

## 論 文 要 旨

**Regulatory effects of Y4 receptor agonist (BVD-74D) on food intake**

〔 Y4 受容体のアゴニスト ( BVD-74D ) の摂食  
調節作用 〕

李 江 波

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

Neuropeptide Y(NPY)とそのファミリーペプチド(Pancreatic polypeptide(PP)及びPeptide YY (PYY))の薬理作用は、7回膜貫通型の受容体を介して惹起され、現時点において哺乳類ではY1、Y2、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8の7つのサブタイプの受容体が判明され、今まで薬理的な研究はY1、Y2、Y4、Y5の4つのサブタイプに集中している。主に視床下部のY1、Y5受容体がNPYによる摂食亢進に関係している。一方Y2、Y4は摂食抑制型の受容体として報告され、そのアゴニストとしてのPYY3-36、PPなどを外因性に投与すると、マウスの摂食量が抑制され、体重も減少するという報告がある。しかしPYY3-36やPPがそれぞれの対応する受容体以外に、他の受容体にも親和性があり、Y2、Y4受容体のそれぞれ独自の役割の究明にも影響を及ぼす。最近Y4受容体に、高選択性、高度親和性があり、他のY受容体には殆ど親和性のないアゴニスト(BVD-74D)が開発され、Y4受容体を介して摂食抑制作用があると報告された。本研究ではBVD-74DがY4受容体を介した摂食調節作用を、高脂肪食マウス、FLS-ob/obマウスへの作用と併せて検討し、Y4受容体の独自の摂食調節に関する役割を解明することを目的としている。

【材料および方法】

普通食群、高脂肪食群のC57BL/6Jマウス及びFLS-ob/ob群のマウスにBVD-74D、コントロール群に生食塩水をIP投与し、摂食量、摂水量、体重を測定した。

不安発現実験は標準の高架式十字迷路を用いて行った。C57BL/6JマウスにBVD-74Dを、コントロール群に生食塩水をIP投与して、10分後に、5分間の各アームでの滞在時間と進入回数を計測した。オープンアームの滞在時間はトータルの滞在時間に対する割合、オープンアームに入る回数はトータル進入回数の割合として評価した。

【結 果】

普通食群へのY4受容体のアゴニスト(BVD-74D、1mg/kg)の投与による20分、1時間及び、10mg/kgの投与による1時間、2時間、4時間、8時間、24時間の累積の摂食量が有意に減少し、8時間の累積の摂水量、体重の増加量が用量依存的に有意に低下された。高脂肪食群へのBVD-74D(10mg/kg)の投与による1時間、2時間、4時間の累積の摂食量、摂水量が有意に減少された。FLS-ob/ob群へのBVD-74D

(10mg/kg)の投与により、2、4時間に累積の摂食量はコントロール群より有意に減少した。  
不安発現実験において、10mg/kgのBVD-74DのIPの投与群は、コントロール群に比較して、オープンアームのトータル滞在時間に対する割合、トータルの進入回数に対する割合及びトータルの進入回数に有意差が認められなかった。

#### 【結論及び考察】

最近開発された Y4 受容体に対する高選択性と親和性を有する Y4 受容体のアゴニストの BVD-74D は Y4 受容体に関する研究にとって重要なツールである。本研究では、BVD-74D は Y4 受容体を介して、普通食のマウスに、強力な摂食、摂水、体重増加の抑制作用を示し、高脂肪食のマウス、FLS-ob/ob マウスにも摂食抑制作用が示され、Y4 受容体が摂食抑制型受容体としてであることが示された。

我々の実験結果では、高脂肪食飼育のマウス、FLS-ob/ob マウスに対する BVD-74D の摂食抑制作用は普通食飼育マウスに比べ減弱した。これまでに肥満により、善玉サイトカインの分泌量は著しく低下、悪玉サイトカインが多く分泌され、レプチンやインスリンの抵抗性をもたらすことが知られている。従って、これらの変化が Y4 受容体の感受性に影響を与える可能性も考えられ、今後 Y4 受容体の研究について、重要な課題ではないかと考える。

今後 Y4 受容体のアゴニストである BVD-74D は将来には抗肥満薬としての創薬が期待されるではないかと考える。

(Peptides Vol. 31, No. 9. 1706-1710, 2010 年 掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第	124号	学位申請者	李江波
審査委員	主査	堂地 勉	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	井上 博雅
	副査	堀内 正久	副査	郡山 千早

**Regulatory effects of Y4 receptor agonist (BVD-74D) on food intake**  
**(Y4 受容体のアゴニスト(BVD-74D)の摂食調節作用)**

近年、生活習慣病の発症率が増加し、世界的関心が集り研究が進む中、摂食やエネルギー代謝調節に深く関わる Ghrelin、Leptin、Nesfatin-1 などのペプチドが続々と発見され、肥満のメカニズムの解明が進められている。興味深いことに、これらのペプチドは殆ど共通して摂食促進ペプチドである Neuropeptide Y(NPY) の発現・分泌の促進或いは抑制に関わっている。そのため、NPY とそのファミリーペプチド Pancreatic polypeptide (PP) 及び Peptide YY (PYY) に関わる受容体の研究やその受容体をターゲットにする抗肥満薬の開発が、一層注目されている。NPY は主に、視床下部の Y1、Y5 受容体を介して摂食亢進作用に関係している。一方 Y2、Y4 は摂食抑制型の受容体として報告され、そのアゴニストとしての PYY3-36、PP などを外因性に投与すると、マウスの摂食量や体重の増加も抑制される。しかし、PYY3-36 や PP が Y2、Y4 以外に、他の Y 受容体にも親和性を持つことが指摘されている。PYY3-36 の摂食抑制作用が再現できないという報告があることや、PP の半減期が短いことなどは、臨床応用にあたっての問題点と考えられている。最近、高選択性、高親和性の Y2 及び Y4 受容体アゴニストである BT-48、BVD-74D が、学位申請者の共同研究者により開発され、Y2、Y4 受容体に関わる摂食調節のメカニズムの解明や新しい抗肥満薬の開発に寄与する可能性が考えられる。そこで学位申請者は、BT-48、BVD-74D の摂食調節作用を研究目的とし、普通食飼育マウス、高脂肪食飼育マウスおよび過食・高度肥満を呈する FLS-ob/ob マウスを用いて、摂食・不安行動実験を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

Y4 アゴニストの BVD-74D は普通食飼育のマウスにおいて、用量依存的に、摂食、飲水、体重増加の抑制作用を示した。高脂肪食飼育マウス及び FLS-ob/ob マウスにおいても摂食を抑制し、単回投与にもかかわらず体重増加を抑制する傾向を示した。BVD-74D は不安行動には影響せず、その摂食抑制作用は特異的であった。BVD-74D の摂食調節作用は、PP と同じく迷走神経を介して、脳幹部から視床下部に満腹シグナルを伝える機序が推察されるが、この Y4 受容体を介する作用機構は、高脂肪食負荷により負の制御を受けることも明らかとなった。一方、Y2 アゴニストである BT-48 は普通食飼育マウス、高脂肪食飼育マウス、FLS-ob/ob マウスともに、摂食抑制作用は確認されなかった。このことは、学位申請者らが見出したヒトとげっ歯類の種差を示唆する所見であり、現在霊長類マーマセットを用いた研究が推進されている。

学位申請者は高脂肪食飼育マウス及び FLS-ob/ob マウスにおいて、BVD-74D の強力な摂食抑制作用を明らかにし、Y4 アゴニストの抗肥満薬としての応用や、BVD-74D を母核とした創薬が期待される。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 124 号	学位申請者	李 江波	
審査委員	主査	堂地 勉	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	井上 博雅
	副査	堀内 正久	副査	郡山 千早
<p>主査および副査の 5 名は、平成 23 年 3 月 2 日、学位申請者 李 江波 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) BVD-74D を普通食マウスに投与すると、8-24 時間の間に体重変化は生ずるか？ 24 時間を越える観察はしたか？</p> <p>(回答) 我々は通常、8 から 24 時間の間の測定はしていない。今回は急性投与実験であり、24 時間以後は観察していない。</p> <p>質問 2) BVD-74D と BT-48 の半減期はどれぐらいか？ なぜ半減期が長いのか？</p> <p>(回答) PP の半減期が短いことが、BVD-74D が開発された理由の一つであるが、BVD-74D と BT-48 の半減期の報告はない。BVD-74D は、PP のヘアピン構造を強化したものであり、このことが半減期の延長をもたらしていると考えられる。</p> <p>質問 3) BVD-74D を連日投与して中止したら、リバウンドの可能性はないのか？ 過去にこのような報告があるか？</p> <p>(回答) リバウンドの可能性は存在すると考える。過去の投与実験はないが、ペプチド性化合物を含め、多くの抗肥満薬にリバウンドが認められている。</p> <p>質問 4) 血液代謝産物やサイトカインは見えていないか？</p> <p>(回答) 今回の実験では、血液生化学データやサイトカインなどは測定していない。</p> <p>質問 5) BVD-74D は抗肥満薬として人への応用の可能性はあるか？</p> <p>(回答) PP そのものに臨床効果が報告されており、作用の強い BVD-74D は、抗肥満薬として臨床応用が期待される。</p> <p>質問 6) この実験でなぜ不安行動などを観察したのか？ 他の抗肥満薬の実験でも不安が見られることがあるか？</p> <p>(回答) BVD-74D の摂食抑制作用に、不安行動が関与しているかどうかを検討するためである。摂食抑制物質で不安が認められることが多いが、その場合は「嫌悪」を示すと考えられ、抗肥満薬としては適切でないと理解されている。</p> <p>質問 7) IP 投与の場合には、迷走神経と BVD-74D、BT-48 の関連性について、報告があるか？</p> <p>(回答) 報告はない。しかし PYY、PP の摂食抑制作用は迷走神経の切断によって消失し、同じ Y2、Y4 アゴニストである BT-48、BVD-74D も同様の作用機序により、中枢に満腹信号を伝達すると考えられる。</p> <p>質問 8) 迷走神経が切断されると、実験動物の摂食量や体重が増えるという論文があるか？</p> <p>(回答) 迷走神経を切断して、摂食量や体重が増えるという報告はなく、むしろ減少する。ただし肝枝のみの切断では、増加するという報告も認められる。</p> <p>質問 9) BVD-74D を投与して、活動性にどう影響したか？</p> <p>(回答) 高架式十字迷路テストにおいては、BVD-74D の投与群の活動量の変化は認められなかった。</p> <p>質問 10) BVD-74D や BT-48 を投与し、血液の PP、PYY レベルの影響を検討したか？</p>				

(回答) 検討していないが、ネガティブフィードバックを生ずる可能性は考えられる。

質問 11) 絶食 16 時間で、FLS-ob/ob のコントロール群の 20 分の摂食量が、通常のマウスのコントロール群より少ないのはなぜか？

(回答) 必ずしも明らかではないが、FLS-ob/ob コントロール群は飢えに対する何らかの応答異常を示すものと考えられる。高度の脂肪蓄積による代謝異常、認知、情動、サーカディアンリズムの異常などにより、2 群において 20 分の摂食量の違いが生じているのではないかと推測される。

質問 12) BVD-74D 投与群の飲水量の違いはどう考えるか？

(回答) これは摂食抑制に伴う変化と考える。

質問 13) Y4 は常に働いているか？

(回答) PP は摂食後長時間分泌反応が持続し、また空腹期においては、消化管運動 (第 3 相) に一致して増加する。摂食調節は促進系と抑制系のバランスで行われるので、Y4 は常に作動していると考えますが、摂食後の役割が主体である。

質問 14) BVD-74D が Y4 アゴニストとして PP より優れている点はなにか？

(回答) BVD-74D は Y4 受容体に対して高親和性、高選択性があるが、他の受容体に対しては殆ど親和性がない。PP は半減期が短く、他の Y 受容体にも親和性があると報告されている。

質問 15) BVD-74D を長期投与して Y4 受容体を介して抑制効果が続くと、Y 受容体に変化する可能性はないか？

(回答) これまでに十分な報告はないが、我々が作製した PP 過剰発現マウスは痩せを生ずるところから、比較的ダウンレギュレーションを受けにくいものと考えられる。

質問 16) BVD-74D の投与後、どの時点で最もペプチドの効果が発揮されるか？

(回答) 投与から 2 時間が最も摂食抑制作用が強かった。

質問 17) 2 時間時点での強い摂食抑制効果と 8 時間時点で体重増加の抑制効果がくることは一般的であるか？

(回答) 摂食抑制作用と体重増加抑制作用の発現時間には差があり、強い摂食抑制作用を示すものは 8 時間の時点で体重増加抑制作用を示しやすい。

質問 18) Y4 受容体の臓器分布は？

(回答) Y4 は脳の視床下部、皮質、胃、十二指腸、大腸、結腸、肝臓、肺、膵臓等に分布している。

質問 19) 今まで同様な実験はあるか？

(回答) BT-48、BVD-74D の摂食抑制作用に関する報告は我々と共同研究者以外にはない。BVD-74D の高脂肪食飼育マウスや、過食・高脂血症・脂肪肝・糖尿病・高度肥満を認める FLS-ob/ob マウスの摂食調節作用に関する研究報告は、今回が初めてである。

質問 20) 実験に使用のマウスの週齢及び体重は何グラムのマウスか？ 雄か雌か？

(回答) C57BL/6J マウスは 7 週齢、体重は 18.8-24.1g、FLS-ob/ob マウスは 10-11 週齢、体重は 35.6-45.7g、雄を用いた。

質問 21) 体重はどんな方法で測定したか？ 摂食を測定した方法は？ 誤差はないか？

(回答) マウスを 16 時間絶食して、BT-48、BVD-74D、生理食塩水をそれぞれ投与してから、0、8、24 時間に体重を、0、20 分、1、2、4、8、24 時間に摂食量を測定した。個体ごとに同じ条件、方法、手順で測定したので、誤差の可能性は低いと考える。

質問 22) ラットではなくマウスを使っている理由は何か？ 種によって BVD-74D の効果の差はあるか？

(回答) 理由の一つは、コストとスペースである。BVD-74D の摂食調節作用に対する種差の報告はない。BT-48 に関しては、ヒトとげっ歯類による効果の相違を認めている。

質問 23) もし肥満の人に BVD-74D を毎日投与するならば、大変ではないか？

(回答) 連日投与は大変であるが、治療薬として高度肥満患者に投与し、肥満が改善されれば、患者は受け入れ可能と考える。GLP-1 は注射製剤として、すでに臨床応用されている。今後は、経口、経鼻投与など、もう少し異なるアプローチを試みる必要がある。

質問 24) 肥満の場合はうつとの関連があるとしたら、このペプチドは抗うつ薬として期待されるか？

(回答) 肥満はうつとの関連が想定されている。BVD-74D そのものに抗不安効果は認められないが、肥満を改善することにより、抑うつ状態が改善する可能性も存在する。

質問 25) BVD-74D は本当に Y4 を介して、効果が出たのか？ 他の抑制系も関与しているか？ どうすれば証明できるか？ Y4 受容体のノックアウトマウスの解析はなされているか？ 特に高脂肪食を与えた時の摂食はどうか？

(回答) Y4 受容体のノックアウトマウスを用いた我々の共同研究者の実験では、BVD-74D の摂食抑制作用は認められなかったので、BVD-74D の摂食抑制作用は Y4 受容体を介したものと考えられる。今後 Y4 受容体のアンタゴニストの同時投与実験も考えられる。Y4 受容体のノックアウトマウスの体重は低下しているという報告があるが、Y4 ノックアウトマウスに高脂肪食を与えた研究の報告はない。我々のこれまでの研究から、Y4 受容体の下流には、食欲促進薬としてはオレキシン、NPY、食欲抑制系としては CRF 及び POMC 系が存在すると考えている。

質問 26) この Y4 アゴニストを投与することによる生体の変化として、何があるのか？ 例えば行動異常など。

(回答) この Y4 アゴニストを投与することによる行動異常は、行動観察や高架式十字迷路テストでは認められなかった。

質問 27) 長期投与による効果として、何かあるか？ また実際長期投与した時の摂食行動の変化はあるのか？

(回答) 長期投与の実験はしていないので、今後の課題になるが、PP より強い食欲抑制、体重減少効果を想定している。

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(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。