

原著

24時間絶食下，非絶食下ラットにおけるグレリン末梢投与による 摂餌量増加と食欲関連中枢神経活性化の相違について

和田 友則^{1,2)*}，堀 裕太郎¹⁾，山口 菜緒美^{1,3)}，細見 英里子¹⁾，勝田 奈穂子¹⁾，
魯 昭輝¹⁾，前沢 皓亮¹⁾，高山 清茂¹⁾，名越 澄子¹⁾，屋嘉比 康治^{1,3)}

- 1) 埼玉医科大学総合医療センター 消化器・肝臓内科
- 2) 公益社団法人東京都教職員互助会 三楽病院 消化器内科
- 3) 埼玉医科大学かわごえクリニック 消化器内科

【背景】グレリンは食欲増加作用のある唯一の消化管ホルモンである。グレリンは生理的な役割として食行動開始を誘導することが推定されているが、摂食量を増加させることも明らかにされており、食欲不振への応用が検討されている。今回、グレリン刺激による脳内食欲調節ネットワークの解明とその作用への栄養摂取状態からの影響を明らかにするために、脳神経活性化の指標である c-Fos 発現を指標として 24 時間絶食と非絶食ラットにおいて検討した。

【方法】これらの 2 群のラットに対してグレリン腹腔内投与を行い摂餌量に対する用量依存性作用の違いについて検討した。さらに、脳内食欲調節ネットワークを構成する視床下部および報酬獲得系の神経核への影響について、神経細胞活性化の指標となる c-Fos 蛋白の発現を抗 c-Fos 抗体による免疫化学染色法にて同定し検討した。また両群に対して 24 時間絶食直後に採血してグルコース、インスリンおよびレプチンの血中濃度についても検討した。

【結果】グレリンをラット体重当たり 10, 30, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔内投与して摂餌量の用量依存性効果を検討したが、両群において 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ にて最大効果を認めた。両群間においてグレリン投与の食欲増加作用を比較すると、絶食ラットにおいてより大きい摂餌量増加を認めた。また脳においては、グレリン 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与は視床下部脳弓核 (arcuate nucleus: ARC) と側坐核 (Nucleus accumbens: NAc) においては両群で c-Fos 発現の増加を認めたが、視床下部外側野 (lateral hypothalamus: LH) と腹側被蓋野 (ventral tegmental area: VTA) に対しては 24 時間絶食群においてのみ有意な c-Fos 発現の有意な増加を認めた。さらに両群においてグルコース、インスリン、レプチンの血中濃度を測定したが、3 者とも非絶食群において有意な高値を認めた。

【結論】末梢投与によるグレリンの食欲増加作用は、非絶食群に比較して絶食群において増大している。その機序については、グレリン末梢投与に対する脳内食欲調節ネットワーク中の視床下部外側野 LH と報酬獲得系の腹側被蓋野 VTA の反応性の相違が関与していることが示唆された。

J Saitama Medical University 2024; 50(2): 45-55

(Received August 16, 2022/Accepted January 23, 2024)

Keywords: food intake, ghrelin, fasted, fed, c-Fos, brain

緒言

1999 年ラットの胃から発見されたグレリン¹⁾は、食欲を亢進させる唯一の消化管ホルモンである。その作用は食欲を亢進し摂食量を増加させることが認められているが、生理的役割としては食行動を誘発することが推測されている²⁾。

これまでの先行研究では、その作用機序について、胃から分泌されたグレリンはまず求心性迷走神経上の growth hormone secretagogue receptor-1 (GHSR-1: 成長ホルモン刺激因子受容体-1) に作用して³⁾、脳内食欲調節ネットワーク、特に視床下部脳弓核 (arcuate nucleus: ARC) に作用することが明らかにされてきた³⁾。一方、末梢に分泌された

* 著者連絡先: 公益社団法人東京都教職員互助会 三楽病院 〒101-8326 東京都千代田区神田駿河台 2-5 Tel: 代表 03-3292-3981 03-3292-3989 [令和 4 年 8 月 16 日受付/令和 6 年 1 月 23 日受理]

○ 著者全員は本論文の研究内容について他者との利害関係は有しません。

グレリンは血液脳関門を通過する⁴⁾ ことによって求心性迷走神経を介さず直接 ARC などの食欲中枢に作用することも示唆されている。多くの脳神経にグレリンに対する受容体 GHSR-1 が存在すること⁵⁾、特に食欲調節ネットワークを形成している視床下部の神経核にも GHSR-1 が存在すること⁷⁾ が明らかにされており、グレリンの作用が脳内食欲調節ネットワークを形成している神経への直接作用である可能性も高い。

これまでの動物を用いた研究において、グレリンは末梢投与だけではなく脳内投与によっても食欲を亢進させる⁶⁾。しかし、生理的には末梢血中に存在するグレリンの大半が胃粘膜から分泌されたもの¹⁾ であり、さらに外因性にグレリンを末梢投与すると強い食欲亢進を生じるので⁷⁾、胃から分泌されるグレリンによる食欲調節が生存に重要な役割を果たしていることは明らかである。内因性グレリンの血中濃度は食前に上昇し²⁾、食後に低下⁸⁾ するように食物摂取の影響を受けている。さらに血中濃度以外にその食欲亢進作用も食物摂取による栄養状態の変化と関連して変化していることが想定されている。実験的に動物を 48 時間など長時間絶食した場合と非絶食（自由摂食）との間でグレリン投与の脳内食欲調節ネットワークへの影響の違いが c-Fos 発現を指標として検討されている^{9,10)}。その結果、グレリン投与による ARC の活性化が自由摂食時より絶食時に増強されることが報告されている^{9,10)}。その他、食行動によって分泌される消化管ホルモンがグレリンの食欲調節ネットワークへの作用を修飾している可能性もある。今後、グレリンの臨床応用^{11,12)} に向けては食欲増加へ最も効力のあるグレリンの投与方法を明らかにする必要がある。

今回、24 時間絶食下及び非絶食（自由摂食）の 2 群のラットにグレリン（活性型グレリン、アシルグレリン）腹腔内投与を行い、その食欲増加作用と脳内食欲調節ネットワークを形成している視床下部と中脳・辺縁の報酬獲得系の神経核活性化の違いについて観察し、絶食時と非絶食時におけるグレリンの食欲亢進作用脳内機序の違いについて検討した。なお、脳神経活性化の評価のために脳神経内の核内蛋白 c-Fos 蛋白の発現を指標としてグレリンの脳への影響を観察した。

方 法

1) 実験動物

8 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット（日本エスエルシー株式会社、東京、日本）を用いて、12 時間ごとに照明を点灯と消灯（14 時消灯～2 時点灯）を行い、温湿度を一定に保った条件下（室内温度 23℃、湿度 50 ± 20%）で管理した。餌は株式会社オリエンタルバイオサービス（東京、日本）より購入した MF 粉末飼料（栄養配分 100 g 中、水分 7.9 g、粗蛋白 23.1 g、粗脂肪 5.1 g、総炭水化物 5.8 g、粗繊維 2.8 g、可溶性無窒素物 55.3 g）を用いた。飲水および餌は自由摂取として、環境に慣らすため 1 週間 1 ケージに 3 匹収容し飼育した。実験日当日、個別ケージに

個別飼育した。絶食群のラットは実験開始の 24 時間前より絶食とし、非絶食群のラットは実験開始直前まで食餌へのアクセスを可能とした。それぞれのグループにおいて摂餌実験前日に体重測定を行い、前日のラット体重は全体の平均 303 ± 21 g で、絶食ラットでは各群とも 303 ± 5 g ~ 317 ± 6 g、非絶食ラットでは各群とも 290 ± 4 g ~ 298 ± 3 g で各群間に体重の有意な差がなく（多重比較 Tukey-Kramer 法）均等化して使用した。本実験については埼玉医科大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号 1495 号、1503 号、1750 号、1756 号）。

2) 試薬

アシルグレリンはラット由来のオクタノイル基を有する 33 のアミノ酸からなるもので株式会社ペプチド研究所（カタログ番号 443-S、大阪、日本）より購入した。抗 c-Fos 抗体はウサギ抗 c-Fos ポリクローナル抗血清を Abcam 社（カタログ番号 ab190289、Abcam, Cambridge, UK）より購入した。

3) 摂餌量測定

8 週齢の SD 雄性ラットを絶食群と非絶食群に分け、絶食群については実験前日 14 時から 24 時間絶食させ、非絶食群では実験直前まで摂餌可能とした。2 群のラットはそれぞれ摂餌量測定実験の開始直前に生理食塩水（コントロール群）またはグレリンを腹腔内に 1 回投与された。グレリンは用量依存性効果を検討するためにグレリンの濃度をラット体重あたり 10 μg、30 μg、50 μg、100 μg/kg に調整し腹腔内投与した。本実験は 14 時の消灯（14 時消灯～2 時点灯）と同時に生理食塩水またはグレリン溶液 200 μL を腹腔内投与した。実験中は食餌や水に自由にアクセスできる環境とし、自由摂食下で行った。グレリンまたは生理食塩水を腹腔内投与後 1 時間に残った餌量を測定し、摂餌開始時の飼料重量との差を摂餌量として計算した¹³⁾。

4) 脳神経の c-Fos 免疫組織化学法

グレリンの食欲関連中枢神経への作用を検討するために神経活性化の指標である c-Fos 蛋白の発現¹⁴⁾ を免疫染色法にて同定し、脳内食欲調節ネットワークへの影響を評価した。

脳における食欲調節は、主にエネルギーバランス（摂取と消費）の均衡を保つ ARC、背内側核 (dorsomedial nucleus: DMN)、腹内側核 (ventromedial nucleus: VMN)、室傍核 (paraventricular nucleus: PVN)、LH などの視床下部神経核群と VTA や NAc、前前頭皮質 (prefrontal cortex: PFC) などの食行動に伴う快感やその獲得への意欲を生成する報酬獲得系によって行われている¹⁵⁾。

今回、これらの視床下部の各神経核と報酬獲得系の VTA と NAc の二つの神経核における c-Fos 蛋白の発現からグレリンの食欲亢進作用に関与している神経ネットワークについて検討、特に絶食時と非絶食時における c-Fos 蛋白発現の違いについて検討した。

a) 心臓からの灌流・脳固定

新規の 8 週齢の SD 雄性ラットを 24 時間絶食群と非絶食群に分けて 24 時間飼育した。それぞれの処置群のラット

をさらに2群に分けて, グレリンをラット体重kgあたり50 μg または生理食塩水をそれぞれの群に腹腔内投与した. その2時間後にラットを麻酔ボックスに移しイソフルラン(イソフルラン吸入麻酔液, マイラン製薬株式会社, 大阪, 日本) 4%による吸入麻酔によって外科麻酔期に導入し仰臥位にして, 速やかに右心房を小切開し左室・大動脈を介して約20 mlの生理食塩水を速やかに注入し全身の血液を洗い流した. 続いて0.5%グルタルアルデヒド/4%パラホルムアルデヒド(PFA) 100 mlを約120 mmHgの加圧下で注入し, さらに4% PFA 200 mlを同圧下で, 次いで200 mlを静水圧下で流し脳を固定した. 固定した脳を取り出して, 中脳の上丘と下丘の間で二つの部分に分断した. 分断した脳を, 4°C下で4% PFAに1.5時間浸して後固定した. その後, 10%スクロースに1時間, 20%と25%スクロースに脳がそれぞれの液底に沈下するまで20%, 25%スクロースの順序で一晩浸した. 固定液, スクロース溶液はいずれも0.1 Mリン酸緩衝液(phosphate buffer PB, pH 7.4)を使用した.

b) 脳切片の作成

上記の工程で固定された脳標本は, 電子冷却式ミクロトームを用いて脳標本の長軸に沿って目的とする各神経核を含む脳全長に及んで40 μm の厚さに横断的に薄切し, 免疫染色用に同じ部位の4切片から4番目の1切片ずつ収集した. 切片は4°CのPBに浸した.

c) 免疫組織化学染色・封入脳切片の免疫組織化学染色

1次反応

上記の様に作成し取捨された脳切片を室温下で0.1 M トリス緩衝液(TS)を用いて10分間3回洗浄し, さらに0.5%ウシ血清アルブミン(BSA, カタログ番号A9056-1109, SIGMA-ALDRICH Co, St. Louis, MO, USA)/TSを用いて4°Cで20分間濯いだ. 次いで0.5% BSA/TSで2000倍に希釈したウサギ抗c-Fos抗体溶液中で4°Cで約16時間振盪反応させた.

2次反応

ABC KIT (VECTASTAIN, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA)を用いて以下の処理を行った. まず切片を0.1 M TSで10分間3回洗浄し, アビジン溶液, 次いでビオチン溶液でそれぞれ15分間インキュベートし, 次いで非特異的結合をブロックするため2%ウサギ血清(0.1 M TS)溶液で20分間振盪反応させた. 引き続き測定キットの抗ウサギIgG抗体で, 60分間振盪しながら反応させた後, 0.1 M TSで10分間3回洗浄した. 更に, ABC溶液で60分間振盪反応させた後, 0.1 M TSで10分間3回洗浄した. 発色はジアミノベンチジン(DAB)-ニッケル(Ni)溶液で, 0.001% H_2O_2 により遮光下で1分40秒静置反応させた. その後0.1 M TSで10分間2回洗浄後0.1 M PBで10分間洗浄した. 上記の実験はすべて室温下で行った.

d) 切片の貼り付け, 脱水, 透徹, 封入

切片をスライドガラス(ゼラチン・コーティング済)上に尾側から頭側の順に貼り付け, 室温で乾燥させた後に脱

水, 透徹(50%, 7%, 95%, 99%エタノール, キシレン3回)し, 封入剤(Permount Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 取扱:和光純薬工業)を用いてカバーガラスで封入した.

e) c-Fos 陽性細胞の顕微鏡下観察

神経細胞の核内に発現したc-Fos蛋白質は, DAB/Ni発色反応により黒色に可視化されるため, このc-Fos陽性細胞を顕微鏡で観察した. c-Fos陽性細胞の所在位置はラットの脳アトラス¹⁶⁾で照合した. 各神経核におけるc-Fos陽性細胞の数値化は, これまで高山らが以前から行ってきた方法で行った¹⁷⁾. まず各神経核の全長に及んで横断的に40 μm 厚に切り出した切片を4切片から4番目の1切片のみを染色した. 各神経核の厚みに応じて算出される切片の数は異なるが, それらの切片において細胞核内が黒色に染まる細胞をc-Fos陽性細胞として算定, 算出されたc-Fos陽性細胞数はそれぞれの神経核ごと合算して各神経核のc-Fos陽性細胞数/ラットとしてその平均値を算出して各群間で比較した¹⁷⁾.

5) 血中グルコース, インスリン, レプチン測定

24時間絶食後群と非絶食群の両群において血中グルコース, インスリン, レプチンの濃度を測定した. 採血方法はラットを断頭し, 頸部血管から流出する血液をガラスロートで受け試験管に採取し, グルコース測定には全血を, インスリンとレプチン測定は血漿を分離して用いた. 測定はそれぞれの市販の測定キットを使用した. 血糖値はNew glucose・pilot血糖測定システム(Syntron Bioresearch, Inc, Carlsbad, CA, USA, 測定範囲20-600 mg/dL)¹⁸⁾を用いて測定した. インスリンはMercodia Rat Insulin ELISA測定キット(Mercodia AB, Uppsala, Sweden)¹⁹⁾を用いて測定した. レプチンはマウス/ラットレプチンELISAキット(BioVender # RD291001200R, Candler, NC, USA)²⁰⁾を用いて測定した.

6) 統計処理

計測値は平均 \pm 標準誤差(SE)で表示したが, 一元配置分散分析法で検定した後Tukey-Kramer法にて有意差検定を行った. また, 2群間の有意差検定にはStudent's unpaired t-testを用いて検討した. 各データの差は $p < 0.05$ を有意差ありとした.

結果

1) 絶食後及び非絶食後のラットの摂餌量に対するグレリンの用量依存性効果

グレリンは10 μg , 30 μg , 50 μg , 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に調整し腹腔内投与した. 図1Aに示すように絶食後のラット群においてはコントロール群にて1時間に4.88 \pm 0.35 gの摂餌量が, グレリンの10 μg , 30 μg , 50 μg , 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与にて, それぞれ5.3 \pm 0.4 g, 5.8 \pm 0.5 g, 6.7 \pm 0.4 g, 5.6 \pm 0.2 gと摂餌量の増加を認め, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の間で用量依存性の増加傾向を認めた. グレリンの50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与にて最大反応を認め, コントロール群によ

る摂餌量と比較して有意な増加 ($p < 0.05$) を認めた. 一方, 非絶食ラット群においてもグレリンの $10 \mu\text{g}$, $30 \mu\text{g}$, $50 \mu\text{g}$, $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の腹腔内投与にて, コントロール群 $0.8 \pm 0.2 \text{ g}$ に対してそれぞれ $1.1 \pm 0.2 \text{ g}$, $1.0 \pm 0.2 \text{ g}$, $1.7 \pm 0.2 \text{ g}$,

$1.1 \pm 0.2 \text{ g}$ と摂餌量の増加を認め, やはり $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ の間で用量依存性の増加傾向を認め, $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与にて最大反応を示しコントロール群による摂餌量と比較して有意な増加 ($p < 0.05$) を認めた. コントロール群の

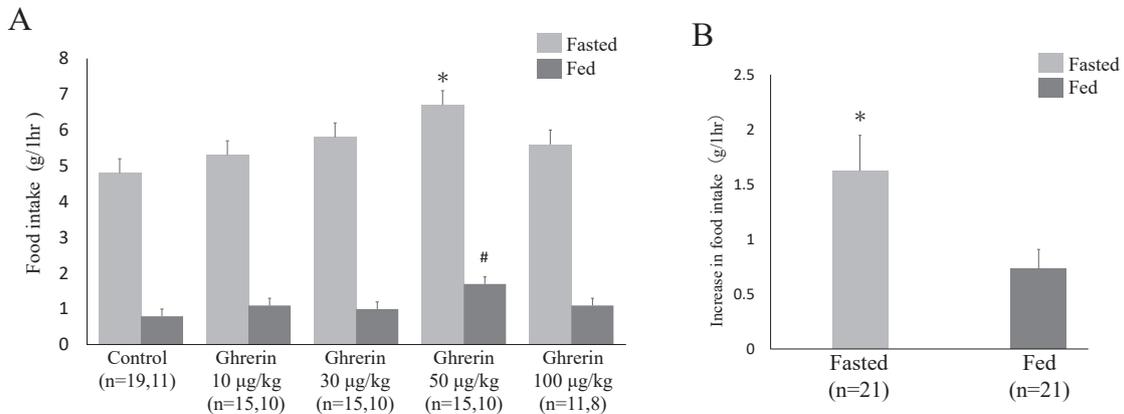


図1 絶食および非絶食ラット摂餌量へのグレリン腹腔内投与用量依存的作用と摂餌量増加の比較

- A. 摂餌量に対するグレリン容量依存性効果 グレリンは濃度をラット体重あたり $10, 30, 50, 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ を達成するように調整し腹腔内投与した. Fasted: 絶食群, Fed: 非絶食群, * vs 絶食コントロール群, $P < 0.05$, # vs 非絶食コントロール群, $P < 0.05$.
- B. 両群におけるグレリンの効果の比較 摂餌量増加はグレリン $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与下ラットの摂餌量からコントロール群の平均摂餌量を引き, それぞれの $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与ラットの摂餌増加量として両群を比較した. Fasted: 絶食群, Fed: 非絶食群, * vs 非絶食群, $P < 0.05$.

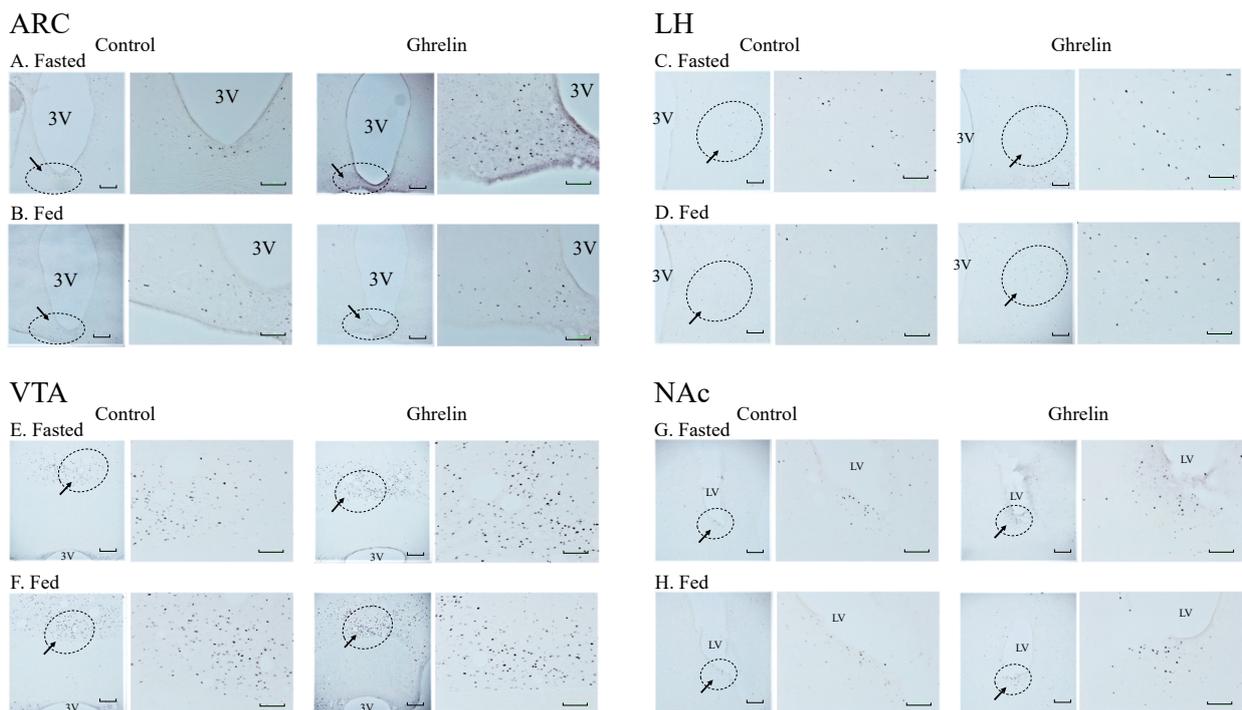


図2 絶食ラットと非絶食ラットにおけるグレリン腹腔内投与下での視床下部 ARC, LH と報酬獲得系 VTA, NAc における免疫組織化学染色による c-Fos 発現細胞の比較

それぞれ ARC の絶食群 (A) と非絶食群 (B), LH の絶食群 (C) と非絶食 (D), VTA の絶食群 (E) と非絶食群 (F), NAc の絶食群 (G) と非絶食群 (H) における c-Fos 発現細胞が認められる. 左側が弱拡大 ($\times 40$), 右側が強拡大 ($\times 200$) である. ケールバーの長さは弱拡大では $500 \mu\text{m}$, 強拡大では $100 \mu\text{m}$ を示している.

ARC と NAc においては絶食群 (A, G) と非絶食群 (B, H) 双方において, LH と VTA においては絶食群 (C, E) において c-Fos 陽性細胞の増加傾向が認められる.

ARC (arcuate nucleus: 脳弓核), LH (lateral hypothalamus: 外側野), VTA (ventral tegmental area: 腹側被蓋野), NAc (nucleus accumbens: 側坐核)

3V: third ventricle, LV: lateral ventricle

平均摂餌量と比較してグレリン 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与による摂餌量増加は, 図 1B に示すように絶食群においては $1.6 \pm 0.3 \text{ g}/1$ 時間であり非絶食群の $0.7 \pm 0.2 \text{ g}/1$ 時間と比較しても有意 ($p < 0.05$) に 2.2 倍に大きかった。

2) グレリン投与による中枢神経調節ネットワークの視床下部と報酬獲得系の各神経核における c-Fos 発現

a) 視床下部と報酬獲得系の各神経核における c-Fos 抗体による免疫組織化学染色を用いた c-Fos の発現解析

絶食状態 (Fasted) と非絶食状態 (Fed) において, 腹腔内グレリン投与による視床下部と報酬獲得系の神経核における c-Fos 発現の増加を図 2 に示す。ARC と NAc においては絶食群 (A, G) と非絶食群 (B, H) 双方において, LH と VTA においては絶食群 (C, E) において c-Fos 陽性細胞の増加傾向が認められる。

b) グレリン投与による視床下部各神経核における c-Fos 発現細胞数の変化

図 3 で視床下部の神経核である ARC, DMN, VMN,

PVN, LH におけるグレリン腹腔内投与下 c-Fos 発現細胞数について検討した。

視床下部 ARC におけるグレリン投与による c-Fos 発現の変化をみると, 図 3A に示すように絶食群, 非絶食群においてともにグレリン投与によって c-Fos 発現細胞の増加を認めた。絶食群においてはコントロール群 47 ± 8 に対してグレリン投与群 143 ± 18 と有意 ($p < 0.001$) に増加を認め, 非絶食群においてもコントロール群 66 ± 15 に対してグレリン投与群 130 ± 17 と有意 ($p < 0.05$) な増加を認めた。

次に DMN について検討すると, 図 3B に示すようにコントロール群と比較してグレリン 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与にて絶食群 (左側) (110 ± 29 vs 194 ± 34 , $p = 0.12$) と非絶食群 (右側) (120 ± 38 vs 129 ± 31 , $p = 0.83$) ともに有意な c-Fos 発現細胞数の変化を認めなかった。VMN についても図 3C に示すようにコントロール群と比較してグレリン 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与にて絶食群 (左側) (86 ± 16 vs 145 ± 32 , $p = 0.14$) と

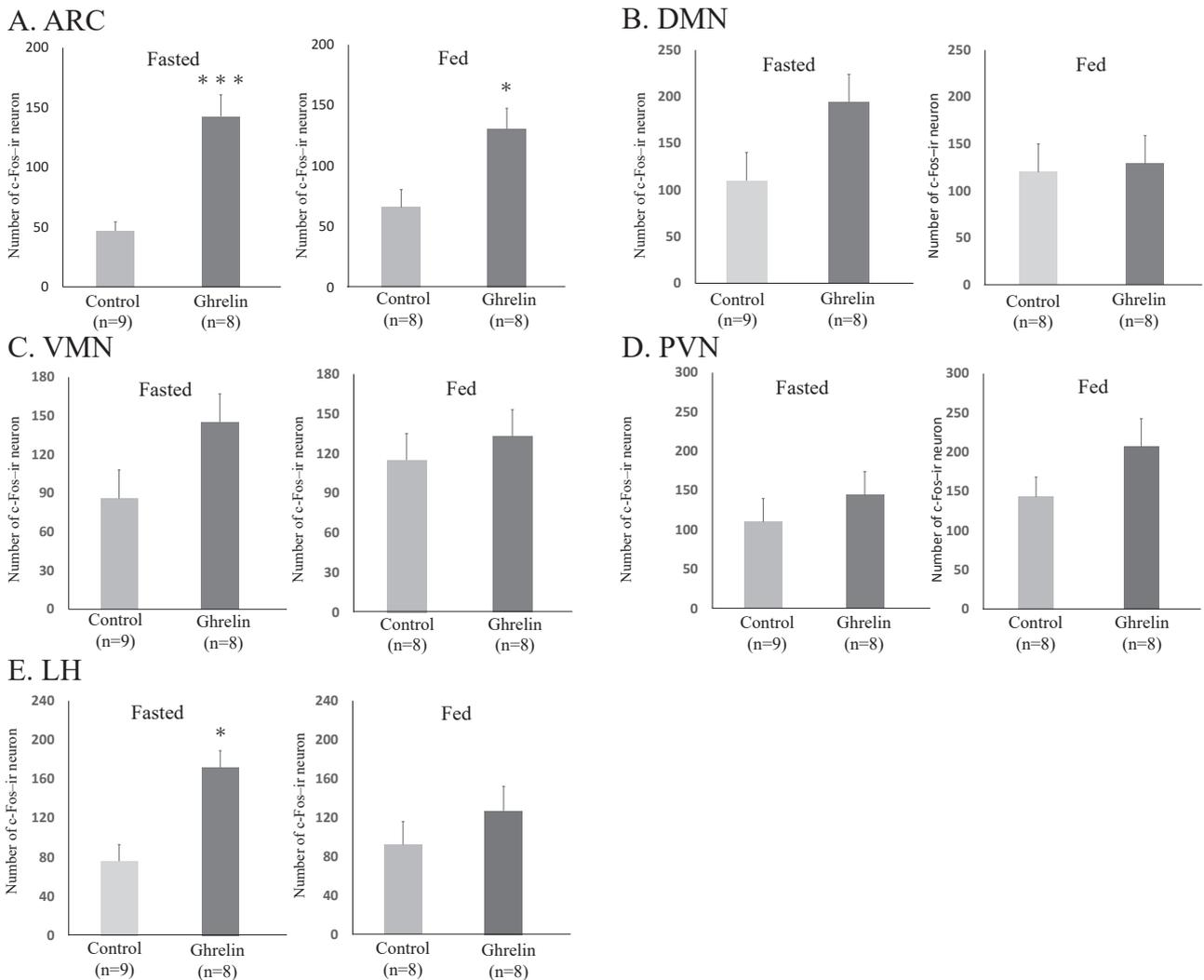
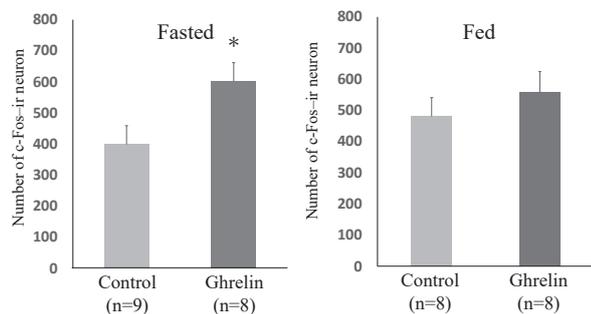


図 3 絶食および非絶食ラットへのグレリン 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔内投与による視床下部神経核における c-Fos 発現細胞数の比較
 A. ARC (arcuate nucleus : 脳弓核), B. DMN (dorsomedial nucleus : 背内側核), C. VMN (ventromedial nucleus : 腹内側核), D. PVN (paraventricular nucleus : 室傍核), E. LH (lateral hypothalamus : 外側野), Fasted : 絶食群, Fed : 非絶食群, * vs コントロール群, $P < 0.05$, *** vs コントロール群, $P < 0.001$.

非絶食群 (右側) (115.4 ± 19.2 vs 133.9 ± 21.7 , $p=0.61$) ともに有意な c-Fos 発現細胞数の変化を認めなかった. PVN については図 3D に示すようにコントロール群に比較してグレリン $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与にて絶食群 (左側) (110 ± 27 vs 144 ± 39 , $p=0.44$) と非絶食群 (右側) (143 ± 26 vs 207 ± 36 , $p=0.16$) ともに有意な c-Fos 発現細胞数の変化を認めなかった. LH では図 3E に示すように絶食群においてはコントロール群 76 ± 15 に対してグレリン投与群 172 ± 20 と有意 ($p<0.05$) な増加を認め, 非絶食群においてはコントロール群 92.3 ± 23.9 に対してグレリン投与群 127 ± 25.0 ($p=0.28$) と有意な増加を認めなかった.

A. VTA



B. NAc

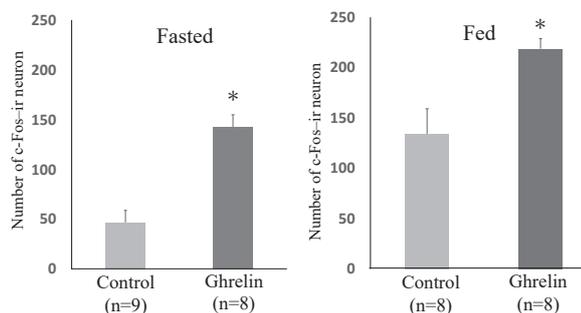


図4 絶食および非絶食ラットへのグレリン体重あたり $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔内投与による腹側被蓋野 (VTA) と側坐核 (NAc) における c-Fos 発現細胞数の比較

VTA (ventral tegmental area: 腹側被蓋野), B. NAc (nucleus accumbens: 側坐核), Fasted: 絶食群, Fed: 非絶食群, * vs コントロール群, $P<0.05$.

c) グレリン投与による報酬獲得系神経核における c-Fos 発現細胞数の変化

図4にて報酬獲得系の神経核であるVTAとNAcにおけるグレリン腹腔内投与下c-Fos発現細胞数について検討した.

図4Aに示すようにVTAにおいては, 絶食群においてはコントロール群 399 ± 63 に対してグレリン投与群: 602 ± 66 と有意 ($p<0.05$) に増加を認め, 非絶食群においてはコントロール群 481 ± 60 に対してグレリン投与群 557 ± 67 と有意な変化は認めなかった ($p=0.35$). NAcにおいては図4Bに見られるように, 絶食群においてコントロール群 47 ± 8 に対してグレリン投与群 143 ± 18 と有意 ($p<0.05$) な増加を認め, 非絶食群においてもコントロール群 134 ± 25 に対してグレリン投与群 218 ± 10 と有意 ($p<0.05$) な増加を認めた.

3) グレリン投与による血中グルコース, インスリン, レプチン値の変化

食欲抑制作用のある栄養代謝因子のグルコース, インスリン, レプチン血中濃度について24時間絶食群と非絶食群ラットの実験開始直前の血中濃度を測定した.

図5に示すように24時間絶食群, 非絶食群の血中グルコース値を比較すると, 絶食群においては $84.1 \pm 3.9 \text{ mg}/\text{dL}$, 非絶食群では $151.1 \pm 5.2 \text{ mg}/\text{dL}$ と非絶食群において有意 ($p<0.001$) に高かった. インスリン値は絶食群においては $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{L}$, 非絶食群では $1.2 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{L}$ と非絶食群において有意 ($p<0.05$) に高かった. さらにレプチンについても絶食群においては $1689.9 \pm 275.8 \mu\text{g}/\text{L}$, 非絶食群では $3602 \pm 387.1 \mu\text{g}/\text{L}$ と非絶食群においても有意 ($p<0.01$) に高かった.

考察

今回の研究ではグレリンの腹腔内投与で24時間絶食および非絶食 (自由摂食) ラット双方においてグレリン投与後の摂餌量が増加した. グレリンの投与量をラット体重あたり $10-100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲で用量依存性を検討すると $10-50 \mu\text{g}/\text{kg}$ の間で摂餌量の増加傾向を示し, 特に最大反応を生じたグレリン $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ でコントロール群に比較して有意な増加を示した. この用量依存性増加作用のパターンは絶

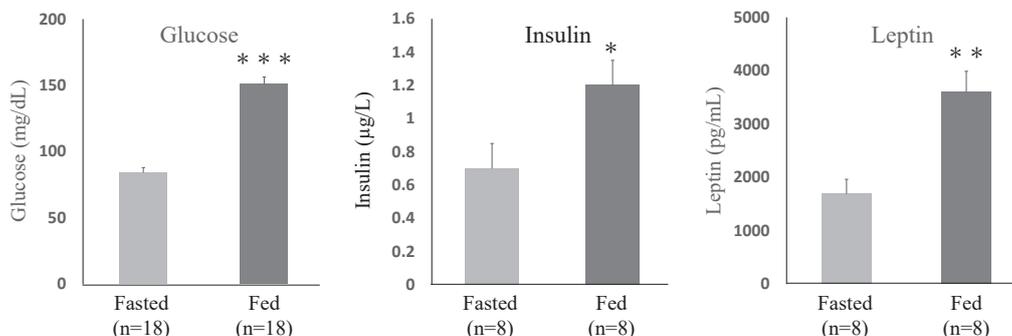


図5 絶食および非絶食ラット血中グルコース, インスリン, レプチン濃度の比較
Glucose: グルコース, Insulin: インスリン, Leptin: レプチン
vs Fasted, $P<0.05$, ** vs Fasted, $P<0.01$, *** vs Fasted, $P<0.001$.

食ラットおよび非絶食ラット双方において同様であった。

本研究において最大反応を生じた 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (15 nmol/kg, 3.7 nmol/rat) の投与量は Wren らの研究⁷⁾にて検討された 1–10 nmol/rat の範囲内である。Wren らの検討ではグレリン 1 nmol/rat 腹腔内投与後 1 時間の血中濃度 (2.83 \pm 0.13 pmol/mL) は 24 時間絶食にて達成される血中グレリン濃度 (2.8 \pm 0.32 pmol/mL) とほぼ同等であることが示されており, グレリン 1 nmol/rat 投与による血中グレリン濃度が絶食によって誘導される生理的なグレリン上昇に近似していることが示されている。今回本研究にて投与されたグレリン量は 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (15 nmol/kg, 3.7 nmol/rat) であり 3.7 倍の投与量である。このことより本研究の c-Fos 発現の実験で用いたグレリン投与量 3.7 nmol/rat も生理的な空腹時の血中濃度よりは高値を生じることが推測できるが, 10 nmol/rat 以下であり Wren らの報告を参考にすると極端な食欲亢進を誘導する量ではないことが推定できる。

絶食群と非絶食群における摂餌量の違いについては, グレリン非投与の状態での 1 時間の摂餌量を比較すると絶食群においては非絶食群に比較して約 6 倍である。さらに両群において, コントロール群 (グレリン非投与ラット) と比較してグレリン 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与による摂餌量の増加を比較すると, 絶食群においては非絶食群と比較して 2.2 倍に有意に増加している。この結果より同量のグレリン投与に対する反応性摂食活動が非絶食群に比べて絶食群において亢進している, あるいは摂食によってグレリン投与に対しての食反応が抑制されていることが示されている。

本研究では, 上記に示した絶食によるグレリン反応性食欲増加の機序を明らかにするため, 絶食ラットと非絶食ラット間におけるグレリン腹腔内投与による脳内食欲関連中枢活性化の違いを c-Fos 発現細胞数にて検討した^{21,22)}。c-Fos 蛋白は脳細胞活性化のマーカーとしてよく知られている核内蛋白^{14,15)}で, その発現は脳細胞が活性状態にあることを示している。

脳内における食欲調節ネットワークには 2 つの回路があることが知られている²³⁾。一つはエネルギーのインとアウトのバランス, 換言すればエネルギーのホメオスタシス (動的平衡) によって食欲を調節している視床下部を中心とした神経核群と, もう一つが食行動に伴う快感の達成や食物獲得への意欲に関連し摂食行動を調節する報酬獲得系の神経核群である。これまでの先行研究では, グレリン末梢投与^{9,24)}あるいは脳内投与^{6,10,25)}による ARC での c-Fos 発現が非絶食に比べて絶食することによってさらに増加することが報告されている。本研究ではこれらの c-Fos 発現の増減を 2 つの回路について検討した。

まずグレリン腹腔内投与にて視床下部神経核 ARC にて c-Fos 発現細胞が絶食および非絶食群において有意に増加した。すなわち絶食及び非絶食の違いに影響されず, グレリンは ARC を活性化することが示されている。

次にその他の視床下部内神経核においては DMN, VMN, PVN, LH について c-Fos 発現を評価すると, DMH, VMH,

PVN においては絶食および非絶食群双方においてグレリン投与によって明らかな c-Fos 発現の変化を認めなかった。しかし, LH においては絶食群のみでグレリン投与によって有意な c-Fos 発現増加を認めたが, 非絶食群においては有意な変化を認めなかった。これは食欲亢進作用のあるオレキシンが局在する LH 神経²⁶⁾においては絶食することによってグレリンに対する反応性が高まっていることを示している。

上記のように視床下部神経核の LH におけるグレリンに対する反応性が絶食状態と非絶食状態にて異なり, LH では絶食時のみ有意な c-Fos 発現の増加が認められたが, その機序について考察すると, まず絶食時において視床下部のグレリン受容体 RNA 量増加²⁷⁾の関与である。その結果, 投与されたグレリンに対する視床下部神経, 特に LH 神経の活性化が絶食時においては増強されている可能性が高い。

本研究においては, 絶食群でグレリン投与による LH 神経の c-Fos 発現がより増加した。LH とグレリンの関係についてのこれまでに報告では, グレリン脳内投与によって LH が活性化されることや²⁵⁾, さらに LH には食欲亢進作用のあるオレキシン神経が存在し²⁸⁾, グレリンの食欲亢進作用にはオレキシンが必須であることが示されている²⁸⁾。また ARC のニューロペプチド Y (Neuropeptide Y: NPY) が LH まで延長しオレキシン神経とシナプスを形成していることも明らかにされている²⁹⁾。すなわち, グレリン \rightarrow ARC NPY 神経活性化^{9,24)}またはグレリンの直接作用 \rightarrow LH オレキシン神経活性化の経路があることがこれまでに証明されている。本研究で見られた絶食群におけるグレリン投与による強い LH 神経活性化は, 絶食によって生じたグレリン受容体増加²⁵⁾に関連した ARC の NPY ニューロン活性化が増強され, 連鎖的に LH オレキシン神経の強い活性化が生じた可能性や, LH のオレキシン神経そのもののグレリン受容体増加による可能性がある。

グレリン投与に対する報酬獲得系の反応について VTA と NAc について検討した。VTA は様々な行動への意欲を高める中枢であるが, 特に摂食行動への意欲を高めることはよく知られている³⁰⁾。これまでの報告でもグレリンは脳内投与^{31,32)}または末梢投与³³⁾においても VTA を活性化することが報告されているが, 絶食群と非絶食群におけるグレリン投与に対する VTA 活性化の違いは明らかにされていない。今回の検討では絶食群でのみ VTA の c-Fos 発現細胞数がコントロール群に比較して有意な増加を認めた。一方, NAc においては絶食群及び非絶食群の両群にて c-Fos 発現細胞の増加を認めている。絶食及び非絶食におけるグレリン腹腔内投与の VTA への効果の違いについて考察すると, 非絶食群において実験直前まで摂食行動を行っていた可能性があり, その結果, 食欲抑制作用のある消化管ホルモン, コレシストキニン (cholecystokinin: CCK) やペプチド YY (peptide tyrosine tyrosine: PYY), さらにインスリンなどが上昇し VTA の興奮を抑制した可能性がある。先行研究では, CCK³⁴⁾ やインスリン, レプチンなど^{35,36)}は VTA に直

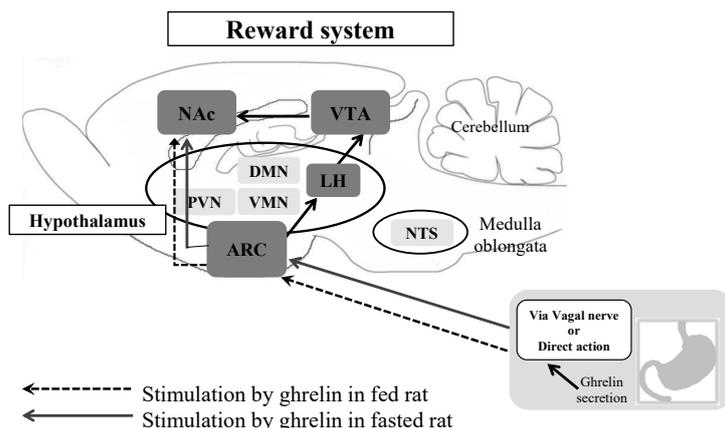


図6 絶食時及び非絶食時におけるグレリン腹腔内投与による食欲増加作用の脳内食欲調節神経回路
 NTSを除いて神経核を示す略語は図2, 3に説明あり
 NTS (nucleus solitarius tract of the medulla: 延髄孤束核)

接作用して食欲を抑制することが報告されている。つまり今回の研究で見られた非絶食でのグレリン投与に対するVTAでのc-Fos発現細胞数増加の抑制は、CCKなど消化管ホルモンやインスリン、レプチンなど代謝調節ホルモンの関与を見ている可能性がある。今回の実験において24時間絶食ラットと非絶食ラットにおけるグルコースやインスリン、レプチン血中濃度を測定したが、三者ともに非絶食において上昇していることが確認できた。すなわちこれらの代謝関連因子がVTAの活性化を抑制した可能性がある。

一方、NAcについては絶食群、非絶食ラット群共にc-Fos発現が増加している。これまでの先行研究では、グレリンによるNAcの活性化はVTA活性化に連動することが報告されている^{37,38)}。VTAのドーパミン神経が活性化されると、続いてNAcにおいてVTAからのドーパミン神経によるドーパミン放出が増加しNAc内のドーパミン濃度が高まることが明らかにされている^{37,38)}。今回の研究で認められた絶食群でのグレリン投与によるNAc神経のc-Fos発現増加は、VTAにc-Fos発現の増加を認めたことからVTAのドーパミン神経活性化を経由して伝播されたと推測できる。一方、非絶食群においてはグレリン投与によってVTAでのc-Fos発現増加は認められなかったため、NAcでのc-Fos発現増加はVTAを介さない別経路で生じた可能性がある。グレリンを直接NAcに局注すると摂餌量が増加することが知られているが³²⁾、グレリンは血液脳関門を通過することが証明されており、さらにNAc神経にはグレリン受容体が存在するので、今回見られたグレリン末梢投与によるNAc神経におけるc-Fos発現増加は末梢から脳内に移動したグレリンによる可能性もある。その他、先行研究ではNAcへ直接NPYを局注するとショ糖や高脂肪食などの摂餌量が増加することが明らかにされているので^{39,40)}、非絶食群へのグレリン投与によるNAcでのc-Fos発現増加は、グレリンによって活性化されたARCのNPYニューロンが関与している可能性もある。

以上、脳内食欲調節ネットワーク神経核におけるc-Fos

発現を検討した上記の結果から、絶食群と非絶食群におけるグレリン投与下での食欲調節ネットワークの活性化の違いを図6に示す。図6を解説すると、まず胃から分泌された末梢血中のグレリンは求心性迷走神経上に存在するGHSR-1受容体に結合して迷走神経を介して空腹シグナルを中枢神経に伝える⁵⁾。その後、絶食状態においてはARC→LH→VTA→NAcとネットワーク上の食欲亢進に働く神経連鎖が活性化される。一方、非絶食ラットではARCまでの興奮は認められるが、その興奮はLHやVTAには伝わらない。おそらくグレリンによる食欲亢進シグナルはARCから別経路でNAcへ伝わるのが推定される。この経路は絶食時においても機能していることが推定される。このLH→VTA→NAcに連鎖するネットワーク活性化の違いが絶食状態におけるグレリンの作用と非絶食状態での作用の違いを生じる機序と推測される。

結論

本研究の結論として、グレリン末梢投与における食欲増加は絶食状態に比べ非絶食状態において抑制されていることが認められた。その機序については、グレリン末梢投与に対する脳内食欲調節ネットワーク中の視床下部外側野LHと報酬獲得系の腹側被蓋野VTAの反応性の相違が関与していることが示唆された。

引用文献

- 1) 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.
- 2) Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714-9.
- 3) Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijijima A, Matsuo H, et al. The role of the gastric afferent vagal

- nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120-8.
- 4) Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silvia I, Horvath B, et al. Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat neurosci* 2006; 9: 381-8.
 - 5) Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 2006; 494: 528-48.
 - 6) Nakazato M, Murakami M, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-8.
 - 7) Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillon WS, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 2001; 50: 2540-7.
 - 8) Tschöp M, Wawarta R, Pieple RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, et al. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: RC19-21.
 - 9) Hewson AK, Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and EFr-1 in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 1047-9.
 - 10) Tung YCL, Hewson AK, Carter RN, Dickson SL. Central responsiveness to a ghrelin mimetic (GHRP-6) is rapidly altered by acute changes in nutritional status in rats. *J Neuroendocrinol* 2005; 17: 387-9
 - 11) Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, et al. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-control trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2832-6.
 - 12) Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Maruyama T, Yokode M, et al. Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on food intake and appetite. *Eur J Endocrinol* 2008; 158: 49-8.
 - 13) Yamaguchi N, Hosomi E, Hori Y, Ro S, Maezawa K, Ochiai M, et al. The Combination of Cholecystokinin and Stress Amplifies an Inhibition of Appetite, Gastric Emptying, and an Increase in c-Fos Expression in Neurons of the Hypothalamus and the Medulla Oblongata. *Neurochem Res* 2020; 45: 2173-83.
 - 14) Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Meth* 1989; 29: 261-5.
 - 15) Palmiter RD. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci* 2007; 30: 375-81.
 - 16) Paxinos G, Watson G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. ACADEMIC PRESS. 1998.
 - 17) Miura M, Takayama K, Okada J. Neuronal expression of Fos protein in the rat brain after baroreceptor stimulation. *J Auton Nerv Syst* 1994; 50: 31-43.
 - 18) Hamaguchi S, Abe K, Komatsu M, Namekata I, Tanaka H. Positive lucitropic of Quercetin on isolated ventricular myocardia from normal and streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 2021; 44: 1894-7.
 - 19) Olsson R, Carlson PO. Better vascular engraftment and function in pancreatic islets transplanted without prior culture. *Diabetologia* 2005; 48: 469-76.
 - 20) Gout J, Sarafian D, Tirand J, Blondet A, Vigier M, Rajas F, et al. Leptin infusion and obesity in mouse cause alteration in the hypothalamic melanocortin system. *Obesity* 2008; 16: 1763-9.
 - 21) Dragunow M, Robertson HA. Generalized seizures induce c-fos protein (s) in mammalian neurons. *Neuroscience Letters* 1977; 82: 157-63.
 - 22) Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988; 240: 1328-31.
 - 23) Ferrario CR, Labouèbe G, Liu S, Nieh EH, Routh VH, Xu S, et al. Homeostasis meets motivation in the battle to control food intake. *J Neurosci* 2016; 9: 11469-81.
 - 24) Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002; 325: 1047-9.
 - 25) Scott V, McDade DM, Luckman SM. Rapid changes in the sensitivity of arcuate nucleus neurons to central ghrelin in relation to feeding status. *Physiol Behav* 2007; 90: 180-5.
 - 26) Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-85.
 - 27) Kim M-S, Yoon C-Y, Park K-H, Shin C-S, Park K-S, Kim S-Y, et al. Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport* 2003; 14: 1317-20.
 - 28) Perello M, Sakata I, Birnbaum M, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, et al. Ghrelin increases the rewarding value of high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol Psychiatry* 2010; 67: 880-6.
 - 29) Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, et al. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003; 144: 1506-12.
 - 30) Berridge KC. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 1996; 20: 1-25.

- 31) Egecioglu E, Jerlhag E, Salome N, Skibicka KP, Haage D, Bohlooly-YM, et al. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict Biol* 2010; 15: 304-11.
- 32) Skibicka KP, Hansson C, Alvarez-Crespo M, Friberg PA, Dickson SL. Ghrelin directly targets the ventral tegmental area to increase food motivation. *Neuroscience* 2011; 180: 129-37.
- 33) Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 2006; 116: 3229-39.
- 34) Xie JX, Tang M, Zhang C. Effects of cholecystinin-8 microinjection into ventral tegmental area on dopamine release in nucleus accumbens of rats: in vitro voltammetric study. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry* 2001; 25: 427-34.
- 35) Mebel DM, Wong JCY, Dong YJ, Borglnd SL. Insulin in the ventral tegmental area reduces hedonic feeding and suppresses dopamine concentration via increase reuptake. *Eur J Neurosci* 2001; 36: 2336-46.
- 36) Bruijnzeel AW, Corrie LW, Rogers JA, Yamada H. Effects of insulin and leptin in the ventral tegmental area and arcuate hypothalamic nucleus on food intake and brain reward function in female rats. *Behav Brain Res* 2011; 219: 254-64.
- 37) Abizaid A. Ghrelin and dopamine: new insights on the peripheral regulation of appetite. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 787-93.
- 38) Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Douhan A, Svensson L, Engel JA. Ghrelin administration into tegmental area stimulates locomotor activity and increases extracellular concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addict Biol* 2009; 12: 6-16.
- 39) Pandit R, Luijendijk MCM, Vanderschuren LJM, la Fleur SE, Adan RAH. Limbic substrates of the effects of neuropeptide Y on intake of and motivation for palatable food. *Obesity (Silver Spring)* 2014; 22: 1216-9.
- 40) van den Heuvel JK, Fuman K, Gumbs MCR, Eggels L, Opland DM, Land BB, et al. Neuropeptide Y activity in the nucleus accumbens modulates feeding behavior and neuronal activity. *Biol Psychiatry* 2015; 77: 633-41.

Differences in the increase in food intake and the activation of neurons of the appetite-control network in the central nervous system between 24-hour fasted and fed rats by peripheral ghrelin administration

Tomonori Wada^{1,2)*}, Yutaro Hori¹⁾, Naomi Yamaguchi^{1,3)}, Eriko Hosomi¹⁾, Naoko Katsuta¹⁾, Shoki Ro¹⁾, Kosuke Maezawa¹⁾, Kiyoshige Takayama¹⁾, Sumiko Nagoshi¹⁾, Koji Yakabi^{1,3)}

- 1) Department of Gastroenterology and Hepatology, Saitama Medical Center, Saitama Medical University
- 2) Department of Gastroenterology, Sanraku Hospital
- 3) Kawagoe Clinic, Saitama Medical University

Background: Ghrelin is the only hormone that increases appetite. Ghrelin is also known to promote physiologically the start of food intake. Using 24-hour fasted or fed rats, the differences in the effects of ghrelin on appetite and the activation of the brain appetite regulation network between these two groups were examined.

Method: These two groups of rats were administered with ghrelin intraperitoneally, and the difference in dose-dependent effects on the amount of food was examined. Furthermore, immunostaining with an anti-c-Fos antibody was carried out to evaluate the expression of the c-Fos protein, which is an index of neuronal activation, on the neurons of the nuclei in the hypothalamus and reward systems constituting the appetite regulation network in the brain. In addition, concentrations of glucose, insulin and leptin in the collecting blood of both groups of rats were also assayed immediately after fasting for 24 hours or feeding.

Results: The dose-dependent effects of intraperitoneal administration of ghrelin at 10, 30, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ rat body weight on food intake were examined. The maximum effect was observed at 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in both groups. When the effect on increasing food intake between the two groups was compared, a larger increase in food intake was observed in rats that fasted for 24 hours than in the fed group. In the experiment with immunostaining of c-Fos in the neurons of the brain, ghrelin 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ administered intraperitoneally increased the number of c-Fos-positive cells in the both groups in the arcuate nucleus (ARC) and nucleus accumbens (NAc), but significant increase in the number of c-Fos-positive cells in the lateral hypothalamus (LH) and ventral tegmental area (VTA) was observed in the 24-hour fasted group. Furthermore, the concentrations of glucose, insulin, and leptin in the blood were measured in both groups, but significantly high levels in all three were observed in the fed group.

Conclusions: The results suggest that the orexigenic effect of ghrelin by peripheral administration is more enhanced in the fasted group compared to that in the fed group and that the mechanism for the difference in the effect of ghrelin is supposed to be due to the responsiveness of these neuronal nuclei such as LH of the hypothalamus and VTA of the reward system in the appetite-control network.