

視床下部で新たに発見した神経ペプチドによる 三大栄養素の嗜好性に関する研究

岩越 栄子

広島大学大学院総合科学研究科 博士研究員

緒 言

現在の飽食の時代にメタボリックシンドローム対策やダイエットが叫ばれているが、根本的な食欲をもたらす脳内分子メカニズムはいまだ不明なことが多い。先行研究によれば、メタボリックシンドロームの原因は肥満ではなく過食であり、過食を抑えることこそが高脂血症、高血圧症、糖尿病の予防や治療に繋がることが指摘されている¹⁾。これまでに摂食行動に関わる脳内因子が数多く報告されているが、我々は未知の調節因子の探索を目指して研究を開始した。その結果、鳥類(ニワトリ)や哺乳類(ヒト、ラット、マウス)において間脳の視床下部に特異的に発現している新規遺伝子を最近発見した²⁾。この視床下部領域は、ラットでは弓状核を含んだ部位であり、摂食調節中枢のひとつである。絶食、肥満モデル、糖尿病モデル動物を用いた遺伝子発現解析から、新規遺伝子の発現量が変動することを見出し、エネルギーホメオスタシスに関与していると予測している。さらに、新規遺伝子から翻訳されるタンパク質には分泌性ペプチドがコードされていると推測しており、実際に前駆体遺伝子から成熟神経ペプチドが産出されることも確認している。そのC末端部分の配列から、この神経ペプチドをNeurosecretory protein GL(NPGL)と命名した²⁾。NPGLをラットの脳室内へ慢性投与すると、通常食では摂食行動へ影響を及ぼさないが、高カロリー食給餌条件下では、摂食行動の亢進が認められた。予備的解析から、高脂肪食と高シヨ糖含有脂肪食の2種類の飼料で解析を行ったところ、高脂肪食ではなく、高シヨ糖含有脂肪食に対する嗜好性が高まること示された。しかしながら、用いた高カロリー食は成分含有量が非公開であったため、嗜好性の同定には、正確な成分含有量が公表されている飼料を使用する必要がある。本研究の目的は、炭水化物、脂肪、タンパク質量が正確に公表されている飼料を用いることで、新規神経ペプチドのNPGLによる三大栄養素に対する嗜好性を明

らかにすることである。

結 果

1. コントロール食、高脂肪食、高シヨ糖食、高シヨ糖含有脂肪食給餌条件下での摂食行動の解析

実験動物としてWistar系統の8週齢の雄ラットを用いた。

飼料は、組成を公表しているリサーチダイエツ社製の製品を用いた。通常のげっ歯類用のコントロール食(Normal Chow; NC、10% Fat kcal%・7% Sucrose kcal%)、高脂肪食(High Fat Diet; HFD、60% Fat kcal%・7% Sucrose kcal%)、高シヨ糖食(High Sucrose Diet; HSD、70% Sucrose kcal%)、高シヨ糖含有脂肪食(High Fat and Sucrose Diet; HFSD、32% Fat kcal%・20% Sucrose kcal%)を用いた。

NPGLは、ペプチド合成機で合成し³⁾、15 nmol/dayの投与量になるように溶解し、Alzet社の浸透圧ポンプに充填した。脳室内カニューレを装着し、背側皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプと接続し、2週間の慢性投与を行った。12時間の明暗周期条件にて飼育し、明期と暗期の摂食量を測定した。摂食量はカロリー表示とした。

その結果、コントロール食(NC)、高脂肪食(HFD)、高シヨ糖食(HSD)給餌条件下では、NPGL投与により顕著な摂食量の変化は認められなかった。しかしながら、高シヨ糖含有脂肪食(HFSD)給餌条件下では、NPGL投与により、明期の摂食量が顕著に増加した(図1)。この間、NPGLは体重に影響を及ぼさなかった(図1)。

また、血糖値の変化は認められなかったが、NC給餌以外のHFD、HSD、HFSD給餌条件下において、血中レプチン濃度がNPGL投与により有意に増加した(図5)。

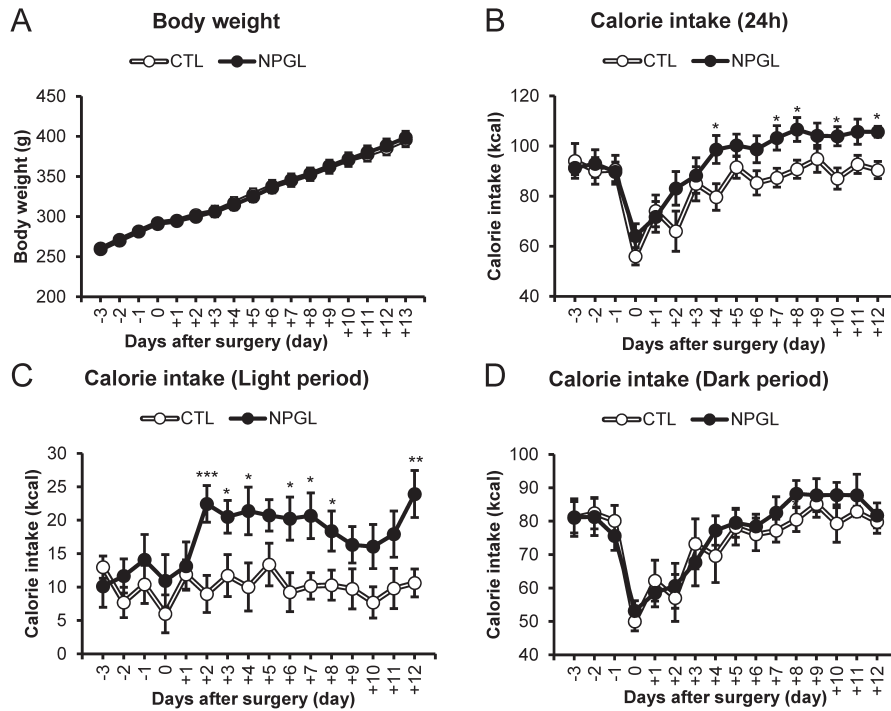


図1 HFSD 給餌条件下でのNPGL慢性投与における摂食量

(A) 体重、(B) 24時間の摂取カロリー、(C) 明期の摂取カロリー、(D) 暗期の摂取カロリー。(n=8) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ 。

2. 三大栄養素飼料（タンパク質食，炭水化物食，脂肪食）選択給餌条件下での摂食行動の解析

三大栄養素であるタンパク質、炭水化物、脂肪のみからなる3種類の粉末飼料を給餌箱に個別に入れ、ラットに自由摂餌を行わせ、それぞれの摂食量を測定した。摂食量はカロリー表示とした。

この三大栄養素飼料選択給餌条件下においてNPGLを脳室内へ慢性投与した結果、体重に有意な差は認められなかった。24時間の摂食量に関して、三大栄養素飼料の総摂食量が有意に増加していた（図2）。個別の栄養素飼料に関しては有意な変化は認められなかったが、炭水化物食の摂食量に増加傾向が認められた。明期における摂食量に関して、炭水化物の摂食量が有意に増加していた（図3）。暗期の摂食量に関して、いずれの飼料においても有意な差は認められなかった（図4）。

また、血糖値の変化は認められなかったが、血中レプチン濃度がNPGL投与により有意に増加した（図5）。

3. 三大栄養素飼料（タンパク質食，炭水化物食，脂肪食）選択給餌条件下での視床下部摂食調節関連因子の遺伝子発現解析

摂食調節中枢である視床下部内側基底部において、

摂食行動を調節する因子のmRNA発現量の解析を行った。以下の摂食調節関連因子について測定を行った。摂食促進因子であるニューロペプチドY (Neuropeptide Y; NPY)、摂食抑制因子の α -メラノサイト刺激ホルモンの前駆体であるプロオピオメラノコルチン (Pro-opiomelanocortin; POMC)、摂食促進因子のアグーチ関連ペプチド (Agouti-related peptide; AgRP)、レプチンシグナルに関わるSH2 domain-containing phosphatase 2 (SHP2)、suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)、protein tyrosine phosphatases 1B (PTP1B)、phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)、T-cell protein tyrosine phosphatase (TC-PTP)、レプチン受容体のOb-Ra receptor (Ob-Ra) およびOb-Rb receptor (Ob-Rb) である。これらに対する特異的なプライマーを用いてリアルタイムRT-PCR解析により相対定量を行った。

その結果、いずれの遺伝子もコントロールと比べNPGL投与による有意な変化は認められなかった（図6）。

考 察

結果1に記したNC、HFD、HSD、HFSD給餌条件下

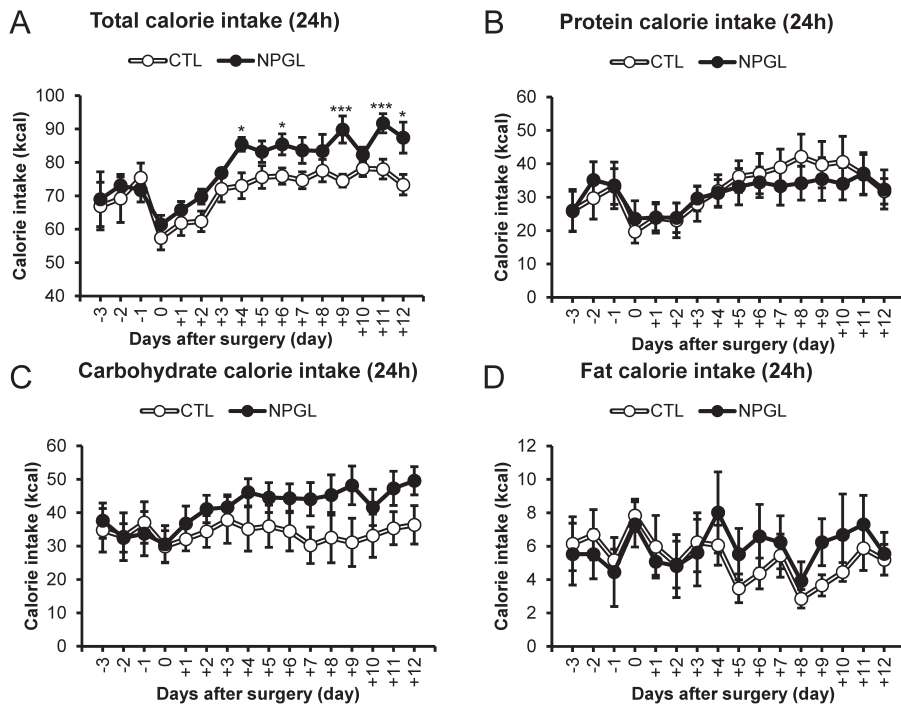


図2 三大栄養素飼料選択給餌条件下でのNPGL慢性投与における24時間ごとの摂取量

(A) 総摂取カロリー、(B) タンパク質の摂取カロリー、(C) 炭水化物の摂取カロリー、(D) 脂肪の摂取カロリー。(n=8) * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ 。

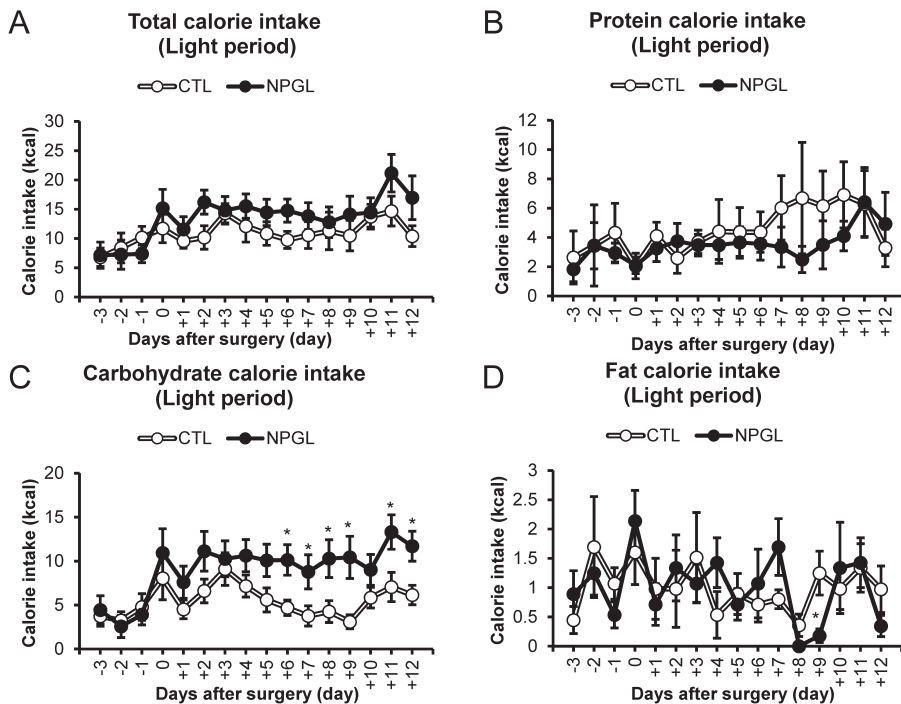


図3 三大栄養素飼料選択給餌条件下でのNPGL慢性投与における明期の摂取量

(A) 総摂取カロリー、(B) タンパク質の摂取カロリー、(C) 炭水化物の摂取カロリー、(D) 脂肪の摂取カロリー。(n=8) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

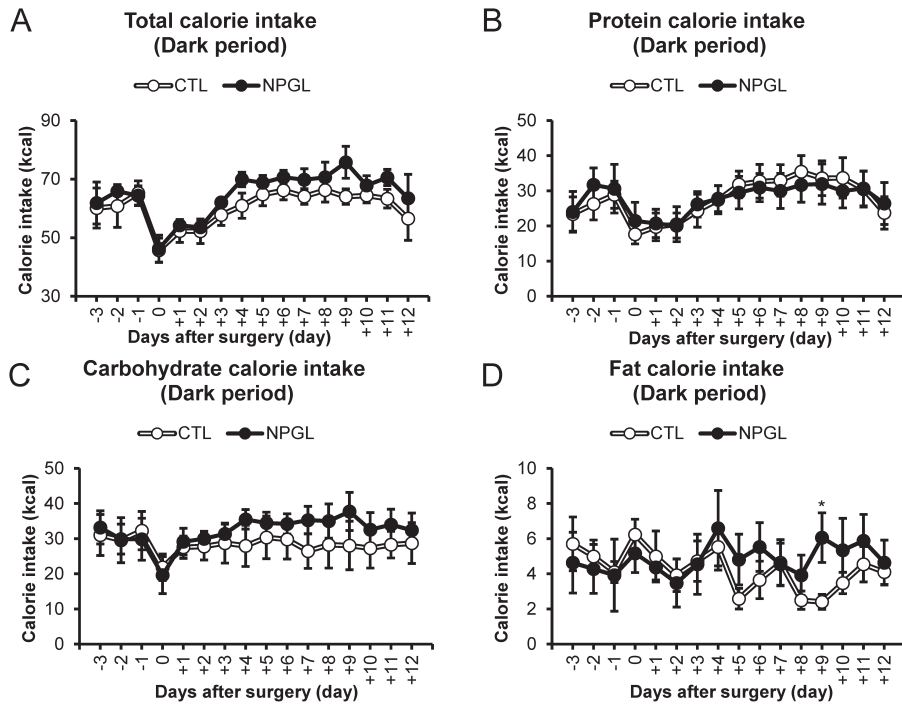


図4 三大栄養素飼料選択給餌条件下でのNPGL慢性投与における暗期の摂食量

(A) 総摂取カロリー、(B) タンパク質の摂取カロリー、(C) 炭水化物の摂取カロリー、(D) 脂肪の摂取カロリー。(n=8) **p*<0.05。

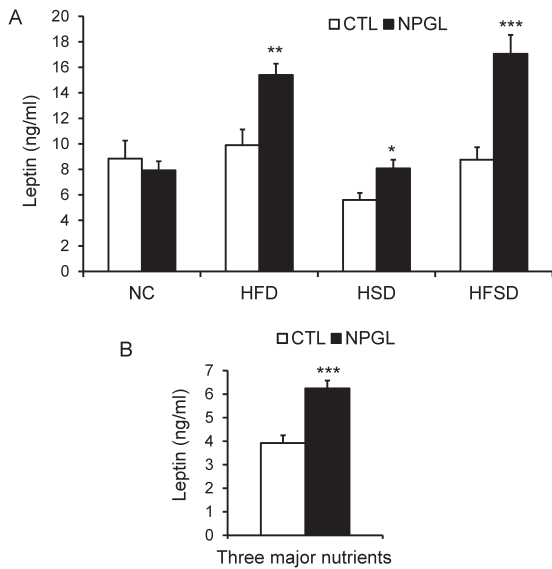


図5 各種飼料給餌条件時の血中レプチン濃度

(A) NC、HFD、HSD、HFSD 給餌条件下、(B) 三大栄養素選択給餌条件下。(n=8) **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.005。

でのNPGL慢性投与の結果、NPGLはシヨ糖と脂肪の両成分が多量に含まれた飼料であるHFSDへの摂食行動を増強することが示された。さらに、HFD、HSD、HFSDの高カロリー飼料を用いた場合に、血中レプチン濃度の有意な増加が認められた。レプチンは特に炭水化

物食（高シヨ糖食）に対する摂食抑制効果を示す因子として報告されている⁴⁾。また、高脂肪食の摂取により、レプチンの効果が減弱されるレプチン抵抗性が促進されることが知られている。今回の解析ではHFSD給餌条件下でのみNPGLによる摂食促進効果が認められたことから、HFSD給餌条件下において特に強いレプチン抵抗性が促進されていたことが示唆された。つまり、高脂肪食により生じるレプチン抵抗性がNPGLによりさらに促進し、シヨ糖をより好むようになったと考えられる。一方、HFD給餌条件下ではレプチン抵抗性は促進していたが、シヨ糖の含有量が少ないために摂食量の増加が生じなかったと推察される。また、HSD給餌条件下で摂食量の有意な増加が認められなかったのは、シヨ糖の含有量が高いものの、脂肪の含有量が少ないためにレプチン抵抗性の促進が弱かったためだと考えられる。これは、HSD給餌条件下のレプチンレベルが低いことから支持される考えである（図5）。これらの結果より、「NPGLはレプチン抵抗性を促進させ、シヨ糖への食嗜好を増強する」という可能性が考えられた。そこで、次に三大栄養素飼料を用い、炭水化物食（高シヨ糖食）を選択的に摂取するかどうかを検討した。その結果、炭水化物食（高シヨ糖食）を選択的に摂取することが明らかになった。

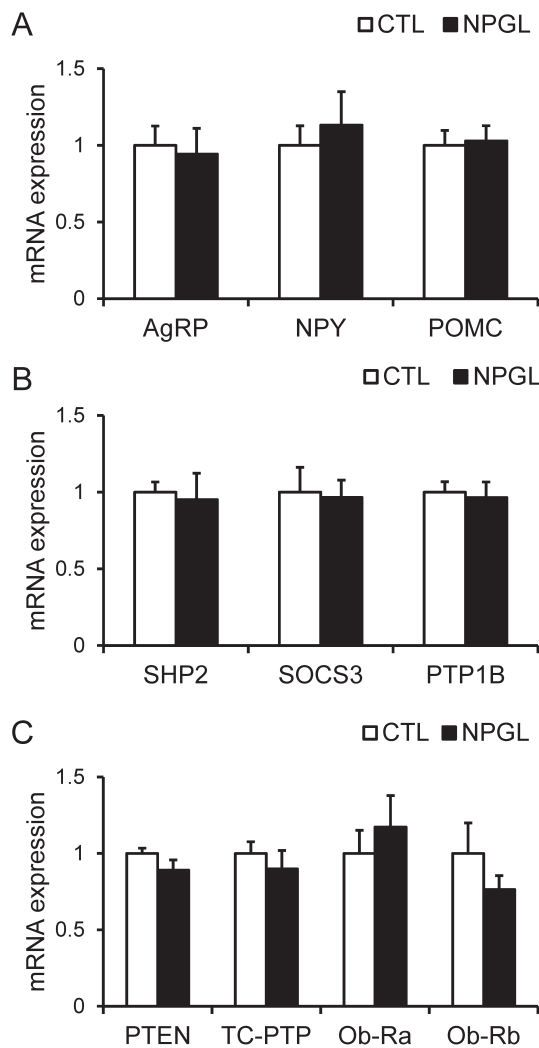


図6 三大栄養素飼料選択給餌条件下でのNPGL慢性投与における視床下部摂食調節関連因子のmRNA発現量

(A) AgRP、NPY、POMCのmRNA発現量、(B) SHP2、SOCS3、PTP1BのmRNA発現量、(C) PTEN、TC-PTP、Ob-Ra、Ob-RbのmRNA発現量。(n=8)

結果2に記した三大栄養素飼料給餌条件下での解析では、脂肪の摂取量がそれほど多くないにも関わらず、レプチン抵抗性の促進が示唆された。これには摂食行動の時間帯が関係していると推測される。実際に、明期の炭水化物食(高シヨ糖食)の摂食量が有意に増加している。同じ脂肪食を与えていても、決まった時間(暗期のみ)に摂食させる群と自由摂食をさせる群では、同様の摂食量にも関わらず後者の方が肥満になることが報告されており、代謝が活発でない明期の摂食行動が肥満を誘導する可能性がある⁵⁾。これに関して、活動期の暗期を前半後半として区別したとき、摂食行動は、暗期の前半に生じることが一般的に知られている。したがって、摂食

量が同様であっても、明期や暗期の後半に摂食することで肥満を呈しやすく、レプチン抵抗性が促進されやすいことも予想される。三大栄養素飼料給餌実験では脂肪の摂食量は同等であるが、摂食時間が異なるためにレプチン抵抗性の促進が生じたのかもしれない。つまり、NPGLは摂食リズムに関与している可能性が考えられる。いずれの飼料を用いた実験においても、暗期に比べ明期における摂食量が増加していることも、この可能性を支持している。今後、NPGLが摂食リズムに関与していることを調べるために、時計遺伝子のmRNA発現への影響や、NPGL慢性投与時に明期の飼料を取り除くことで、脂肪蓄積が生じなくなる可能性について検証する必要がある。

さらに結果3に記したNPGLとレプチン抵抗性の関連性について、既知の摂食調節因子に加え、レプチンシグナル経路のmRNA発現解析を行った。レプチンシグナルを減弱する因子としてSOCS3、PTP1B、PTEN、TC-PTPが知られ、増強する因子としてSHP2が報告されている⁶⁾。また、末梢から脳にレプチンを輸送するレプチン受容体のOb-Raおよび視床下部に発現しているレプチン受容体Ob-Rbについての解析も行った。しかし、この解析において、これらの因子のmRNA発現変動は認められなかった。今回の実験ではmRNA発現量のみを測定したが、タンパク質レベルで変動している可能性があるため、今後はウエスタンブロット等の解析を行う必要があると考えている。NPGLがレプチン抵抗性を生じさせる分子メカニズムの解明が急がれる。

要約

本研究では、飼料組成が公表されているコントロール食(NC)、高脂肪食(HFD)、高シヨ糖食(HSD)、高シヨ糖含有脂肪食(HFSD)を用いてNPGLの脳室内慢性投与を行った。その結果、HFSD給餌条件下でのみ摂食量が有意に増加した。さらに詳細な解析を行うために、三大栄養素飼料(タンパク質食、炭水化物食、脂肪食)選択給餌条件において、NPGLの慢性投与を行った。その結果、炭水化物食(高シヨ糖食)の摂食量が有意に増加した。また、血中レプチン濃度が増加したことから、シヨ糖への食嗜好性亢進の原因は、レプチン抵抗性の促進による可能性が示唆された。ヒトの肥満者は血中レプチン濃度が高いにも関わらず、その本来の摂食抑制やエネルギー代謝亢進作用が生じないレプチン抵抗性が生じることで、益々過食と肥満が進むことが知られて

いる。本研究により、NPGLがレプチン抵抗性を引き起こし、ショ糖への嗜好性を高める働きがあることを見出した。今後、レプチン抵抗性の発症メカニズムの解明を進めることで、甘いものへの嗜好性の高まりを抑え、過食や肥満を防止できる可能性がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、学術研究奨励金を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行は、所属研究室の浮穴和義博士、近藤邦裕氏、鹿野健史朗氏、益田恵子氏らの協力により

なされたものです。この場をお借りして感謝いたします。

文 献

- 1) M. Y. Wang, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 6139-6144, 2008.
- 2) K. Ukena, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **446**, 298-303, 2014.
- 3) K. Masuda, et al.: *J. Pept. Sci.*, **21**, 454-460, 2015.
- 4) S. Wetzler, et al.: *Physiol. Behav.*, **83**, 65-72, 2004.
- 5) M. Hatori, et al.: *Cell Metab.*, **15**, 848-860, 2012.
- 6) J. St-Pierre, M. L. Tremblay: *Cell Metab.*, **15**, 292-297, 2012.