

## 論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成25年度 博士課程入学

氏名 小松田 麦子

指導教員名 西原 眞杉

論文題目 摂食制御における自由走行運動の役割に関する研究

### 【背景と目的】

現代の人類、特に先進国の人々にとって肥満は大きな社会問題になっており、その一因には高カロリーな食料の食べ過ぎがある。また、摂食障害、投薬の副作用による食欲低下など、食べる量をうまく調節できない病気も存在する。よって、摂食行動の制御機構を解明し、正常な摂食量を維持するための方法を確立することが求められている。

すべての動物は生きるための栄養源を食べることで得ているため、摂食行動は動物の様々な行動の中でも重要度が極めて高い。脳の視床下部は古くより摂食制御の中核であると考えられており、そこに存在する摂食量を増減させる多種のニューロペプチドとそれらを分泌する神経群が次々と明らかになっている。また、海馬、扁桃体、中脳など情動や報酬系を制御する部位も摂食行動に深く関わっている。さらに副腎、脂肪組織、消化管などの末梢組織から分泌されるグルココルチコイド、レプチン、グレリン等のホルモンが中枢に作用することで、栄養状態に合わせた摂食行動を可能にしている。このように、摂食の制御には非常に多くの機構が多角的に関与している。

摂食行動と同様に見られる動物の本能的な行動に、走行運動がある。実験動物のラットをランニングホイール (RW) のある飼育ケージで飼育すると、夜間には自発的な走行運動が見られ、多い個体では一晩で数千メートルを走る。また RW での自由走行運動はげっ歯類にとって餌や、ニコチン、アンフェタミンなどの中毒性のある薬物と同様に報酬として機能することが知られ、RW へ入ることを報酬にしたレバー押しの学習行動が成立するほどである。他にも、海馬における神経新生を亢進させる、認知機能を向上させるなど、自由走行運動は中枢神経へも大きな影響を与えることがわかっている。

さらに、様々な過食モデル動物を用いた実験によって、RW での自由走行運動が摂食量や餌の選択に影響することがわかってきた。著者の所属研究室で以前作出されたヒト成長ホルモン (hGH) 遺伝子導入ラット (TG) は、乳清酸性タンパク質プロモーター下流で発現する hGH が末梢血中で低濃度に、中枢で高濃度に分泌され、なおかつ内因性のラット GH の分泌が抑制されているという GH 分泌動態を示す。この TG は幼若期から同腹の野生型ラット (WT) に比べて過食と肥満を示すことから、過食性肥満のモデル動物として研

究が進められてきた。

そこで本研究では、過食モデル動物である TG を用いて、摂食制御において自由走行運動が果たす役割の、より詳細な機構を明らかにすることを目的とした。第 1 章では RW を用いて、自由走行運動が過食を示す TG の摂食量を変化させるかを調べた。第 2 章では、TG で見られる過食や脱毛、中心性肥満といった表現型からグルココルチコイド、中でもげっ歯類で最も生理活性の高いコルチコステロンの過剰分泌が起きていることを疑い、さらにこれが TG の過食に与える影響について検討した。第 3 章では、自由走行運動によって活性化する脳部位を探索し、摂食量の制御に関与する因子の同定を試みた。

## 【方法と結果】

第 1 章では WT と TG を RW のある飼育ケージおよび通常ケージで飼育し、自由走行運動が摂食量に与える影響を調べた。RW ケージでの飼育により、WT では摂食量は変化しなかったが、遺伝的に過食を示す TG では摂食量が減少し、WT と同量の正常な摂食量が長期間にわたって維持された。この自由走行運動が TG の摂食量を正常に保つ効果は、RW ケージでの飼育を離乳直後の 4 週齢から開始した場合と成長後の 10 週齢から開始した場合で全く同様に起きた。さらに、RW を飼育の途中で固定して走行運動を抑止すると TG の過食が即時に再発した。なお、自発的な走行量は WT では成長とともに増加したのに対し、TG では漸減し 12 週齢以降には WT の 1/10 以下にまで減少したが、摂食量への効果は変わらず維持されていた。以上より、RW での自由走行運動は TG の摂食量を正常化し、その効果は走行量や週齢には依存せず、また、可逆的なものであることがわかった。なお、これらのラットで視床下部の各種ニューロペプチドとその受容体の遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR により比較したが、自由走行運動による TG の摂食量の正常化に関連付けられるような発現量の変化は認められなかった。

第 2 章では、TG の体内でコルチコステロンが過剰分泌されていることを疑い、コルチコステロンが TG の摂食量に与える影響を検討した。TG の血中コルチコステロン濃度は 200 ng/ml を超える高値を示し、副腎は両側性に肥大していた。一方で血中の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の濃度や視床下部の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) の遺伝子発現量は WT-TG 間に差が認められなかった。TG に副腎摘出 (ADX) 処置をすると摂食量が減少し、WT と同程度の量が実験終了まで 2 週間以上維持された。さらにこの ADX 処置をした TG にコルチコステロンを連続的に皮下投与したところ、過食が再発した。一方で、WT においては、ADX 処置も TG の血中濃度を再現する高濃度のコルチコステロンの投与も摂食量には全く影響しなかった。以上より TG の体内では、コルチコステロンが過剰に分泌されていること、さらにコルチコステロンの摂食量増加作用への反応性が亢進していることが、過食を引き起こしていることが示唆された。

第 3 章では、自由走行運動により活性化する脳部位を探索し、摂食量の制御に関与する因子の同定を試みた。走行運動と摂食行動が活性化する暗期の初期において興奮性が変化する脳部位を特定するため、神経興奮のマーカーである c-fos の免疫組織染色法を用いて、興奮状態の変化する神経核の探索を脳全体で網羅的に行った。その結果、RW ケージで飼育していたラットでは通常ケージでの飼育に比べて、扁桃体内側核と背側縫線核の c-fos 陽性細胞数が 10 倍以上に増加していることがわかった。さらに、サンプリングの 3.5 時間前に RW を固定した場合には、この神経興奮は見られなかった。そこで次に、これらの神経興奮の変化によって摂食制御に関与する因子の発現量に変化している可能性を検討した。まず、摂食量の制御に関わる遺

伝子の候補を探索するため、DNA チップを用いた解析により扁桃体内側核と背側縫線核の遺伝子発現量を RW ケージと通常ケージで飼育した TG で比較した。扁桃体内側核では RW ケージでの飼育で発現量が 2 倍以上増加したものが 6 遺伝子、0.5 倍以下に減少したものが 13 遺伝子確認された。これらのうち、RW ケージでの飼育で発現量の増加が見られた遺伝子の中から、摂食量を減少させる作用があり、かつグルココルチコイドによって発現が抑制される性質のあるプロスタグランジン類の合成酵素である cyclooxygenase-2 (COX-2) に注目した。COX-2 阻害剤 (NS-398) を脳室内投与したところ、通常ケージ飼育下の TG では摂食量が変化しなかったが、RW ケージ飼育下の TG では摂食量減少が阻害された。このことから、自由走行運動による TG の摂食量正常化には COX-2 の働きが関与していることが示唆された。背側縫線核をサンプルに用いた DNA チップでは、摂食量の制御に関わる遺伝子発現量の変化は確認されなかった。そこで、自由走行運動により興奮した神経群が背側縫線核に細胞体が多く存在するセロトニン (5-HT) ニューロンまたはドーパミンニューロンである可能性を考え、5-HT とドーパミン合成酵素の Tyrosine Hydroxylase (TH) との c-fos の二重免疫組織染色を行った。C-fos 陽性細胞のうち 5-HT、TH と共陽性であったものはそれぞれ全体の約 5%、約 40% であった。そこで、背側縫線核に細胞体が存在するドーパミンニューロンの主な投射先である側坐核におけるドーパミン受容体の遺伝子発現量を比較したところ、WT では差が認められなかったが、TG では 1 型、2 型受容体ともに RW ケージでの飼育によって発現量が増加した。このことから、自由走行運動がドーパミンニューロンの興奮性と受容体の発現量の双方向から、ドーパミンシグナルを増強していることが示唆された。

#### 【考察と結語】

COX-2 は感染による炎症時に生じる摂食量減少に関与することが知られている。グルココルチコイドには COX-2 の発現量を抑制する働きがあるため、高コルチコステロン血症を示す TG の中枢は COX-2 の発現上昇が起きにくい環境であると考えられる。しかし RW による COX-2 遺伝子発現量の上昇は WT と TG で同じように見られたことから、走行運動はグルココルチコイドの働きとは独立に COX-2 の発現を増加させ、摂食量を抑制できると考えられる。

また、背側縫線核のドーパミンニューロンは、側坐核や前頭皮質など、報酬系の主要な神経回路である A10 ドーパミンニューロンと類似の部位に投射している。したがって、自由走行運動は背側縫線核のドーパミンニューロン群を興奮させることで、餌の代替となる報酬として機能し、薬物と同様のメカニズムで摂食量を抑制していると考えられる。

本研究により、自由走行運動による摂食の制御機構は、古典的に代謝・摂食の制御中枢であると考えられてきた視床下部ではなく、情動や報酬を司る神経系である縫線核および扁桃体を介していることが新たに見出された。過去の研究で報告されている他の過食モデル動物を用いた実験結果では、走行運動が摂食量に与える影響は微弱あるいは一過性のものであったため、今回 TG で観察された RW ケージでの飼育によって摂食量が長期間正常に保たれるという現象は、過食の治療という面ではより望ましい効果であると言える。本研究で新たに見出された、自由走行運動が摂食量を制御する機構をターゲットにすることで、新しい摂食障害の治療法が確立されることが期待できる。