

運動習慣形成における摂取食塩の生理的意義と塩類による運動制御機構の解明 ー 運動能確立における食塩と代謝シグナルの意義ー

阪上 浩, 原田 永勝, Bold Ungarbayar, 佐藤 蒔子, 中屋 豊

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部代謝栄養学分野

概要 SPORTS ラット (Spontaneously running Tokushima-Shikoku ラット) は長距離走行能をする高運動性モデルラットであり、回転カゴにおける自発運動で 6~10 倍の走行距離を示すが、単に生まれながら運動能が高いのではなく、運動習慣(自発運動)が形成される時期が 5~12 週齢に存在するが、運動習慣形成における分子基盤や形成時期の意味は明らかにされておらず、また栄養素、特に塩類が運動習慣に影響を与えるかはほとんど理解されていない。そこで本研究では、摂取食塩による運動習慣獲得への影響を解析し、さらに塩類による運動制御機構の分子基盤解明を試みた。

まず、自由摂食下で摂取食塩濃度を变化させたところ、通常食塩濃度 (0.5%) に比較して、高食塩濃度 (2%) の給餌によって、オープンフィールドにおける自発運動は影響を受けなかったが、回転カゴにおける自発運動は抑制された。一方、低食塩濃度 (0.05%) の給餌によって回転カゴにおける自発運動が亢進した。この自発運動に対する食塩の作用は高自発運動能をもたないコントロールラット (Wister ラット) においても確認された。すなわち摂取食塩量が運動習慣形成に関与することが明らかとされた。さらに SPORTS ラットにおける摂取食塩によるエネルギー代謝への影響を検討したところ、高食塩濃度食では水分摂取とともに摂食量の増加が認められたが、酸素消費量には影響を与えなかった。最終的には、高食塩濃度食を給餌した SPORTS ラットは通常食塩濃度食を給餌した SPORTS ラットに比べて体重増加を示し、低食塩濃度食を給餌した SPORTS ラットは体重減少を示した。以上のことから摂取食塩量が血圧のみならず運動習慣形成や摂食量、体重に影響を及ぼすことが明らかとなった。

本邦の生活習慣病の発症の劇的な増加に対して、適切な塩類摂取の重要性と生活習慣病の発症に及ぼす塩類の影響を明らかにする必要があるが、今回の研究成果によって運動習慣形成における塩類の生理的意義が明らかとなった。今後食塩がどのような機序で運動習慣形成に関与するかを、中枢運動制御系を中心に解明し、またその他の栄養素である脂肪やアミノ酸の関与や代謝シグナルも検討が必要であると考えられた。そこで本研究では、Ghrelin、Obestatin の末梢 (皮下) 投与および中枢 (脳室内) 投与を行い、自発運動の変化を中心に、摂食量、安静時代謝、体重などの生体の変化を検討した。Ghrelin 投与にて運動量の減少、摂食量の増加、安静時代謝の低下が認められ、体重が増加した。さらに Obestatin は Ghrelin の摂食量増加および安静時代謝低下作用に拮抗したが、Ghrelin の運動量抑制作用には影響を与えなかった。このことから、Ghrelin による自発運動制御は食欲調節とは別の経路を介していることが示唆された。この作用経路の詳細が明らかとされれば、肥満と運動に対する生理学的治見が集積され、さらに食塩の運動能獲得の意義の検討と相まって新たな生活習慣病へのアプローチも創出できると思われる。

1. 研究目的

生活習慣病の原因として動物性脂質の過剰摂取や運動不足が挙げられるが、運動習慣の形成における栄養素の役割は明らかでない。申請者及び共同研究者が樹立し

た長距離走行能をする高運動性モデルラット (Spontaneously running Tokushima Shikoku ラット; SPORTS ラット) は、回転カゴにおける自発運動で 6~10 倍の走行距離を示すが、単に生まれながら運動能が高い

のではなく、運動習慣(自発運動)が形成される時期が 5～12 週齢に存在し、この時期より週齢がすすめば、運動習慣が形成されないことを見出した。しかしながら、この運動習慣形成における分子基盤や形成時期の意味は明らかにされておらず、また栄養素、特に塩類が運動習慣に影響を与えるかはほとんど理解されていない。本邦の生活習慣病の発症の劇的な増加に対して、適切な塩類摂取の重要性と生活習慣病の発症に及ぼす塩類の影響を明らかにする必要があるが、申請者は、運動習慣形成における塩類の生理学的意義を明らかにすることによって、生活習慣病の発症における塩類の役割を明らかとすることを研究目的とする。すなわち、食塩の過剰摂取又は極端な減塩が運動習慣形成に及ぼす影響を検討することによって、塩類による運動制御機構の分子基盤を明らかとし、運動習慣獲得に対する栄養素、特に塩類の役割を明らかにする。

Leptin は、食欲を抑制し、エネルギー消費を促すように作用する^[1,2]。この Leptin の発見をきっかけに、末梢由来のホルモンや神経ペプチドなどの物質によってコントロールされていることが明らかとなり、その後数多くの食欲調節物質が同定されるようになった^[3]。中でも胃で産生され成長ホルモンの分泌を調節するホルモンとして、1999 年寒川氏らによって発見された Ghrelin は、Leptin と逆の作用を示すものとして注目をあびた。つまり Ghrelin は食欲を増進させエネルギー消費を抑制するように作用するのである^[4-7]。Ghrelin はその他にも抗炎症や心機能の改善など、様々な作用が確認され、注目を集めている^[4-9]。その1つとして、交感神経の活性を抑制するという作用が確認されており^[9]、我々はこの作用にも注目をした。

SPORTS (Spontaneously Running Tokushima-Shikoku) ラットは対照ラットに比べ、通常かご(安静)飼育下においても有意に内臓脂肪量や体重増加が少なく^[11]、安静時代謝が高いことが報告されている。さらに、脳内のモノアミンオキシダーゼ A (MAO-A) 活性の低下により、脳内のノルエピネフリン量が高く、これが高自発運動性を示す原因の一つであると考えられている^[10-12]。さらに、血中 Ghrelin 濃度を測定したところ、対照ラットに比べ SPORTS ラットは有意な低値を示した。これらの結果から、SPORTS ラットの高自発運動性に対する Ghrelin の作用が想定され、自発運動に対する Ghrelin の影響について検討も行った。また、

近年 Ghrelin の前駆体である Prepro-ghrelin から Obestatin が同定された^[13]。Obestatin は、Ghrelin の前駆体から生成されながら Ghrelin の作用に拮抗する作用がいくつか報告されているが、未だその作用は明確にされていない^[6,3-15]。そこで本研究では、Obestatin の Ghrelin 作用に対する影響も同時に検討した。

2. 研究方法

本研究の最終的な目標は、申請者が SPORTS ラットで新たに見出した運動習慣獲得時期における塩類の役割を明らかとし、その分子基盤の解明から、新たな塩類摂取の意義と医療への応用における基盤確立にある。このため運動習慣獲得時期を同定し、摂取食塩による運動習慣獲得への影響を解析、さらに塩類や代謝シグナルによる運動制御機構の分子基盤を解明するために、本研究計画を立案した。

(1) 実験動物及び運動習慣獲得時期の同定

本研究は、徳島大学動物実験委員会の承認を受け、「動物の愛護および管理に関する法律」に則り飼育・研究を行った。本研究では、我々の研究室で確立した SPORTS ラット雄を用いた。SPORTS ラットは、回転カゴ運動において自発的に 1 日 6,000 m 以上走る Wister 系ラットを選択的に交配させて誕生したラットであり、回転カゴ運動では 6,000 回転/日 (1.07 m/回転) 以上の運動量を呈する^[10]。

処置終了後、12 時間絶食・安静後にペントバルビタール麻酔下で腹部大静脈より採血し、血漿を採取した。また、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および腹腔内脂肪(副睾丸周囲、腸間膜、後腹膜)を摘出し、直ちに湿重量を測定した。血液は解剖時に大動脈より採取した。その血液を用いて、血漿グルコース(和光純薬工業株式会社)、中性脂肪(トリグリセライド G-テストワコー, 和光純薬工業株式会社)、総コレステロール(コレステロール E-テストワコー, 和光純薬工業株式会社)、HDL-コレステロール(HDL-コレステロール E-テストワコー, 和光純薬工業株式会社)濃度を測定した。解剖時に採取した血漿中、尿中のカテコールアミン(エピネフリン, ノルエピネフリン, ドーパミン)を高速液体クロマトグラフィ(HPLC)法(SRL Japan)により測定した。

ラットは室温 23±1℃、照明時間 12 時間の条件下の飼育室で回転カゴ付ケージにて個別飼育し、食餌は市販ラ

ット飼育用粉末試料(MF 型, オリエンタル酵母)を与えた。飼育期間中は自由摂食・飲水とした。低食塩食及び高食塩食は市販ラット飼育用粉末試料を調整し 0.2%及び 2%とした。

(2) 試薬及びその投与時間

Ghrelin(ヒトグレリン)は、アスピオフォーマ株式会社、ペプチド研究所より購入した。Obestatin(ヒトオベスタチン)は、ANASPEC、ペプチド研究所より購入した。

予備実験より、SPORTS ラットの運動量は 0 時から 2 時に最大となるため(Fig. 1A)、Ghrelin および Obestatin の投与は、運動量が増加する直前として 22 時に行った。

(3) 摂取食塩による運動習慣獲得への影響解析

実験(1)によって同定された運動習慣獲得時期において、食塩濃度(0.05%から2%程度までで段階的に増量)を変化させた餌を投与し、回転かご付き飼育ケージによる自発運動獲得能を評価する。同様な検討を 20 週齢以降の SPORTS ラットにも実施し、時期特異的な効果も検討する。

(4) 摂取食塩によるエネルギー代謝への影響分析

高運動性 SPORTS ラットおよびコントロール Wister ラットのエネルギー代謝に対して、摂取食塩の影響を安静時・自発運動時・強制運動時の各状態で測定する。食塩濃度が摂餌量に影響を与えることはよく知られているが、酸素消費や呼吸商に対しての効果は十分に明らかとされていない。さらに体重、脂肪量、血圧、耐糖能、血中脂質等を検討した。

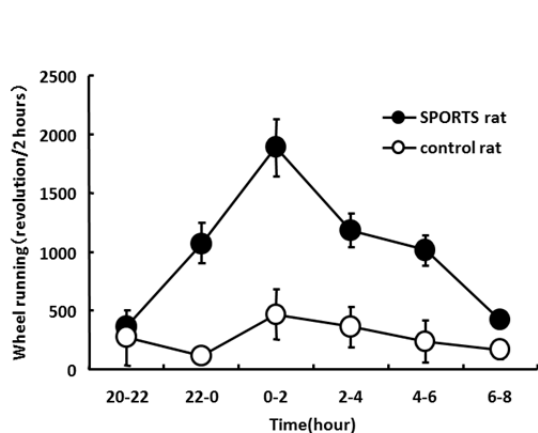


Fig. 1A. Change of wheel running in SPORTS rat

(5) Ghrelin、Obestatin の中枢投与による検討

15-20 週齢の雄性 SPORTS ラット 25 匹に、麻酔薬(ペントバルビタール: 1 ml/kg)を腹腔内投与し、側脳室(bregmaより1 mm 後方, 1.5 mm 側方)にガイドカニューレを装着した。術後 1 週間後、走行量が回復したことを確認した上で、生理食塩水(0.9% saline 5 μ l)を脳室内に投与し、走行量、摂食量、体重を測定した。これらのデータからラットを 2 群に分け、その翌週に 1 群には Ghrelin(5 μ g/rat)を(n=12)、もう 1 群には Ghrelin(5 μ g/rat)に加えて Obestatin(5 μ g/rat)を(n=13)、22 時に 3 日間それぞれ脳室内投与し、2 時間ごとに走行量、摂食量を記録した。また、体重を実験開始前、実験終了後に測定した。

(6) 結果の表示及び統計処理

結果は平均値±標準誤差(S.E.)で示した。各群間の有意差は非パラメトリック t 検定を行い、有意水準は 5%以下で表した。

3. 研究結果

(1) 運動習慣獲得時期の同定

SPORTS ラットおよび対照ラットの回転かごにおける自発運動量の推移を観察した(Fig. 1)。SPORTS ラットは 0 時から 2 時に最も回転かご運動量が多いことが確認された(Fig. 1A)。また SPORTS ラットおよび対照ラットの回転かごを設置する時期を変化させ自発運動量の推移を観察したところ、12 週齢以降に回転カゴケージに移しても高発運動量は観察されず、運動習慣が決定される時期が 5~12 週齢であることがわかった(Fig. 1B)。

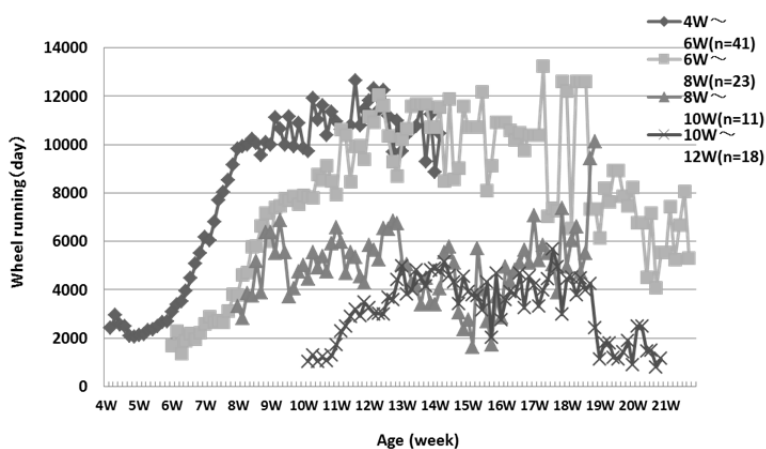


Fig. 1B. Wheel running in SPORTS rat at the age of 4 weeks to 21 weeks

(2) 摂取食塩による運動習慣獲得への影響解析

運動習慣獲得時期である 5~12 週齢の SPORTS ラットにおいて、食塩濃度 (0.05% から 2% 程度までで段階的に増量) を変化させた餌を投与し、回転かご付き飼育ケージによる自発運動獲得能を評価したところ、0.05% 低食塩給餌では自発運動能は低形成となり、2% 高食塩給餌では高自発運動能を獲得した (Fig. 2A, B)。一方、オープンフィールドにおける自発運動は影響を与えなかった (データ示さず)。同様な検討を 20 週齢以降の SPORTS ラットにも実施したが自発運動能獲得には影響を与えなかった (データ示さず)。

(3) 摂取食塩によるエネルギー代謝への影響分析

高運動性 SPORTS ラットおよびコントロール Wister ラット

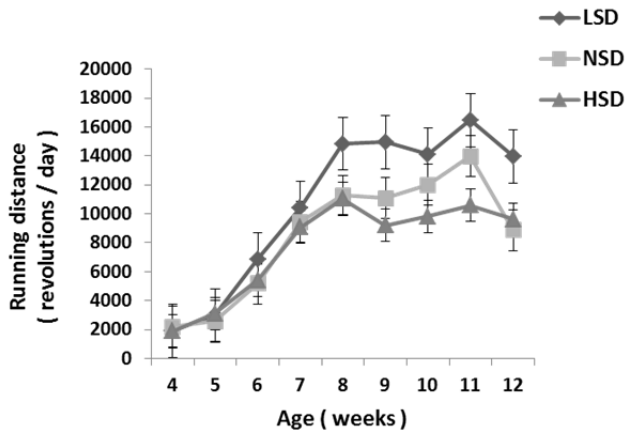


Fig. 2A. Wheel running activity in SPORTS rats submitted from weaning to adulthood to low- (LSD), normal- (NSD) or high- (HSD) salt diet

のエネルギー代謝に対して、摂取食塩の影響を安静時・自発運動時・強制運動時の各状態で測定したが、0.05% 低食塩給餌群と 2% 高食塩給餌では有意な差が認められなかった (データ示さず)。高食塩濃度食を給餌した SPORTS ラットは通常食塩濃度食を給餌した SPORTS ラットに比べて摂餌量、飲水量が増加し体重増加を示した (Fig. 3A, B)。低食塩濃度食を給餌した SPORTS ラットは体重減少を示した (データ示さず)。0.05% 低食塩給餌ではコントロール群にくらべて摂餌量、飲水量が減少し低血圧 (収縮期、拡張期とも) を示した (Fig. 3A, B)。2% 高食塩給餌では高血圧 (収縮期、拡張期とも) を示し (データ示さず)、平均血圧でも高血圧を示した (Fig. 4)。

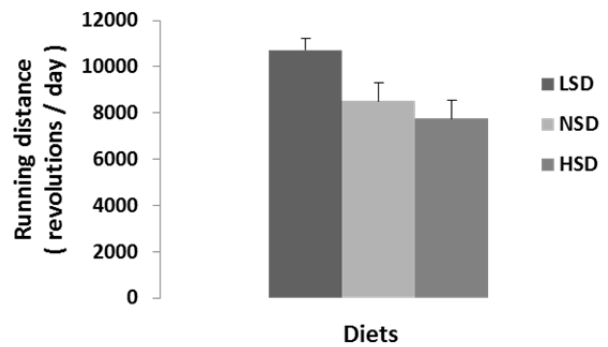


Fig. 2B. The average wheel running activity in SPORTS rats submitted from weaning to adulthood to low- (LSD), normal- (NSD) or high- (HSD) salt diet

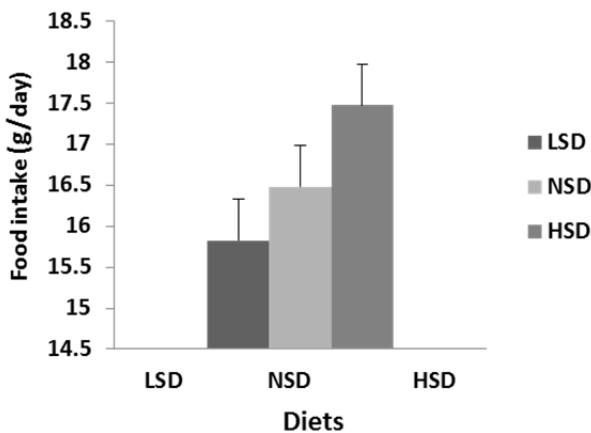


Fig. 3A. Daily food intake was higher in rats of high-salt diet and lower in low-salt diet

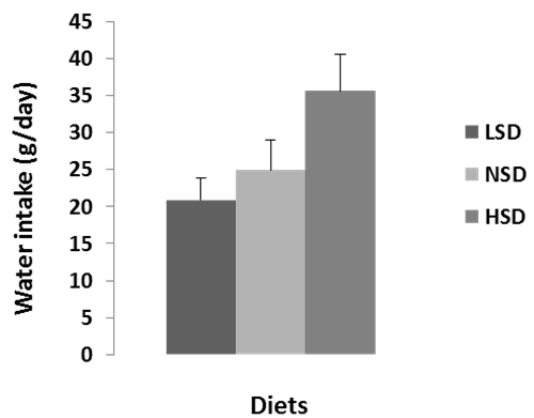


Fig. 3B. Water intake were higher in HSD than on NSD or LSD

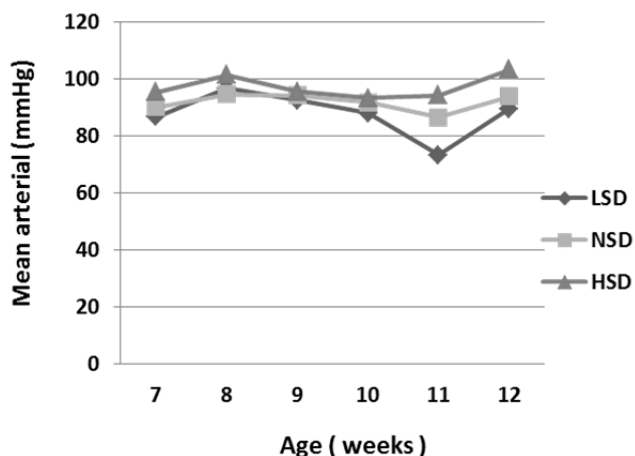


Fig. 4. Compared to low and normal salt rats, mean arterial pressure increased in the high-salt-diet group

(4) Ghrelin、Obestatin の皮下・中枢投与による検討

7日間の Ghrelin、Obestatin 皮下投与による夜間 12 時間の回転カゴ走行量の変化を観察した (**Fig. 5A**)。投与 1 日目から Ghrelin 群に減少傾向がみられ、投与 7 日間を平均すると、Ghrelin 群は Saline 群と比較して有意な走行量の減少が認められた。一方、G+O 群は Ghrelin 群と同様に、投与 1 日目から減少傾向がみられ、投与 7 日間の平均において Saline 群と比較して有意な走行量の減少が認められた。Ghrelin 群と G+O 群の間には有意な差は認められなかった。この結果から、Ghrelin は自発運動抑制作用を有することが考えられ、Obestatin はその Ghrelin の自発運動抑制作用に対して影響を及ぼさないことが示唆された。

1 日の摂食量の変化を観察した (**Fig. 5B**)。Ghrelin 群は Saline 群と比較して投与 1 日目から増加傾向を示し、2 日目以降は有意な増加が認められた。一方、G+O 群は Ghrelin 群と比較して、投与 1 日目から有意に少なく、7 日間それを維持した。また、Saline 群と G+O 群の間には差がなかった。以上の結果より、Ghrelin の食欲増進作用が確

認され、Obestatin は Ghrelin 投与による摂食量増加作用を抑制することが示唆された。

安静時における 1 時間あたりの酸素消費量と呼吸商を各群で比較検討した (**Fig. 5C, D**)。Ghrelin 群の酸素消費量は Saline 群と差はなく、呼吸商は 1 日を通して高値を示した。すなわち、Ghrelin はエネルギー源として糖利用の割合を増加させ、脂肪利用の割合を減少させる作用を有すると考えられた。一方、G+O 群では、投与直後に酸素消費量の増加がみられた (**Fig. 5C**)。Obestatin には代謝を亢進させる作用を有する可能性が考えられた。呼吸商は、Ghrelin 群と Saline 群の間を推移していた。体重の変化を実験開始前からの増加量として表し、各群で検討した。投与 4 日目、7 日目ともに Ghrelin 群の体重は Saline 群と比較して有意に増加していた (**Fig. 5E**)。G+O 群は、Ghrelin 群と比較して 4 日目、7 日目ともに有意に低く、Saline 群と同程度であった。以上の結果より、Ghrelin は体重増加を促し、Obestatin は Ghrelin による体重増加を抑制することが示唆された。次に組織湿重量の違いを検討したが、Ghrelin 群は内臓脂肪重量が Saline 群に比べ有意に高かったが、他の組織では有意な差はなかった (データ示さず)。また、G+O 群の内臓脂肪重量は Saline 群と有意差は見られなかった。すなわち、Ghrelin 群の体重増加は主に内臓脂肪量の増加によるものと考えられ、Obestatin 投与により内臓脂肪量の増加は抑制された。血糖、Total 及び HDL コレステロールには 3 群間で差はなかったが、中性脂肪は Ghrelin 群が有意に高値を示した (データ示さず)。

Ghrelin、Obestatin の単回中枢投与によっても Ghrelin 群は Saline 群と比較して有意な走行量の減少が認められたが (**Fig. 6A, C**)、この抑制効果は G+O 群でも認められた (**Fig. 6B, C**)。さらに Obestatin は Ghrelin による摂食量や体重増加を抑制することが示唆された (**Fig. 7**)。

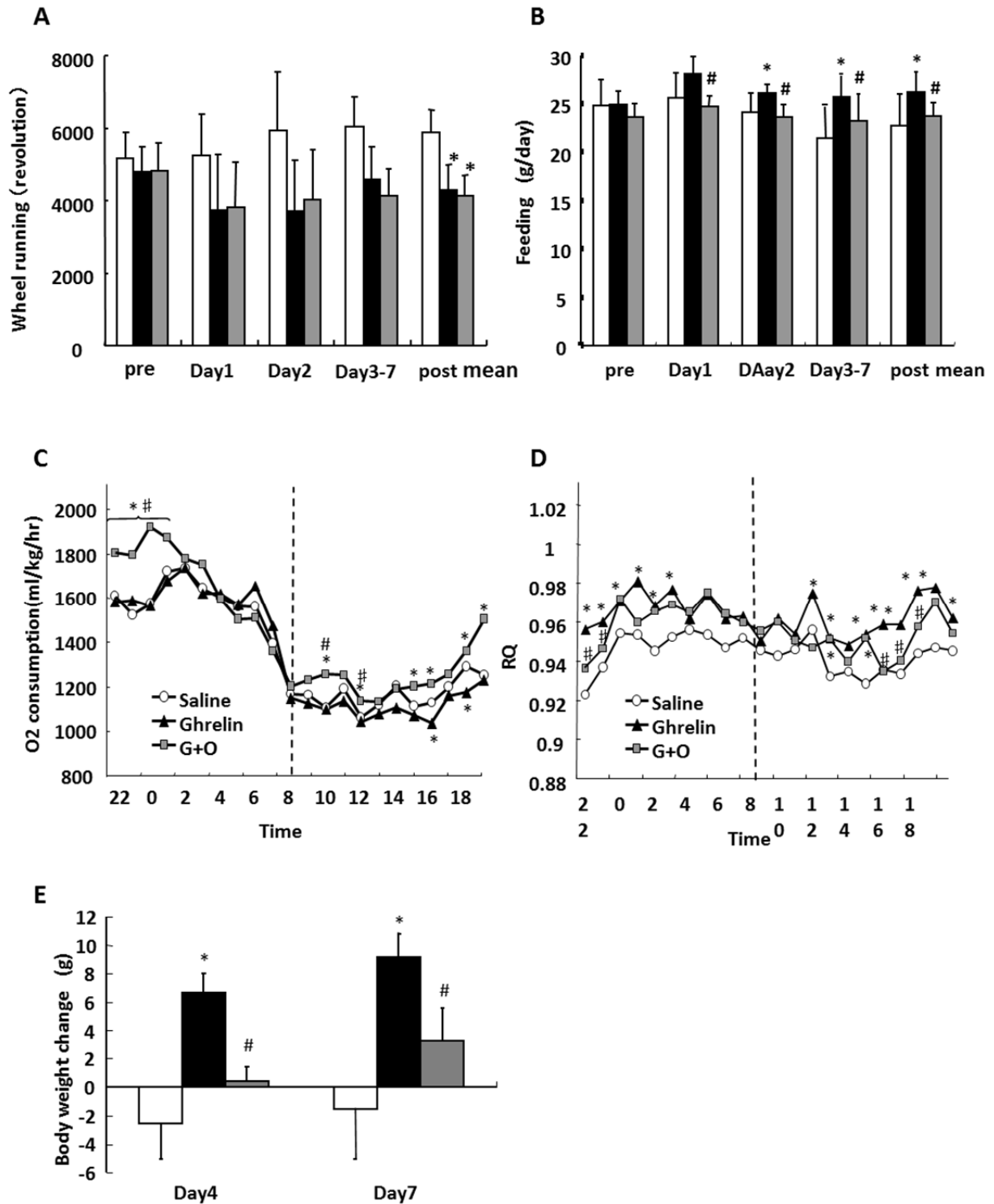


Fig. 5. Subcutaneous administration of Ghrelin and Obestatin. (A) Wheel running, (B) Feeding, (C) CO₂ consumption, (D) RQ, (E) Body weight change. □ Saline (0.9% saline 100 μl/kg), ■ Ghrelin (Ghrelin 100 μg/100 μl saline), ▣ G+O (Ghrelin 100 μg/100 μl saline+Obestatin 100 μg/100 μl saline), (n=5). *p<0.05 vs saline, #<0.05 vs Ghrelin.

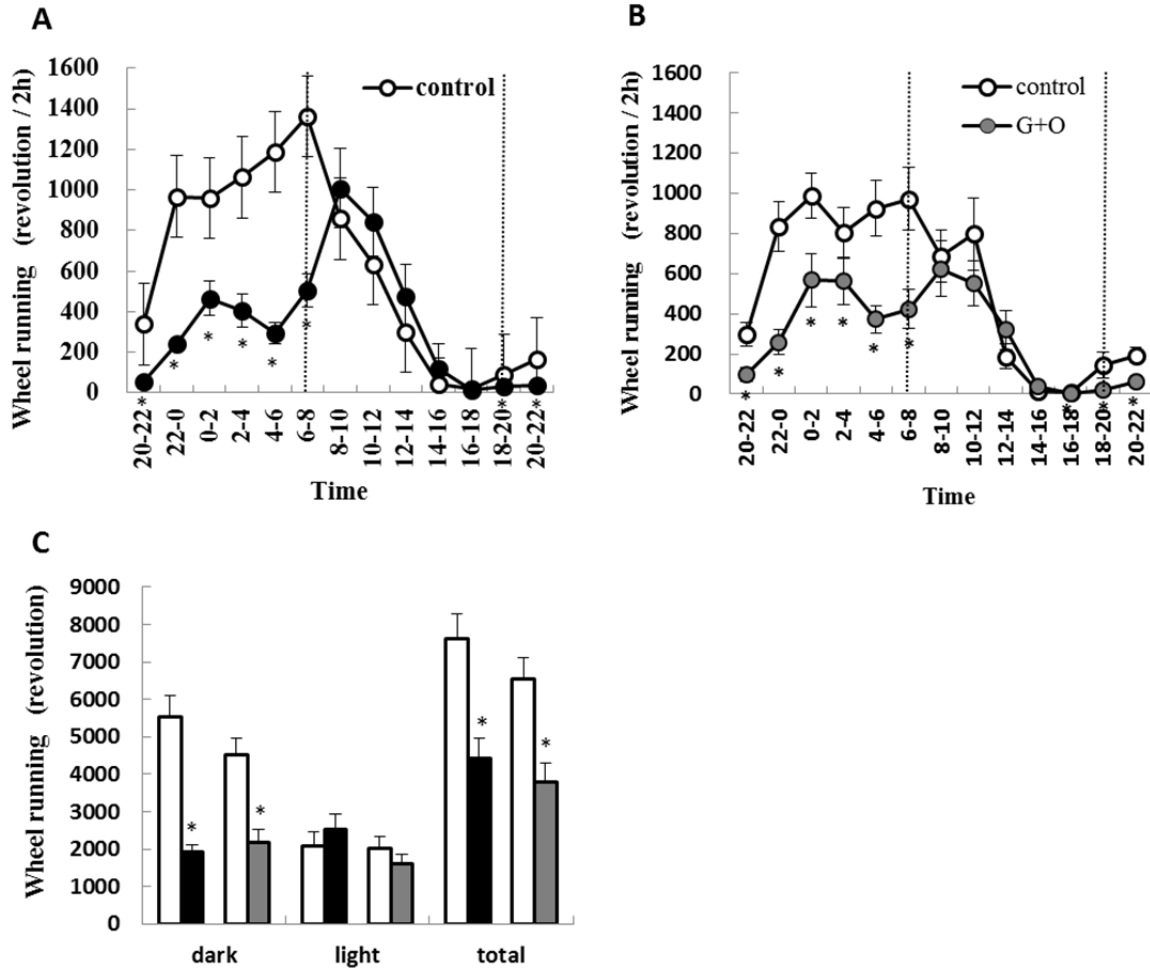


Fig. 6. ICV administration of Ghrelin and Obestatin. (A) Wheel running in Ghrelin administration. ○Saline (n=12), ● Ghrelin (n=12). (B) Wheel running in Ghrelin and Obestatin administration. ○Saline (n=13), ● Ghrelin+Obestatin (n=13) (C) Total wheel running in Ghrelin and Obestatin administration. (n=12, 13). □ Saline (n=13), ■ Ghrelin (n=12), ▣ Ghrelin+Obestatin (G+O) (n=13). *p<0.05 vs saline.

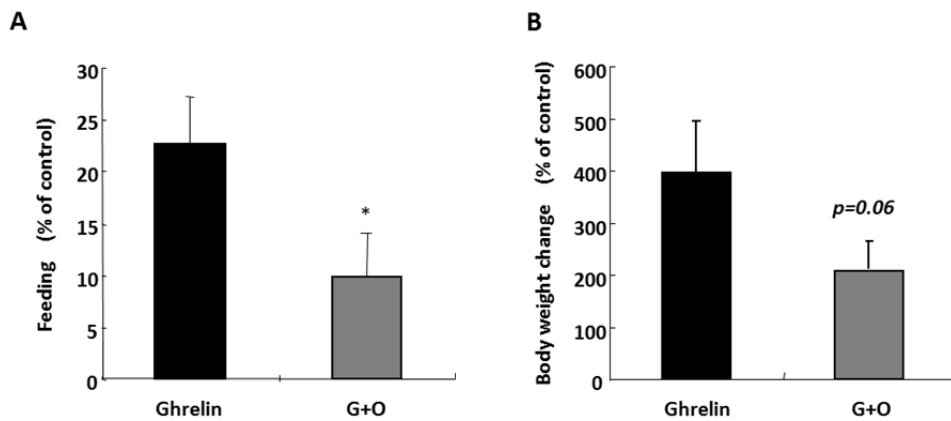


Fig. 7. Feeding and Body weight in ICV administration of Ghrelin and Obestatin. (A) Feeding change. ■ Ghrelin (n=12), ▣ Ghrelin+Obestatin (G+O) (n=13). (B) Body weight change. ■ Ghrelin (n=12), ▣ Ghrelin+Obestatin (G+O) (n=13). *p<0.05 vs Ghrelin.

4. 考 察

本研究では、食塩濃度を変化(0.2%から2%程度まで段階的に増量)させて摂餌させ、自発運動の変化を中心に、摂食量、安静時代謝、体重などの生体の変化を検討した。0.05% 低食塩給餌では自発運動能は低形成となり、2% 高食塩給餌では高自発運動能を獲得した(Fig. 2)。同様な検討を20週齢以降のSPORTSラットにも実施したが自発運動能獲得には影響を与えなかった。一方、オープンフィールドにおける自発運動は影響を与えなかった。すなわち高運動能を獲得する12週齢以下のラットに対して、摂餌食塩量が自発運動能獲得に影響を与えることが明らかとなった。この自発運動に対する食塩の作用は高自発運動能をもたないコントロールラット(Wistarラット)においても確認された。すなわち摂取食塩が運動習慣形成に関与することが明らかとされた。ヒトではこの時期は小児期のなかでも幼児期から学童期に相当すると考えられ、学童期の生活習慣形成の基礎となるものとして、食事摂取をはじめとする環境因子との関連に注目される時期でもある。ダール食塩感受性ラットでは、6週齢で高い食塩量を投与したラットの方が31週齢で与えるよりも血圧が上昇し、さらに6週齢まで高食塩で、それ以後は低食塩にしても血圧は低下しない。すなわち、この時期に刷り込みされた摂取習慣、食嗜好、運動習慣などは、将来の生活習慣を決定する時期であり、血圧に対する食塩感受性を決定する時期でもあったと考えられた。

さらに、SPORTSラットにおける摂取食塩によるエネルギー代謝への影響を検討したところ、高食塩濃度食では水分摂取とともに摂食量の増加が認められたが、酸素消費量には影響を与えなかった。最終的には、高食塩濃度食を給餌したSPORTSラットは通常食塩濃度食を給餌したSPORTSラットに比べて体重増加を示し、低食塩濃度食を給餌したSPORTSラットは体重減少を示した。以上のことから摂取食塩量が血圧のみならず運動習慣形成や摂食量、体重に影響を及ぼすことが明らかとなった。

本邦の生活習慣病の発症の劇的な増加に対して、適切な塩類摂取の重要性和生活習慣病の発症に及ぼす塩類の影響を明らかにする必要があるが、今回の研究成果によって運動習慣形成における塩類の生理学的意義が明らかとなった。今後食塩がどのような機序で運動習慣形成に関与するかを、中枢運動制御系を中心に解明し、ま

たその他の栄養素である脂肪やアミノ酸の関与や代謝シグナルも検討が必要であると考えられた。そこで本研究では、Ghrelin、Obestatinの末梢(皮下)投与および中枢(脳室内)投与を行い、自発運動の変化を中心に、摂食量、安静時代謝、体重などの生体の変化を検討した。

まず、Ghrelinの末梢投与により回転カゴ走行量が有意に減少することを確認した。この現象はGhrelinの脳室内投与でも確認され、Ghrelinは中枢を介して自発運動を抑制することが示唆された。

Ghrelinは成長ホルモン(GH)の分泌を促進する内因性リガンドとして胃から単離・同定された^[7]。その後Ghrelinは脳内の視床下部弓状核のニューロンでも産生されることも確認され、その受容体は脳のさまざまな部位で発現していることから、GHの分泌刺激のほかにも種々の中枢生理機能に関わっていると考えられている^[16-18]。本研究においても、脳室内投与により摂食量、体重の増加が確認された。Ghrelinの末梢から中枢への作用経路は迷走神経を介することが考えられている^[19]、血液脳関門を通過し直接作用するという報告もある^[20]。末梢から分泌されたGhrelinは、このどちらかの経路を介して食欲を調節し、そして自発運動制御もこのどちらかの経路を介しているものと思われる。この作用経路を確立するには、迷走神経切離の上でGhrelinの末梢投与を行い、自発運動や摂食行動を確認する必要がある。

Ghrelinは循環器系にも作用することが明らかになっている。Ghrelinを経静脈的投与すると、心拍数に影響せず血圧の低下や拍出量の増加が確認され、心不全治療薬としての有用性が示唆されている^[21-24]。また、これらの作用は交感神経の抑制による可能性が示唆されている^[9]。交感神経は自発運動をも支配しているため、我々は、交感神経の活性が高いSPORTSラットを用いてGhrelinが自発運動に及ぼす影響を検討したところ、Ghrelinが自発運動を抑制することを見出した。また、Ghrelinがノルエピネフリン放出を抑制するという報告がある^[25]、本研究では血中と尿中カテコールアミン濃度に変化はみられなかった。GhrelinはNEの受容体への結合を阻害し、NEの産生、放出抑制にも作用している可能性も考えられ、脳内のカテコールアミン量や受容体の発現、受容体との結合能などを今後検討する必要がある。Ghrelin投与による運動抑制に関する報告によれば、胃が満腹状態になると便秘や吐き

気を催す傾向があり、これも運動意欲が落ちた原因のひとつではないかと考えられており^[26]、自発運動抑制が Ghrelin の直接的な作用であるかについては疑問がもたれる。本研究においても摂食量が十分増加しており、満腹による運動意欲の低下も考えられる。しかし、Ghrelin と共に Obestatin を同時に投与した群において、Ghrelin による摂食量増加は抑えられながら、運動量低下は維持されていた。この結果から、胃の満腹感による運動量低下は考え難く、Ghrelin が直接自発運動抑制に作用したものと考えられる。

Obestatin は、摂食や消化管機能を抑制し Ghrelin の作用に拮抗する新規ペプチドとして、2005 年に Zhang らによってマウスのグレリン前駆体遺伝子から同定された^[13]。しかし、Obestatin の抑制効果についてはその効果を否定する報告もあり、いまだ結論をみていない^[14,15]。我々は Ghrelin と同時に Obestatin を投与することで、その作用を検討した。その結果、摂食、代謝に関しては Ghrelin 投与による影響が抑えられていた。この結果から、Obestatin は Ghrelin 作用抑制効果を有することが考えられた。しかし、自発運動に関してはその効果を示さなかった。よって、Ghrelin の自発運動抑制作用は、Obestatin とは別の経路で行われている可能性があると考えられた。また、我々は Obestatin の脳室内単独投与も行ったが、Obestatin 単独では運動量、摂食量、体重に変化は見られなかった(データ示さず)。従って、Obestatin は Ghrelin に対して拮抗作用を示すもので、単独では食欲や体重の調節作用を有しないことが示唆された。

Ghrelin はこれまで、成長ホルモンの分泌促進や食欲増進、心機能の改善など、様々な作用が確認されている。その中で食欲増進や脂肪利用低下といった作用はエネルギー蓄積の方向に働くものであり、本研究での Ghrelin の自発運動抑制作用もエネルギー蓄積作用の要因のひとつであると考えられた。また、Obestatin は Ghrelin の作用を抑制したが、自発運動抑制作用には影響がなかった。このことから、Ghrelin による自発運動制御は食欲調節とは別の経路を介していることが示唆された。この作用経路の詳細が明らかとされれば、肥満と運動に対する生理学的知見が集積され、さらに食塩の運動能獲得の意義の検討と相まって新たな生活習慣病へのアプローチも創出できると思われる。

5. 今後の課題

(1) 塩類による運動制御機構の分子基盤の解明

正常血圧ラットで、若年期に片方の腎臓を摘出した場合に、高ナトリウム摂取によって成獣期で高血圧となるが、成長してから片側の腎臓を摘出したラットでは高食塩摂取でも血圧に影響をあたえなかったことから、運動習慣獲得への摂取食塩の決定臓器として腎臓の役割を検討する必要がある。すなわち、片腎を摘出した高運動性 SPORTS ラットを作製し、腎臓を介する運動習慣獲得に対する摂取食塩の影響を検討する。さらに、SPORTS ラットの腎臓におけるレニン-アンジオテンシン系(RAS 系)遺伝子発現と AT1 受容体拮抗薬や抗レニン薬、抗アルドステロン薬の効果を検討し、運動習慣獲得における RAS 系の意義を明らかとし、血圧制御機構と運動制御機構のクロストークを明らかとする必要がある(現在検討中)。

(2) 塩類と代謝シグナルによるクロストークの分子基盤の解明

我々は代謝シグナルとして Ghrelin の中枢を介する自発運動への影響を明らかとした。塩類摂取がこの代謝シグナルによる分子基盤とどのようにクロストークしているかも興味もたれる。すなわち RAS 系遺伝子発現と Ghrelin の効果を検討し、運動習慣獲得における RAS 系の意義を明らかとし、代謝制御機構と運動制御機構のクロストークを明らかとする必要がある(現在検討中)。

参考文献

- [1] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature*. 372: 425-432, 1994
- [2] Hamann A, Matthaei S. Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 104: 293-300, 1996
- [3] Stanley S, Wynne K, McGowan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev*. 85: 1131-1158, 2005
- [4] Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*. 409: 194-198, 2001

- [5] Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 407: 908-913, 2000
- [6] Soares JB, Leite-Moreira AF. Ghrelin, des-acyl Ghrelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle. *PEPTIDES*. 29: 1255-1270, 2008
- [7] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 402: 656-660, 1999
- [8] Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation*. 104: 1430-1435, 2001
- [9] Matsumura K, Tsuchihashi T, Fujii K, Abe I, Iida M. Central Ghrelin Modulates Sympathetic Activity in Conscious Rabbits. *Hypertension*, 40: 699-699, 2002
- [10] Morishima-Yamato M, Hisaoka F, Shinomiya S, Harada N, Matoba H, Takahashi A, Nakaya Y. Cloning and establishment of a line of rats for high levels of voluntary wheel running. *Life Science*. 77: 551-561, 2005
- [11] Hattori A, Mawatari K, Tsuzuki S, Yoshioka E, Toda S, Yoshida M, Yasui S, Furukawa H, Morishima M, Ono K, Ohnishi T, Nakano M, Harada N, Takahashi A, Nakaya Y. β -Adrenargic-AMPK Pathway Phosphorylates Acetyl-CoA Carboxylase in a High-epinephrine Rat Model, SPORTS. *Obesity*. 18 : 48-54, 2009
- [12] Morishima M, Harada N, Hara S, Sano A, Seno H, Takahashi A, Morita Y, Nakaya Y: Monoamine oxidase A activity and norepinphrine level in hippocampus determine hyperwheel running in SPORTS rats. *Neuropsychopharmacology*. 12: 2627-2638, 2006
- [13] Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelingene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science*. 310: 996-999, 2005
- [14] Gourcerol G, Tache Y: Obestatin--a Ghrelin associatedpeptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility. *Neurogastroenterol Motil*. 19: 161-165, 2007
- [15] Tang SQ, Jiang QY, Zhang YL, Zhu XT, Shu G, Gao P, Feng DY, Wang XQ, Dong XY. Obestatin: its physicochemical characteristics and physiological functions. *Peptides*. 29, 639-645, 2008
- [16] Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevicz M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 273, 974-977, 1996
- [17] McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol*. 415-423, 1997
- [18] Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res*. 48, 23-29, 1997
- [19] Date,Y, Murakami N, Toshinai K,. Matukura S, Nijijima A, Matsuo H, Kanagawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 123: 1120-1128, 2002
- [20] Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther*. 302: 822-827, 2002
- [21] Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H.,Hayashi Y, Kangawa K. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers; *Am.J. Physiol. Regul. Integr. Comp.*

- Physiol.* 280: R1483-1487, 2001
- [22] Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman A B, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 2988, 2002
- [23] Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol.* 3: 146-151, 2003
- [24] Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, Kagiya S, Fujii K, Iida M. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension.* 43: 977-982, 2004
- [25] Mano-Otagiri A, Ohata H, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Shibasaki T. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *Journal of Endocrinology.* 201: 341-349, 2009
- [26] Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, Tschöp M. Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83-132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology.* 145: 4645-4652, 2004

Elucidation of Exercise-Established Mechanism on Salt Intake in SPORTS Rats: Crosstalk of Salt and Metabolism-Related Signal Molecules in Locomotor Activity

Hiroshi Sakaue, Nagakatsu Harada, Bold Ungarbayar, Fukiko Satho, Yutaka Nakaya

Department of Nutrition and Metabolism, Institute of Health Biosciences,
The University of Tokushima Graduate School

Summary

Purpose & Methods: We have established an original line from rats of Wister strain that had unique characteristic of high voluntarily wheel-running, named SPORTS (Spontaneously Running Tokushima-Shikoku) rats. Male SPORTS rats were fed on normal- (0.5% Na), high- (2.0% Na) or low-sodium (0.05% Na) diets for 6 weeks after weaning. Blood pressure (BP) was measured using tail-cuff system. A locomotor activity was performed by wheel cage system (voluntary activity) and open field system (spontaneously physical activity). At the end of each period, rats were sacrificed and blood samples were collected for metabolic parameters.

Ghrelin and Obestatin with a feeding promotion action have a variegated body-adjustment function of the energy metabolism regulation, the anti-inflammatory mechanism, the sympathetic nerve control and the cardiovascular system protection. Therefore, we also administered Ghrelin and Obestatin in the intracerebroventricular lesion of the SPORTS rats to examine the effects on the voluntary exercise.

Results: The high salt diet significantly decreased a voluntary activity with a wheel running cage, but did not affect the oxygen consumption, while low salt diet significantly increased a voluntary activity. Body weight was higher and food and water consumption was lower on a low-salt diet, and the opposite was observed on a high salt intake. Ghrelin significantly decreased a voluntary activity with a wheel running cage, but did not affect the oxygen consumption, while Obestatin did not inhibit the Ghrelin-induced decrease in a voluntary activity.

Discussion: Besides the known effect of low and high salt intake on blood pressure, the present data indicate that the voluntary activity are influenced by salt restriction and overload. Ghrelin negatively controls the voluntary exercise with a wheel running cage through the center nerve system. These effects of physical activity are possibly due to increased and decreased metabolic signals respectively, induced by high and low salt intake. Thus, Ghrelin might be new key molecules for the biological regulation of voluntary exercise.