



Decreased food intake and body weight in pancreatic polypeptide-overexpressing mice

上野, 尚彦

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-08-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2427

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002427>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【136】

氏 名・(本 籍) 上野 尚彦 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博ろ第1743号

学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学位授与の 日 付 平成12年8月9日

【学位論文題目】

**Decreased food intake and body weight
in pancreatic polypeptide-overexpressing mice.**

(膵ポリペプチド過剰発現マウスに認められた摂食抑制及び
体重減少について)

審 査 委 員

主査 教授 春日 雅人

教授 千原 和夫 教授 寺島 俊雄

<緒言>

膵ポリペプチド (Pancreatic Polypeptide, 以下 PP と略す) は、ニューロペプチド Y (NPY)、ペプチド YY (PYY) と共に、PP ファミリーを構成する脳腸ホルモンの一つで 36 のアミノ酸からなり、主に膵ラ氏島周辺部の F 細胞より分泌される。PP の生理学的作用として膵外分泌抑制、胆嚢収縮抑制、胃酸分泌亢進、胃消化管運動の調節、その他、満腹因子としての役割も注目されているがその生理学的意義は、未だに不明である。今回、PP を過剰発現するトランスジェニックマウス (以下 TG マウスと略す) を作成し解析を行った。

<方法>

1) 発現ベクターの構築

β -actin プロモーターを持つ pCAGGS 発現ベクターに PP cDNA を組み込み、導入遺伝子 (Transgene) を作成、精製した。

2) TG マウスの作成

既報の如くマイクロインジェクション法にて雌マウス受精卵の雄性前核に導入遺伝子を注入し、胚を偽妊娠雌マウスの卵管内に移植し TG マウスを作成した。

3) 導入遺伝子の検定

マウスの尾よりゲノムを抽出、制限酵素で切断した後、アガロース電気泳動を行いナイロン膜に転写、P32 でラベルした導入遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、洗浄後フィルムに露光させ、BAS2000 システム (富士写真フィルム、東京) にて解析し、導入遺伝子の同定およびそのコピー数を定量した。また同時に PCR 法にて導入遺伝子の検定を行った。

4. 各臓器における導入遺伝子発現の検討

膵、脳、筋、肝、腎等の臓器よりグアニジン法にて RNA を抽出し、RT-PCR 法にて導入遺伝子の mRNA 発現を検定し、また、RNA をアガロース電気泳動後ナイロン膜に転写、ジギトキシンでラベルした導入遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、導入遺伝子の mRNA を定量した。

マウスを麻酔後、4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde, 0.2% picric acid にて灌流固定後、臓器の切片を作成し、抗ラット PP 抗体 (1/10,000 希釈) を処置し、免疫組織染色を行った。

5. 体重測定および摂食実験

TG およびコントロールマウスを個飼いにし体重増加を観察した。

また個飼いにした TG およびコントロールマウス (生後約 6 カ月) を 16 時間絶食後、各群同時に餌を与え、明期、暗期、合計の各摂食量を測定した。

6. エネルギー代謝測定

O₂/CO₂ 代謝測定システム (MK-5000、室町機械) にて TG およびコントロールマウスの酸素消費量を測定した。

7. 胃排泄能実験

マウスを 16 時間絶食後、1 時間餌を与え再び 2、3 あるいは 4 時間絶食にし、頸椎脱臼後すぐに胃の噴門、幽門部を結さく摘出、胃内容物重量を測定した。胃排泄率 (%) は、 $(1 - \text{胃内容物乾燥重量} / \text{1 時間の摂食量}) \times 100$ で表わした。

8. 体組成

体組成は、既報の方法にてマウスの脂肪、水分、蛋白質量を測定した。

9. 血中 PP、Leptin および corticosterone 値の測定

PP および corticosterone は RIA (radioimmunoassay)、Leptin は enzyme immunoassay にて測定した。

10. 統計学的検定

測定値は平均値 ± 標準誤差 (mean ± SE) で表わし、群間の有意差検定には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

<結果>

1 系列の F0 TG マウスを得、ゲノムへの 14 コピーの導入遺伝子挿入を確認した。免疫組織染色および mRNA 解析により PP TG マウスの膵ラ氏島ほぼ全域にわたり高密度で多量の PP 発現を認めた。しかし他の組織には殆どその発現を認めなかった。血中 PP 濃度は、空腹時でコントロールマウスに比し約 20 倍の高値を示した。PP TG マウスは、雌雄共、摂食実験ににおいて明期、暗期、一日摂食量、各々において有意に摂食量の低下を認め、さらに体重増加の減少を認めた。飲水量、酸素消費量、Lee Index の評価においては有意差を認めなかったが、体組成およびインピーダンス分析において有意に TG マウスの脂肪量減少を認めた。血中レプチン濃度は、体重減少に相応して低下傾向にあった。胃排泄能試験にて絶食後 3 および 4 時間で PP TG マウスにおいて有意に胃排泄能の遅延が認められた。

<考察>

主に膵ラ氏島に PP を過剰発現する PP TG マウス、すなわち末梢での慢性 PP 過剰発現状態において摂食抑制、および体重増加、体脂肪の減少を認めた。飲水量が正常であったことから過剰な PP による直接的な作用が影響していると考えられた。CCK による急性満腹効果あるいは摂食量の低下が、胃排泄能の遅延と関係している事が報告されており、PP TG マウスにおける胃排泄能の低下が摂食抑制の一因になっていると考えられた。

PP は中枢投与による迷走神経核刺激で胃排泄能、motility および胃酸分泌を促進させ、末梢（腹腔内）投与で胃排泄能を低下させると報告されている。末梢投与での胃排泄能低下の原因として PP の胃粘膜保護効果に関係しているという報告もあるが、そのメカニズムは明らかにされていない末梢で分泌された PP が血液脳関門の不十分な脳幹部領域（後下野、迷走神経核）に存在する PP 受容体に結合して迷走神経の tone を下げ、胆嚢収縮抑制、膵外分泌抑制作用を出現させるという negative feedback loop を形成していることが示唆されているが、PP の末梢での過剰発現状態が、脳幹の PP 受容体レベルで影響を与え、胃排泄能を司る迷走神経系を抑制している可能性が考えられた。

今回、獲得できた F0 TG マウスは一列のみで、他の F0 TG マウスは、生後約一週で死亡しており、解剖所見上消化管内に食物残渣が全く無く、死因は脱水によるものと考えられ、PP の過剰発現が致死的になっていた可能性も考えられた。

生存した 1 系列の FOTG マウスについて、その phenotype が導入遺伝子による遺伝子組み替え操作に起因し発生しうる効果 (the potential positional effect of the transgene) によって出現している可能性を否定するため、抗 PP 抗体を用いた免疫中和実験を行った結果、抗 PP 抗体腹腔内投与にて摂食抑制、体重減少のフェノタイプが打ち消され、PP 過剰発現によるフェノタイプであることが証明された。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|------------|---|-----|-------|
| 受付番号 | 乙 第1744号 | 氏 名 | 上野 尚彦 |
| 論文題目 | <p>Decreased Food Intake and Body Weight in Pancreatic Polypeptide-Overexpressing Mice</p> <p>膵ポリペプチド過剰発現マウスに認められた 摂食抑制及び体重減少について</p> | | |
| 審査委員 | <p>主 査 春日 雅人</p> <p>副 査 千原 和夫</p> <p>副 査 寺島 俊雄</p> | | |
| 審査終了日 | 平成 12 年 7 月 24 日 | | |

(要旨は1,000字~2,000字程度)

膵ポリペプチド (Pancreatic Polypeptide, 以下 PP) は、ニューロペプチド Y、ペプチド YY と共に、PP ファミリーを構成する脳腸ホルモンの一つで膵外分泌抑制、胆嚢収縮抑制、胃酸分泌亢進、胃消化管運動の調節、その他、満腹因子としての役割も注目されているがその生理学的意義は、未だに不明である。今回、PP を過剰発現するトランスジェニックマウス (以下 TG マウスと略す) を作成し解析を行った。

β -actin プロモーターを持つ pCAGGS 発現ベクターに PP cDNA を組み込み、導入遺伝子 (Transgene) を作成、精製し、既報の如くマイクロインジェクション法にて雌マウス受精卵の雄性前核に導入遺伝子を注入し、胚を偽妊娠雌マウスの卵管内に移植し TG マウスを作成した。生まれたマウスの尾より DNA を抽出し、PCR 法およびサザンプロット法にて導入遺伝子の同定およびそのコピー数を定量し、ゲノムにつき 14 コピーの導入遺伝子の挿入を確認した。

膵臓、脳、筋肉、肝臓、腎臓等の臓器よりグアニジン法にて RNA を抽出し、RT-PCR 法にて導入遺伝子の PP mRNA 発現を検定、ノザンプロット法にて導入遺伝子由来の PP mRNA を定量した結果、RT-PCR 法では各臓器に発現が認められたが、ノザンプロット法では膵臓にのみ発現を認めた。また免疫組織染色において膵ラ氏島のほぼ全域にわたり高密度で多量の PP が発現し、他の組織には殆どその発現を認めず、膵ラ氏島にのみ PP の過剰発現を有する PP TG マウスを獲得した。

TG およびコントロールマウスを個飼いにし体重増加および摂食量を測定した結果、TG マウスはコントロールマウスに比べ有意に体重減少、摂食量の低下を認めた。飲水量、酸素消費量、Lee Index の評価においては有意差を認めなかったが、体組成およびインピーダンス分析において有意に TG マウスの脂肪量減少を認めた。血中 PP 濃度は、空腹時でコントロールマウスに比し約 20 倍の高値を示した。血中レプチン濃度は、体重減少に相応して低下傾向にあった。胃排泄能試験にて絶食後 3 および 4 時間で PP TG マウスにおいて有意に胃排

泄能の遅延が認められた。

藤ラ氏島に PP を過剰発現する PP TG マウス、すなわち末梢での慢性 PP 過剰発現状態において摂食抑制、および体重増加、体脂肪の減少を認めた。飲水量が正常であったことから過剰な PP が直接的に影響していると考えられた。

CCK による急性満腹効果あるいは摂食量の低下が、胃排泄能の遅延と関係している事が報告されており、PP TG マウスにおける胃排泄能の低下が摂食抑制の一因になっていると考えられた。

PP は中枢投与による迷走神経核刺激で胃排泄能、motility および胃酸分泌を促進させ、末梢（腹腔内）投与で胃排泄能を低下させると報告されている。末梢投与での胃排泄能低下の原因として PP の胃粘膜保護効果に関係しているという報告があるが、そのメカニズムはまだ明らかにされていない。末梢で分泌された PP が血液脳関門の不十分な脳幹部領域（後下野、迷走神経核）に存在する PP 受容体に結合して迷走神経の tone を下げ、胆嚢収縮抑制、膵外分泌抑制作用を出現させる negative feedback loop を形成していることが示唆されており、PP の末梢での過剰発現状態が、脳幹の PP 受容体レベルで影響を与え、胃排泄能を司る迷走神経系を抑制している可能性が考えられた。

今回、獲得できた F0 TG マウスは一列のみで、他の F0 TG マウスは、生後約一週で死亡しており、解剖所見上消化管内に食物残渣が全く無く、摂食不良のため死亡したと考えられ、PP の過剰発現が致死的になっていた可能性も考えられた。

生存した 1 系列の F0TG マウスについて、その phenotype が導入遺伝子による遺伝子組み替え操作に起因し発生しうる効果（the potential positional effect of the transgene）によって出現している可能性を否定するため、抗 PP 抗体を用いた中和抗体実験を行った結果、抗 PP 抗体の腹腔内投与にて摂食抑制、体重減少のフェノタイプが打ち消され、PP 過剰発現によるフェノタイプであることが証明された。

本研究は、豚ポリペプチドについて、トランスジェニックマウスを作製することによりその慢性過剰状態を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった豚ポリペプチドによる摂食抑制および体重減少の原因について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。