

神経性食欲不振症における神経ペプチドおよび

脳内アミン受容体の遺伝子解析

(課題番号 11671098)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金（基盤研究（C））研究成果報告書



平成13年3月31日

研究代表者 鈴木真理（堀田）  
(東京女子医科大学内分泌疾患総合医療センター内科助手)



[はしがき]

神経性食欲不振症は、主として若年女性に発症する心身症で、本邦でもこの20年間に患者数が激増している。単一遺伝子疾患ではないが、家族内に本症の発症や他の心身症の合併が多く、何らかの遺伝素因が推測されている。著者は、本症は心理ストレスが発病と病態の維持に深く関与していることから、ストレスの主たるメディエーターである Corticotropin-releasing factor (CRF) およびその受容体 (type1 と type2) の遺伝子解析を行った。CRF およびそのプロモーター領域についてはこの報告書作成時に解析中であった。セロトニンやドパミン受容体の解析を行う予定であったが、研究期間中に他施設から報告されたので、今回の検討から削除した。

#### 研究組織

鈴木 眞 理 (東京女子医科大学内分泌疾患総合医療センター内科助手)

#### 研究経費

平成 11 年度	1500 千円
平成 12 年度	1100 千円
計	2600 千円

#### 研究発表

(2) 口頭発表 鈴木眞理

神経性食欲不振症患者の Corticotropin-releasing factor type1 受容体遺伝子の解析  
第 8 回 (財) 赤枝医学研究財団 助成論文研究発表会 平成 12 年 2 月 17 日

## [研究目的]

神経性食欲不振症は、心理的原因による摂食量の減少、体重減少、無月経、行動異常、精神症状を呈し、視床下部機能不全による内分泌異常や自律神経失調を伴う心身症である。本症患者では、血漿 ACTH や血中コルチゾール値が高く、日内変動を欠き、低用量のデキサメサゾンによる抑制が不良で、静脈内投与された corticotropin-releasing factor (CRF) への反応が低下している<sup>1)</sup>。CRF は、下垂体前葉からの ACTH 分泌を促進するばかりでなく、中枢で作用してさまざまなストレス反応の出現機序に関与しており、ラットに CRF を慢性脳室内投与すると本症に類似した病態を再現できる<sup>2)</sup>。著者らは、本症患者の脳脊髄液中の CRF 濃度が高いことを報告し、内因性 CRF の過剰分泌が本症の発症や病態に関与している可能性を示した<sup>1)</sup>。ところで、本症ではしばしば同一家族内に複数例の発症があり<sup>3) 4)</sup>、一卵性双生児における発症の一致率は二卵性双生児を上回る。患者の家族内には本症のみならずうつ病やアルコール依存症患者をしばしば認める<sup>5) 6)</sup>。さらに、うつ病患者においても脳脊髄液中の CRF 濃度が高いことが報告されている<sup>7)</sup>。

ヒト CRF 受容体(R)は、CRFR1 と CRFR2 $\alpha$ の2種のサブタイプが既にクローニングされている<sup>8) 9)</sup>。遺伝子座はそれぞれ 17q12-q22 と 7p21-p15 である。アミノ酸数はそれぞれ 415 と 411 で、それらのアミノ酸配列には 70%の homology があるものの、薬理学的特徴、脳内分布、ストレス時の mRNA の変化には際立った違いがある<sup>10)</sup>。例えば、摂食中枢である視床下部の室傍核では、非ストレス時には CRFR1 mRNA は発現していないが、拘束などのストレスを与えたり CRF を脳室内に投与すると発現し、この時 CRFR2 mRNA 発現レベルは変化しない<sup>11)</sup>。ラットにおける CRFR1 の選択的拮抗薬や CRFR1 の antisense の投与、あるいは CRFR1 knockout mouse で CRFR1 作用を減少させると、下垂体前葉からの ACTH 分泌や不安や鬱症状を減少させるため、ストレス時に認められる ACTH 分泌や不安による行動変化にはの主として CRFR1 が関与していることが明らかにされている<sup>12) 13) 14)</sup>。我々も、拘束ストレスによる摂食の低下、拘束ストレス時の覚醒度の亢進<sup>15)</sup>、心理ストレスによる摂食量の低下と自発運動の亢進に CRFR1 が主として関与していること<sup>16)</sup>を報告している。一方、CRFR1 とは反対に、CRFR2 deficient mouse では、不安度が増強しており、CRFR2 は不安を軽減するように作用している。興味深いことに、この作用は雄マウスにのみ認められ、性差があることも明らかにな

っている<sup>17)</sup>。神経性食欲不振症患者の95%が女性であり、これほど性差が明らかな心身症はほかにない。

CRF 遺伝子では、制限酵素 AflIII (position 1273 の T→C base substitution)、BsmAI (position 2942 の T→C base substitution) による消化で識別できる多型が慢性関節リウマチの発病と関連していることが報告されている<sup>18)</sup>。

神経性食欲不振症は単一遺伝子疾患ではないが、CRF をはじめとする、摂食や情動にかかわると考えられている脳内ペプチドやアミンの受容体遺伝子の解析で遺伝子多型が得られれば、疾患発症の素因、あるいは広く心身症の素因の一つとなりうる遺伝子異常が解明される可能性があると考えられる。また、本症の病態に CRF の過剰分泌の関与が推測されるため、最近開発されつつある非ペプチド性 CRFR1 拮抗薬の治療薬としての治験が進められている。本症における CRFR1 遺伝子の解析は、非ペプチド性 CRFR1 拮抗薬を本症の治療薬として利用できる可能性を明らかにする上でも意義があると考えられる。

そこで、神経性食欲不振症患者の家族内発症を有する患者の末梢血リンパ球からゲノム DNA を抽出して、ヒト CRF、CRFR1 および R2 遺伝子を、制限酵素切断片長多型 (restriction fragment length polymorphism : RFLP) 法を用いたサザンブロット法と、PCR を用いたシーケンス法で解析し、疾患発症の素因に関与した遺伝子異常を解明することを目的とした。

#### [対象と方法]

##### 1) 対象

対象は1990年の厚生省調査研究班の診断基準、①標準体重の-20%のやせが3カ月以上持続、②食行動の異常、③体重や体型についての歪んだ認識、④発症年齢は30歳以下、⑤女性ならば無月経、⑥やせの原因と考えられる器質的疾患がない、を満たす表1に示した女性患者15名で、同疾患の家族内発症を有する。内訳は図1に示したように、両者が罹患した1卵生双生児2組4名、母親も罹患した2名、姉もしくは妹も罹患した5名、いともしくはおばも罹患している4名である。対照は、心身症や精神疾患の既往がなく、調査の限りでは神経性食欲不振症の家族歴のない30才以上の健康女性10名とした。

## 2) 方法

### 1) RFLP 法

ヘパリン加末梢血液からシュクロース勾配法にて白血球を分離し、ゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA を、Apa I、Bcl I、Bgl II、BamH I、Dra I、EcoR I、EcoRV、Hpa I、Hind III、Kpn I、Nco I、Pst I、Pvu II、Sac I、Sca I、Sma I、Spe I、Sph I、Ssp I、Xba I、Xho I の 21 種類の制限酵素で消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動後、ヒト CRFR1 および CRFR2cDNA 全長をプローブにしてサザンブロット法にて RFLP の検出を行った。

### (2) シークエンス法

ゲノム DNA は、既報のヒト CRFR1 と CRFR2 のシークエンス<sup>9) 15)</sup>に従って、イントロン内にプライマーを設定してエクソンごとに DNA 断端を PCR 法にて増幅後、その産物を Dye terminator cycle sequencing (PE Biosystems, Foster City, CA)にてシークエンスした。表 2 に CRFR1 の PCR の primer を示した。

Exon	
1	F 5'-AAACGGCGGCCAGACTTCCCCGGGA-3' R 5'-AGAGGGATGGCCGGCGGGCTGTTAC-3'
2	F 5'-TGGACACTCGGCCTCTCTTTGACT-3' R 5'-ACTAGCCTGTGAGCCCCCTTGTTC-3'
3	F 5'-ATTGCAGAGACGTGAGGGGCTAGGT-3' R 5'-CCTGTGCATCTGAACTCTGGGTCC-3'
4	F 5'-AGGAAGATGGGGGTGGTAAGGAAGC-3' R 5'-GGCATGTGTTGTGGAAAAGGGTGGG-3'
5~9	F 5'-GGTTGCCCTGATGGTTTAAGACGA-3' R 5'-CCAAGAGGTAGATGTCCCAATTCC-3'
10~14	F 5'-GTTTGAGATCCACCCTGAGTAACC-3' R 5'-GTAGCCTGATGTGGGAATGCAGAA-3'

## [結果]

- 1) 21 種類の制限酵素の消化後のサザンブロット法では、ヒト CRFR1 と CRFR2 に神経性食欲不振症患者と健康女性ともに RFLP を認めなかった。CRFR1 の制限酵素 Dra I、EcoR I、EcoR I、Kpn I による消化後のサザンブロットティングの結果を図 2 と 3 に示した。
- 2) 患者のゲノム DNA のシーケンス法では、ヒト CRFR1 はエクソン 1-5 および 7-14 とそれぞれのエクソン前後のイントロン 30 塩基には点変異を認めず、塩基配列はよく保存されていた。ヒト CRFR2 のエクソン 1-12 とそれぞれのエクソン前後のイントロン 30 塩基にも点変異を認めず、塩基配列はよく保存されていた。

## [考察]

家族歴を有する神経性食欲不振症患者 15 名の CRFR1 と CRFR2 遺伝子は、エクソンとその前後のイントロン 30 塩基には点変異を認めず、よく保存されていた。この検討の限りでは、神経性食欲不振症の発病の素因に関して CRFR1 と CRFR2 遺伝子多型の関与はないと考えられた。

この検討の経過中、本症の発症に関して種々の遺伝子解析の結果が報告された<sup>20)</sup>。レプチン、セロトニン受容体(5-HT<sub>2A</sub>、5-HT<sub>1D</sub>β、5-HT<sub>7</sub>) セロトニン受容体ドパミン受容体(D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub>)、セロトニントランスポーター、トリプトファンヒドロキシラーゼ遺伝子多型には有意な関連を認めない。セロトニンは、食欲、エネルギー調節、情動とくに抑鬱に関係した脳内アミンである。また、最近、神経性過食症の過食と抑鬱、神経性食欲不振症の強迫性に対して、セロトニン再吸収阻害薬(SSRI)が使用され、効果が認められている。セロトニン受容体(5-HT<sub>2A</sub>)のプロモーター領域の-1438G/A 多型に関して、A-allele と本症との相関が報告されているが、人種によって統一した見解が得られていない。

今後、CRF 遺伝子多型、およびおけるセロトニン受容体(5-HT<sub>2A</sub>)のプロモーター領域の-1438G/A 多型について解析をすすめる予定である。

[参考文献]

- 1) Hotta M, Shibasaki T, Yamauchi N, Ohno H, Benoit R, Ling N, Demura H.  
The effects of chronic central administration of corticotropin-releasing factor on food intake, body weight and hypothalamic-pituitary-adrenocortical hormones.  
*Life Sci* 48: 1483-1491, 1991.
- 2) Hotta M, Shibasaki T, Masuda A, Imaki T, Demura H, Ling N, Shizume K.  
The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone(CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa.  
*J Clin Endocrinol Metab* 62:319-324, 1986.
- 3) Dally PJ, Gomez J. Anorexia nervosa. (Heinemann, London) 1979.
- 4) Garfinkel PE, Garner DM, Rose J, Darby PL, Brandes J, O'Hanlon J, Walsh N.  
A comparison of characteristics in the families of patients with anorexia nervosa and normal controls. *Psychological Medicine* 13:821-828, 1983.
- 5) Crisp AH. Anorexia nervosa: Let me be. (Grune & Stratton, New York) 1980.
- 6) Kalucy RC, Crisp AH, Harding B. A study of 56 families with anorexia nervosa.  
*Br J Med Psychol* 50:381-395, 1977.
- 7) Nemeroff CB, Waderlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226:1342-1343, 1984.
- 8) Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW.  
Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8967-8971, 1993.
- 9) Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grioriadis DE, DeSouza EB.  
Cloning and characterization of the human CRF2 receptor gene and cDNA.  
*Endocrinology* 137:72-77, 1996.
- 10) Turnbull AV, Rivier C.  
Corticotropin-releasing factor (CEF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *PSEBM* 215:1-10, 1997.
- 11) Makino S, Takemura T, Asabe K, Nishiyama M, Takao T, Hashimoto K.  
Differential regulation of type-1 and type-2a corticotropin-releasing hormone receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat.  
*Mol. Brain Res.* 47:170-176, 1997.
- 12) Webster EL, Lewis DB, Torpy DJ, Zachman EK, Rice KC, Chrousos GP.

In vivo and in vitro characterization of Antalarmin, a nonpeptide corticotropin-releasing hormone(CRH) receptor antagonist : Suppression of pituitary ACTH release and peripheral inflammation.

Endocrinology 137:5747-5750, 1996.

13) Heinrichs SC, Lapsansky J, Lovenberg TW, De Souza EB, Chalmers DT.

Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. Regul. Pept. 71:15-21, 1997.

14) Smith GW, Aubry J-M, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, Lee K-F.

Corticotropin-releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development.

Neuron 20:1093-1102, 1998.

15) Arai K, Ohata H, Shibasaki S.

A non-peptidic corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor type 1 antagonist reverses restraint stress-induced shortening of sodium pentobarbital-induced sleeping time of rats: evidence that an increase in arousal induced by stress is mediated through CRH receptor type 1. Neurosci. Lett. 255:103-106, 1998.

16) Hotta M, Shibasaki T, Arai K, Demura H.

Corticotropin-releasing factor receptor type1 mediates emotional stress-induced inhibition of food intake and behavioral changes in rats. Brain Res 823:221-225, 1999.

17) Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, Hermanson O, Rosenfeld MG, Spiess J.

Deletion of crfr2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. Nature Gen. 24:415-419, 2000.

18) Baerwald CG, Panaya GS, Lanchbury JS

Corticotropin releasing hormone promoter region polymorphisms in rheumatoid arthritis. J Reumatol. 24:215-216, 1997.

19) Sakai K, Yamada M, Horiba N, Wakui M, Demura H, Suda T.

The genomic organization of the human corticotropin-releasing factor type-I receptor.

Gene 219:125-130, 1998.

20) Hinney A, Remschmidt H, Hebebrand J.

Candidate gene polymorphisms in eating disorders.

Eur J Endocrinol. 410:147-159, 2000.



表1：対象患者のプロファイル

患者番号	発病年齢 (歳)	罹病期間 (年)	転帰	家族内発症
1	15	4	治癒	双生児妹
2	17	5	治癒	双生児姉
3	12	2	治癒	双生児妹
4	12	2	治癒	双生児姉
5	18	4	治癒	母
6	20	4	未治癒	母
7	18	2	治癒	妹
8	15	3	神経性過食症	姉
9	16	6	未治癒	姉
10	12	6	治癒	姉
11	20	9	未治癒	妹
12	18	6	未治癒	父方伯母
14	24	10	未治癒	父方伯母
13	15	5	治癒	母方叔母
15	15	4	治癒	父方従姉妹

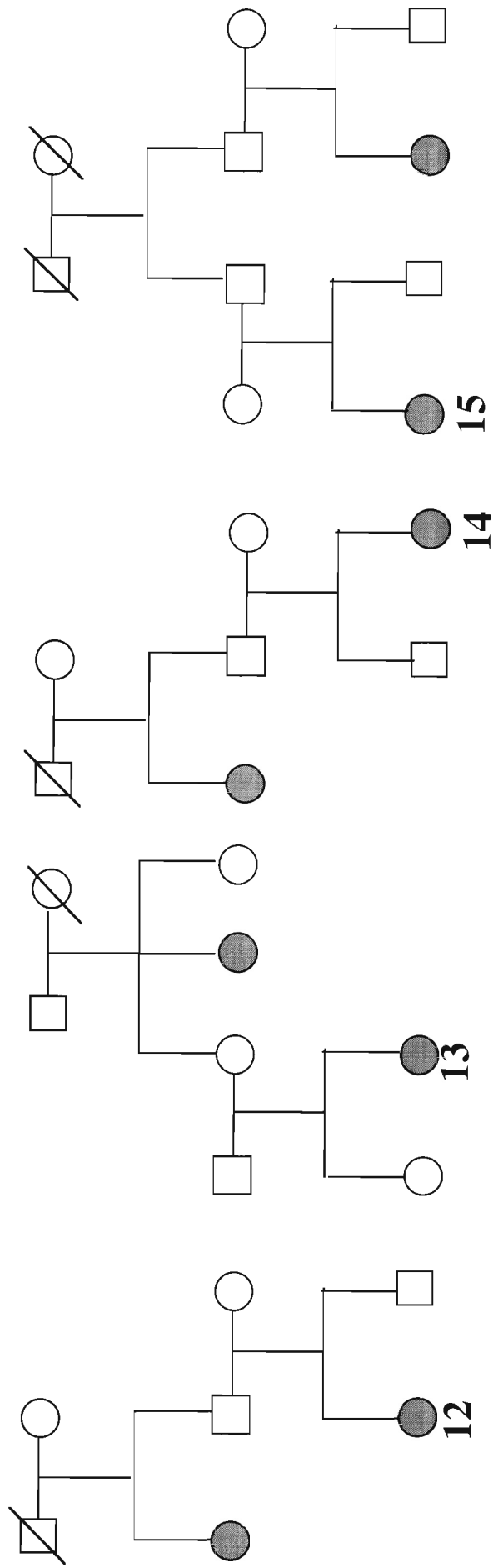
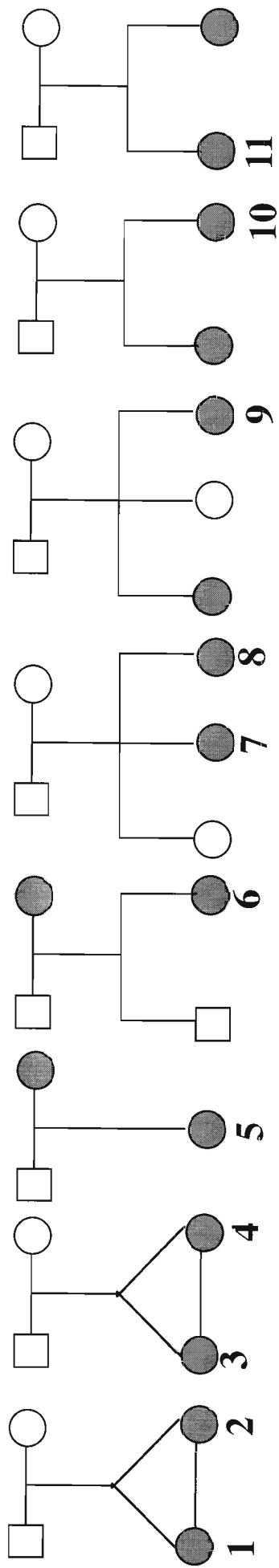
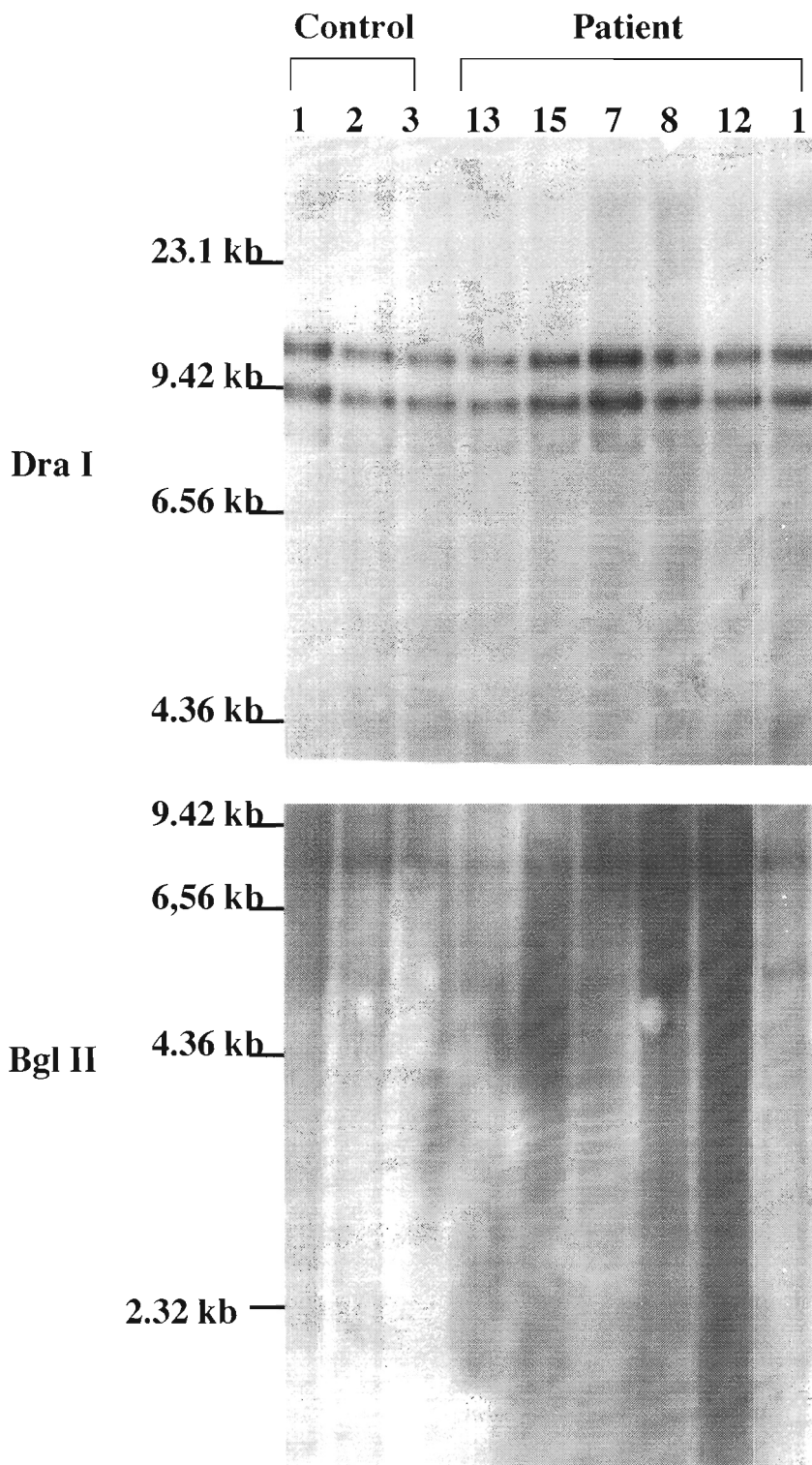


図1 対象患者の家系図

● anorexia nervosa



☒ 2 RFLP digested with Dra I or Bgl II

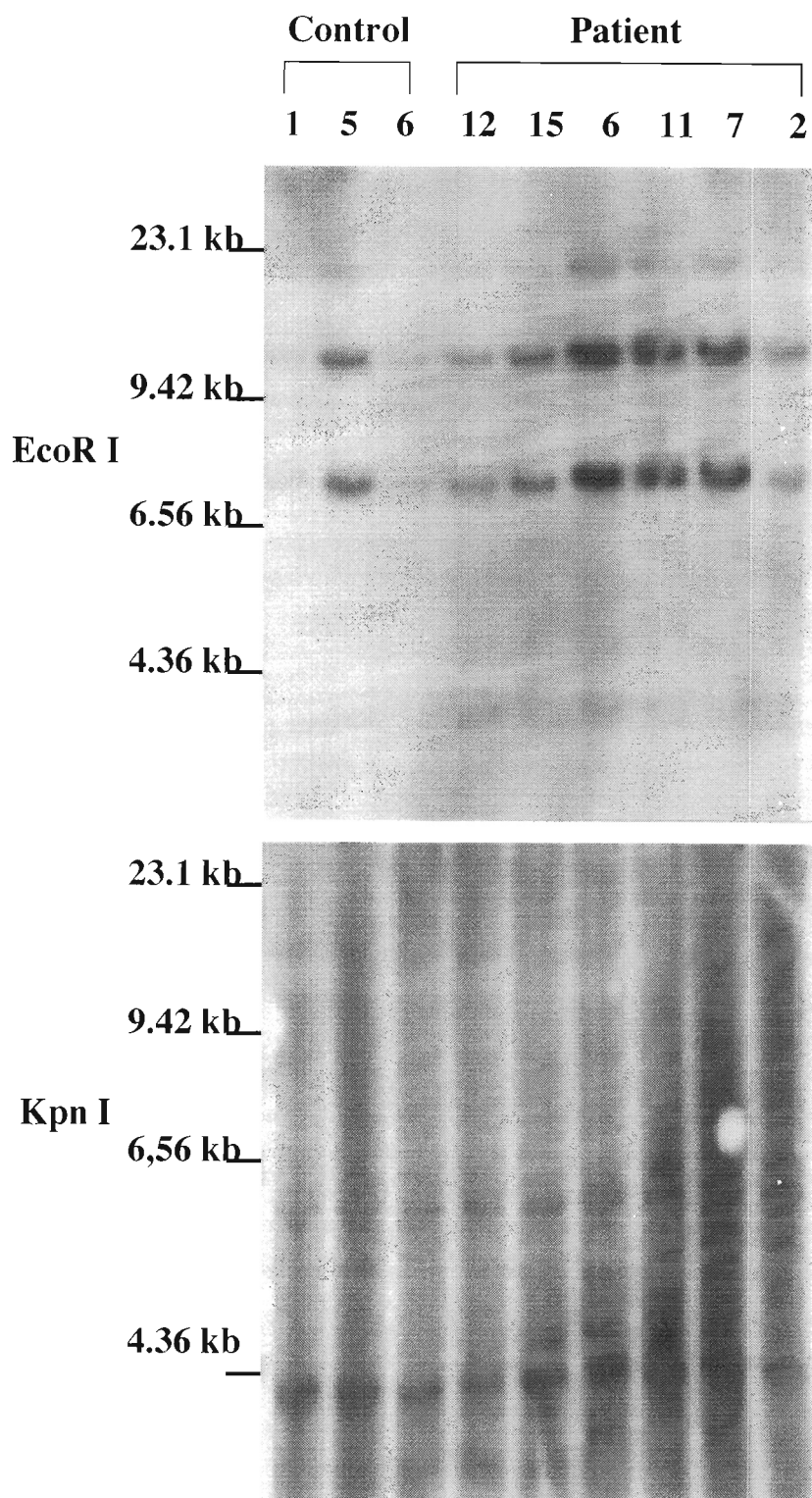


图3 RFLP digested with EcoR I or Kpn I