35　栄養素に対する食欲の調節機序の解明	佐々木　努

【目的】生活習慣病対策として健康的な食生活を指導しても、「実践し続けてもらえない」という課題がある。根本的な解決には、背景に潜む「食欲の調節機序（生理）」と「病態におけるその変容（病態生理）」を分子レベルで解明することが必要である。そのために、本研究では栄養素に対する食欲の調節機序（生理的メカニズム）の解明をめざす。
【方法】栄養素のうち、生体恒常性の維持に対する影響が大きい三大栄養素に焦点を絞り、三大栄養素（糖質、脂質、タンパク質）それぞれに対する特異的な食欲（嗜好性）の調節機序を解明するために、栄養素特異的に変動するホルモンのシグナルに着目し、条件付け遺伝子組換えマウスに対して、食行動解析とオミクス解析を行った。各栄養素特異的な臓器連関シグナルへの介入手段として、条件付き遺伝子組換えマウスを作出した。また、食行動（嗜好性）は、2 種類の餌での食事選択試験（食事中の三大栄養素の配合比率が変わる）と、2 種類の水溶液での 2 瓶選択試験（特定成分のみ操作できる）で評価した。実験 1．単純糖質への嗜好性の検証：FGF21 受容体の発現に必要なβ-Klotho をコードする *Klb* 遺伝子を、OXT 神経特異的に欠損させた Oxt-Cre; Klb-flox マウスを作製、解析した。実験 2．中鎖脂肪酸への嗜好性の検証：中鎖脂肪酸の摂取を脳に伝えるシグナル“X”を肝臓のマルチオミクス解析により探索するために、中鎖脂肪酸が代謝される肝臓特異的に中鎖脂肪酸のβ酸化に必須な MCAD（中鎖脂肪酸 CoA デヒドロゲナーゼ）を欠損させた Alb-Cre; Acadm-flox マウスの作製を試みた。また、肝臓の初代培養細胞と、視床下部細胞株を活用し、シグナル X の探索系を構築した。実験 3．タンパク質への嗜好性の検証：分枝鎖アミノ酸摂取により血中濃度が上昇するグルカゴンの受容体（Gcgr）を脳特異的に欠損させた Tau-Cre; Gcgr-flox マウスを作製、解析した。
【結果】Oxt 神経特異的 FGF21 受容体欠損マウスは、摂取時に血中 FGF21 濃度を上昇させる単純糖質に対する嗜好性が亢進していたが、血中 FGF21 濃度を変化させない人工甘味料や多糖類に対する嗜好性は変化していなかった。肝臓特異的 *MCAD* 欠損マウスの作製は、flox マウスのトラブルで遅延したが、その間別の実験を行い、シグナル”X”候補の絞り込みを進めることができた。薬理量のグルカゴン投与による NEAA 嗜好性の制御は、グルカゴンがまず神経系に作用してから、他臓器などに指令を送り、その臓器での代謝変化が再度脳に伝わり、NEAA 嗜好性を調節すると推察された。

三大栄養素の摂取を調節する臓器連関シグナルと脳内標的の関係

栄養素の摂取	臓器連関シグナル	脳内標的	表現型
単純糖質	肝臓 FGF21分泌	視床下部Oxt神経 （活性化）	摂取の抑制
中鎖脂肪酸 トリグリセリド	肝臓 シグナルX分泌	視床下部Gal神経? （活性化）	摂取の促進
BCAA （生理的）	グルカゴン （薬理量投与）	「？→末梢臓器→中枢」 【仮説モデル】	摂取の抑制 （NEAA）

35. 栄養素に対する食欲の調節機序の解明

佐々木　努

京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学専攻 栄養化学分野

Key words：FGF21，MCAD，グルカゴン

緒　言

生活習慣病の関連疾患（高血圧・糖尿病・肥満症・高脂血症）は、世界疾病負荷の第1、3、4、7位を占める公衆衛生上の大問題になっている［1］。生活習慣病対策には、生活習慣への介入と医学的介入がある。医学的介入法の研究、開発は盛んだが、生活習慣への効果的な介入を可能にする基礎医学・生命科学的な取り組みは不足している。

栄養学的に体に良い食事とその準備法を教える現状の食事療法には、「実践し続けてもらえない」という課題がある。この課題の根本的な解決には、背景に潜む「食欲の調節機序（生理）」と「病態におけるその変容（病態生理）」を分子レベルで解明することが必要である。そのために、研究者は栄養素に対する食欲の調節機序（生理的メカニズム）の解明をめざしている。本研究では、三大栄養素の摂取をそれぞれ調節すると考えられるシグナルに関して、条件付き遺伝子組換えマウスを作製し、解析することを試みた。

単純糖質への嗜好性を調節する臓器連関シグナルとして、FGF21-オキシトシン（Oxt）系の機能不全モデルであるOxt神経特異的FGF21受容体欠損マウスを作製し、解析した。同マウスは、摂取時に血中FGF21濃度を上昇させる単純糖質に対する嗜好性が亢進していたが、血中FGF21濃度を変化させない人工甘味料や多糖類に対する嗜好性は変化していなかった。

中鎖脂肪酸への嗜好性を調節する未知の臓器連関シグナル“X”を同定するために、中鎖脂肪酸のβ酸化に必須なMCAD（中鎖脂肪酸CoAデヒドロゲナーゼ）をコードする*Acadm*遺伝子のfloxマウスの作製を試みた。当初作製したマウスでは生殖細胞系列にflox配列が入っていなかったため、floxマウスを再作製し、F1世代へのflox配列の継承が確認できた。他方、肝臓特異的MCAD欠損マウスの作製が遅延したため、肝臓の初代培養細胞と、視床下部細胞株を活用し、シグナルXの探索系を構築した。シグナルXは、一定の分子量帯に存在するタンパク質性の因子であり、プロテオミクス解析により因子候補の絞り込みを行っている最中である。

タンパク質への嗜好性を検証するために、分枝鎖アミノ酸摂取により血中濃度が上昇するグルカゴンの受容体(Gcgr)を神経特異的に欠損させたTau-Cre; Gcgr-floxマウスを作製、解析した。マウスに対する薬理量のグルカゴン投与は、投与10時間後に非必須アミノ酸（NEAA）に対する嗜好性を抑制することを発見した。この現象は、神経特異的グルカゴン受容体欠損マウスでは認められなかった。

その結果、グルカゴンによるNEAA嗜好性の制御は、グルカゴンがまず神経系に作用してから、他臓器などに指令を送り、その臓器での代謝変化が再度脳に伝わり、NEAA嗜好性を調節すると推察された。

方　法

1. Oxt神経特異的FGF21受容体欠損マウスの作製

Oxt-ires-Creマウスと、Klb-floxマウスを交配し、目的とする条件付き遺伝子欠損マウスを作製した。

2. 食嗜好の評価

2種類の餌での食事選択試験（食事中の三大栄養素の配合比率が変わる）と、2種類の水溶液での2瓶選択試験（特定成分のみ操作できる）で評価した。

3. Acadm-flox マウスの作製

Acadm-flox マウスは、AMED-BINDS 事業のサポートを受けて、Cas9 法を用いて Acadm 遺伝子配列に loxP 配列を 2 つ挿入した。

4. 肝臓の初代培養細胞と視床下部細胞株を活用したシグナル X の探索

中鎖脂肪酸代謝時に生成されるシグナル X は、肝臓の初代培養細胞の培養上清に含まれると想定し、その作用標的となる視床下部不死化細胞株を活用したレポーターアッセイ系を構築して、シグナル X の性質を絞り込んだ。

5. 神経特異的グルカゴン受容体欠損マウスの作製

神経特異的な Tau -Cre マウスと、Gcgr-flox マウスを交配し、目的とする条件付き遺伝子欠損マウスを作製した。

6. 薬理量のグルカゴン投与実験

2 種類の餌での食事選択試験（食事中の三大栄養素の配合比率が変わる）と、2 種類の水溶液での 2 瓶選択試験（特定成分のみ操作できる）で評価した。

結果および考察

1. 単純糖質への嗜好性の検証（FGF21 シグナルの解析）

Oxt 神経特異的 FGF21 受容体欠損マウスを作製し、食嗜好を評価した。同マウスは、摂取時に血中 FGF21 濃度を上昇させる単純糖質（ショ糖）に対する嗜好性が亢進していたが、血中 FGF21 濃度を変化させない人工甘味料（サッカリン）や多糖類（デキストリン）に対する嗜好性は変化していなかった（図 1）。

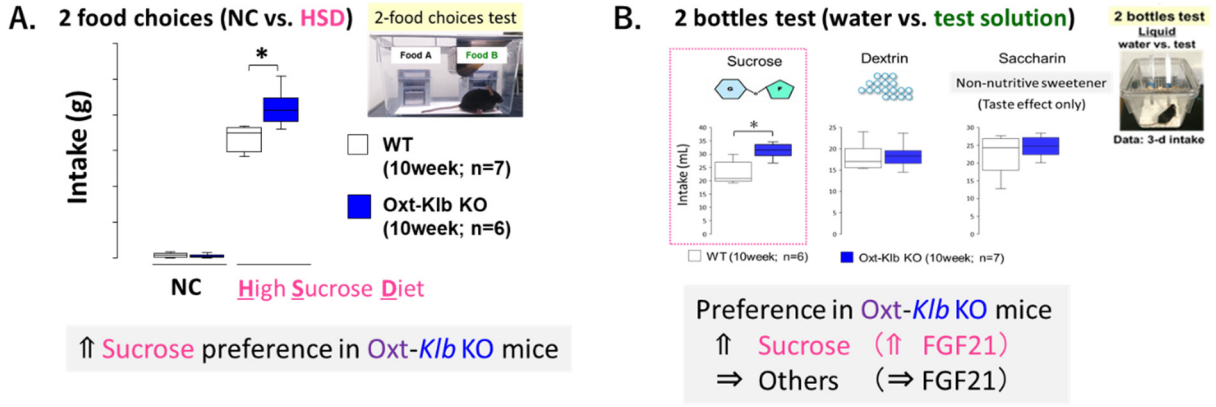


図1. Oxt神経特異的FGF21受容体欠損マウスでは、単純糖質嗜好性が亢進する
A）食事選択試験（普通食（NC）vs. 高ショ糖食（HSD）。
B）2 瓶選択試験での各甘味溶液（ショ糖、デキストリン、サッカリン）の摂取量。
Student's t-test、*p＜0.05。

以上より、単純糖質摂取時に肝臓から分泌された FGF21 は、視床下部 Oxt 神経に作用して、単純糖質への嗜好性を抑制するネガティブ・フィードバック制御を担うと考えられる。なお、米国のコンペティターのグループも、Oxt 神経特異的 FGF21 受容体欠損マウスの解析結果を一部報告しており［2］、我々の結果と概ね矛盾していない。

2. 中鎖脂肪酸への嗜好性の検証

中鎖脂肪酸のβ酸化に必須な MCAD（中鎖脂肪酸 CoA デヒドロゲナーゼ）をコードする *Acadm* 遺伝子の flox マウスの作製を試みた。AMED--BINDS 事業により Cas9 法を用いた flox マウスの作製を群馬大学生体調節研究所ゲノムリソース化学分野にお願いし、Founder マウスを得た。しかし、Founder マウスはモザイクマウスで、1 つの *Acadm* 遺伝子に 2 つの loxP 配列が入っているのではなく、5'の loxP 配列と 3'の loxP 配列が別々の遺伝子座に入っており、次世代（F1 世代）で 5'と 3'の両方の loxP 配列を持つ flox マウスは生まれてこなかった。そこで、作製元に再作製をお

願いした。新たなマウスでは、F1 世代に flox が遺伝されたことが確認できた。現在、マウスを繁殖して増やしている最中である。

肝臓特異的 MCAD 欠損マウスの作製が遅延したため、肝臓の初代培養細胞と、視床下部細胞株を活用し、シグナル X の探索系を構築した。シグナル X は、視床下部細胞株において Galanin 遺伝子（*Gal*）の発現を誘導するとの仮説のもとに、*Gal*-Luc ベクターを作製し、視床下部細胞株へのトランスフェクションを行って、培養上清中のシグナル X 活性を評価する実験系を構築した（図 2）。この探索系を用いて、肝初代培養細胞への C8 添加後の培養上清中に、タンパク質性のシグナル X 活性が存在することを確かめた。

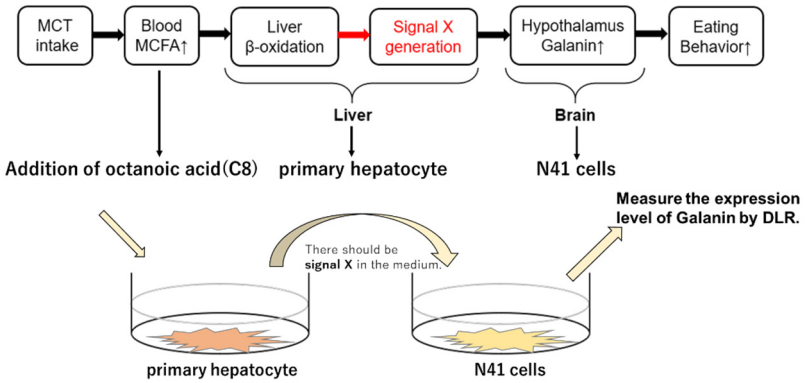


図2. シグナルX探索実験系の概念図

中佐脂肪酸トリグリセリド（MCT）摂取後、門脈から肝臓へと中鎖脂肪酸が肝臓に到達すると、その大半はβ酸化される。その反応によりシグナル X が生成され、視床下部ガラニン神経にシグナルとして伝わると仮説を立てた。そこで、肝臓からのシグナル X 生成を肝臓の初代培養細胞で、シグナル X の血中移行を培養上清の添加で、ガラニン神経の反応を視床下部不死化細胞株 N41 での Gal-Luc でそれぞれ模倣したスクリーニング系を構築した。

現在、活性フラクションのプロテオミクス解析を京都大学大学院農学研究科生体高分子化学分野に依頼し、データを解析中である（新規生理活性ペプチドの探索・同定というプロジェクトの性質上、具体的なデータは報告書には記載できないので、ご容赦いただきたい）。

3. タンパク質への嗜好性の検証（グルカゴンシグナルの解析）

近年、グルカゴンの生理作用は、血糖値の上昇作用ではなく、アミノ酸代謝の制御であるといわれ始めている。そこで、マウスへのグルカゴン投与を用いて、グルカゴンの食行動に対する影響を解析した。

マウスに対する薬理量のグルカゴン投与は、食事選択肢存在下ではタンパク質に対する嗜好性のみを有意に抑制することを発見した（図 3）。アミノ酸分画溶液に対する嗜好性を 2 瓶選択試験で評価した結果、薬理量のグルカゴンは非必須アミノ酸（NEAA）に対する嗜好性を抑制することを発見した（図 4）。さらに、これらの表現型は、グルカゴンの投与直後ではなく、投与後 10 時間以上を経てから表出することを見出した（data not shown）。

これらの解析を進める中で、グルカゴンへの脳への作用が表現型に重要かを検証するために、グルカゴンの受容体（Gcgr）を神経特異的に欠損させた Tau-Cre; Gcgr-flox マウスを作製して解析した。同欠損マウスでは、グルカゴン投与によるタンパク質嗜好性の抑制効果が認められないという初期データを得た（図 5）。

以上の結果より、グルカゴンは NEAA 嗜好性を抑制するが、投与後に作用が認められるまでに時間を要するため、グルカゴンがまず神経系に作用してから、他臓器などに指令を送り、その臓器での代謝変化が再度脳に伝わり、NEAA 嗜好性を調節するという仮説モデルを考えている。また、現状では、他臓器におけるグルカゴンシグナルが NEAA 嗜好性の調節に果たす役割が未解明であるため、各種の代謝関連臓器に特異的なグルカゴン受容体欠損マウスを作製中である。

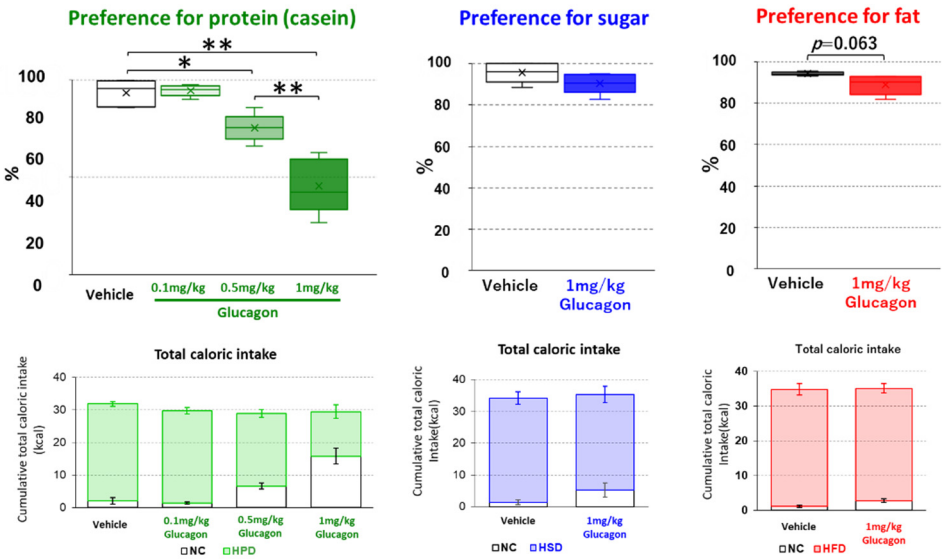


図3. グルカゴンはタンパク質嗜好性を特異的に抑制する（食事選択試験）

左：普通食（NC）vs. 高タンパク質食（HPD）、中央：NC vs. 高ショ糖食（HSD）、右：NC vs. 高脂肪食（HFD）。上段：高栄養素含有食に対する嗜好性、下段：摂取総カロリー量と摂取カロリーに占める各食事の割合。各群 N＝5。HPD は Tukey's test、HSD と HFD は Student's t-test、*p<0.05, **p<0.01。

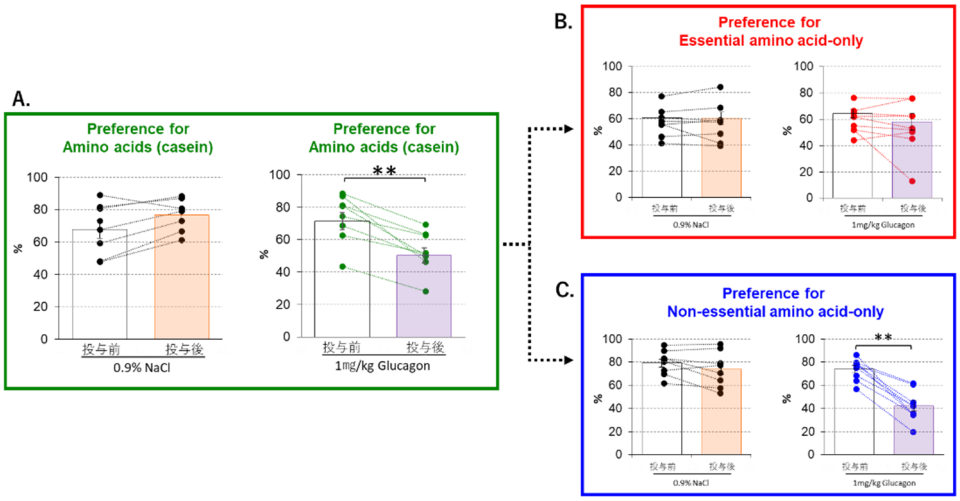


図4. グルカゴンは非必須アミノ酸嗜好性を特異的に抑制する（2瓶選択試験）

A) カゼイン組成のアミノ酸溶液に対する嗜好性。

B) カゼイン組成中の必須アミノ酸（EAA）溶液に対する嗜好性。

C) カゼイン組成中の非必須アミノ酸（NEAA）溶液に対する嗜好性。

左（オレンジ）：生理食塩水投与、右（紫）：グルカゴン投与。

各群 N＝8。Student's t-test、*p<0.05、**p<0.01。

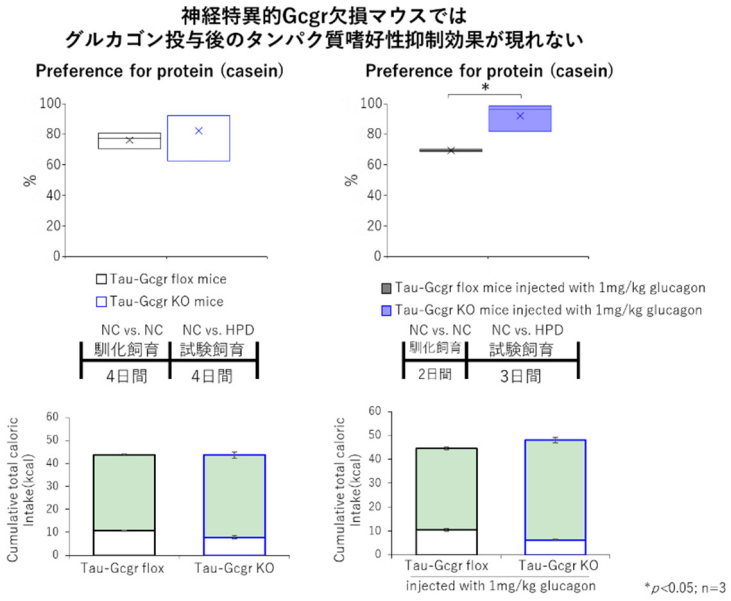


図 5. 神経特異的グルカゴン受容体欠損マウスでは、グルカゴン投与による
タンパク質嗜好性の抑制効果が認められない（食事選択試験）

普通食（NC）vs. 高タンパク質食（HPD）の食事選択試験の結果。
タンパク質嗜好性（上段）、摂取総カロリー量（下段）と摂取カロリーに占める
各食事の割合。各群 N＝3。Student's t-test、*p<0.05。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、群馬大学生体調節研究所ゲノムリソース化学分野の畑田出穂教授と堀居拓郎準教授、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生体高分子化学研究室の植田充美教授と青木航助教、群馬大学生体調節研究所分子糖代謝制御分野の藤谷与士夫教授である。

文　献

1） GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet. 2016 Oct 8;388(10053):1659-1724. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31679-8. PMID: 2773328

2） Jensen-Cody SO, Flippo KH, Claflin KE, Yavuz Y, Sapouckey SA, Walters GC, Usachev YM, Atasoy D, Gillum MP, Potthoff MJ. FGF21 Signals to Glutamatergic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus to Suppress Carbohydrate Intake. Cell Metab. 2020 Aug 4;32(2):273-286.e6. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.06.008. PMID: 32640184