

絶食により増加する走行運動に対するレプチンの抑制効果

成田和巳

Inhibitory Effect of Leptin on the Fasting-Induced Increase in Running Activity

Kazumi NARITA

Abstract

In this study, the inhibitory effect of leptin injection into the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) on fasting-induced increase in running activity was examined in the rat. Rats implanted with the cannulae into the VMH bilaterally were kept in a cage with running wheel and subjected to 3-day fasting. In fasted rats, running wheel activity progressively increased in both light and dark period. Injection of leptin into the VMH previous to the onset of dark phase or following the onset of light period inhibited the amount of running activity over 12-hr. The results of this study suggest that leptin acts on the VMH to mediate the fasting-induced increase in running activity.

Keywords: leptin レプチン, ventromedial nucleus of the hypothalamus 視床下部腹内側核
fast 絶食, running activity 走行運動

1. 緒言

ラットに長期間の絶食を行うと明期および暗期の走行運動が著しく増加する。このような行動変化の目的は、走行運動を増加することにより食物と遭遇する可能性を高くし生存の可能性を上昇させることであり、進化の過程で動物が採用したある種の環境適応戦略と考えられる。そしてそのような行動変化を引き起こすための神経機構が脳内に存在するのは間違いない。そのような神経機構に必要な機能は、絶食に伴う体内の栄養状態を感知できること、そして走行運動の増加を引き起こすことが出来る制御機構である。

視床下部腹内側核 (VMH) を予め破壊した実験動物のラットでは、絶食による走行運動の増加が観察されないことが知られている⁽¹⁾。このことから VMH は絶食による走行運動の増加に関与していると考えられる。また筆者はラットの VMH に走行運動を誘起するような神経細胞群「VMH ランニングニューロン」が存在することを明らかとしてきた⁽²⁾。走行運動は動物実験で脳内の様々な部位を刺激したときに観察されるが、攻撃行動や逃避行動が付随して引き起こされる。しかし VMH ランニングニューロンでは、それを刺激することにより攻撃行動や逃避行動

が付随していない走行運動のみが抽出できることから、走行運動について研究を行う上で有力な手段であると考えている。

レプチンは遺伝性肥満を引き起こす *ob/ob* マウスの原因遺伝子として発見されたタンパク質である⁽³⁾。レプチン遺伝子に変異を起こした *ob/ob* マウスでは、レプチンによる摂食抑制のシグナルが欠落するため、著しい過食に陥り肥満に至る。そしてレプチンは脂肪細胞から分泌され、脳に作用することにより摂食抑制とエネルギー消費の亢進をもたらすホルモンであると捉えられている。

また絶食によっても血中レプチン濃度は低下する⁽⁴⁾。生まれたときからレプチン遺伝子が遺伝的に欠落している *ob/ob* マウスとは異なり、正常な動物に絶食を負荷すると、徐々に血中レプチン濃度が低下する。これらのことから絶食を負荷した動物で引き起こされる走行運動の増加は、絶食により血中レプチン濃度が低下した結果、レプチンによる脳へのシグナルが減少したため引き起こされる可能性が考えられる。そしてそのような変化はレプチン投与によりレプチンを補充すれば元通りに回復するはずである。

VMHにはレプチン受容体が発現していることが報告されている⁽⁵⁾。またVMHランニングニューロンの存在については前述した。これらの事実から、レプチン受容体を介したレプチンのVMHへの直接作用と、ランニングニューロンによる走行運動の調節がリンクする可能性が考えられる。

以上の事を踏まえ本研究では、絶食により引き起こされる走行運動の著しい増加に、レプチンが関与するか、またレプチンの作用部位としてVMHランニングニューロンが関与するか検討を行った。

2. 材料と方法

2.1. 動物

動物は実験開始時に7週齢のウイスター

系成熟雄ラット（チャールスリバー、横浜）を用いた。この実験では各群それぞれ7匹、計42匹の動物を使用した。水は自由摂取、明暗は12L（5：00-17：00）、12D（17：00-5：00）、室温は摂氏22±1度で飼育を行った。手術からの回復と過度な絶食を防止するためのモニタリングとして、毎日10：00-11：00に体重と摂食量の測定を行った。本論文の動物実験は福井大学実験動物委員会において承認を受け、同大学の動物実験施設内で行った（2000-2001年実施および2015年実施の承認番号27024）。

2.2. 手術

ネブタール麻酔下（45mg/kg腹腔内投与）で、Pellegrinoらの脳地図⁽⁶⁾に従いラットを脳底固定装置に固定し、両側VMH（空間座標：AP 5.8mm、ML 0.75mm、DV -3.0mm）に薬物投与用のステンレス製の留置カニューラ（外径0.6mm、内径約0.4mm、長さ15mm）の設置を行った。留置カニューラは歯科用セメントとステンレス製の小ねじで頭蓋骨に固定した。手術後には留置カニューラ内に内栓（外径0.35mm、長さ15mm）を挿入し、血液凝固や感染の低減を図った。

手術後3日以上は床敷きを敷いた一般ケージで飼育し、体重が手術前まで回復したのを確認してから回転かごに移した。

2.3. 運動量の計測

手術からの回復確認後、回転かご（回転輪の半径30cm、幅15cm、プラスチック製）付きケージで1週間飼育し、回転かごへの馴化を行った。運動量測定のため回転かごの回転数を測定した。回転かごの回転をフォトエンコーダーにより検出（分解能は1/10回転）し、30分間の回転数をパーソナルコンピュータに記録し、その値を走行運動量とした⁽²⁾。

2.4. 絶食

回転かごには出入り口（10×10cm）を介して側室（12×12×32cm）が備わり、ラットが自由に出入りできるようになっている。

側室には水、餌を置き、自由に摂取できるようにした。回転かごへの馴化を1週間以上行い、回転かごの回転数と体重が安定したのを確認して、絶食を開始した。絶食は明期開始時刻の5:00より開始し3日間継続した。実験期間全てを通して、飲水は常時可能とした。

2.5. 薬物投与

留置カニューラからのVMH内レプチン

(PeperoTech、ロンドン) 投与は絶食3日目の明期開始直後の5:00-5:30、もしくは暗期直前の16:30-17:00に、無麻酔無拘束で行った。内栓を抜き、留置カニューラの前から約0.1mmほど先端が出るようにした薬物投与カニューラを挿入し、ハミルトンマイクロシリンジを用い約2分の時間を掛けて注入した。投与量は片側のVMHあたり500nlとし

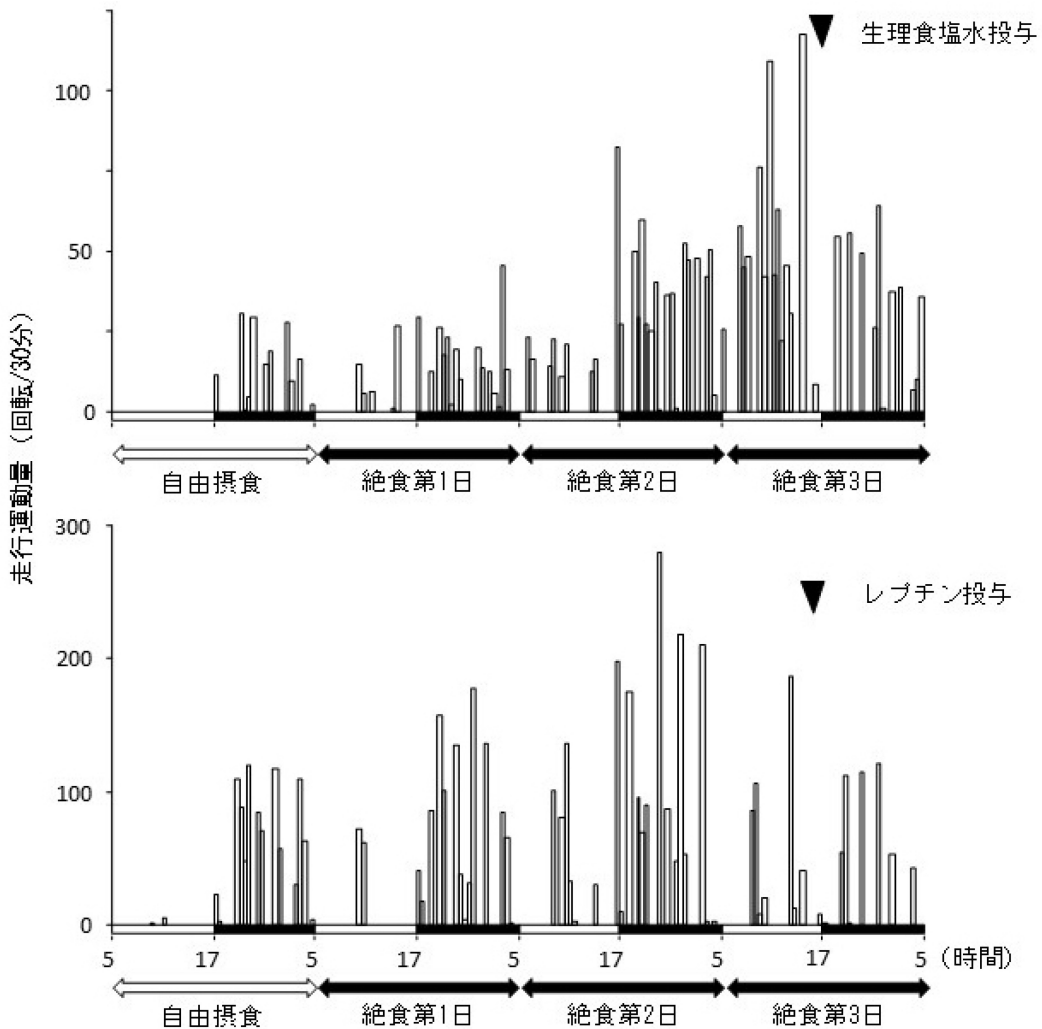


図 1. 4日にわたる経時的な運動量変化の典型例

回転かごを用いて測定した4日間にわたる走行運動量の典型例を示す。それぞれのカラムは30分間の回転かごの回転数を示す。1日目は自由摂食、そして2日目の5:00から4日目の5:00まで絶食を負荷した。絶食3日目の暗期開始直前(矢印)に生理食塩水(上段)またはレプチン(200ng)(下段)の投与を両側VMHに行った。

て両側の VMH に行った。投与は生理食塩水、生理食塩水に溶かしたレプチン (片側 VMH あたり 200ng) を行った。また偽投与では、500nl の注入以外の全ての操作を行った。ラットあたりの投与回数は 1 回のみとした。

2.6. 投与部位の確認

実験終了後に薬物投与部位の確認を行った。ラットを二酸化炭素で安楽死させてから脳を採取しホルマリンで固定した後、25 μ m 厚の連続切片を作製しチオニンで染色した。染色した脳切片を光学顕微鏡下で観察し、薬物投与部位の特定を行った。この実験では使用した全てのラットにおいて、薬物投与部位が VMH 内にあることを確認した。

2.7. 統計

データは平均値 \pm 標準誤差とし、まず分散分析法 (ANOVA) を行い、さらに Tukey-Kramer の検定により統計学的な評価を行った。p<0.05 において有意差ありと判定した。

3. 結果

ラットは夜行性の動物のため、回転かごで飼育すると夜間に著しい運動量の増加が認められた (図 1)。手術から回復し、回転かごへの馴化期間をおいてから絶食を開始した。あるラットの回転かごの回転数の経時的な変化を図 1 に示す。絶食を負荷すると、暗期、明期の運動量が共に増加することが示された。そして絶食 3 日目の暗期開始直前に、両側 VMH に生理食塩水 (図 1 上) もしくはレプチン (200ng) (図 1 下) の投与を行った。生理食塩水投与群では投与後の運動量の減少傾向が観察された。またレプチン投与群でも投与後の運動量の減少傾向が観察された。

絶食したラットの暗期開始直前に VMH に投与したレプチンの効果をまとめたのが図 2 になる。自由摂食時と比べ絶食開始後 2 日目の明期以降は運動量が有意に増加した。絶食 3 日目の暗期開始直前に生理食塩水を投与した群 (図 2 上) では、自由摂食時と比べ投与

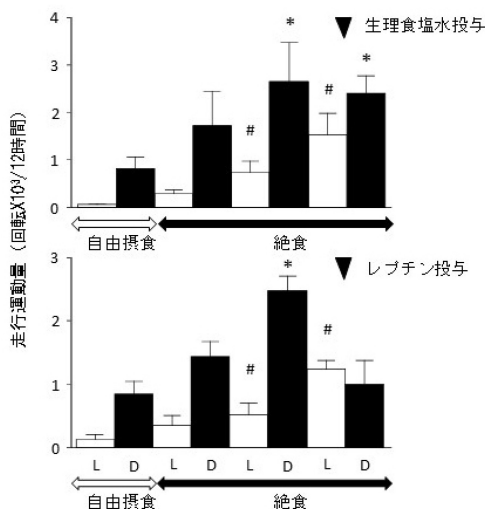


図 2. 絶食により増加した運動量に対する暗期開始直前に投与したレプチンの効果

黒カラムは暗期 12 時間、白カラムは明期 12 時間の回転かご回転数の平均 \pm 標準誤差 (n=7) を示す。2 日目の 5:00 から 3 日間にわたる絶食を負荷した。絶食 3 日目の暗期開始直前 (矢印) に生理食塩水 (上段) またはレプチン (200ng) (下段) の投与を両側 VMH に行った。L: 明期、D: 暗期を示す。* は自由摂食時の暗期運動量と、# は自由摂食時の明期運動量と比べ有意 (p<0.05) に増加していることを示す。

直後の暗期において運動量の増加は維持された。一方、レプチンを投与した群 (図 2 下) では、投与直後の暗期運動量は自由摂食時の暗期運動量と同等のレベルまで低下した。

絶食により増加した運動量に対する、明期開始直後に VMH に投与したレプチンの抑制効果を図 3 にまとめた。絶食 3 日目の明期開始直後に生理食塩水を投与した群 (図 3 上) では、自由摂食時と比べ投与の明期および暗期において運動量の増加は維持された。一方、レプチンを投与した群 (図 3 下) では、投与後の明期運動量は自由摂食時の明期運動量と同等のレベルまで低下した。またこのレプチンの運動量抑制効果は、レプチン投与から 12 時間経過後から始まる暗期においても

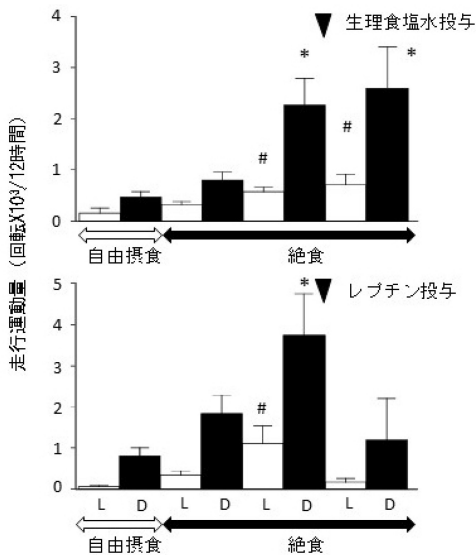


図 3. 絶食により増加した運動量に対する明期開始直後に投与したレプチンの効果

黒カラムは暗期 12 時間、白カラムは明期 12 時間の回転かごの回転数の平均 ± 標準誤差 (n=7) を示す。2 日目の 5:00 から 3 日間につながる絶食を负荷した。絶食 3 日目の明期開始直後 (矢印) に生理食塩水 (上段) またはレプチン (200ng) (下段) の投与を両側 VMH に行った。L: 明期、D: 暗期を示す。* は自由摂食時の暗期運動量と、# は自由摂食時の明期運動量と比べ有意 (p<0.05) に増加していることを示す。

観察され、自由摂食時の暗期運動量と同等のレベルまで抑制された。

投与後 12 時間の走行運動量に対する、偽投与、生理食塩水、レプチン投与の効果を図 4 にまとめた。偽投与群と比べると、暗期開始直前 (図 4 上) に VMH へ生理食塩水を投与すると、その後の暗期 12 時間の運動量は有意に抑制された。生理食塩水は 500ml 投与しているので、この量の液体を投与すること自体が運動量に対し何らかの抑制効果を発揮していることになる。そして同量の生理食塩水にレプチン 200ng を溶かした溶液を投与すると、生理食塩水投与群と比べさらに有意な抑制効果が見られた。同様の生理食塩水お

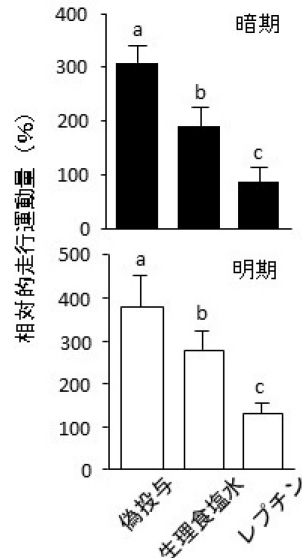


図 4. 絶食により増加した運動量に対するレプチンの抑制効果のまとめ

縦軸は自由摂食での暗期 12 時間 (上) もしくは明期 12 時間 (下) の運動量を 100% としている。上段では、絶食 3 日目の暗期開始直前に投与等の処置を行い、その直後の暗期 12 時間の運動量を比率で表している。下段では、絶食 3 日目の明期開始直後に処置を行い、その直後の明期 12 時間の運動量を比率で表している。各処置群のアルファベットが異なる場合は有意差有り (p<0.05) を示す。

よびレプチン投与の運動量に対する抑制効果は、明期開始直後 (図 4 下) に投与した時にも観察された。

4. 考察

本研究の結果より、絶食による運動量の増加は VMH にレプチンを投与すると抑制されることが示された。

レプチンは脂肪細胞が分泌するホルモンで、その分泌量は脂肪細胞の大きさと正の相関があることが明らかとなっている⁽⁴⁾。また肥満の個体では血中レプチン濃度は高く、逆に痩せた個体では低くなる^(7, 8)。本研究では血中レプチン濃度の測定を行っていない

が、絶食により血中レプチン濃度は低下することは既に報告されている⁽⁹⁾。そして絶食を負荷したラットのVMHにレプチンを投与したが、そのような個体では血液を含む全身のレプチン濃度は絶食により低下しているが、レプチン投与によりVMH近傍のレプチン濃度のみが高くなった状態であると考えられる。そのような処置により、絶食により増加していた運動量が抑制される結果が得られた。このことから絶食により増加する運動に対し、VMHの神経機構とそれに対するレプチンの作用は、極めて重要な役割を担っていることが示唆された。

絶食により増加する運動量に対し、VMHに投与したレプチンは明期、暗期ともに抑制効果を発揮した。ラットは夜行性の動物で、運動の発現パターンは概日リズムに従っている。レプチンが運動の発現に対し暗期、明期共に抑制作用を発揮したということは、レプチンの作用は概日リズムとは共役しないような独立した作用機序の可能性が考えられる。概日リズムは視床下部視交叉上核が担っているが⁽¹⁰⁾、その部位とレプチンとの関連も興味深いものであろうと考えている。

レプチン受容体はVMHも含めて視床下部に広範に発現していること、また中枢神経系だけでなく肝臓、腎臓、肺といった末梢組織にも存在していることが報告されている⁽⁴⁾。そして脂肪細胞から血中に分泌されたレプチンは、そのようなVMHを含む様々な部位に存在する受容体を介して作用を発現する。本研究ではVMHに注目してレプチンの効果を検討したが、このようなレプチンの効果はVMH以外の部位においても観察できる可能性は考えられる。このようなVMH以外の部位の関与に関しては、さらなる検討が必要である。

緒言で述べたとおり、筆者はこれまでの研究で、VMHに走行運動を誘起するような神経細胞群「VMHランニングニューロン」が

存在することを明らかとしてきた。そしてVMHランニングニューロンの活動を調節する様々な物質を突き止め、VMHランニングニューロン由来の走行運動が担っている役割を解明してきた。今回の研究により、VMHランニングニューロンはレプチンを介して個体の栄養状態に関する情報の入力を受け、走行運動発現を制御していること、特に絶食下での生存の可能性を上げるためであると考えられる運動量の増加に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

5. まとめ

絶食下におかれたラットでは、走行運動が著しく増加する。本研究により、この行動変化を説明する機序として、絶食により白色脂肪細胞が減少し血中レプチン濃度が低下する。それがVMHランニングニューロンを刺激し、走行運動の増加を引き起こしている可能性が示唆された。

6. 謝辞

本研究はJSPS科研費15K08204の助成を受けたものである。

7. 参考文献

- (1) Challet E et al, Behav Brain Res, 1996, vol 77 (1-2), pp155-163.
- (2) Narita K et al, Physiol Behav, 2016, vol 164, pp107-112.
- (3) Chen K et al, Nat Med, 2006, vol 12 (4), pp425-32.
- (4) Ahima RS et al, Annu Rev Physiol, 2000, vol 62, pp413-437.
- (5) Seamon M et al, Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, vol 317 (4), E586-E596.
- (6) Pellegrino LJ et al, A stereotaxic atlas of the rat brain, 1967.
- (7) 松岡直樹他, 別冊医学のあゆみ, 1999,

pp49-53.

- (8) 勝浦五郎, Bio Clinica, 2002, vol 17 (2), pp62-65.
- (9) Ahima RS et al, Nature, 1996, vol 382, pp250-252.
- (10) Krout KE et al, Neuroscience, 2002, vol 110, pp73-92.