

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504019

研究課題名(和文) 肥満の食リズム異常に関わる摂食促進ホルモン・グレリンの役割

研究課題名(英文) The role of ghrelin, an appetite-promoting hormone on abnormal feeding behavior in obesity

研究代表者

御船 弘治 (MIFUNE, Hiroharu)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：70174117

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)：本研究は摂食促進ホルモンのグレリンについて、高脂肪食により生じる食行動異常と肥満制御のメカニズムを明らかにすることを目的とし、高脂肪食下のエネルギー代謝障害におけるグレリンの関与、肥満制御機構に関わるグレリン・摂食リズムの役割、および肥満者の食行動異常と自律神経活動を解析した。本研究により、高脂肪食負荷によりグレリン日内リズムの位相にズレが生じ、明期における摂食量増加の一因である可能性が示唆され、高脂肪食にて生じる食リズム異常には、末梢時計遺伝子の日内リズム異常も関与していることが明らかとなった。また、肥満者において夜間の副交感神経活動が減弱し、QOLの低下をきたしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was undertaken to evaluate the relevance of ghrelin, an appetite-promoting hormone, for the mechanism of eating disorder in high fat diet (HFD)-induced obesity. For this purpose, we investigated roles of ghrelin under energy derangement caused by HFD in animal model, especially its rhythm together with feeding rhythm in the formation of obesity. Furthermore, we evaluated autonomic nervous activity in obese patients in relation to abnormal binge eating behavior often observed in these subjects. In result, diurnal rhythm of ghrelin production was severely shifted by HFD, suggesting its relevance in abnormal feeding behavior characterized by an increase of food intake during light phase. Furthermore, we clarified the participation of peripheral clock genes in the formation of feeding rhythm abnormality. In obese patients, parasympathetic activity was suppressed during night, suggesting a possible contribution to blunted quality of life in these subjects.

研究分野：内分泌学・実験動物学

キーワード：グレリン グレリン遺伝子欠損マウス 高脂肪食 摂食リズム 肥満制御 ニューロメジン 末梢時計遺伝子

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。

グレリンは、1999年に本研究課題の連携研究者である児島ら¹⁾によりラットおよびヒトの胃から発見された28個のアミノ酸からなるペプチドであり、その生理活性として強力な成長ホルモン分泌促進作用を有するだけでなく、摂食促進作用、脂肪蓄積など代謝系に対する様々な作用がみられる。さらに、我々はグレリンの病態・生理学的な新規役割を解明するためのモデル動物として、グレリン遺伝子欠損 (GKO) マウスを作出・維持しており、摂食量や体重増加などに野生型 (WT) マウスと相違が認められず、目立った表現型は見つかっていなかった。しかし最近、我々はGKOマウスでは体温や血圧・心拍数の日内リズムに異常が認められ、交感・副交感神経日内リズムの恒常性が破綻していることを見出した [平成19~20年, 22~24年度基盤研究 (C), 課題番号 19590840, 22500361]。

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²⁾、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の深刻な増加の大きな原因となっている。肥満時や高脂肪食によりグレリンの機能が低下し³⁾、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。ごく最近我々は、高脂肪食下の本GKOマウスではエネルギー消費量の日内リズムが消失 (明期暗期とも同等レベル) し、このような食リズムを含む食行動異常にグレリンが関与することが示唆されるが、その本質的な機序は不明な点も多い。

2. 研究の目的

本研究課題は、以下の二つの目的にて遂行した。

(1) 動物実験：高脂肪食下のエネルギー代謝障害におけるグレリンの関与

グレリン遺伝子欠損 (GKO) マウスを高脂肪食下で飼育すると、エネルギー消費の減少が野生型マウスと比べ顕著であり、体内エネルギー代謝の日内リズムの消失が認められる。このようなエネルギー代謝リズムの変調はグレリンの消失により生じ、高脂肪食などの栄養学的な外的刺激により修飾されると考えられるが、この高脂肪食下のエネルギー代謝障害がグレリンそのものの消失により起こるのか、あるいはグレリンによる摂食リズムの消失により惹起されるのか不明な点も多い。先ず、高脂肪食肥満におけるグレリンの病態・生理学意義を時間栄養学的に理解した上で本研究課題を遂行する必要がある。1) 高脂肪食にて生じるグレリン動態の変化 (経日的変化や日内リズムなど) を、2) 高脂肪食による肥満形成時の摂食・エネルギー代謝リズムの変化、また 3) 摂食・エネルギー代謝リズム調節機構にグレリンが神経あるいは体液性の因子として関わっているのか等を明らかにし、高脂肪食下のエネルギー代謝障害におけるグレリンの病態生理学的意義を明確にする。

(2) 臨床研究：肥満者における自律神経活動の特徴

肥満者には摂食リズム異常を認める場合が多く、肥満と食リズムなど身体活動リズム異常との関連は肥満治療を進めるうえで重要なキーワードであり、病態の解明に繋がることが期待される。しかし、肥満者の活動リズムを詳細に調査した報告は少なく、肥満者の自律神経活動に異常がみられ、健常者と比較して深夜の副交感神経活動が低下し、肥満者の副交感神経活動は日中と夜間に変化が認められないが、その機序は明らかではない。

一方、申請者らはグレリンが交感・副交感神経日内リズムの恒常性に関与していることを報告し [平成 19~20 年, 22~

24年度 基盤研究(C) 課題番号 19590840, 22500361], 肥満者の自律神経活動にグレリンが病態生理学的に関与していることが考えられ, 肥満者の自律神経活動を評価し, その特徴を明確にする。

3. 研究の方法

(1-1) 動物実験: 高脂肪食下のエネルギー代謝障害におけるグレリンの関与 高脂肪食にて生じるグレリン動態の解析:

1) 経日的変動; 高脂肪食を4, 8, 12週間給餌した各々の野生型(WT)マウスのグレリン動態を以下の解析にて比較検討した。

- ・ラジオイムアッセイ(RIA); 血漿・胃内グレリン濃度をRIAにて測定し, 胃内の活性型グレリン産生および血漿への分泌量を定量評価した。
- ・RT-PCR; 胃組織内のグレリンおよびghrelin O-acyltransferase (GOAT: グレリンの脂肪酸修飾酵素)の発現量をRT-PCRにより測定し, 胃組織内のグレリン合成・脂肪酸修飾酵素の変動を定性・定量解析した。

2) 日内変動; WTマウスの普通食給餌(CD; 10 kcal% fat, RESEARCH DIETS Inc.) 群と高脂肪食給餌(HFD; 60 kcal% fat, RESEARCH DIETS Inc.) 群(8週間給餌)の7時, 13時, 19時, 25時, 各時刻に採血・胃組織の採材によりグレリン動態の日内リズム(グレリン変動の振幅により評価)を1)と同様にRIA, PCRにて解析した。

高脂肪食による肥満・摂食・エネルギー代謝リズムの解析: WTおよびGKOマウスの高脂肪食給餌開始前から12週間給餌後までの間, 以下の解析を行った。

- 1) 体重・摂餌量・飲水量・内臓脂肪量; 1週毎に体重・摂餌量・飲水量を測定し, 同時にマイクロX線CT装置(R_mCT2, 株リガク)によるWTおよびGKOマウスの内臓脂肪の変動を観察した。
- 2) エネルギー消費量, 脂肪燃焼, 炭水化物燃焼量; エネルギー代謝測定装置(ア

ルコシステム)を用い, WTおよびGKOマウスにおけるエネルギー代謝(エネルギー消費量, 脂肪燃焼, 炭水化物燃焼量)の変動相違を詳細に検討した。

高脂肪食によるグレリン摂食・エネルギー代謝リズム調節の解析: 8週間高脂肪食給餌後のWTおよびGKOマウスについて以下の方法にて比較検討した。

1) 中枢性, 末梢性調節の解析; 迷走神経胃枝切除後(胃から分泌されるグレリンは迷走神経胃枝を介し中枢性に働く)のWTマウス, グレリン受容体antagonist ([D-Lys3]-GHRP6, BACHEM社)を腹腔内にて浸透圧ミニポンプ(Model 1004, ALZET社)を用いて持続投与後のWTマウスおよびグレリン受容体agonist (GHRP-6, BACHEM社)を腹腔内にて浸透圧ミニポンプ(Model 1004, ALZET社)を用いて持続投与後のGKOマウスと比較検討し, 摂食・エネルギー代謝リズム調節機構としてのグレリンが神経あるいは体液性の因子なのかを明らかにした。

2) サーカディアンリズム(概日リズム)の解析; GKOマウスに認められるエネルギー代謝リズムの変調が24時間周期でない概日リズムの24時間明暗サイクルに同調するリセット機構に起因するのかを確かめるために, 長期恒常暗(21日間)でのGKOマウスおよびWTマウスのエネルギー代謝リズムと自由継続リズム(*free-running rhythm*)の相関を比較検討した。

(1-2) 動物実験: 肥満制御機構に関わるグレリン・摂食リズムの役割

高脂肪食による肥満モデルマウスの摂食抑制関連ペプチドおよび末梢時計遺伝子発現の日内変動: WTマウスの普通食給餌(CD)群と高脂肪食給餌(HFD)群(8週間給餌)の7時, 13時, 19時, 25時における視交叉上核のニューロメジンUとS(摂食抑制因子・概日リズム因子)および胃内のPer2, BMAL1, CLOCKなどの時計遺伝子発現を比較検討した。

高脂肪食負荷マウスにおけるグレリン末梢投与後の摂餌行動：WTマウスのCD群とHFD群（12週間給餌）にグレリン受容体agonist（GHRP-6, BACHEM社）を明期（9時30分，15時30分）および暗期（21時30分，3時30分）に腹腔内投与し，摂餌行動（摂餌量，活動量）を比較検討した。

(2) 臨床研究：肥満者における自律神経活動の解析

対象：肥満または肥満歴を有する入院患者8例（男2例，糖尿病患者6例，50.8 ± 16.8歳，BMI 34.9 ± 10.3m平均 ± 標準偏差）を対象とした。

方法：自律神経活動の評価はActiHR4® (CamNtech社製)を24時間装着し，心拍周期変動の周波数成分のうち副交感神経活動を反映するHF成分と，交感神経と副交感神経の両者の活動を反映するLF成分を抽出し，HF成分を副交感神経活動の，LF/HF比を交感神経活動の指標とした。24時間を6時間毎に分け，深夜(0時～6時)と昼(12時～18時)のHF成分，LF/HF比を比較した。また，Quality of Life (QOL) 評価としてSF-36 (iHope International社製)を施行し，体組成測定をInBody720® (Biospace社製)を用いて行った。

4. 研究成果

(1-1) 動物実験：高脂肪食下のエネルギー代謝障害におけるグレリンの関与

脂肪食にて生じるグレリン動態の解析：

- 1) 経日的変動；野生型 (WT) マウスを用い高脂肪食 (HFD) を4, 8, 12週間給餌後のグレリン動態は，高脂肪食の長期給餌に伴い低くなり，普通食給餌群と比べ有意に低値であった。
- 2) 日内変動；WTマウスの普通食給餌 (CD) 群と高脂肪食 (HFD) 給餌群 (8週間給餌) の7時，13時，19時，25時におけるグレリン動態を比較検討した結果，CD群においては25時に有意に高くなり，7時に有意に低値となる日内リズムが存在し，一方，HFD群では13時に有意に高くなり25時に有意に低くなるCD群と

異なる日内リズムが存在し (図1)，高脂肪食給餌により摂食リズムに異常が生じることが示唆された。

Plasma concentrations of *n*-octanoyl ghrelin

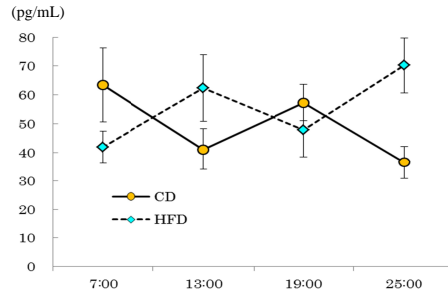


図 1. 高脂肪食(HFD)荷後の肥満マウスでは，グレリン血中濃度が恒常的に低くはなく，グレリン日内リズムの位相にズレが生じていた。

高脂肪食による肥満・摂食・エネルギー代謝リズムの解析：WTおよびGKOマウスの高脂肪食を12週間給餌後の体重増加は，GKOマウスの方が少ない傾向にあり，エネルギー代謝は逆に増加していた。また，GKOマウスでは自発活動量や体内エネルギー代謝の日内リズムの恒常性に異常が認められた (図2)。

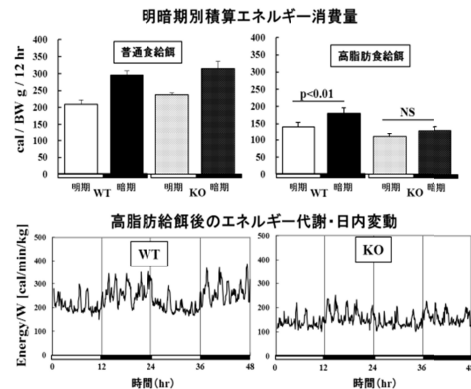


図 2. 高脂肪給餌後，グレリン遺伝子欠損マウス (KO) ではエネルギー消費量が著しく減少し，エネルギー代謝の日内リズムが消失 (明暗期とも同等レベル) していた。

高脂肪食によるグレリン摂食・エネルギー代謝リズム調節の解析：

- 1) 8週間高脂肪食給餌後のWTおよびGKOマウスについて，迷走神経胃枝切除後のWTマウス，グレリン受容体antagonist投与後のWTマウスでは体重増加が抑制され，一方，グレリン受容体agonist投与後のGKOマウスではWTマウスと同様の体重増加が認められた。
- 2) 長期恒常暗 (21日間) でのGKOマウスおよびWTマウスのエネルギー代謝リズム

と自由継続リズム (*free-running rhythm*)の相関に有意な差はなく, GK0マウスの概日リズムに変調は認められなかったことから, 中枢細胞時計のリズム異常は生じていないと考えられた。

(1-2) 動物実験: 肥満制御機構に関わるグレリン・摂食リズムの役割

高脂肪食による肥満モデルマウスの摂食抑制関連ペプチドおよび末梢時計遺伝子発現の日内変動; 視交叉上核のニューロメジンUとSの発現は, HFD群では暗期に有意に高くなり明期に有意に低くなるCD群とは異なる日内リズムが存在した。さらに, 胃内の時計遺伝子発現の日内リズムは, *Per2*においてのみCD群とHFD群とは異なるパターンが存在した。高脂肪食給餌により摂食抑制関連因子においても日内リズムに異常が生じ, 一部の末梢時計遺伝子発現の日内リズムも異常をきたしていることが明らかとなった。

高脂肪食負荷マウスにおけるグレリン末梢投与後の摂食行動: グレリン受容体 agonist を投与すると, CD群では何れの時刻においても摂食行動が認められたが, HFD群では明期に投与すると摂食行動が生じ, 暗期における時刻に投与しても, 摂食行動は発現しなかった。

(2) 臨床研究: 肥満者における自律神経活動の解析

夜間(0時~6時)と昼(12時~18時)のHF成分, LF/HF比を比較した結果, LF/HF比については全例で夜間睡眠中の有意な低下が認められ(夜間 $2.81 \pm 4.29\text{ms}^2$ に対して昼 $5.14 \pm 7.28\text{ms}^2$), 交感神経活動が夜間は低下している事を示していた。

HFについては対象患者8例のうち5例では夜間の上昇(昼 $110.9 \pm 343.8\text{ms}^2$ に対して $469.9 \pm 713.1\text{ms}^2$)を認めたが, 3例では認めなかった(夜間 $95.3 \pm 198.4\text{ms}^2$, 昼 $104.6 \pm 288.0\text{ms}^2$)。

SF-36の結果, 夜間HF成分の上昇が認められた5例は認められなかった3例に比べてQOLのスコアが高かった(心の健康に関する点数が $88.0 \pm 5.7\%$ vs $55.0 \pm 13.2\%$ と有意に高値, 全体的健康感にお

いても高い傾向)。

以上の臨床研究により, 肥満者において夜間の副交感神経活動の減弱はQOLの低下をきたしている可能性が示唆された。

本研究により, 高脂肪食負荷によりグレリン日内リズムの位相にズレが生じ, 明期における摂食量増加の一因である可能性が示唆され, 肥満マウスにおけるグレリン末梢投与による摂食促進効果は, 明期の時間帯により異なり, グレリン日内リズムの位相のズレなど生体リズムの異変によりグレリン抵抗性が変化する可能性がある。また, 高脂肪食にて生じる食リズム異常には, 摂食促進作用を有すグレリン以外の摂食抑制因子や末梢時計遺伝子の日内リズム異常も関与し, また肥満モデルではグレリン末梢投与による摂食行動に異常が生じ, 摂食リズム異常との関連を示唆する結果であると考えられる。

引用文献

- 1) Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-60 (1999).
- 2) Peterson R.E., Latendresse S.J., Bartholome L.T., Warren C.S., Raymond N.C. Binge Eating Disorder Mediates Links between Symptoms of Depression, Anxiety, and Caloric Intake in Overweight and Obese Women. *J. Obes. Epub* 2012 Jun 18.
- 3) Briggs D.I., Enriori P.J., Lemus M.B., Cowley M.A., Andrews Z.B. Diet-Induced Obesity Causes Ghrelin Resistance in Arcuate NPY/AgRP Neurons. *Endocrinology* 151, 4745-4755 (2010).

5. 主な発表論文等

[学会発表](計8件)

原 健人, 坂井勇介, 岩田慎平, 田尻祐司, 西 芳寛, 御船弘治, 児島将康, 山田研太郎: 肥満モデルマウスの摂食リズム異常における胃組織内時計遺伝子とグレリンの

関与 . 第30回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 , 2016.3.11 ~ 3.12 , 大宮ソニックシティ (さいたま市).

Hiroharu Mifune, Yuji Tajiri, Kento Hara, Shimpei Iwata, Yoshihiro Nishi, Masayasu Kojima, Kentaro Yamada: A disrupted rhythm of appetite-regulating hormone is relevant to abnormal feeding behavior in high fat diet induced obese mice. 51th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 2015.9.14 ~ 9.18, Stockholm (Sweden).

坂井勇介, 原 健人, 岩田慎平, 西 芳寛, 田尻祐司, 児島将康, 御船弘治: 肥満モデルマウスの食リズム異常における時計遺伝子発現の関与 . 第2回時間栄養科学研究会 , 2015.9.2 , 早稲田大学国際会議場 (東京).

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におけるグレリン抹消投与後の摂餌行動 . 第88回日本内分泌学会学術総会 , 2015.4.23 ~ 4.25 , ホテルニューオータニ東京 (東京).

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・肥満動物学会年次学術集会 , 2015.2.13 ~ 2.14 , 京都大学医学部創立百周年記念施設 (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 , 2014.10.24 ~ 10.25 , 宮崎シーガイアコンベンションセンター (宮崎市).

御船弘治, 原 健人, 西 芳寛, 岩田慎平, 大木 剛, 田尻祐司, 山田研太郎, 満園良一, 児島将康: 肥満モデルラットにおけるグレリン動態に及ぼす自発運動の効果 . 第 87 回日本内分泌学会学術総会 ,

2014.4.24 ~ 4.26 , 福岡国際会議場 (福岡市).

御船弘治, 原 健人, 岩田慎平, 田尻祐司, 山田研太郎, 満園良一, 児島将康: 高脂肪食負荷ラットのグレリン動態に及ぼす自発運動の効果 . 第34回日本肥満学会 , 2013.10.11 ~ 10.12 , 東京国際フォーラム (東京).

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

御船 弘治 (MIFUNE Hiroharu)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号 : 7 0 1 7 4 1 1 7

(2) 研究分担者

田尻 祐司 (TAJIRI Yuji)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号 : 8 0 4 6 9 3 6 1

(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 : 2 0 3 5 2 1 2 2

(4) 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 : 2 0 2 0 2 0 6 2

(5) 研究協力者

原 健人 (HARA Kento)
坂井 勇介 (SAKAI Yusuke)
岡部 百合 (OKABE Yuri)