

<平成 30 年度助成>

香辛料成分 TRPA1 アゴニストの摂食亢進作用と 食欲不振モデルマウスへの有効性

岩崎 有作

(京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 応用生命科学専攻 動物機能学)

目 的

少子高齢化社会を迎える日本にとって、高齢者の健康寿命延伸、医療費削減は解決すべき重要な課題である。加齢（高齢者）、ストレス、がん悪液質、抗がん剤治療、外科手術などによる「食欲不振」は、低栄養状態を惹起し、筋萎縮（サルコペニア）をはじめ健康状態を悪化させる。しかし、未だ有効な食欲不振改善薬は開発されていない。食べることは生命活動の根源であり、食欲不振改善こそ高齢者の健康寿命延伸、フレイル・サルコペニア・認知症の予防と改善に最も有効であると考え、本研究の長期的目標はヒトに有効な新規食欲不振改善法の確立を目指すことである。

香辛料には食欲増進作用があるとして伝承的に利用されているが、その有効成分と作用機構は不明なままである。求心性迷走神経は、脳と末梢臓器を繋ぐ内臓感覚神経であり、食欲調節に重要な役割を担う。申請者は、末梢から脳機能（食欲）に介入するための作用点として求心性迷走神経に注目している。申請者は、空腹因子（胃ホルモンの Ghrelin、低血糖）を特異的にセンスする求心性迷走神経サブクラスを発見し、この神経を活性化することにより摂食量を亢進させることを見出した（投稿準備中）。さらに、この空腹系求心性迷走神経サブクラスは香辛料に多く含まれる TRPA1（Transient Receptor Potential A1）アゴニストによって選択的に活性化されることを見出した。ニンニク中の強力な TRPA1 アゴニストである Diallyl trisulfide（DATS）をマウスに胃内投与すると短期的に摂食量が亢進し、迷走神経切断によってこの摂食亢進作用は完全に消失し

た。従って、香辛料成分の TRPA1 アゴニストが食欲不振改善に有効かもしれない。

本研究では、香辛料由来の強力な TRPA1 アゴニストとしてニンニク精油主成分の DATS を用い、DATS による空腹系求心性迷走神経の活性化が食欲不振モデルマウスの摂食量低下を改善するか、検討する。食欲不振モデルマウスとして拘束ストレスマウスと高齢マウスを用いて、DATS の摂食亢進作用を検証した。本研究成果は、香辛料成分（ニンニク DATS）が食欲不振を改善するという有用性を明らかとし、香辛料を用いたヒトに対する新規食欲不振改善を開発するための基盤研究となる。

方 法

化合物

TRPA1 アゴニストの Diallyl trisulfide（DATS、純度 97%以上）は、日本大学生物資源科学部生命化学科 細野崇先生、関泰一郎先生らが化学合成したものを分与して頂いた。Ghrelin（4373-s）は株式会社ペプチド研究所（大阪）より購入した。DATS は Ethanol に溶解し、2% DATS Ethanol 溶液、10% Tween80、88%生理食塩水の割合で混合した。対照としての Vehicle 溶液は、DATS を含まない Ethanol を用いて同様に調製した。Ghrelin は、超純水を用いて 1 mM 溶液を調製、分注後、-80℃にて保管した。実験当日、Ghrelin ストック溶液を滅菌生理食塩水に溶解させ、実験に供した。

動物

雄性 ICR マウスは日本エスエルシー株式会社（静

岡)より購入した。動物は12時間の明暗サイクル(明期7:30~19:30)条件下で室温(22±2℃)、湿度(55±10%)管理された飼養保管施設で飼育し、少なくとも1週間は順化飼育をした。飼料(CE-2、日本クレア株式会社)と水は自由摂取とした。動物実験は京都府立大学の動物実験委員会のガイドラインに従い、承認を得て実施した。

拘束ストレスモデルマウスの作製と摂食行動解析

雄性ICRマウスは、マウス用粉末給餌器(SN-950、株式会社シナノ製作所)を用いた粉末飼料(CE-2、日本クレア株式会社)とALPHA-dri(Shepherd Specialty Papers)を敷いた個別ケージ環境下で、少なくとも1週間以上、順化飼育した。加えて、実験前の数日間は、毎日ハンドリングとフィーディングニードル(FG4202、有限会社フチガミ器械)を用いた経口投与トレーニングを実施した。9週齢の雄性ICRマウスを一時的に拘束するために、100 mLチューブ(2355-100、AGCテクノグラス株式会社)に厚さ2 mmのシリコンラバーを2周分、加えて頭部分にさらに1周分詰めた拘束器具を作製した。17時に、ad lib条件下のマウスをこの器具に入れ、2時間(17:00~19:00)拘束ストレスを与えた。対照の非拘束ストレス群は、この2時間は、絶食のみをした。19:15よりDATS溶液(100 µmol/kg、5 ml/kg)もしくはVehicle溶液(5 ml/kg)をマウスに経口投与し、19:30より経時的に摂食量を測定した。

加齢(10ヶ月齢)マウスを用いた摂食行動解析

9匹の雄性ICRマウスを、個別ケージ、ad lib条件下で10ヶ月齢まで飼育した。10ヶ月齢のICRマウスを対象に、Ghrelinによる摂食亢進作用を検討した。9:30、ad lib条件下のマウスにGhrelin(30 nmol/kg)もしくはSaline(5 ml/kg)を腹腔内投与し、摂食行動を解析した。本解析は交差試験法にて解析し、その間の休息期として1週間設けた。次いで翌週より、DATS(100 µmol/kg)経口投与後の摂

食行動を解析した。方法と時間行程は、前述のGhrelin実験と同様で、交差試験法にて実施した。

結果・考察

DATSは拘束ストレスマウスの食欲不振を改善する

食欲不振はストレスによっても惹起される。齧歯動物を用いたストレス実験において、一時的な拘束ストレス負荷は摂食量低下を誘導する。そこで、拘束ストレス負荷によるストレス誘発食欲不振マウスを作製し、食欲不振状態のマウスに対してDATSの摂食亢進作用が有効であるか、検証した。

暗期前の2時間の拘束ストレスが摂食量に与える影響を調べた。拘束ストレスを与えたマウス(Vehicle経口投与)の累積摂食量は、非拘束ストレス群(Vehicle経口投与)と比較して、暗期直後の0.5時間から14時間まで有意に低値を示した。拘束ストレスマウスにDATS(100 µmol/kg)を経口投与すると、投与後0.5時間から3時間まで摂食量を増加させ、その摂食量は拘束ストレスを与えていないマウスの摂食量まで回復させた。DATS投与6時間後の摂食量は増加する傾向にあったが、投与14時間後の摂食抑制に対して改善効果は観察できなかった。

DATSはグレリン抵抗性を呈する加齢マウスの摂食量を亢進させる

加齢に伴う食欲不振は、ヒトやマウスで観察されている。加齢マウス(17~25ヶ月齢)は、若年マウス(2~3ヶ月齢)と比較して、1日摂食量が低下しており、この時、摂食亢進性胃ホルモンのGhrelinの血中濃度は若年マウスと同程度で、Ghrelin末梢投与による摂食亢進作用が消失していることが報告されている^{1,2)}。従って、加齢に伴う摂食量低下の原因として、Ghrelinの摂食亢進作用が減弱した「Ghrelin抵抗性」の関与が示唆されている。本研究では、Ghrelin抵抗性を示した加齢マウスにおいてもDATSは摂食量を亢進させることができるのか、検証した。

2.5ヶ月齢と10ヶ月齢のICRマウスを用いて、加齢に伴う Ghrelin 投与後の摂食亢進作用（Ghrelin 抵抗性）について検証した。10ヶ月齢のICRマウスは、2.5ヶ月齢と比較して、有意な体重増加に対して、1日摂食量は同程度であり、その結果、体重あたりの摂取エネルギー量が低下していた。2.5ヶ月齢マウスで観察された Ghrelin (30 nmol/kg, ip) の摂食亢進作用は、10ヶ月齢マウスでは全くみられなかった。従って、10ヶ月齢のICRマウスは Ghrelin 投与による摂食亢進作用が消失し、Ghrelin 抵抗性を示した。

2.5ヶ月齢と Ghrelin 抵抗性を示した10ヶ月齢のマウスを対象に DATS 経口投与による摂食亢進作用を検証した。DATS (100 μ mol/kg) の経口投与は、2.5ヶ月齢と10ヶ月齢のマウス共に、投与後0.5～3時間まで摂食量を有意に亢進させた。

結 語

我々はニンニク由来 TRPA1 アゴニストの DATS が、求心性迷走神経を介して摂食量を亢進させることを見出していた。本研究では、DATS の食欲不振モデルマウス（拘束ストレスマウス、加齢マウス）に対する摂食亢進作用を検証した。その結果、DATS の摂食亢進作用は、拘束ストレス性食欲不振マウス及び加齢 Ghrelin 抵抗性マウスに対して有効であった。以上の成果より、TRPA1 アゴニスト (DATS) の求心性迷走神経を介した摂食亢進作用は、食欲不振に対する治療に応用できる可能性が示された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりまして、公益財団法人浦上食品・食文化振興財団にご支援を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Takeda H et al. Endocrinology 2010.
- 2) Miyazaki Y et al. Mol Nutr Food Res 2014.

Orexigenic effect of TRPA1 agonist in model animals showing anorexia

Yusaku IWASAKI

*Laboratory of Animal Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences,
Kyoto Prefectural University*

Aging, stress, and some therapies (surgery and anticancer agent) reduce appetite, and hypophagia exacerbates health conditions. However, there is no effective therapeutic medicine for treating eating disorder. Recently, we demonstrated that diallyl trisulfide (DATS), which is a potent TRPA1 agonist and is one of the characteristic ingredients in garlic, increases food intake via direct interaction with vagal afferent nerves in healthy mice. In this study, we examined the orexigenic effect of this TRPA1 agonist in model animals showing anorexia. Oral administration of DATS increased food intake in both anorexigenic model mice induced by restraint stress and aged mice showing ghrelin-resistance. Therefore, TRPA1 agonists such as DATS are expected to be effective compounds in the improvement of anorexia.