



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	胃食道逆流症の消化管運動低下と加齢におけるストレス時摂食低下に関する研究
Author(s)	名畑, 美和
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第6895号
Issue Date	2013-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6895
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53962
Type	doctoral thesis
File Information	Miwa_Nahata.pdf



学位論文

胃食道逆流症の消化管運動低下と
加齢におけるストレス時摂食低下に関する研究

名 畑 美 和

目次

目次	1
略語表	4
序論	5
第一部 胃食道逆流症モデルにおける基礎的研究	8
第1章 胃食道逆流症モデルラットにおける消化管運動障害に関する基礎的研究	9
第1節 背景	9
第2節 材料・実験方法	11
第1項 実験動物	11
第2項 被験物質	11
第3項 GERD モデルの作製	12
第4項 胃排出能の測定	12
第5項 摂餌量の測定	13
第6項 Strain gauge force transducer の取付け	13
第7項 胃十二指腸運動の解析	13
第8項 血漿グレリンおよびGH 値の測定	14
第9項 免疫組織化学的研究	14
第10項 RNA の抽出およびRT-PCR	15
第11項 統計解析	15
第3節 実験結果	16
第1項 胃排出能および摂餌量	16
第2項 胃十二指腸運動	16
第3項 血漿グレリン値、GH 値、および胃体部グレリン陽性細胞数	18
第4項 胃体部および視床下部における食欲関連因子の mRNA 発現	19
第5項 胃排出能、摂餌量、血漿 GH 値におけるグレリン投与の影響	20
第6項 胃十二指腸運動におけるグレリン投与の影響	21
第7項 胃十二指腸運動のグレリン反応性に対する六君子湯投与の効果	23
第8項 胃排出能のグレリン反応性に対する六君子湯投与の効果	25
第4節 考察	27
第2章 胃食道逆流症モデルラットにおける食欲関連因子に関する基礎的研究	32
第1節 背景	32
第2節 材料・実験方法	33
第1項 実験動物	33

第2項	被験物質	33
第3項	GERD モデルの作製	33
第4項	体重および摂餌量の測定	34
第5項	免疫組織化学的評価	34
第6項	GERD ラットへの外因性グレリン投与の影響	34
第7項	血漿グレリン値と摂食関連ホルモン値の測定	34
第8項	RNA の抽出およびRT-PCR	35
第9項	統計解析	35
第3節	実験結果	36
第1項	一般状態および組織学的所見	36
第2項	血漿グレリン値	37
第3項	血漿レプチン値、CCK 値	37
第4項	体重および摂餌量におけるグレリン反復投与の影響	38
第5項	胃体部および視床下部における食欲関連 mRNA 発現	38
第4節	考察	41
第二部 加齢マウスにおける基礎的研究		44
第3章 加齢マウスへの新奇環境ストレス負荷による摂食低下に関する基礎的研究		45
第1節	背景	45
第2節	材料・実験方法	47
第1項	実験動物	47
第2項	血清 ACTH および corticosterone 値の測定	47
第3項	摂餌量の測定	47
第4項	RNA の抽出およびRT-PCR	48
第5項	摂餌量に対する薬物投与の効果	48
第6項	ストレスホルモンの分泌ならびにストレス関連および食欲関連因子の mRNA 発現に対する薬物投与の効果	49
第7項	In vitro 試験	49
第8項	In situ hybridization 法	50
第9項	統計解析	50
第3節	実験結果	51
第1項	ACTH および corticosterone 分泌に対する新奇環境暴露の影響	51
第2項	摂餌量に対する新奇環境暴露の影響	51
第3項	ストレス関連および食欲関連因子の mRNA 発現に対する新奇環境暴露の影響	52
第4項	新奇環境暴露後の aged マウスにおける SB242084 投与の効果	53
第5項	新奇環境暴露後の aged マウスにおける六君子湯投与の効果	56
第6項	Control マウスにおける SB242084 および六君子湯投与の効果	60
第7項	Corticosterone 分泌に対する mCPP 投与の影響	61

第8項	摂食量に対する mCPP 投与の影響.....	62
第9項	新奇環境暴露後の 5-HT _{2C} 受容体 mRNA 発現	63
第4節	考察	66
総括		71
参考文献		74
謝辞		86

略語表

ACTH	adrenocorticotrophic hormone
AgRP	agouti-related protein
α -MSH	α -melanocyte-stimulating hormone
CCK	cholecystokinin
CRF	corticotropin-releasing factor
DW	distilled water (蒸留水)
FD	functional dyspepsia (機能性ディスぺプシア)
GERD	gastroesophageal reflux disease (胃食道逆流症)
GH	growth hormone (成長ホルモン)
GHS-R	growth hormone secretagogue receptor (成長ホルモン放出促進因子受容体)
GOAT	ghrelin <i>O</i> -acyltransferase
GPCR	G protein-coupled receptor
HPA axis	hypothalamus-pituitary-adrenal axis (視床下部—下垂体—副腎皮質系)
MCH	melanin-concentrating hormone
mCPP	1-(<i>m</i> -chlorophenyl) piperazine
MI	motility index
NPY	neuropeptide Y
POMC	proopiomelanocortin
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
5-HT	5-hydroxytryptamine (セロトニン)

序論

現代はストレス社会とも呼ばれるほど社会にストレスが蔓延している。2008 年度の内閣府の調査によれば、日頃ストレスを「とても感じる」、「やや感じる」と回答した人が 56.9%と過半数を占めており、ストレスを「あまり感じない」、「まったく感じない」と回答した人の割合より 30.8%も多い¹。適度なストレスはエネルギーとなって体にプラスに働くこともあるが、過度のストレスは体にダメージを与え、ときに重大な問題へと発展する。

消化管はストレス感受性が高い組織であり、ストレスによって胃の痛みや胸焼けなどの不快な症状が発生することも多く、胃腸の炎症や潰瘍、癌などの重大な疾患へと進展する場合もある。胃食道逆流症（GERD）は、胃酸や胃内容物が逆流することによって胸焼けや呑酸などの不快感やそれに伴う合併症が生じる上部消化管疾患で²、日本では 2009 年にガイドラインが策定され新しい疾患概念として注目されるようになってきた。GERD 発症の原因には、胃からの逆流を防止する役割をもつ下部食道括約部の機能低下や、胃酸分泌過多、胃運動機能低下、食道クリアランスの低下などが挙げられるが³、その背景にはストレスがあると考えられている。GERD の病態には、炎症などの障害が認められる逆流性食道炎と、内視鏡的に食道炎などの障害が見られない非びらん性胃食道逆流症がある。GERD 患者の過半数が後者であり、前者と比較して胃酸の分泌が少ないため、GERD 治療の第一選択薬である胃酸分泌を抑制するプロトンポンプ阻害薬の効果が低いことが報告されている⁴。一方、上腹部症状が存在するのに炎症や潰瘍などの器質的な疾患が認められない病態は、機能性ディスぺプシア（FD）と呼ばれている⁵。これまで慢性胃炎・胃下垂・胃アトニーなどと診断されてきた疾患であり、日本ではまだ治療ガイドラインを作成している段階である。FD の病態には多因子が関与しており、GERD（特に非びらん性胃食道逆流症）を含む他の疾患との症状のオーバーラップがあることから⁶、これら疾患の診断や治療を難しくさせているという現状がある。これらの疾患患者は、高齢化や食生活の欧米化、診断の進歩など

によって増加の傾向があり、病態のメカニズム解明と適切な治療法の確立が必要である。

医学的なストレスの概念は、1936年に H. Selye が「ストレス」という言葉を初めて用い、外界からの様々な刺激に対し生体が非特異的な反応を示すことと定義したことにより確立された⁷。Selye は、このストレス反応の中心は視床下部—下垂体—副腎皮質系 (HPA axis) であることを示している。これまでの多くのストレス研究の成果から、ストレス応答には脳が重要な役割を果たしていることが明らかになってきているが、その中心にあるのが視床下部室傍核の corticotropin-releasing factor (CRF) ニューロンである。生体が受けたストレス情報は、様々な神経経路を介して室傍核の CRF ニューロンに伝達され、HPA axis が活性化されてストレスからの回復が図られるが⁸、うつなどの精神疾患や加齢などによってこのストレス応答は異常な反応を示すことが知られている^{9,10}。現代のストレス社会では不安障害やうつ病などストレス関連疾患は増加しつつあり、また、これら疾患に伴う食欲不振は栄養不良や衰弱、病死に結びつく大きな問題となっている。高齢化が進む今、高齢者の精神的ストレスによる食欲不振のメカニズムは未だ十分に解明されておらず、課題として残されている。

以上のように、わが国においてはストレスに関連する疾患は増加の一途をたどっているが、その発症には様々な因子が複雑に関与しており、真の原因は未だ明らかになっていない。病態のメカニズムを解明することは適切な治療法を確立するうえで必須と考えられる。そこで本研究は、ストレスに関連する疾患として 1) GERD の消化管機能障害、ならびに、2) ストレスによる高齢者の摂食障害の二つを取り上げ、これらのメカニズム解明を目的として動物モデルを用いた検討を行った。

本論文は二部構成とし、第一部「胃食道逆流症モデルにおける基礎的研究」では、第 1 章として GERD モデルラットにおける消化管運動障害に関する検討を行い、モデル動物の病態を評価するとともに、消化管運動および摂食を亢進させる作用をもつグレリンを投与してその反応性について検証を行った。第 2 章では GERD モデルラットにおける食欲関連因子に関する検討を行い、食欲関連のホルモン分泌およびその mRNA の発現について評価

するとともに、グレリンを反復投与してその反応性について検証を行った。第二部「加齢マウスにおける基礎的研究」では、第 3 章として加齢マウスへの新奇環境ストレス負荷による摂食低下に関する検討を行った。摂食低下のメカニズムとして、視床下部室傍核における CRF ニューロン上のセロトニン 2C (5-HT_{2c}) 受容体に着目し、その関与について薬理学的および組織化学的アプローチから検討を行った。

第一部 胃食道逆流症モデルにおける基礎的研究

第1章 胃食道逆流症モデルラットにおける消化管運動障害に関する基礎的研究

第1節 背景

GERD は、胃酸や胃内容物が食道へ逆流することによって不快感および合併症が生じる疾患である²。胃酸による食道粘膜の障害には下部食道括約部の機能低下および食道クリアランスの低下が関与しており³、胃酸分泌を抑制するプロトンポンプ阻害薬が GERD 治療の第一選択薬とされている。酸逆流患者では胃排出遅延が生じることが多く^{11, 12}、5-HT₄受容体作動薬である消化管運動促進薬の投与によって GERD 患者の症状はある程度改善する^{13, 14}。そのため、胃運動障害も食道への酸逆流に関与していると考えられる^{11, 12, 15, 16}。しかしながら、この胃運動障害の原因は十分に明らかになっていない。

グレリンは 28 個のアミノ酸から成る成長ホルモン放出促進因子受容体 (GHS-R) の内因性リガンドであり、主に胃内分泌細胞から分泌される^{17, 18}。グレリンには、3 番目のセリン残基が ghrelin O-acyltransferase (GOAT) の作用によりオクタノイル化修飾されたアシルグレリンと、非修飾型のデスアシルグレリンの 2 種類のフォームが存在し、アシルグレリンが活性化体として機能していると考えられている。グレリンは成長ホルモン (GH) 分泌促進作用に加え、強力な食欲促進作用^{18, 19}や、消化管運動促進作用²⁰⁻²²が報告されている。*In vitro* においてグレリンは、ラットの前胃および胃前庭部の筋条片を収縮させること^{23, 24}や、グレリンの投与が用量依存的に胃前庭部の phase III 様収縮を惹起し、げっ歯類²⁵⁻²⁷およびヒト²⁸において motility index (MI) を増加させること、さらに、グレリンおよびグレリン受容体作動薬である GH-releasing peptide-6 の投与は、シスプラチン投与マウス²⁹および胃不全麻痺を伴う糖尿病マウス³⁰における胃排出遅延を改善することが報告されている。グレリンのこれらの作用は、迷走神経求心路を介して中枢神経系に作用し、遠心路を介し

で消化管運動を促進すると考えられている^{22,31,32}。しかしながら、グレリンシグナル伝達障害が GERD における消化管運動障害に関与しているかどうかは不明である。

六君子湯は、さまざまな消化管症状を呈する患者に広く処方される漢方薬である。臨床において FD に関連する消化管愁訴を改善することが報告されており^{33,34}、多施設二重盲検群間比較試験でその有効性が証明されている³⁵。近年では、六君子湯が基礎および臨床において GERD 患者の食道への酸逆流や関連症状を減少させることや³⁶⁻³⁹、さらに、六君子湯が胃からのグレリンの分泌を促進し^{40,41}、グレリン受容体の感受性を増強する⁴²ことも報告されている。

本研究では、グレリンシグナル伝達障害が GERD における消化管運動障害に関与しているとの仮説を立て、この仮説を検証するため、GERD のモデル動物において、血中グレリン濃度と外因性グレリン投与の影響について検討した。さらに、この GERD モデルにおいて、六君子湯がグレリンのシグナル伝達を改善するかどうかの検討を行った。

第2節 材料・実験方法

実験はすべて㈱ツムラの動物実験審査委員会の承認を得たプロトコール（承認済プロトコール No. 09-22、10-047、11-010）に従って実施した。

第1項 実験動物

日本クレア(株)から 8 週齢の雄の Wistar ラットを購入し、12 時間照明（7 時～19 時）で温湿度を一定に保った条件下で管理した。飼料および水は自由に摂取させ、4-5 匹のグループでケージに収容した。動物実験はすべて 9 時～18 時に実施した。日内変動の影響を回避するため、実験の 24 時間前に給餌を中止し、13 時～16 時に血液および組織サンプルを採取した。尾静脈内投与は、無麻酔でラットホルダーを使用して軽く保持し、温水で尾を温めて行った。26 ゲージの注射針を用いて過度のストレスを与えないよう被験物質をゆっくりと投与した。

第2項 被験物質

ラットグレリンは㈱ペプチド研究所から購入し、saline（大塚製薬(株)）に溶解した。Cisapride (5-HT₄ 受容体作動薬) は Sigma-Aldrich 社から購入し、0.1% carboxymethyl cellulose に懸濁した。六君子湯（㈱ツムラ）は、8 種類の生薬〔蒼朮 (*Atractylodis lanceae rhizoma*)、人参 (*Ginseng radix*)、半夏 (*Pinelliae tuber*)、茯苓 (*Hoelen*)、大棗 (*Zizyphi fructus*)、陳皮 (*Aurantii nobilis pericarpium*)、甘草 (*Glycyrrhizae radix*)、生姜 (*Zingiberis rhizoma*)〕を混合して熱水抽出し、噴霧乾燥したものである。六君子湯は 1.2% wt/vol の濃度で蒸留水(DW)に懸濁し、10 日間 GERD ラットに自由に摂取させた³⁹。六君子湯の 1 日の摂取量は約 1000 mg/kg 相当であった。

第3項 GERD モデルの作製

Omura らの方法^{43,44}に従ってラットに外科的に GERD を誘発した。24 時間の絶食後にエーテルで麻酔をかけ、正中線で開腹した。胃と十二指腸を体外に露出させ、1-0 絹糸（株式会社夏目製作所）を用いて前胃から腺胃への移行（境界）部分を結紮した。幽門の十二指腸側を 2 mm 幅の 18-Fr ネラトンカテーテル（テルモ株式会社）で覆い、5-0 ナイロン糸を用いて十二指腸漿膜の表面に縫合し、固定した。胃と十二指腸を腹腔内に戻して閉腹した。Sham ラットについては、開腹して胃と十二指腸を約 1 分間露出させた後、腹腔内に戻して閉腹した。処置後、ラットはさらに 24 時間絶食とした。GERD 処置の翌日から自由に摂食させたが、栄養低下の影響を検討する目的で sham 処置を施した pair-fed 群を設定し、前日の GERD ラットの摂餌量と同量の飼料を与えた。

第4項 胃排出能の測定

胃排出能は、既報の方法に従って評価した⁴⁵。GERD 処置から 10 日後、絶食させた sham ラットと GERD ラットに、10-Fr ネラトンカテーテルで 2.5 mL のシリンジに接続したテフロンチューブ（内径 1.68 mm）を用いて、標準粉末飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）と飼料の固形度を上げるためにガラスビーズ（φ0.2 mm; アズワン株式会社）を混合して調製した試験食 0.5 mL を経口投与した。試験食は粉末飼料 16 g、ガラスビーズ 20 g、DW 40 mL を混合して調製した。試験食の投与 2 時間後または投与直後（100% control 群）にラットを断頭し、正中線に沿って腹部を切開して、幽門部と噴門部を結紮した後、胃を摘出した。胃内容物は DW を入れた 50 mL チューブに回収し、遠心分離した。上清を捨てて 45℃で一晩乾燥させた後、重量を測定した。以下の算式に従い胃排出能を計算した：胃排出能 (%) = $(1 - A/B) \times 100$ 。A は試験食投与 2 時間後に胃から回収された試験食の乾燥重量であり、B は 100% control 群の胃から回収された試験食の乾燥重量平均値である。Cisapride (20 mg/kg) は、GERD ラットにおける消化管運動促進薬の効果を明らかにするため、試験食投与 1 時間前に経口投与した。

また、胃排出能に対する外因性グレリンの作用を検討するため、試験食投与直後にラットグレリン（3 または 10 nmol/rat）を尾静脈内投与し、1 時間後の胃排出能を測定した。さらに、GERD 処置後 10 日間、GERD ラットに六君子湯（1.2% wt/vol）を DW に混合して自由に摂取させ、GERD 処置 10 日後、1 nmol/rat のグレリンを尾静脈内投与し、1 時間後の胃排出能を測定した。対照群には DW のみを摂取させた。

第5項 摂餌量の測定

GERD 処置後、ラットを個別にケージに収容し、10 日後に 24 時間累積摂餌量を測定した。また、摂餌量に対する外因性グレリンの作用を検討するため、ラットグレリン (3 nmol/rat) を尾静脈内投与し、1 時間後の摂餌量を測定した。摂餌量は摂食前と摂食後の飼料重量の差として計算した。摂餌量の測定は、自由摂餌下で行った。

第6項 Strain gauge force transducer の取付け

24 時間の絶食後、ラットにペントバルビタールナトリウム（共立製薬㈱）を腹腔内投与し麻酔した。GERD 処置を行った後、胃前庭部および十二指腸漿膜の表面に輪状筋収縮を測定できるように strain gauge force transducer（F-08IS；スターメディカル㈱）を縫着した。さらに、ヘパリン添加 saline を充填したカテーテルを頸静脈に固定した。術後、ラットを個別にケージに収容し、さらに 24 時間絶食とした。

第7項 胃十二指腸運動の解析

GERD 処置から 10 日後、24 時間絶食させた自由行動下の覚醒ラットにおいて胃十二指腸運動を測定した。ブリッジボックス（FB-01；スターメディカル㈱）を介してプリアンプ（FS-04M；スターメディカル㈱）に strain gauge force transducer を接続した。データは MP150（Biopac Systems 社）を用いて記録し、AcqKnowledge（Biopac Systems 社）を用いて解析した。Phase III 様収縮を観察するため、胃十二指腸運動を 2～3 時間モニターした。

胃十二指腸運動に対する外因性グレリンの作用を検討するため、頸静脈カテーテルからラットグレリン（3 nmol/rat）を投与した。投与前後の phaseⅢ様収縮の頻度と MI の変化によって薬剤の影響を評価した。既報の定義⁴⁶を若干変更し、phaseⅢ様収縮は短時間（5 分以内）に強い収縮（最大収縮の大きさの 1/3 超）が 3 回以上見られるものと定義し、MI は、1 分間当たりの収縮記録曲線下面積の平均と定義した。

また、GERD 処置後のラットに、六君子湯（1.2% wt/vol）を 10 日間自由に摂取させ、胃十二指腸運動の測定を行った。対照群には DW のみを摂取させた。

第8項 血漿グレリンおよび GH 値の測定

GERD 処置 10 日後、ラットを断頭してアプロチニン(和光純薬工業㈱)および EDTA-2Na (㈱同仁化学研究所)を入れたチューブに血液を回収し、既報⁴¹の通り血漿サンプルを得た。ただちに 4℃で血液サンプルを遠心分離し、1 mol/L の HCl（1/10 量）で血漿を酸性化し、測定まで -80℃で保存した。血漿グレリン値は、Active-および Desacyl-Ghrelin ELISA Kit（三菱化学メディエンス㈱）を用いて測定した。血漿 GH 値は、酸性化していない血漿サンプルを用いて、Rat/Mouse GH ELISA Kit（Millipore 社）にて測定した。また、GH 分泌に対する外因性グレリンの作用を検討するため、ラットグレリン（3 nmol/rat）を尾静脈内投与し、0、10、30、60 分後の血漿 GH 値を測定した。

第9項 免疫組織化学的研究

GERD 処置 10 日後、24 時間絶食したラットから胃を摘出した。胃体部の一部を 10%ホルマリン／リン酸緩衝液に入れて 2 日間固定した。胃の近位部から遠位部に沿って 1.5 cm の切片を切り出し、パラフィン包埋し、免疫組織化学的染色を行った。メタノール含有 3% 過酸化水素を用いて、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。PBS で洗浄後、1 : 500 に希釈したポリクローナル抗グレリン抗体（㈱トランスジェニック）を用いてパラフィン切片を 90 分間インキュベートした。切片を PBS で洗浄し、免疫組織化学染色キット

(MAX-PO ; 株ニチレイバイオサイエンス) を用いて 20 分間インキュベートし、再び PBS で洗浄し、3,3'-ジアミノベンジジン溶液を用いてインキュベートした。胃体部切片におけるグレリン陽性細胞数を計測し、縦断面の粘膜 1 mm 当たりのグレリン陽性細胞数として表した。

第10項 RNA の抽出および RT-PCR

GERD 処置 10 日後、胃体部と視床下部をマイクロチューブに回収してドライアイス上で凍結させた。凍結後は -80°C で保存した。組織をホモジナイズし、RNeasy Universal Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて RNA を抽出した。RNA 溶液は $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ に希釈し、 70°C で 5 分間反応させた後、氷上で冷却した。RNA (1000 ng) は TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems 社) を用いて逆転写反応を行った後、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems 社) で定量的 PCR 解析を行った。mRNA 発現量は β -actin を内在性コントロールとして補正を行い、 $\Delta\text{threshold cycle}$ (ΔCt) 値 : $\Delta\text{Ct} = 2^{-(A-B)}$ で表して発現量の比較を行った。A は β -actin の、B は標的遺伝子の閾値に達したサイクル数である。用いたプライマーとプローブ (Applied Biosystems 社) は下記の通りである : *Actb*, Rn00667869_m1; *Ghrl*, Rn00572319_m1; *Ghsr*, Rn00821417_m1; *Npy*, Rn00561681_m1; *AgRP*, Rn01431703_g1。

第11項 統計解析

データは各群の平均値 $\pm$ 標準誤差として表した。F 検定後に Student's *t*-test 又は Aspin-Welch's *t*-test を用いて、あるいは一元配置 ANOVA 後に Dunnett analysis を用いて、統計的有意性を検定した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

第3節 実験結果

第1項 胃排出能および摂餌量

GERD 処置 10 日後、GERD ラットの体重は sham ラットと比較して有意に低下した (sham ラット 247.3 ± 2.0 g ; GERD ラット 202.4 ± 4.7 g ; $P < 0.001$)。また、GERD ラットにおける胃排出能は sham ラットと比較して有意に低下した (図 1A)。消化管運動促進薬である cisapride (20 mg/kg) の投与は、sham ラットの胃排出を有意に促進させ、さらに、GERD ラットにおける胃排出低下を改善した。GERD ラットの 24 時間累積摂餌量は sham ラットと比較して有意に低下した (図 1B)。

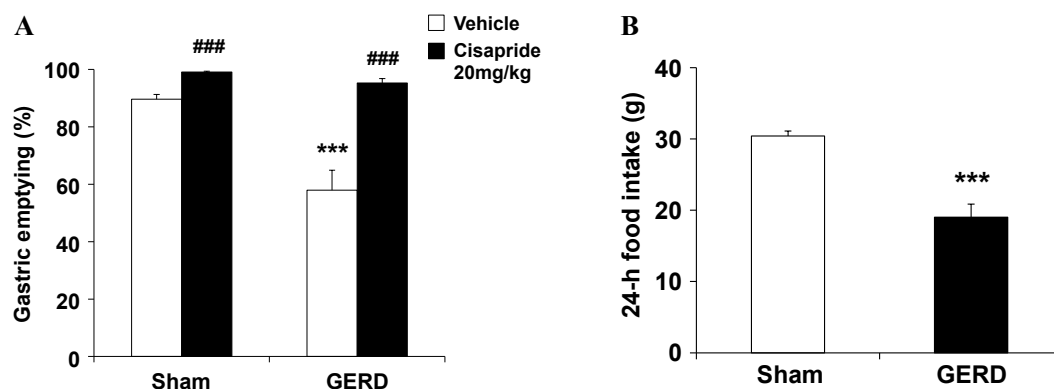


図 1 Sham ラットおよび GERD ラットの胃排出能および摂餌量

A) 胃排出能、B) 24 時間累積摂餌量。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 6–16)。

$P < 0.001$ vs. vehicle 投与群。*** $P < 0.001$ vs. sham ラット。

第2項 胃十二指腸運動

GERD 処置 10 日後の sham ラットおよび GERD ラットの胃前庭部および十二指腸における空腹期収縮運動を図 2A, B に示す。GERD ラットの胃前庭部の phase III 様収縮の出現頻度は sham ラットより有意に低下した (図 3A)。しかしながら、十二指腸の phase III 様収縮の出現頻度には差は認められなかった (図 3B)。

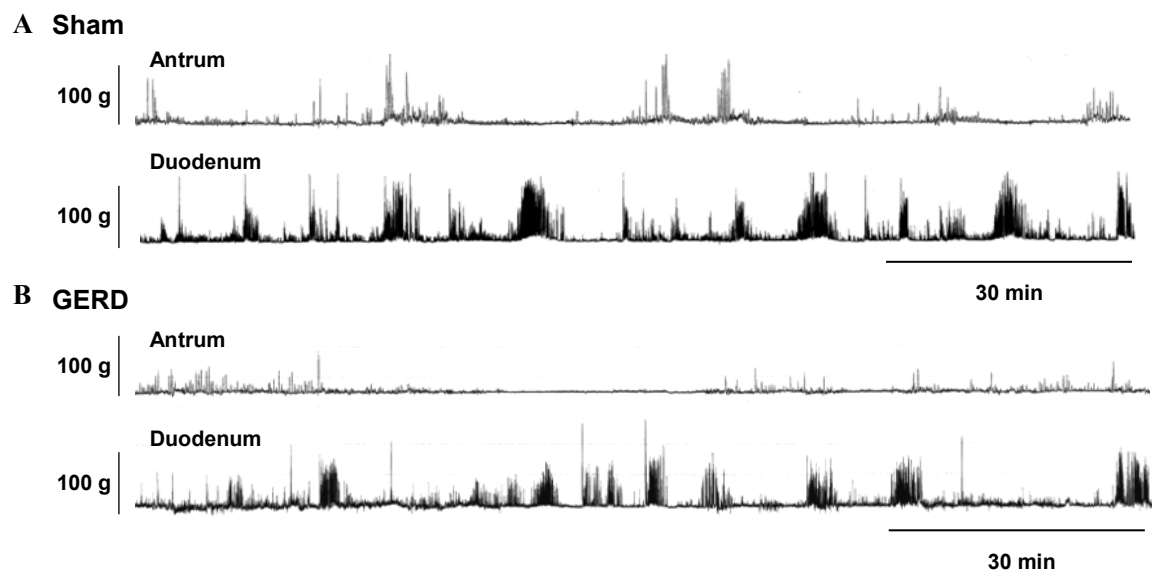


図 2 Strain gauge force transducer による空腹期収縮運動の波形

A) sham ラット、B) GERD ラット。上段に胃前庭部 (antrum)、下段に十二指腸 (duodenum) の運動パターンを示す。

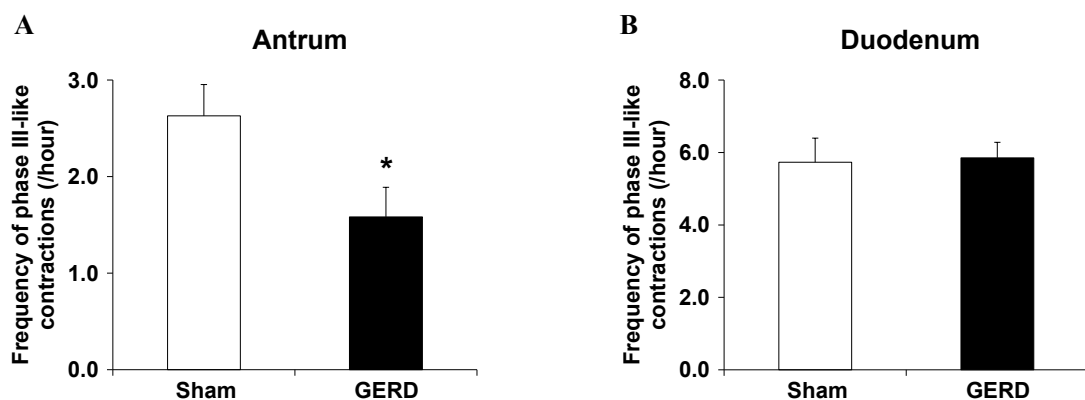


図 3 Sham ラットおよび GERD ラットの胃前庭部および十二指腸における phaseIII様収縮の出現頻度

A) 胃前庭部、B) 十二指腸。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 6-8)。* $P < 0.05$ vs. sham ラット。

第3項 血漿グレリン値、GH 値、および胃体部グレリン陽性細胞数

GERD 処置 10 日後、GERD ラットの血漿アシルグレリン値およびデスアシルグレリン値は、sham ラットと比較して有意に増加した (図 4A, B)。ここで、GERD ラットの摂餌量の低下が血漿グレリン値に影響を及ぼすのか、pair-fed の sham ラットと比較して確認を行った。GERD ラット (202.4 ± 4.7 g) と pair-fed の sham ラット (209.6 ± 2.1 g) の体重はほぼ同じであったが ($P = 0.19$)、GERD ラットの血漿グレリン値 (アシルグレリン 133.8 ± 9.0 fmol/mL ; デスアシルグレリン 709.0 ± 49.5 fmol/mL) は、pair-fed の sham ラットより有意に増加していた (アシルグレリン 86.5 ± 7.7 fmol/mL ; $P = 0.001$; デスアシルグレリン 423.5 ± 40.7 fmol/mL ; $P < 0.001$)。血漿 GH 値に差は認められなかった (sham ラット 2.4 ± 1.2 ng/mL ; GERD ラット 4.7 ± 2.8 ng/mL ; $P = 0.54$)。GERD ラットの胃体部のグレリン陽性細胞数は sham ラットと比較して有意に減少していた (図 5A–C)。

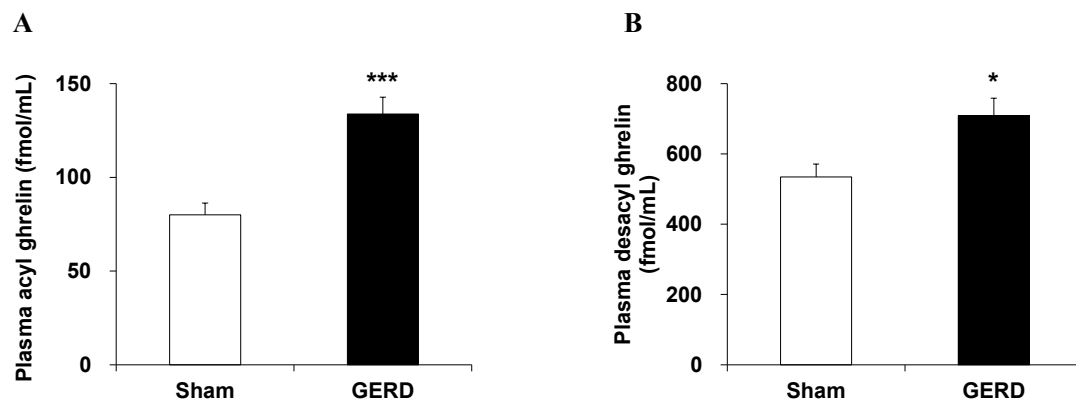


図 4 Sham ラットおよび GERD ラットの血漿グレリン値

A) アシルグレリン値、B) デスアシルグレリン値。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 8)。

*, *** $P < 0.05, 0.001$ vs. sham ラット。

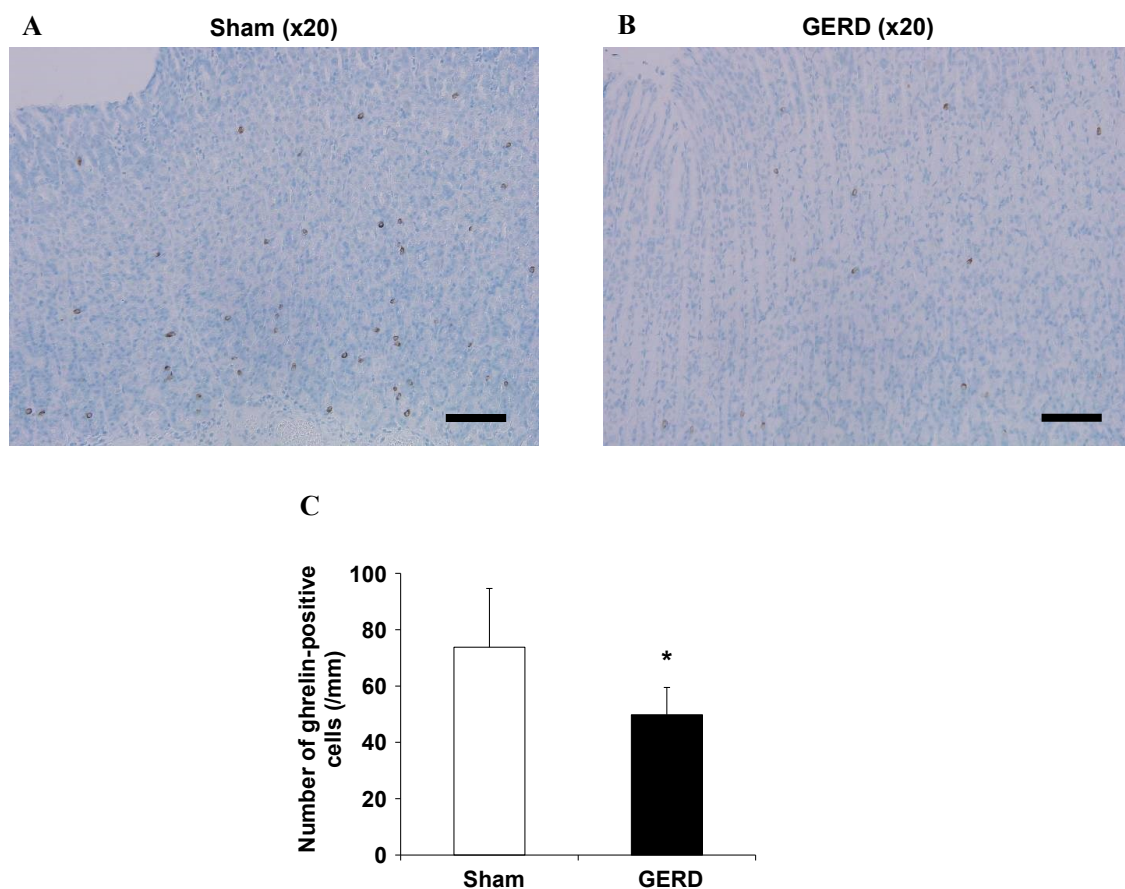


図 5 免疫染色による Sham ラットおよび GERD ラットの胃体部グレリン陽性細胞
A) sham ラット、B) GERD ラット、C) 胃体部切片におけるグレリン陽性細胞数。データは
平均値±標準誤差で表示 (n = 5)。Bar : 100 μ m。* $P < 0.05$ vs. sham ラット。

第4項 胃体部および視床下部における食欲関連因子の mRNA 発現

GERD ラットの胃体部における prepro-ghrelin およびグレリン受容体である GHS-R の mRNA の発現量には sham ラットとの差は見られなかった (図 6A, B)。一方、視床下部で食欲を促進することが知られている neuropeptide Y (NPY) および agouti-related protein (AgRP) の mRNA の発現量は、GERD ラットにおいて sham ラットと比較して有意な増加が認められた (図 6C, D)。

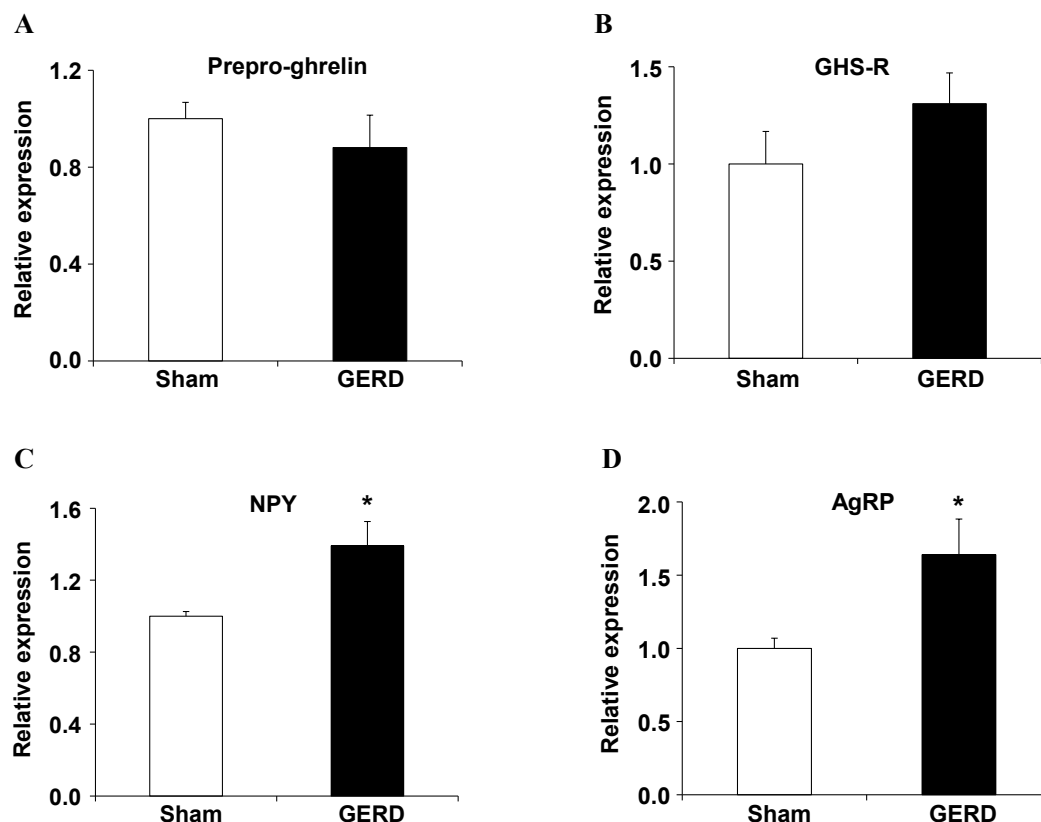


図 6 Sham ラットおよび GERD ラットの胃体部および視床下部における食欲関連因子の mRNA 発現

A) 胃体部 prepro-ghrelin mRNA、B) 胃体部 GHS-R mRNA、C) 視床下部 NPY mRNA、D) 視床下部 AgRP mRNA。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 4-8)。* $P < 0.05$ vs. sham ラット。

第5項 胃排出能、摂餌量、血漿 GH 値におけるグレリン投与の影響

グレリンの投与により、sham ラットでは胃排出が用量依存的に有意に促進したが、GERD ラットでは促進傾向のみであった (図 7A)。また、sham ラットではグレリン投与によって摂餌量が有意に増加したが、GERD ラットでは saline 投与群とグレリン投与群との間に差は認められなかった (図 7B)。血漿 GH 値は、sham ラット、GERD ラットともグレリン投与 10 分後にピークに達したが、GERD ラットにおける血漿 GH 値のピークは sham ラットより有意に低かった (図 8)。

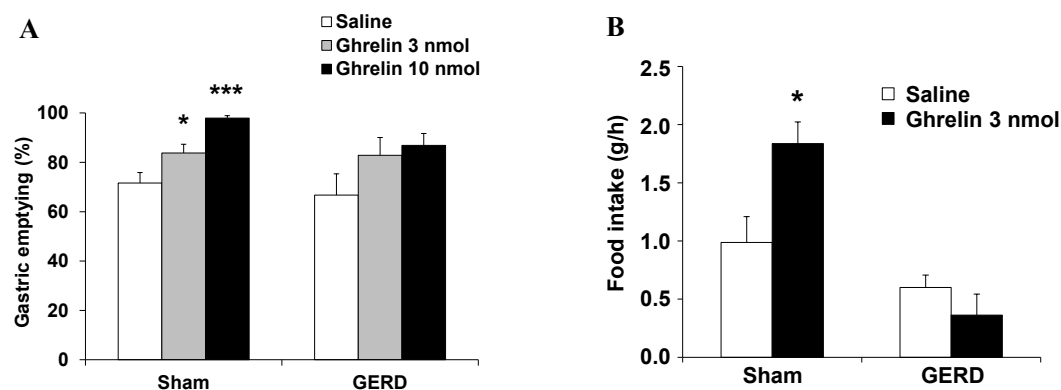


図 7 胃排出能および摂餌量におけるグレリン投与の影響

A) 胃排出能、B) 摂餌量。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 7-8)。*, *** $P < 0.05, 0.001$ vs. sham ラット saline 投与群。

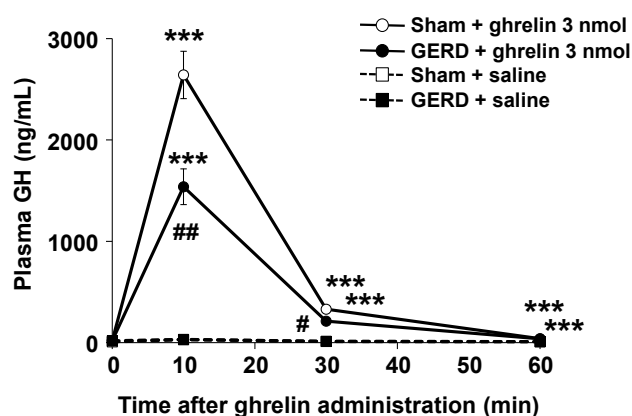


図 8 血漿 GH 値におけるグレリン投与の影響

データは平均値±標準誤差で表示 (n = 5-8)。*** $P < 0.001$ vs. saline 投与群。#, ## $P < 0.05, 0.01$ vs. sham ラットグレリン投与群。

第6項 胃十二指腸運動におけるグレリン投与の影響

図 9 に、グレリンを投与した sham ラットおよび GERD ラットにおける胃十二指腸の収縮運動パターンを示す。

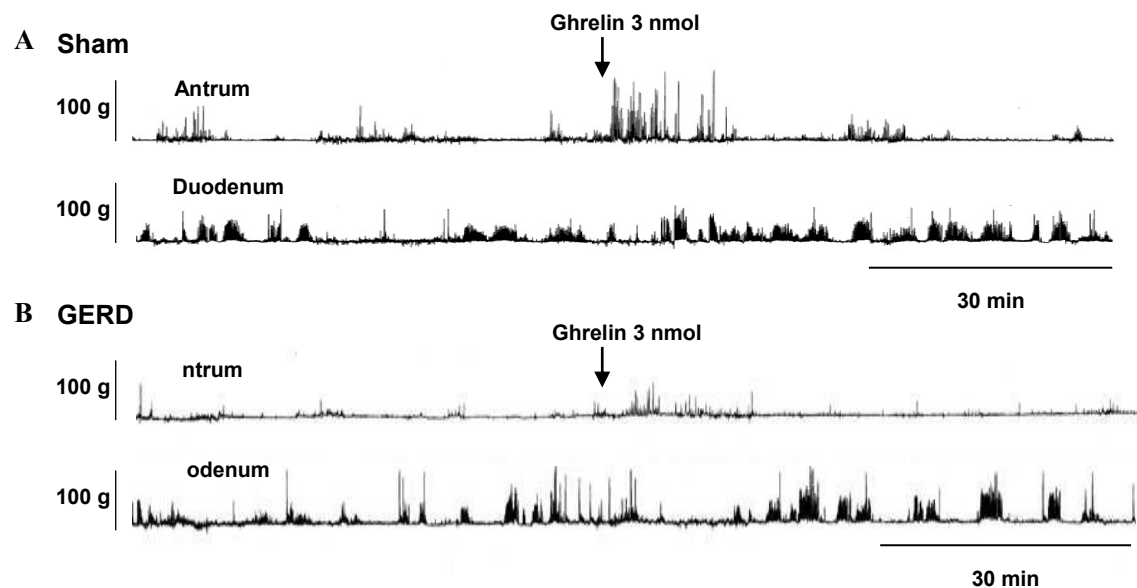


図 9 胃十二指腸の空腹期収縮運動におけるグレリン投与の影響

A) Sham ラット、B) GERD ラット。上段に胃前庭部 (antrum)、下段に十二指腸 (duodenum) の運動パターンを示す。

Sham ラットでは、グレリンの投与によって胃前庭部および十二指腸における MI 変化率が有意に増加したが、GERD ラットでは、グレリン投与群と saline 投与群の MI 変化率に差は見られなかった (図 10A, B)。胃前庭部における phase III 様収縮の頻度は、グレリンを投与しても sham ラットおよび GERD ラットに変化は見られなかった (図 10C)。十二指腸における phase III 様収縮の頻度は、sham ラットではグレリンの投与によって有意に増加したが、GERD ラットでは変化が見られなかった (図 10D)。

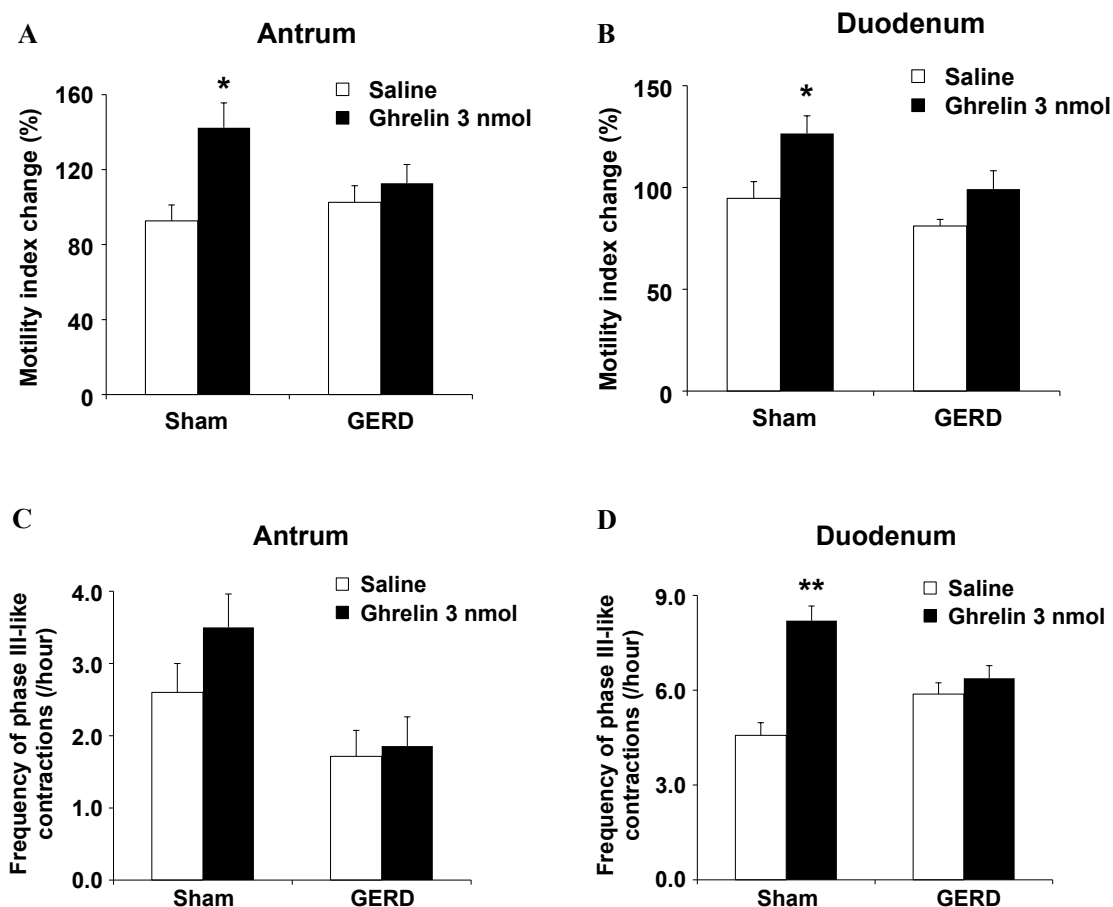


図 10 胃前庭部および十二指腸の MI 変化率および phaseIII様収縮の出現頻度におけるグレリン投与の影響

A) 胃前庭部の MI 変化率、B) 十二指腸の MI 変化率、C) 胃前庭部の phaseIII様収縮出現頻度、D) 十二指腸の phaseIII様収縮出現頻度。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 5-10)。

*, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. sham ラット saline 投与群。

第7項 胃十二指腸運動のグレリン反応性に対する六君子湯投与の効果

DW または六君子湯を 10 日間摂取させ、グレリンを投与した GERD ラットの胃十二指腸運動パターンを図 11 に示す。

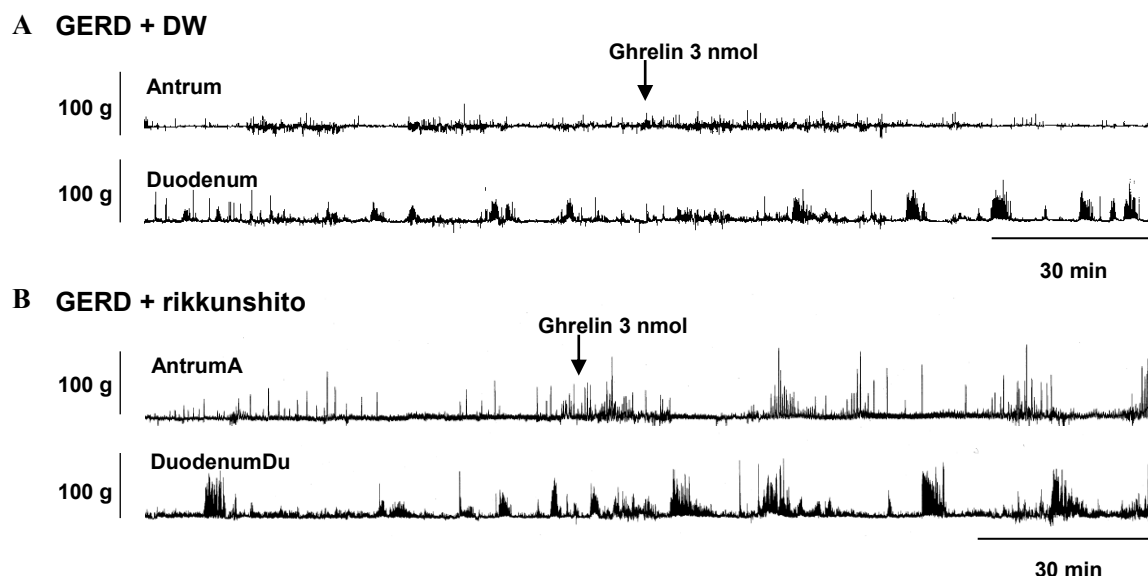


図 11 胃十二指腸の空腹期収縮運動におけるグレリン反応性に対する六君子湯投与の効果

A) GERD ラット蒸留水 (DW) 摂取群、B) GERD ラット六君子湯摂取群。上段に胃前庭部 (antrum)、下段に十二指腸 (duodenum) の運動パターンを示す。

グレリン投与前において、六君子湯を摂取させた GERD ラットの胃前庭部における phaseIII 様収縮の頻度は、DW を摂取させた GERD ラットより有意に増加していたが (DW 摂取群 1.6 ± 0.1 回/時間 ; 六君子湯摂取群 2.1 ± 0.2 回/時間 ; $P = 0.035$)、十二指腸における phaseIII 様収縮の頻度には差は見られなかった (DW 摂取群 5.4 ± 0.5 回/時間 ; 六君子湯摂取群 5.7 ± 1.0 回/時間 ; $P = 0.78$)。DW を摂取させた GERD ラットにおいては、胃前庭部および十二指腸の MI はグレリンを投与しても変化は認められなかった (図 12A, B)。一方、六君子湯を摂取させた GERD ラットの胃前庭部においては MI 変化率に有意な増加が見られ (図 12A)、十二指腸では MI 変化率に増加傾向が認められた (saline 投与群と比較して $P = 0.074$; 図 12B)。同様に、六君子湯を摂取させた GERD ラットの胃前庭部では phaseIII 様収縮の頻度の有意な増加が見られ、十二指腸では phaseIII 様収縮の頻度の増加傾向が認められた (saline 投与群と比較して $P = 0.074$; 図 12C, D)。

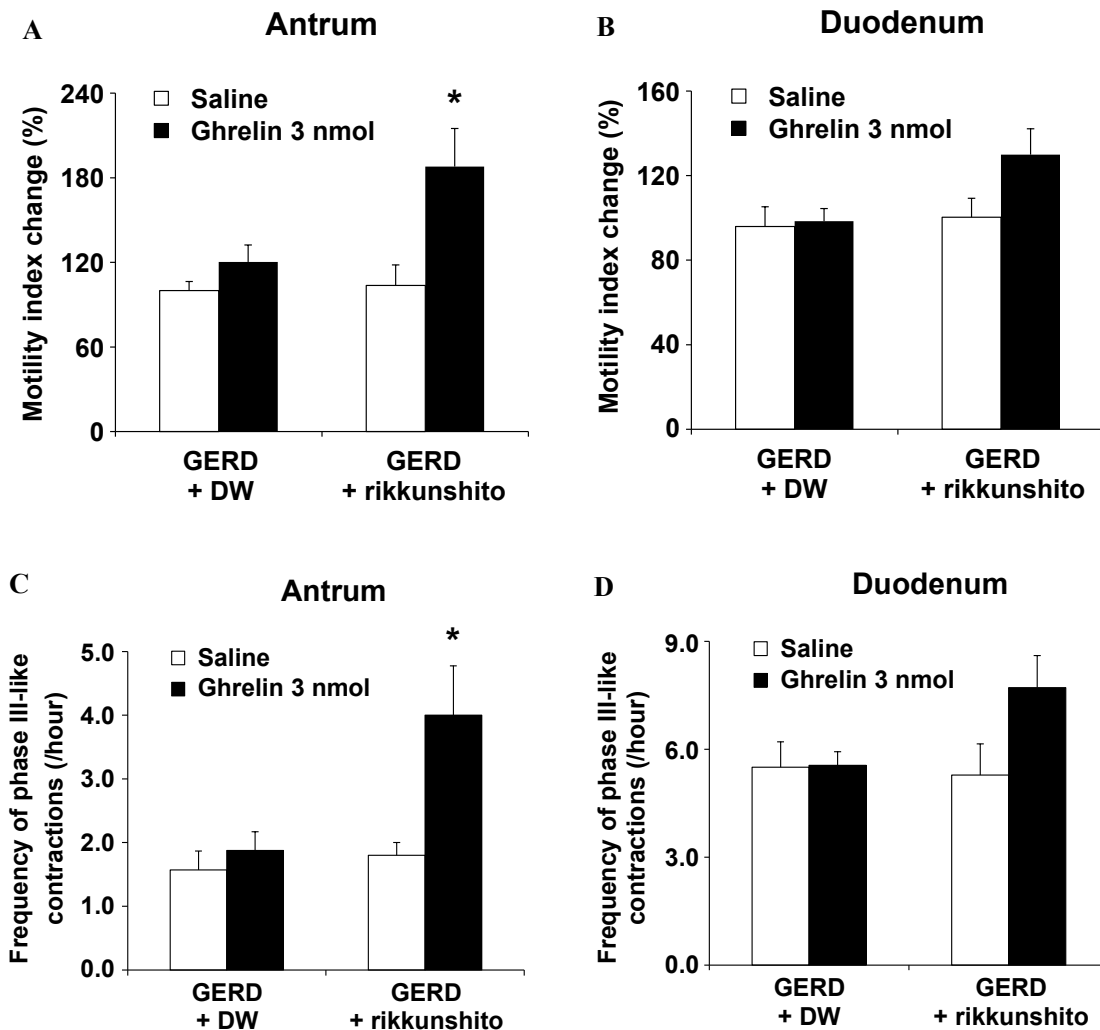


図 12 胃前庭部および十二指腸の MI 変化率および phaseIII様収縮の出現頻度におけるグレリン反応性に対する六君子湯投与の効果

A) 胃前庭部の MI 変化率、B) 十二指腸の MI 変化率、C) 胃前庭部の phaseIII様収縮出現頻度、D) 十二指腸の phaseIII様収縮出現頻度。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 7-9)。DW : 蒸留水。 * $P < 0.05$ vs. saline 投与群。

第8項 胃排出能のグレリン反応性に対する六君子湯投与の効果

六君子湯を 10 日間摂取させた GERD ラットと DW を摂取させた GERD ラットでは、摂餌量に差は見られなかった (GERD 処置 9 日後 ; DW 摂取群 19.9 ± 1.2 g/日 ; 六君子湯摂取群 17.9 ± 0.9 g/日 ; $P = 0.24$)。GERD 処置 10 日後、DW を摂取させた GERD ラットでは、

グレリンを投与しても胃排出能に影響を与えなかったが、六君子湯を摂取させた GERD ラットでは、グレリン投与によって胃排出が有意に亢進した (図 13)。

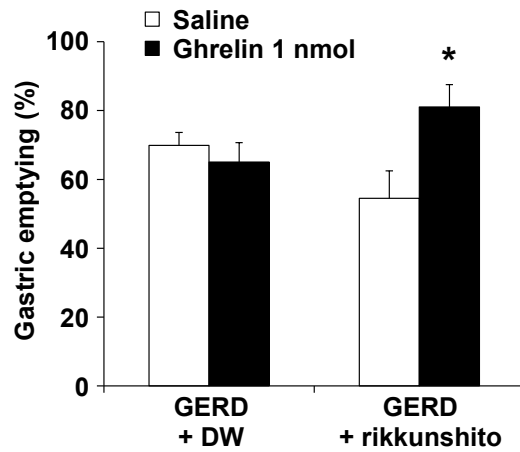


図 13 胃排出能におけるグレリン反応性に対する六君子湯投与の効果

データは平均値±標準誤差で表示 (n = 8-12)。DW : 蒸留水。* $P < 0.05$ vs. saline 投与群。

第4節 考察

本章では末梢グレリンと GERD との関連性に着目して検討を行い、次のことが明らかとなった。1) GERD ラットは胃排出能、摂餌量および胃前庭部運動の低下を示し、末梢グレリンレベルの増加を示した。2) GERD ラットにグレリンを投与しても胃排出能、摂餌量および胃前庭部運動の低下は改善されなかったが、六君子湯を摂取させると胃前庭部運動および胃排出能において、グレリン反応性の低下が改善された。

GERD 患者で胃排出能が低下していることは既に報告されているが^{11,12}、そのメカニズムは明らかになっていない。しかしながら、GERD 患者に消化管運動促進薬を投与することによって症状がある程度改善されることが示されており^{13,14}、著者らの研究グループでも *cisapride* が GERD ラットの下部食道括約部の近位の運動を改善することを報告している⁴⁴。これらの所見から、消化管運動障害が GERD の進行に関与していることが示唆される。本研究の結果から、GERD ラットへ *cisapride* を投与すると胃排出遅延が顕著に改善されることから、GERD ラットの上部消化管運動は 5-HT₄ 受容体を介したシグナル伝達によって調節されることが示唆された。これまで GERD ラットの胃前庭部運動の変化に関する研究は報告されていなかったが、本研究から、GERD ラットでは胃前庭部運動が有意に低下することが明らかとなった。一方、GERD ラットにおいて十二指腸運動の変化は認められなかった。以上の結果から、胃前庭部運動の低下が GERD ラットの胃排出遅延の一因であることが示唆される。

胃前庭部の空腹期収縮は末梢アシルグレリンによって一部調節されている⁴⁰。血中アシルグレリン値が増加すると、胃前庭部の *phase III* 様収縮が誘発される。本研究では、GERD ラットにおける血漿アシルグレリンおよびデスアシルグレリン値が有意に増加していたが、胃のグレリン陽性細胞数は有意に減少していた。また、GERD ラットの胃における *prepro-ghrelin* 遺伝子発現には変化がなかった。これらの結果から、GERD ラットで血漿グレリン値が高い理由として、胃におけるグレリン合成が亢進したためではなく、胃から血

中へのグレリンの分泌が増加したためと考えられ、その結果、X/A 様細胞に蓄積されたグレリンが減少し、GERD ラットのグレリン陽性細胞数の減少が観察されたのではないかと考えられた。

ラットでは、血清グレリンは絶食によって増加し、再給餌およびグルコース投与によって減少することが報告されている⁴⁷。ヒトでは、血清又は血漿グレリンはボディ・マス・インデックスに反比例する^{48,49}。本研究では、GERD ラットの体重は sham ラットと比較して有意に減少していた。これらのことから、栄養状態が血漿グレリン値に影響を及ぼした可能性が示唆されたが、GERD ラットの摂餌量と同量の飼料を摂取させた pair-fed の sham ラットは、sham ラットとほぼ同じ血漿グレリン値を示した。この結果は、25%あるいは 50%制限食で飼育したラットにおいて、15 日後の血漿グレリン値は自由摂餌下のラットと差が見られなかったとする報告と合致する⁵⁰。したがって、GERD ラットの血漿グレリン値の上昇は、摂餌量の減少だけに起因しているわけではないことが示唆された。

本研究では、GERD ラットの血漿グレリン値が上昇しているにもかかわらず、胃前庭部の phaseIII 様収縮の減少ならびにその結果としての胃排出能および摂餌量の低下が認められた。Sham ラットにグレリンを投与すると、胃排出能、摂餌量および十二指腸の phaseIII 様収縮の頻度が増加したが、GERD ラットでは胃排出遅延および摂餌量の減少は改善されなかった。本研究では、sham ラットと GERD ラットに 3 nmol/rat の外因性グレリンを投与した。GERD ラットの溶媒群では胃排出能に大きなばらつきが見られた。各群の動物数は 7 匹であったので、病態のばらつきが胃排出能に影響を与えた可能性が考えられる。体重 kg 当たりに換算すると、GERD ラットへのグレリン投与量は sham ラットと比較して高かったが (sham ラット, 12.1 nmol/kg; GERD ラット, 14.8 nmol/kg)、胃排出能に有意な改善は認められなかった。さらに、GERD ラットと sham ラットの十二指腸における phaseIII 様収縮の頻度はほぼ同じであったにもかかわらず、GERD ラットにグレリンを投与しても、十二指腸における phaseIII 様収縮の頻度は増加しなかった。以上の結果から、GERD ラットではグレリン反応性が減弱していることが示唆された。

食欲促進性の視床下部神経ペプチドである NPY および AgRP をコードする遺伝子の発現量は、GERD ラットでは sham ラットと比較して有意に増加したが、胃における GHS-R の発現量には変化がなかった。末梢グレリンは、胃粘膜に軸索輸送される迷走神経上の GHS-R への結合によってシグナルを伝達し、視床下部弓状核の NPY/AgRP ニューロンを活性化し、その結果、摂食行動^{19,31} および消化管運動^{20,21} を亢進させることが知られている。しかしながら、これらの食欲促進神経ペプチドの発現増加は GERD ラットの食欲を増進させず、下流の食欲促進シグナル伝達が妨げられていることが示唆された。Scarlett ら⁵¹ が示しているように、視床下部における NPY および AgRP の合成または分泌が関与していた可能性がある。大腸炎および閉塞性胆汁うっ滞のラットモデルでは、NPY 分泌は正常であったにもかかわらず、食欲促進ペプチドに対する摂食反応の低下が示されている^{52,53}。これらの報告は、食欲促進ニューロン経路が障害されていた可能性があること、または interleukin-1 β などの食欲抑制因子が関与していた可能性があることを示しているが、更なる研究が必要である。

本研究では、GERD ラットにおいてグレリン投与による GH 分泌能が低下した。常に高い末梢グレリン値を示すグレリントランスジェニックマウス、および高い血漿グレリン値を示す神経性無食欲症患者では、GH 分泌能に対するグレリンの作用は低下していることが報告されているが^{54,55}、高グレリン血症に起因するグレリンに対する反応性の低下の正確なメカニズムは不明である。最近、ストレス反応がグレリンの作用を抑制することが報告されたことから⁵⁶、本研究においても、ストレスの指標として血漿 corticosterone 値を測定したが、sham ラットと GERD ラットの差は認められなかった（データ未掲載）。したがって、GERD ラットにおいてグレリンの作用が減弱した原因にはストレスホルモン（CRF、urocortin など）は関与していないことが示唆される。グレリンの作用の減弱の機序については、現時点では不明であるが、グレリン受容体の脱感作が関与している可能性が考えられ、今後更に詳細な解析が必要である。

六君子湯を 10 日間摂取した GERD ラットでは、DW のみを摂取した GERD ラットと比

較して、グレリン投与後の胃前庭部の MI および phase III 様収縮の頻度に有意な増加が認められた。六君子湯は GERD 患者の食道クリアランスを高め、その症状を改善することが示されている³⁷。また、GERD ラットでは、六君子湯は疼痛の指標である自発運動の低下を有意に改善する³⁹。GHS-R を過剰発現させた細胞又は NPY ニューロンを用いた *in vitro* 試験では、六君子湯は [¹²⁵I]グレリンの結合を増加させ、グレリン添加後の Ca²⁺ の流入を持続的に増加させると報告されている⁴²。これらの所見から、六君子湯は GERD ラットにおいて内因性グレリンシグナル伝達を改善する可能性があると考えられる。

本研究では、GERD ラットに六君子湯を摂取させると、胃前庭部の MI および phase III 様収縮の頻度におけるグレリン反応性の低下が改善された。さらに、六君子湯単独では摂餌量および胃排出能の低下に影響を及ぼさなかったが、六君子湯とグレリン (1 nmol/rat) を併用すると、GERD ラットの胃排出遅延が有意に改善された。グレリンは、迷走神経末端に存在する GHS-R を刺激することにより、求心性迷走神経にシグナルを伝達し、中枢神経系から遠心性迷走神経を介して消化管収縮を引き起こすことが知られていることから^{22, 31, 32}、これらの結果は、六君子湯が求心性迷走神経のグレリン感受性を上昇させ、胃排出遅延を抑制させたことによるものではないかと推察される。

六君子湯がグレリンの感受性の低下を改善する分子的な機序としては、六君子湯による III 型ホスホジエステラーゼ活性の阻害が関与している可能性が考えられる。これまでの解析から、六君子湯の成分である heptamethoxyflavone と nobiletin は、*in vitro* で III 型ホスホジエステラーゼ活性を阻害することが明らかとなっている⁵⁷。また、視床下部弓状核の AgRP/NPY ニューロンにおいて、グレリン受容体 GHS-R は、Gs を介してアデニル酸シクラーゼ活性を上昇させることで cAMP を増加させ、A キナーゼ経路を活性化すること⁵⁸、さらに、III 型ホスホジエステラーゼおよびホスファチジルイノシトール 3 キナーゼの作用によってグレリンのシグナル伝達が遮断され、cAMP が減少する⁵⁹ことが知られている。これらの事実から、六君子湯が III 型ホスホジエステラーゼの活性を阻害することによって cAMP の分解を抑制し、その結果、A キナーゼを活性化してグレリンシグナルを増強することで、前

庭部の自発的な phase III 様収縮の頻度およびグレリン反応性を亢進させた可能性が考えられる。しかしながら、迷走神経末端における GHS-R が、弓状核の AgRP/NPY ニューロンの場合と同様に、cAMP→A キナーゼ経路を活性化させているかどうかは明らかでなく、この仮説を実証するためには、今後、迷走神経におけるグレリンシグナル伝達機構とそれに対する六君子湯の効果を分子レベルで更に詳細に解析する必要がある。

本章の結論として、GERD ラットの消化管運動障害にはグレリン感受性の低下が関与している。さらに、六君子湯は低下したグレリン反応性を高めることによって消化管運動を改善する。グレリンに対する反応性の改善は GERD の新しい治療アプローチとなりうると考えられる。

第2章 胃食道逆流症モデルラットにおける食欲関連因子に関する基礎的研究

第1節 背景

GERD は食道へ胃酸などが逆流することによって発症する。多くの GERD 患者の食道では粘膜上皮にびらんが認められ、プロトンポンプ阻害薬などの酸分泌抑制剤で症状が緩和する⁶⁰。食道への酸の逆流は食後に多く⁶¹、GERD 患者においては吐き気や食欲の低下を訴える場合もあり、GERD の原因ともなる食道への酸逆流は、食事の量や内容も一部関与している可能性が考えられる。

空腹や満腹を制御しているのは末梢や中枢のさまざまな摂食関連ホルモンである。胃から分泌されるグレリンは摂食や消化管運動を促進し³¹、摂食により分泌亢進される cholecystokinin (CCK) やレプチンは逆に摂食を抑制する^{62, 63}。グレリンは胃粘膜に存在する X/A 様細胞から分泌され、迷走神経末端に存在する GHS-R に結合して、CCK によって伝えられる満腹刺激を抑制することで、摂食行動を刺激する^{18, 64}。一方、レプチンは脂肪細胞から分泌され、血中を介して直接視床下部へ作用し、グレリンによる摂食刺激を抑制する⁶³。これまでのところ、GERD 患者における摂食関連ホルモンの変化は十分に検討されていない。本研究では GERD における食欲関連因子の関与を明らかにする第一歩として、摂食関連ペプチド類の末梢プロファイルを明確にし、その中から特にグレリンの変化に焦点を絞って、その反応性に関する検討を行った。

第2節 材料・実験方法

第1項 実験動物

日本クレア(株)から 8 週齢の雄の Wistar ラットを購入し、実験に使用した。実験期間中は 4-5 匹のグループでケージに収容し、飼料および水は自由に摂取させた。12 時間照明（7 時～19 時）で温湿度を一定に保った条件下で管理した。動物実験はすべて(株)ツムラの動物実験審査委員会のガイドラインに従って 9 時～18 時に実施した。

第2項 被験物質

ラットグレリンは(株)ペプチド研究所から購入し、saline（大塚製薬(株)）に溶解した。

第3項 GERD モデルの作製

Omura らの方法に従ってラットに外科的に GERD を誘発した⁴³。24 時間の絶食後にエーテルで麻酔をかけ、正中線で開腹した。胃と十二指腸を体外に露出させ、1-0 絹糸（(株)夏目製作所）を用いて前胃から腺胃への移行（境界）部分を結紮した。幽門の十二指腸側を 2 mm 幅の 18-Fr ネラトンカテーテル（テルモ(株)）で覆い、5-0 ナイロン糸を用いて十二指腸漿膜の表面に縫合し、固定した。胃と十二指腸を腹腔内に戻して閉腹した。Sham ラットについては、開腹して胃と十二指腸を約 1 分間露出させた後、腹腔内に戻して閉腹した。処置後、ラットはさらに 24 時間絶食とした。GERD 誘発動物において、死亡した個体や、各実験の評価日において臓器の癒着や膿瘍が認められた個体、極度に体重低下した個体、衰弱した個体は実験から除外した。サンプル数の極端な減少を防ぐため、GERD 誘発動物は sham ラットより多めに作製した。

第4項 体重および摂餌量の測定

GERD 処置後、ラットは個別にケージに収容した。体重は GERD 処置日から測定し、毎日の摂餌量は、摂食前と摂食後の飼料重量の差として計算し、GERD 処置 2 日後 (day 2) から測定した。ラットは day 9 から 24 時間絶食させた後、安楽死させ、免疫組織化学的評価に用いた。

第5項 免疫組織化学的評価

24 時間絶食後 (day 10)、エーテル麻酔下で腹部下大静脈から脱血死させ、食道を摘出した。免疫組織化学的評価は既報³⁹と同様に行った。食道は縦方向に切開し、ゴムプレートに虫ピンで留めて写真を撮った。画像解析ソフト (WinROOF ; 三谷商事株) に取り込んで食道粘膜の潰瘍部分の面積を計測した。

第6項 GERD ラットへの外因性グレリン投与の影響

GERD 処置の際、ヘパリン添加 saline を充填したカテーテルを頸静脈に固定した。カテーテルは皮下を通して背部から体外に出し、噛まれないように金属スプリングで覆った。術後、ラットを個別にケージに収容し、さらに 24 時間絶食とした。翌日からラットグレリン (3 nmol/rat) を頸静脈から 1 日 1 回、6 日間投与した。control 群には saline を投与した。体重は GERD 処置日から、摂餌量は処置の 2 日後から測定した。

第7項 血漿グレリン値と摂食関連ホルモン値の測定

GERD 処置 3、7、10 日後、エーテル麻酔下で腹部下大静脈から採血した。アプロチニン (和光純薬工業株) および EDTA-2Na (株同仁化学研究所) を入れたチューブに血液を回収し、既報⁴¹の通り血漿サンプルを得た。ただちに 4°C で血液サンプルを遠心分離し、1 mol/L の HCl (1/10 量) で血漿を酸性化し、測定まで -80°C で保存した。血漿グレリン値は、Active- および Desacyl-Ghrelin ELISA Kit (三菱化学メディエンス株) を用いて測定した。血漿 CCK

値は、酸性化していない血漿サンプルを用いて、CCK EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals 社) にて測定した。血漿レプチン値は、Bio-Plex suspension array system (BioRad Laboratories 社) にて Bio-Plex Pro Rat Diabetes assay panel (BioRad Laboratories 社) を用いて測定した。

第8項 RNA の抽出および RT-PCR

GERD 処置 3、7、10 日後、採血の直後に胃体部と視床下部をマイクロチューブに回収して凍結させ、測定まで -80°C で保存した。組織をホモジナイズし、RNeasy Universal Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて RNA を抽出した。RNA 溶液は $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ に希釈し、 70°C で 5 分間反応させた後、氷上で冷却した。RNA (1000 ng) は TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems 社) を用いて逆転写反応を行った後、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems 社) で定量的 PCR 解析を行った。mRNA 発現量は β -actin を内在性コントロールとして補正を行い、 $\Delta\text{threshold cycle}$ (ΔCt) 値: $\Delta\text{Ct} = 2^{-(A-B)}$ で表して発現量の比較を行った。A は β -actin の、B は標的遺伝子の閾値に達したサイクル数である。用いたプライマーとプローブ (Applied Biosystems 社) は下記の通りである: *Actb*, Rn00667869_m1; *Ghrl*, Rn00572319_m1; *Ghsr*, Rn00821417_m1; *Mboat4*, Rn02079102_s1; *Npy*, Rn00561681_m1; *AgRP*, Rn01431703_g1; *Pomc*, Rn00595020_m1; *Pmch*, Rn00561766_g1; *Hcrt*, Rn00565995_m1。

第9項 統計解析

データは各群の平均値 $\pm$ 標準誤差として表した。Student's *t*-test を用いて統計的有意性を検定し、有意水準は $P < 0.05$ とした。

第3節 実験結果

第1項 一般状態および組織学的所見

図 14に示すように、day 10 の GERD ラットの食道では粘膜の潰瘍が明確に観察された。GERD ラットにおける潰瘍の個数は 2.5 ± 0.4 であり、総面積は $39.7 \pm 9.8 \text{ mm}^2$ であった。また、day 9 の体重および摂食量は sham ラットと比較して GERD ラットで有意に低下した (図 15A, B)。

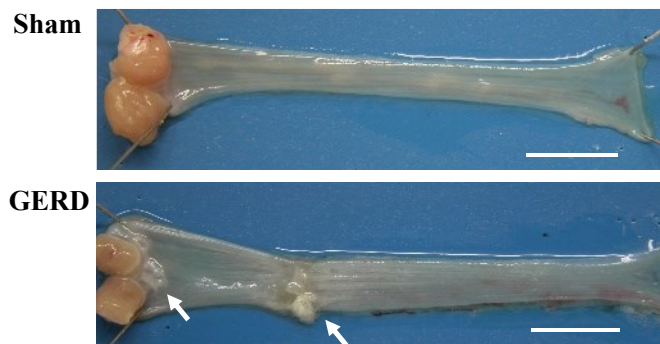


図 14 Day 10 における sham ラットおよび GERD ラットの食道写真
矢印は潰瘍発生箇所。Bar : 10 mm

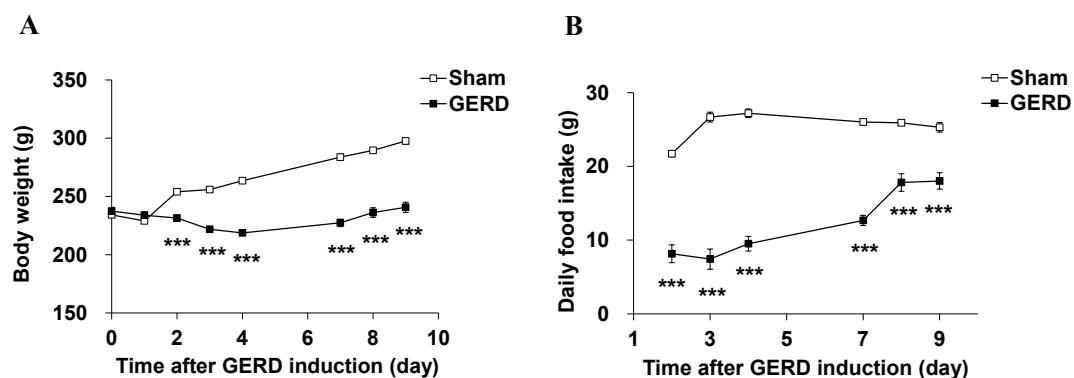


図 15 Sham ラットおよび GERD ラットの体重および摂餌量推移

A) 体重、B) 摂餌量。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 8)。*** $P < 0.001$ vs. sham ラット。

第2項 血漿グレリン値

GERD ラットの血漿アシルグレリンならびにデスアシルグレリン値は day 3 から有意に増加し、day 10 まで持続した (図 16A, B)。

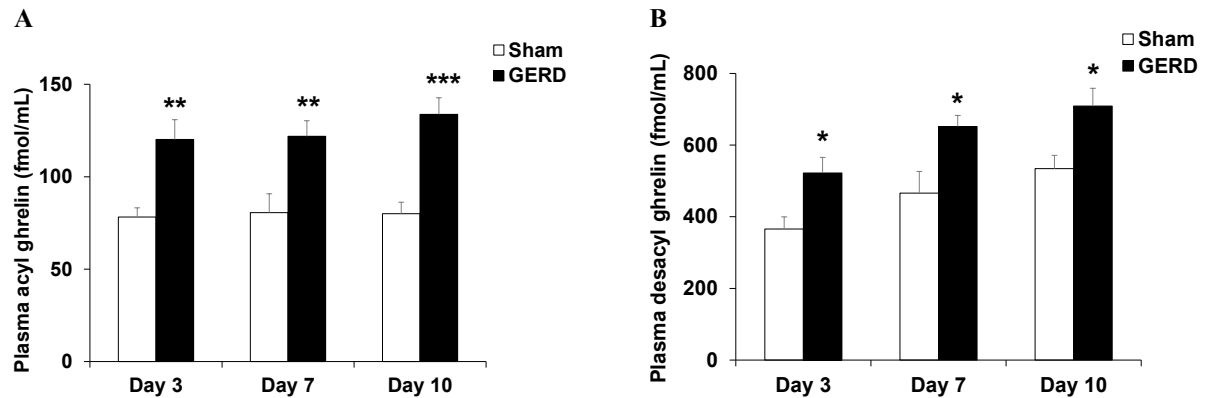


図 16 Sham ラットおよび GERD ラットの血漿グレリン値

A) アシルグレリン値、B) デスアシルグレリン値。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 4-8)。*, **, *** $P < 0.05, 0.01, 0.001$ vs. sham ラット。

第3項 血漿レプチン値、CCK 値

Day 10 における血漿レプチン値は GERD ラットで有意に低下した (表 1)。血漿 CCK 値は sham ラットと比較し有意な差はなかった。

表 1 Sham ラットおよび GERD ラットの血漿レプチン値および CCK 値

	Sham (pg/mL)	GERD (pg/mL)
Leptin	714.6 ± 49.3	358.1 ± 78.5 *
CCK	133.8 ± 8.2	112.3 ± 6.8

データは平均値±標準誤差で表示 (n = 4-8)。* $P < 0.05$ vs. sham ラット

第4項 体重および摂餌量におけるグレリン反復投与の影響

体重は sham ラットと比較して GERD ラットで有意に低下した (図 17A)。GERD ラットへのグレリンの反復投与は体重低下に対し効果を示さなかった。また、摂食量に対しては GERD ラットの摂食低下に対し、グレリンの反復投与は効果を示さなかった (図 17B)。

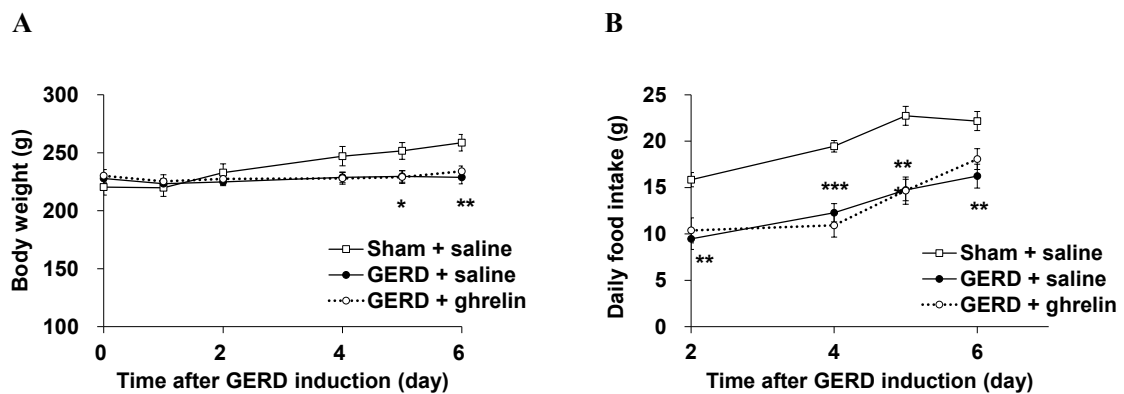


図 17 GERD ラットの体重および摂餌量におけるグレリン投与の影響

A) 体重、B) 摂餌量。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 6-10)。*, **, *** $P < 0.05, 0.01, 0.001$ vs. sham ラット。

第5項 胃体部および視床下部における食欲関連 mRNA 発現

胃体部における prepro-ghrelin mRNA ならびに GHS-R の mRNA 発現は day 10 まで sham ラットと GERD ラットに大きな差はなかった (図 18A, B)。一方、GOAT mRNA 発現は GERD ラットにおいて day 7 から有意に低下し、day 10 まで持続した (図 18C)。

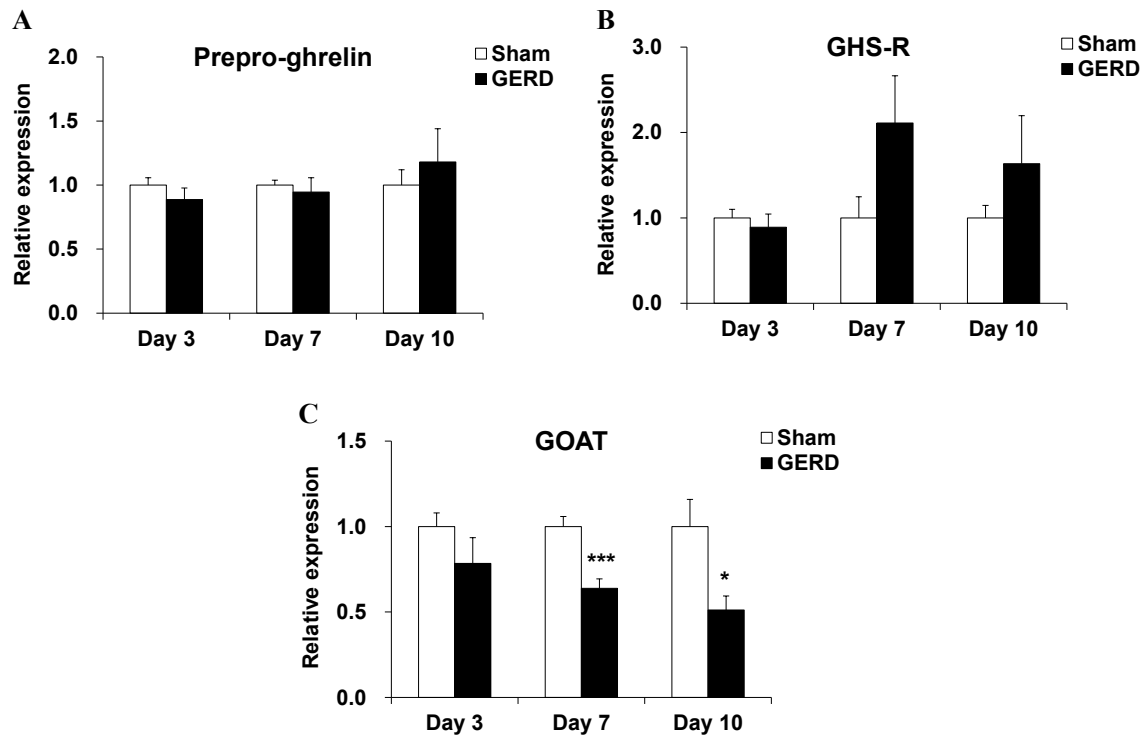


図 18 Sham ラットおよび GERD ラットの胃体部のグレリン関連 mRNA 発現

A) prepro-ghrelin mRNA、B) GHS-R mRNA、C) GOAT mRNA。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 6–8)。*, *** $P < 0.05, 0.001$ vs. sham ラット。

視床下部では、NPY mRNA 発現は GERD ラットにおいて day 10 で有意な増加が見られた(図 19A)。AgRP mRNA 発現は day 3 より GERD ラットで有意な増加が認められた(図 19B)。一方、proopiomelanocortin (POMC) mRNA 発現は day 7 より、GERD ラットで有意な低下が見られた(図 19C)。Melanin-concentrating hormone (MCH) mRNA および prepro-orexin mRNA 発現は、sham ラットと GERD ラットで変化が認められなかった(図 19D, E)。

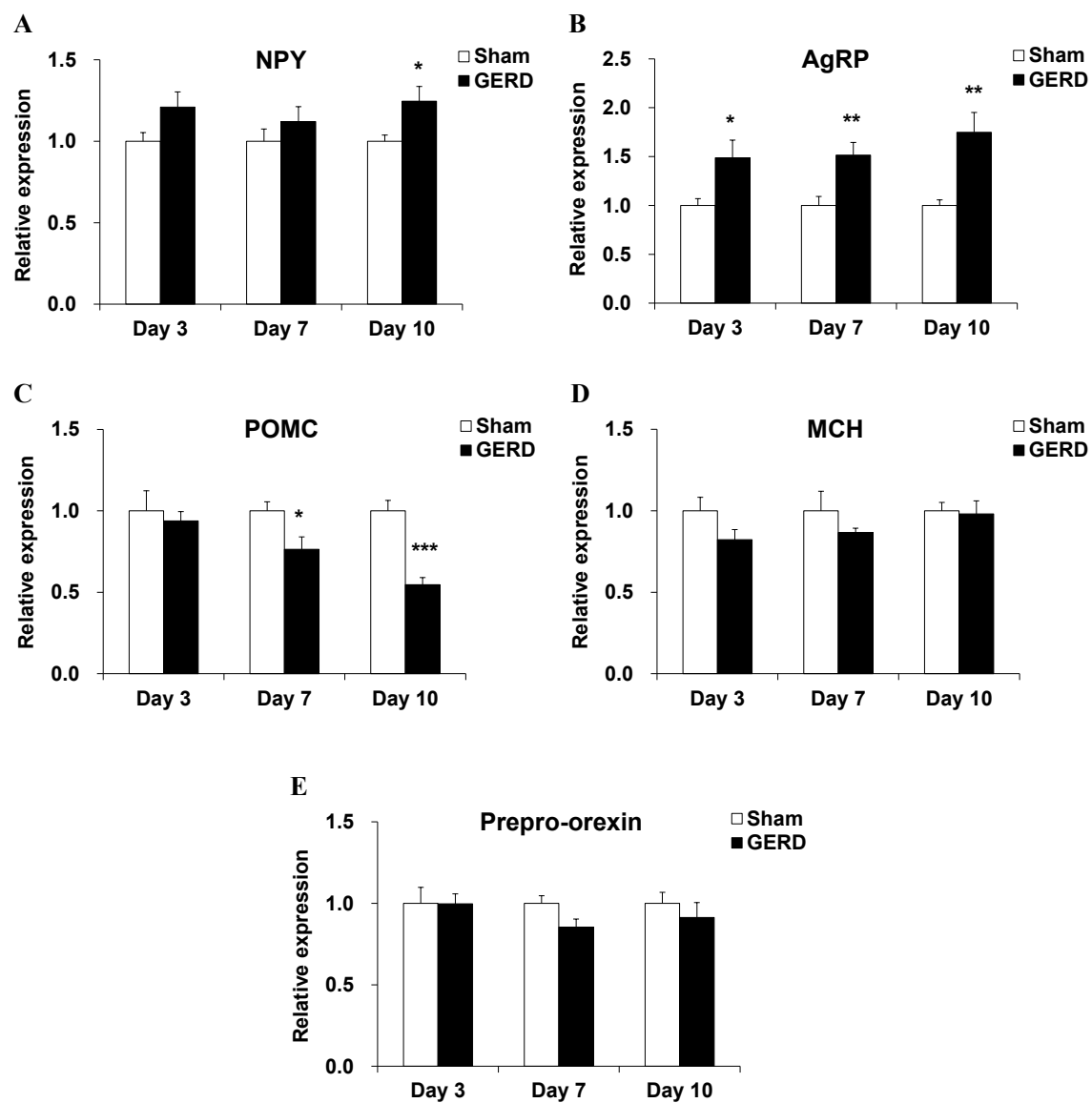


図 19 Sham ラットおよび GERD ラットの視床下部の食欲関連 mRNA 発現

A) NPY mRNA、B) AgRP mRNA、C) POMC mRNA、D) MCH mRNA、E) prepro-orexin mRNA。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 7-12)。*, **, *** $P < 0.05, 0.01, 0.001$ vs. sham ラット。

第4節 考察

GERD ラットの血漿アシルグレリンならびにデスアシルグレリンが GERD 惹起後急速に増加しているにも関わらず、逆に摂食量や体重が低下した。アシルグレリンの反復投与は摂食量の低下と体重の低下を抑制しなかった。視床下部の NPY/AgRP ニューロンの活性はすでに有意に増加していたが、MCH および orexin ニューロンの活性には変化がなかった。GERD ラットの末梢グレリンのシグナルは視床下部弓状核へ入力されているが、外側野の MCH および orexin ニューロンは活性化しておらず、このことが摂食低下に関与していると考えられた。

グレリンは主に胃で産生される食欲増進ホルモンで¹⁸、摂食を増やしてエネルギー消費を抑制する作用をもつ^{31,19}。本研究では、第1章で示したように、GERD では、グレリン投与（3 nmol/rat）による急性の反応が低下していることを見出している⁶⁵。GERD ラットへのグレリンの静脈内投与は、sham ラットと比較して成長ホルモン分泌能が減弱し、摂食量、胃排出能および胃運動の低下を抑制しなかった。さらに、本章で示した結果から、GERD ラットへのグレリン反復投与（3 nmol/rat/day）は、実験期間を通して摂餌量にも体重にも作用を示さなかった。第1章で示したように、sham ラットへのグレリン単回投与（3 nmol/rat）は摂食量を顕著に増加させることが判明しており⁶⁵、また、他の報告においても正常ラットではグレリン 1.5 nmol/rat の投与で摂食量が顕著に増加することが示されている³²。これらの結果から、GERD ラットではグレリン感受性が低下しており、摂食量を増加させるにはさらに高用量のグレリンの投与が必要な可能性がある。

GERD ラットにおいて末梢の血中グレリンが高値になるメカニズムに関しては十分に明らかになっていない。胃の prepro-ghrelin mRNA および GHS-R mRNA 発現は GERD ラットと sham ラットで差は見られず、このことは、GERD ラットの胃におけるグレリン合成の亢進が原因ではないことを示している。また、proghrelin にオクタノイル基を付加する酵素である GOAT の遺伝子発現は有意に低下していたが、この結果は、GOAT mRNA 発現が長

時間の絶食によって負に調節されているという知見に一致し⁶⁶、末梢血中にアシルグレリンが豊富に存在しているためにネガティブフィードバックにより GOAT の mRNA の発現が低下した可能性が考えられる。これらの結果から、GERD ラットにおいて末梢血中のグレリン濃度が高いのは、胃からのグレリンの合成促進によるものではなく、分泌亢進の可能性が高いと考えられる。

グレリン受容体 GHS-R は G-protein coupled receptor (GPCR) の一種であり、通常リガンドとの結合後に脱感作が生じる⁶⁷。GERD ラットにおいて血漿グレリン濃度が持続的に高いことによって、全身性に GHS-R の脱感作を招いている可能性が考えられる。しかしながら、本研究では GERD ラットの視床下部の NPY/AgRP mRNA 発現が sham ラットと比較して day 3 から有意に増加していた。グレリンは胃に存在する迷走神経末端の GHS-R に結合し、迷走神経を介して視床下部弓状核に存在する NPY/AgRP ニューロンを刺激し、NPY/AgRP mRNA 発現が亢進する^{31, 32}。GERD ラットでは NPY/AgRP 遺伝子発現が亢進していたことから、グレリンシグナルはすでに上限まで達しており、さらなるグレリンの投与に不応性を示している可能性も考えられる。レプチンは NPY/AgRP mRNA 発現を抑制し、POMC ニューロンを刺激して POMC mRNA を産生する^{68, 69}。血漿レプチン値は GERD 処置 10 日後のみ測定しているため、グレリン濃度の増加と逆相関しているかどうかは推測の域を脱しないが、GERD ラットの血漿グレリン値の増加に加え血漿レプチン値が低下したことも、NPY/AgRP mRNA 発現の亢進および POMC mRNA 発現の低下に寄与したのかもしれない。

本研究では、GERD ラットにおける prepro-orexin mRNA および MCH mRNA 発現は、実験期間を通して変化が見られなかった。食欲亢進シグナルは NPY/AgRP ニューロンの活性化を介して外側野に伝えられ、orexin ニューロンや MCH ニューロンを活性化させる⁷⁰⁻⁷³。Orexin や MCH はこれらニューロンの活性化によって主に外側野において産生される。MCH1 受容体の拮抗作用や MCH の欠損は摂食を低下させ、MCH1 受容体欠損マウスは痩せを来す⁷⁴⁻⁷⁶。また、これらニューロンが活性化することによって、腹側被蓋野や側坐核の

dopamine ニューロンを介して食欲や学習を含む報酬系が働くことが知られている^{77, 78}。

GERD ラットでは orexin や MCH ニューロンの活性が抑制されることによって摂食が低下していると推測される。しかしながら、その詳細なメカニズムやこれらニューロンを抑制する因子についてはまだ明確になっていない。GERD ラットにおいて orexin や MCH ニューロンがなぜ反応を示さないのか、さらなる検討が必要である。

現在、ヒトの GERD を適切に反映した GERD のモデルはない。今回の実験で用いた GERD モデルは、前胃を結紮し幽門部にリングをつけるという広範な手術操作を施したモデルであり、ヒトの GERD とは大きく異なる点がある。しかしながら、cisapride の経口投与によって本モデルの胃排出低下が明らかに改善することから⁶⁵、物理的な処置（幽門部のリングや結紮処置）によって不可逆的な胃運動低下が惹起されているわけではないと考えられる。一方で、広範な手術操作が摂食関連パラメーターに影響している可能性は除外できない。なお、予備検討結果ではあるが、プロトンポンプ阻害薬の有効量⁷⁹の投与は GERD ラットの初期の体重、摂食量、グレリン濃度に影響を与えなかったことから本モデルにおけるグレリンの分泌亢進や摂食関連因子の変動に、少なくとも食道への胃酸の過剰暴露は関与していないと考えられる。

本研究に用いた GERD モデルの妥当性は今後十分に検証すべき課題であり、処置における物理的な障害や胃酸の暴露が摂食関連パラメーターやホルモンレベルに及ぼす影響をさらに丁寧に検証していく必要がある。

本章の結論として、GERD ラットでは末梢のアシルグレリンレベルが高くレプチン濃度が低いという特徴を持ち、グレリンシグナル伝達が障害されていると考えられる。しかしながら、本モデルの妥当性の検討や酸分泌抑制剤投与による詳細な検討を実施することが課題として残される。

第二部 加齢マウスにおける基礎的研究

第3章 加齢マウスへの新奇環境ストレス負荷による摂食低下に関する基礎的研究

第1節 背景

不安障害やうつ病を抱えた高齢者は増加の一途を辿っており、現代の高齢化社会においては、これら疾患を治療することは非常に重要なことである⁸⁰。高齢者では食欲が低下しやすく、その結果として、様々な疾患の罹患率上昇や身体機能の低下を助長させる^{81, 82}。高齢者の食欲不振には様々な要因が関与しているが、社会的因子や環境の変化などの心理的要因は特に重要である^{83, 84}。晩年になってからの近親者との離別や死別は、うつ病の発症や再発の可能性を高めることが報告されている⁸⁵。このように、高齢者では不安要因が食欲に大きく影響する。

環境変化によって食欲が低下する神経メカニズムはまだ明らかになっていない。脳内 CRF 受容体の活性化は、食欲や消化管機能、情動反応に影響を及ぼす^{86, 87}。CRF 受容体は、HPA axis (図 20) の亢進に加え⁸、不安行動や摂食低下といったストレス反応にも重要な役割を果たしている⁸⁶。新奇環境への暴露(群飼育から個別飼育ケージへの移動)は急性に摂食低下を引き起こすが、これには CRF1 受容体の活性化が関与している⁸⁸。摂食や不安は様々な神経伝達物質によって制御されている。中枢の神経伝達物質の中でも 5-HT は情動行動や摂食行動を始め、様々な生理反応に関与している。5-HT を急性に枯渇させれば、novelty-induced hypophagia テストにおける新奇環境下での摂食低下や摂食開始までの時間が長くなるなどの不安行動を抑制する⁸⁹。

5-HT 受容体のサブタイプの中で 5-HT_{2C} 受容体は、視床下部弓状核の POMC ニューロン上⁹⁰および室傍核の CRF ニューロン上⁹¹に発現しており、不安を増強させることや⁹²、5-HT_{2C} 受容体の活性化によって不安行動が増大することが報告されている^{93, 94}。また、

5-HT_{2c} 受容体は摂食を負に制御している^{90, 95-97}。近年、5-HT_{2c} 受容体と CRF の相互作用に関する研究が報告されている^{88, 98}。しかしながら、加齢動物における環境変化ストレスに CRF および 5-HT_{2c} 受容体が関与するかどうかは明確になっていない。

これまでに、著者らや他の研究者らは、加齢げっ歯類における摂食量の低下を報告しているが^{57, 99}、加齢動物において、新奇環境への暴露が摂食行動に及ぼす影響についてはまだ検討されていなかった。一般的に動物モデルにおける不安状態の評価には、open field test や、新たな飼育ケージまたは不安を惹起させるような新奇環境下での摂食行動を評価する方法が用いられる。たとえば、摂食開始までの時間や新奇環境下での摂食量について評価されている^{89, 100}。本研究では、動物を新奇環境に暴露させるだけでなく、群飼育から個別飼育に変更することで、環境変化と社会的隔離による臨床上的ストレスの評価を試みた。加齢マウスの新奇環境変化に伴う摂食低下のメカニズムには、セロトニン神経系、特に 5-HT_{2c} 受容体の持続的な活性化が関与しているとの仮説を立て、この仮説を検証するため、加齢マウスに新奇環境ストレスを負荷し、選択的 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬および 5-HT_{2c} 受容体拮抗作用を有する六君子湯を投与して摂食行動に与える影響を検討した。また、5-HT_{2c} 受容体機能亢進のメカニズムを解明するため、視床下部における 5-HT_{2c} 受容体の mRNA 発現について検討した。

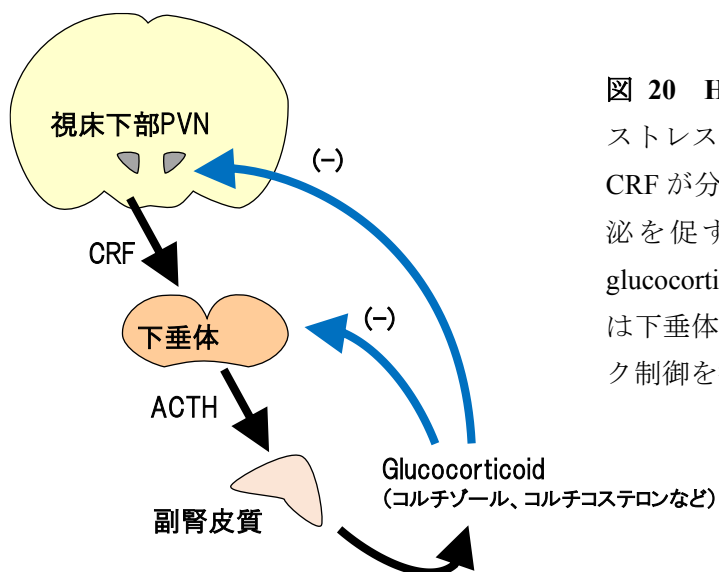


図 20 HPA axis

ストレスを受けると視床下部 PVN から CRF が分泌され、下垂体からの ACTH 分泌を促す。ACTH は副腎皮質からの glucocorticoid 分泌を促し、glucocorticoid は下垂体や視床下部に負のフィードバック制御を行う。

PVN: 室傍核、CRF: corticotropin-releasing factor、ACTH: adrenocorticotrophic hormone。

第2節 材料・実験方法

第1項 実験動物

6 週齢 (young ; 体重 22.8 ± 0.3 g) および 79–80 週齢 (aged ; 体重 44.1 ± 0.6 g) の雄の C57BL/6J マウスを日本チャールスリバー(株)から購入した。マウスは 5 匹/ケージにし、温湿度一定・12 時間照明 (7 時～19 時)・自由摂餌下で馴化飼育させた。Novelty-induced hypophagia テストは、Merali ら (2004) ¹⁰¹ および Bechtholt ら (2007) ⁸⁹ の方法を改変して行った。マウスは群飼育 (5 匹/ケージ、ケージサイズ W230 × D310 × H155 mm) から個別飼育ケージ (1 匹/ケージ、ケージサイズ W136 × D208 × H115 mm) に突然移す (isolation) ことで新奇環境ストレスとし、摂食量に対する効果を評価した。摂餌量を評価する実験では、実験前に 7 日間個別飼育ケージで飼育したマウスを control 群とした。すべての実験は 9 時～18 時の間に行った。実験はすべて(株)ツムラの動物実験審査委員会のガイドラインに従って実施した (承認済プロトコール No. 08-212)。

第2項 血清 ACTH および corticosterone 値の測定

マウスを自由摂餌下で isolation し 24 時間後、頸動脈から採血を行った。日内変動の影響を考慮し、採血は 13:00 から 15:00 の間に行った。血清 adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 値の測定は、ACTH EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals 社) を用い、血清 corticosterone 値は、Corticosterone EIA kit (Enzo Life Sciences 社) を用いて測定した。

第3項 摂餌量の測定

マウスを isolation して標準飼料 (MF ; オリエンタル酵母工業(株)) を与え、6 および 24 時間後、摂餌量の測定を行った。摂餌量は給餌量と各時点の残餌量の重量差として算出した。食べこぼしは各時点の残餌量に加えて重量を測定した。実験期間中は水を自由に摂取させた。群飼育したマウスの摂餌量は、各ケージの摂餌量を個体数で徐して 1 匹当たりの

平均摂餌量とし、7日間個別飼育した control マウスの摂餌量と差がないことを確認した。

第4項 RNA の抽出および RT-PCR

マウスを自由摂餌下で isolation して 24 時間後、視床下部と下垂体をマイクロチューブに回収し、ドライアイス上で凍結させた。凍結後は -80°C で保存した。組織をホモジナイズし、RNeasy Universal Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて RNA を抽出した。RNA 溶液は $100\text{ ng}/\mu\text{L}$ に希釈し、 70°C で 5 分間反応させた後、氷上で冷却した。RNA (1000 ng) は TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit (Applied Biosystems 社) を用いて逆転写反応を行った後、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 社) を用いて PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems 社) で定量的 PCR 解析を行った。mRNA 発現量は ribosomal protein S29 を内在性コントロールとして補正を行い、 $\Delta\text{threshold cycle}$ (ΔCt) 値： $\Delta\text{Ct} = 2^{-(A-B)}$ で表して発現量の比較を行った。A は ribosomal protein S29 の、B は標的遺伝子の閾値に達したサイクル数である。用いたプライマーとプローブ (Applied Biosystems 社) は下記の通りである：*Rps29*, Mm02342448_gH; *Crh*, Mm01293920_s1; *Crhr1*, Mm00432670_m1; *Htr2c*, Mm00434127_m1; *Npy*, Mm00445771_m1; *Agrp*, Mm00475829_g1; *Pomc*, Mm00435874_m1。CRF 一次転写物 (CRF hnRNA) の検出に用いたプライマーおよびプローブは、Custom TaqMan Assay Design Tool (Applied Biosystems 社) にて設計した。Forward プライマーの配列は GGAATGGAGACAGAGAAGGTTGTTC、reverse プライマーの配列は AGCTGTCGCACACCCTAATC である。

第5項 摂餌量に対する薬物投与の効果

選択的 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬の SB242084 (6 mg/kg; Tocris Bioscience 社)⁹⁶ および六君子湯 (1000 mg/kg; 榊ツムラ)⁴¹ を自由摂餌下でマウスに経口投与し、同時に isolation を行って 3、6、24 時間後の累積摂餌量を測定した。Control 群には DW を経口投与した。また、7日間個別飼育したマウス (非ストレスマウス) にも SB242084 を経口投与し摂餌量を測定し

た。六君子湯の 5-HT_{2c} 受容体に対する拮抗作用を確認するため、5-HT_{2c} 受容体作動薬として 1-(m-chlorophenyl) piperazine (mCPP ; Sigma-Aldrich 社) を young マウス (5 mg/kg) および aged マウス (3 mg/kg) に腹腔内投与し¹⁰²、同時に六君子湯 (1000 mg/kg) を経口投与して 3 および 6 時間後の累積摂餌量を測定した。また、mCPP を 1、3、5 mg/kg の用量で young マウスおよび aged マウスに腹腔内投与し、3 および 6 時間後の累積摂餌量を測定した。

第6項 ストレスホルモンの分泌ならびにストレス関連および食欲関連因子の mRNA 発現に対する薬物投与の効果

SB242084 (6 mg/kg) および六君子湯 (1000 mg/kg) は自由摂餌下でマウスに経口投与し、同時に isolation を行って 24 時間後に採血して血清 ACTH 値および corticosterone 値を測定した。また、絶食させたマウスに薬物を投与して isolation を行い、6 時間後に視床下部および下垂体を摘出して RNA を抽出し、mRNA の発現解析を行った。また、絶食させた young マウスに mCPP (50μg/mouse) を脳室内投与して 1 時間後、頸動脈から採血を行い、血清 corticosterone 値を測定した。脳室内投与は既報の方法⁸⁸に従い、マウスの頭蓋骨表面から 2.6mm 下 (ブレグマから 1.1mm 横) の側脳室に、ポリエチレンチューブおよび 26 ゲージの注射針を取り付けた 10μL のマイクロシリンジを用いて 6μL/mouse を投与した。

第7項 *In vitro* 試験

5-HT_{2c} 受容体を安定的に発現している CHO-K1 細胞を modified Tris-HCl 緩衝液中で培養して細胞膜を得た。膜タンパクは 1.0 nmol/mL [³H]-mesulergine (5-HT_{2c} 受容体拮抗薬) とともに 25°C で 60 分間培養し、フィルターで濾過した。非特異的結合は 1 μmol/L の mianserin (日本オルガノン(株)) 存在下で測定した。フィルターの放射活性を測定し、[³H]-mesulergine の特異的結合に対する阻害作用を評価した¹⁰³。

5-HT_{2c} 受容体に対する拮抗作用は、5-HT_{2c} 受容体を発現している HEK-293 細胞を用い、HTRF 法にて作動薬による IP₁ 産生に対する効果を測定した¹⁰⁴。細胞は緩衝液 [10 mM

Hepes (pH 7.4)] に懸濁し、 2×10^4 cells /well となるように 96 well マイクロプレートに分注して、室温で 5 分間、緩衝液 (basal コントロール) または被験化合物と前培養した。その後、終濃度 10 nM で reference agonist として 5-HT を添加した。basal コントロールは 5-HT を非添加とした。37°C で 30 分間培養後、細胞を溶解し、蛍光 acceptor (D2 標識 IP₁) および donor (抗 IP₁ 抗体) を添加した。室温で 60 分間培養後、蛍光の転移を $\lambda_{ex} = 337$ nm ならびに $\lambda_{em} = 620$ および 665 nm にて測定した。IP₁ 濃度は 665 nm で測定したシグナルを 620 nm で測定したシグナルで除することによって算出した。結果は、10 nM 5-HT に対する control の反応の抑制率として表した。IC₅₀ 値は用量反応曲線から算出した¹⁰⁴。

第8項 *In situ* hybridization 法

Young マウスおよび aged マウスは自由摂餌下で isolation を行い、6 時間後に脳を Tissue Fixative (Cat. No. TSF-01; ジェノスタッフ株) を用いて固定し摘出した。摘出した脳組織をパラフィン包埋後、厚さ 6 μ m の組織切片を作製し、digoxigenin (Roche Molecular Biochemicals 社) 標識した cRNA プローブと 60°C で 16 時間ハイブリダイゼーションした。Nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP ; Sigma-Aldrich 社) を用いて標識を検出し、Kernechtrot 染色溶液 (武藤化学株) を用いて組織切片の染色を行った。なお、組織の固定や摘出、切片の作製、染色の工程は、ジェノスタッフ株に依頼した。cRNA プローブは、マウス 5-HT_{2C} 受容体 cDNA 配列 (GenBank accession number NM_008312.4) をもとに設計された。

第9項 統計解析

各群の数値は平均値 $\pm$ 標準誤差で表した。2 群間の比較は Student's *t*-test を実施し、多群間の比較は二元配置分散分析を実施後、Bonferroni post hoc test を実施した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

第3節 実験結果

第1項 ACTH および corticosterone 分泌に対する新奇環境暴露の影響

マウスを isolation して 24 時間後に血清 ACTH 値および corticosterone 値を測定した。

血清 ACTH 値は、aged control マウスでは young control マウスより高値であった。新奇環境に暴露することによって、young マウスおよび aged マウスともに ACTH 値が約 2 倍に増加した（表 2）。二元配置分散分析の結果、処置 [F(1, 16) = 40.02] および週齢 [F(1, 16) = 36.03] については有意な効果であったが、処置と週齢の交互作用による効果は認められなかった。非ストレス下では、aged control マウスの血清 corticosterone 値は young control マウスより高値の傾向であった。新奇環境への暴露後、aged マウスの血清 corticosterone 値は young マウスと比較して顕著に増加した（表 2）。二元配置分散分析の結果、処置 [F(1, 13) = 11.93]、週齢 [F(1, 13) = 15.31]、およびこれらの交互作用 [F(1, 13) = 11.15] は有意な効果であった。

表 2 血清 ACTH 値および corticosterone 値に対する新奇環境暴露の影響

	Young		Aged	
	Control	Isolation	Control	Isolation
ACTH (ng/mL)	0.42 ± 0.10	0.80 ± 0.04 #	0.83 ± 0.06 *	1.42 ± 0.11 ###
Corticosterone (ng/mL)	58.7 ± 12.7	97.6 ± 44.9	253.8 ± 87.8	2069.4 ± 743.4 ##

データは平均値 ± 標準誤差で表示 (n = 4-5)。

* $P < 0.05$ vs. young マウス。#, ##, ### $P < 0.05, 0.01, 0.001$ vs. control 群。

第2項 摂餌量に対する新奇環境暴露の影響

7 日間個別飼育した control マウス (young、 5.3 ± 0.1 g/24 h ; aged、 4.9 ± 0.3 g/24 h) と群飼育したマウス (young、 4.6 ± 0.2 g/24 h ; aged、 4.5 ± 0.4 g/24 h) との間に摂餌量における統計学的な差は認められなかった。新奇環境への暴露により、6 時間後および 24 時間後の摂餌量は young マウスではやや低下したのみであったが、aged マウスでは顕著な低下が

認められた(表 3)。二元配置分散分析の結果、6 時間後の摂餌量では、処置 [F(1, 33) = 90.58]、週齢 [F(1, 33) = 54.38]、およびこれらの交互作用 [F(1, 33) = 36.68] は有意な効果であった。24 時間後の摂餌量でも、処置 [F(1, 33) = 63.60]、週齢 [F(1, 33) = 45.20]、およびこれらの交互作用 [F(1, 33) = 25.34] は有意な効果であった。

表 3 摂餌量に対する新奇環境暴露の影響

Period	Cumulative food intake (g)			
	Young		Aged	
	Control	Isolation	Control	Isolation
6 h	1.60 ± 0.09	1.49 ± 0.09	1.31 ± 0.08	0.19 ± 0.07 ###
24 h	5.31 ± 0.10	4.50 ± 0.20 ##	4.88 ± 0.28	1.53 ± 0.34 ###

データは平均値±標準誤差で表示 (n = 8–10)。##, ### $P < 0.01, 0.001$ vs. control 群

第3項 ストレス関連および食欲関連因子の mRNA 発現に対する新奇環境暴露の影響

新奇環境暴露後の不安と摂食との関連性を明確にすることを目的として、ストレス関連および食欲関連因子の mRNA 発現解析を行った。まず、視床下部における CRF システムへの影響を検討したところ、young マウスでは視床下部 CRF mRNA および下垂体 POMC mRNA 発現には新奇環境への暴露による変化が認められなかった。一方、aged マウスでは視床下部 CRF mRNA および下垂体 CRF1 受容体 mRNA 発現が顕著に増加し、下垂体 POMC mRNA 発現は増加の傾向を示した(表 4)。

次に、摂食関連ペプチドの mRNA 発現に対する影響を検討した。control 群での比較では、aged マウスの視床下部 NPY mRNA および AgRP mRNA 発現が young マウスと比較して顕著に低下していたが、POMC mRNA 発現は同程度であった。新奇環境暴露によるこれら mRNA 発現への影響は見られなかった(表 4)。

表 4 下垂体および視床下部 mRNA 発現に対する新奇環境暴露の影響

	Young		Aged	
	Control	Isolation	Control	Isolation
Pituitary mRNA relative expression				
CRF1R	1.00 ± 0.05	0.97 ± 0.12	0.88 ± 0.01	1.18 ± 0.08 #
POMC	1.00 ± 0.24	1.29 ± 0.11	1.05 ± 0.06	1.84 ± 0.29
Hypothalamic mRNA relative expression				
CRF	1.00 ± 0.13	1.12 ± 0.08	0.63 ± 0.05	0.83 ± 0.04 ##
POMC	1.00 ± 0.09	1.25 ± 0.20	0.98 ± 0.10	1.27 ± 0.11
NPY	1.00 ± 0.09	0.85 ± 0.05	0.64 ± 0.05 **	0.61 ± 0.01
AgRP	1.00 ± 0.10	0.90 ± 0.11	0.54 ± 0.02 **	0.53 ± 0.07

データは平均値±標準誤差で表示 (n = 5-13)。
 ** $P < 0.01$ vs. young マウス。#, ## $P < 0.05, 0.01$ vs. control 群。

第4項 新奇環境暴露後の aged マウスにおける SB242084 投与の効果

新奇環境暴露後の摂食低下に対する 5-HT_{2c} 受容体の役割を明確にするため、5-HT_{2c} 受容体拮抗薬の SB242084 を投与し摂食量に対する効果を検討した。図 21A に示すように、young マウスにおいて SB242084 (6 mg/kg) の投与は 24 時間後までの摂餌量に影響を与えなかった。Aged マウスにおける摂餌量は、SB242084 投与 24 時間後にやや増加が認められたものの、投与 6 時間後までは young マウスと同様に摂餌量に影響は認められなかった (図 21B)。一方、新奇環境への暴露によって低下した aged マウスの摂餌量は、全時点において SB242084 の投与によって有意に改善した。(図 21B)。

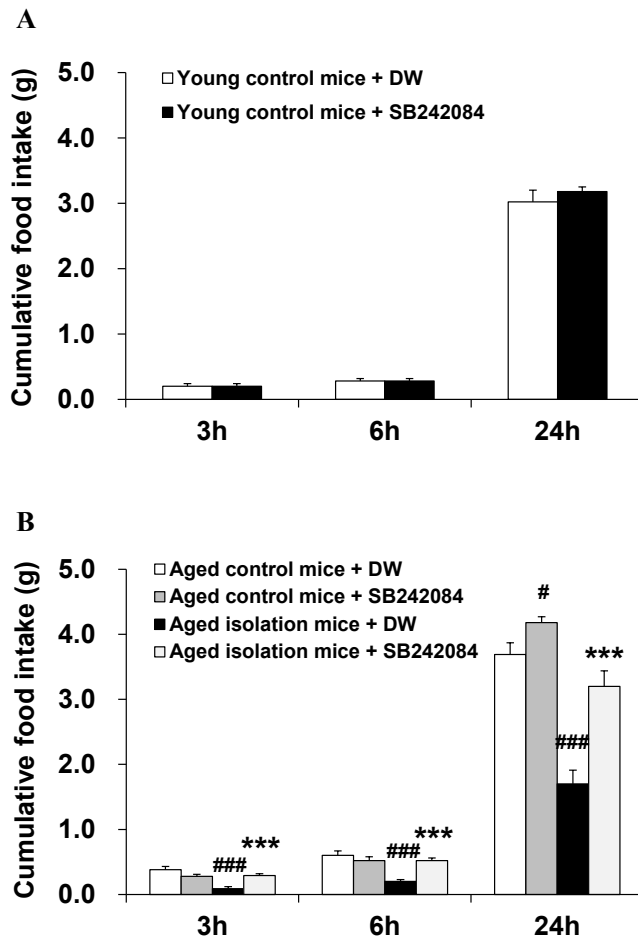


図 21 Young マウスおよび aged マウスの摂餌量に対する 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬 (SB242084) 投与の効果

A) young マウス、B) aged マウス。データは平均値±標準誤差で表示 (n = 5–8)。DW : 蒸留水。#, ### $P < 0.05, 0.001$ vs. aged control マウス DW 投与群。*** $P < 0.001$ vs. aged isolation マウス DW 投与群。

5-HT_{2C} 受容体は視床下部室傍核の CRF ニューロン上⁹¹ および視床下部弓状核の POMC ニューロン上¹⁰⁵ に発現することが報告されている。Aged マウスの視床下部における 5-HT_{2C} 受容体の役割を明確にするため、SB242084 を投与し HPA axis および視床下部の食欲関連ペプチドの発現について検討した。新奇環境への暴露後、血清 ACTH 値および corticosterone 値は顕著に増加したが、SB242084 の投与によってこの反応は抑制された (図 22A, B)。新奇環境暴露後の視床下部 CRF mRNA 発現は、SB242084 の投与によって DW 投与群と比較

して有意に増加した (DW 投与群 1.00 ± 0.06 ; SB242084 投与群 1.41 ± 0.09 ; $P < 0.01$)。視床下部 CRF hnRNA 発現も同様の結果を示した (DW 投与群 1.00 ± 0.07 ; SB242084 投与群 1.42 ± 0.10 ; $P < 0.01$)。下垂体 CRF1 受容体および POMC mRNA 発現については、SB242084 の投与による変化は認められなかった (CRF1 受容体 : DW 投与群 1.00 ± 0.06 ; SB242084 投与群 1.00 ± 0.12 ; $P = 0.98$ 。POMC : DW 投与群 1.00 ± 0.12 ; SB242084 投与群 1.10 ± 0.11 ; $P = 0.55$)。

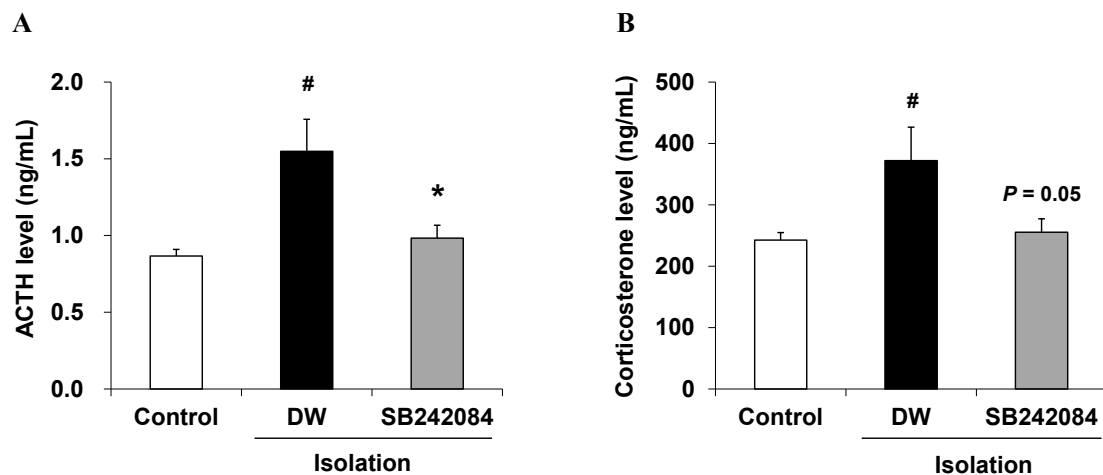


図 22 新奇環境暴露後の aged マウスのストレスホルモン分泌に対する 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬 (SB242084) 投与の効果

A) 血清 ACTH 値、B) 血清 corticosterone 値。データは平均値±標準誤差で表示 (n=5-8)。DW : 蒸留水。# $P < 0.05$ vs. control 群。* $P < 0.05$ vs. isolation マウス DW 投与群。

視床下部の NPY mRNA および AgRP mRNA 発現は、SB242084 の投与によって有意な増加が認められた。一方、POMC mRNA 発現は SB242084 の投与による影響が認められなかった (図 23A-C)。

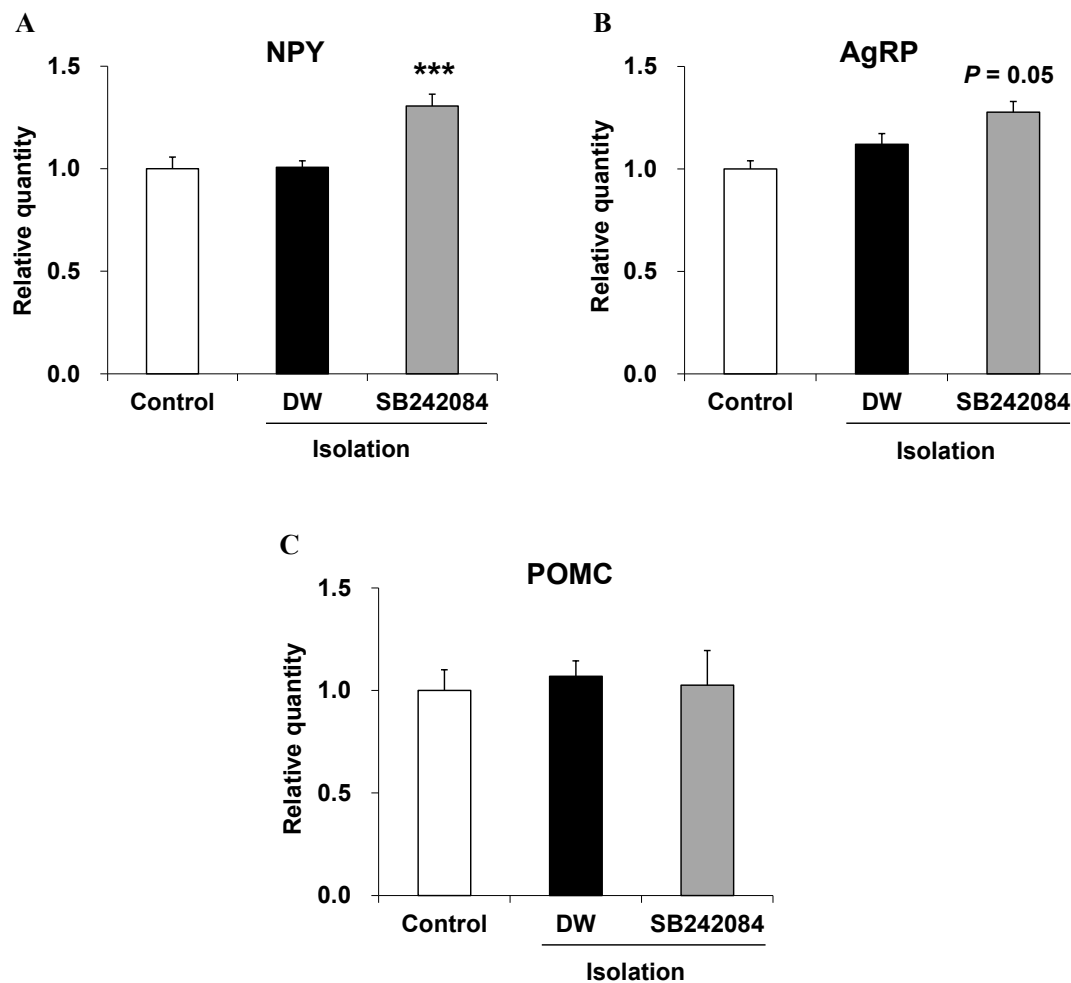


図 23 新奇環境暴露後の aged マウスの視床下部 mRNA 発現に対する 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬 (SB242084) 投与の効果

A) NPY mRNA、B) AgRP mRNA、C) POMC mRNA。データは平均値±標準誤差で表示 (n=5-8)。DW：蒸留水。*** $P < 0.001$ vs. isolation マウス DW 投与群。

第5項 新奇環境暴露後の aged マウスにおける六君子湯投与の効果

六君子湯は *in vivo* および *in vitro* において 5-HT_{2C} 受容体拮抗作用を示すことが報告されている^{40, 41, 106, 107}。まず、六君子湯が aged マウスの新奇環境暴露後の摂食低下に対し、SB242084 と同様の効果を示すか検証を行った。結果は図 24 の通り、六君子湯は新奇環境への暴露による摂食低下を有意に抑制した。

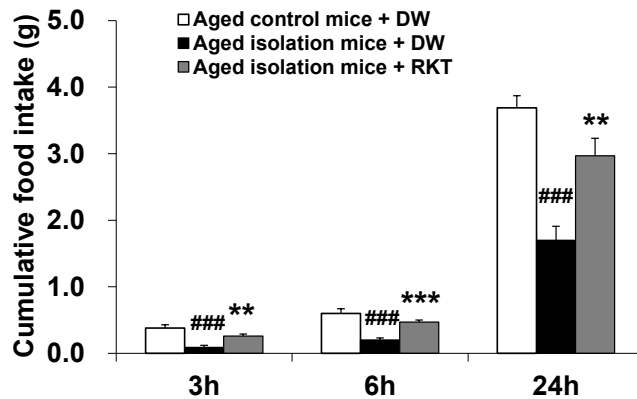


図 24 新奇環境暴露後の aged マウスの摂食量に対する六君子湯投与の効果

データは平均値±標準誤差で表示 (n=5-8)。DW : 蒸留水、RKT : 六君子湯。### $P < 0.001$ vs. aged control 群。**, *** $P < 0.01, 0.001$ vs. aged isolation マウス DW 投与群。

次に、六君子湯が *in vivo* で 5-HT_{2C} 受容体拮抗作用を示すかを検証するため、5-HT_{2C} 受容体作動薬である mCPP 処置した young マウスおよび aged マウスに六君子湯を投与して摂食量を測定した。結果を図 25A, B に示す。Young マウスおよび aged マウスへの mCPP 処置によって 3 および 6 時間後に摂食量が有意に低下したが、六君子湯は摂食低下を顕著に抑制した。

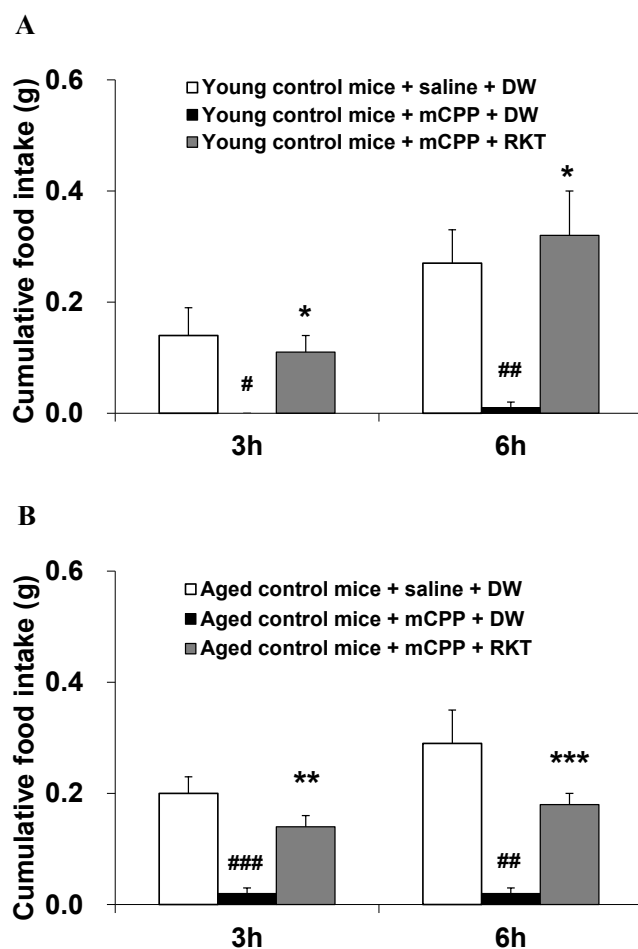


図 25 mCPP 処置したマウスの摂食量に対する六君子湯投与の効果

A) young マウス、B) aged マウス。データは平均値±標準誤差で表示 (n=5-8)。DW : 蒸留水、RKT : 六君子湯。#, ##, ### $P < 0.05, 0.01, 0.001$ vs. saline + DW 投与群。*, **, *** $P < 0.05, 0.01, 0.001$ vs. mCPP + DW 投与群。

次に、六君子湯に含まれる成分について、*in vitro* で 5-HT_{2c} 受容体への結合活性および細胞内シグナル伝達に対する作用を検証した。表 5 に六君子湯成分の 5-HT_{2c} 受容体 binding assay および cell functional assay の結果を示す。六君子湯成分のうち 36 種類について assay を行い、そのうち glycycomarin, isoliquiritigenin, 8-shogaol の 3 成分は 5-HT_{2c} 受容体結合阻害活性の IC₅₀ 値がそれぞれ 17.1, 7.5, 16.5 $\mu\text{mol/L}$ であり、IP₁ 産生抑制試験の IC₅₀ 値がそれぞれ 7.7, 5.5, 36.9 $\mu\text{mol/L}$ であった。ポジティブ control の SB242084 は、5-HT_{2c} 受容体結合阻害活性および IP₁ 産生抑制試験の IC₅₀ 値がそれぞれ 0.8, 3.9 nmol/L であった。

表 5 六君子湯成分の 5-HT_{2C} 受容体活性に対する抑制効果

	IC ₅₀ (μmol/L)	
	Binding assay	Cell functional assay
Glycycomarin	17.1	7.7
Isoliquiritigenin	7.5	5.5
8-Shogaol	16.5	36.9
Hesperetin	36.8	48.2

新奇環境に暴露することにより、aged マウスの血清 ACTH 値、corticosterone 値が上昇するが、六君子湯の投与によりこれらの上昇が抑制された (図 26A, B)。

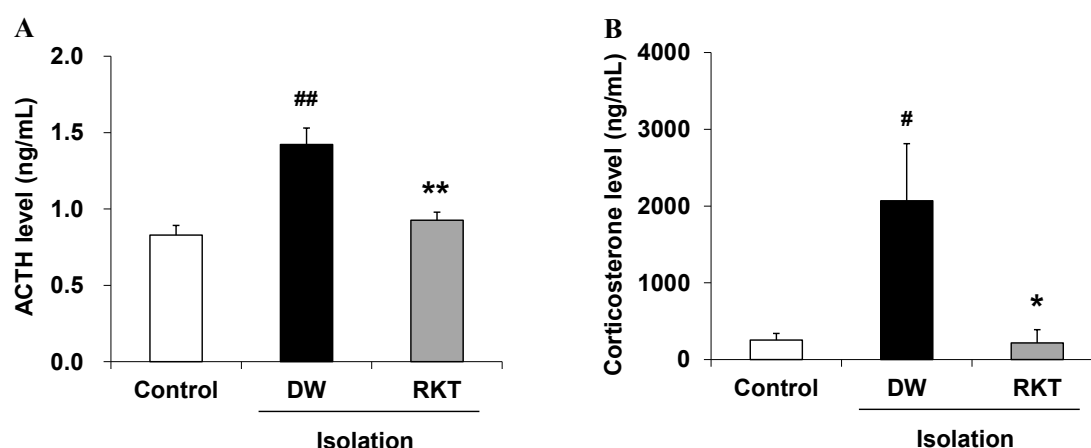


図 26 新奇環境暴露後の aged マウスのストレスホルモン分泌に対する六君子湯投与の効果

A) 血清 ACTH 値、B) 血清 corticosterone 値。データは平均値±標準誤差で表示 (n=5-8)。DW: 蒸留水、RKT: 六君子湯。#, ## $P < 0.05, 0.01$ vs. control 群。*, ** $P < 0.05, 0.01$ vs. isolation マウス DW 投与群。

新奇環境暴露後の視床下部 CRF mRNA 発現は、六君子湯の投与によって増加の傾向を示した (DW 投与群 1.00 ± 0.06 ; 六君子湯投与群 1.24 ± 0.16 ; $P = 0.19$)。下垂体 CRF1 受容体および POMC mRNA 発現については、六君子湯の投与による変化は認められなかった (CRF1 受容体: DW 投与群 1.00 ± 0.06 ; 六君子湯投与群 0.89 ± 0.11 ; $P = 0.38$ 。POMC :

DW 投与群 1.00 ± 0.12 ; 六君子湯投与群 0.96 ± 0.13 ; $P = 0.80$)。視床下部 NPY mRNA および AgRP mRNA 発現は、六君子湯の投与によって増加した (図 27A, B)。POMC mRNA 発現は六君子湯の投与による変化は認められなかった (図 27C)。

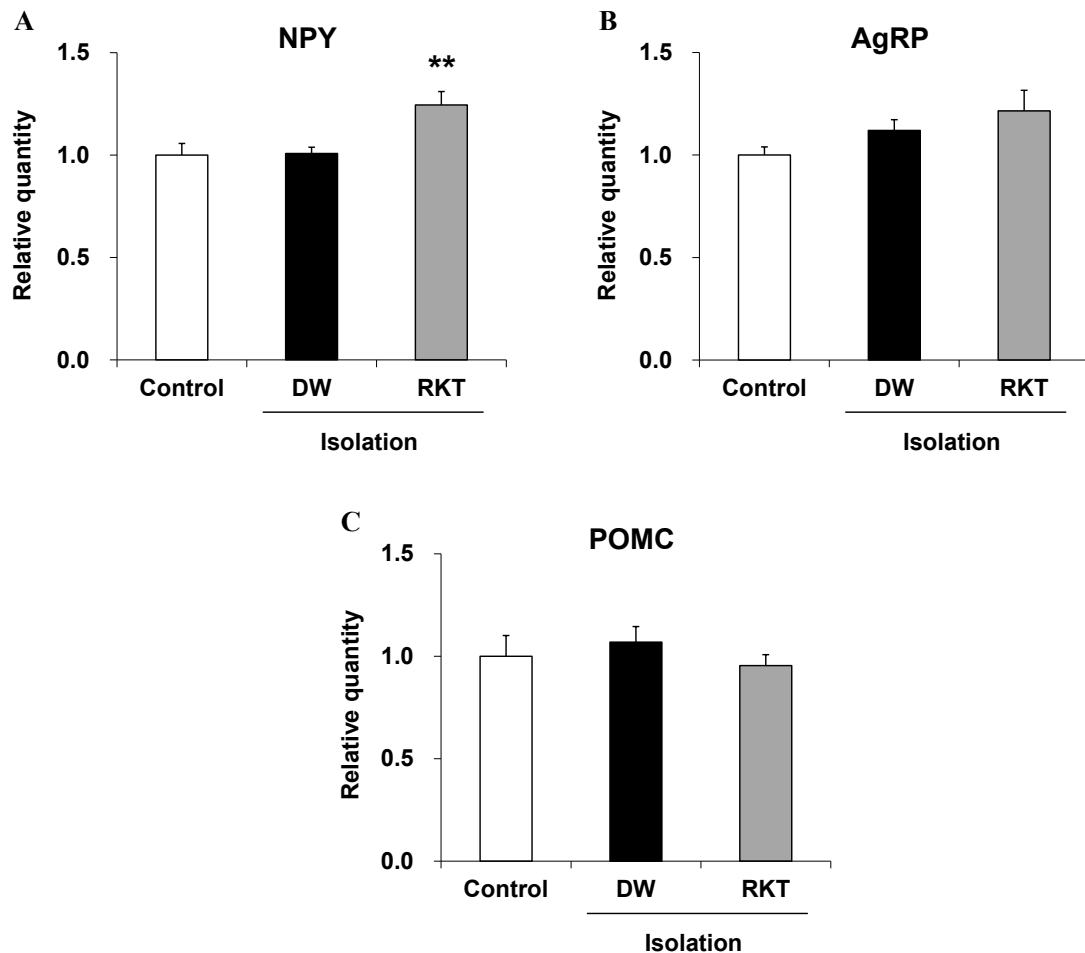


図 27 新奇環境暴露後の aged マウスの視床下部 mRNA 発現に対する六君子湯投与の効果
A) NPY mRNA、B) AgRP mRNA、C) POMC mRNA。データは平均値±標準誤差で表示 (n=5-8)。
DW : 蒸留水、RKT : 六君子湯。 ** $P < 0.01$ vs. isolation マウス DW 投与群。

第6項 Control マウスにおける SB242084 および六君子湯投与の効果

SB242084 および六君子湯が非ストレス下のマウスに対して影響を与えるかどうか確認を行った。Young または aged の control マウスに SB242084 を投与したところ、血清 corticosterone 値に影響は認められず (図 28)、下垂体における POMC および CRF1 受容体

の mRNA 発現にも変化は認められなかったが (図 29)、視床下部 CRF の mRNA 発現が抑制された (図 29)。一方、六君子湯の投与では、血清 corticosterone 値にもストレス関連ペプチドの mRNA 発現にも変化は認められなかった (図 28、図 29)。

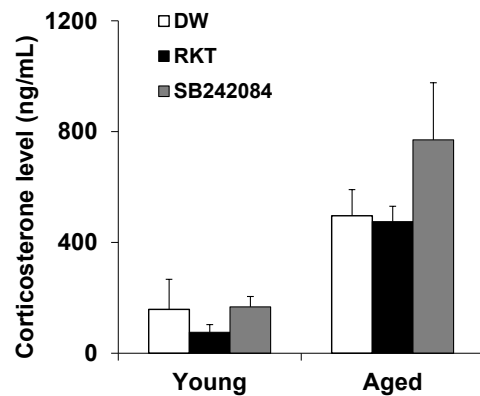


図 28 Control マウスの血清 corticosterone 値に対する 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬投与の効果
データは平均値±標準誤差で表示 (n=5-8)。DW：蒸留水、RKT：六君子湯。

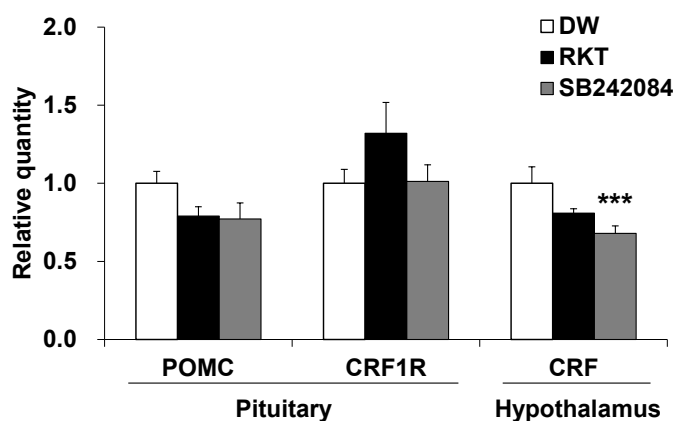


図 29 Aged control マウスの視床下部および下垂体 mRNA 発現に対する 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬投与の効果
データは平均値±標準誤差で表示 (n=5)。DW：蒸留水、RKT：六君子湯。*** $P < 0.001$ vs. DW 投与群。

第7項 Corticosterone 分泌に対する mCPP 投与の影響

5-HT_{2C} 受容体の刺激が corticosterone 分泌に及ぼす影響を検討するため、young マウスに mCPP (50µg/mouse) を脳室内投与し、1 時間後の血清 corticosterone 値を測定したところ、

mCPP 投与により血清 corticosterone 値の顕著な増加が認められた (図 30)。

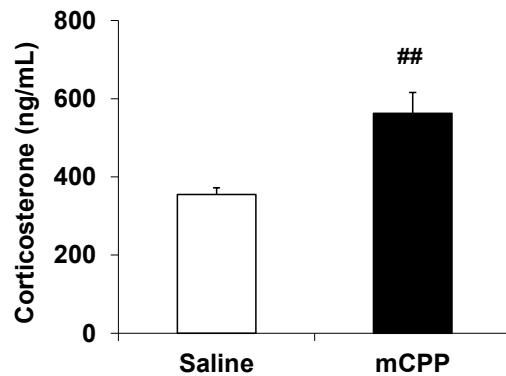


図 30 Young マウスにおける血清 corticosterone 値に及ぼす mCPP 投与の影響

データは平均値±標準誤差で表示 (n=8)。## $P < 0.01$ vs. saline 投与群

第8項 摂食量に対する mCPP 投与の影響

ここまでの検討で、新奇環境に暴露された aged マウスのストレスホルモン分泌や摂餌量に対し、5-HT_{2c} 受容体拮抗薬は有用な作用を示した。この結果は 5-HT_{2c} 受容体機能が亢進している可能性を示していると考え、次に 5-HT_{2c} 受容体作動薬として mCPP を用い、young マウスおよび aged マウスにおける摂餌量に対する 5-HT_{2c} 受容体活性化の影響について検討した。mCPP 5 mg/kg の腹腔内投与は、young マウスおよび aged マウスの摂餌量を有意に低下させた (図 31A, B)。しかしながら、低用量の mCPP (1, 3 mg/kg) 投与は aged マウスの摂餌量を有意に低下させたが、young マウスの摂餌量には影響を与えなかった。

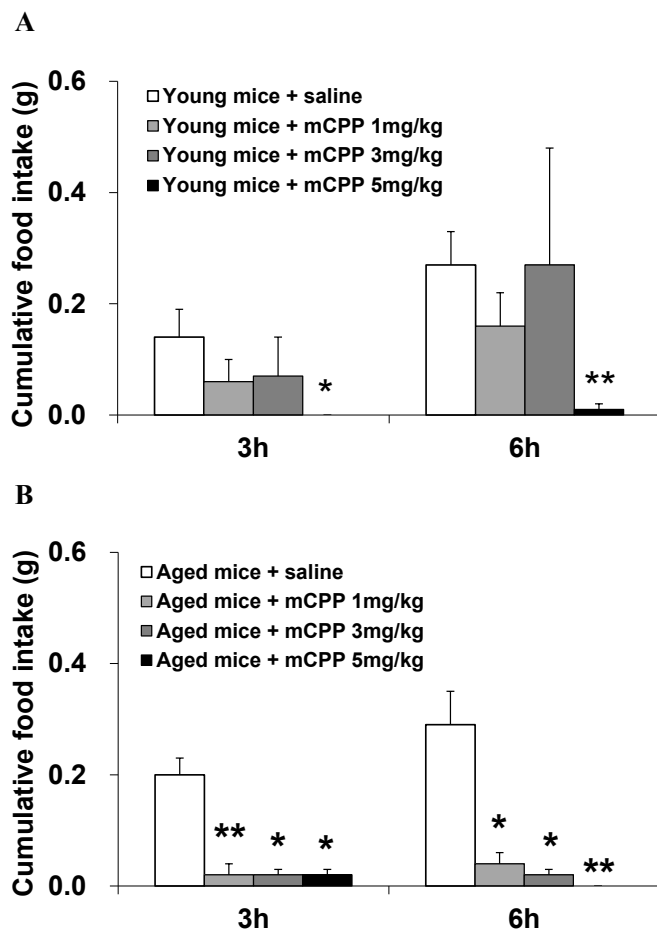


図 31 摂餌量に対する 5-HT_{2C} 受容体作動薬の影響

A) young マウス、B) aged マウス。データは平均値±標準誤差で表示 (n=5)。*, ** $P < 0.05$, 0.01 vs. saline 投与群。

第9項 新奇環境暴露後の 5-HT_{2C} 受容体 mRNA 発現

ここまでの検討で、aged マウスでは young マウスと比較して 5-HT_{2C} 受容体の拮抗薬および作動薬に対し高い反応性を示したことから (図 21 および図 31)、新奇環境に暴露後の aged マウスでは、視床下部室傍核の 5-HT_{2C} 受容体が活性化し mRNA 発現が亢進している可能性があるかと推測された。RT-PCR 法で確認したところ、young マウスでは新奇環境に暴露後も視床下部の 5-HT_{2C} 受容体 mRNA 発現には変化が認められなかったが、aged マウスでは新奇環境に暴露後、5-HT_{2C} 受容体 mRNA 発現の有意な増加が認められた (図 32)。

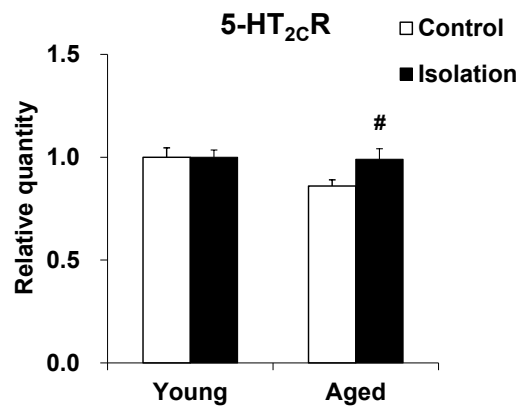
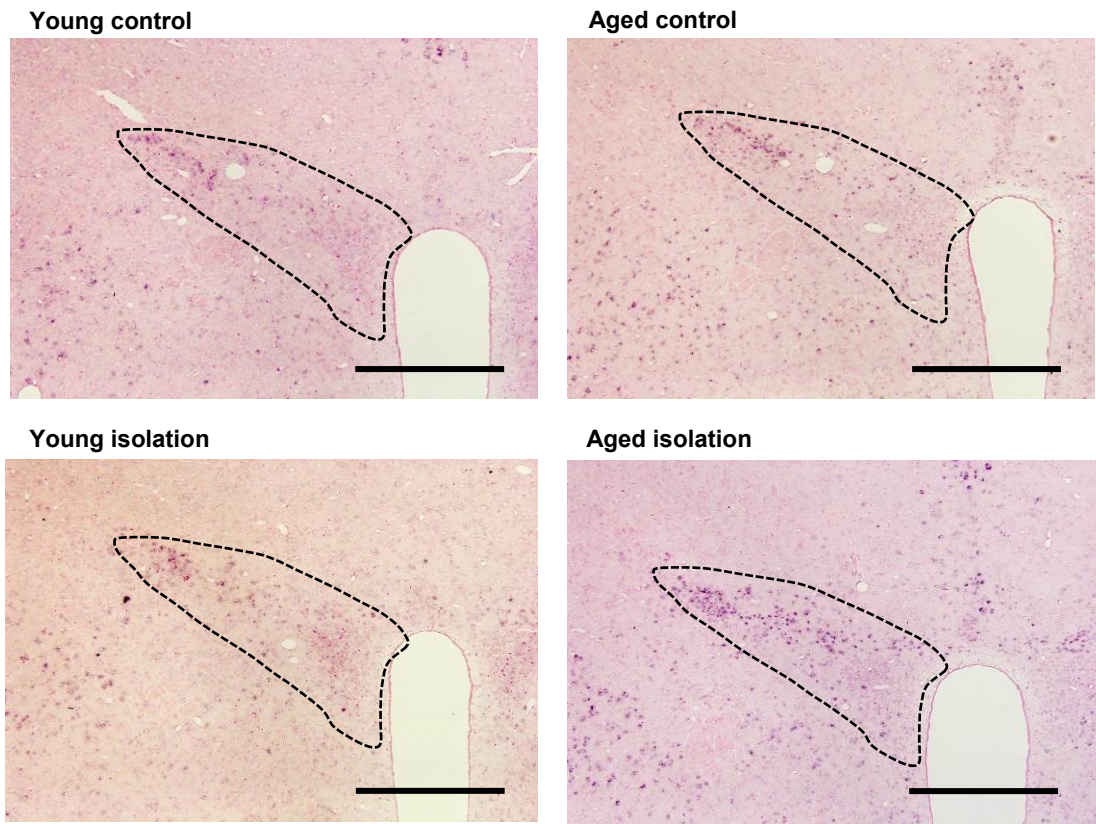


図 32 視床下部 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現に対する新奇環境暴露の影響

データは平均値±標準誤差で表示 (n=5)。# $P < 0.05$ vs. aged マウス control 群。

そこで、*in situ* hybridization を行い、視床下部室傍核における 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現を young マウスと aged マウスとで比較した。非ストレス下では、aged マウスの視床下部室傍核における 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現は young マウスのものと差は見られなかった (図 33A)。新奇環境への暴露後は、young マウスでは 5-HT_{2c} 受容体陽性細胞数に変化はなかったが、aged マウスでは有意な増加が認められた (図 33B)。

A



B

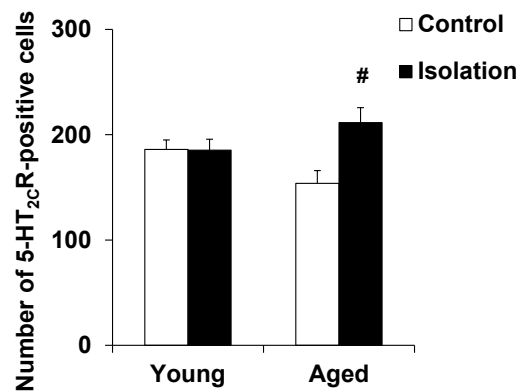


図 33 視床下部室傍核における 5-HT_{2C} 受容体 mRNA 発現に対する新奇環境暴露の影響
 A) 室傍核における 5-HT_{2C} 受容体 mRNA 発現、B) 室傍核における 5-HT_{2C} 受容体陽性細胞数。データは平均値±標準誤差で表示 (n=3-5)。Bar : 500μm。# $P < 0.05$ vs. aged マウス control 群。

第4節 考察

本研究で、aged マウスにおける新奇環境への暴露は、持続的なストレスホルモンの分泌および顕著な摂食低下を来することが明らかとなった。この現象は、視床下部、特に室傍核に存在する CRF ニューロン上の 5-HT_{2c} 受容体の機能亢進によって説明される。第一に、選択的 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬の投与によって aged マウスにおける新奇環境暴露後の摂食低下および HPA axis の過剰な活性化を抑制した。第二に、低用量の 5-HT_{2c} 受容体作動薬は aged マウスでは摂食を顕著に低下させたのに対し、young マウスでは影響を与えなかった。第三に、aged マウスでは新奇環境への暴露によって視床下部 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現が増加したが、young マウスでは変化がなかった。これらの結果から、aged マウスのストレス下における摂食調節には、視床下部 5-HT_{2c} 受容体が重要な役割を果たしていると結論付けた。

5-HT_{2c} 受容体の活性化は、young マウスにおいて不安様行動や食欲抑制を引き起こすことが知られている^{93,95-97,108}。しかしながら、aged マウスにおいて不安を惹起させるような条件下での 5-HT_{2c} 受容体の役割についてはまだ明確になっていない。本研究において、選択的 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬 (SB242084) の投与は、young マウスの摂餌量に影響を与えない 6 mg/kg という用量で、新奇環境暴露後の aged マウスにおける持続的な摂食低下およびストレスホルモンレベルの増加を顕著に抑制した。本研究で用いた SB242084 の 6 mg/kg という用量は、既報において mCPP による摂食低下に対して拮抗作用を示すのに必要な投与量と同程度である¹⁰⁹。また、不安を評価するために用いられた投与量 (0.1–3.0 mg/kg, i.p.) とも大きく変わらない¹¹⁰。今回用いた SB242084 の 6 mg/kg という用量は、young control マウスの摂餌量およびストレスホルモンレベルに影響を与えなかったことから、SB242084 の投与によって直接的に摂食を亢進させたのではなく、新奇環境変化に伴う不安やストレス反応を低下させたことにより摂食低下を抑制したものと考えられる。

六君子湯は *in vivo* において 5-HT_{2c} 受容体に拮抗作用を示すことが報告されている^{40,41,106,107}。 *In vitro* においても、六君子湯が 5-HT_{2c} 受容体の阻害効果を発揮することが示されて

おり、これは六君子湯に含まれる成分である glycycomarin, isoliquiritigenin, 8-shogaol によるものと考えられる⁴¹。本研究においても、aged マウスにおける新奇環境変化による摂食低下に対し、六君子湯が SB242084 と同様に HPA axis の活性化および持続的な摂食低下を抑制することが観察された。また、young マウスおよび aged マウスにおいて mCPP による摂食低下を六君子湯が抑制し、この結果は既報の知見に一致した¹⁰⁶。Cell functional assay では、glycycomarin, isoliquiritigenin, 8-shogaol を含む 六君子湯の成分が 5-HT_{2c} 受容体の細胞内シグナル伝達に対し阻害作用を示した。これら成分の IC₅₀ 値はそれぞれ 7.7, 5.5, 36.9 $\mu\text{mol/L}$ であり、この結果は受容体の binding assay にて得られた K_i 値と近いものであった⁴¹。これらの知見から、ストレスを負荷した aged マウスにおいて六君子湯が 5-HT_{2c} 受容体拮抗作用を示したと考えられた。

次に、young マウスと aged マウスにおいて 5-HT_{2c} 受容体活性化が摂餌量に与える影響について検討した。5-HT_{2c} 受容体作動薬として mCPP を投与したところ、5 mg/kg の用量では young マウス、aged マウスとも摂餌量を顕著に抑制したが、低用量 (1, 3mg/kg) の投与では young マウスの摂餌量に影響を与えなかった。このことから、aged マウスの脳内において、5-HT_{2c} 受容体のシグナル伝達が亢進している可能性が示唆された。ストレスを負荷したマウスでは非ストレスマウスと比較して低用量の mCPP 投与によって摂食が低下することが報告⁸⁸されており、本研究の結果はこれと類似した。

SB242084 および六君子湯は、新奇環境暴露後の摂食低下に加え、ストレスホルモンの分泌を顕著に抑制したことから、その作用部位は CRF ニューロンリッチな室傍核である可能性が考えられる。本研究において young マウスに mCPP (50 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) を脳室内投与したところ、血清 corticosterone 値が上昇した。mCPP 投与による血清 corticosterone 値の上昇は過去の報告⁹⁸でも示されており、この corticosterone 値の上昇は SB242084 によって顕著に抑制されている。さらに、近年の研究によって、5-HT_{2c} 受容体は室傍核の CRF ニューロン上に発現し、5-HT_{2c} 受容体作動薬が CRF ニューロンを活性化すると ACTH が分泌されることが明らかにされた⁹¹。これらの知見は、aged マウスにおいて新奇環境暴露後、室傍核の CRF

ニューロン上の 5-HT_{2c} 受容体の興奮によって HPA axis が活性化する、という仮説を裏付ける。

定量的 RT-PCR 解析により、aged マウスにおいては、新奇環境への暴露によって視床下部における 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現の有意な増加が観察された。*In situ* hybridization 法を用いてこの結果の検証を行ったところ、新奇環境への暴露は、aged マウスにおける室傍核の 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現を有意に増加させたことが明らかとなった。このことから、新奇環境への暴露によって aged マウスの室傍核における 5-HT_{2c} 受容体シグナルが亢進した可能性が示唆された。この結果は、薬理学的アプローチの結果に基づいた仮説に一致した。

一方、視床下部の他の部位では、たとえば、食欲調節に働く NPY/AgRP ニューロンや POMC ニューロンが存在する弓状核において新奇環境への暴露による 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現に有意な変化は見られなかった（データ未掲載）。

本研究の結果から、aged マウスにおける 5-HT_{2c} 受容体の機能亢進は、室傍核の 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現の増加が主要なメカニズムであると推測される。しかしながら、シナプス間の 5-HT や受容体数の増加、受容体と 5-HT の親和性の増加、受容体の脱感作やダウンレギュレーションの減少、細胞内シグナル伝達系の亢進など、他の可能性も否定できない。さらに、げっ歯類において、老齢では環境変化によって脳内 5-HT ターンオーバーが抑制され、5-HT 濃度が増加することが報告されている¹¹¹。本研究では 5-HT 濃度を測定していないが、aged マウスにおいて新奇環境への暴露後に 5-HT_{2c} 受容体シナプス間隙で 5-HT 濃度が増加することが 5-HT_{2c} 受容体活性化の一因である可能性も考えられる。また、5-HT_{2c} 受容体は GPCR の一つであるが、他の GPCR と同様に、GPCR キナーゼやアレチンによって脱感作やインターナリゼーションが起き、それによって 5-HT_{2c} 受容体の機能が微調整されている¹¹²。そのため、ストレス下の aged マウスでは、受容体の脱感作やインターナリゼーションの低下によって 5-HT_{2c} 受容体のシグナル伝達が亢進している可能性が考えられる。さらに、5-HT_{2c} 受容体は GPCR の中では唯一 pre-mRNA が RNA editing を受けることが知られており¹¹³、それによって受容体の機能が変化した可能性も考慮しなければならない。こ

のようなメカニズムがストレス負荷した aged マウスの 5-HT_{2c} 受容体機能亢進に関与しているかは未だ不明である。

本研究では、5-HT_{2c} 受容体拮抗薬の投与によってストレス負荷した aged マウスのストレスホルモン分泌を有意に抑制した。このことから、5-HT_{2c} 受容体の阻害は視床下部 CRF や下垂体 POMC、CRF1R の mRNA 発現を抑制すると考えた。これらは、新奇環境へ暴露してから 24 時間後において、aged マウスで持続的に増加が認められたものである。しかしながら、SB242084 や六君子湯の投与によって血中 ACTH 値や corticosterone 値を大きく抑制したにも関わらず、予想に反して CRF mRNA 発現を増加させた。この CRF mRNA 発現が増加した原因は明らかではないが、5-HT_{2c} 受容体拮抗作用によるストレスホルモン分泌の抑制や摂食低下の改善が、単に視床下部の CRF や下垂体の POMC 合成の抑制によって説明できるものではないことを示唆している。ストレスホルモン分泌と視床下部 CRF や下垂体 POMC の mRNA 発現との間にタイムラグがあるだろうことを考慮すると、サンプル回収のタイミングをより詳細に検証する必要がある。

5-HT_{2c} 受容体は、室傍核の CRF ニューロン上だけでなく、弓状核の POMC ニューロン上にも発現しており、脱感作や POMC 遺伝子発現を増加させ⁹⁰、 α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) を分泌させる。 α -MSH は室傍核の CRF ニューロン上および外側野の orexin ニューロン上の melanocortin 4 受容体に結合し、食欲を強力に抑制する¹¹⁴。一方、NPY/AgRP は精力的に研究が進んでおり、NPY Y1 受容体の活性化または α -MSH の melanocortin 4 受容体への結合阻害を介して食欲促進に働く最も重要なペプチドとして知られている^{97, 108}。摂食行動はこのように促進性と抑制性の食欲調節経路のバランスによって調節されている¹¹⁵。本研究では、新奇環境ストレスも、SB242084 や六君子湯による 5-HT_{2c} 受容体拮抗作用も、視床下部 POMC mRNA 発現に変化をもたらさなかった。しかしながら、一方で SB242084 や六君子湯の投与によって、aged マウスにおいて新奇環境ストレス負荷後の NPY/AgRP mRNA 発現を増加させた。これらの結果や知見から、弓状核における POMC ニューロン上の 5-HT_{2c} 受容体の関与は、young マウスおよび aged マウスとも、ストレス惹起後の急性期

(たとえば3時間程度⁸⁸)にその役割のピークを迎え、aged マウスにおける持続的な摂食低下における役割が小さい可能性が考えられる。あるいは、aged マウスでの弓状核における POMC ニューロンの優位性が、 α -MSH 分泌の高まりを介して室傍核における CRF ニューロンを刺激するという一つの役割を持ち¹¹⁶、薬理的な 5-HT_{2c} 受容体拮抗作用が AgRP と POMC のバランスを正常化することで、過剰なストレスホルモン分泌や摂食低下を軽減したという可能性も考えられうる。

ストレスや摂食に関連する代表的な中枢領域は、室傍核、弓状核のほか、辺縁系（扁桃体を含む）が知られている。辺縁系の中でも扁桃体は不安や恐怖を認識する重要な部位であり、5-HT_{2c} 受容体や CRF 受容体が豊富に存在する^{117, 118}。予備的な検討では、aged マウスへのストレス負荷によって、扁桃体の 5-HT_{2c} 受容体 mRNA 発現は統計学的に有意ではなかったものの増加傾向を示した（扁桃体における 5-HT_{2c} 受容体陽性細胞数：aged control, 85 ± 16.1 ; aged stressed, 135 ± 18.4 ; $P = 0.087$, データ未掲載）。このことから、新奇環境ストレスによる摂食低下には扁桃体の関与が示唆される。辺縁系の関与については、さらなる検討が必要である。

本章の結論として、aged マウスを新奇環境に暴露すると、5-HT_{2c} 受容体の活性化を介して持続的に摂食が低下し、ストレスホルモンレベルが上昇する。SB242084 や六君子湯など 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬は、摂食低下およびストレスホルモン分泌に対し改善効果を示す。これらのことから、aged マウスにおける新奇環境下の摂食低下には、5-HT_{2c} 受容体の過剰刺激が関与していることが示唆された。

総括

わが国においてストレスに関連する疾患は増加の一途をたどっている。しかしながら、これらの疾患には様々な因子が複雑に関与しており、発症原因が未だ明らかになっていないため、病態のメカニズムを解明することは疾患の理解や治療法の確立に繋がる重要な意味を持つ。そこで本研究はストレスに関連する疾患として 1) GERD の消化管機能障害、ならびに 2) ストレスによる高齢者の摂食障害の二つを取り上げ、これらのメカニズム解明を目的として動物モデルを用いた検討を行った。

1) 胃食道逆流症モデルにおける基礎的研究

第 1 章では、GERD ラットにおける胃排出能、摂餌量および胃前庭部運動の低下には、血漿におけるグレリン濃度の上昇およびグレリンに対する反応性低下が関与していることを見出した。また、六君子湯を摂取させることによって、胃前庭部運動および胃排出能においてグレリン反応性低下が改善することを明らかにした。六君子湯は、グレリン感受性を上昇させることによって GERD ラットの消化管運動低下を改善したものと推察される。本研究で GERD モデル動物におけるグレリンシグナル伝達障害を示したことは、GERD の病態の理解に加え、新たな GERD の治療確立に有用な結果であると考えられる。

第 2 章では、GERD ラットにおける摂餌量低下のメカニズムとして、視床下部における MCH ニューロンおよび orexin ニューロンの非活性化が関与していることを明らかにした。GERD ラットは高グレリン血漿であり、末梢グレリンによる摂食亢進シグナルは視床下部まで伝達されているが、その下流にある MCH ニューロンおよび orexin ニューロンの活性化が抑制されているために摂食低下に繋がったことを示した。今後の研究として、酸分泌抑制剤による検討を加え、よりヒトの GERD や FD 病態に近い動物モデルとして発展させていくことが検討課題である。

2) 加齢マウスにおける基礎的研究

第3章では、aged マウスにおける新奇環境下の摂食低下やストレスホルモン分泌増加には、5-HT_{2c}受容体を介したシグナルの過剰な活性化が関与していることを明らかにした。そのメカニズムとして、視床下部室傍核に存在する CRF ニューロン上の 5-HT_{2c} 受容体の機能亢進が関与していることを見出した。さらに、aged マウスにおける新奇環境下の摂食低下やストレスホルモン分泌増加は 5-HT_{2c} 受容体拮抗薬によって抑制されることを見出した。本研究で明らかにしたことは、高齢者のストレス下における摂食調節機構の解明に役立つ重要な結果であると考えられる。

以上、本研究では、ストレスに関連する疾患として GERD の消化管機能障害、ならびにストレスによる高齢者の摂食障害について、その病態と発生機構の一端を明らかにした。今回得られた知見は、これらの疾患の新たな治療アプローチとして有用な情報を提供するものとする。

本論文の内容は、学術雑誌に掲載された下記の原著論文を基礎とするものである。

- 1 . Nahata M, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M, Takeda H.

Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012 Jul;303(1):G42-53.

- 2 . Nahata M, Saegusa Y, Harada Y, Tsuchiya N, Hattori T, Takeda H.

Changes in ghrelin-related factors in gastroesophageal reflux disease in rats.

Gastroenterology Research and Practice. 2013;2013:504816

- 3 . Nahata M, Saegusa Y, Harada Y, Tsuchiya N, Hattori T, Takeda H.

Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-induced hypophagia in aged mice.

Psychoneuroendocrinology. 2013 (in press)

参考文献

1. 内閣府国民生活局総務課調査室. 平成 20 年度国民生活選好度調査結果の概要. 2009.
2. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1900-20; quiz 1943.
3. Boeckxstaens GE. Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:149-60.
4. Fass R, Shapiro M, Dekel R, Sewell J. Systematic review: proton-pump inhibitor failure in gastro-oesophageal reflux disease--where next? *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:79-94.
5. Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, Stanghellini V. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1466-79.
6. Choung RS, Locke GR, 3rd, Schleck CD, Zinsmeister AR, Talley NJ. Overlap of dyspepsia and gastroesophageal reflux in the general population: one disease or distinct entities? *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:229-34, e106.
7. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936;138:32.
8. Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 2004;16:348-355.
9. Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? *J Neuroendocrinol* 2001;13:1009-23.
10. Ferrari E, Cravello L, Muzzoni B, Casarotti D, Paltro M, Solerte SB, Fioravanti M, Cuzzoni G, Pontiggia B, Magri F. Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *Eur J Endocrinol* 2001;144:319-29.
11. McCallum RW, Berkowitz DM, Lerner E. Gastric emptying in patients with gastroesophageal reflux. *Gastroenterology* 1981;80:285-91.

12. Benini L, Sembenini C, Castellani G, Caliri S, Fioretta A, Vantini I. Gastric emptying and dyspeptic symptoms in patients with gastroesophageal reflux. *Am J Gastroenterol* 1996;91:1351-4.
13. Gardner JD, Rodriguez-Stanley S, Robinson M, Miner PB, Jr. Cisapride inhibits meal-stimulated gastric acid secretion and post-prandial gastric acidity in subjects with gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1819-29.
14. Ruth M, Hamelin B, Rohss K, Lundell L. The effect of mosapride, a novel prokinetic, on acid reflux variables in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:35-40.
15. Emerenziani S, Sifrim D. Gastroesophageal reflux and gastric emptying, revisited. *Curr Gastroenterol Rep* 2005;7:190-5.
16. Maddern GJ, Chatterton BE, Collins PJ, Horowitz M, Shearman DJ, Jamieson GG. Solid and liquid gastric emptying in patients with gastro-oesophageal reflux. *Br J Surg* 1985;72:344-7.
17. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000;141:4255-61.
18. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656-60.
19. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001;409:194-8.
20. Fujino K, Inui A, Asakawa A, Kihara N, Fujimura M, Fujimiya M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol* 2003;550:227-40.
21. Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, Fujimiya M. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J* 2004;18:439-56.
22. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:905-8.

23. Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, Sanger GJ. Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience* 2003;120:443-53.
24. Fukuda H, Mizuta Y, Isomoto H, Takeshima F, Ohnita K, Ohba K, Omagari K, Taniyama K, Kohno S. Ghrelin enhances gastric motility through direct stimulation of intrinsic neural pathways and capsaicin-sensitive afferent neurones in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004;39:1209-14.
25. Fujimiya M, Asakawa A, Ataka K, Kato I, Inui A. Different effects of ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin on gastroduodenal motility in conscious rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:6318-26.
26. Taniguchi H, Ariga H, Zheng J, Ludwig K, Takahashi T. Effects of ghrelin on interdigestive contractions of the rat gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2008;14:6299-302.
27. Zheng J, Ariga H, Taniguchi H, Ludwig K, Takahashi T. Ghrelin regulates gastric phase III-like contractions in freely moving conscious mice. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:78-84.
28. Tack J, Depoortere I, Bisschops R, Delpoort C, Coulie B, Meulemans A, Janssens J, Peeters T. Influence of ghrelin on interdigestive gastrointestinal motility in humans. *Gut* 2006;55:327-33.
29. Liu YL, Malik NM, Sanger GJ, Andrews PL. Ghrelin alleviates cancer chemotherapy-associated dyspepsia in rodents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006;58:326-33.
30. Qiu WC, Wang ZG, Wang WG, Yan J, Zheng Q. Gastric motor effects of ghrelin and growth hormone releasing peptide 6 in diabetic mice with gastroparesis. *World J Gastroenterol* 2008;14:1419-24.
31. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niiijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001;120:337-45.
32. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niiijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002;123:1120-8.

33. Tatsuta M, Iishi H. Effect of treatment with liu-jun-zi-tang (TJ-43) on gastric emptying and gastrointestinal symptoms in dyspeptic patients. *Aliment Pharmacol Ther* 1993;7:459-62.
34. Yagi M, Homma S, Kubota M, Iinuma Y, Kanada S, Kinoshita Y, Ohtaki M, Yamazaki S, Murata H. The herbal medicine Rikkunshi-to stimulates and coordinates the gastric myoelectric activity in post-operative dyspeptic children after gastrointestinal surgery. *Pediatr Surg Int* 2004;19:760-5.
35. Hattori T, Fujitsuka N, Asakawa A, Inui A. A new strategy using Rikkunshito (Liu-Jun-Zi-Tang), a Japanese traditional medicine, to treat gastrointestinal disease. In: Satoh H, ed. *Basics of Evidences-Based Herbal Medicine*. Kerala: Research Signpost, 2010:149-60.
36. Johnson DA, Levy BH, 3rd. Evolving drugs in gastroesophageal reflux disease: pharmacologic treatment beyond proton pump inhibitors. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11:1541-8.
37. Kawahara H, Kubota A, Hasegawa T, Okuyama H, Ueno T, Ida S, Fukuzawa M. Effects of rikkunshito on the clinical symptoms and esophageal acid exposure in children with symptomatic gastroesophageal reflux. *Pediatr Surg Int* 2007;23:1001-5.
38. Kawahara H, Mitani Y, Nomura M, Nose K, Yoneda A, Hasegawa T, Kubota A, Fukuzawa M. Impact of rikkunshito, an herbal medicine, on delayed gastric emptying in profoundly handicapped patients. *Pediatr Surg Int* 2009;25:987-90.
39. Miwa H, Koseki J, Oshima T, Kondo T, Tomita T, Watari J, Matsumoto T, Hattori T, Kubota K, Iizuka S. Rikkunshito, a traditional Japanese medicine, may relieve abdominal symptoms in rats with experimental esophagitis by improving the barrier function of epithelial cells in esophageal mucosa. *J Gastroenterol* 2010;45:478-87.
40. Fujitsuka N, Asakawa A, Hayashi M, Sameshima M, Amitani H, Kojima S, Fujimiya M, Inui A. Selective serotonin reuptake inhibitors modify physiological gastrointestinal motor activities via 5-HT_{2c} receptor and acyl ghrelin. *Biol Psychiatry* 2009;65:748-59.
41. Takeda H, Sadakane C, Hattori T, Katsurada T, Ohkawara T, Nagai K, Asaka M. Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT₂ receptor antagonism. *Gastroenterology* 2008;134:2004-2013.
42. Fujitsuka N, Asakawa A, Uezono Y, Minami K, Yamaguchi T, Nijima A, Yada T, Maejima Y,

- Sedbazar U, Sakai T, Hattori T, Kase Y, Inui A. Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival. *Transl Psychiatry* 2011;1:e23.
43. Omura N, Kashiwagi H, Chen G, Suzuki Y, Yano F, Aoki T. Establishment of surgically induced chronic acid reflux esophagitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:948-53.
 44. Saegusa Y, Takeda H, Muto S, Oridate N, Nakagawa K, Sadakane C, Nahata M, Harada Y, Iizuka M, Hattori T, Asaka M. Decreased motility of the lower esophageal sphincter in a rat model of gastroesophageal reflux disease may be mediated by reductions of serotonin and acetylcholine signaling. *Biol Pharm Bull* 2011;34:704-11.
 45. Mogami S, Suzuki H, Fukuhara S, Matsuzaki J, Kangawa K, Hibi T. Reduced ghrelin production induced anorexia after rat gastric ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;302:G359-64.
 46. Tatewaki M, Harris M, Uemura K, Ueno T, Hoshino E, Shiotani A, Pappas TN, Takahashi T. Dual effects of acupuncture on gastric motility in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R862-72.
 47. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000;407:908-13.
 48. Ingelsson E, Larson MG, Yin X, Wang TJ, Meigs JB, Lipinska I, Benjamin EJ, Keaney JF, Jr., Vasan RS. Circulating ghrelin, leptin, and soluble leptin receptor concentrations and cardiometabolic risk factors in a community-based sample. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3149-57.
 49. Nanjo Y, Adachi H, Hirai Y, Enomoto M, Fukami A, Otsuka M, Yoshikawa K, Yokoi K, Ogata K, Tsukagawa E, Kasahara A, Murayama K, Yasukawa H, Kojima M, Imaizumi T. Factors associated with plasma ghrelin level in Japanese general population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;74:453-8.
 50. Ling PR, Bistrrian BR. Comparison of the effects of food versus protein restriction on selected nutritional and inflammatory markers in rats. *Metabolism* 2009;58:835-42.
 51. Scarlett JM, Zhu X, Enriori PJ, Bowe DD, Batra AK, Levasseur PR, Grant WF, Meguid MM, Cowley MA, Marks DL. Regulation of agouti-related protein messenger ribonucleic acid transcription and peptide secretion by acute and chronic inflammation. *Endocrinology* 2008;149:4837-45.

52. Ballinger AB, Williams G, Corder R, El-Haj T, Farthing MJ. Role of hypothalamic neuropeptide Y and orexigenic peptides in anorexia associated with experimental colitis in the rat. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:221-9.
53. Rioux KP, Le T, Swain MG. Decreased orexigenic response to neuropeptide Y in rats with obstructive cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G449-56.
54. Broglio F, Gianotti L, Destefanis S, Fassino S, Abbate Daga G, Mondelli V, Lanfranco F, Gottero C, Gauna C, Hofland L, Van der Lely AJ, Ghigo E. The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:592-9.
55. Wei W, Qi X, Reed J, Ceci J, Wang HQ, Wang G, Englander EW, Greeley GH, Jr. Effect of chronic hyperghrelinemia on ingestive action of ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R803-8.
56. Currie PJ, Coiro CD, Duenas R, Guss JL, Mirza A, Tal N. Urocortin I inhibits the effects of ghrelin and neuropeptide Y on feeding and energy substrate utilization. *Brain Res* 2011;1385:127-34.
57. Takeda H, Muto S, Hattori T, Sadakane C, Tsuchiya K, Katsurada T, Ohkawara T, Oridate N, Asaka M. Rikkunshito ameliorates the aging-associated decrease in ghrelin receptor reactivity via phosphodiesterase III inhibition. *Endocrinology* 2010;151:244-52.
58. Kohno D, Sone H, Minokoshi Y, Yada T. Ghrelin raises $[Ca^{2+}]_i$ via AMPK in hypothalamic arcuate nucleus NPY neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:388-92.
59. Kohno D, Nakata M, Maekawa F, Fujiwara K, Maejima Y, Kuramochi M, Shimazaki T, Okano H, Onaka T, Yada T. Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology* 2007;148:2251-63.
60. Fass R. Therapeutic options for refractory gastroesophageal reflux disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2012;27 Suppl 3:3-7.
61. Johnson LF, Demeester TR. Twenty-four-hour pH monitoring of the distal esophagus. A quantitative measure of gastroesophageal reflux. *American Journal of Gastroenterology* 1974;62:325-32.
62. Dockray GJ. Cholecystokinin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2012;19:8-12.

63. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Letters* 1996;387:113-6.
64. Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Nijima A, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology* 2005;146:3518-25.
65. Nahata M, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M, Takeda H. Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G42-53.
66. Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA, Schurmann A, Joost HG, Jandacek RJ, Hale JE, Heiman ML, Tschop MH. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 2009;15:741-5.
67. Camina JP. Cell biology of the ghrelin receptor. *J Neuroendocrinol* 2006;18:65-76.
68. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation* 1996;98:1101-6.
69. Mizuno TM, Kleopoulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 1998;47:294-7.
70. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998;92:573-85.
71. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 1998;402:442-59.
72. Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Mathes WF, Przypek R, Kanarek R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the

- central regulation of feeding behaviour. *Nature* 1996;380:243-7.
73. Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003;144:1506-12.
 74. Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 1998;396:670-4.
 75. Mashiko S, Ishihara A, Gomori A, Moriya R, Ito M, Iwaasa H, Matsuda M, Feng Y, Shen Z, Marsh DJ, Bednarek MA, MacNeil DJ, Kanatani A. Antiobesity effect of a melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonist in diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2005;146:3080-6.
 76. Marsh DJ, Weingarth DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3240-5.
 77. Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 2005;437:556-9.
 78. Sherwood A, Wosiski-Kuhn M, Nguyen T, Holland PC, Lakaye B, Adamantidis A, Johnson AW. The role of melanin-concentrating hormone in conditioned reward learning. *Eur J Neurosci* 2012;36:3126-33.
 79. Miwa H, Oshima T, Sakurai J, Tomita T, Matsumoto T, Iizuka S, Koseki J. Experimental oesophagitis in the rat is associated with decreased voluntary movement. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:296-303.
 80. Diefenbach GJ, Goethe J. Clinical interventions for late-life anxious depression. *Clinical interventions in aging* 2006;1:41-50.
 81. Rowe JW, Kahn RL. Human aging: usual and successful. *Science (New York, N.Y.)* 1987;237:143-149.
 82. Seeman TE, Robbins RJ. Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans. *Endocrine Reviews* 1994;15:233-260.

83. Donini LM, Savina C, Cannella C. Eating habits and appetite control in the elderly: the anorexia of aging. *International psychogeriatrics / IPA* 2003;15:73-87.
84. Hughes G, Bennett KM, Hetherington MM. Old and alone: barriers to healthy eating in older men living on their own. *Appetite* 2004;43:269-276.
85. Lenze EJ, Mulsant BH, Shear MK, Alexopoulos GS, Frank E, Reynolds CF, 3rd. Comorbidity of depression and anxiety disorders in later life. *Depression and Anxiety* 2001;14:86-93.
86. Hotta M, Shibasaki T, Arai K, Demura H. Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. *Brain Research* 1999;823:221-225.
87. Zorrilla EP, Tache Y, Koob GF. Nibbling at CRF receptor control of feeding and gastrocolonic motility. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003;24:421-427.
88. Saegusa Y, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Decreased plasma ghrelin contributes to anorexia following novelty stress. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2011;301:E685-96.
89. Bechtholt AJ, Hill TE, Lucki I. Anxiolytic effect of serotonin depletion in the novelty-induced hypophagia test. *Psychopharmacology* 2007;190:531-40.
90. Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL, Rubinstein M, Tatro JB, Marcus JN, Holstege H, Lee CE, Cone RD, Elmquist JK. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science (New York, N.Y.)* 2002;297:609-611.
91. Heisler LK, Pronchuk N, Nonogaki K, Zhou L, Raber J, Tung L, Yeo GS, O'Rahilly S, Colmers WF, Elmquist JK, Tecott LH. Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007;27:6956-6964.
92. Heisler LK, Zhou L, Bajwa P, Hsu J, Tecott LH. Serotonin 5-HT(2C) receptors regulate anxiety-like behavior. *Genes, brain, and behavior* 2007;6:491-496.
93. Gatch MB. Discriminative stimulus effects of m-chlorophenylpiperazine as a model of the role of serotonin receptors in anxiety. *Life Sciences* 2003;73:1347-67.
94. de Mello Cruz AP, Pinheiro G, Alves SH, Ferreira G, Mendes M, Faria L, Macedo CE,

- Motta V, Landeira-Fernandez J. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 2005;182:345-54.
95. Dryden S, Wang Q, Frankish HM, Williams G. Differential effects of the 5-HT 1B/2C receptor agonist mCPP and the 5-HT_{1A} agonist flesinoxan on hypothalamic neuropeptide Y in the rat: evidence that NPY may mediate serotonin's effects on food intake. *Peptides* 1996;17:943-949.
 96. Hayashi A, Suzuki M, Sasamata M, Miyata K. Agonist diversity in 5-HT(2C) receptor-mediated weight control in rats. *Psychopharmacology* 2005;178:241-249.
 97. Nonogaki K. Ghrelin and feedback systems. *Vitamins and Hormones* 2008;77:149-170.
 98. Hemrick-Luecke SK, Evans DC. Comparison of the potency of MDL 100,907 and SB 242084 in blocking the serotonin (5-HT)₂ receptor agonist-induced increases in rat serum corticosterone concentrations: evidence for 5-HT(2A) receptor mediation of the HPA axis. *Neuropharmacology* 2002;42:162-169.
 99. Toshinai K, Mondal MS, Shimbara T, Yamaguchi H, Date Y, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin stimulates growth hormone secretion and food intake in aged rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 2007;128:182-186.
 100. Dulawa SC, Hen R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2005;29:771-83.
 101. Merali Z, Khan S, Michaud DS, Shippy SA, Anisman H. Does amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) mediate anxiety-like behaviors? Dissociation of anxiogenic effects and CRH release. *European Journal of Neuroscience* 2004;20:229-39.
 102. Lee MD, Somerville EM, Kennett GA, Dourish CT, Clifton PG. Reduced hypophagic effects of d-fenfluramine and the 5-HT_{2C} receptor agonist mCPP in 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *Psychopharmacology* 2004;176:39-49.
 103. Wolf WA, Schutz LJ. The serotonin 5-HT_{2C} receptor is a prominent serotonin receptor in basal ganglia: evidence from functional studies on serotonin-mediated phosphoinositide hydrolysis. *Journal of Neurochemistry* 1997;69:1449-58.
 104. Porter RH, Benwell KR, Lamb H, Malcolm CS, Allen NH, Revell DF, Adams DR,

- Sheardown MJ. Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *British Journal of Pharmacology* 1999;128:13-20.
105. Xu Y, Jones JE, Kohno D, Williams KW, Lee CE, Choi MJ, Anderson JG, Heisler LK, Zigman JM, Lowell BB, Elmquist JK. 5-HT_{2C}Rs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron* 2008;60:582-589.
 106. Yakabi K, Kurosawa S, Tamai M, Yuzurihara M, Nahata M, Ohno S, Ro S, Kato S, Aoyama T, Sakurada T, Takabayashi H, Hattori T. Rikkunshito and 5-HT_{2C} receptor antagonist improve cisplatin-induced anorexia via hypothalamic ghrelin interaction. *Regul Pept* 2010;161:97-105.
 107. Yakabi K, Sadakane C, Noguchi M, Ohno S, Ro S, Chinen K, Aoyama T, Sakurada T, Takabayashi H, Hattori T. Reduced ghrelin secretion in the hypothalamus of rats due to cisplatin-induced anorexia. *Endocrinology* 2010;151:3773-3782.
 108. Halford JC, Harrold JA, Boyland EJ, Lawton CL, Blundell JE. Serotonergic drugs : effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs* 2007;67:27-55.
 109. Kennett GA, Wood MD, Bright F, Trail B, Riley G, Holland V, Avenell KY, Stean T, Upton N, Bromidge S, Forbes IT, Brown AM, Middlemiss DN, Blackburn TP. SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Neuropharmacology* 1997;36:609-20.
 110. Martin JR, Ballard TM, Higgins GA. Influence of the 5-HT_{2C} receptor antagonist, SB-242084, in tests of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2002;71:615-25.
 111. Miura H, Qiao H, Ohta T. Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress. *Synapse (New York, N.Y.)* 2002;46:116-124.
 112. Van Oekelen D, Luyten WH, Leysen JE. 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sciences* 2003;72:2429-49.
 113. Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson RB. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 1997;387:303-8.
 114. Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and

behavioral effects of leptin. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2001;25 Suppl 5:S78-82.

115. Tecott LH. Serotonin and the orchestration of energy balance. *Cell metabolism* 2007;6:352-361.
116. Tachibana T, Oikawa D, Takahashi H, Boswell T, Furuse M. The anorexic effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone is mediated by corticotrophin-releasing factor in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology* 2007;147:173-8.
117. Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 1983;36:165-86.
118. Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Research. Molecular Brain Research* 1994;23:163-78.

謝辞

本論文を執筆するにあたり、多大なるご指導、ご高配を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 臨床病態解析学研究室 武田宏司教授、薬理学研究室 南雅文教授、薬剤分子設計学研究室 原島秀吉教授に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。また、本論文をまとめるにあたり、的確なご助言とご激励を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 臨床病態解析学研究室 講師 中川宏治博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、有益なご指導、ご助言を賜りました北海道大学大学院医学研究科 がん予防内科学 浅香正博教授ならびに特任助教 細野秀崇博士、内科学講座消化器内科学分野 助教 大西俊介博士、北海道大学大学院薬学研究院 臨床病態解析学研究室 大久保直登博士に深謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、貴重なご助言とご支援を頂くとともに学位取得に向けてご激励を頂きました株式会社ツムラ ツムラ研究所長 加瀬義夫博士、育薬 1 グループ長 服部智久博士に心より深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧な実験指導と多大なご支援を頂きました株式会社ツムラ ツムラ研究所 育薬 1 グループ飯塚生一博士、定金千春博士、小瀬木順一博士、三枝弥生氏に心から感謝致します。また、終始多大なご協力と温かいご支援を頂きました育薬 1 グループの皆様を始め、ツムラ研究所の皆様に深く感謝致します。