

## 論 文 要 旨

## Comparison of the anorexigenic activity of CRF family peptides

### 〔 CRF ファミリーペプチドにおける 摂食抑制作用の比較に関する研究 〕

田 中 千 絵

#### 【序論および目的】

Corticotropin releasing factor (CRF) は、41 アミノ酸残基のペプチドホルモンの1つである。CRF に加え Urocortin1 (Ucn1)、Urocortin2 (Ucn2)、Urocortin3 (Ucn3) が CRF ファミリーペプチドとして発見されている。近年、摂食調節において、CRF システムの関与が明らかになってきているが、我々の知る限り、これらの CRF ファミリーペプチドの摂食抑制効果を同時に比較した研究は未だ皆無である。本研究は、①マウスに CRF ファミリーペプチドの腹腔内 (IP) 投与を行い、摂食と体重増加に及ぼす効果を比較することでそれぞれの作用強度の違いを明らかにすること、②高脂肪食を摂食させたマウスに CRF ファミリーペプチドの IP 投与を行い高脂肪食摂食下での作用強度の違いを明らかにすること、③高脂肪食摂食により肥満化させたマウスに CRF ファミリーペプチドの連続 IP 投与を行い、摂食と体重増加、さらに脂肪組織、体温、血糖値、血液成分や血清グレリンに及ぼす影響を比較し、それぞれの作用強度の違いを明らかにすることを目的とした。

#### 【材料および方法】

##### ・動物

雄性 C57BL/6J マウス (6-7 週齢) を鹿児島大学フロンティアサイエンスセンターにて、一定の環境下で個別に飼育。餌および水は自由摂取させ実験に用いた。

##### ・被験薬物

被験薬物として CRF (MW4757.52; purity  $\geq$  95%)、Ucn1 (MW4707.33; purity  $\geq$  95%)、Ucn2 (MW4152.59; purity  $\geq$  95%)、Ucn3 (MW4171.56; purity  $\geq$  95%) (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., CA, USA) を用いた。被験薬物は実験直前に 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) を含んだ 0.9% 生理食塩水 100 $\mu$ l に溶解、いずれも溶解液をコントロールとして用いた。

##### ・IP 投与

日中の実験では、16 時間絶食後 (飲水は自由摂取)、被験薬物およびコントロールの IP 投与を行った。投与濃度は 0.3nmol と 0.1nmol/マウスの 2 条件行った。また、夜間においては、食餌、飲水は自由摂取とし、消灯直前に (0.3nmol/マウス) IP 投与を行った。それぞれ、投与後 20 分、1、2、4、8、12、24、48 時間の摂食量、投与後 0、24、48 時間の体重測定を行った。

##### ・高脂肪食摂食マウスにおける IP 投与

2 週間高脂肪固形食を摂食させ、実験を行った。日中、16 時間絶食後 (飲水は自由摂取)、IP 投与を行い (0.3nmol/マウス)、投与後 20 分、1、2、4、8、12、24、48 時間の摂食量、投与後 0、24、48 時間の体重測定を行った。

##### ・高脂肪食摂食により肥満化させたマウスにおける連続 IP 投与

高脂肪固形食を4週間摂食させ肥満化したマウスに、1日1回被験薬物(3nmol/マウス)の投与を連続5日間行った。摂食量および体重測定は毎日行った。最終日のIP投与後マウスを4時間絶食させ、体温、血糖値測定を行い、血液サンプルを採取し、肝臓、内臓脂肪を取り出しそれぞれ重量測定を行った。血液サンプルからインスリン、コレステロール、中性脂肪、アシルグレリン濃度測定を行った。

#### 【結果】

① CRFファミリーペプチドIP投与後の摂食抑制および体重増加抑制作用の比較。

日中、夜間のすべての実験において、摂食抑制、体重増加抑制作用はUcn1が最も強力であった。CRFとUcn2の作用強度は条件によって順位が入れ替わり、Ucn3が最も弱い傾向にあった。

② 高脂肪食摂食下での作用強度の比較。

通常食を摂食させたマウスに比較して高脂肪食を摂食させたマウスの方がすべてのペプチドにおいて、作用がより強力に認められた。また、通常食摂食時と同様Ucn1の作用が最も強かった。

③ 高脂肪食摂食により肥満化したマウスにおける、CRFファミリーペプチド5日間連続IP投与の摂食、体重、脂肪組織、体温、血糖値、血液成分や血清グレリンに及ぼす作用の比較。

Ucn1とCRFは連続投与により、有意に摂食抑制、体重増加抑制が認められた。CRF、Ucn1、Ucn2は有意に血糖値を低下させた。Ucn1はアシルグレリン値を有意に減少させたが、Ucn2は有意に増加させた。Ucn1はインスリン値を増加させる傾向を認めたが、有意差は認めなかった。CRFはUcn1と似たような傾向を示した(有意に血糖値を減少させ、アシルグレリン値を減少、インスリン値を増加させる傾向)。CRFとUcn3は有意に肝臓重量を減少させた。Ucn1は有意に体温を上昇させ、内臓脂肪の重量を減少させた。Ucn1とCRFは有意にコレステロール値を増加させたが、中性脂肪値はどのペプチドにおいても有意差は認めなかった。

#### 【結論及び考察】

本研究において、末梢投与ではCRFファミリーペプチドの中でUcn1が最も強く、長く摂食抑制および体重増加抑制効果を認めることが明らかになった。過去の研究において、Ucn1はCRFと比較してより強力な食欲減少作用を認めるとの報告がある。本研究においても、その結果と矛盾せず、さらに、Ucn2およびUcn3よりも摂食抑制、体重増加抑制効果が強いことが示された。Ucn1はCRFR1よりCRFR2に高親和性である。摂食抑制において、Ucn1がCRFと比較し強力であり、Ucn1のほうがCRFと比較しCRFR2に高親和性であることから、満腹感にはCRFR2がより関係していると考えられている。さらに、Ucn1が最も摂食抑制効果が高いことから、CRFR1とCRFR2両方に結合し、相乗効果を発揮している可能性が考えられる。

肥満の要因の一つとして、手軽な高カロリー食の過食が考えられる。これまでの研究において、高脂肪食を摂食させた動物は低脂肪食を食べさせた動物と比較してストレスにより大きく反応することが報告されている。これは、高脂肪食摂取が慢性ストレスとしての因子を持っているのではないかと推察されている。本研究においても通常食を摂食させたマウスに比較して高脂肪食を摂食させたマウスのほうがCRFファミリーペプチドの効果がより強力に認められた。さらに、このことは過食やストレスの多い生活スタイルによる肥満や糖尿病の臨床応用の可能性も秘めていると考えられる。

Ucn1の効果は摂食抑制、体重増加抑制のみならず、高脂肪食摂食肥満マウスにおいて、連続投与を行うことで、有意に血糖値を低下させ、内臓脂肪を減少させた。加えて、食欲を増進させ、体重増加へとつながる、アシルグレリン値を減少させた。

これらの結果から、Ucn1のメカニズム解析は肥満治療の有効な薬物治療につながる可能性があるのではないかと考えられる。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 83 号	学位申請者	田中 千絵
審査委員	主査	杉原 一正	学位 博士(歯学)
	副査	佐藤 友昭	副査 於保 孝彦
	副査	堀内 正久	副査 松山 孝司

**Comparison of the anorexigenic activity of CRF family peptides**

(CRF ファミリーペプチドにおける摂食抑制作用の比較に関する研究)

世界では肥満が年々増加し、大きな社会的問題となってきた中、近年、多数の摂食調節関連ペプチドの存在が報告され、複雑な摂食調節のメカニズムの存在が明らかとなりつつある。Corticotropin releasing factor (CRF) は、41 アミノ酸残基のホルモンであり、CRF に加え Urocortin 1 (Ucn1)、Urocortin 2 (Ucn2)、Urocortin 3 (Ucn3) が CRF ファミリーペプチドとして発見されている。近年、摂食調節において、CRF システムの関与が明らかになってきているが、これらの CRF ファミリーペプチドの摂食抑制作用強度の違いは明らかではない。そこで学位申請者は、マウスに CRF ファミリーペプチドの腹腔内 (IP) 投与を行い、それぞれ CRF ファミリーペプチド間の摂食と体重増加に及ぼす作用の比較を行った。また、高脂肪食摂食下での CRF ファミリーペプチドの IP 投与を行い作用強度の比較も行った。さらに、高脂肪食摂食により肥満化させたマウスに CRF ファミリーペプチドの連続 IP 投与を行い、摂食と体重増加、さらに脂肪組織量、体温、糖脂質代謝や血中アシルグレリンレベルに及ぼす影響の比較を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) CRF ファミリーペプチド IP 投与において、日中、夜間のすべての実験で、Ucn1 が最も強力に摂食抑制、体重増加抑制作用を示した。
- 2) 高脂肪食摂食下では、通常食を摂食させたマウスに比較して高脂肪食を摂食させたマウスの方がすべての CRF ファミリーペプチドにおいて、作用がより強力に認められた。また、通常食摂食時と同様 Ucn1 の作用が最も強かった。
- 3) 高脂肪食摂食により肥満化したマウスにおける、CRF ファミリーペプチド 5 日間連続 IP 投与により、Ucn1 と CRF は有意に摂食抑制、体重増加抑制を示した。
- 4) 高脂肪食摂食により肥満化したマウスにおける、CRF ファミリーペプチド 5 日間連続 IP 投与により、CRF、Ucn1、Ucn2 は有意に血糖値を低下させた。Ucn1 は血中アシルグレリン値を有意に減少させた。Ucn1 は有意に体温を上昇させ、内臓脂肪量を減少させた。Ucn1 と CRF は有意に血中コレステロール値を増加させたが、中性脂肪値はどのペプチドにおいても有意差は認めなかった。

本研究は CRF ファミリーペプチドの摂食抑制作用の強度を同時に比較した研究であり、通常マウス、高脂肪食摂食下および高脂肪食摂食により肥満化したマウス、いずれにおいても、CRF ファミリーペプチド末梢投与の中で Ucn1 が最も強力に摂食抑制、体重増加抑制作用を示した。加えて、高脂肪食摂食による肥満化したマウスへの Ucn1 連続投与により、血糖値、内臓脂肪の減少が認められた点は興味深い。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 83 号		学位申請者	田中 千絵
審査委員	主査	杉原 一正	学位	博士(歯学)
	副査	佐藤 友昭	副査	於保 孝彦
	副査	堀内 正久	副査	松山 孝司
<p>主査および副査の5名は、平成21年12月3日、学位申請者 田中 千絵 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 腹腔内に投与した CRF ファミリーペプチドの作用機序はどういう経路か。  (回答) 腹腔内に存在するレセプターに結合し上行性に神経を介したシグナルを伝達するとともに胃排出運動を抑制する他、一部血流を介して中枢のレセプターへ結合し、作用発現しているのではないかと考えている。</p> <p>質問2) 薬物投与後の血中濃度の測定は行わなかったのか。また、投与した薬物は血液脳関門を通るのか。  (回答) 血中濃度の測定は今回行っていない。血液脳関門の通過は明らかではないが、一部透過性の比較的高い部位を経て通過している可能性はあると思われる。</p> <p>質問3) C57BL/6J マウスを使用した理由は何か。  (回答) 遺伝的バックグラウンドをそろえ、より薬剤の作用効果の違いを検討したかったことと、高脂肪食を摂取させることで肥満が誘導されやすい特徴を有することから、食餌性肥満モデルとして広く用いられているため使用した。</p> <p>質問4) 投与後のマウスの状態に何か変化があったか。  (回答) 特に投与直後には活動の低下が認められた。</p> <p>質問5) なぜ摂食抑制ペプチドの中で CRF ファミリーペプチドを選んだのか。  (回答) 近年摂食抑制に CRF ファミリーペプチドの関連が報告されているものの、ファミリー内での作用の違いを同時に比較した研究がなかったため CRF ファミリーペプチドを選んだ。</p> <p>質問6) 薬理効果の持続時間はどれくらいか。  (回答) 条件や濃度によって異なり、条件によっては5日間持続することもある。</p> <p>質問7) なぜ雄性マウスを使用したのか。雌性マウスは使用してみたか。  (回答) 雌性マウスでの検討も必要であると考えますが、今回、雌性マウスは使用していない。</p> <p>質問8) CRF は ACTH からコルチゾールを経由して何か効果を発揮している可能性はないか。また、コルチコステロンの血中濃度は測定しなかったのか。  (回答) CRF を投与することで HPA 系に影響を与えている可能性がある。今回はコルチコステロンの血中濃度は測定していない。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

質問 9) 作用強度の順位は何か有意差検定で出しているのか。

(回答) 今回はコントロールとの比較のみで CRF ファミリー間での検定は行っていない。

質問 10) Ucn1 の摂食抑制作用が強い理由に CRFR1、CRFR2 の相乗効果をあげているが、具体的にはどうということか。

(回答) CRFR1 と CRFR2 両方に結合することで、結合量が多く、加えてそれぞれが異なる経路から作用を発揮 (CRFR1 は不安を誘起しさらに摂食抑制する) している可能性が考えられる。

質問 11) GH にも影響を及ぼしている可能性はあるか、また、その経路の想定もしていたのか。

(回答) グレリンの値に変化が認められたことから可能性はあると考えられるが、今回はその経路から及ぼす影響は想定していなかった。

質問 12) 長期投与により考えられる副作用はあるか。

(回答) 長期投与により抑うつ状態や心筋肥大や低血糖、腸管運動異常などを起こす可能性がある。

質問 13) 今後の実験は何を考えているか。レプチンへの作用は検討していないのか。

(回答) 今後は中枢・静脈内投与との比較や胃排泄作用に対する影響も検討していきたい。今回はレプチンの作用を検討していなかったが、今後作用機序を明らかにしていく上でも必須の検討事項だと思われる。

質問 14) 摂食抑制というテーマにたどりついた理由は何か。

(回答) 摂食抑制がストレスと関連していること、肥満と歯周病の関連に興味があったためである。

質問 15) CRF と Ucn1,2,3 は共通するアミノ酸配列があるのか、また、どの部位が結合することで作用を発揮しているのか。

(回答) 共通するアミノ酸配列が存在し、相互の相同性は約 20~40% である。CRF は C 端が CRFR1 の N 端に、N 端が CRFR1 の J ドメインに入りこむことで G 蛋白に共役し作用発現する。

質問 16) 体重の増減と摂食の増減が全く同じにならない理由は何か。

(回答) 体重の増減には摂食量以外にも活動量、代謝など他の要因が関連するため、摂食量と体重の増減が一致しないこともある。

質問 17) 血液データはコントロールとの比較のみだが実験前後では比較しなくてよいのか。

(回答) マウスの経時的採血量には制限があるので、前後で比較することは実際には難しい。

質問 18) 耐糖能はどうか。グルコース負荷試験はできるのか。

(回答) 可能だが、今回は行っていない。今後検討したい。

質問 19) 16 時間絶食させた理由は。また、人間にとってはどういう状態か。

(回答) マウスは夜行性であり、通常昼間は寝ている。昼間実験時、絶食を行うことは睡眠欲以上に空腹な状態を作り出し、摂食抑制作用をより明らかにするため。人間にとっても同様の状態と思われる。

質問 20) CRF や Ucn 自体が薬剤として使用される可能性はあるか。

(回答) 摂食関連薬としてはまだ開発されていないが、可能性はあると思われる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。