摂餌量は毎週測定し、摂餌量は、明期 (7:00 ~ 19:00) と暗期 (19:00 ~ 7:00) に分けてそれぞれ測定した。16 週齢の時点で、自発活動、エネルギー代謝 (アルコシステム)、および体組成 (マイクロ X 線 CT 装置) を測定した後に sacrifice し、血漿および胃の活性型グレリン濃度およびグレリン、GOAT の mRNA を測定した。

### 4. 研究成果

(1) 肥満 2 型糖尿病におけるグレリン動態や体組成、代謝パラメーターの解析：

SDT fatty ラットは4週齢の時点で著明な過食を認め、16週齢ではSDラットの約2倍の摂餌量であった。体重は16週齢でSDラットに比べて軽かったが、8週齢以降に著明な内臓脂肪量および皮下脂肪量の増加を認めた。血糖値は5週齢以降有意に高値であり、16週齢では800mg/dl前後の著明な高血糖を呈していた。インスリン値は5週齢で著明な高インスリン血症を呈していたが、その後徐々に低下し16週齢では逆にSDラットに比べて有意の低値を認めた。中性脂肪や総コレステロール値も、8週齢以降はSDラットに比べて有意に高値であった。この糖尿病肥満モデルにおいて、いずれの週齢においても血漿活性型グレリン濃度はSDラットに比べて低値であり、胃のGOAT mRNA発現量は16週齢の時点で有意の高値であったが、いずれもSDラットに比べて2倍の摂餌量を説明するには不十分と思われた。さらに視床下部におけるGHSR mRNAの発現は、すべての週齢においてSDT fatty ラットでは有意に低下しており、このようなグレリン抵抗性ともいえる状態においては、本モデルにおける過食をグレリン濃度や感受性のみで説明する事は困難であった(図1)。

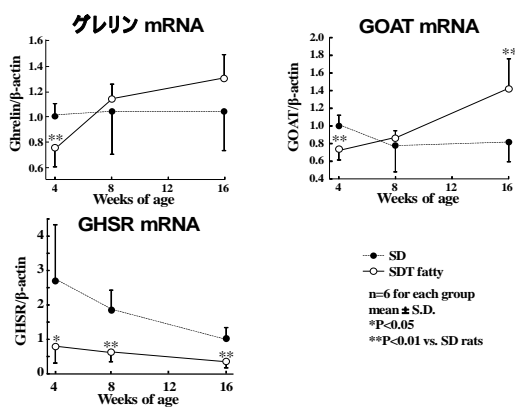


図1. グレリン, GOAT, GHSR mRNA発現量の推移

通常ラットは明期の摂餌行動はほとんど行わないが、SDT fatty ラットにおいては全体の摂餌量のみならず、明期の摂餌量の割合がSDラットに比べて有意に高値であった。これは肥満者にしばしばみられる‘ダラダラ

喰い’を想起させる食リズムの異常であった。従って、グレリン産生もワンポイントのサンプリング(通常はAM9頃に行う)のみならず、その他の時間帯でも測定する必要性を考え、10週齢の時点で7:00, 13:00, 19:00, 25:00の4時点でサンプリングを施行した。図2に示す通り、非常に興味深い事にSDラットにおいては7:00と19:00(明期と暗期の切り替え時点)に明瞭なpeakを有する血漿グレリン濃度の日内変動を認め、胃のグレリン含量はちょうど血漿濃度のmirror imageを呈している事が判明した。一方SDT fatty ラットにおいては血漿、胃ともにグレリン濃度は全体的に低値であり、その日内リズムもSDラットに比べて明瞭ではなく、位相のズレも観察された。従って、今回の肥満モデル動物においては、血漿グレリン濃度が低下していたわけではなく、その日内リズムが不明瞭化し、位相がずれていた事が過食(ダラダラ喰い)と何らかの関連を有する事が示唆された。

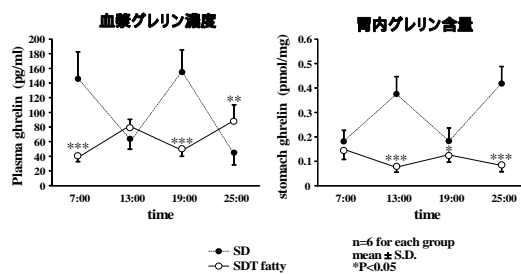


図2. 血漿グレリン濃度, 胃内グレリン含量の日内変動

(2) 肥満モデルラットのグレリン動態や身体活動リズムにおよぼす自発運動の効果:

上記(1)の結果より、肥満モデル動物における摂餌や活動リズムに注目し、実験を進めていった。HFDにより肥満を形成し、回転カゴによる自発運動の効果を検査した。16週齢の時点で、HFD摂取による体重や体脂肪量の増加は、自発運動導入により有意に抑制された。HFD-S群においては明期の活動量や摂餌量の有意の増加を認め、食行動異常を示唆する所見であったが、自発運動の導入

によりこのリズム異常は改善を認めた(図3)

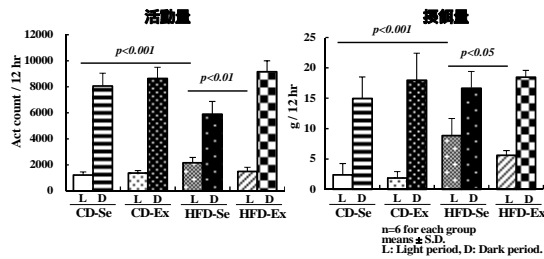


図3. 16週齢における明期, 暗期の活動量と摂食量

HFD-S 群は CD-S 群に比べて血漿グレリン濃度の有意な低下を認めたと、自発運動の導入により HFD-Ex 群において血漿グレリン濃度は回復していた。胃のグレリン mRNA や GOAT mRNA も血漿グレリン濃度と同様の変化を認めた(図4)。

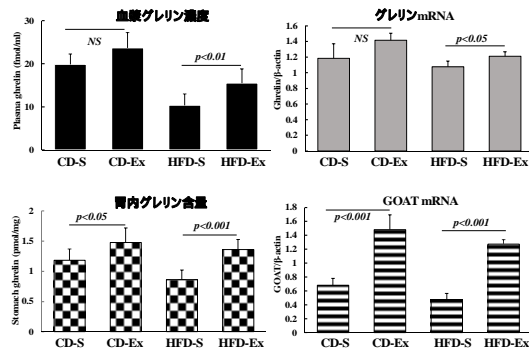


図4. 16週齢におけるグレリン動態の変化

従って、肥満状態の食リズム異常におけるグレリン分泌異常の関与およびそれに対する効果的な介入方法としての運動習慣導入の重要性が示された。

今回は血漿グレリン濃度の日内変動は測定しておらず、グレリンリズムと食リズム異常の関連は、他の食欲関連ホルモンやその日内リズムおよび時計遺伝子の変化などを含めた今後の研究の継続により解明していく予定である。

#### 文献

- 1) Peterson RE, et al. Binge eating disorder mediates links between symptoms of depression, anxiety, and caloric intake in overweight and obese women. *J Obes* 407103, 2012

- 2) Kojima M, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660, 1999
- 3) Mifune H, et al. Increased production of active ghrelin is relevant to hyperphagia in nonobese spontaneously diabetic Torii rats. *Metabolism* 61: 491-495, 2012
- 4) Briggs DI, et al. Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology* 151: 4745-4755, 2010
- 5) Masuyama T, et al. A novel model of obesity-related diabetes: introgression of the *Lepr(fa)* allele of the Zucker fatty rat into nonobese Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats. *Exp Anim* 54:13-20, 2005

#### 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1件)

Hiroharu Mifune, Yuji Tajiri, Yoshihiro Nishi, Kento Hara, Shimpei Iwata, Ichiro Tokubuchi, Ryouichi Mitsuzono, Kentaro Yamada, Masayasu Kojima: Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat diet-induced obese rats. *Peptides* (査読有), 2015 (in press)

[学会発表](計5件)

田尻 祐司, 原 健人, 岩田 慎平, 西 芳寛, 児島 将康, 御船 弘治, 山田 研太郎: 肥満モデルマウスの摂食行動日内リズム異常

と摂食関連ペプチドの関連 .第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 . 2015 年 05 月 21 日 ~ 05 月 24 日 . 東京第一ホテル下関、下関市

田尻 祐司 ,原 健人 ,西 芳寛 ,岩田 慎平 ,山田 研太郎 ,満園 良一 ,児島 将康 ,御船 弘治 : 肥満モデルマウスにおけるグレリン投与後の摂餌行動について . 第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会 . 2015 年 02 月 13 日 ~ 02 月 14 日 , 京都大学医学部芝蘭会館、京都市

御船 弘治 ,原 健人 ,西 芳寛 ,岩田 慎平 ,徳淵 市朗 ,田尻 祐司 ,満園 良一 ,山田 研太郎 ,児島 将康 : 高脂肪食負荷マウスのグレリン日内リズムについて . 第 35 回日本肥満学会 . 2014 年 10 月 24 日 ~ 10 月 25 日 . シーガイアコンベンションセンター , 宮崎市

田尻 祐司 ,原 健人 ,西 芳寛 ,岩田 慎平 ,満園 良一 ,児島 将康 ,御船 弘治 ,山田 研太郎 : 肥満モデルラットのグレリン動態や身体活動リズムにおよぼす自発運動の効果 . 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 . 2014 年 05 月 22 日 ~ 5 月 26 日 . 大阪国際会議場 , 大阪市

田尻 祐司 ,西 芳寛 ,原 健人 ,副島 恵理 ,平田 留美子 ,太田 毅 ,笹瀬 智彦 ,細田 洋司 ,寒川 賢治 ,児島 将康 ,御船 弘治 ,山田 研太郎 : 肥満 2 型糖尿病モデル SDT fatty ラットの過食におけるグレリン分泌異常の関与 . 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 . 2013 年 05 月 16 日 ~ 05 月 18 日 . ホテル日航熊本 , 熊本市

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

田尻 祐司 (TAJIRI, YUJI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号 : 80469361

### (2)研究分担者

御船 弘治 (MIFUNE, HIROHARU)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70174117

### (3)研究分担者

西 芳寛 (NISHI, YOSHIHIRO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号 : 20352122

### (4)研究分担者

山田 研太郎 (YAMADA, KENTARO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号 : 10191305

### (5)連携研究者

児島 将康 (KOJIMA, MASAYASU)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号 : 20202062