

<平成25年度助成>

新規成長遅延モデル動物を用いた 成長キャッチアップフードの探索

浮 穴 和 義

(広島大学大学院総合科学研究科生命科学研究領域)

1. 緒 言

生後の成長や発達は、脳下垂体で作られる成長ホルモン (GH) やその標的組織である肝臓で合成されるインスリン様成長因子 (IGF-1) の働きによるところが大きい。GHの合成・分泌の調節を行っているのが間脳視床下部領域で産生される成長ホルモン放出促進ホルモン (GHRH) やその拮抗作用を有するソマトスタチンである。GHやGHRHの分泌が十分に行われない場合やそれらの受容体変異がある場合、成長ホルモン分泌不全性低身長症が生じる¹⁻³⁾。臨界期での治療を逃すとその後の成長に重大な影響を及ぼすことが一般的に知られている。

我々は、脳下垂体ホルモン分泌に関わる視床下部ホルモン研究^{4,5)}を経て、未知の視床下部因子の探索を目指して研究を開始した。その結果、鳥類(ニワトリ)や哺乳類(ヒト、ラット、マウス)において間脳の視床下部に特異的に発現している新規遺伝子を最近発見した⁶⁾。この視床下部領域は、ラットでは弓状核を含んだ部位であり、摂食調節中枢のひとつである。絶食、肥満モデル、糖尿病モデル動物を用いた遺伝子発現解析から、新規遺伝子の発現量の変動することを見出しており、エネルギーホメオスタシスに関与していると予測している。さらに、新規遺伝子から翻訳されるタンパク質には分泌性ペプチドがコードされていると推測しており、実際に前駆体遺伝子から成熟神経ペプチドが産出されることも確認している。そのC末端部分の配列から、この神経ペ

プチドを Neurosecretory protein GL (NPGL) と命名した⁶⁾。このNPGLの前駆体遺伝子をラットの視床下部へ過剰発現させると、体重、大腿骨長、筋肉量から判断した結果、成長抑制効果が認められた。さらに、脳下垂体中のGH mRNA発現が減少することから、GHの合成・分泌を抑制している可能性が考えられる。これらのことから、NPGLの働きを高めることで新規成長遅延モデル動物が産出できるのではないかと考えた。特に、冒頭の成長ホルモン分泌不全性低身長症と表現型が極めて類似していることから、成長回復のための治療薬や食品成分の探索に利用する可能性を考えた。

そこで、本研究の目的は、我々が独自の研究で発見したNPGLの過剰作用による成長遅延モデルラットを産出し、成長回復(キャッチアップ)フードを探索することとした。本研究では、前駆体遺伝子の過剰発現ではなく、NPGLを脳室内へ投与することにより成長遅延が生じるかをまず検討し、その後、高カロリー食、高脂肪食、高ショ糖食、ショ糖含有脂肪食、マクロ栄養素(炭水化物、脂肪、タンパク質)選択食を用い、どの食餌が成長キャッチアップフードとして適当かを解析することとした。それらの指標として、体重増加量、摂食量、飼料効率(体重増加量/累積摂食量)、大腿骨長を測定した。さらに、視床下部中のGHRHとソマトスタチンのmRNA発現量、脳下垂体中のGH mRNA発現量、血中のGH及びIGF-1濃度を測定し、NPGLによる成長遅延の原因について解析した。

2. 方法

2-1 実験動物・飼料

実験動物としてWistar系統の8週齢の雄ラットを用いた。

飼料は、日本クレア社とリサーチダイエツト社の製品を用いた。日本クレア社のげっ歯類用の普通食 (Normal Chow; NC) と高カロリー食 (Quick Fat; QF) の成分は非公開であった。

リサーチダイエツト社の高脂肪食 (High Fat Diet; HFD、Fat 60kcal%・Sucrose 7kcal%)、

高シヨ糖食 (High Sucrose Diet; HSD、Sucrose 70kcal%)、シヨ糖含有脂肪食 (High Fat and Sucrose Diet; HFSD、Fat 32kcal%・Sucrose 20kcal%)、マクロ栄養素飼料 (Macronutrient Diet; MD、タンパク質食 99kcal%、炭水化物食 100kcal%、脂肪食 99kcal%) の組成は表1に示す。

マクロ栄養素飼料以外は固形飼料とした。マクロ栄養素飼料は、タンパク質、炭水化物、脂肪のみからなる3種類の粉末飼料を給餌箱に個別に入れ、ラットに自由摂餌を行わせ、それぞれの摂食量を測定した。

表1 本研究で用いた飼料の組成

飼料 (略称)	普通食 (NC)	高脂肪食 (HFD)	高シヨ糖食 (HSD)	シヨ糖含有脂肪食 (HFSD)
	kcal %	kcal %	kcal %	kcal %
タンパク質	28.7	20	20	20
炭水化物	56.1	20	70	48
脂肪	15.2	60	10	32
カロリー(kcal/g)	3.45	5.24	3.85	4.4
成分	kcal	kcal	kcal	kcal
カゼイン	Confidential	800	800	800
L-システチン		12	12	12
コーンスターチ		0	0	829
マルトデキストリン		500	0	300
シヨ糖		275	2800	771
大豆油		225	225	225
ラード		2205	180	1080

飼料 (略称)	タンパク質食 (Protein)	炭水化物食 (Carb)	脂肪食 (Fat)
	kcal %	kcal %	kcal %
タンパク質	99	0	0
炭水化物	1	100	1
脂肪	0	0	99
カロリー(kcal/g)	3.6	3.6	7.2
成分	kcal	kcal	kcal
カゼイン	3685	0	0
L-システチン	55	0	0
コーンスターチ	0	1631	0
マルトデキストリン	0	590	0
シヨ糖	0	1518	0
大豆油	0	0	293
ラード	0	0	3447

2.2. 成長遅延モデルラットの産出と成長キャッチアップフードの探索

NPGLは、ペプチド合成機で合成し⁷⁾、15 nmol/dayの投与量になるように溶解し、Alzet社の浸透圧ポンプに充填した。脳室内投与カニューレを装着し、背側皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプと接続し、2週間の慢性投与を行った。12時間の明暗周期条件にて飼育し、明期と暗期の摂食量を測定した。摂食量はカロリー表示とした。

毎日、体重を測定し、体重増加量を算出した。飼料効率(体重増加量/累積摂食量)は投与開始日及び最終日の体重と累積摂食量を基に算出した。さらに、HFD、HSD、HFSD、MD給餌群では、大腿骨長を測定した。

2.3. 成長遅延の原因探索

普通食給餌のラットを用い、NPGLの脳室内慢性投与後に視床下部、脳下垂体、血液を回収した。

視床下部中のGHRHとソマトスタチン mRNA 発現量、脳下垂体中のGH mRNA 発現量をリアルタイムRT-PCR法により測定した。

さらに、血中のGHとIGF-1の濃度をELISA法により測定した。

3. 結 果

3.1. 普通食と高カロリー食給餌条件下での体重増加、摂食量、飼料効率の解析

まず、げっ歯類用の普通食(NC)給餌条件下において、成長遅延が生じるかを解析した。その結果、体重増加量がNPGL投与群で有意に低下していた(図1A)。摂食量は殆んど変化が見られなかった(図1C)。さらに、体重増加量を累積摂食量で割った飼料効率を求めたところ、NPGL投与群で有意に低いことが分かった(図1E)。

次に、高カロリー食(QF)給餌条件下でNPGLを脳室内へ2週間慢性投与したところ、体重増加は対照群と差が見られなかった(図1B)。摂食量は有意に増加していた(図1D)。飼料効率は対照

群と差が見られなかった(図1E)。

3.2. 高脂肪食、高シヨ糖食、シヨ糖含有脂肪食、マクロ栄養素食給餌条件下での体重増加、摂食量、飼料効率の解析

上記の実験3-1で使用した日本クレア社製の高カロリー食の組成が公表されていなかったため、リサーチダイエット社製の組成が公表された飼料を用い、同様の解析を行った。

高脂肪食(HFD)と高シヨ糖食(HSD)給餌条件下では、NPGL投与により有意差は無いものの対照群と比較して体重増加の抑制が観察された(図2A, B)。この時、摂食量にも顕著な変化は認められなかった(図3A, B)。

一方、シヨ糖含有脂肪食(HFSD)給餌条件下では、対照群と体重増加量は等しくなり、NPGLによる成長遅延効果がキャンセルされた(図2C)。この時、摂食量は有意に増加した(図3C)。

次に、マクロ栄養素食(MD)選択給餌条件下においてNPGLを脳室内へ慢性投与した結果、対照群と比較して体重増加に差は見られなかった(図2D)。摂食量は有意に増加した(図3D)。このマクロ栄養素食は、個別の容器に粉末飼料として与えたが、タンパク質食、炭水化物食、脂肪食の内、炭水化物食の摂食量が増加傾向であり、総摂食量は有意に増加していることが明らかとなった(図4)。

上記の各々の飼料を与えた時の、飼料効率と大腿骨長を測定したところ、HFD、HSD、HFSD給餌条件では飼料効率が有意に低下していた(図5A)。大腿骨長は、HFD給餌条件下では有意に短かったが、それ以外の給餌では有意な変化は見られなかった(図5B)。

3.3. 成長遅延の原因探索

最後の実験として、普通食給餌条件下でのNPGL投与における成長遅延の原因を探るために、成長ホルモンの合成・分泌に着目して解析を行った。

視床下部領域におけるGHRHとソマトスタチン mRNA 発現量、脳下垂体中のGH mRNA 発現量、血中のGH及びIGF-1濃度のいずれにおいても対照群と比較してNPGL慢性投与群で差は認められなかった。

4. 考 察

我々の先行研究において、NPGL前駆体遺伝子の過剰発現系において成長遅延が生じることを見出ししている。このことから成長遅延モデル動物と

して利用可能であると考えた。この過剰発現法はアデノ随伴ウイルスベクターを用いた遺伝子組換え実験であり、ウイルスベクターの調整や視床下部の限局した部位への投与といった煩雑さや精巧さが求められることから、熟練した手技を必要としており、実験の再現性を得るのが難しい。そこで、本研究では、合成NPGLを用いた脳室内慢性投与実験により前駆体遺伝子の過剰発現と同様な表現型が生じるかを最初に検討した。その結果、普通食 (NC) 給餌条件下で、体重増加の抑制と飼

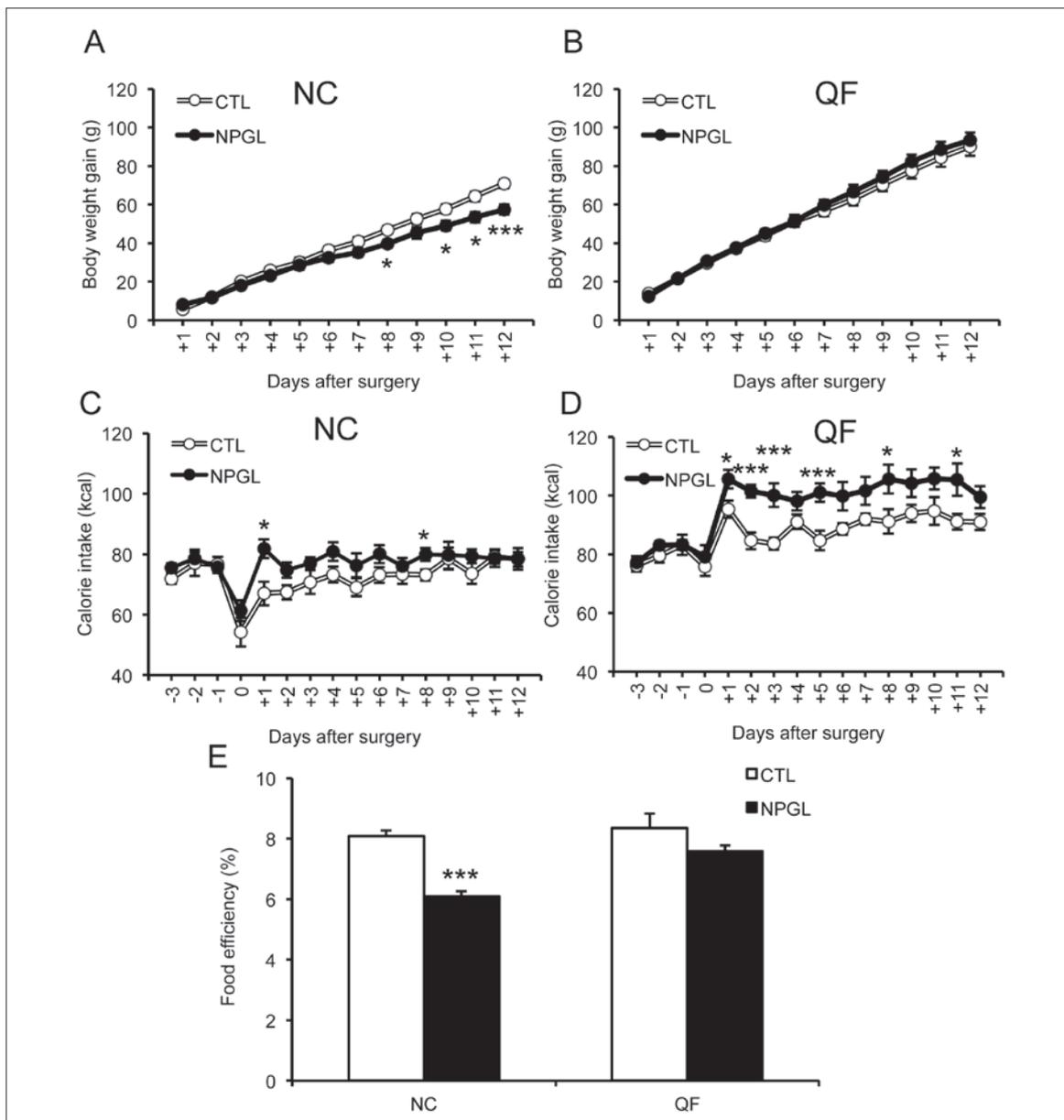


図 1. 普通食 (NC) と高カロリー食 (QF) 給餌条件下での体重増加、摂食量、飼料効率

(A) NC 給餌条件下での体重増加量、(B) QF 給餌条件下での体重増加量、(C) NC 給餌条件下での摂取カロリー、(D) QF 給餌条件下での摂取カロリー、(E) NC 及び QF 給餌条件下での飼料効率

(n = 8) * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

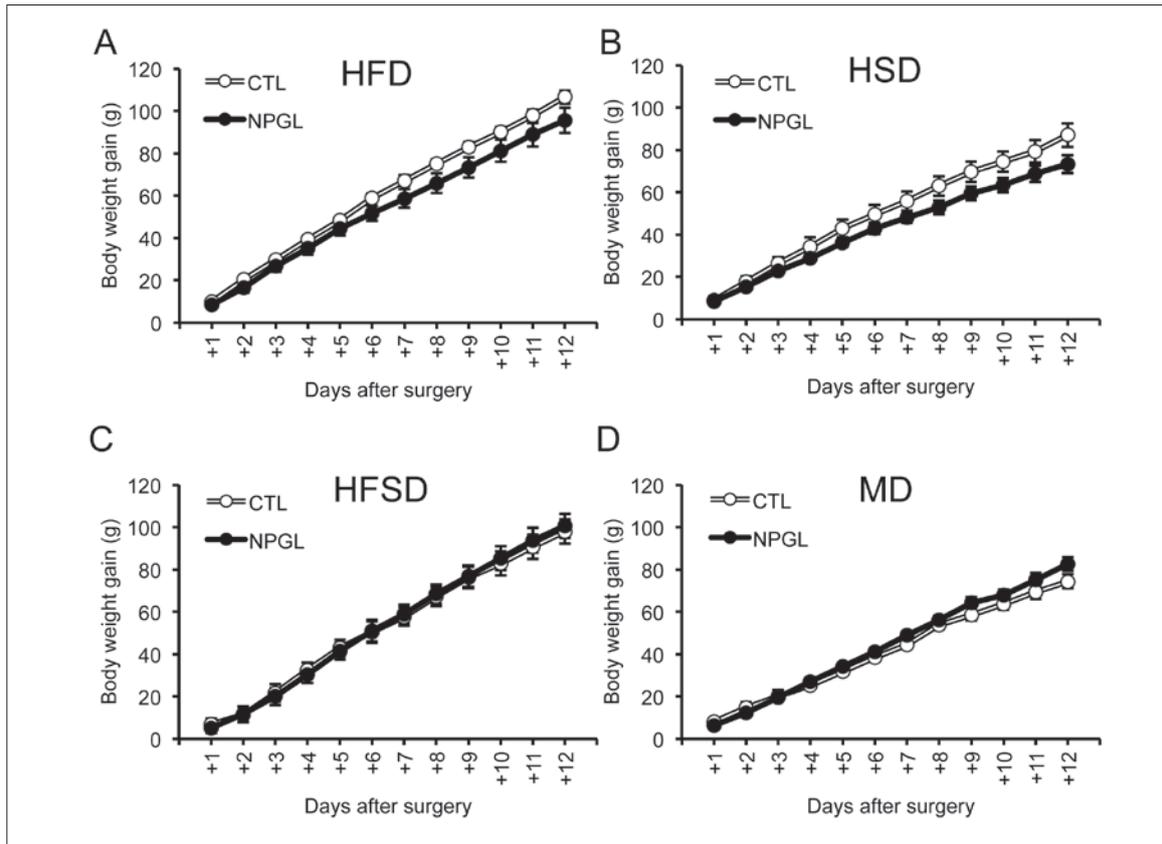


図2. 高脂肪食(HFD)、高シヨ糖食(HSD)、シヨ糖含有脂肪食(HFSD)、マクロ栄養食(MD) 給餌条件下での体重増加 (A) HFD 給餌、(B) HSD 給餌、(C) HFSD 給餌、(D) MD 給餌 (n=8)

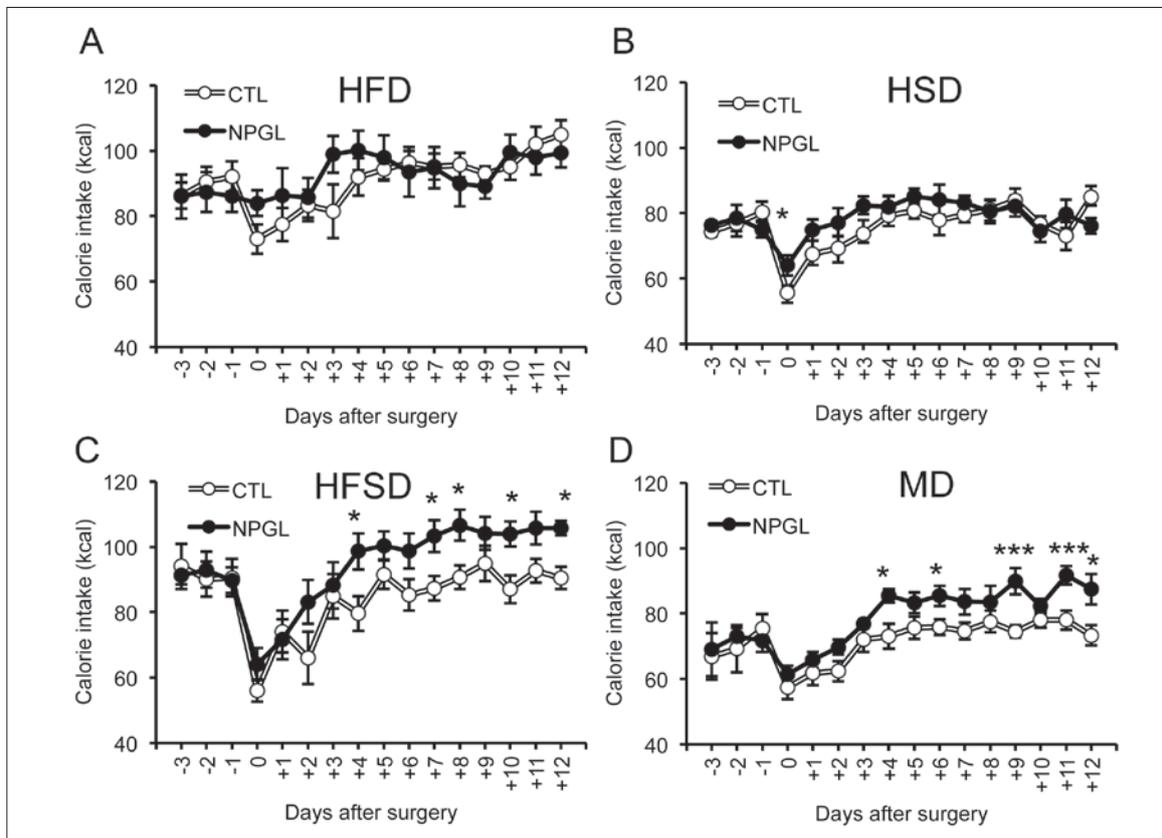


図3. 高脂肪食(HFD)、高シヨ糖食(HSD)、シヨ糖含有脂肪食(HFSD)、マクロ栄養食(MD) 給餌条件下での摂食量 (A) HFD 給餌、(B) HSD 給餌、(C) HFSD 給餌、(D) MD 給餌 (n=8) * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

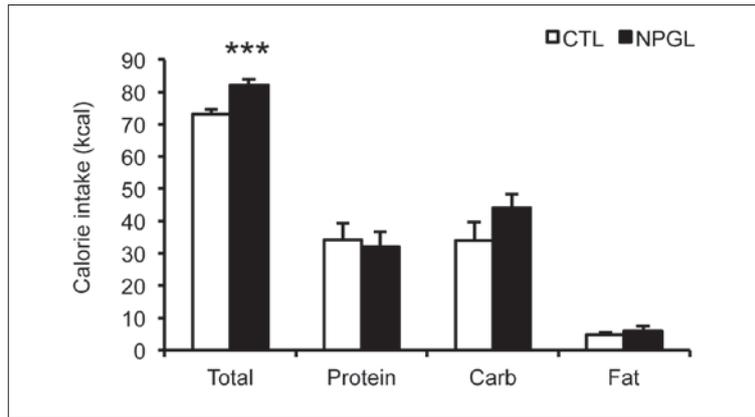


図4. マクロ栄養素食 (MD) 給餌条件下での摂食量の内訳
 総 (Total) 摂取カロリー、タンパク質 (Protein) 摂取カロリー、
 炭水化物 (Carb) 摂取カロリー、脂肪 (Fat) 摂取カロリー
 (n=8) *** $p < 0.005$

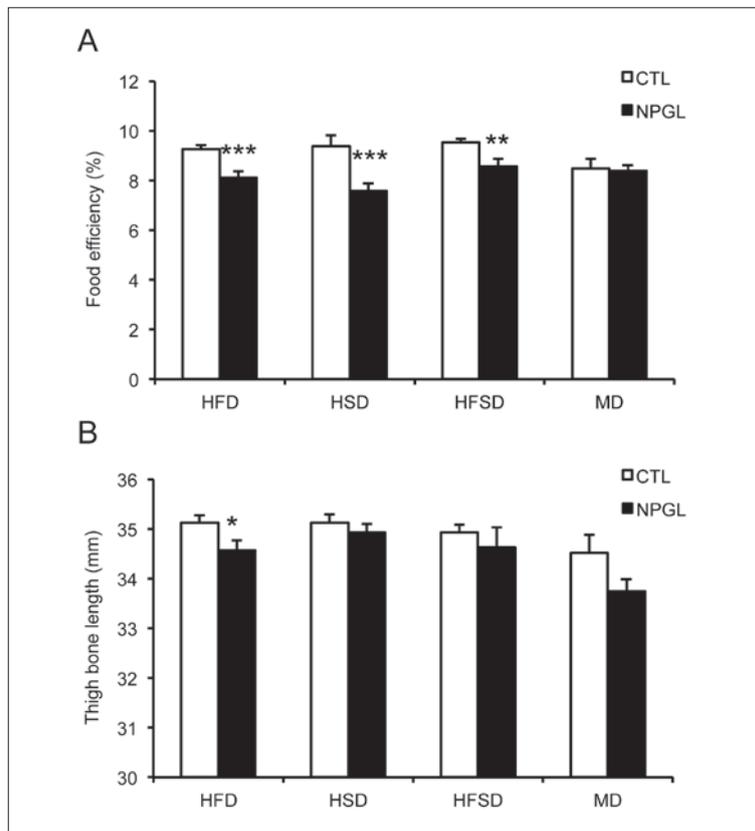


図5. 各種飼料給餌条件下での飼料効率と大腿骨長
 (A) HFD, HSD, HFSD, MD 給餌条件下での飼料効率、(B) 大腿骨長
 (n=8) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

料効率の低下が認められ、成長遅延が生じていることが確認できた。

次に、安価な高カロリー食 (QF) を用いて同様の実験を行ったところ、摂食量を増加させ、成長遅延効果をキャンセルする効果があることが認められた。残念ながら用いた QF が成分非公開の飼

料であったため、成分が公開されている高脂肪食 (HFD)、高シヨ糖食 (HSD)、シヨ糖含有脂肪食 (HFSD) を用いて解析を行った。その結果、上記の QF と同様の効果が認められたのは HFSD であった。しかしながら、飼料効率の観点からすると、HFD、HSD、HFSD 共に NPGL 投与群では

低下しており、完全な成長キャッチアップフードとは言い難い。より少ない飼料摂取で最大限の体重増加を示す飼料の同定が望まれた。そこで、最後の食餌給餌実験として、マクロ栄養素飼料による自由選択性給餌条件を用いることとした。その結果、摂食量が有意に増加し、体重増加も対照群と比べて増加傾向を示すことが分かった。これらの原因は、炭水化物食の摂食量の増加が主であると考えられる。飼料効率も、対照群と一致し、成長キャッチアップフードとしての条件を満たしていると思われる。この自由摂餌の栄養素の組成を計算したところ、タンパク質39kcal%、炭水化物54kcal%、脂肪7kcal%となった。今後、この組成からなる固形飼料を作製し、簡単に摂取できる成長キャッチアップフードとしての可能性を検討していく必要がある。

一方、NPGL前駆体過剰発現やNPGLの脳室内慢性投与によって生じる成長遅延は既知の成長ホルモン分泌不全性低身長症と比べ、何が違うのであろうか。成長ホルモン分泌不全性低身長症とNPGL作用の表現型が極めて類似していることから、成長ホルモンに着目して解析を行った。しかしながら、結果の項目で記した通り、成長ホルモンの合成・分泌を介した作用ではないことを示唆するデータが得られた。一方、先行研究からはNPGL前駆体遺伝子の過剰発現実験において、脳下垂体中のGH mRNA発現量が低下していた。過剰発現の期間が約1月半であったことから、今回のNPGL慢性投与の2週間とは作用期間が異なることが原因なのかもしれない。したがって、成長遅延のメカニズムに関しては今後の詳細な検討が必要である。

現在、巷ではダイエットのために脂質や炭水化物の制限が盛んに行われている^{8,9)}。しかしながら、成長期での無理なダイエットに関して様々な弊害が指摘されている。特に、特定の栄養素を抜くことはタンパク質合成や脂質合成、新陳代謝と

いった生命活動全般に悪影響を及ぼすことが容易に想像できる。また、発達期・成長期における栄養の偏りは、成人後の体つきや体質、さらには食嗜好性にも大きな影響を及ぼす。今回は、特に脂肪やショ糖に着目して餌組成を変更した。その結果、成長キャッチアップフードとしてベストである食餌組成は、マクロ栄養素飼料を用いた研究により明らかにできた。今後は、成長ホルモン分泌不全性成長遅延モデル動物でも同様な解析を行い、今回の知見が広く成長遅延への対処法として有益かどうかを検討したい。さらに、動物実験での知見を我々人間への応用可能かどうかについても、検討していく必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、学術研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行は、所属研究室の岩越栄子博士、近藤邦裕氏、鹿野健史朗氏、益田恵子氏らの協力によりなされたものです。この場をお借りして感謝いたします。

文 献

- 1) Toogood AA, Adams JE, O'Neill PA, Shalet SM. Body composition in growth hormone deficient adults over the age of 60 years. *Clin. Endocrinol (Oxf)*. **45**:399-405 (1996)
- 2) Laron Z, Ginsberg S, Lilos P, Arbiv M, Vaisman N. Body composition in untreated adult patients with Laron syndrome (primary GH insensitivity). *Clin. Endocrinol (Oxf)*. **65**:114-117 (2006)
- 3) List EO, Sackmann-Sala L, Berryman DE, Funk K, Kelder B, Gosney ES, Okada S, Ding J, Cruz-Topete D, Kopchick JJ. Endocrine parameters and phenotypes of the growth hormone receptor gene disrupted (GHR^{-/-}) mouse. *Endocr. Rev.* **32**:356-386 (2011)
- 4) Ukena K, Koda A, Yamamoto K, Kobayashi T, Iwakoshi-Ukena E, Minakata H, Kikuyama S, Tsutsui K. Novel neuropeptides related to frog growth hormone-releasing peptide: Isolation, sequence, and functional analysis. *Endocrinology* **144**:3879-3884 (2003)
- 5) Ukena K, Tsutsui K. A new member of the hypothalamic RFamide peptide family, LPXRFamide peptides: Structure,

- localization and function (review). *Mass Spectrom. Rev.* **24**:469-486 (2005)
- 6) Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Bessho Y, Maejima S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Tachibana T. Identification of a cDNA encoding a novel small secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamic infundibulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**:298-303 (2014)
- 7) Masuda K, Ooyama H, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Iwakoshi-Ukena E, Ukena K. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis of neurosecretory protein GL composed of 80 amino acid residues. *J. Pept. Sci.* **21**:454-460 (2015)
- 8) Stern L, Iqbal N, Seshadri P, Chicano KL, Daily DA, McGrory J, Williams M, Gracely EJ, Samaha FF. The effects of low-carbohydrate versus conventional weight loss diets in severely obese adults: one-year follow-up of a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **140**:778-785 (2004)
- 9) Cardillo S, Seshadri P, Iqbal N. The effects of a low-carbohydrate versus low-fat diet on adipocytokines in severely obese adults: three-year follow-up of a randomized trial. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **10**:99-106 (2006)

Search for catch-up foods that can promote growth in animal models of delayed growth

Kazuyoshi Ukena

Graduate School of Integrated Arts and Sciences

Hiroshima University

We recently identified a cDNA encoding a novel small secretory protein in the hypothalamus of birds and rodents and named it neurosecretory protein GL (NPGL). In rats, NPGL-producing neurons are localized to the arcuate nucleus of the hypothalamus, which is involved in the regulation of feeding behavior and energy homeostasis. NPGL mRNA expression in the hypothalamus was altered in fasted rats, streptozotocin-induced diabetic rats, and genetically obese (*fa/fa*) Zucker rats, suggesting that NPGL modulates energy homeostasis. Moreover, the overexpression of the precursor gene in the hypothalamus showed the dwarf phenotype in rats. Therefore, this animal over-expressing NPGL may be a good model for studies on the dwarf phenotype. The purpose of the present study was to determine the ideal catch-up food among various foods including high-fat foods, high-sucrose foods, foods with high contents of both fat and sucrose, and macronutrient-rich diets, which can help promote the growth of these dwarf rats.

We chronically injected NPGL into the cerebral ventricle of male rats for 2 weeks using an osmotic pump. We then fed the rats a normal chow or one of several high-calorie diets, measured their body weight and food intake, and calculated food efficiency. In the normal chow-diet group, the infusion of NPGL suppressed body weight gain, without affecting food intake. However, the injection of NPGL into the high-calorie-diet group increased food intake without suppressing body weight. These results indicated that a high calorie diet is a candidate catch-up food that can promote growth in rat models of delayed growth. Furthermore, we investigated the growth and food intake in more detail in the rats fed the different diets, and found that the macronutrient-rich diet with 39kcal% protein, 54kcal% carbohydrate, and 7kcal% fat was the most effective in preventing the dwarf phenotype.

These results suggest that chronic central infusion of NPGL in rats is a good technique to develop dwarf models for animal studies. Furthermore, a high-carbohydrate diet is a good catch-up food that can promote growth in these rat models of delayed growth.