

# 嗜好性行動の脳内機構解明

動物生理制御研究チーム（課題番号：127106）

研究期間：平成 24 年 7 月 26 日～平成 25 年 3 月 31 日

研究代表者：入江圭一 研究員：佐藤朝光

## 【研究概要】

### 1. 研究開始当初の背景

近年、日本人の脂質摂取量は増え続け、必要以上の脂質の摂取は肥満や生活習慣病を招く一因となっている。国民健康・栄養調査によれば、60 歳代において、高血圧・高脂血症である人が 60% となっており、食習慣が起こす問題は既に顕在化している。一度、形成した食の好みを制御するのは容易ではないため、より簡便な食習慣の改善法や補助する食品や薬品の開発が必要である。そこで、申請者らは脂肪を好んで食べるようになる動物を作製し、脂肪を好んで食するようになるまでの過程を解明し、その一助としたいと考えた。

食の嗜好性は、日々、どのような食に触れてきたかにより影響を受けるため、必要以上の脂質の摂取は食の嗜好性に影響を与える。脂質の嗜好性は、肥満形成を加速すると考えられるが、脂質の摂取と嗜好性の制御について、その機構の詳細は明らかにされていない。脂質の代謝産物の中で 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) は脂質メディエーターの 1 つとしてはたらいっており、成熟動物において、脂質の摂取により、その体内量が上昇する (British Journal of Pharmacology, 2009)。

2-AG などの脂質メディエーターは、日々の食事の積み重ねにより、その体内量が変化する生理活性物質である。

研究代表者らは、これまでに高脂肪食 (F2HFS1: オリエンタル酵母) を 1、3、7 日間摂取し続けたマウスは、脂肪を好んで摂食するモデルとして有用であることを確認し、脂肪を好んで食べることに脳内 2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) 量に関わることを証明した (Behav Brain Res 216 (1) :477-480, 2011, J Pharmacol Sci 112 (3) :369-72, 2010)。

以上のことから、本研究は、脂肪を好んで食べる性質が形成される際に起こる脳内環境の変化を検出し、嗜好

性形成過程における役割を明らかにすることを目的として実施した。

### 2. 研究の目的

本研究は、嗜好性形成時の脳内環境の変化を検出する目的で実施した。そのために、1) . 高脂肪食摂食時の脳内 2-AG 量の変化を期間による違いを測定した。2) .

また、このときの脳内変化を網羅的に捉える目的で、DNA マイクロアレイによる RNA の変化を測定した。このときの嗜好性形成過程を条件づけ場所嗜好性試験により測定した。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 実験動物

本実験では、ICR 系雄性マウス (紀和、和歌山) を用いた。マウスは、プラスチックケージの中に、室温  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル (7:00AM 点灯) の動物室で飼育した。なお、餌は CE-2 (クレア、東京) を使い、水は自由に摂取できるようにした。実験動物の取り扱い、福岡大学動物実験委員会 (Experimental Animal Care and Use Committee) 規程に準じた。

#### 3-2. 実験に使用した高脂肪食

餌は、標準食 (蛋白、25% ; 炭水化物、51% ; 脂肪、5% ; 総カロリー、347 kcal/100g ; Standard Diet, SD, CE-2 ; 九動)、高脂肪食 (蛋白、22% ; 炭水化物、42% ; 脂肪、36% ; 総カロリー、414kcal/100 g ; High Fat Diet, HFD, F2HFD1 ; オリエンタル飼料) をそれぞれ、自由摂食させた。

#### 3-3. 2-AG の測定

マウスの脳を摘出し、視床下部を切り出し、重量を測定した。重量に対し、約 20 倍量のクロロホルム/メタノー

ル /50 mmol L-1 Tris HCl (2:1:1) 中で氷冷しながらホモジナイズした。ホモジネートを 1,500rpm、5 分間遠心分離し、下層の溶液をとり、得られた下層を N2 下で乾固した後、アセトンに溶解したものを生体サンプルとした。調整した生体サンプルに精製水を添加した後、固相抽出カートリッジ (Sep Pack) に吸着させた。その後、20% アセトン水溶液で溶出し、ジエチルエーテルで洗い流すことで生体サンプル中から 2-AG を精製した。この精製した 2-AG にメチルヘネイコサノエート (IS) を添加して、得られた溶液を窒素存在下で乾固し、TMS 化試薬を添加し、窒素存在下で再度乾固した。これをアセトニトリルに溶解して得られた溶液を GC/MS で測定した。

### 3-3. 条件づけ場所嗜好性試験 (Conditioned Place Preference test: CPP test)

図 1 に示すような、同じ大きさ (縦 15cm、横 15cm、高さ 15cm) でそれぞれ内壁の色の異なる (白、黒) 2 つの箱をつなげ、その接着面に取り外し可能である仕切りを備え付けた。

仕切りには、二つの箱を完全に遮断できるものを 1 つ、二つの箱の間をマウスが自由に行き来できるように、穴の開いたものを 1 つ、計 2 種類を用意した。二つの箱の上蓋には個々に照度の調節が可能な電球を取り付けた。照度を 40 ルクスに設定した箱を明箱、照度を 4 ルクスに設定した箱を暗箱とし、二つの箱に対しマウスの視覚刺激に違いを持たせた。また、明箱の床にはマジックテープを貼り、マウスにザラザラした粗い触感を与えるようにし、暗箱の床にはアクリル板を敷き、滑らかな触感を与えるようにした。これにより、二つの箱の間での触感刺激に違いを持たせた。このように、床の粗い触感は好むが、明るさは好まない明箱と、床の滑らかな触感は好まないが、明るさは好む暗箱を設定することで、マウスが二つの箱に均等に滞在するようにした。また、装置の前面は透明なアクリル板で作成し、マウスの 2 つの箱の間の移動を観察できるようにした。



図 1 CPP test 装置

二つの箱に行き来可能な仕切りを設置した状態で、マウスを装置内に入れ、明箱と暗箱の滞在時間を 15 分間

測定した (Pre-test :Day1)。この時の測定値を Pre 値とした。続いて、二つの間の仕切りを塞いだ状態で、滞在時間の少ない箱を選定し、高脂肪食処置箱とし、箱内にマウスと HFD を共に 30 分間入れ、条件づけを行った (Conditioning :Day 2-5)。一方、滞在時間の大きな箱は標準食処置箱とし、30 分間、マウスと SD を共に入れた。Day 2 と Day4 に HFD とマウスを滞在時間の少ない箱に入れ、Day3 と Day5 に SD とマウスを滞在時間の多い箱に入れる、または、Day3 と Day5 に HFD とマウスを滞在時間の少ない箱に入れ、Day2 と Day4 に SD とマウスを滞在時間の多い箱に入れ、条件づけを行った。Day6 に pre-test と同様に、二つの箱の間に行き来可能な仕切りを設置した状態で、15 分間、二つの箱の滞在時間を測定した (test : Day6)。この時の測定値を post 値とした。なお、条件づけ時、餌に対する摂食を促すため、本試験中は、HFD 摂食群、SD 摂食群共に、ND1 個 / 1 匹 / 1 日の摂食制限をかけた。

また、SD 摂食群に対して、初めて接触する HFD への警戒を和らげるため、pre- test の前日に HFD1 個を餌に加えた。

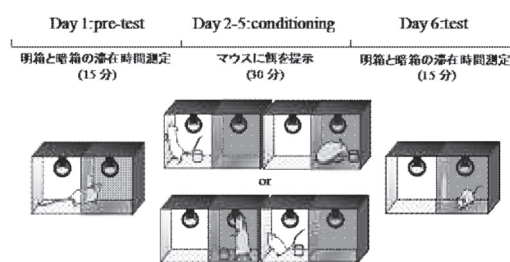


図 2 CPP test スケジュール

最終的な HFD に対する報酬効果の指標として、マウスの嗜好性の変化 (Preference score) を用いた Preference score は Preference score = (test 時の高脂肪食条件づけ箱滞在時間) - (pre-test 時の高脂肪食条件づけ箱滞在時間) として算出し、評価した。このとき、Preference score の値がプラスであれば、HFD に対する嗜好性の発現を認め、変化がないもしくはマイナスであれば、HFD に対する嗜好性がないと評価した。

### 3-4. DNA マイクロアレイ

高脂肪食を 3 日間あるいは 14 日間摂食させたマウスを作製した。このとき、対照群として、標準食を 14 日間摂食させた群を作製した。高脂肪食を 3、14 日間摂食したマウスの脳を摘出し、視床下部を TRIZOL 試薬 1.8mL に入れ、ホモジナイズし、サンプルとした。

作製した脳サンプル (対照群、高脂肪食摂食群 : 各 6 サンプル) から Invitrogen 推奨のプロトコルで total RNA を抽出した。抽出した各 50ng の total RNA を用いて、Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit, one-color により、

ラベリング反応を行った。SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイキット (8x 60K) を用い、Agilent 社推奨のプロトコルで、ハイブリダイゼーション、wash、scan を行った。Agilent 社 Feature Extraction ソフトウェアによるデータの数値化を行った。統計処理ソフト R を用いて、正規化を行った。正規化には、quantile 法を用いた。

#### 4. 研究成果

##### 4-1.

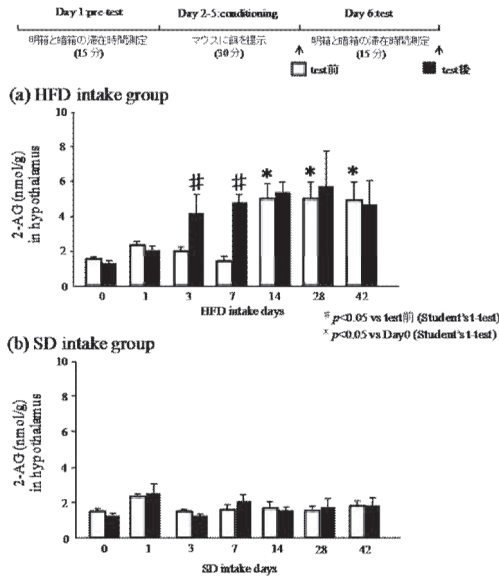


図3 高脂肪食摂食時の視床下部 2-AG 量

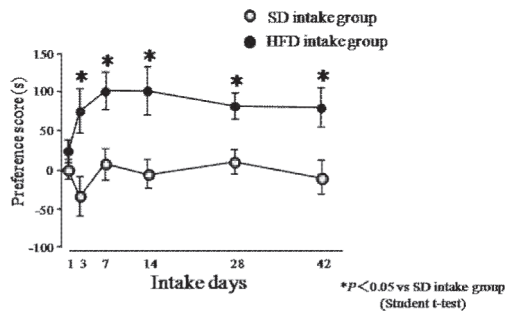


図4 HFD 摂食時の preference score による嗜好性の評価

HFD 摂食後 3、7 日目 CPP test の test を行うことで視床下部の 2-AG が有意に増加していた。また、HFD 摂食後 14、28、42 日目は test 前から 2-AG 濃度が高く、test 後も高かった。一方、SD 群は test を行っても視床下部の 2-AG 濃度は変化しなかった (図 3)。

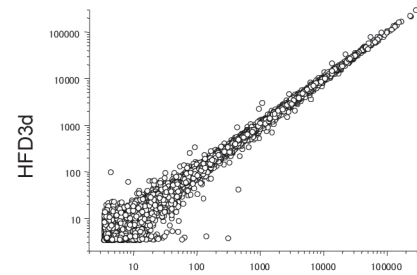
このとき、HFD を 3 日間摂食することで preference score が有意に増加した。HFD の 42 日間摂食まで検討した結果 3、7、14、28、42 日間の HFD 摂食は継続して

有意に preference score が高かった。

以上のことから、マウスの高脂肪食摂食期間により、大麻受容体の内因性リガンドである 2-arachidonoylglycerol (2-AG) 濃度が視床下部内で一時的に上昇する期間 (3 日目) と慢性的に上昇する期間 (14 日目) が存在することが示唆された。

##### 4-2. DNA マイクロアレイ法を用いた高脂肪食摂食期間別の発現量解析

###### SD-HFD3d



###### SD-HFD14d

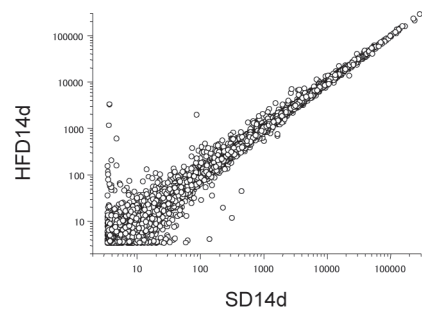


図5 マイクロアレイの散布図

標準食と HFD 摂食後 3、14 日目に摂食させたマウスから RNA を抽出し、マイクロアレイ法を用いて解析した。このとき、HFD 摂食後 3、14 日目に標準食を摂食させたマウスとそれぞれ比較した散布図を図 5 に示す。

DNA マイクロアレイに配置されている約 5 万個の遺伝子のうち、HFD3 日目に増えている遺伝子より、14 日目に増えている遺伝子が多いことが明らかとなった。このことから、HFD 摂食後 3、14 日目の脳内で、遺伝子の発現パターンが異なることが明らかとなった。

#### 総括

本研究結果より、マウスの高脂肪食嗜好性において、高脂肪食を 3 日間摂食し形成された嗜好性と 2 週間摂食したものでは、視床下部 2-AG 量が異なること、マイクロアレイを用いた網羅的解析により、発現している RNA 量に差があることが明らかとなった。このことから、高脂肪食摂食期間で脳内環境が異なり、特に CB1 受容体を介した経路を含む脂肪嗜好性発現までの

過程が変化していることが示唆された。今後、脂肪嗜好性の形成過程を詳細に解析することで、肥満症などの予防に有用な情報を得られると考えられる。

### 【業績一覧】

〔雑誌論文〕（計2件）

① Higuchi S, Irie K, Yamaguchi R, Katsuki M, Araki M, Ohji M, Hayakawa K, Mishima S, Akitake Y, Matsuyama K, Mishima K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Hypothalamic 2-arachidonoylglycerol regulates multistage process of high-fat diet preferences, *PLoS One* 7 (6) :e38609 (2012), 査読有

② Fukumitsu Y, Irie K, Satho T, Aonuma H, Dieng H, Ahmad AH, Nakashima Y, Mishima K, Kashige N, Miake F, Elevation of dopamine level reduces host-seeking activity in the adult female mosquito *Aedes albopictus*, *Parasit Vectors* 5 (92) (2012), 査読有

〔学会発表〕（計1件）

山下郁太、入江圭一、山口竜司、樋口聖、中野貴文、林稔展、松尾宏一、佐藤朝光、松山清、三島健司、桂林秀太郎、窪田香織、高崎浩太郎、三島健一、岩崎克典、脂肪嗜好性に対する高脂肪食摂取期間が及ぼすカンナビノイドシステムの変化、第66回日本薬理学会西南部会、2013年11月16日、福岡

連絡先：kirie2919@gmail.com