

周期的制限給餌下における予知性

コルチコステロンピークの発現におけるラット脳内

Neuropeptide Y の役割

学位論文内容の要旨

(緒言) 多くの生理機能には昼夜変化に同調する概日リズムが認められる。例えば、夜行性齧歯目であるラットでは、自発行動、摂食行動、飲水行動は暗期にみられ、血漿コルチコステロンレベルは明期後半から暗期前半にかけて上昇する。これらのリズムは恒常暗の照明条件下でも独自の周期で長時間持続する内因性リズムであり、その振動体は視床下部視交叉上核に存在することが明らかにされている。一方、ラットの給餌を一日の一定時刻に制限する周期的制限給餌を2週間以上行くと、給餌の1~2時間前よりあたかも給餌時刻を予知するかのように、行動量や血漿コルチコステロンレベルが上昇する。これを給餌前ピークという。給餌前ピークは周期的制限給餌を中止し、ラットを自由摂食に戻しても数日は持続し、また絶食条件下で再現することから、概日周期を持つ内因性リズムに支配されていると考えられる。給餌前ピークは、視交叉上核を両側性に破壊しても出現するので、視交叉上核の概日振動体とは異なる振動機構に支配されていると考えられるが、その局在は不明である。一方、CRHニューロンの細胞体が存在する室傍核には脳幹(孤束核等)に由来するニューロペプチドY(NPY)を含む上行性カテコールアミンニューロンが分布しており、神経終末から分泌されるノルアドレナリン(NA)やNPYはCRH分泌に促進的に作用することが知られている。また、NAやNPYは強力な摂食促進物質としても知られている。上行性カテコールアミンニューロンを特異的に阻害すると、コルチコステロンの概日リズムは影響されないが、周期的制限給餌下の給餌前ピークが消失することから、給餌性振動体からの情報は上行性カテコールアミンニューロンを介してCRHニューロンに伝達されている可能性がある。ラットを絶食条件下におくと、視床下部NPY濃度が上昇し、合成や分泌が亢進することから、視床下部NPYが絶食時の摂食行動に重要な役割を果たしていると想定される。本研究は、周期的制限給餌あるいは48時間絶食におけるラット弓状核および孤束核NPYmRNAを定量的に測定し、NPY合成に対する給餌条件の影響を解析することによって、給餌前コルチコステロンピーク形成に関する弓状核および孤束核NPYの役割を検討するとともに、給餌性振動体の局在を解明することを目的として行われた。

(方法) 実験動物には、6時から18時まで明期の24時間明暗サイクル下で飼育した約12週齢のウイスター系雄ラットを用いた。周期的制限給餌 (RF) あるいは48時間絶食の実験を除き、ラットには固形飼料および水道水を自由に摂取させた (自由摂食ラット)。周期的制限給餌実験では、10時から12時までの2時間のみ摂食が可能な制限給餌スケジュールを3週間実施した。その間飲水は自由に摂取させた。48時間絶食実験では、10時に給餌を中止し、48時間の絶食を行った後、10時に再摂食させた。飲水は自由にさせた。自由摂食、周期的制限給餌および48時間絶食の各給餌条件下におけるラット血漿コルチコステロンの24時間変動、室傍核、弓状核、孤束核NPY含量、および弓状核、孤束核のNPYmRNA量の経時変化を測定した。血漿コルチコステロンは、Murphyのタンパク競合結合法により測定した。脳組織中NPYは免疫酵素法 (EIA) にて測定し、組織タンパク量で割った値をNPY濃度とした。また、NPYmRNAの測定に定量的RT-PCR法およびin situ hybridization法を導入した。

(結果) 血漿コルチコステロンの24時間変動は、48時間絶食では自由摂食と本質的な差異はなかったが、周期的制限給餌では給餌前に血漿コルチコステロンレベルが上昇する給餌前ピークが認められた。弓状核NPY濃度は、周期的制限給餌および48時間絶食の給餌前に自由摂食よりも有意に上昇したが、摂食後は有意差は認められなかった。室傍核および孤束核NPY濃度には、どの時点でも自由摂食と有意差は認められなかった。弓状核NPYmRNA量は周期的制限給餌および48時間絶食のいずれにおいても自由摂食より有意に上昇していたのに対し、孤束核NPYmRNA量は周期的制限給餌の給餌前だけに有意に上昇していた。

(考察) 本実験結果から、弓状核NPYニューロンとNPYを含む上行性カテコールアミンニューロンは周期的制限給餌と48時間絶食条件下で異なる機能を示すことが明らかとなった。すなわち、弓状核におけるNPY濃度およびNPYmRNA量は両条件下で自由摂食より有意に増加していたのに対し、孤束核におけるNPY濃度およびNPYmRNA量は周期的制限給餌でのみ自由摂食より増加し、48時間絶食では増加していなかった。この結果は、弓状核におけるNPY合成が一般的に給餌が制限された場合に亢進するのに対し、孤束核におけるNPY合成は周期的制限給餌で特異的に亢進することを示している。NPYは摂食行動を刺激する他に、CRH分泌を増加させる。しかしながら、NPYの作用と室傍核に分布する2系統のNPYニューロンとの関係は不明であった。カテコールアミン枯渇剤である6-hydroxydopamine (6-OHDA) を中脳に投与して、上行性カテコールアミンニューロンを選択的に破壊すると、周期的制限給餌で形成された給餌前コルチコステロンピークの消失とともに、室傍核における給餌前NPY分泌もみられなくなる。しかし、48時間絶食でみられるNPY分泌の亢進は6-OHDA投与で影響されないことから、給餌前コルチコステロンピークの成立には上行性カテコールアミンニューロンが特異的に関与することが示唆された。本実験結果は、これらの成績を支持するとともに、上行性カテコールアミンニューロンが主としてCRH分泌に作用し、弓状核NPYニューロンは摂食行動に関与することを示している。48時間絶食では血漿コルチコステロンレベルは自由摂食と差が無いのに対し、周期的制限給餌では午前8時の血漿コルチコステ

ロンレベルが有意に上昇している。これは孤束核におけるNPYmRNAの変化と一致している。一方、両条件下ではともに摂食行動の亢進が予想されるが、これは弓状核NPYmRNAの変化と対応している。すなわち、本実験結果は、室傍核に分布する2系統のNPYニューロンが異なる機能を持つことを示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 福 島 菊 郎
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

周期的制限給餌下における予知性

コルチコステロンピークの発現におけるラット脳内

Neuropeptide Y の役割

本研究は、周期的制限給餌あるいは48時間絶食におけるラット弓状核および孤束核NPYmRNAを定量的に測定し、NPY合成に対する給餌条件の影響を解析することによって、給餌前コルチコステロンピーク形成に関する弓状核および孤束核NPYニューロンの役割を検討するとともに、給餌性振動体の局在を解明することを目的として行われた。本実験結果から、弓状核NPYニューロンとNPYを含む上行性カテコールアミンニューロンは周期的制限給餌と48時間絶食条件下で異なる機能を示すことが明らかとなった。すなわち、弓状核におけるNPY濃度およびNPYmRNA量は両条件下で自由摂食より有意に増加していたのに対し、孤束核におけるNPY濃度およびNPYmRNA量は周期的制限給餌でのみ自由摂食より増加し、48時間絶食では増加していなかった。この結果は、弓状核におけるNPY合成が一般的に給餌が制限された場合に亢進するのに対し、孤束核におけるNPY合成は周期的制限給餌で特異的に亢進することを示している。

公開発表において、福島菊郎教授から周期的制限給餌下におけるラットの睡眠覚醒状態、周期的制限給餌下における血漿コルチコステロン濃度と輪回し行動の関係、周期的制限給餌下における血漿コルチコステロン濃度の給餌前ピークの意義、24時間絶食ではなく、なぜ48時間絶食を行ったかの理由、周期的制限給餌下における血漿コルチコステロン濃度とNPY濃度の変動パターンの相違の解釈に関する質問があった。申請者は哺乳類であるラットの睡眠覚醒状態は脳波を測定してみなければ分からないこと、周期的制限給餌下における血漿コルチコステロン濃度と輪回し行動には直接の因果関係はないこと、周期的制限給餌下における血漿コルチコステロン濃度の給餌前ピークには食物の利用効率の上昇が関与していること、48時間絶食下の血漿コルチコステロン濃度変動パターンは24時間絶食群と差異はなく、従来の研究により2日間絶食は負荷条件として中程度にあること、転写後修飾、翻訳制御、翻訳後修飾などの段階でNPY合成がコントロールされている可能性がある

ことなどを回答した。次いで吉岡充弘教授から周期的制限給餌下におけるラットの摂食量と体重の変化、NPYmRNA量とNPY濃度の変動パターンの相違の解釈、室傍核におけるCRH合成に関するNPYレセプターのサブタイプと細胞内伝達系、給餌性リズムの振動中枢に関する質問があった。申請者は周期的制限給餌を行うと最初は摂食量も体重増加率も低下するが、1週間ほどで体重増加率は回復すること、転写後修飾の段階に給餌性リズム信号が入っている可能性があること、NPYレセプターには5つのサブタイプが知られており、そのうちのY1とY5の2つのサブタイプが関与していること、給餌性リズムの振動中枢は孤束核、あるいは迷走神経を孤束核に投射している胃腸管に存在する可能性があることを回答した。また本間研一教授から行動の種類と給餌前ピークの形成、本研究の医学的意義に関する質問があった。申請者は自発行動などの輪回し行動以外でも給餌前ピークがみられること、摂食障害などでみられる行動や内分泌系の変化を理解するうえで意義のあることなどを回答した。最後に富樫広子講師から給餌性リズムに関与している孤束核内部位に関する質問があった。申請者は胃腸管から孤束核に投射されている迷走神経が今後の研究対象になることを回答した。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の内容を引用し、妥当な回答を行った。

本論文は、孤束核におけるNPY合成が周期的制限給餌下で特異的に亢進することを実証し、弓状核ニューロンとの相違を明確に示した点が高く評価され、今後の生物リズムの振動機構の解明に役立つものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や修得単位なども考え併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに、十分な資格を有するものと判定した。