HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	若齢および加齢マウスを用いた心理的ストレス負荷における摂食行動に関する研究
Author(s)	山田, ちひろ
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第6992号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6992
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62143
Type	doctoral thesis
File Information	Chihiro_Yamada.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

若齢および加齢マウスを用いた心理的ストレス負荷における摂食行動に関する研究

山田　ちひろ

目次

目次 **1**

略語表 **3**

序論 **4**

第１章　新奇環境変化ストレス負荷マウスの摂食行動に対するセロトニン 2B 受容体の関与 ... **6**

第１節　背景 6
第２節　材料・実験方法 9
第１項　実験動物ならびに新奇環境変化ストレス 9
第２項　被験物質 9
第３項　摂食量の測定 10
第４項　血漿グレリンの測定 11
第５項　統計解析 12
第３節　実験結果 13
第１項　摂食量に与える新奇環境変化ストレスの影響 13
第２項　絶食条件における血漿グレリンレベルに与える新奇環境変化ストレスの影響 .. 14
第３項　摂食低下に対する 5-HT_{2B} 受容体拮抗薬の効果 16
第４項　血漿グレリンレベルならびに摂食低下に対する六君子湯の効果 17
第４節　考察 18

第２章　心理的ストレス負荷マウスにおける加齢ならびに性差に関する研究 **22**

第１節　背景 22
第２節　材料・実験方法 26
第１項　実験動物ならびに心理的ストレス 26
第２項　血漿ホルモンレベルの測定 27
第３項　摂食量ならびに体重増加率の測定 28
第４項　摂食量ならびに血漿アシルグレリンレベルに対する薬物投与の効果 28
第５項　アロマターゼ、エストロゲン受容体の mRNA 発現 29
第６項　免疫組織化学評価 30
第７項　統計解析 30
第３節　実験結果 32
第１項　血漿ホルモンレベルおよび摂食に与える新奇環境変化ストレスの影響 32
第２項　外因性アシルグレリン、5-HT_{2C} 受容体拮抗薬ならびに六君子湯の効果 35
第３項　継続的隔離飼育負荷が摂食関連因子に与える影響 37
第４項　新奇環境変化ストレス負荷における加齢と性差の影響 42
第４節　考察 51

総括 62

参考文献 66

謝辞 72

略語表

CRF	corticotropin-releasing factor（コルチコトロピン放出因子）
DPN	2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile （エストロゲン受容体β作動薬）
DW	distilled water（蒸留水）
EIA	enzyme immunoassay
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HPA	hypothalamus-pituitary-adrenal（視床下部-下垂体-副腎皮質）
I.P.	intraperitoneal（腹腔内）
I.V.	intravenous（静脈内）
P.O.	per os（経口）
PPT	1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole （エストロゲン受容体α作動薬）
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
S.C.	subcutaneous（皮下）
5-HT	5-hydroxytryptamine（セロトニン）

序論

現代社会において、「ストレス」は一般に用いられる言葉となっている。我々が社会活動において身近に直面するストレスとして、これまで慣れ親しんだ環境から、新しい環境への変化に伴って生じるものがある。一方、ストレスに曝されることによって、我々は様々な生理反応の異常に見舞われることもよく経験する。若年層においても、ストレスに適応できず様々な身体的異常を呈する場合も少なくないが、高齢化社会を迎えた現代では、特に、高齢者特有の生活環境変化や家族との離別・社会的ネットワークの欠如は、医療現場における精神的、身体的症候の訴えの原因となりうる。ストレス性症候の中でも食欲といった本能的欲求の抑制は非常に頻繁に見受けられる症状であり、高齢者における長期的な栄養障害は罹患率や死亡率の増加、生命維持に関わる重大な問題を引き起こす[1, 2]。加えて、ストレス反応後の視床下部-下垂体-副腎皮質（HPA）軸の活性化には性差が存在することも報告されている[3-5]。近年、末梢の栄養状態を摂食中枢に伝えるホルモンが注目され、創薬のターゲットにされている。そのほとんどが、食欲抑制シグナルを脳に伝えるペプチドであるが、グレリンは胃から分泌され、脳内へ空腹シグナルを伝える非常にユニークな食欲亢進ペプチドである[6]。最近、グレリンが様々な疾患における摂食障害を仲介する研究結果がヒトやげっ歯類で報告されるようになった[7-12]。ストレス性食欲低下と食欲亢進ペプチドとの関連性を検討し、高齢者におけるストレス反応のメカニズムの一端を明らかにすることは、高齢化社会への医療貢献という意味で重要である。しかしながら、これ

まで、高齢者における心理的なストレス負荷による食欲不振のメカニズム解明は十分検討されてきていない上、高齢者におけるストレス反応性における性差の影響について焦点を当てた研究はない。そこで本研究では、高齢者の心理的ストレス負荷による摂食抑制メカニズムならびにそれらにおける性差の影響の解明を目的として、若齢ならびに加齢雌雄マウスにおいて、新奇環境変化ならびに隔離飼育における摂食行動と食欲亢進ペプチドであるグレリンの関与について検討した。

本論文では、はじめに、若齢マウスを用いて新奇環境変化ストレス負荷による摂食量の変化を観察し、そのメカニズム解明のためにグレリン動態ならびにセロトニン 2B 受容体拮抗薬、グレリン分泌促進剤である六君子湯の効果を検討した。次に、若齢ならびに加齢雌雄マウスを用い、新奇環境変化ストレスならびに隔離飼育の影響について摂食とグレリンとの関連性を比較検討した。最後に、上記結果から得られた加齢雄マウスの新奇環境変化ストレス負荷による顕著な摂食低下のメカニズムの一端を解明するために、エストロゲン受容体とセロトニン 2C 受容体の関与について検討した。

第1章　　新奇環境変化ストレス負荷マウスの摂食行動に対するセロトニン 2B 受容体の関与

第1節 背景

ストレスが社会的問題[13, 14]になって久しい。特に、我々が社会生活を営む中で、環境変化や孤独に曝されることはしばしばであり、日常的な心理ストレスとしてよく経験する。健常人においては、ストレス反応が軽度な段階で回避行動やアダプテーションによってストレスに適応するが、年齢、性別、身体ならびに精神・心理的要因を背景にして、ストレス症状の遷延化や悪化が見られることがある。また、動物実験においても、オープンフィールド試験などの評価系では、新奇環境におかれたマウスにおける特徴的な不安・ストレス行動を評価できる。しかしながら、新奇環境におかれ且つ孤独に曝された動物の摂食行動に関する評価はこれまで十分に検討されてこなかった。

また、ストレス負荷は食欲や消化管機能にも影響することが良く知られている[15, 16]。特に食欲に関しては、ストレスが食欲の増進、あるいは低下のどちらの原因にもなりうることが知られている。しかしながら、これまでこの新奇環境変化に伴って起こるストレス反応が食欲に与える影響について詳細な検討はなされていなかった。最近、一定期間グループで飼育したホームケージから新しい飼育環境に移したマウスにおいて、摂食行動の低下が報告されている[10, 17]。合わせて、ストレス惹起性の摂食行動低下に、主に胃で産生

される末梢で唯一の摂食亢進ホルモン、グレリンの動態異常が関与する可能性も見出されてきている[18-20]。しかしながら、ストレス負荷後の末梢のグレリンの変化はストレスの種類や程度によって異なり、摂食行動との関係性については未だ議論が尽くされていない。

セロトニン(5-HT)は、14 種類の受容体サブタイプを持つ、マルチターゲットな神経伝達物質である。近年、5-HT_2受容体サブタイプである5-HT_{2B}受容体あるいは5-HT_{2C}受容体の活性化がげっ歯類の摂食行動を抑制することが報告されてきている[7, 21]。興味深いことに、これらサブタイプの局在は異なり、5-HT_{2C}受容体は中枢に広く分布するが、5-HT_{2B}受容体は消化管平滑筋に広く分布する[7]。また、我々のグループにより、孤立を伴う新奇環境変化によって惹起されるストレス負荷が摂食量を低下させ、そのメカニズムとしてcorticotropin-releasing factor (CRF) 1受容体ならびに5-HT_{1B}受容体、5-HT_{2C}受容体の活性化が関与することが証明されてきた[10]。加えて5-HT_{2B}受容体作動薬をnaïve動物へ投与することで、摂食量と同時に末梢グレリンレベルの低下を引き起こすことを証明してきている[22]。これらの結果はストレスによる摂食低下に数種の 5-HT 受容体が関与し、5-HT_{2B}受容体もそれを仲介する可能性を示している。しかしながらこれまで、ストレスによる摂食低下と5-HT_{2B}受容体の活性化の関連性については未だに明確になっていない。

六君子湯は日本の漢方薬の一つで食欲不振に処方されており、5-HT_{2B}受容体あるいは5-HT_{2C}受容体と5-HTとの結合を阻害する生薬成分を数多く含んでいる[7]。さらに、ヒト[23]、げっ歯類[7, 24, 25]、イヌ[26]において末梢ならびに視床下部のアシルグレリンレベルを増加させ、加えてグレリンの受容体とグレリンの結合を亢進[9]させることで持続的なグレ

リンシグナルを入力させることが知られている。新奇環境変化ストレスモデルの摂食低下に $5\text{-}HT_{2B}$ 受容体の活性化が関与するとすれば、六君子湯もまた摂食低下を改善すると考えられる。

本章では、若齢マウスを用いて、新奇環境変化ストレスによる摂食行動のプロファイルを明確にし、2 種類の $5\text{-}HT_{2B}$ 受容体拮抗薬ならびに $5\text{-}HT_{2B}$ 受容体拮抗作用を介したグレリン分泌促進作用を有する漢方薬、六君子湯の効果について検討した。

第2節　　材料・実験方法

第1項　実験動物ならびに新奇環境変化ストレス

6 週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー）を使用した。入荷後、マウスは 5 匹/ケージで飼育し、温湿度一定・12 時間照明（7:00-19:00）・自由摂餌下で馴化飼育させた。新奇環境変化ストレスは、Merali ら[27]および Bechtholt ら[28]の方法を若干改変して行った。グループ飼育（5 匹/ケージ、ケージサイズ W230 × D310 × H155 mm）していたマウスを新しい個別飼育ケージ（1 匹/ケージ、ケージサイズ W136 × D208 × H115 mm）に移すことで新奇環境変化ストレスを負荷し、摂食量に対する効果を評価した。摂食量を評価する実験では、馴化時から 7 日間個別飼育ケージで馴化飼育したマウスを対照群とした。その際は、グループ飼育による各ケージの平均摂食量と、7 日間個別飼育に慣れさせたマウスの摂食量はほぼ同程度であることを確認している[29]。すべての実験は 9:00-18:00 の間に行った。実験はすべて㈱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　被験物質

5-HT_{2B}受容体作動薬である SB215505 ならびに SB204741（Sigma-Aldrich）は生理食塩水（大塚製薬）に懸濁し、10 mg/kg [7]で腹腔内投与した。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 500 mg/kg の用量[7]で、また含有成分は 4 mg/kg の用量で蒸留水（DW）に懸濁し、経口ゾンデを用いて強制経口投与した。

第3項　摂食量の測定

24 時間絶食後、新奇環境変化ストレス負荷と同時に被験物質（SB215505, SB204741; 10 mg/kg, I.P., 六君子湯；500 mg/kg, P.O., 六君子湯含有成分各種；4 mg/kg, P.O.）を投与し、一定時間後の摂食量を評価した(図 1)。対照群ならびにストレス群のマウスには溶媒である DW あるいは生理食塩水を投与した。摂食量は摂食前と摂食後の飼料重量の差として計算した。対照群は実験開始前 7 日間、個別飼育に慣らしたマウスを用いた。

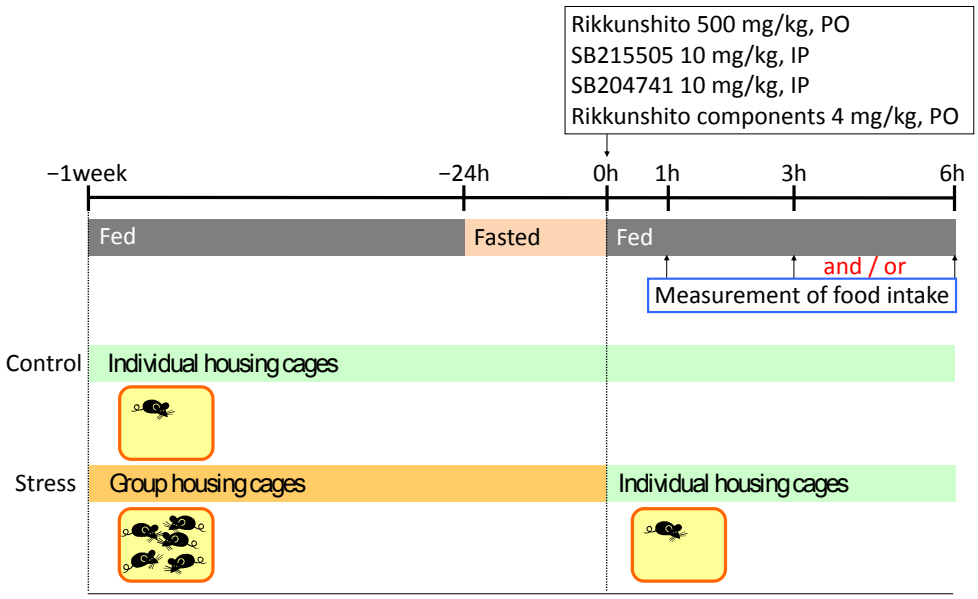


図 1　新奇環境変化ストレスマウスの摂食量に与える被験物質投与の影響

第4項　血漿グレリンの測定

24 時間絶食ならびに自由摂食下のマウスにストレスを負荷し、0.5 時間ならびに 3 時間後に下記の方法で採血した。また六君子湯(125, 250 ならびに 500 mg/kg, P.O.)は、24 時間絶食条件下で、ストレス負荷 1 時間前に投与し、ストレス負荷 3 時間後に採血した（図 2)。

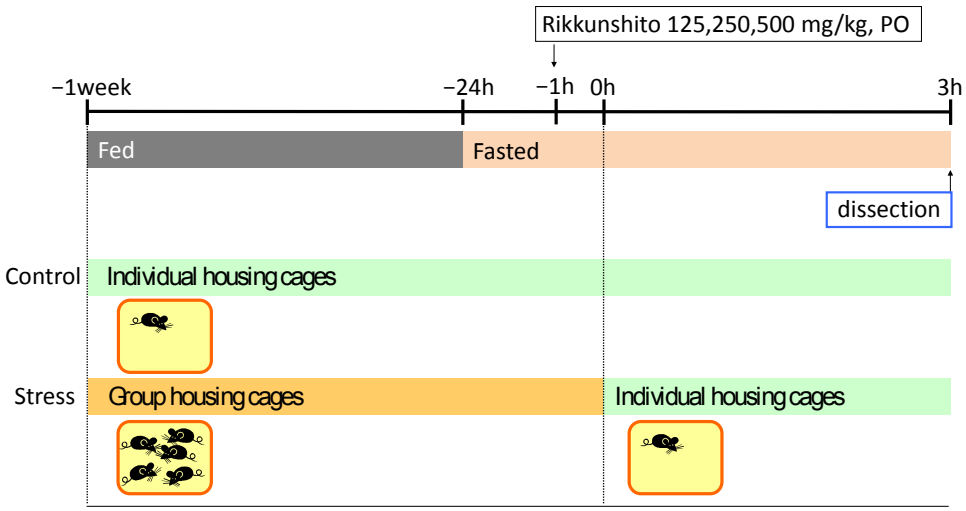


図 2　新奇環境変化ストレスマウスの血漿グレリンレベルに対する六君子湯の効果

10:00-12:00 に麻酔したマウスの腹部大静脈より採血し、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[7]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。血漿グレリンレベルは、活性型アシルグレリンは Active-Ghrelin ELISA Kit（LSI メディエンス)、不活性型デスアシルグレリンは

DesAcyl-Ghrelin ELISA Kit（LSI メディエンス）を用いて添付のプロトコールに従って測定した。

第5項　統計解析

データは各群の平均値±標準誤差で表示した。2群間の比較はF検定後にStudent’s *t*-testまたはAspin-Welch’s *t*-testを用いた。多群間比較はOne way analysis of variance (ANOVA)あるいはTwo way repeated measures ANOVA後にpost hoc testとして、Dunnett あるいは Bonferroni 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。なお、統計ソフトはStatLight (Yukms)を用いた。

第3節 実験結果

第1項　摂食量に与える新奇環境変化ストレスの影響

対照群は、24 時間絶食後継時的に摂食量が増加した。新奇環境変化ストレスを負荷したマウスでは、ストレス負荷 1 時間後から 6 時間後まで摂食量は対照群と比較し有意に低下した（図 3）。図表には示していないが、両群間で体重の差は観察されなかった。

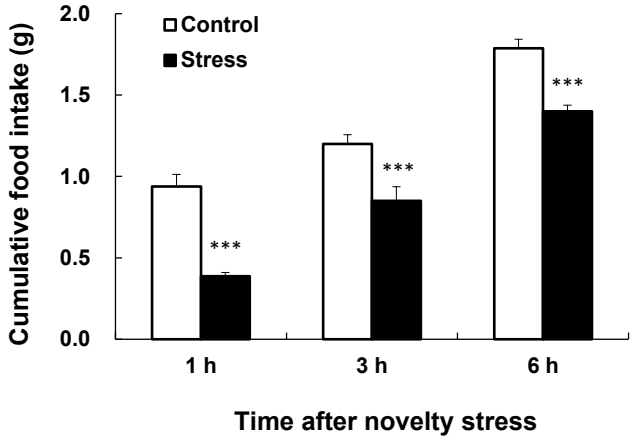


図 3　新奇環境変化ストレス負荷マウスの摂食量変化

***; $P < 0.001$ vs. control（それぞれ N = 8）

第2項　絶食条件における血漿グレリンレベルに与える新奇環境変化ストレスの影響

対照群では 24 時間絶食後、0.5 時間後および 3 時間後において有意に血漿アシルグレリンレベルが増加した（図 4A)。一方、新奇環境変化ストレス負荷マウスでは、0.5 時間後および 3 時間後において絶食による血漿アシルグレリンレベルの増加が観察されなかった。また、デスアシルグレリンレベルに関しては、対照群ならびにストレス群共に絶食下で有意に増加したが、対照群と比較しストレス群では、その増加の程度が軽度であった（図 4B)。

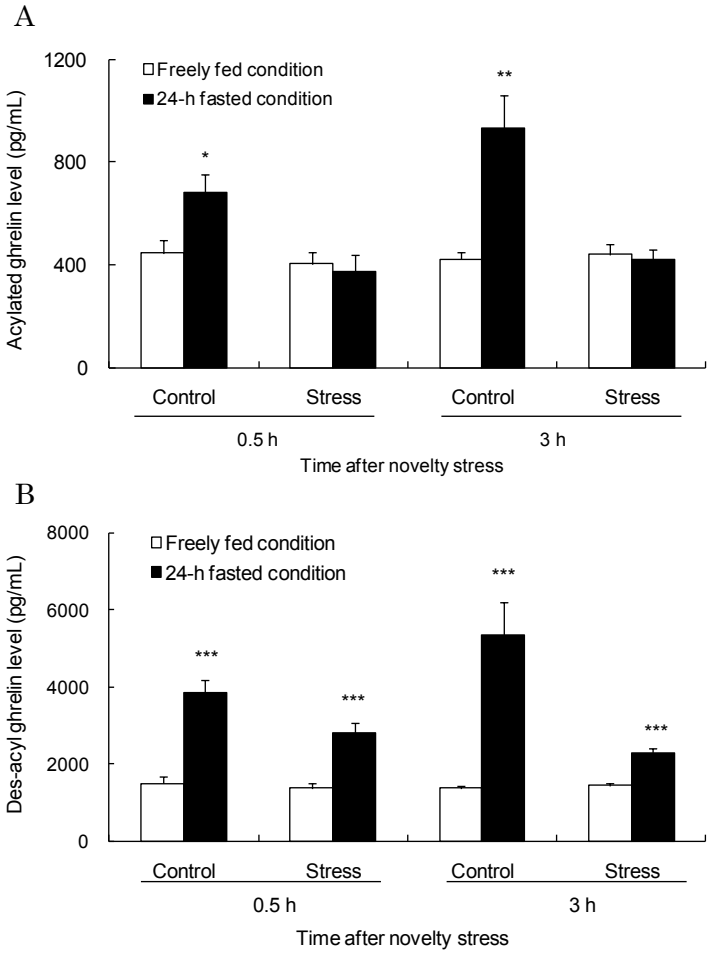


図 4　新奇環境変化ストレス負荷マウスの血漿グレリンレベル

(A) アシルグレリンレベル　(B) デスアシルグレリンレベル

*, **, ***; $P < 0.05$, 0.01, 0.001 vs. freely fed condition (N = 7-8)

第3項　摂食低下に対する 5-HT_{2B} 受容体拮抗薬の効果

対照群と比較し、ストレス群では 6 時間までの摂食量が有意に低下した（図 5）。これに対して 5-HT_{2B} 受容体拮抗薬投与はストレス負荷による摂食低下を有意に抑制した。SB204741（10 mg/kg）投与では 1 時間後、SB215505（10 mg/kg）投与では 3 時間後に、摂食量の低下を抑制した（図 5）。



図 5　新奇環境変化ストレスマウスの摂食量低下に対する 5-HT_{2B} 受容体拮抗薬の効果

*, **; $P < 0.05$, 0.01 vs. control, #, ##; $P < 0.05$, 0.01; vs. stress + saline (N = 10-21)

第4項　血漿グレリンレベルならびに摂食低下に対する六君子湯の効果

対照群と比較して、ストレス群ではストレス負荷 3 時間後の血漿アシルグレリンレベルが有意に低下した。一方、六君子湯 500 mg/kg 投与群ではストレス負荷による血漿アシルグレリンレベルの低下を有意に抑制した（図 6A)。さらに、六君子湯投与マウスでは、ストレス負荷マウスでみられる 6 時間後の摂食量の低下を有意に抑制した（図 6B)。また、図表には示していないが、5-HT_{2B} 受容体結合阻害作用を有する六君子湯の成分[7]、イソリクイリチゲニン（4 mg/kg） も同様に、6 時間後の摂食量低下を有意に抑制した。

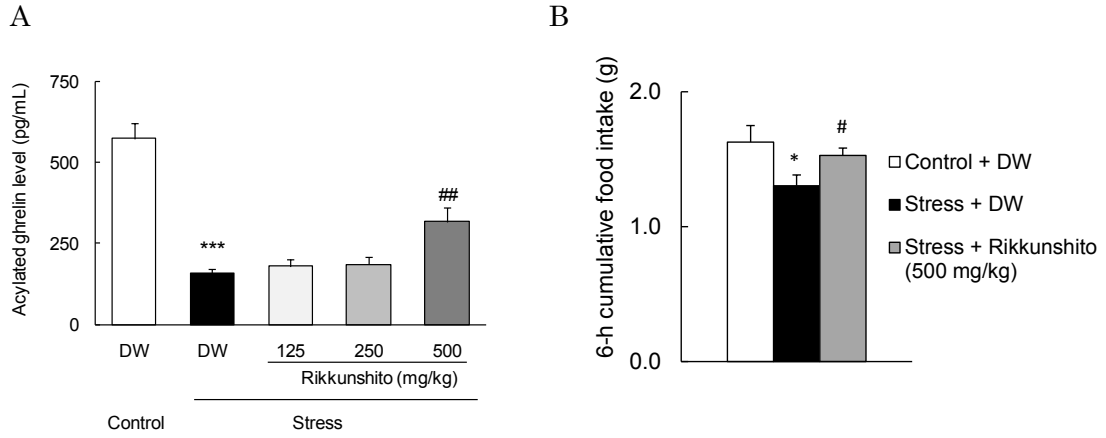


図 6　新奇環境変化ストレスマウスの血漿アシルグレリンレベルならびに摂食量に対する六君子湯の効果

(A) ストレス負荷 3 時間後の血漿アシルグレリンレベル　(B) 6 時間後の摂食量

*, ***; $P < 0.05$, 0.001 vs. control, #, ##; $P < 0.05$, 0.01 vs. stress＋蒸留水 (DW)

(N = 7-8)

第4節 考察

本実験では、若齢マウスにおいて、新奇環境変化ストレス負荷による摂食量低下と、絶食時の血漿アシルグレリンレベルの上昇抑制が示された。また、5-HT_{2B}受容体拮抗薬は新奇環境変化ストレスによる摂食量の低下を抑制した。さらに、5-HT_{2B}受容体拮抗作用を介してグレリン分泌を促進する成分を含む漢方薬、六君子湯の経口投与は、5-HT_{2B}受容体拮抗薬と同様にこの摂食低下を有意に抑制し、アシルグレリンレベルの低下を抑制した。

環境変化を用いた試験系は、オープンフィールドによる評価がよく用いられる。近年、1匹飼育動物を新しい環境へ移すnovelty-induced hypophagia testが確立されており[27, 28]、嗜好性を指標に、新奇環境における研究が実施されてきた。しかしながら、これらの評価系は、不安や抑うつなどの行動薬理学的な評価系として汎用されているものの、孤立を伴った新奇環境に暴露されたマウスにおける食欲に焦点を当てた研究はほとんど行われていない。そこで本研究では上記novelty-induced hypophagiaモデルを若干改良し、グループで飼育され慣れたホームケージ環境から新しい個別飼育ケージに 1 匹ずつマウスを移動することによりストレスを惹起させる隔離を伴った新奇環境変化ストレス[10]に暴露させ、摂食量に及ぼす影響を検討した。今回の実験で、新奇環境変化ストレスをマウスに負荷することによって、摂食量の有意な低下が確認できた。しかしながら、摂食に対する影響をさらに詳細に分析すると、積算摂食量においてストレス群と対照群との有意差は継続して

いるものの、ストレス負荷後3時間以降の摂食量は対照マウスと同程度に回復しはじめた。Saegusa ら[10]の報告においても、新奇環境変化ストレスによる摂食低下は 3 時間まで認められその後回復したことから、このストレスによる摂食低下が一過性である点は一致した。本実験で用いた新奇環境変化ストレスは、ケージ、床敷きならびに動物数という因子を新奇要因としたが、これらの因子の変更は、ストレスの程度としては、身体的および心理的ストレスを併せ持つような拘束ストレスと比較してマイルドであると考えられた。また、今回の実験で使用した対照マウスは入荷時から個別飼育に慣らしたマウスを用いた。個別飼育は長期的には攻撃行動の増加や不安行動を引き起こすが、本実験で使用した 1 週間程度の個別飼育では、グループ飼育と比較しても有意なストレスホルモンの増加は認められず、摂食量もほぼ同程度であることを予備的に確認した上で用いた[29]。ただし、今回用いた1週間個別飼育マウスに対照群として必要な条件が十分に備わっているかどうか、さらに詳細に検証する必要がある。

食欲亢進ペプチドであるアシルグレリンは、絶食下で胃粘膜の X/A like 細胞からの分泌が亢進し、血漿中濃度が増加するが、逆に飽食下では分泌が低下する[30]。今回の研究で新奇環境変化に曝されたマウスにおいては、24 時間絶食によるアシルグレリンの血漿中濃度増加が観察されなかった。また、ストレスマウスにおける24時間絶食下の血漿デスアシルグレリン（アシルグレリンの代謝物）レベルは、飽食時と比較して有意に亢進したが、その増加の程度は、対照群と比較して低いものであった。加えて、胃におけるグレリン前

駆体遺伝子の発現は、新奇環境変化ストレスによる影響は見られなかった（結果未掲示）。このことから、新奇環境変化ストレスは、アシルグレリンの生合成を低下させたのではなく、胃からのアシルグレリンの分泌を低下させることが暗示された。

5-HT_2受容体は 5-HT_{2A}受容体、5-HT_{2B}受容体、5-HT_{2C}受容体のサブタイプを有するが、5-HT_{2B}ならびに 5-HT_{2C}受容体が食欲制御に重要な働きをすると考えられている。既に、我々のグループがシスプラチン惹起性の摂食量の低下と、胃における 5-HT_{2B}受容体刺激ならびにグレリン分泌低下との関連性を見出してきた[7]。さらに、5-HT_{2B}受容体作動薬の naïve 動物への投与は、末梢グレリンレベルの低下と並行して摂食量も低下させる[22]。しかしながら、新奇環境変化ストレス下における摂食量の低下における 5-HT_{2B}受容体の役割は今まで検討されてこなかった。本研究において、2 種類の 5-HT_{2B}受容体拮抗薬投与は、新奇環境変化ストレス負荷による摂食量の低下を有意に抑制した。しかしながら、今回実験に用いた 5-HT_{2B}受容体拮抗薬投与後の末梢グレリンレベルは不明であることから、5-HT_{2B}受容体拮抗薬投与時の血漿アシルグレリンレベルの測定、あるいは 5-HT_{2B}受容体拮抗薬による有効性がグレリン受容体拮抗薬との併用によって遮断されるかどうかについて今後検討する必要がある。

今回の実験で、六君子湯は、新奇環境変化ストレスによる末梢アシルグレリンレベルの低下を有意に抑制した。六君子湯投与によるグレリンシグナルの増強が本モデルの摂食低

下を抑制したことから、新奇環境変化ストレスによる摂食低下は、グレリンのシグナル異常が関係する可能性が考えられた。

図表には示していないが、今回、5-HT_{2B}受容体に対する結合阻害を示す一部の生薬成分について、ストレスモデルの摂食量に及ぼす効果について検証し、甘草に含まれるイソリクイリチゲニン（4 mg/kg）投与はストレス負荷 6 時間後の摂食低下を有意に抑制した。また、すでに我々は 5-HT_{2B}受容体拮抗作用を持つグリシクマリンがストレス負荷後 3 時間の摂食量低下を抑制することを報告している[10]。また、図表には示していないが、イソリクイリチゲニンは 5-HT と 5-HT_{2B}受容体との結合阻害だけでなく、拮抗作用の活性を評価する cell functional assay においても、明らかに 5-HT_{2B}受容体の拮抗作用を有することが明確となった（IC_{50}値　2.1±0.2 μmol/L）。イソリクイリチゲニンは単独投与でもグレリンの低下を阻止することが報告されていることから[7]、本モデルの摂食低下における 5-HT_{2B}受容体とグレリン分泌の関連性はこれら六君子湯の成分を用いた解析からも間接的ながら証明できた。

結論

若齢雄マウスを用いた新奇環境変化ストレスモデルにおける摂食量の低下機序の一部に 5-HT_{2B}受容体活性化が関わることが示唆された。また、心理的ストレスによる食欲不振に、5-HT_{2B}受容体拮抗薬あるいはグレリン分泌促進作用を有する薬剤が有効である可能性が示された。

第2章　　心理的ストレス負荷マウスにおける加齢ならびに性差に関する研究

第1節 背景

高齢化社会を迎え、高齢者の抑うつや不安の訴えは、ますます増加することが推測される。高齢者は活動の低下に伴うエネルギー消費の減少により、摂食量そのものが減少し、栄養基盤が脆弱である。このような状況下でのストレス暴露は、著しい低栄養状態を引き起こし、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[1, 2]。従って、高齢者における栄養状態の改善やフレイルの予防は、高齢化社会への重要な対策である[31]。高齢者の食欲不振には、社会的因子や環境変化などの心理的要因が密接に関わっていることが知られている[32, 33]。特に社会的なネットワークの欠如や家族や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[34]。しかしながらそのメカニズムは十分に明確になっておらず、心理的ストレスに曝された高齢者の食欲不振に対する治療戦略も不十分である。

ストレスの感受性には性差があることは、以前より知られている。大うつ病性障害[35]あるいは神経性食思不振症[36]の発症率は若い女性の方が高率であり、げっ歯類においてもストレス負荷による HPA 軸の活性化は雌の方が高い傾向にある[37]。一方で、高齢者の食欲不振の症状は女性よりも男性の方が明確であると報告[38, 39]されているが、 高齢者

におけるストレス感受性と摂食量に焦点を当てた性差に関する調査は行われていないのが現状である。

ストレスに対する性差は、ストレスの反応性を仲介する様々な神経伝達物質や性ホルモンが密接に関わっていることが知られている[3, 4]。ストレス反応における脳内 CRF の産生、遊離は、食欲や消化管機能、情動反応に影響を及ぼす[40, 41]。また、CRF は 5-HT と相互作用し、脳内の領域依存的にストレス反応を制御している。急性の脳内 5-HT 枯渇は、不安行動を惹起する[28]一方で、CRF ニューロン上に存在する 5-HT_{2C} 受容体活性化は不安行動を増大させることも報告されている[42, 43]。さらに、加齢雄マウスに関しては、ストレスによって視床下部室傍核の 5-HT_{2C} 受容体遺伝子発現が増加することも認められている[29]。しかしながら、高齢マウスのストレス負荷による性差の影響と 5-HT_{2C} 受容体の関与は十分に明確になっていない。

アシルグレリンは、食欲、消化管運動を始めとするエネルギー蓄積に重要な役割を果たしているペプチドホルモンである。これまで我々や他のグループが末梢ならびに中枢のアシルグレリン動態異常が食欲の低下や消化管運動異常に関与することを見出してきた[8, 18, 24]。最近、Saegusa ら[10]は、若齢マウスの新奇環境変化ストレス負荷が、脳内の 5-HT_{2C} 受容体の活性化を引き起こし、末梢アシルグレリンの低下を介して、摂食量を低下させる可能性を証明してきた。しかしながら、ストレス負荷加齢マウスにおける性差を含めた 5-HT_{2C} 受容体ならびにアシルグレリンの関連性については、これまで全く研究されてこなかった。

ストレスに関する性差は性ホルモンの影響を強く受けていると考えられている。エス

トラジオールの作用はエストロゲン受容体αとβによって仲介されており、エストロゲン受容体αは HPA 軸を活性化し、摂食行動を負に制御する。一方、エストロゲン受容体βはそのカウンターパートである[3, 44]。しかし、エストロゲン受容体と摂食行動に影響を与える 5-HT_2 受容体や食欲亢進ホルモンであるアシルグレリンとの関連性は未だ不明であり、ストレス負荷加齢マウスにおけるエストロゲン受容体と摂食行動の関連は検討されていない。

本研究では、加齢マウスにおける心理的ストレス、特に孤立を伴う環境変化に対する摂食行動について検討することを目的とし、その摂食低下および性差に関わるメカニズムを明確にするため、始めに、加齢マウスへの急性心理ストレスとして新奇環境変化ストレス負荷による摂食行動に、加齢や性差の影響があるかどうかを検討した。合わせて、継続的心理ストレスとして、新奇環境変化で用いた飼育環境を 2 週間継続した継続的隔離飼育に対する同様の影響について検討した。次に、新奇環境変化ストレス負荷における性差のメカニズムを明確にする目的で、摂食の制御に関わる 5-HT_{2C} 受容体の役割に着目し、5-HT_{2C} 受容体作動薬あるいは拮抗薬投与による摂食行動に対する効果を検討した。また、5-HT_{2C} 受容体拮抗作用を有する漢方薬である六君子湯の摂食低下に対する効果を評価した。加えて、ストレス関連脳領域の 5-HT_{2C} 受容体活性化を免疫組織化学的に検討した。最後に、加齢マウスにおけるストレス負荷による摂食低下における性差の要因を明確にするため、加齢雄マウスにおける視床下部のアロマターゼならびにエストロゲン受容体の遺伝子発現を

測定した。さらに、エストロゲン受容体α作動薬投与による摂食量低下に対する 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬投与の効果を検討した。

第2節 材料・実験方法

第1項　実験動物ならびに心理的ストレス

6-10 週齢（若齢）および 79 週齢以上（加齢）の C57BL/6 系統、雌雄マウス（日本チャールスリバー）を使用した。マウスは 3-5 匹/ケージにし、温湿度一定・12 時間照明（7:00-19:00）・自由摂餌下で馴化飼育させた。急性の心理ストレスとして新奇環境変化ストレスは、第 1 章で述べた通り、Merali ら[27]および Bechtholt ら[28]の方法を若干改変して行った。グループ飼育（3-5 匹/ケージ、ケージサイズ W230 × D310 × H155 mm）していたマウスを新しい個別飼育ケージ（1 匹/ケージ、ケージサイズ W136 × D208 × H115 mm）に移すことで新奇環境変化ストレスを負荷し、摂食量に対する効果を評価した。摂食量を評価する実験では、馴化時から 7 日間個別飼育ケージで馴化飼育したマウスを対照群とした（図 1）。

継続的隔離飼育として、新奇環境変化ストレスで使用した隔離飼育を 2 週間継続した場合の変化も同様に検討した。対照群としてはグループ飼育（3 匹/ケージ）のマウスを用い、対照群の摂食量は、グループ飼育 1 ケージ当たりの平均摂食量を N = 1 とした（図 7）。

すべての実験は 9:00-18:00 の間に行った。実験はすべて㈱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、12-105）。

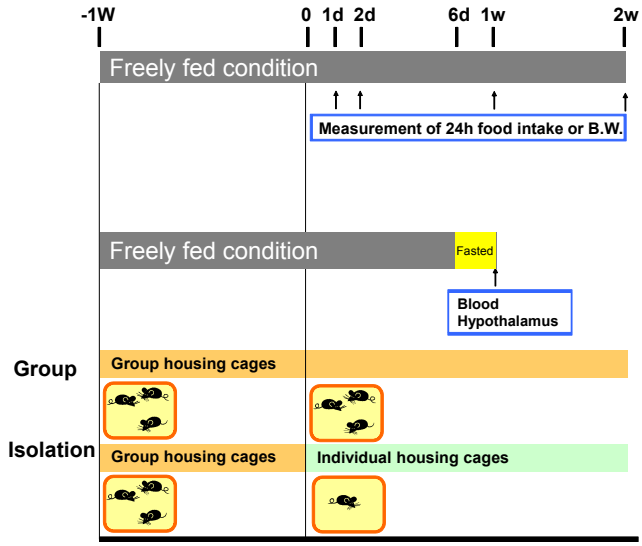


図 7　継続的な隔離飼育のプロトコール

第2項　血漿ホルモンレベルの測定

13:00-15:00 に、麻酔したマウスの腹部大静脈より採血、もしくは断頭して採血を行った。血漿アシルグレリンレベルは第 1 章、第 2 節、第 4 項に記載した方法に準じて測定した。血漿コルチコステロンレベルは、Corticosterone EIA kit（Enzo Life Sciences）を用いて測定した。血漿エストラジオールレベルは 17β-Estradiol ELISA kit（Enzo Life Sciences)で測定した。新奇環境変化ストレスに関しては加齢雌雄マウスを 18 時間絶食し、ストレス負荷 3 時間ならびに 6 時間の血液サンプルを採取した。また、継続的隔離飼育に関しては隔離開始後 1 週間目で 18 時間絶食し、血液サンプルを採取した。

第3項　摂食量ならびに体重増加率の測定

第1章、第2節、第3項の方法に準じて24時間までの評価を行った。実験期間中は水を自由に摂取させた。継続的隔離飼育に関しては、グループ飼育したマウスの摂食量は、各ケージの摂食量を個体数で除して1匹当たりの平均摂食量とし、7日間個別飼育した対照マウスの摂食量と有意差がないことを確認した。体重を測定し体重増加率（(測定日の体重-0日の体重）/(0日の体重)×100）を算出した。

第4項　摂食量ならびに血漿アシルグレリンレベルに対する薬物投与の効果

18時間絶食した後、若齢ならびに加齢雌雄マウスに選択的 5-HT_{2C} 受容体作動薬；CP-809101 (Sigma-Aldrich)を 0.1, 1.0 ならびに 3.0 mg/kg の用量にて皮下投与した。投与後、1ならびに3時間に摂食量を測定した。

また、加齢マウスに 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬；SB242084 (6 mg/kg, P.O., Tocris Bioscience)[45]、六君子湯（1000 mg/kg, P.O., ツムラ）[7]、アロマターゼ阻害薬；レトロゾール (2.5 mg/kg, P.O., Tocris Bioscience)[46]、エストロゲン受容体β作動薬；2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propionitrile [DPN] (8 mg/kg, S.C., Sigma-Aldrich)[47]を18時間絶食後にストレス負荷と同時に投与し、6時間後の積算摂食量を測定した。対照群には溶媒を投与した。また、同様にストレス負荷3時間後の血液を採取し、血漿アシルグレリンレベルを測定した。加えて、加齢雄マウスにアシルグレリン (10 nmol/kg, ペプチド研究所)をストレス負荷と同時に腹腔内投与し、1、3、6時間の摂食量を測定した。

次にエストロゲン受容体α作動薬；1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole［PPT］(0.63, 1.25 mg/kg, S.C., Sigma-Aldrich)[48]を若齢ならびに加齢雌雄マウスに処置し、その後6ならびに24時間の摂食量を測定した。さらに、加齢雌雄マウスにおける 5-HT_{2C} 受容体とエストロゲン受容体αの関与を明確にする目的で PPT (1.25 mg/kg)投与直後に SB242084 (6 mg/kg)を投与し、6 時間後の摂食量に与える影響を検討した。

第5項　アロマターゼ、エストロゲン受容体の mRNA 発現

若齢ならびに加齢雌雄マウスから視床下部を摘出して total RNA を抽出し、mRNA の発現解析を行った。視床下部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-80℃で保存した。組織をホモジナイズし、RNeasy Universal Tissue Kit（Qiagen）を用いて RNA を抽出した。RNA 溶液は 100 ng/μL に希釈し、70℃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）を用いて逆転写反応を行った後、TaqMan Universal PCR Master Mix（Applied Biosystems）を用いて PRISM 7900HT Sequence Detection System（Applied Biosystems）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、Δthreshold cycle（ΔCt）値：$\Delta Ct = 2^{(-|A-B|)}$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）は下記の通りである：*Rps29*, Mm02342448_gH;

Ghrl, Mm00445450_m1; *Cyp19a1 (aromatase)*, Mm00484049_m1; *Esr1*, Mm00433149_m1; *Esr2*, Mm00599821_m1

第6項　免疫組織化学評価

若齢ならびに加齢雌雄マウスは、新奇環境変化ストレス負荷 6 時間後に Tissue Fixative（Cat. No. TSF-01; ジェノスタッフ）を用いて脳を固定し摘出した。摘出した脳組織をパラフィン包埋後、厚さ 6 μm の組織切片を作製し、0.3 %過酸化水素エタノール溶液に 30 分間処置し、Protein Brock（ジェノスタッフ）ならびに Avidin/biotin blocking kit (Vector Laboratories) でさらに処置した。切片は、anti-5-HT_{2C} 受容体 rabbit polyclonal antibody (Novus Biologicals) あるいは anti-c-Fos rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) を用いて、4℃で一晩反応させた。その後、biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG (Dako)、alkaline-phosphatase-conjugated streptavidin あるいは peroxidase-conjugated streptavidin と反応させた。シグナルについては、3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) にて検出した。ネガティブコントロールとして、anti-rabbit IgG (Dako) を用いた。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㈱に依頼した。

第7項　統計解析

データは各群の平均値±標準誤差で表示した。2 群間の比較は F 検定後に Student's

t-test または Aspin-Welch’s *t*-test を用いた。多群間比較は One way ANOVA あるいは Two way repeated measures ANOVA 後に post hoc test として、Dunnett あるいは Bonferroni 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。なお、統計ソフトは StatLight (Yukms)を用いた。

第3節 実験結果

第1項　血漿ホルモンレベルおよび摂食に与える新奇環境変化ストレスの影響

図 8 に示すように若齢マウスへの新奇環境変化ストレスは、雌雄とも僅かな血漿コルチコステロンレベルの増加が観察されたが、統計学的な差は見られなかった。一方、ストレス負荷した加齢雄マウスでは、対照群と比較して顕著なコルチコステロンの増加が観察された（図 8A)。加齢雌マウスでは、ストレス負荷による差は見られなかった（図 8B)。

摂食量に関して、若齢マウスではストレス負荷後 6 時間までに摂食量の低下は消失した(図 8C,D)。一方、加齢雄マウスでは 24 時間まで持続的な摂食低下が観察された(図 8C)。また、加齢雌マウスでは若齢マウスと同様 6 時間までに摂食量の低下は消失した（図 8D)。

図 9 に示すように加齢雄マウスの血漿アシルグレリンレベルは、ストレス負荷後 3 時間ならびに 6 時間目で有意に低下した（図 9A)。しかしながら、加齢雌マウスでは対照群と比較してグレリンレベルの低下は観察されなかった（図 9B)。

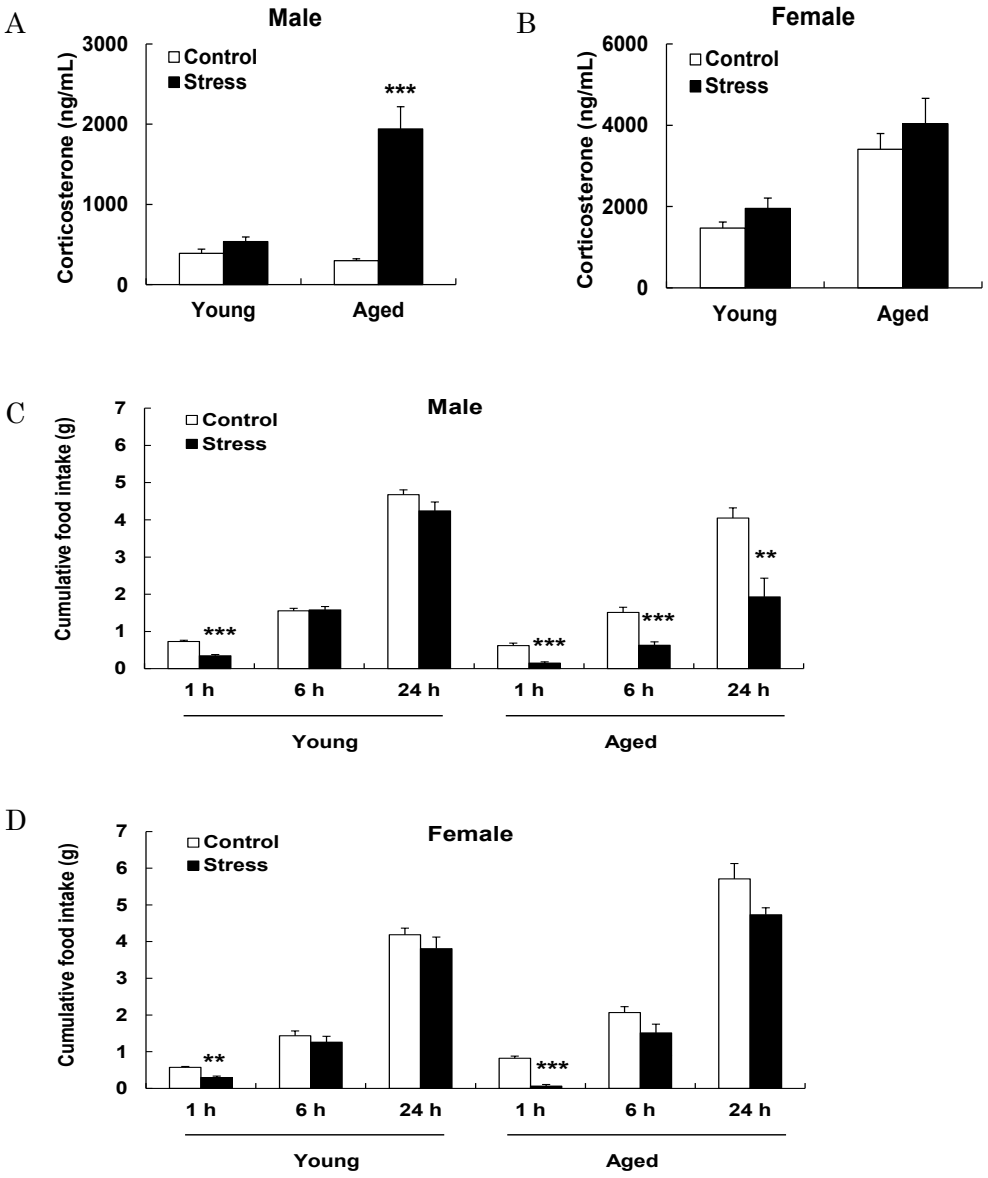


図 8　新奇環境変化ストレス負荷による血漿コルチコステロンレベルならびに摂食量への影響

（A）および（B）ストレス負荷 6 時間後の血漿コルチコステロンレベル

（C）および（D）新奇環境ストレス負荷後の摂食量

, *; $P < 0.01$, 0.001 vs. age-matched control (N = 4-8)

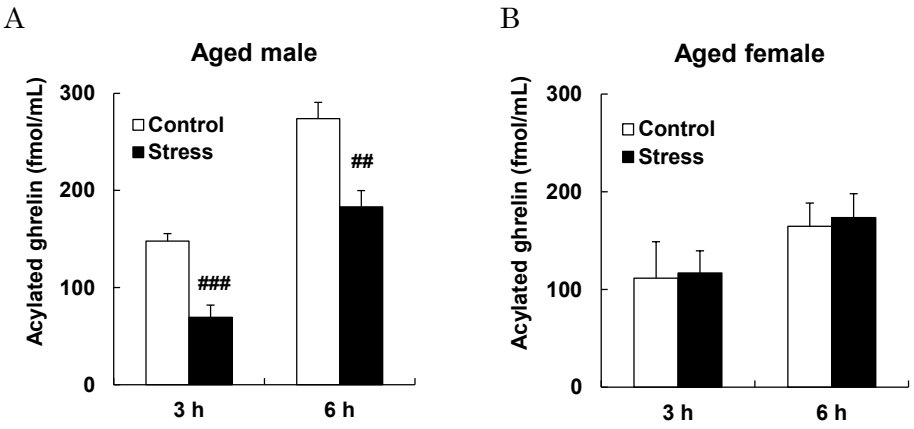


図9　加齢マウスにおける新奇環境変化ストレス負荷時の血漿アシルグレリンレベル

（A）加齢雄マウス　（B）加齢雌マウス

##, ###; $P < 0.01$, 0.001 vs. control (N = 5-8)

第2項　外因性アシルグレリン、5-HT_{2C}受容体拮抗薬ならびに六君子湯の効果

加齢雄マウスへの外因性アシルグレリン（10 nmol/kg）投与は対照群と比較し摂食量に影響しなかったが、新奇環境変化ストレスを負荷した加齢雄マウスの摂食量低下に対して、外因性アシルグレリン投与は、摂食の低下をほぼ完全に回復させた（図10）。

加齢雄マウスのストレス負荷6時間ならびに24時間の摂食量低下に対し、5-HT_{2C}受容体拮抗薬（SB242084, 6 mg/kg）ならびにグレリン分泌促進剤である六君子湯（1,000 mg/kg）は有意な抑制作用を示した（図11A）。一方、図表には示していないが、加齢雌マウスでは、ストレス負荷6時間ならびに24時間の摂食低下が観察されず、両被験物質の効果も観察されなかった。また、加齢雄マウスにおいて、5-HT_{2C}受容体拮抗薬ならびに六君子湯投与はストレス負荷3時間での血漿アシルグレリンレベルの低下を有意に抑制した（図11B）。



図 10　加齢雄マウスにおける新奇環境変化ストレス負荷による摂食量低下に対する外因性アシルグレリン投与の効果

#; $P < 0.05$ vs. control, *; $P < 0.05$ vs. stress (N = 4-5)

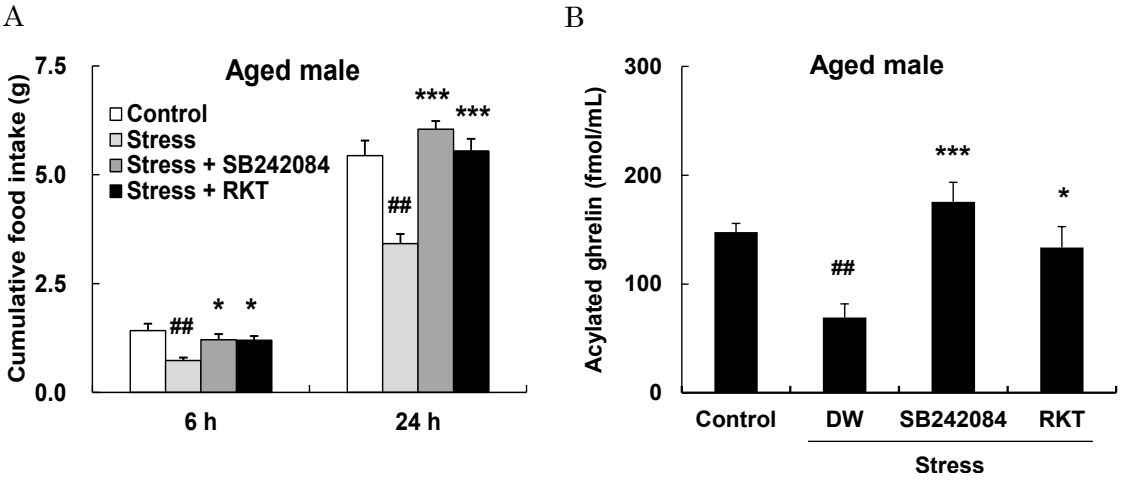


図 11　加齢雄マウスにおける新奇環境変化ストレス負荷による摂食量および血漿アシルグレリン低下に対する 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬の効果

(A) ストレス負荷後の摂食量

(B) ストレス負荷 3 時間後における血漿アシルグレリンレベル

##; $P < 0.01$ vs. control, *, ***; $P < 0.05$, 0.001 vs. stress (それぞれ N = 5)

第 3 項　継続的隔離飼育負荷が摂食関連因子に与える影響

若齢マウスでは雌雄ともに 2 週間の隔離飼育によって摂食量が継続的に有意に増加した（図 12A, B）。一方、加齢マウスでは雌雄ともに実験期間を通じて、継続的な摂食量の増加は見られなかった（図 12C, D）。

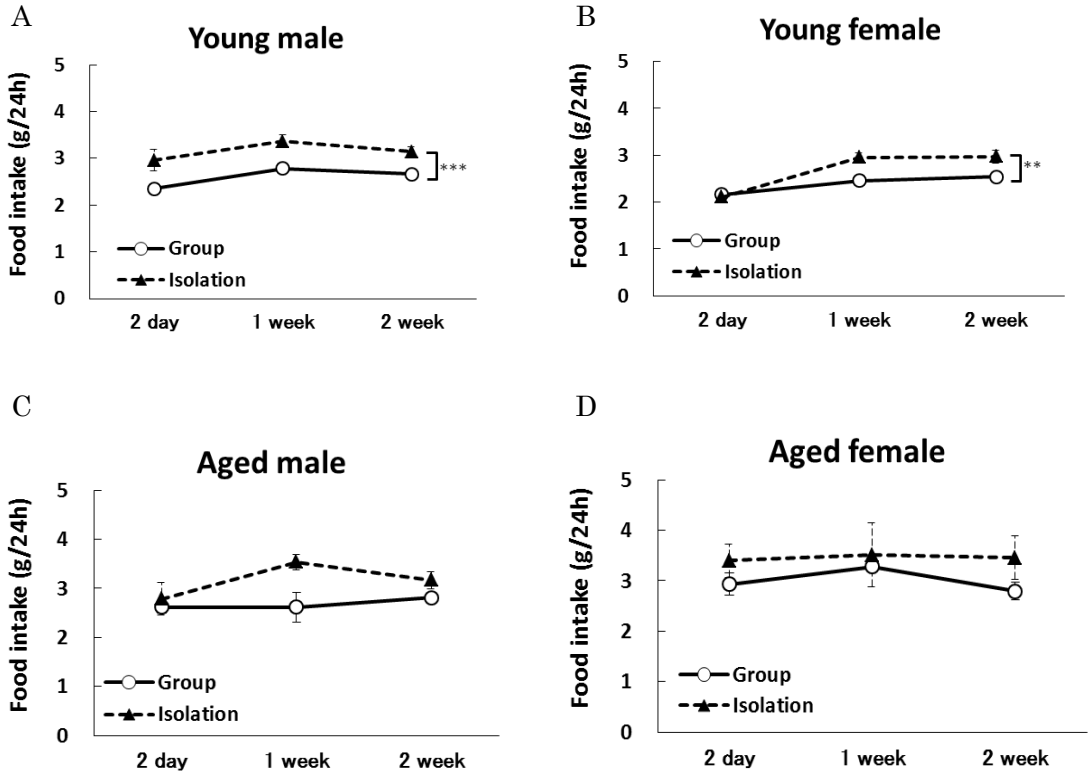


図 12　継続的隔離飼育負荷が摂食量に与える影響

（A）若齢雄マウス　（B）若齢雌マウス　（C）加齢雄マウス　（D）加齢雌マウス

, *; $P < 0.01$, 0.001 (N = 3-9)

図表には示していないが、実験期間を通して、若齢、加齢ともにグループ飼育群と隔離飼育群の間に体重の有意な差は観察されなかった。図 13 に示すように、体重の増加率に関しては、若齢マウスでは、グループ飼育ならびに隔離飼育どちらも雌雄ともに、1 週目に顕著な増加は観察されなかったが､2 週間目においては両群ともに増加を示した(図 13A, B)。加齢マウスにおいて、グループ飼育群では 2 週間で体重増加率の変化は見られなかった。その一方、加齢雄マウスの隔離飼育群では 2 週間でグループ飼育群と比較して有意に体重増加率が減少した（図 13C)。また、加齢雌マウスでも、隔離飼育 2 週間で体重増加率は減少傾向であった（図 13D)。

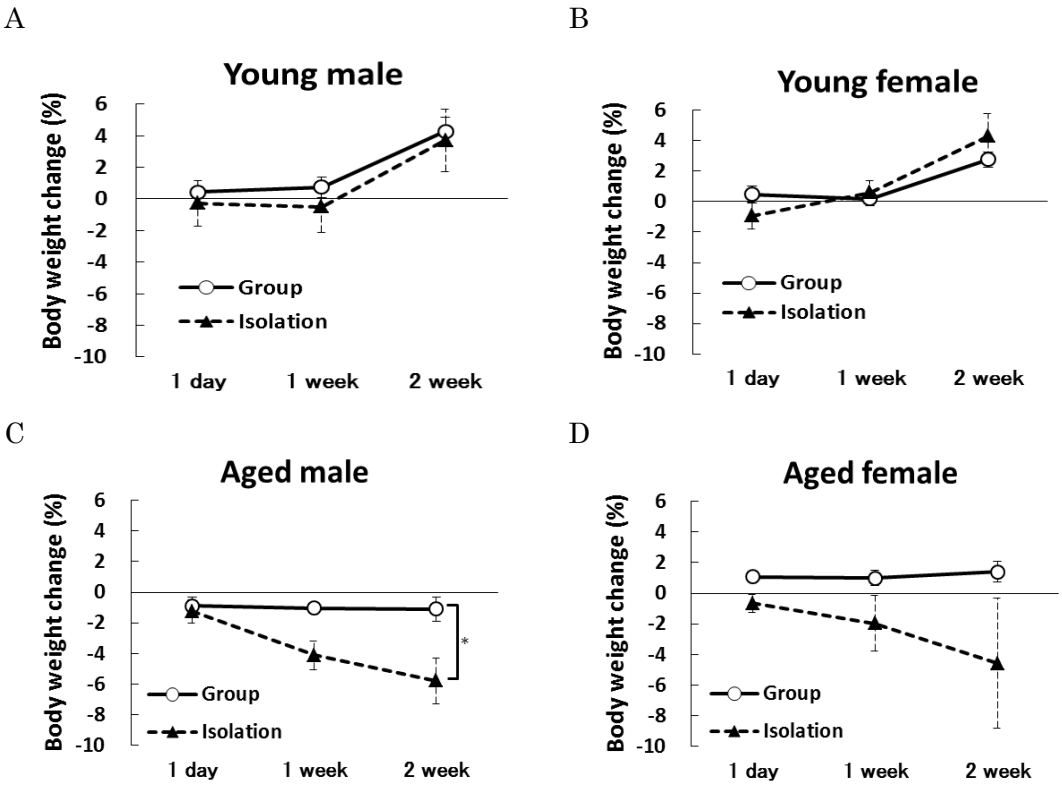


図 13　継続的隔離飼育負荷が体重増加率に与える影響

（A）若齢雄マウス　（B）若齢雌マウス　（C）加齢雄マウス　（D）加齢雌マウス

*; $P < 0.05$ (N = 3-9)

18 時間絶食した隔離 1 週目での若齢雄マウスにおいて、グループ飼育と比べて隔離飼育マウスの血漿アシルグレリンレベルは有意に増加(2.2 倍)した(図 14A)。これに対して、若齢雌マウスでは、グループ飼育と大きな差がなかった(図 14B)。加齢雄マウスでは、隔離飼育によって有意だが、若齢に比べて軽度なアシルグレリンの増加(1.3 倍)が見られた(図 14C)。加齢雌マウスでは逆に低下の傾向であった(図 14D)。

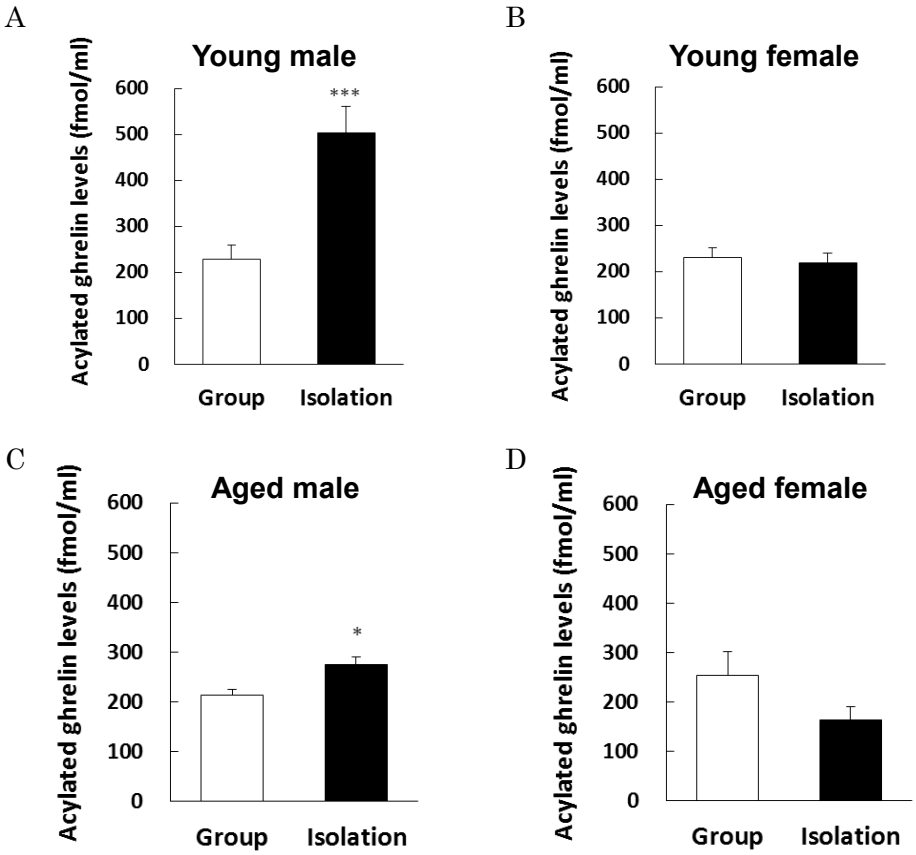


図 14　継続的隔離飼育負荷が血漿アシルグレリンレベルに与える影響

（A）若齢雄マウス　（B）若齢雌マウス　（C）加齢雄マウス　（D）加齢雌マウス

*, ***; $P < 0.05, 0.001$ (N = 7-8)

18 時間絶食した隔離 1 週目での若齢雄マウスにおいて、グループ飼育と比較して、隔離飼育により視床下部のグレリン前駆体の遺伝子発現は低下した（図 15A）。逆に若齢雌マウスでは遺伝子発現が有意に増加した（図 15B）。これに対して、加齢マウスでは、雌雄ともにグレリン前駆体の遺伝子発現に隔離飼育による影響は見られなかった（図 15C, D）。

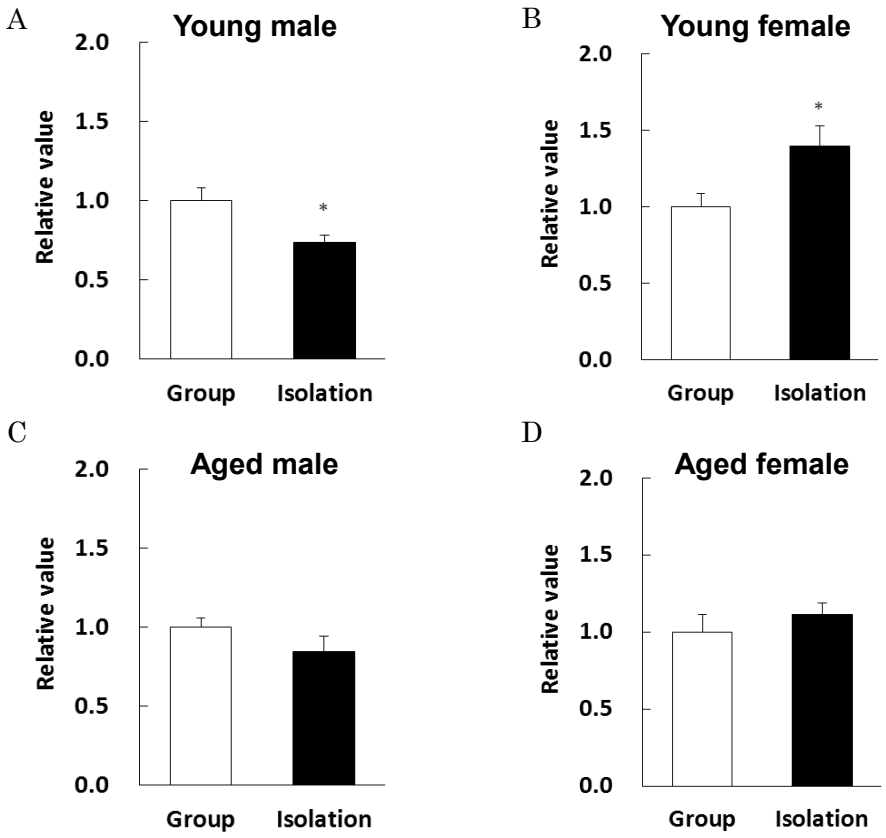


図 15　継続的隔離飼育負荷が視床下部グレリン前駆体遺伝子発現に与える影響

（A）若齢雄マウス　（B）若齢雌マウス　（C）加齢雄マウス　（D）加齢雌マウス

*; $P < 0.05$ (N = 7-8)

第4項　新奇環境変化ストレス負荷における加齢と性差の影響

次に、加齢と性差による影響が明確に見られた新奇環境変化ストレスに焦点を絞ってそのメカニズムの解明を行った。まず初めに、加齢ならびに雌雄における 5-HT_{2C} 受容体作動薬（CP-809101）投与による摂食量に与える影響について検討した。若齢雄マウスではCP-809101 の 3.0 mg/kg 投与 1 時間後において有意な摂食量の低下を示したが、3 時間後においては低下傾向を示したのみであった。若齢雌マウスでは 3.0 mg/kg 投与で、1 ならびに 3 時間目で、1.0 mg/kg では 3 時間目のみで有意に摂食量の低下を示した（図 16A,B）。その一方で、加齢雄マウスにおいては、低用量（0.1 mg/kg）から有意な摂食低下が引き起こされ、加齢雌マウスでは CP-809101 による摂食量の低下は認められなかった（図 16C,D）。

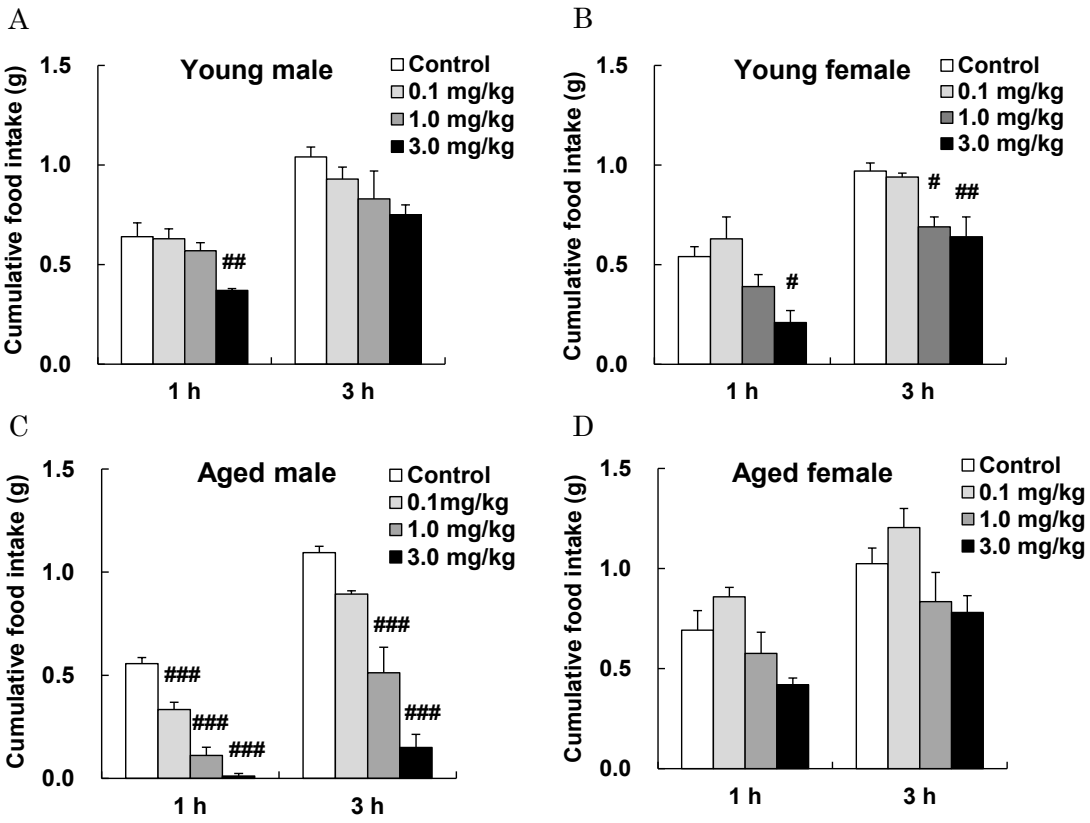


図 16　5-HT$_{2C}$ 受容体作動薬 CP-809101 投与による摂食量への影響

（A）若齢雄マウス　（B）若齢雌マウス　（C）加齢雄マウス　（D）加齢雌マウス

#, ##, ###; $P < 0.05$, 0.01, 0.001 vs. control（それぞれ N = 5）

図 17 に示すように、5-HT_{2C} 受容体と神経活動の指標である c-Fos の共染色細胞数は、若齢マウスにおいては雌雄ともに、室傍核および扁桃体どちらも新奇環境変化ストレス負荷による変化は見られなかった。一方、加齢雄マウスではストレス負荷によって室傍核の共染色細胞数は顕著に増加した（図 17A)。加齢雌マウスでは室傍核におけるストレスによる共染色細胞数増加は認められなかった。図 17B に示すように、加齢雄マウスでは、扁桃体においても室傍核と同様に、ストレス負荷によって顕著に共染色細胞数が増加した。扁桃体では室傍核と異なり、加齢雌マウスにおいてもストレス負荷によって有意な増加を認めたが、その程度は加齢雄マウスと比較して低いレベルであった（図 17B)。図 18A に室傍核の、図 18B に扁桃体の代表的な免疫染色像を示す。図 18C に典型的な 5-HT_{2C} 受容体、c-Fos 陽性細胞像を示した。

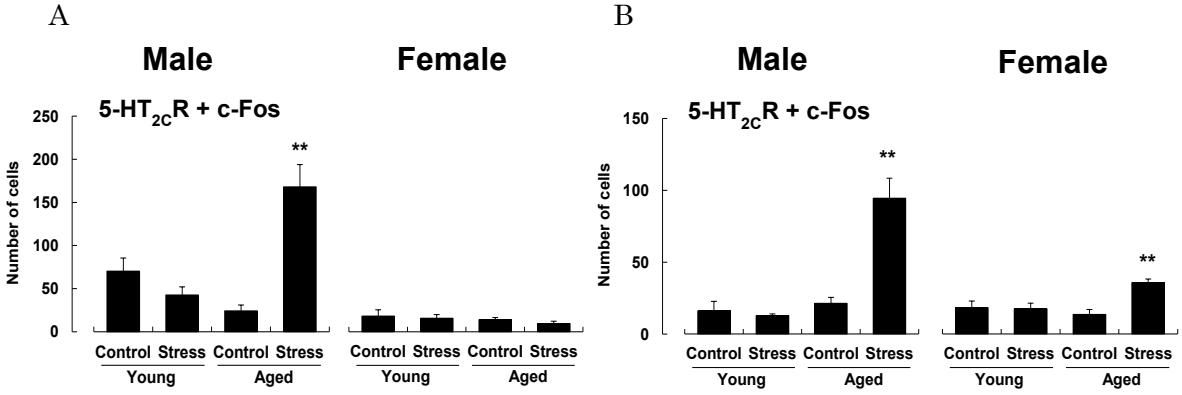


図 17　新奇環境変化ストレス負荷 6 時間後における 5-HT_{2C} 受容体ならびに c-Fos 発現の免疫組織化学的分析

(A) 室傍核　（B）扁桃体

**; $P < 0.01$ vs. age-matched control (それぞれ N = 5)

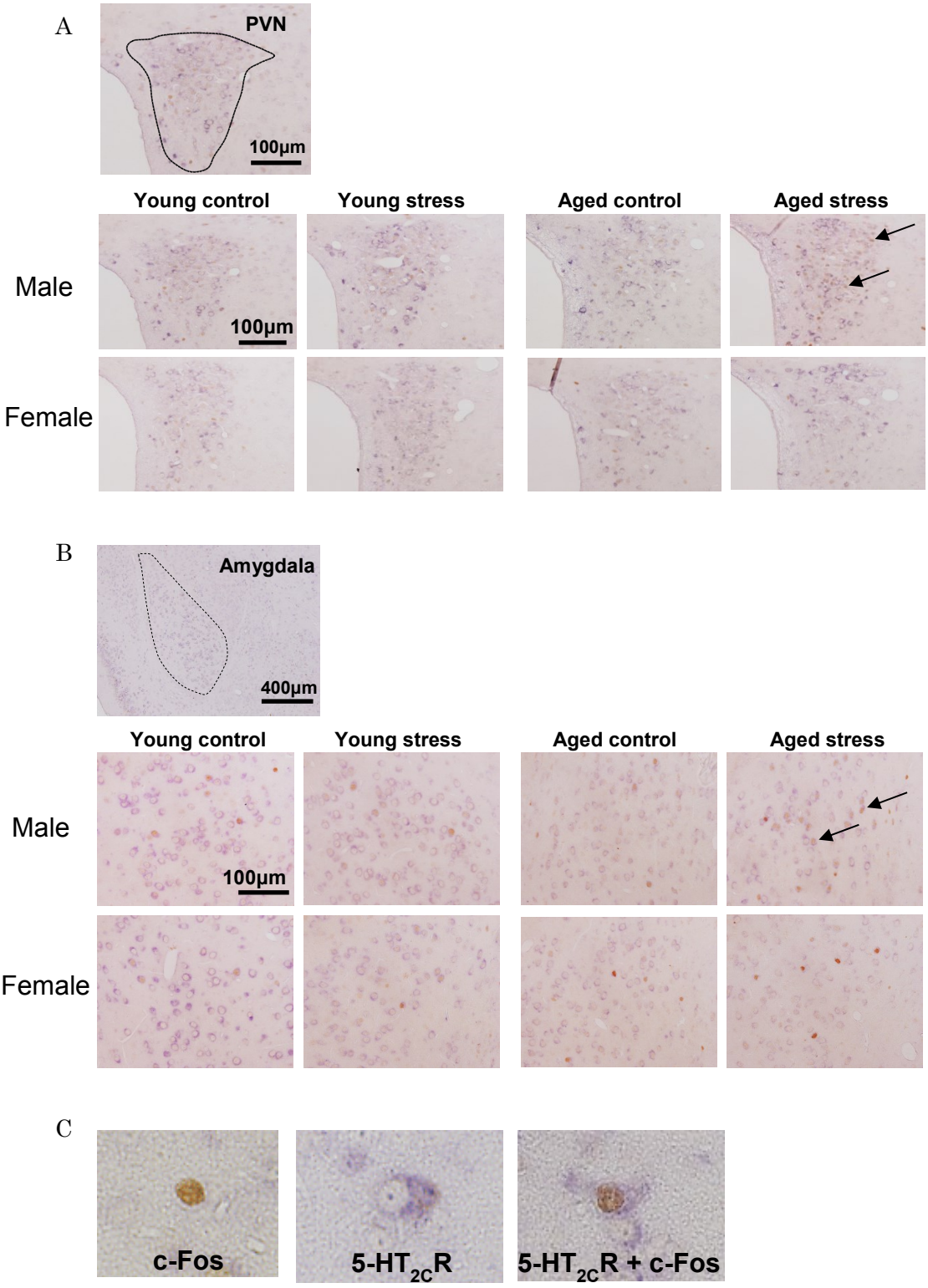


図 18　新奇環境変化ストレス負荷 6 時間後における 5-HT_{2C} 受容体ならびに c-Fos 発現陽性細胞の染色像

（A）室傍核（B）扁桃体（C）典型的な陽性細胞像　↙は共染色細胞を示す。

若齢ならびに加齢雌雄マウスにおける基礎値の血漿エストラジオールレベルについて検討したが、各群で血漿エストラジオールレベルに差は見られず、性差や加齢の影響は見られなかった（図 19）。図表には示していないが、血漿テストステロンレベルも同様に各群間の有意差は認められなかった。

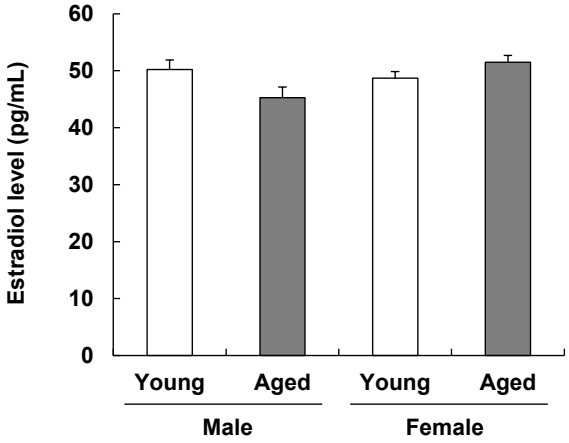


図 19　若齢ならびに加齢雌雄マウスにおける血漿エストラジオールレベル

（それぞれ N = 5）

次に、摂食の制御に関連する視床下部におけるエストロゲン受容体α、エストロゲン受容体β、ならびにエストラジオール産生酵素であるアロマターゼの遺伝子発現を測定した。Table 1 に示すように、視床下部の遺伝子発現は、若齢と比較し、加齢雄マウスでエストロゲン受容体αならびにアロマターゼ遺伝子発現が有意に増加した。これに対して、雌マウスでは、加齢によるこれら遺伝子発現への影響は見られなかった。

Table 1 若齢ならびに加齢雌雄マウスにおける視床下部遺伝子発現

Male	Young	Aged
エストロゲン受容体 α	1.00 ± 0.07	1.43 ± 0.12 ##
エストロゲン受容体 β	1.00 ± 0.08	1.23 ± 0.08
アロマターゼ	1.00 ± 0.22	1.91 ± 0.31 #
Female	**Young**	**Aged**
エストロゲン受容体 α	1.00 ± 0.06	0.81 ± 0.13
エストロゲン受容体 β	1.00 ± 0.05	1.07 ± 0.18
アロマターゼ	1.00 ± 0.12	0.87 ± 0.18

#, ##; $p < 0.05$, 0.01 vs. young mice (N = 4-8)

そこで、脳内のエストロゲンが新奇環境変化ストレスにおける摂食量低下に関与するか否かを明確にする目的で、アロマターゼ阻害薬の効果について検討した。図 20 に示すように、新奇環境変化ストレス負荷 6 時間後における加齢雄マウスの摂食低下はアロマターゼ阻害薬であるレトロゾール（2.5 mg/kg）投与によって有意に抑制された。一方、加齢雌マウスではストレスによる摂食量の低下自体が起きなかった。このことから、加齢雄マウスの摂食低下にはテストステロンからエストラジオールへの産生系が関与する可能性が示唆された。

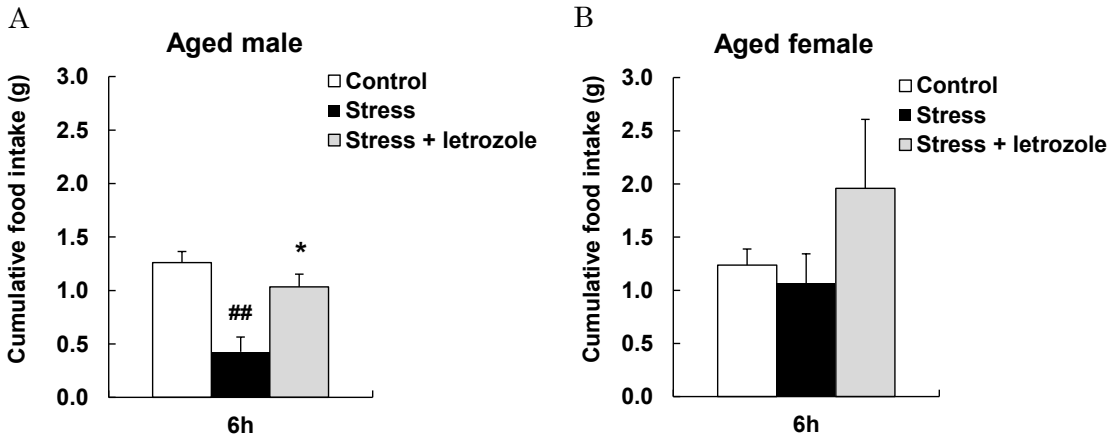


図 20　加齢マウスにおける新奇環境変化ストレス負荷 6 時間後における摂食量低下に対するアロマターゼ阻害薬レトロゾールの効果

（A）加齢雄マウス　（B）加齢雌マウス

##; $P < 0.01$ vs. control, *; $P < 0.05$ vs. stress (それぞれ N = 5)

図 21 に示すように、加齢雄マウスではエストロゲン受容体α作動薬（PPT）投与によって低用量(0.63 mg/kg)から摂食量の有意な低下が観察された。しかしながら、加齢雌マウスでは PPT による摂食の低下は観察されなかった。一方、データは示していないが、若齢マウスにおいても PPT による摂食低下は観察されなかった。

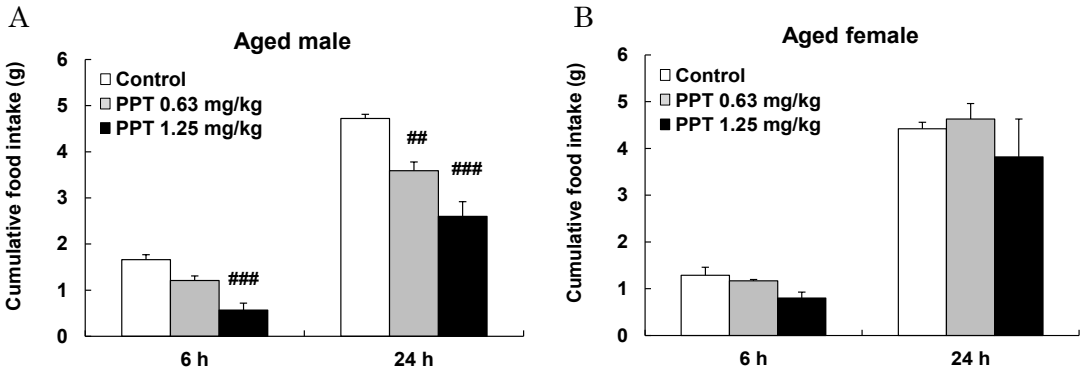


図 21　加齢マウスにおけるエストロゲン受容体α作動薬 PPT 投与による摂食量低下に対する効果

（A）加齢雄マウス　（B）加齢雌マウス

##, ###; $P < 0.01$, 0.001 vs. control (N = 4-5)

最後に、エストロゲン受容体α作動薬（PPT，1.25 mg/kg）投与によって低下する摂食量に対し、5-HT_{2C}受容体拮抗薬（SB242084，6 mg/kg）の効果を検討した。図 22 に示すように、加齢雄マウスでは SB242084 を併用することで PPT 処置による摂食量の低下が有意に改善された。加齢雌マウスでは、6 時間の摂食量の有意な低下を確認できず、SB242084 の効果も明確には観察されなかった。

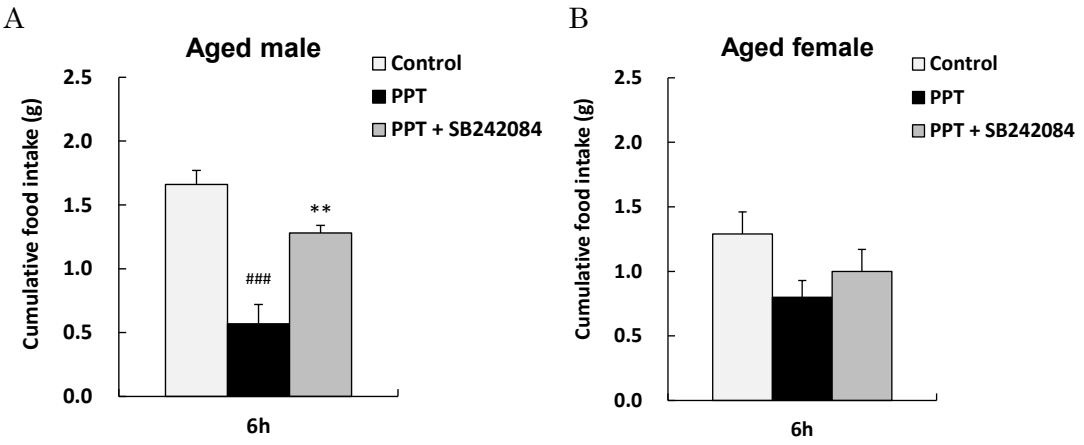


図 22　加齢マウスにおけるエストロゲン受容体α作動薬 PPT 処置による摂食量低下に対する 5-HT_{2C}受容体拮抗薬の効果

（A）加齢雄マウス　（B）加齢雌マウス

###; $P < 0.001$ vs. control, **; $P < 0.01$ vs. PPT (N = 4-5)

第4節 考察

今回の研究で、若齢マウスへの新奇環境変化ストレス負荷は、一過性の摂食低下を示したのに対して、加齢雄マウスでは、若齢と比較し摂食低下が持続的であることを見出した。また、加齢雄マウスは、ストレスによって 5-HT_{2C} 受容体陽性細胞の活性化ならびに血漿アシルグレリンレベルの低下が明確に観察され、外因性グレリン、5-HT_{2C} 受容体拮抗薬ならびに六君子湯投与はストレスによる摂食低下を抑制し、5-HT_{2C} 受容体拮抗薬、六君子湯に関しては、ストレスによる血漿アシルグレリンの低下も有意に抑制した。加えて、加齢雄マウスでは、アロマターゼ阻害薬もストレスによる摂食低下に効果を示し、エストロゲン受容体α刺激による摂食低下は 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬投与により抑制された。これに比べて、２週間の継続的隔離飼育を負荷した若齢マウスでは、摂食量が増加し、末梢グレリンレベルもしくは脳内グレリン前駆体遺伝子が増加したが、加齢マウスではそれらが見られず、新奇環境変化ストレスほどの明確な性差の影響は確認できなかった。しかしながらどちらのモデルも加齢や性差におけるアシルグレリン産生や分泌の差異を示す結果が得られた。

加齢雄マウスでは、新奇環境変化ストレス負荷により、ストレス負荷 24 時間後まで持続する顕著な摂食量の低下が観察されたと同時に、血漿コルチコステロンレベルの有意な増加が認められた。一方、加齢雌マウスでは、ストレス負荷直後に有意な摂食量の低下が確認されたが、その後、若齢マウスと同様に対照群と同程度に回復し、ストレスホルモン

レベルも明確に上昇しなかった。これらの結果は、加齢雄マウスがストレスに対して脆弱性を有する可能性を示唆している。

臨床的に女性は男性よりもうつ病患者や神経性食思不振が多いことはよく知られている[35，36]。基礎研究においては、これを支持するデータがある一方、高架式十字迷路を用いた研究では、雄と比較して、雌は抗不安を呈する場合もある[5，49]。また、飼育環境の違いがストレスに対する雌雄の反応に影響するという報告もある[50，51]。今回の若齢マウスに対する新奇環境変化ストレス負荷では、明確な性差は確認できなかった。今回我々は摂食に焦点を当て、不安や抑うつそのものに対する評価は行っていない。摂食を指標にした本研究の結果と臨床における疫学的なデータとの違いは、評価指標、負荷されるストレスの種類、強度、測定タイミングあるいは摂食条件に起因するかもしれない。しかしながら、今回の加齢マウスの摂食の結果においては、高齢者の食欲不振症状は女性よりも男性の方が明確であるという臨床結果[38，39]と一致する性差が示唆された。

また、雌マウスの血漿コルチコステロンレベルは若齢、加齢を問わず、定常時の値が高かった。既報によると、雌マウスのコルチコステロンレベルは雄よりも高値であり[52]、本研究の結果と一致するが、採血によるストレス負荷における雌雄の違いにも注意を払う必要があるかもしれない。

新奇環境変化ストレスに曝された加齢雄マウスの摂食低下メカニズムを明らかにする目的で、ストレス暴露した加齢マウスにおける血漿アシルグレリン濃度を測定した。加齢

雄マウスの血漿アシルグレリンレベルは対照群と比較してストレス負荷後3ならびに 6 時間で有意に低下した。一方、加齢雌マウスでは血漿アシルグレリンの有意な変化は観察されなかった。加齢雄マウスの末梢アシルグレリンの低下を外因性グレリン投与によって補充すると、低下した摂食量は回復した。興味深いことに、加齢マウスに投与したアシルグレリンの投与量では、対照加齢雄マウスの摂食量に影響を与えないことから、ストレスにより血漿グレリンレベルが低下しているため、アシルグレリンに対する反応性が対照群より亢進している可能性がある。

グレリンの分泌は 5-HT_{2C}受容体の活性化によって負に制御されている[7, 10]。新奇環境変化ストレス負荷による加齢雄マウスにおける摂食量の低下ならびに血漿アシルグレリンレベルの低下は、5-HT_{2C}受容体拮抗薬によって有意に抑制された。これらの結果から、ストレスによる 5-HT_{2C} 受容体の活性化が、胃からのアシルグレリン分泌を抑制し、摂食量を低下させた可能性が示唆される。一方、加齢雌マウスにおいては、今回の検討ではそれらの影響は認められなかった。

次に、継続的隔離飼育による摂食量に与える影響について検証した。継続的な隔離飼育では、摂食量に対する明らかな性差の影響は観察されなかった。しかしながら、新奇環境変化ストレスと異なり、若齢マウスではむしろ摂食量が増加した。また、摂食量が増加したにもかかわらず、体重ならびに体重増加率は対照群と差がなかった。ストレス負荷による摂食量の影響は、摂食抑制[18, 20, 29]と摂食亢進[53-56]のどちらも報告されている。

特に、慢性的なストレスに関しては末梢グレリン濃度の増加と摂食行動の亢進が認められる。我々のグループによって報告された結果でも、新奇環境変化ストレス負荷における若齢マウスの摂食低下やストレスホルモン上昇は一過性であった[10]。このことから、24 時間以上の隔離飼育の継続では摂食抑制から摂食亢進へ切り替えるメカニズムが存在する可能性が考えられる。このメカニズムとしては、若齢マウスでは隔離飼育の継続がエネルギー消費を増加させ、その埋め合わせとして摂食量が増加する可能性が考えられた。一方、加齢マウスでは、若齢で見られた摂食増加作用が消失した。また、加齢マウスでは各個体の体重に大きなばらつきがあるため、ストレスによる体重そのものへの影響は認められなかったものの、体重増加率は低下、あるいは低下の傾向であった。すなわち、加齢マウスではエネルギー消費に見合う摂食量の亢進が生じないため、体重増加率の維持や増加に至らない可能性が考えられた。

摂食抑制から増加に転じるメカニズムを探る目的で、血漿アシルグレリンレベル、ならびに脳内のグレリン合成を検討した。今回の検討では、ストレス負荷による摂食量の変化の原因を探る目的で、摂食量や体重増加率の結果が明確になる前の隔離一週間目で実施した。若齢雄マウスの血漿アシルグレリンレベルは、新奇環境変化ストレスとは逆に、グループ飼育マウスと比較して有意に増加した。この結果は既報[53-56]と一致していた。若齢雌マウスでは継続的な隔離飼育により、血漿アシルグレリンレベルは変化しなかったが、脳内のグレリン前駆体遺伝子発現が有意に増加した。このメカニズムについては不明である。脳内グレリンレベルと摂食量の関係は未だ十分に検討されていないが、脳室内にグレ

リンを投与した場合には摂食促進作用が認められている[57]。一つの仮説として、若齢雄マウスでは、主に血漿アシルグレリンの増加を介して隔離飼育による摂食量の増加を引き起こすが、若齢雌マウスではその経路を介していない別の機序、例えば脳内アシルグレリンレベルあるいは分泌を高める等が介在し摂食を亢進させるということが考えられる。また、この仮説は、加齢マウスでは隔離飼育による摂食の増加が生じず、若齢で生じるグレリン分泌あるいは合成促進も生じない結果からも支持される。

今回の実験の性質上、継続的隔離飼育群の対照群として、グループ飼育のマウスを使用していることから、新奇環境変化ストレスに使用した対照群とは異なる点で直接的な比較はできない。しかしながら、これまでの予備検討において、対照群をグループ飼育にした場合の若齢マウスの新奇環境変化ストレスの実験においても、摂食量に関してほぼ同等の結果が得られており、大きな差は生じないと考えられる。ただし、加齢マウスでは未検討のため、さらなる検証実験を行う必要性が残されている。

新奇環境変化ストレス負荷モデルは、継続的隔離飼育負荷モデルよりも加齢ならびに性差の影響が顕著であったため、このモデルに焦点を当て、そのメカニズムを検討した。5-HT_{2C}受容体の活性化が、食欲低下や不安行動を引き起こすことは既に報告されている[43, 58]。若齢の雌雄マウスへの選択的 5-HT_{2C}受容体作動薬、CP-809101 の投与による 5-HT_{2C}受容体の反応性の評価を検討した結果、雌雄同等か、むしろ雌の反応性が高い傾向が示された。ところが、加齢雄マウスへの CP-809101 の投与では低用量である 0.1 mg/kg から顕著

な摂食量の低下を引き起こし、加齢雌マウスには、今回用いた投与量では摂食量の低下は見られなかった。この結果は、雄マウスにおいては、加齢により 5-HT_{2C} 受容体を介した情報伝達の亢進が生じていることを示唆している。さらに、新奇環境変化ストレス誘発性の摂食低下に対する 5-HT_{2C} 受容体拮抗薬投与の検討では、加齢雄マウスでは SB242084 がストレスによる摂食低下を明確に抑制した。しかしながら、加齢雌マウスでは、これらの薬剤の投与は摂食量に影響しなかった。これらのことから、加齢雄マウスにおいて、新奇環境変化ストレスへの暴露が、例えば 5-HT の分泌の亢進、あるいは 5-HT_{2C} 受容体のリガンドとの親和性の増加等を引き起こし、5-HT_{2C} 受容体作動薬を投与した場合と同じように、著明な摂食低下を引き起こしているという仮説が考えられる。逆に雌では、雄のような加齢による 5-HT あるいは 5-HT_{2C} 受容体の機能亢進が生じないのかもしれない。

脳内の 5-HT は、縫線核からストレスに関連する脳領域に投射された神経末端から放出される。摂食制御の中心である視床下部[59]あるいは情動を司る扁桃体[60]における 5-HT の基礎値は加齢に伴って低下していることが報告されている。その一方で、ストレス負荷した加齢マウスでは、脳内の 5-HT の代謝回転が抑制され、結果として 5-HT 濃度の増加がおこる[60]。今回の実験で、我々は脳内の 5-HT の濃度を測定していないため、仮説の段階ではあるが、加齢雄マウスでは、新奇環境変化に曝されることで、脳内の 5-HT 濃度が基礎値と比較して相対的に高くなり、5-HT_{2C} 受容体作動薬投与と同じような現象、つまり、5-HT_{2C} 受容体機能亢進を起こしていることが考えられる。

今回、加齢雄マウスにおいて、ストレス負荷時に 5-HT_{2C} 受容体機能亢進が生じている

という仮説を検証するために、室傍核、扁桃体および弓状核における 5-HT_{2C} 受容体タンパク発現と、神経活動の指標である c-Fos タンパクの共染色を実施した。ストレスを負荷しない対照群の加齢雄マウスの室傍核ならびに扁桃体における 5-HT_{2C} 受容体ならびに c-Fos の共陽性細胞数は若齢マウスと差がなかった。このことより、加齢そのものが、5-HT_{2C} 受容体タンパク合成の増加や活性化を起こしているわけではないと考えられた。一方、加齢雄マウスにストレスを負荷した際の室傍核ならびに扁桃体の 5-HT_{2C} 受容体ならびに c-Fos 共陽性細胞数は顕著に増加していた。加齢雄マウスにおける新奇環境変化への暴露は、対照加齢マウスと比較して室傍核における 5-HT_{2C} 受容体遺伝子発現を増加させる[29]ことからも、加齢雄マウスでは、ストレス負荷が 5-HT_{2C} 受容体タンパク合成を亢進させ、同時に 5-HT_{2C} 受容体発現神経細胞の活性化を引き起こしていることを示唆している。一方、ストレスを負荷した加齢雌マウスにおける室傍核の 5-HT_{2C} 受容体と c-Fos の共陽性細胞数には変化がなく、摂食量の変化と一致した結果が得られた。一方、扁桃体においては、5-HT_{2C} 受容体と c-Fos の共陽性細胞数は軽度であるが有意に増加していた。扁桃体は外部からの情報に対して快・不快を判断する要の部位であることから、加齢雌マウスにおいても、情動における不快な反応はストレスによって影響を受けているかもしれない。一方、データには示していないが、ストレス負荷 6 時間後の弓状核における 5-HT_{2C} 受容体および c-Fos 発現は痕跡程度であり、弓状核における 5-HT_{2C} 受容体活性化は、関与が低いことが示唆された。

ストレス反応に対する性差に関するいくつかの研究から、性ホルモンとストレス反応ならびに摂食行動の低下との間に、相互作用がある可能性が示されている。特に、エスト

ロゲンは HPA 軸に影響を与え[61, 62]、ストレスはエストロゲン分泌に影響する[63, 64]ことが報告されている。また、エストロゲン自身も摂食を制御する[65]。加えて、エストラジオールは 5-HT_{2C} 受容体タンパク増加を引き起こす[66]ことも報告されており、エストラジオールと 5-HT_{2C} 受容体の関連性も示されている。

視床下部のエストロゲン受容体αの刺激は、HPA 軸の活性化を亢進[61]し、エストロゲン受容体βの刺激はそれを抑制する[67]ことが知られている。最近、脳内のエストロゲン受容体が末梢のエストラジオールレベルと独立してストレス反応や摂食行動を制御していることが明らかになってきた。拘束ストレスモデルを用いた研究では、ストレスにより室傍核のエストラジオールの増加がみられるが、末梢の濃度は変化しないことが報告されている[64]。また、今回の実験では、血漿エストラジオールレベルにおいては、若齢・加齢共に雌雄差は認められなかったため、脳内のエストラジオールに焦点を当てて検討した。そこで、若齢ならびに加齢マウスの視床下部におけるアロマターゼ、エストロゲン受容体α、ならびにエストロゲン受容体β遺伝子発現について測定した。その結果、アロマターゼならびにエストロゲン受容体αの遺伝子発現は若齢と比較し、加齢雄マウスで有意に増加し、雌マウスでは変化が見られなかった。このことは、雄マウスでは加齢によってアロマターゼやエストロゲン受容体αの合成が亢進し、脳内のエストロゲン濃度が高まっている可能性を暗示するものであった。

実際に、加齢雄マウスへの新奇環境変化ストレスによる摂食低下はアロマターゼ阻害薬であるレトロゾールによって有意に抑制された。レトロゾールは経口投与であり、末梢

のアロマターゼにも作用する。また、今回の実験でレトロゾール投与後のエストラジオールレベルを測定していないので、レトロゾールの作用を中枢に限定できなかった。しかしながら、若齢雄マウスと加齢雄マウスにおいて末梢のエストラジオールに差がなかったことから、視床下部で増加したアロマターゼにより産生されたエストラジオールの阻害が今回の摂食制御に関与している可能性が高いことを支持する結果であった。

また、エストロゲン受容体α作動薬 PPT の 1.25 mg/kg 投与は若齢マウスでは摂食量に影響を与えないが、加齢雄マウスのみ 0.63 mg/kg から有意な摂食量の低下が確認できた。加えて、加齢雌マウスでは、若齢と同様に摂食量に影響はなかった。これらの結果は、視床下部のアロマターゼならびにエストロゲン受容体α遺伝子発現量解析の結果と相関する。また、加齢雄マウスの PPT の 1.25 mg/kg 投与による摂食量の低下は、5-HT_{2C} 受容体拮抗薬である SB242084 投与で抑制された。また、エストロゲン受容体β作動薬である DPN の投与は加齢雄マウスの摂食量低下に何ら影響を示さなかった(Aged male：control; 1.26 ± 0.11 g, stress; 0.43 ± 0.14 g, $P < 0.01$ vs. control, stress + DPN; 0.57 ± 0.20 g, n.s. vs. stress)。これらの結果から、加齢雄マウスではアロマターゼの合成亢進により、テストステロンからエストラジオールへの変換が亢進し、同時に発現亢進したエストロゲン受容体αへのエストラジオールの結合が摂食量を低下させると考えられた。さらに、その下流には 5-HT_{2C} 受容体の活性化、さらには末梢グレリンの分泌低下が介在する可能性が推察された。

今回の実験では、性周期を測定しなかった。C57B6 の性周期は若齢マウスで 4 日間であ

り、6 週齢のマウスの性周期は一定と考えられるが、加齢マウスでは一か月に一度以下の頻度である[68]。ヒトでは加齢に伴い性ホルモンの低下が観察されるが、加齢マウスにおける末梢エストラジオールレベルに差はなかった。この点はヒトとげっ歯類の大きな種差であるかもしれないし、性周期を合わせていないことが原因である可能性も考えられた。性周期を一定にした更なる検討が必要かもしれない。

結論

加齢雄マウスでは、雌マウスと比較して新奇環境変化ストレスの暴露により持続的な摂食低下が生じた。また、継続的な隔離飼育では、新奇環境変化ストレスと異なり、摂食に関する性差が減弱した。加齢雄マウスの顕著な摂食低下の機序として、室傍核や扁桃体における 5-HT_{2C} 受容体陽性細胞の過剰な活性化によって引き起こされる末梢グレリン濃度の低下が関与することが暗示された。5-HT_{2C} 受容体陽性細胞の反応性の亢進には脳内におけるエストロゲン濃度の増加とエストロゲン受容体αの合成亢進の関与があると考えられた（図 23）。

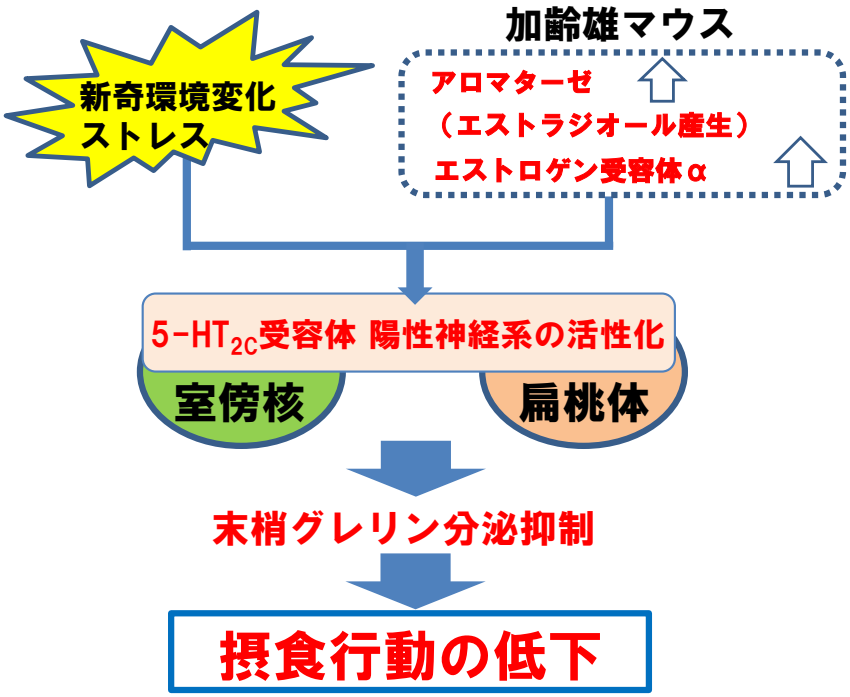


図 23　加齢雄マウスにおける新奇環境変化ストレス負荷による摂食行動低下の仮説

総括

高齢化社会を迎え、ストレスに見舞われる高齢者も増えている。特に、高齢者は家族との死別や社会的なネットワークからの離脱等の環境変化が多く、ストレスを感じる機会も多い。ストレスにおける生理反応への影響は様々であるが高齢者における摂食意欲の低下は、栄養障害を誘発し、生命維持に影響することから非常に重要である。加えて、精神・神経系疾患には性差があることが知られており、女性の罹患率が高いと言われている[35, 36]。しかしながら、男性の晩年のうつ病は死亡の危険因子であると報告され[69, 70]、自殺による死亡率は男性が圧倒的に多く、特に高齢者ではそれが顕著であるのも現状である[71]。また、高齢者の食欲不振の症状は女性よりも男性の方が明確であるという報告もある[38, 39]。これらのことは、高齢者のストレス感受性やストレスを背景とする食欲低下が、若年層と異なる性質を持つ可能性を示唆している。

これまで、我々のグループは、若齢マウスの新奇環境変化ストレスによる摂食低下に 5-HT_{1B} ならびに 5-HT_{2C} 受容体の活性化が関与することを明らかにしてきた。一方、ストレスによる摂食低下には食欲亢進ホルモン、グレリンの動態異常や反応性の低下が関与することも報告されている。しかしながら、同じ 5-HT_2 受容体に属する 5-HT_{2B} 受容体とストレス性食欲低下との関与については全く検討されてこなかった。今回の研究では、はじめに若齢マウスを用いて新奇環境変化ストレス負荷による摂食低下と 5-HT_{2B} 受容体の関連性、ならびにグレリン動態異常が本モデルでも見られるか検討した。末梢のグレリン濃度は絶食

時に上昇し、末梢の栄養状態を脳にシグナルとして伝える。しかしながら新奇環境変化ストレス負荷マウスでは飢餓状態でのグレリン上昇シグナルが遮断されていることが示唆された。また、5-HT_{2B}受容体の活性化を受容体拮抗薬の投与により遮断することで、摂食量が回復した。このことから、新奇環境変化ストレスでもグレリンの分泌低下と5-HT_{2B}受容体活性化が摂食低下を仲介している可能性が暗示された。本研究成果が加齢動物のストレス性摂食低下にも応用可能であるか否かを明確にする研究が求められる。

加齢雄マウスに新奇環境変化ストレスを負荷した場合、若齢マウスと比較して明らかにストレス応答と摂食の低下が顕著であった。加齢雌マウスでは、若齢マウスと大きな差はなかった。一方、継続的な隔離飼育は、若齢マウスに摂食量の増加を引き起こし、加齢マウスでは雌雄ともにこの摂食亢進が消失し、体重の増加率が低下した。このように新奇環境変化と隔離飼育の継続は異なった表現型を発現することが明らかとなったが、どちらもグレリン動態異常が仲介する可能性が示唆された。新奇環境変化ストレスでは、末梢グレリンの低下が、加齢雄マウスの摂食低下を仲介し、隔離飼育では、グレリンの増加による摂食亢進の欠如を引き起こすかもしれない。ただし、隔離飼育による今回の仮説を裏付けるメカニズムの検証は今後の検討に期待したい。

新奇環境変化ストレスが、加齢雄マウスのストレスや摂食量に顕著に影響を与えることが暗示されたため、次のステップでは、加齢雄マウスの摂食低下のメカニズムを性ホルモン、特に食欲の中枢である視床下部のエストロゲンに焦点を当てて検討を行った。加齢

雄マウスの視床下部におけるアロマターゼ、エストロゲン受容体α遺伝子発現は、若齢マウスと比較して有意に増加した。これに対して加齢雌マウスでは変化が見られなかった。さらに、加齢雄マウスへのアロマターゼ阻害薬の投与はストレスで惹起された摂食低下を回復させた。加齢雄マウスへのエストロゲン受容体α作動薬の投与は、若齢や加齢雌マウスの場合と比較して明らかに摂食を抑制した。これらの結果から、雄マウスは加齢に伴って、視床下部のエストラジオール産生が高まり、エストロゲン受容体αの発現亢進との相乗効果により、エストロゲン受容体αの活性化が生じやすい状態であるという仮説が考えられた。つまり、エストラジオール産生が亢進しており、ストレス負荷によってエストロゲン受容体αを介したシグナルが増強され摂食量の低下を導くメカニズムが存在する可能性が推察できた。また、エストラジオールは5-HT_{2C}受容体の合成を促進することが報告されており、5-HT_{2C}受容体拮抗薬の投与がエストロゲン受容体α作動薬によって惹起した摂食低下を抑制することから、エストロゲン受容体α活性化が5-HT_{2C}受容体の活性化を引き起こし、さらには食欲亢進ペプチドであるグレリンの濃度の低下を導く可能性が推察された。

本研究により、5-HT_{2C}受容体拮抗薬やグレリン補充は、高齢者の心理的ストレスによる食欲低下の新しい治療戦略のひとつとなりうる可能性が示唆された。しかしながら、今回の研究成果は高齢者のストレス性食欲不振に関する性差のメカニズム解明の第一歩であり、作用部位の詳細な検証や性ホルモンとアシルグレリンの相互作用についてはさらなる検証が求められる。

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) Yamada C et al. Rikkunshito, a Japanese kampo medicine, ameliorates decreased feeding behavior via ghrelin and serotonin 2B receptor signaling in a novelty stress murine model. *Biomed Res Int.* 2013; 792940.

(2) Yamada C et al. Serotonin 2C receptor contributes to gender differences in stress-induced hypophagia in aged mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 55: 81-93.

(3) Yamada C et al. Influence of aging and gender differences on feeding behavior and ghrelin-related factors during social isolation in mice. *PLoS One* 2015; 10(10): e0140094.

参考文献

1. Rowe, J.W. and R.L. Kahn, *Human aging: usual and successful.* Science, 1987. **237**(4811): p. 143-9.

2. Seeman, T.E. and R.J. Robbins, *Aging and hypothalamic-pituitary-adrenal response to challenge in humans.* Endocr Rev, 1994. **15**(2): p. 233-60.

3. Handa, R.J., S.K. Mani, and R.M. Uht, *Estrogen receptors and the regulation of neural stress responses.* Neuroendocrinology, 2012. **96**(2): p. 111-8.

4. Handa, R.J. and M.J. Weiser, *Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis.* Front Neuroendocrinol, 2014. **35**(2): p. 197-220.

5. Steenbergen, H.L., et al., *Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior.* Physiol Behav, 1990. **48**(4): p. 571-6.

6. Kojima, M., et al., *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.* Nature, 1999. **402**(6762): p. 656-60.

7. Takeda, H., et al., *Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT2 receptor antagonism.* Gastroenterology, 2008. **134**(7): p. 2004-13.

8. Fujitsuka, N., et al., *Selective serotonin reuptake inhibitors modify physiological gastrointestinal motor activities via 5-HT2c receptor and acyl ghrelin.* Biol Psychiatry, 2009. **65**(9): p. 748-59.

9. Fujitsuka, N., et al., *Potentiation of ghrelin signaling attenuates cancer anorexia-cachexia and prolongs survival.* Transl Psychiatry, 2011. **1**: p. e23.

10. Saegusa, Y., et al., *Decreased plasma ghrelin contributes to anorexia following novelty stress.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(4): p. E685-96.

11. Ohno, T., et al., *Rikkunshito, a traditional Japanese medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in humans.* Clin Exp Gastroenterol, 2011. **4**: p. 291-6.

12. Hiura, Y., et al., *Fall in plasma ghrelin concentrations after cisplatin-based chemotherapy in*

esophageal cancer patients. Int J Clin Oncol, 2012. **17**(4): p. 316-23.

13. Luanaigh, C.O. and B.A. Lawlor, *Loneliness and the health of older people.* Int J Geriatr Psychiatry, 2008. **23**(12): p. 1213-21.

14. Steptoe, A., et al., *Loneliness and neuroendocrine, cardiovascular, and inflammatory stress responses in middle-aged men and women.* Psychoneuroendocrinology, 2004. **29**(5): p. 593-611.

15. Bhatia, V. and R.K. Tandon, *Stress and the gastrointestinal tract.* J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(3): p. 332-9.

16. Lo Sauro, C., et al., *Stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and eating disorders.* Neuropsychobiology, 2008. **57**(3): p. 95-115.

17. Dulawa, S.C. and R. Hen, *Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test.* Neurosci Biobehav Rev, 2005. **29**(4-5): p. 771-83.

18. Yakabi, K., et al., *Urocortin 1 reduces food intake and ghrelin secretion via CRF(2) receptors.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(1): p. E72-82.

19. Nahata, M., et al., *Administration of exogenous acylated ghrelin or rikkunshito, an endogenous ghrelin enhancer, improves the decrease in postprandial gastric motility in an acute restraint stress mouse model.* Neurogastroenterol Motil, 2014. **26**(6): p. 821-31.

20. Yakabi, K., et al., *Peripheral alpha2-beta1 adrenergic interactions mediate the ghrelin response to brain urocortin 1 in rats.* Psychoneuroendocrinology, 2014. **50**: p. 300-10.

21. De Vry, J. and R. Schreiber, *Effects of selected serotonin 5-HT(1) and 5-HT(2) receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action.* Neurosci Biobehav Rev, 2000. **24**(3): p. 341-53.

22. Hattori, T., K. Yakabi, and H. Takeda, *Cisplatin-induced anorexia and ghrelin.* Vitam Horm, 2013. **92**: p. 301-17.

23. Matsumura, T., et al., *The traditional Japanese medicine Rikkunshito increases the plasma level of ghrelin in humans and mice.* J Gastroenterol, 2010. **45**(3): p. 300-7.

24. Yakabi, K., et al., *Reduced ghrelin secretion in the hypothalamus of rats due to*

cisplatin-induced anorexia. Endocrinology, 2010. **151**(8): p. 3773-82.

25. Sadakane, C., et al., *10-Gingerol, a component of rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation.* Biochem Biophys Res Commun, 2011. **412**(3): p. 506-11.

26. Yanai, M., et al., *Intragastric administration of rikkunshito stimulates upper gastrointestinal motility and gastric emptying in conscious dogs.* J Gastroenterol, 2013. **48**(5): p. 611-9.

27. Merali, Z., et al., *Does amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) mediate anxiety-like behaviors? Dissociation of anxiogenic effects and CRH release.* Eur J Neurosci, 2004. **20**(1): p. 229-39.

28. Bechtholt, A.J., T.E. Hill, and I. Lucki, *Anxiolytic effect of serotonin depletion in the novelty-induced hypophagia test.* Psychopharmacology (Berl), 2007. **190**(4): p. 531-40.

29. Nahata, M., et al., *Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-induced hypophagia in aged mice.* Psychoneuroendocrinology, 2013. **38**(10): p. 2051-64.

30. Tschop, M., D.L. Smiley, and M.L. Heiman, *Ghrelin induces adiposity in rodents.* Nature, 2000. **407**(6806): p. 908-13.

31. Diefenbach, G.J. and J. Goethe, *Clinical interventions for late-life anxious depression.* Clin Interv Aging, 2006. **1**(1): p. 41-50.

32. Donini, L.M., C. Savina, and C. Cannella, *Eating habits and appetite control in the elderly: the anorexia of aging.* Int Psychogeriatr, 2003. **15**(1): p. 73-87.

33. Hughes, G., K.M. Bennett, and M.M. Hetherington, *Old and alone: barriers to healthy eating in older men living on their own.* Appetite, 2004. **43**(3): p. 269-76.

34. Lenze, E.J., et al., *Comorbidity of depression and anxiety disorders in later life.* Depress Anxiety, 2001. **14**(2): p. 86-93.

35. Kornstein, S.G., *Gender differences in depression: implications for treatment.* J Clin Psychiatry, 1997. **58 Suppl 15**: p. 12-8.

36. Ehlert, U., J. Gaab, and M. Heinrichs, *Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis.* Biol Psychol, 2001. **57**(1-3): p. 141-52.

37. Iwasaki-Sekino, A., et al., *Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats.* Psychoneuroendocrinology, 2009. **34**(2): p. 226-37.

38. Morley, J.E., *Nutrition and the older female: a review.* J Am Coll Nutr, 1993. **12**(4): p. 337-43.

39. Morley, J.E., *Nutrition and the aging male.* Clin Geriatr Med, 2010. **26**(2): p. 287-99.

40. Hotta, M., et al., *Corticotropin-releasing factor receptor type 1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats.* Brain Res, 1999. **823**(1-2): p. 221-5.

41. Zorrilla, E.P., Y. Tache, and G.F. Koob, *Nibbling at CRF receptor control of feeding and gastrocolonic motility.* Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(8): p. 421-7.

42. Heisler, L.K., et al., *Serotonin 5-HT(2C) receptors regulate anxiety-like behavior.* Genes Brain Behav, 2007. **6**(5): p. 491-6.

43. Gatch, M.B., *Discriminative stimulus effects of m-chlorophenylpiperazine as a model of the role of serotonin receptors in anxiety.* Life Sci, 2003. **73**(11): p. 1347-67.

44. Asarian, L. and N. Geary, *Sex differences in the physiology of eating.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2013. **305**(11): p. R1215-67.

45. Hayashi, A., et al., *Agonist diversity in 5-HT(2C) receptor-mediated weight control in rats.* Psychopharmacology (Berl), 2005. **178**(2-3): p. 241-9.

46. Meng, F.T., et al., *Inhibition of oestrogen biosynthesis induces mild anxiety in C57BL/6J ovariectomized female mice.* Neurosci Bull, 2011. **27**(4): p. 241-50.

47. Shin, J.A., et al., *Activation of estrogen receptor beta reduces blood-brain barrier breakdown following ischemic injury.* Neuroscience, 2013. **235**: p. 165-73.

48. Santollo, J., et al., *Middle-aged female rats retain sensitivity to the anorexigenic effect of exogenous estradiol.* Behav Brain Res, 2012. **232**(1): p. 159-64.

49. Johnston, A.L. and S.E. File, *Sex differences in animal tests of anxiety.* Physiol Behav, 1991. **49**(2): p. 245-50.

50. Brown, K.J. and N.E. Grunberg, *Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females.* Physiol Behav, 1995. **58**(6): p. 1085-9.

51. Westenbroek, C., J.A. Den Boer, and G.J. Ter Horst, *Gender-specific effects of social housing on chronic stress-induced limbic Fos expression.* Neuroscience, 2003. **121**(1): p. 189-99.

52. Goel, N. and T.L. Bale, *Sex differences in the serotonergic influence on the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis.* Endocrinology, 2010. **151**(4): p. 1784-94.

53. Trainor, B.C., et al., *Sex differences in social interaction behavior following social defeat stress in the monogamous California mouse (Peromyscus californicus).* PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17405.

54. Ochi, M., et al., *Effect of chronic stress on gastric emptying and plasma ghrelin levels in rats.* Life Sci, 2008. **82**(15-16): p. 862-8.

55. Kumar, J., et al., *Differential effects of chronic social stress and fluoxetine on meal patterns in mice.* Appetite, 2013. **64**: p. 81-8.

56. Lutter, M., et al., *The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress.* Nat Neurosci, 2008. **11**(7): p. 752-3.

57. Asakawa, A., et al., *Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin.* Gastroenterology, 2001. **120**(2): p. 337-45.

58. Dryden, S., et al., *Differential effects of the 5-HT 1B/2C receptor agonist mCPP and the 5-HT1A agonist flesinoxan on hypothalamic neuropeptide Y in the rat: evidence that NPY may mediate serotonin's effects on food intake.* Peptides, 1996. **17**(6): p. 943-9.

59. De la Fuente, M., et al., *Characterization of monoaminergic systems in brain regions of prematurely ageing mice.* Neurochem Int, 2003. **43**(2): p. 165-72.

60. Miura, H., H. Qiao, and T. Ohta, *Influence of aging and social isolation on changes in brain monoamine turnover and biosynthesis of rats elicited by novelty stress.* Synapse, 2002. **46**(2): p. 116-24.

61. Lund, T.D., L.R. Hinds, and R.J. Handa, *The androgen 5alpha-dihydrotestosterone and its metabolite 5alpha-androstan-3beta, 17beta-diol inhibit the hypothalamo-pituitary-adrenal response to stress by acting through estrogen receptor beta-expressing neurons in the*

hypothalamus. J Neurosci, 2006. **26**(5): p. 1448-56.

62. Lunga, P. and J. Herbert, *17Beta-oestradiol modulates glucocorticoid, neural and behavioural adaptations to repeated restraint stress in female rats.* J Neuroendocrinol, 2004. **16**(9): p. 776-85.

63. Galea, L.A., et al., *Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress.* Neuroscience, 1997. **81**(3): p. 689-97.

64. Liu, J., et al., *Acute restraint stress increases intrahypothalamic oestradiol concentrations in conjunction with increased hypothalamic oestrogen receptor beta and aromatase mRNA expression in female rats.* J Neuroendocrinol, 2011. **23**(5): p. 435-43.

65. Blaustein, J.D. and G.N. Wade, *Ovarian influences on the meal patterns of female rats.* Physiol Behav, 1976. **17**(2): p. 201-8.

66. Henderson, J.A. and C.L. Bethea, *Differential effects of ovarian steroids and raloxifene on serotonin 1A and 2C receptor protein expression in macaques.* Endocrine, 2008. **33**(3): p. 285-93.

67. Oyola, M.G., et al., *Anxiolytic effects and neuroanatomical targets of estrogen receptor-beta (ERbeta) activation by a selective ERbeta agonist in female mice.* Endocrinology, 2012. **153**(2): p. 837-46.

68. Nelson, J.F., et al., *A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology.* Biol Reprod, 1982. **27**(2): p. 327-39.

69. Diniz, B.S., et al., *The effect of gender, age, and symptom severity in late-life depression on the risk of all-cause mortality: the Bambui Cohort Study of Aging.* Depress Anxiety, 2014. **31**(9): p. 787-95.

70. Dombrovski, A.Y., et al., *Sex differences in correlates of suicide attempt lethality in late life.* Am J Geriatr Psychiatry, 2008. **16**(11): p. 905-13.

71. 厚生労働省, *自殺死亡統計の概要 3. (1)性年齢別階級別自殺死亡率（人口 10 万対）の年次比較*, 2015.

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、薬理学研究室 講師　天野大樹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　内科学講座　消化器内科学分野 坂本直哉教授、講師 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 ツムラ研究所所長 加瀬義夫博士、生体機能研究部部長 服部智久博士、消化器グループ　グループ長　藤塚直樹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 飯塚生一博士、定金千春博士、三枝弥生博士、名畑美和博士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消化器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。