【304】

氏　名（本籍）	相川志都（茨城県）（あいかわしづ）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博甲第 5118 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	**Effects of Neuropeptide B on feeding behavior are influenced by Stress Responses mediated by Corticotropin-releasing Factor** （ニューロペプタイド B の摂食行動に対する効果はコルチコトロピン放出因子によるストレス応答に影響を受ける）

主　査	筑波大学教授	薬学博士	幸田幸直
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	福島　敬
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	髙橋伸二
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	石黒浩毅

論文の内容の要旨

（目的）

摂食量の低下は哺乳動物においてストレス応答時にしばしばみられる現象である。ストレス応答において重要な役割を果たすコルチコトロピン放出因子（CRF）はストレス状況下の食欲不振にも関与すると考えられている。しかしながら摂食行動は様々な神経伝達物質・神経調節物質の関与する複雑な系によって制御されており，ストレス状況下の摂食行動を制御する因子は他にも存在すると考えられる。

Neuropeptide B（NPB）は orphan G protein-coupled receptors（GPCRs）としてクローニングされた neuropeptide B/W receptor-l（NPBWRl）と neuropeptide B/W receptor-2（NPBWR2）の内因性リガンドとして，2002 年に同定された神経ペプチドである。NPBWR1 は，摂食行動・エネルギー恒常性の維持に対する効果が報告されている。NPBWRl はまた，恐怖や不安などの嫌悪系情動やストレス応答と関係が深い部位に強く発現している。NPB は摂食行動に対し二相性（暗期投与後 2 時間の摂食促進とその後の摂食抑制）の効果を示すことが知られており，また NPB は CRF との同時投与により暗期の摂食抑制効果が増強することが報告されている。これらのことから，NPB の効果が内因性 CRF の活性により影響を受ける可能性，ならびに NPB の遅発性摂食抑制効果が NPB が CRF を誘導することにより生じるという可能性を探るため，CRF 受容体非選択的拮抗薬であるアストレシン存在下での NPB 脳室内投与の摂食行動に対する効果を検討した。また，手術侵襲後にも同様の検討を行った。

（対象と方法）

C57BL/6J マウスの雄（9-14 週齢）に対し右側脳室に脳室内投与カテーテルを留置した。NPB は明期（10 時）・暗期（20 時）に投与した。アストレシンの前投与は NPB 投与 15 分前に行った。手術侵襲は，明・暗期でペントバルビタール麻酔下に腹部正中切開し，脳室内投与は麻酔の影響を除外するため手術終了から 24 時間後に行った。すべての群で NPB 投与後 5 時間の摂食量を測定した。NPB の鎮痛効果が手術侵襲後の摂食行動に及ぼす影響を除外するために，1 時間の拘束ストレス後に NPB を投与したマウスでも同様に摂食量

を測定した。

手術侵襲とストレス応答の関係を探るため，術後の *CRF* mRNA 量を定量的 real-time RT-PCR 法で，血清コルチコステロンの測定を ELISA 法で行った。手術侵襲前・手術直後（0h）・1h・4h・24h にマウスの全脳から RNA を抽出し mRNA の相対量を測定し，血清コルチコステロンは心臓穿刺により *CRF* mRNA 量測定と同時刻に全血を採取した。手術侵襲が NPB の発現量に影響を与える可能性を探るため，術後の *NPB* mRNA 量を *CRF* mRNA 量測定と同様の時間経過で測定した。また，NPB が CRF を誘導する可能性を探るため，3nmole NPB の脳室内投与前，投与後 1h・3h で *CRF* mRNA 量を測定した。

（結果）

明期の NPB 投与は摂食量に影響を与えなかった。アストレシンを前投与すると，3 nmole の NPB は軽度ではあるが有意な摂食促進効果を認めた。暗期には 3 nmole の NPB が摂食抑制効果を示したが，その効果はアストレシン前投与により消失した。

明期の手術侵襲後には，0.3 nmole ならびに 1 nmole の NPB は摂食促進効果を認めたが，その効果は 3 nmole では消失し，5 時間累積摂食量と NPB 用量はベル型の関係となった。アストレシンの前投与は NPB の摂食促進効果に影響を与えなかった。暗期の手術侵襲後は通常の暗期の NPB 投与に比して 0.3 nmole，1 nmole，3 nmole で用量依存的に強い摂食抑制効果を示した。しかし，アストレシンの前投与によりその作用は反転し，1 nmole をピークにした摂食促進効果が認められた。拘束ストレスを 1 時間行った後に NPB 投与を行った群では，明期手術後と同様の摂食促進作用が認められ，0.03 nmole 投与時に有意差を認め，より高濃度の NPB では作用は消失した。

手術侵襲後の *CRF* mRNA 量は術直後から 4 時間で有意に上昇しており，血清コルチコステロンは 24 時間を通して高値を示した。術後の *NPB* mRNA 量は 24 時間を通し平常時に比して 2 倍以上の高値となった。

3 nmole の NPB 投与後の *CRF* mRNA 量は投与前と比して 1 時間後，3 時間後ともに有意に上昇していた。3 時間後には生食投与群に比しても有意に上昇を認めた。

（考察）

この研究は，NPB の摂食行動に対する効果が内因性 CRF に大きく影響を受けていることを示している。CRF 受容体非選択的拮抗薬であるアストレシンは，明期には NPB の摂食促進効果を明らかにし，暗期には NPB の摂食抑制効果を消失させた。NPB の作用が明期・暗期で異なるのは，内因性 CRF の日内リズムによるものと考えられる。

明期手術後には NPB に摂食促進効果が認められた。NPB の炎症性疼痛に対する鎮痛効果が関与している可能性も考えたが，疼痛を伴わない拘束ストレスでも，同様の摂食促進効果が認められた。この摂食促進効果はアストレシンの前投与により変化せず，拘束ストレス後も同様の効果が認められることから明期のストレス状況下の摂食促進効果には CRF 以外の因子が関与していると考えられる。どちらのストレスでも高濃度の NPB では効果が減少し，特に 1-3 時間後の摂食量が減少する傾向が見られた。NPB 投与が *CRF* mRNA を誘導したという結果と，NPB と CRF の同時投与がきわめて強い摂食抑制効果を惹起するという報告とあわせて考えると，投与数時間後からおこる摂食量の減少は，NPB と誘導された CRF の相互作用によると考えられる。

暗期手術後の NPB の摂食抑制効果は通常時に比してより顕著であった。手術後の *CRF* mRNA 量ならびに血清コルチロステロンの値が上昇している事，アストレシンで摂食抑制効果が消失し，むしろ NPB の摂食促進効果が明らかになる事を考え合わせると，強い摂食抑制は NPB と CRF との相互作用によると考えられる。

ストレス状況下における内因性 NPB と摂食行動の制御の関係を調べるために，術後の経時的 *NPB* mRNA 量を測定し，その上昇を確認した。ストレスにより NPB の発現が増加することと，NPB の脳室内投与で

CRF が誘導された結果を考慮に入れると，NPB/NPBWR1 と HPA axis は互いに活性を促進しあう関係にあると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，Neuropeptide B（NPB）の効果が内因性コルチコトロピン放出因子（CRF）の活性により影響を受ける可能性，ならびに NPB の遅発性摂食抑制効果が NPB が CRF を誘導することにより生じるという可能性を探るため，CRF 受容体非選択的拮抗薬であるアストレシン存在下での NPB 脳室内投与の摂食行動に対する効果を検討したものである。

その結果，内因性 CRF の活性が NPB の効果に大きく影響を与えることが示され，ストレスによる *NPB* mRNA の上昇は，生体内で NPB がストレス時の摂食行動を制御する可能性を示唆するものであり，NPB 投与による *CRF* mRNA の上昇と考え合わせると，NPB/neuropeptide B/W receptor-1 系とストレスは互いに活性を増強しあう関係にあると考えられることを見出したものである。

このことは，ストレス状況下の摂食行動を制御する因子に関連する議論に重要な知見を提供したものと評価できる。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。