

## 論 文 要 旨

**Effects of peripherally administered urocortin 3 on feeding behavior and gastric emptying in mice**

マウスに末梢投与されたウロコルチン3の摂食行動と  
胃内容排出に与える影響

寺 師 睦 美

## 【序論および目的】

副腎皮質刺激ホルモン因子(CRF)は、1981年に羊の視床下部から単離された41個のアミノ酸ペプチドである。CRFの視床下部-下垂体前葉-副腎皮質軸を介する作用は、ストレス応答の主要な調節役であり、不安様行動と食欲・体重調節に重要な役割を果たす。CRF受容体には、2つのCRF受容体サブタイプがある。主としてCRF受容体1(CRF-R1)は、不安行動に関与し、CRF受容体2(CRF-R2)は、摂食行動と腸管運動に関与している。

ラットウロコルチン1(Ucn1)は、40個のアミノ酸ペプチドで、1995年にラットの脳から単離された。Ucn1は構造的にCRFに類似しており、CRF-R1とCRF-R2に結合する。マウスウロコルチン2(Ucn2)は、38個のアミノ酸ペプチドで、2001年にマウスの脳から単離され、CRF-R2により強力な親和性を示す。ヒトとマウスウロコルチン3(Ucn3)は、同様に2001年に単離された38個のアミノ酸ペプチドである。Ucn3は、選択的にCRF-R2に結合する。マウスUcn3のmRNAの発現は、視床下部・扁桃体・脳幹・小腸そして皮膚に検出されている。過去の研究では、ラットで中枢投与されたUcn3が、摂食量を減少させることが明らかにされた。近年、Czimmerらが意識下のラットにUcn2を中枢投与し、腸管運動を抑制することを発表した。しかしながら、腸管運動の調節におけるUcn3の役割は、未だ究明されていない。

この研究において、我々は、マウスに末梢投与されたUcn3の摂食量と腸管運動に与える影響について検討した。

## 【材料および方法】

動物と試料：本研究は、鹿児島大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。実験には、雄性マウスC57BL/6L(7週齢・体重19-24g)が使われ、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、照明の明暗サイクル12時間の環境下で個別に飼育し、実験前は自由摂食・給水とした。マウスUcn3(FW 4171.56; purity  $\geq 95\%$ )は、実験直前に生理食塩水で溶解された。

摂食実験：本実験は、明期と暗期に実施した。明期では投与前16時間絶食、暗期では非絶食下とし、それぞれ自由給水とした。マウスUcn3は、0nmol(生理食塩水)・0.1nmol・0.3nmol・1nmol・3nmolの5群に分け末梢投与した。Ucn3末梢投与から、20分・1・2・4・8時間後に摂食量を測定した。

胃内容排出実験：本実験前の16時間、絶食および自由給水とした。マウスUcn3は、0nmol(生理食塩水)・0.3nmol・1nmol・3nmolの4群に分け末梢投与した。Ucn3の末梢投与から1時間摂食させ摂食量を測定し、その後1時間と2時間に再び絶食した。絶食後に胃内容物を摘出し、内容物を凍結乾燥後

に計量し、胃内容排出率(%)を算出した。

### 【結果】

摂食実験：明期では、Ucn3 の末梢投与 20 分～2 時間後に、累計摂食量は有意に減少し、濃度依存的に Ucn3 は摂食量を抑制した。また暗期では、末梢投与 2～4 時間後に、累計摂食量は有意に減少した。

胃内容排出実験：Ucn3 の末梢投与 1～2 時間後、濃度依存的に胃内容排出は有意に遅延された。

### 【結論及び考察】

我々はこれまで、摂食抑制において CRF より Ucn1 がより強力であることを報告した。Ohata らは、Ucn2 と Ucn3 の中枢投与は、ラットの摂食量を減少させることを報告した。

本研究では、末梢投与された Ucn3 は他の CRF ファミリーと同様に摂食量を減らす作用があり、明期と暗期ともに摂食抑制を示した。

これまでに腸管運動は、摂食行動に影響することが知られている。胃排出の亢進が過食と肥満に関与する一方で、胃排出の遅延が食欲不振や悪液質に関与していることが示されている。Gourcerol らが、マウスでの Ucn2 の末梢投与が、胃排出を遅延させることを報告した。本研究では、他の CRF ファミリーペプチドと同様に、末梢投与された Ucn3 は胃排出を抑制する作用を示した。近年 Liu らが、Ucn1・2・3 は腸管筋神経の刺激作用に影響を与えることを報告した。Ucn1 による腸管筋神経の刺激作用の誘導は、CRF-R1 によって調節され、Ucn2 及び Ucn3 は CRF-R2 によって調節される。またこれまでに、CRF-R2 は胃腸管を含む様々な末梢組織に存在することが示されている。

これらの知見と本研究の結果は、Ucn3 と他の CRF ファミリーペプチドは、機能的胃腸障害や摂食障害の病態に関与していることを示唆している。Ucn3 と CRF-R2 は、様々な疾患の治療のための有望なターゲットになるのではないかと考えられる。

(Experimental and Therapeutic Medicine, in press)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 120 号	学位申請者	寺師 睦美
審査委員	主査	佐野 輝	学位 博士 (医学)
	副査	岸田 昭世	副査 井上 博雅
	副査	堀内 正久	副査 武田 泰生
<p style="text-align: center;"><b>Effects of peripherally administered urocortin 3 on feeding behavior and gastric emptying in mice</b> (マウスに末梢投与されたウロコルチン 3 の摂食行動と胃内容排出に与える影響)</p> <p>副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRF)は、視床下部-下垂体前葉-副腎皮質軸を介するストレス応答の主要な調整因子であり、不安行動や食欲・体重調整に重要な役割を果たす。CRF 受容体には 2 つのサブタイプがあり、主として CRF 受容体 1(CRF-R1)は不安行動に関与し、CRF 受容体 2(CRF-R2)は摂食行動に関与している。ウロコルチン 1(Ucn1)は、CRF-R1 と CRF-R2 に結合する。ウロコルチン 2(Ucn2)とウロコルチン 3(Ucn3)は、選択的に CRF-R2 に結合する。マウス Ucn3 mRNA の発現は、視床下部・扁桃体・脳幹・小腸・皮膚などに検出されている。近年、ラットに中枢投与された Ucn3 は摂食量を減少させ、意識下のラットの Ucn2 の中枢投与が腸管運動を抑制することが報告された。しかし、腸管運動の調節における Ucn3 の役割はまだ解明されていない。本研究においては、学位申請者はマウスに末梢投与した Ucn3 の摂食量と腸管運動に与える影響について検討した。</p> <p>実験はマウス(C57BL/6J)を用い、自由飲水下に絶食下(明期: 16 時間絶食)および非絶食下(暗期)に施行された。マウス Ucn3 を 0(コントロール)、0.1、0.3、1、3nmol 腹腔内投与し、投与後の摂食量を 20 分から 8 時間まで測定した。胃内容排出は、16 時間絶食下(明期)に 1 時間摂食後、マウス Ucn3 を 0(コントロール)、0.3、1、3nmol 腹腔内投与した。投与後は絶食とし、その 1、2 時間後に胃内容物を摘出し、凍結乾燥重量を計測して胃内容排出率(%)を算出した。Ucn3 は絶食下の摂食行動を抑制し、投与後 20 分~2 時間において、累計摂食量に有意の減少が認められた。非絶食下暗期の生理的条件下においても、Ucn3 は投与後 2~4 時間において、累計摂食量を有意に減少させた。また、Ucn3 は投与後 1 及び 2 時間後の胃内容排出率を有意に遅延させた。</p> <p>学位申請者は、CRF-R2 特異的アゴニストである Ucn3 が、他の CRF ファミリーペプチドと同様に摂食を抑制し、その作用の一部が、胃排出能低下による満腹作用に基づく可能性を初めて明らかにした。学位申請者はさらに、カテーテルを留置したマウスモデルを用い、Ucn3 が他の満腹ホルモンと同じく、空腹期運動を抑制し食後期様運動を出現させることを見出している。これらの知見は、CRF-R2 が胃や腸管に存在することとあわせ、Ucn3-CRF-R2 系が摂食や腸管運動の調節とその異常に関わる可能性を示唆している。</p> <p>本研究は、CRF-R2 特異的アゴニストである Ucn3 が、摂食行動や消化管運動に抑制的に作用することを示した。情動調節に深く関わる CRF-R1 の影響を回避しようところから、肥満症や過食症の治療開発に向けて有意義な研究と言える。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。</p>			

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 126 号		学位申請者	寺師 睦美
審査委員	主査	佐野 輝	学位	博士 (医学)
	副査	岸田 昭世	副査	井上 博雅
	副査	堀内 正久	副査	武田 泰生

主査および副査の5名は、平成23年3月7日、学位申請者 寺師 睦美 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。

質問1) CRF 受容体は、どのようなタイプの受容体か。

(回答) 7回膜貫通型のG蛋白質共役型受容体である。

質問2) cAMP は上がるのか。細胞内でどのような作用をするのか。

(回答) cAMP は上昇する。細胞質内で cAMP は、PKA(protein kinase A)を活性化し、蛋白質をリン酸化して生理作用を引き起こす。CRF の摂食や情動に及ぼす多くの作用が、この細胞内メカニズムを介するものと考えられている。

質問3) Ucn3 は、通常の日内の摂食によって変動するペプチドなのか。

(回答) 日内変動に関する報告はない。しかし、食欲とエネルギー調節に関与していると考えられ、日内変動する可能性が考えられる。

質問4) 実験で投与した濃度は、ヒトの血中レベルに対応しているのか。ヒトの Ucn3 血中レベルを調べたのか。

(回答) ヒトの血中 Ucn3 血中濃度についての報告はない。今回マウスに投与した濃度は、多くの脳腸ペプチドの作用を見るために用いられている濃度である。薬理作用を検討しているが、生理作用を反映している可能性もある。

質問5) CRF-R1 を介した摂食抑制が強いのではないか。

(回答) 摂食抑制には、CRF-R2 を介する作用が主体であると考えられている。Ucn3 は CRF-R2 特異的ペプチドなので、摂食抑制作用は CRF-R2 を介するものと考えられる。

質問6) Ucn3 は肥満ややせなどの病態でどのように変化するのか。

(回答) これまでに報告はないが、肥満ラットの視床下部の CRF-R2 mRNA 発現が減少するなどから、Ucn3 の発現、分泌も変化すると考えられる。

質問7) 実験に C57BL/6J マウスを使ったのはなぜか。

(回答) 遺伝的に均一な近交系で、様々な実験で使われており、研究結果を比較しやすいため使用した。

質問8) 胃内容排出はどのような要素を測定したのか。

(回答) カロリーのない固体食や液体食の胃排出測定に比べ、より生理的に近い食物の胃排出を評価していると考えられる。凍結乾燥して測定しているのは、胃酸分泌の影響を除外するためである。

質問9) 胃内容排出実験では、なぜ 0.1nmol 群を測定しなかったのか。

(回答) 摂食実験で、摂食量抑制に有意な差が得られなかったため測定しなかった。

質問 10) 絶食下明期と非絶食下暗期の摂食量の違いは何か。

(回答) 非絶食下暗期の摂食実験が、生理的な摂食行動への影響を検討しているのに対し、絶食下明期は、強制的な絶食下での再摂食応答における抑制効果を検討している。この再摂食反応は、絶食時間の増加により亢進し、異なる程度の空腹状態で検討することが可能である。

質問 11) 他のペプチドの作用や影響があるのではないかな。

(回答) 食欲は、様々なペプチドによって調節される。CRF は視床下部で食欲促進系のニューロペプチド Y(NPY)を負に制御することが知られており、Ucn3 の作用点の一つは NPY であろうと思われる。その他のペプチドの作用や影響も受けていると考えられるので、その関連については、今後の研究課題としたい。

質問 12) CRF-R2 の分布はどこか。

(回答) 視床下部腹側内核、外側中隔核、心臓、血管、胃腸管、筋肉などに発現が認められる。

質問 13) Ucn3 投与は、どこを受容体に作用したのか。

(回答) 胃や腸管あるいは肝臓など末梢の CRF-R2 を介して、その満腹シグナルが神経性に中枢へ伝えられ摂食を抑制した可能性と、血液脳関門を通過し、液体情報として中枢に伝えられた可能性があると考えられる。

質問 14) 内因性 Ucn3 は、絶食下と非絶食下で変化しているか。

(回答) これまでに報告はないが、絶食や非絶食により、内因性の Ucn3 は変化すると考えられる。

質問 15) 胃内容排出に与える他の物質の因子はないのか。

(回答) グレリン、NPY、ペプチド YY(PYY)、コレシストキニン(CCK)、腓ポリペプチド(PP)など、多くの食欲促進・抑制ペプチドが、胃内容排出に関わっている。NPY との相互作用なども想定されるが、今後の検討課題である。

質問 16) Ucn3 は、腸管運動に直接作用するのか。in vitro ではどうか。

(回答) げっ歯類の結腸組織を用いた in vitro の実験において、Ucn3 は CRF-R2 を介して、直接筋層間神経叢に作用することも報告されている。一般には、より高濃度でこのような直接作用が発現されやすいと考えられる。

質問 17) Ucn3 は、胃で産生されるのか。

(回答) Ucn3 は、胃においても発現している。

質問 18) CRF-R2 は、胃にあるのか。

(回答) CRF-R2 は、胃においても存在している。

質問 19) CRF-R2 は、胃のどの細胞に発現するのか。

(回答) CRF-R2 は、胃壁細胞と内分泌細胞において発現する。

質問 20) Ucn3 のノックアウトマウスはあるのか。

(回答) Ucn3 のノックアウトマウス作成の報告はない。

質問 21) Ucn3 様の作用をもつ内服投与など可能な薬剤開発はあるのか

(回答) CRF-R2 のアンタゴニストは作成されているが、アゴニストに関しては、現在までに報告はない。しかし、Ucn3 のコアとなる活性部分を強化することや、ドラッグデリバリーシステム(DDS)を工夫することで、臨床開発を行うことは可能であると考えられる。

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(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。