

表 題 FGF21 の社会的敗北ストレスにおける働き

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 薄井 直

担当指導教員氏名 森 良之教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
専攻 地域医療学系
専攻分野 消化器疾患学
専攻科 歯科口腔外科学

2021 年 1 月 8 日申請の学位論文

目次

1. はじめに.....	2
2. 方法.....	6
3. 結果.....	24
4. 考察.....	56
5. おわりに.....	61
引用文献.....	63
謝辞.....	68

1. はじめに

FGF21 は主に肝臓から分泌される蛋白質で¹、その他に膵臓や筋肉など多数の組織における分泌が報告されており²⁻⁸、標的細胞上に存在する受容体の FGFR1C が N 末端、共受容体である β Klotho が C 末端に結合し複合体を形成し細胞内にシグナルを伝達する(図 1)。

β Klotho は脳内において主に最後野(AP)、孤束核(NTS)、視交叉上核(SCN)に多く分布しており⁹、末梢で分泌された FGF21 が血液脳関門を通過して¹⁰ β Klotho と FGFR1C と複合体を形成^{11,12}し作用する。例えば FGF21 は脱髄モデルマウスにおいてオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖を促進し再ミエリン化に寄与したり¹³、交感神経活動を修飾する。さらに FGF21 は末梢臓器のみならず、皮質や海馬、線条体や黒質におけるグリア細胞が発現しているという報告もなされている¹⁴。

また FGF21 は交感神経を介して白色脂肪組織と褐色脂肪組織を含む標的組織のエピネフリン代謝回転を増加させたり¹⁵、脂肪組織、アディポネクチンを介したグルコースの恒常性、インスリン感受性の増加¹⁶や報酬系(側坐核のドーパミン濃度)に関連したショ糖やアルコール嗜好性の低下¹⁷に寄与するとされており糖尿病や脂質異常症患者への治療を見据えた研究が行われている¹⁸⁻²¹(図 2)。

また FGF21 の合成と分泌は酸化ストレスに対する抑制作用や²²、ケトン食や高

脂肪食、飢餓といった多様な栄養ストレスにおいても誘導される⁹ことが報告されている。さらに双極性躁病患者において血清 FGF21 濃度が高値を示し、薬物療法後に減少したとの報告もある²³。加えて脳脊髄液中の FGF21 濃度がうつ病スコア(BDI)との間に負の相関が認められたとの報告や²⁴、FGF21 が不安様行動を誘発した²⁵との報告からも FGF21 がストレス応答やうつ病などの気分障害に関わることが示唆されている。こういった精神疾患に対する作用の存在は FGF21 を用いた糖尿病や脂質異常症に対する治療薬開発の一助となり、さらには新たな疾患に対する治療薬となる可能性も期待できると考えられる。

また FGF21 の共受容体である β Klotho が延髄孤束核のノルアドレナリン作動性ニューロンに発現していることが示唆されている。そのノルアドレナリン作動性ニューロンの 1/3 には PrRP (プロラクチン放出ペプチド) ニューロンが含まれている。PrRP ニューロンは条件恐怖ストレスの刺激により活性化されとの報告²⁶があり延髄孤束核のノルアドレナリン作動性ニューロンとストレス応答との関連が示唆されている。これらのことから FGF21 がストレス応答に関与している可能性が考えられる。また腹側被蓋野(VTA)に投射するノルアドレナリン作動性ニューロンの活性化も社会的敗北ストレス後に観察される抑うつ様行動を減弱させるとの報告がある²⁷。

社会的敗北ストレスは同種の優位個体からの攻撃により身体的、精神的にスト

レスを負荷させるものである。社会的敗北ストレスの暴露により抑うつ症状(強制水泳テストにおける無動時間(immobile behavior)の増加²⁸や社会性の低下(社会相互作用テストにおける社会的相互作用の低下²⁹や不安傾向の増加(高架式十字迷路における壁のないオープン通路内での滞在時間の減少、壁のあるクローズド通路内での滞在時間の増加³⁰や無快感の増加(ショ糖施行テストにおけるショ糖嗜好の低下³⁰などの表現型が誘発される。社会的敗北ストレスはうつ病の動物実験モデルとして広く用いられている手法である。

本研究ではまず FGF21 の中枢投与を行い延髄のチロシン水酸化酵素(TH)陽性のカテコラミン作動性ニューロンにおける Fos 蛋白質の発現を調べることにより、FGF21 が孤束核のノルアドレナリン作動性ニューロンを活性化するかどうかを検証した。

次に、社会的敗北ストレスが血漿中の FGF21 を増加させるかどうかを検証した。

さらに、FGF21 欠損マウスにおける社会的敗北ストレス誘発性の抑うつ様行動を分析することにより、内因性 FGF21 が抑うつ様行動の制御に関与するかどうかを検証した。

また、抑うつ様行動に対するアデノ随伴ウイルス (AVV) ベクターの末梢投与によって過剰発現された外因性 FGF21 の影響を検討した。

図 1

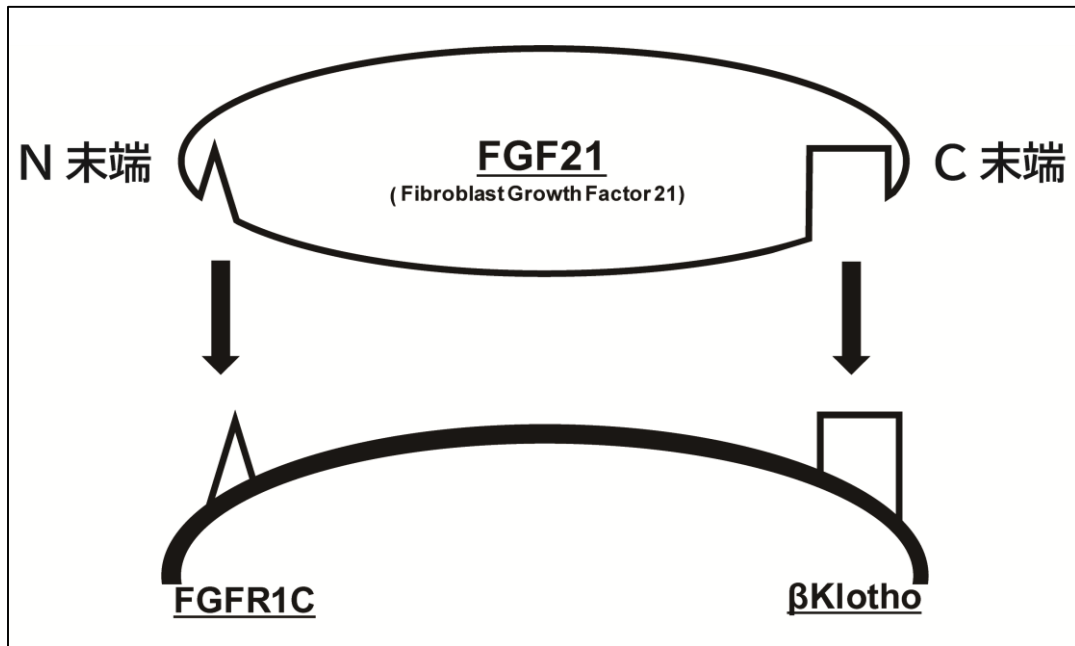
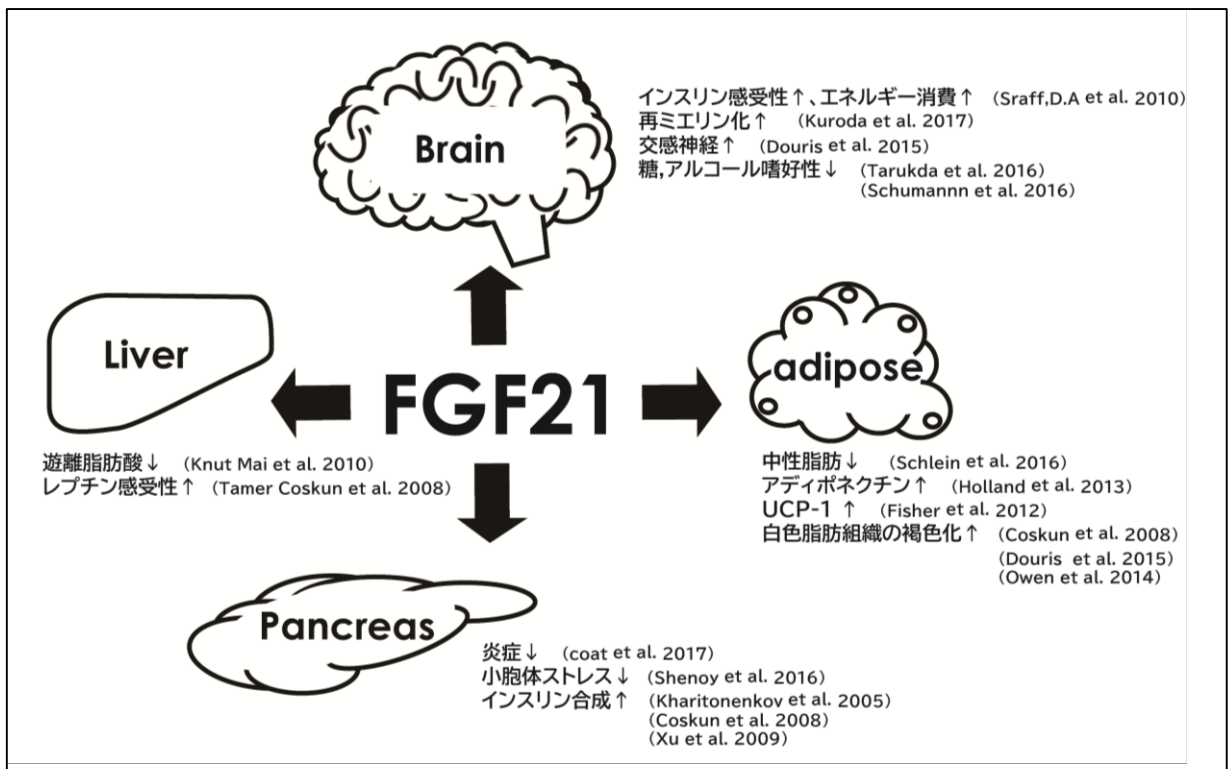


図 2



2. 方法

2-1 動物

オス C57BL/6J マウス(Charles River Laboratories Japan)、オス FGF21 欠損マウス(Dr Steven Kliewer, university of Texas Southwestern Medical Center)、オスリタイア ICR マウス(Charles River Laboratories Japan)、オスラット(Slc : Wistar、Japan SLC,Inc.,Shizuoka,Japan)を本実験に使用した。

全ての動物は室温 20～24 °C、湿度 40～70 %で管理され 12 時間おきの明暗周期(明期 7:30～19:30)のもと飼育し、固形飼料(CE-2、日本クレア)と水は自由摂取とした。

FGF21 欠損マウスを用いた実験、および野生型マウスを用いた FGF21 過剰発現実験では個飼い開始からテスト終了まで体重、飲水量、食事摂取量の測定を毎日行った。

なお、動物実験は自治医科大学の動物実験委員会と遺伝子組み換え実験安全委員会から承認を受け、本学の実験動物指針と本邦の関連法規に従い行った。

2-2 カニユーレ留置術、FGF21 の脳室内投与

オスのラット（9 週齢、slc:Wistar、SLC Japan）をアバチン（tribromoethanol、200 mg / kg BW、トリブロモエタノール、WAKO Pure Chemical Industries Ltd.,Osaka,Japan）の腹腔内投与にて麻酔し、イヤバーを用い頭部を脳定位固定装置に固定した。

ステンレス鋼のガイドカニユーレ（23 G）を右側脳室（先端の位置が bregma から尾側に 0.6 mm、正中線の右側に 1.6 mm、頭蓋骨の下方に 4.5 mm）に挿入し、ネジ 2 本と歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。ガイドカニユーレ留置後、FGF21 の脳室内投与まで 2 週間の回復期間を設けた。

脳室内投与時の体動や過度なストレスを与えることを避けるために回復期間中、毎朝ラットを手指にて把持し、腹を 10 回程度撫でるというハンドリング操作を行った。またカニユーレの内筒は脳室内投与の前日に除去しておき、予め摂水と、摂食の影響を避けるため当日の朝にそれぞれのケージの餌と給水ボトルを除いた。脳室内投与はマイクロシリンジ(株式会社 伊藤製作所)を用いて内部カニユーレ（30 G）を介して FGF21（0、10、100、1,000 ng/ 5 μ l、1 群あたり 5～6 匹）を投与した。コントロールの 0 ng/5 μ l 投与群は人工脳脊髄液を投与した。FGF21 溶液は 1000 ng/5 μ l から人工脳脊髄液で希釈し作製した(人工脳脊髄液：147 mM NaCl ,1.2 mM CaCl₂ , 0.9 mM MgCl₂ , 4 mM KCl)。

2-3 アデノ随伴ウイルス 8(AAV8)-FGF21/AAV8-hrGFP の投与

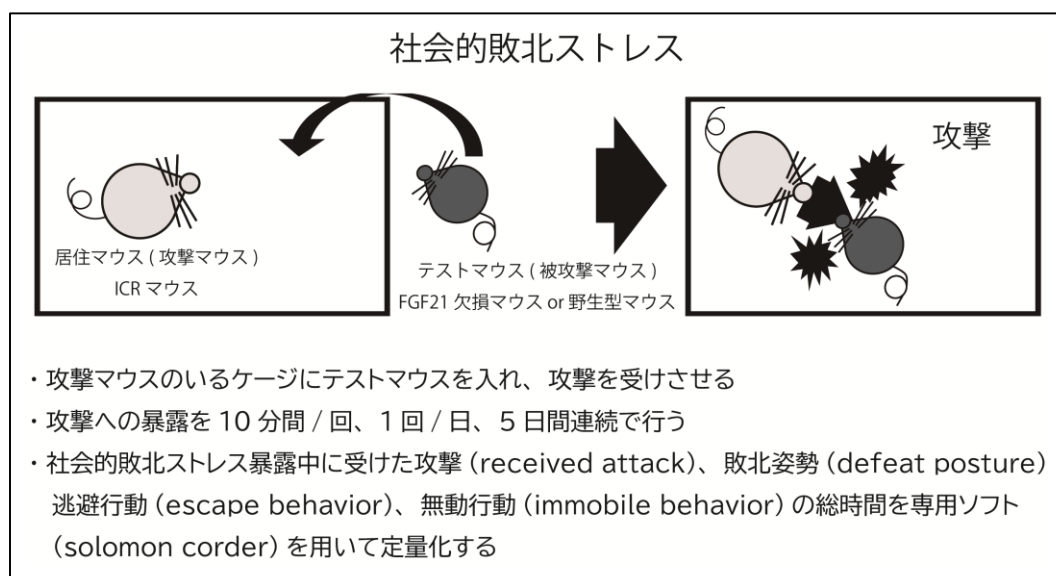
CAG プロモーターの制御下でマウスの FGF21 または hr-GFP(green fluorescent protein)を発現させる AAV8 ベクターを無麻酔下で野生型マウスに対して腹腔内へ単回投与(500 μ l)した。(自治医科大学医学研究科 遺伝子治療研究部水上研からの譲渡)

投与群はコントロールを含め 3 群にし(AAV8-FGF21 : 1.0×10^9 vg(ウイルスゲノム)/500 μ l、 5.0×10^8 vg/500 μ l、AAV8-hr-GFP : 1.0×10^9 vg/500 μ l)、先行文献³¹に従い AAV の投与は購入したマウスを 2 週間、群飼いにした後 1 週間個飼いにして飼育環境に十分順化させてから行った。

2-4 社会的敗北ストレス

先行文献³²に従い攻撃性の高いオスリタイア ICR マウスを選別した。選別したアグレッサー(攻撃者)は個飼いで飼育した。アグレッサーICR マウスのホームケージに、テストされるマウスを入れた。先行文献³²に従い1日10分間ICR マウスのホームケージに入れ、ICR マウスからの攻撃を受けさせた。その後、テストマウスを取り出しホームケージに戻した。攻撃中のテストマウスの行動をビデオに記録し受けた攻撃の時間(received attack)、社会的敗北姿勢を示した時間(defeat posture)、無動行動を示した時間(immobility behavior)、逃避行動を示した時間(escape behavior)を計測した。この計測は社会的敗北ストレスの1日目と5日目に行った。攻撃は1匹につき1日1回、連続で5日間行った。テストマウスは毎日、異なる ICR マウスからの攻撃に暴露させた(図3)。

図3



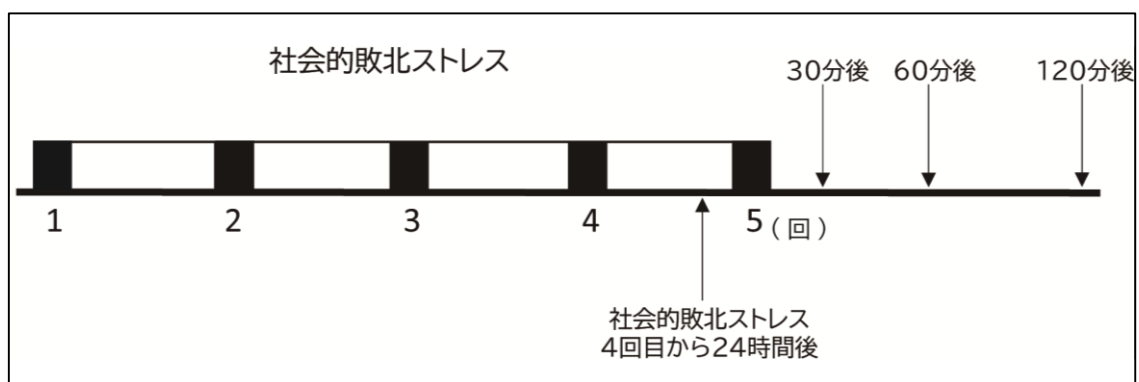
2-5 社会的敗北ストレス後の血漿 FGF21、コルチコステロン濃度の測定

10 週齢の野生型オス C57BL/6J マウス(Charles River Laboratories Japan)に対して社会的敗北ストレスを 1 日 1 回 5 日間、暴露させた。最後のストレス暴露から様々な時間に断頭採血した。血漿 FGF21 とコルチコステロン濃度は ELISA(FGF21-BioVender RD291108200R, Brno, Czech Republic、コルチコステロン-Cayman chemical No.501320, Ann Arbor, Michigan, USA)を用いて製造元の手順に従い定量した。

マウスを 20 匹ずつ(社会的敗北ストレス群 10 匹、コントロール群 10 匹)の 4 グループに分け、それぞれ 5 回目のストレス暴露から 0 分後(5 回目のストレス暴露直前かつ 4 回目のストレス暴露から 24 時間後)、30 分後、60 分後、120 分後に断頭採血を行った。

コントロール群のマウスは社会的敗北ストレスに暴露させず、5 日間連続で新規のケージに 10 分間入れホームケージに戻すという処理を行った(図 4)。

図 4



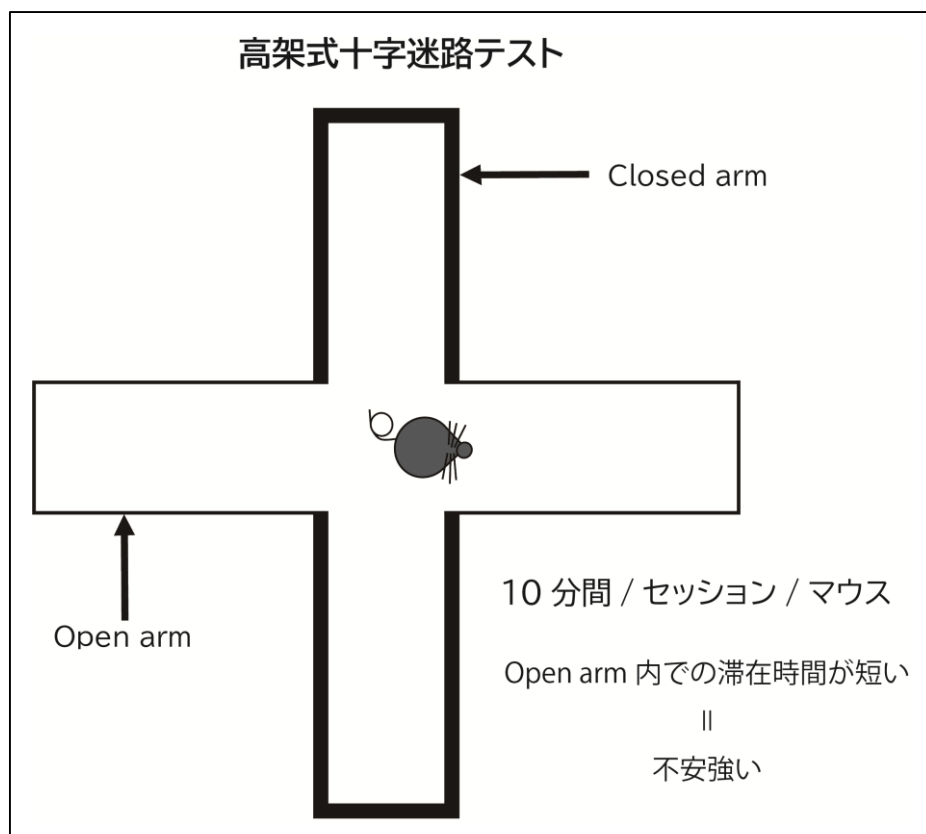
2-6 行動テスト

行動テストは社会的敗北ストレスを与える前後に行った。不安様行動を評価する高架式十字迷路テスト、社会行動の評価を行う社会的回避テスト、社会相互作用テスト、抑うつ行動を評価する強制水泳テストを行った。行動テストは全て明期の間に行い、1日に1種類のテストのみを行った。行動テストは社会的敗北ストレス暴露前と暴露後に同じ順番、日程で行った。また1日あたりの飲水量、食事摂取量はAAVベクターを投与しFGF21を過剰発現させた実験においてはAAVベクター投与当日の朝、1回目の社会的敗北ストレス当日の朝および5回目の社会的敗北ストレス翌日の朝に測定した。FGF21欠損マウスを用いた実験においては、社会的敗北ストレス当日の朝および5回目の社会的敗北ストレス翌日の朝に個々のケージの飲水瓶と餌箱の重量を測定し体重とともに記録した。

2-6-1 高架式十字迷路テスト

壁のないオープン通路(open arm)と壁のあるクローズド通路(close arm)(25 × 5 × 15 cm の透明の壁)からなる高架式十字迷路(10 lux、O'Hara & Co., Tokyo, Japan)を用いて活動量の指標としてマウスの総移動距離(total distance)、オープン通路内での滞在時間(open arm duration)、オープン通路への侵入回数(number of open arm entries)を計測し、不安症状の評価を行った。テストは1 個体 1 セッション 10 分間行った。上記は先行文献に従い³³ 行動解析ソフト (Time EP1 O'Hara & Co., LTD、Tokyo , Japan)を用いて自動計測した(図 5)。

図 5



2-6-2 社会的回避テスト

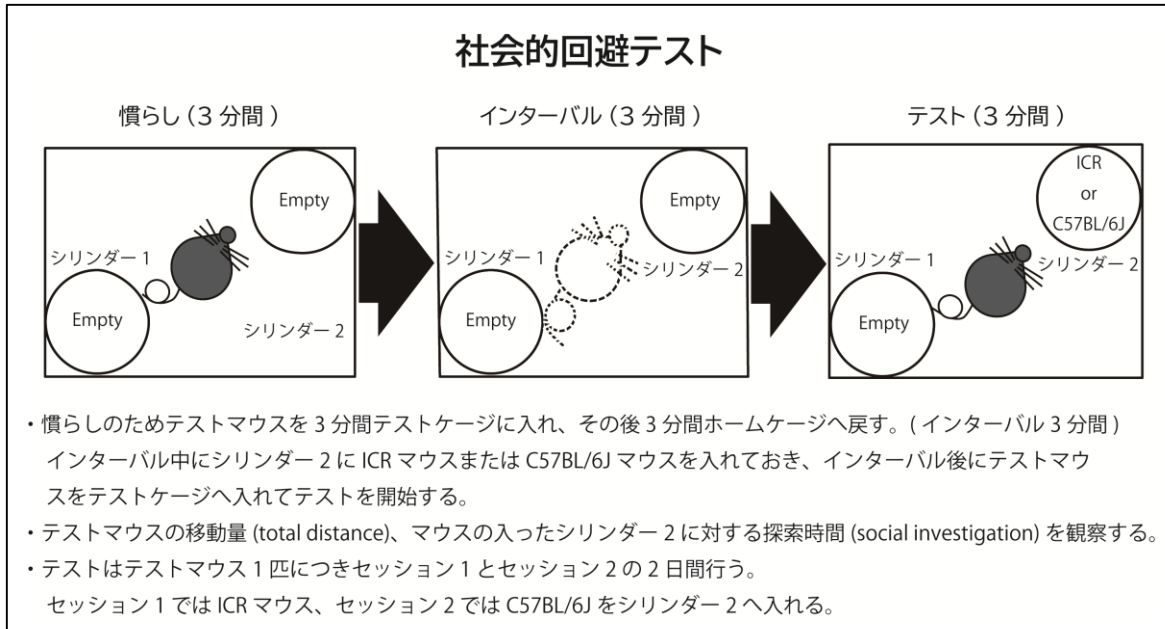
初めにテストマウスをテストケージ(20 lux、15 × 28.5 × 39.5 cm)に 3 分間入れて環境への慣らしを行った後にホームケージに戻し、3 分間待機させた。

テストケージ内には 1 つの角とその対角にそれぞれ 1 本、計 2 本の穴の開いた空のシリンダーが置かれている。シリンダーは透明なアクリル製で、大きさは直径 7 cm、高さ 16.3cm で下方に複数の小穴が開いている。

3 分間の待機の上にシリンダーの一方に ICR マウスもしくは C57BL/6J マウスを入れた。3 分後、再びテストマウスをテストケージに入れてテストマウスの活動量の指標としてテスト中のマウスの総移動距離(total distance)を計測した。さらに ICR もしくは C57BL/6J の入ったシリンダーへの探索時間(social investigation)を 3 分間観察した。上記は先行文献に従い³³行動解析ソフト(Time SSI O'Hara & Co., LTD、Tokyo , Japan)を用いて自動計測した。

活動量と社会的な探索時間(マウスの入ったシリンダーへの探索時間)を測定することで、攻撃を受けた相手と同じ系統の ICR マウスを回避しているのか、また自分と同じ系統である C57BL/6J マウスに対しても回避するようになるのかを検証した。このテストは 1 日 1 セッション、2 日間連続で行い 1 セッション目はシリンダーに ICR を入れ、2 セッション目に C57BL/6J マウスを入れた(図 6)。

図 6



2-6-3 社会相互作用テスト

テストマウスと購入した C57BL/6J マウスをテスト用のホームケージ(29 × 18 × 12 cm) (26~30 lux、O'Hara and Co., Tokyo Japan)にそれぞれ 1 匹ずつをペアにして入れ活動量(locomotor activity)と 2 匹の接触時間(contact time)を 30 時間(10:30~16:30)観察した。

接触時間(contact time)はケージに入れた 2 匹のマウスが身体的接触を示している時間を明期(12 時間)、暗期(12 時間)ごとに合計した。

各ケージからの画像を 2 フレーム/秒の速度で取り込み、各フレームの粒子数を先行文献に従い³³行動解析ソフト(Time HC8 Multi O'Hara and Co., LTD、Tokyo, Japan)を用いて自動的に測定した。

粒子が 2 つとなるときにはマウスが互いに接触していないことを示し、粒子が 1 つのときは 2 匹のマウス間の接触を示している。明期、暗期のそれぞれ毎に 1 となるフレーム数を合計し接触している時間を計算した。

2-6-4 強制水泳テスト

テストマウスを深さ 15 cm の水(23°C)が入ったシリンダー(直径 11 cm、高さ 25.5 cm)に入れ 6 分間観察した。

行動解析ソフト (Time FZ1 O'Hara & Co. ,LTD、Tokyo , Japan)を用いて無動行動(immobile behavior)の累積時間を自動的に測定した(図 7)。

図 7



2-7 組織化学的方法

2-7-1 チロシン水酸化酵素(TH)産生ニューロンにおける Fos 蛋白質の二重免疫組織化学染色

FGF21 の脳室内投与を行った 90 分後にアバチン (tribromoethanol、200 mg/kg BW , WAKO Pure Chemical Industries Ltd) を腹腔内投与して深麻酔した。ヘパリン(20 U/ml)添加 0.9%生理食塩水を経心的に 2 分間還流させた後に 2%パラホルムアルデヒド+3.75%アクロレインを 15 分間還流させ脳組織を固定した。固定後、頭蓋骨から脳組織を取り出して 4%パラホルムアルデヒドで一晩、氷温下で後固定を行い 30%ショ糖液に脳組織が完全に沈むまで浸漬させ、ドライアイスにて凍結させ-80°Cで保存した。滑走式マイクロームにて凍結脳の延髄を冠状断方向に 30 μ m の厚さでスライスし免疫組織化学的染色を行った。ウサギ抗 c-Fos 抗体(Ab-5, 1:10000, Oncogene Science Diagnostics, Cambridge, MA, USA)と 4°Cで 48 時間インキュベートした。その後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(PI-1000, 1:500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)と 4°Cで 24 時間インキュベートし、ニッケル-3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (ニッケル DAB) 液で発色させた。次に切片をウサギ抗 TH 抗体(AB152, 1:7500, Chemicon, Temecula, CA, USA)に 4°Cで 15 時間インキュベートした。その後、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体(BA1000, 1:750, Vector

Laboratories)に室温で 2 時間インキュベートし、アビジン-ビオチン化オキシダーゼ複合体液(Elite ABC kit, 1:50, PK6100, Vector Laboratories)に室温で 30 分インキュベートした。その後、DAB 液(0.05%)で染色を行った。TH 産生ニューロンは茶褐色に、Fos 蛋白質は黒褐色に染色された。

また、c-Fos 欠損マウスにおいては Fos 免疫染色を検出できなく、また過剰 c-Fos 抗原で吸着させた抗体を用いた場合も検出されなかった。

切片は延髄孤束核領域では各個体当たり 13 枚、延髄最後野領域では各個体当たり 3 枚を光学顕微鏡下で観察し Fos 蛋白質を発現している TH 産生ニューロンの数を計測しその合計の平均値と標準誤差を計算した。また、各切片の間隔は 120 μm ごとであった。

2-7-2 プロラクチン放出ペプチド(PrRP)産生ニューロンにおける Fos 蛋白質の

二重免疫組織化学染色

TH 産生ニューロンにおける Fos 蛋白質の二重免疫組織化学染色を行った個体と同じ個体の脳の切片を用いた。ウサギ抗 c-Fos 抗体(Ab-5, 1:10000, Oncogene Science Diagnostics, Cambridge, MA, USA)と 4°Cで 48 時間インキュベートした。その後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(PI-1000, 1:1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)と 4°Cで 24 時間インキュベートし、ニッケル DAB 液で発色を行った。次に切片をマウスモノクローナル抗 PrRP 抗体(P2L-1T, 1:1600, 武田薬品工業株式会社)に 4°Cで 48 時間インキュベートした。

その後、ビオチン標識抗マウス IgG 抗体(BA2001, 1:500, Vector Laboratories)に室温で 2 時間インキュベートし、アビジン-ビオチン化オキシダーゼ複合体液(Elite ABC kit, 1:50, PK6100, Vector Laboratories)に室温で 30 分インキュベートし、その後 DAB 液(0.05%)で発色させた。PrRP 産生ニューロンは茶褐色に、Fos 蛋白質は黒褐色に染色された。

また、用いた PrRP 抗体の特異性は競合酵素免疫測定法で確認しており、PrRP 欠損動物の脳においては免疫染色性が消失していた。

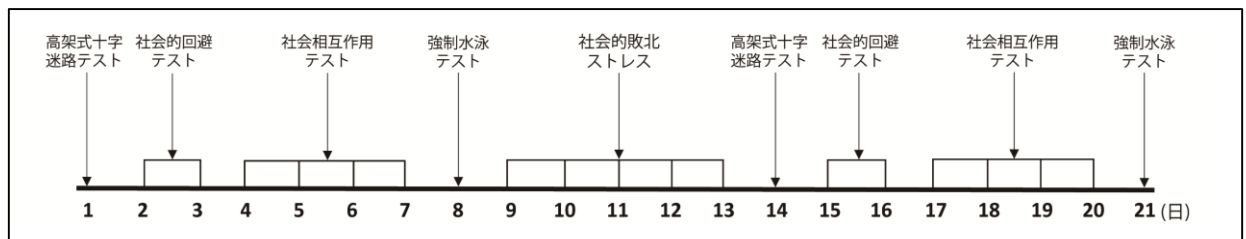
切片は延髄孤束核領域を光学顕微鏡下で観察した。各個体当たり 7 枚の脳切片

を観察し、Fos 蛋白質を発現している PrRP 産生ニューロンの数を計測し、各
個体ごとの合計の平均値と標準誤差を計算した。また、各切片の間隔は 120 μm
ごとであった。

2-8 FGF21 欠損マウスを用いた社会的敗北ストレスと行動テスト実験

FGF21 欠損オスマウス(自治医科大学医学研究科 抗加齢医学 黒尾研からの譲渡)を用いて行った。5 日間の社会的敗北ストレス暴露させる前後に高架式十字迷路テスト、社会的回避テスト、社会相互作用テスト、強制水泳テストを行いストレス暴露前後における FGF21 欠損マウスと野生型マウスの行動学的変化の比較を行った(図 8)。FGF21 欠損マウスと野生型マウスはヘテロ FGF21 欠損マウスの雄と雌を掛け合わせて作製した。FGF21 欠損マウスは 8 匹、その兄弟の野生型マウスは 6 匹を用いた。

図 8



2-9 AAV(アデノ随伴ウイルス)8 ベクターを用いた FGF21 過剰発現下での社会的敗北ストレスと行動テスト実験

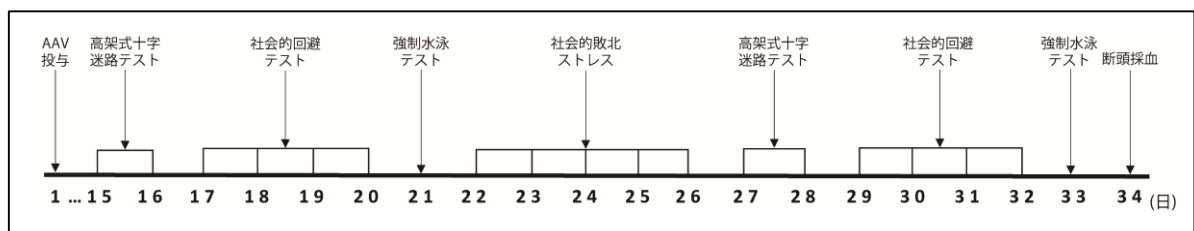
野生型オス C57BL/6J マウス(Charles River Laboratories Japan)を用いて行った。FGF21 を AAV-hrGFP、AAV-FGF21 を用いて過剰発現させた状態で5日間の社会的敗北ストレス暴露の前後に高架式十字迷路テスト、社会的回避テスト、強制水泳テストを行った。

先行文献⁸を参照し、AAV を投与して2週間後の FGF21 過剰発現マウスに行動テストを行い、社会的敗北ストレスを加え、その後再び行動テストを行った。

AAV-hrGFP を投与したコントロールマウスと AAV-FGF21 を投与したマウスの行動学的変化を比較した。

社会的敗北ストレス後の行動テストが終了した翌日に全てのマウスの断頭採血を行い、ELISA(FGF21-BioVender RD291108200R)を用いて各グループの血漿 FGF21 濃度を確認した(図9)。1群12~13匹とした。

図9



2-10 統計学的解析

結果は平均値と標準誤差で示した。統計学的検討は Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) または SPSS (IBM, Chicago, IL, USA) の統計ソフトを用いて行った。TH 産生ニューロン及び PrRP 産生ニューロンと Fos 蛋白質の二重免疫組織化学染色結果と AAV ベクターを用いた FGF21 過剰発現実験結果における社会的敗北ストレス前後における水分摂取量、体重増加量においてはデータの正規性を認めなかったため Kruskal-Wallis テスト及び多重比較検定として Dunn テストを行った。その他の実験結果に関しては一元配置分散分析、繰り返しのある二元配置分散分析、重複測定二元配置分散分析及び多重比較検定として Bonferroni テストを行った。 $P < 0.05$ で有意差ありとした。

3 結果

3-1 FGF21 の脳室内投与による神経細胞の活性化

脳幹部のカテコラミン産生ニューロンは神経内分泌系のストレス応答の一部を担うとされている。また、カテコラミン産生ニューロンの 1/3 は PrRP を産生しており PrRP 産生ニューロンは全てカテコラミン産生ニューロンであることが示されている。また PrRP ニューロンは条件恐怖刺激において著明に活性化されることが報告されている²⁶。そこで FGF21 を中枢投与することにより延髄孤束核領域のカテコラミン産生ニューロンおよび PrRP 産生ニューロンが活性化されるかを検討した。この目的で成体ラットの側脳室にカニューレを留置し FGF21 を脳室内投与した。投与 90 分後に固定した脳を摘出し、その切片を用いて TH 産生ニューロンおよび PrRP 産生ニューロンと Fos 蛋白質の二重免疫染色を行った。すると、TH 産生ニューロンにおいて Fos 蛋白質の有意な増加を認めた(孤束核: $P=0.0063$, Kruskal-Wallis テスト; $P=0.017$, 0 ng 対 1000 ng, Dunn テスト)(最後野: $P=0.004$, Kruskal-Wallis テスト; $P=0.0044$, 0 ng 対 1000 ng, Dunn テスト)(図 10、11)。それに対して PrRP 産生ニューロンにおける Fos 蛋白質の発現には、有意な変化を認めなかった(孤束核: $P=0.681$, Kruskal-Wallis テスト)(図 12、13)。これらの結果は FGF21 が延髄背側部に分布

する非 PrRP カテコラミン作動性ニューロンを活性化することを示唆している。

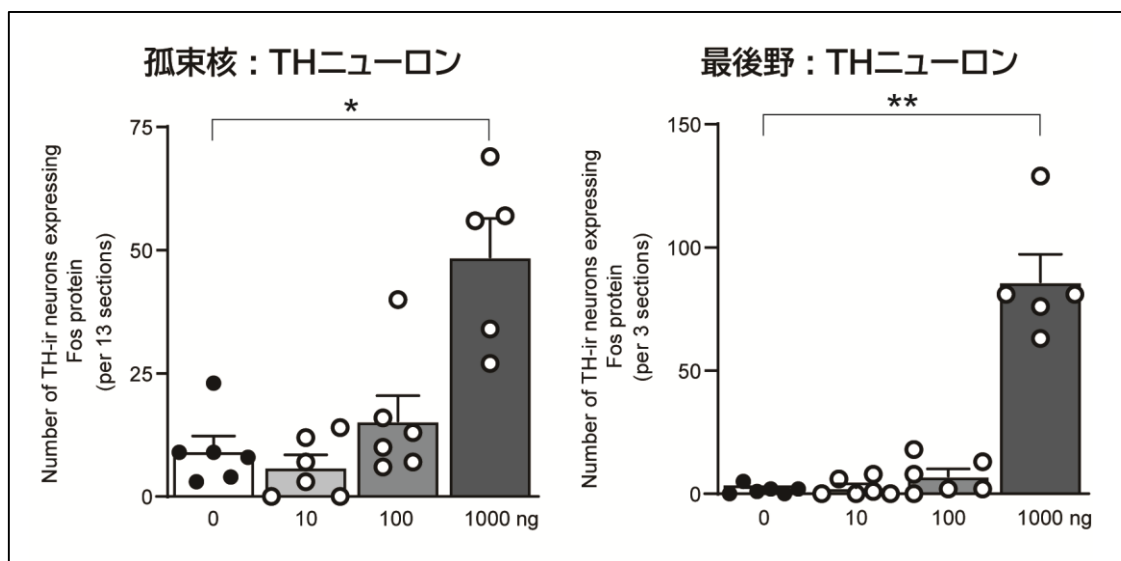


図 10 FGF21 の脳室内投与による TH 産生ニューロンにおける Fos 蛋白質の発現(投稿中論文から改変)

1000 ng の FGF21 の投与により Fos 蛋白質を発現する TH 産生ニューロンの数が有意に増加した。

このことは FGF21 が延髄孤束核、最後野におけるカテコラミン作動性ニューロンを活性化したことを示唆している。

0、10、100 ng の各群 n =6、1000 ng 群 n =5

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 0 ng 対 1000 ng Kruskal-Wallis テストとその後の Dunn テスト

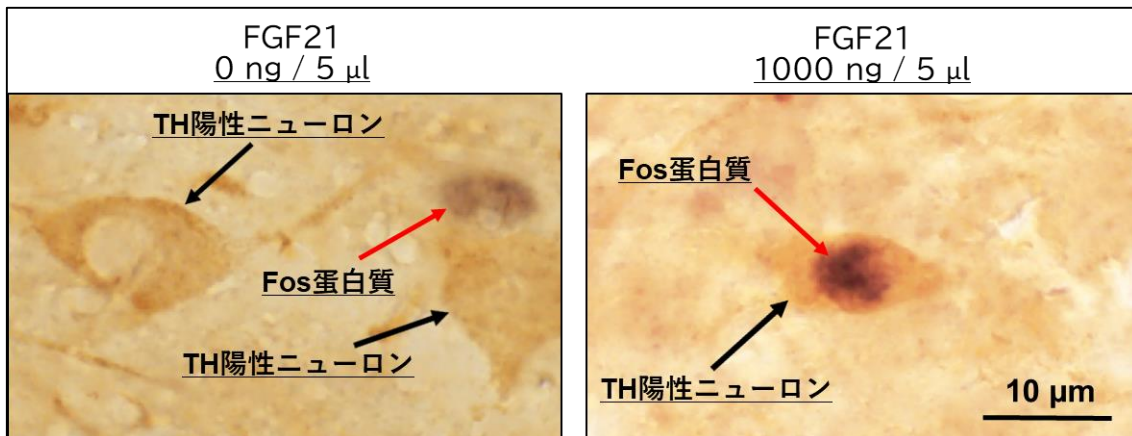


図 11 延髄孤束核における FGF21 投与後の TH 陽性ニューロンと Fos 蛋白質の二重免疫染色像

黒矢印が TH 陽性ニューロン、赤矢印が Fos 蛋白質を示している。

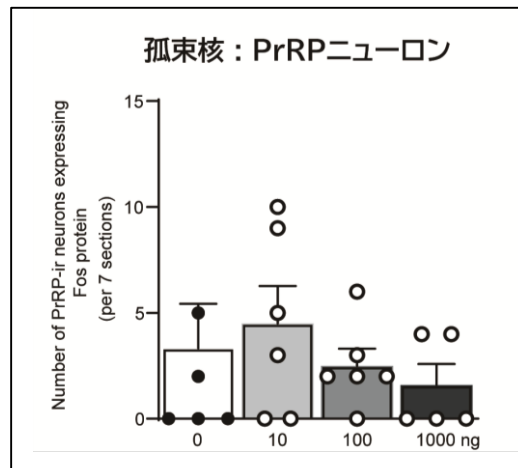


図 12 FGF21 の脳室内投与による PrRP 産生ニューロンにおける Fos 蛋白質の発現

Fos 蛋白質を発現する PrRP 産生ニューロンの数は有意に変化しなかった。

これにより FGF21 が延髄孤束核におけるカテコラミン作動性ニューロンを活性化しないことが示唆された。 0、10、100 ng の各群 n=6、1000 ng 群 n=5

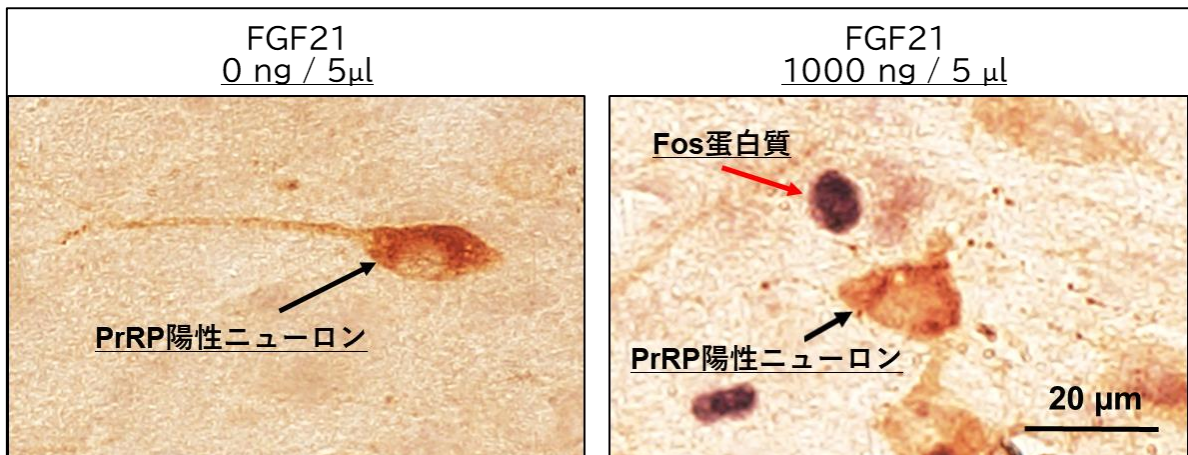


図 13 延髄孤束核における FGF21 投与後の PrRP 陽性ニューロンと Fos 蛋白質の二重免疫染色像

黒矢印が PrRP 陽性ニューロン、赤矢印が Fos 蛋白質を示している。

3-2 社会的敗北ストレスによる FGF21 の放出

生体はストレスを受けると視床下部-下垂体-副腎系が賦活化されグルココルチコイドが促進さる。社会的敗北ストレスにより生体内で FGF21 の放出も促進されるのかを明らかにする目的でストレス暴露後のマウスの血漿 FGF21 濃度を測定した。

コントロール群と比較して社会的敗北ストレス群において有意に血中 FGF21 濃度が上昇した(図 14 グループの効果 $F(1,72) = 4.344$, $P=0.0407$; 時間の効果 $F(3,72) = 7.758$, $P=0.000147$; 交互作用 $F(3,72) = 2.260$, $P=0.0888$; 繰り返しのある二元配置分散分析, 5 日目社会的敗北ストレス暴露 30 分後断頭採血群 対 4 日目社会的敗北ストレス暴露 24 時間後断頭採血群, $P=3.35 \times 10^{-5}$, Bonferroni テスト)。

この結果から社会的敗北ストレスが血中 FGF21 を増加させることが示唆された。血中コルチコステロン濃度もまた、社会的敗北ストレス暴露後にコントロール群と比較して有意に上昇した(図 14 グループの効果 $F(1,72) = 52.030$, $P=4.46 \times 10^{-10}$; 時間の効果 $F(3,72) = 17.34$, $P=1.42 \times 10^{-8}$; 交互作用 $F(3,72) = 8.928$, $P=4.19 \times 10^{-5}$; 繰り返しのある二元配置分散分析, 5 日目社会的敗北ストレス暴露 30 分後断頭採血群 対 4 日目社会的敗北ストレス暴露 24 時間後断頭採血群, $P=9.59 \times 10^{-5}$, 5 日目社会的敗北ストレス暴露 60 分後断頭採血群

対 4 日目社会的敗北ストレス暴露 24 時間後断頭採血群, $P = 3.05 \times 10^{-11}$, 5
日目社会的敗北ストレス暴露 120 分後断頭採血群 対 4 日目社会的敗北ストレ
ス暴露 24 時間後断頭採血群, $P = 7.57 \times 10^{-7}$, Bonferroni テスト)。

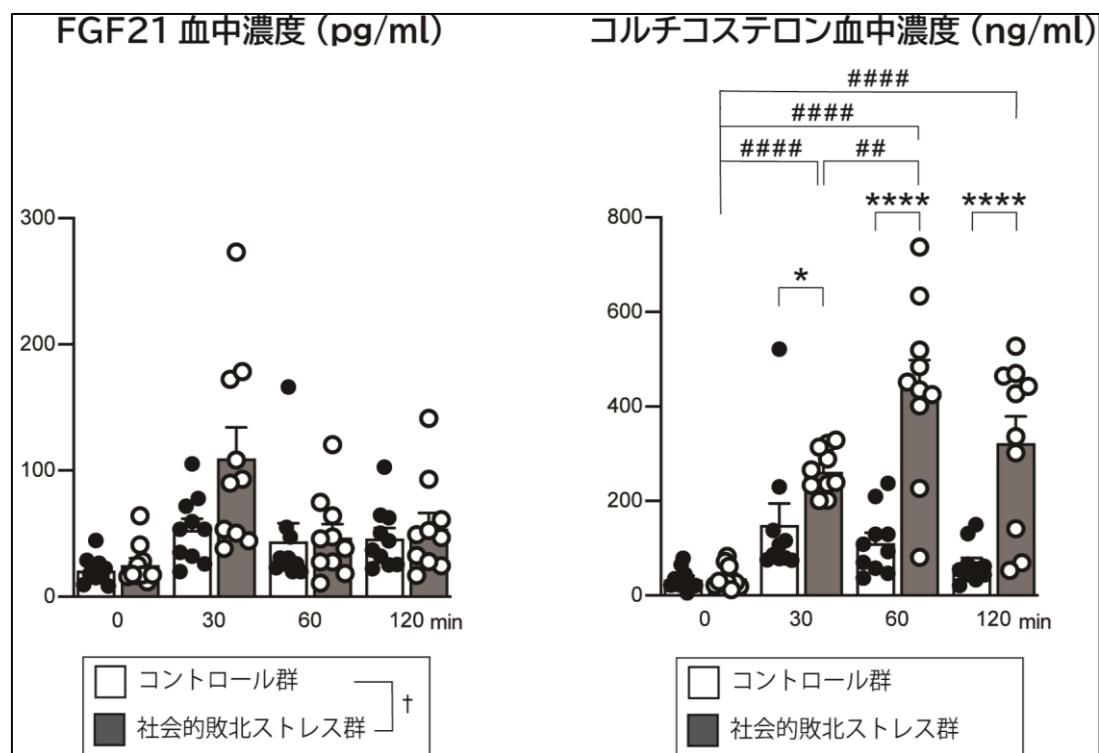


図 14 社会的敗北ストレス暴露後の血中 FGF21 及びコルチコステロン濃度(投稿中論文から改変)

4 回目の社会的敗北ストレス暴露から 24 時間後、5 回目の社会的敗北ストレスから 30 分後、60 分後、120 分後の血中 FGF21 及びコルチコステロン濃度を示す。血中 FGF21 及びコルチコステロン濃度はコントロール群と比較して社会的敗北ストレス群において有意に高値を示した。

n = 80(各グループ社会的敗北ストレス群 n = 10、コントロール群 n = 10)

* $P < 0.05$ 、**** $P < 0.0001$ 対応する時点におけるコントロール群 対 社会的敗北ストレス群 繰り返しのある二元配置分散分析

† $P < 0.05$ 社会的敗北ストレス群 対 コントロール群

$P < 0.01$ 、#### $P < 0.0001$ 4 回目の社会的敗北ストレス暴露から 24 時間
後断頭採血群 対 5 回目の社会的敗北ストレスから 30 分後、60 分後、120 分
後断頭採血群 繰り返しのある二元配置分散分析とその後の Bonferroni
テスト

3-3 FGF21 欠損下での社会的敗北ストレスの影響

FGF21 の欠損が社会的敗北ストレス暴露後の表現型に影響を与えるかを明らかにする目的で FGF21 欠損マウスと野生型マウスを用いて社会的敗北ストレス前後に行動テストを行い比較した。その際、野生型マウス、FGF21 欠損マウスへの 1 日目および 5 日目の社会的敗北ストレス暴露時の行動を測定した。受けた攻撃の時間(received attack)、社会的敗北姿勢を示した時間(defeat posture)、逃避行動を示した時間(escape behavior)、無動行動を示した時間(immobility behavior)の 4 項目を記録した。これらの行動には、野生型マウスと FGF21 欠損マウスとの間で有意な差は認めなかった (図 15 受けた攻撃の時間(received attack) グループの効果 $F(1,12) = 0.724, P = 0.411$; 時間の効果 $F(1,12) = 0.052, P = 0.823$; 交互作用 $F(1,12) = 0.041, P = 0.843$; 社会的敗北姿勢を示した時間(defeat posture) グループの効果 $F(1,12) = 0.212, P = 0.654$, 時間の効果 $F(1,12) = 0.039, P = 0.847$; 交互作用 $F(1,12) = 1.281, P = 0.280$; 逃避行動を示した時間(escape behavior) グループの効果 $F(1,12) = 0.016, P = 0.901$; 時間の効果 $F(1,12) = 1.129, P = 0.309$; 交互作用 $F(1,12) = 0.157, P = 0.699$; 無動行動を示した時間(immobility behavior) グループの効果 $F(1,12) = 0.936, P = 0.352$; 時間の効果 $F(1,12) = 10.823, P = 0.00646$; 交互作用 $F(1,12) = 0.00617, P = 0.939$ 重複測定二元配置分散分析)。

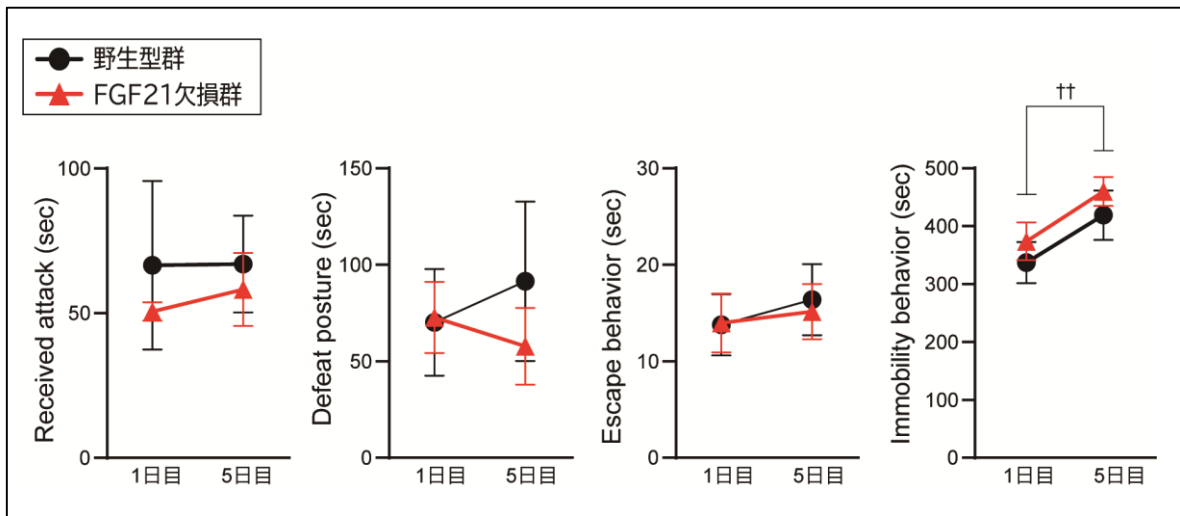


図 15 1 日目及び 5 日目の社会的敗北ストレス暴露中の行動(投稿中論文から改変)

社会的敗北ストレス暴露中における受けた攻撃の時間(Received attack)、社会的敗北姿勢を示した時間(Defeat posture)、逃避行動を示した時間(Escape behavior)、無動行動を示した時間(Immobility behavior)の総時間を示す。

野生型マウスと FGF21 欠損マウスとの間に有意な差は認めなかったが、FGF21 欠損マウスにおける無動行動を示した時間(Immobility behavior)において社会的敗北ストレス 5 日目において 1 日目と比較し有意な増加を認めた。

野生型マウス群 $n = 6$ 、FGF21 欠損マウス群 $n = 8$

†† $P < 0.01$ 社会的敗北ストレス 1 日目 対 社会的敗北ストレス 5 日目

重複測定二元配置分散分析

3-3-1 飲水量、摂食量、体重

FGF21 は水分摂取量を増加させるとの報告^{34, 35}や、肥満の齧歯類において食事摂取量の減少を伴わず体重減少を引き起こすとの報告^{36, 37}がある。

そこで、本実験において FGF21 欠損動物における社会的敗北ストレスに伴う飲水量、摂食量、体重変化について検討した。その結果、社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス後の水分摂取量は有意な増加を認めた。野生型マウス群と FGF21 欠損マウス群との間には有意差はみられず、両群とも増加した（図 16 グループの効果 $F(1,12)=0.101$, $P=0.756$; 時間の効果 $F(1,12)=56.968$, $P=6.79 \times 10^{-6}$; 交互作用 $F(1,12)=0.533$, $P=0.479$; 重複測定二元配置分散分析)。また食事摂取量に関しては社会的敗北ストレス前後で有意差を認めず、野生型マウス群と FGF21 欠損マウス群との間においても有意差はみられなかった（図 16 グループの効果 $F(1,12)=1.809$, $P=0.203$; 時間の効果 $F(1,12)=2.714$, $P=0.125$; 交互作用 $F(1,12)=1.444$, $P=0.253$; 重複測定二元配置分散分析)。体重に関しては水分摂取量と同様に社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス後の体重において有意な増加を認めたが、野生型マウス群と FGF21 欠損マウス群との間に有意差は見られなかった（図 16 グループの効果 $F(1,12)=0.273$, $P=0.611$; 時間の効果 $F(1,12)=50.943$, $P=1.18 \times 10^{-5}$; 交互作用 $F(1,12)=0.395$, $P=0.542$; 重複測定二元配置分散分析)。

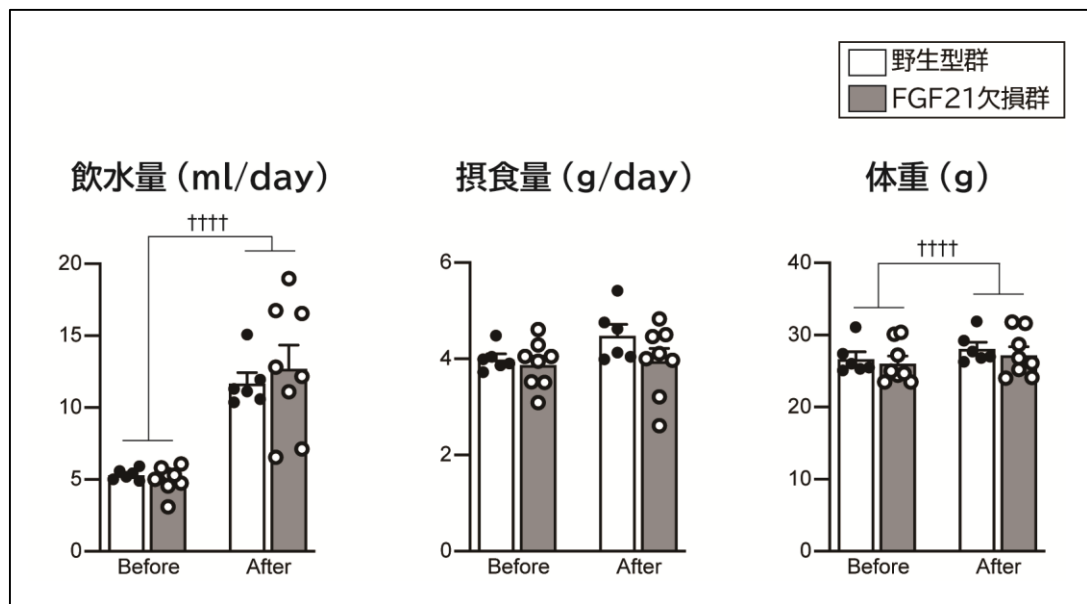


図 16 野生型マウスおよび FGF21 欠損マウスにおける社会的敗北ストレスの前後の飲水量、摂食量および体重(投稿中論文から改変)

社会的敗北ストレス暴露前と比較して、社会的敗北ストレス暴露後に水分摂取量と体重が増加した。

野生型マウスと FGF21 欠損マウスとの間に有意差は認めなかった。

野生型マウス群 $n = 6$ 、FGF21 欠損マウス群 $n = 8$

† † † † $P < 0.0001$ 、重複測定二元配置分散分析

3-3-2 高架式十字迷路テスト

社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス後における総移動距離 (total distance) とオープン通路内での滞在時間(open arm duration)及びオープン通路への侵入回数(number of open arm entries)が有意に減少した。

しかし、野生型マウス群と FGF21 欠損マウス群との間に有意差はみられなかった(図 17 a 総移動距離(total distance), グループの効果 $F(1,12) = 0.855$, $P = 0.373$; 時間の効果 $F(1,12) = 60.098$, $P = 5.18 \times 10^{-6}$; 交互作用 $F(1,12) = 0.261$, $P = 0.619$; オープン通路内での滞在時間(open arm duration), グループの効果 $F(1,12) = 1.889$, $P = 0.194$; 時間の効果 $F(1,12) = 33.068$, $P = 9.16 \times 10^{-5}$; 交互作用 $F(1,12) = 0.737$, $P = 0.407$; オープン通路への侵入回数 (number of open arm entries), グループの効果 $F(1,12) = 2.907$, $P = 0.114$; 時間の効果 $F(1,12) = 44.905$, $P = 2.19 \times 10^{-5}$; 交互作用 $F(1,12) = 0.0455$, $P = 0.835$ 重複測定二元配置分散分析)

これらの結果は社会的敗北ストレスが不安様行動を増加させ、FGF21 が社会的敗北ストレス後の不安様行動の制御に不可欠ではないことを示唆している。

3-3-3 社会的回避テスト

3-3-3-1 セッション 1 (ICR マウスに対する回避テスト)

社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス後において総移動距離 (total distance) と ICR マウスへの探索時間 (social investigation) が有意に減少した。野生型マウス群と FGF21 欠損マウス群との間に有意差はみられなかった (図 17 b 総移動距離 (total distance), グループの効果 $F(1,12) = 0.000119$, $P = 0.991$; 時間の効果 $F(1,12) = 105.685$, $P = 2.65 \times 10^{-7}$; 交互作用 $F(1,12) = 1.334$, $P = 0.271$; ICR マウスへの探索時間 (social investigation), グループの効果 $F(1,12) = 0.154$, $P = 0.702$; 時間の効果 $F(1,12) = 58.097$, $P = 6.15 \times 10^{-6}$; 交互作用, $F(1,12) = 0.0171$, $P = 0.898$; 重複測定二元配置分散分析)。

3-3-3-2 セッション 2 (C57BL/6J マウスに対する回避テスト)

C57BL/6J に対する回避テスト中の総移動距離において、社会的敗北ストレスを加える前には野生型マウスと FGF21 欠損マウスで有意な差はみられなかった、しかし社会的敗北ストレスを加えた後に FGF21 欠損マウスで野生型マウスと比較し有意に減少した (図 17 c 総移動距離 (total distance), グループの効果 $F(1,12) = 0.911$, $P = 0.359$; 時間の効果 $F(1,12) = 28.164$, $P = 0.000186$; 交互作用 $F(1,12) = 6.640$, $P = 0.0242$ 重複測定二元配置分散分析; ストレス後の野生型マウス 対 ストレス後の FGF21 欠損マウス $P = 0.0148$)。

Bonferroni テスト)。

C57BL/6J マウスに対する探索行動については、FGF21 欠損マウスにおいて野生型マウスと比べ有意に減少していた(C57BL/6J マウスへの探索時間(social investigation), グループの効果 $F(1,12)=4.889$, $P=0.0472$; 時間の効果 $F(1,12)=13.012$, $P=0.00360$; 交互作用 $F(1,12)=0.539$, $P=0.477$ 重複測定二元配置分散分析)。

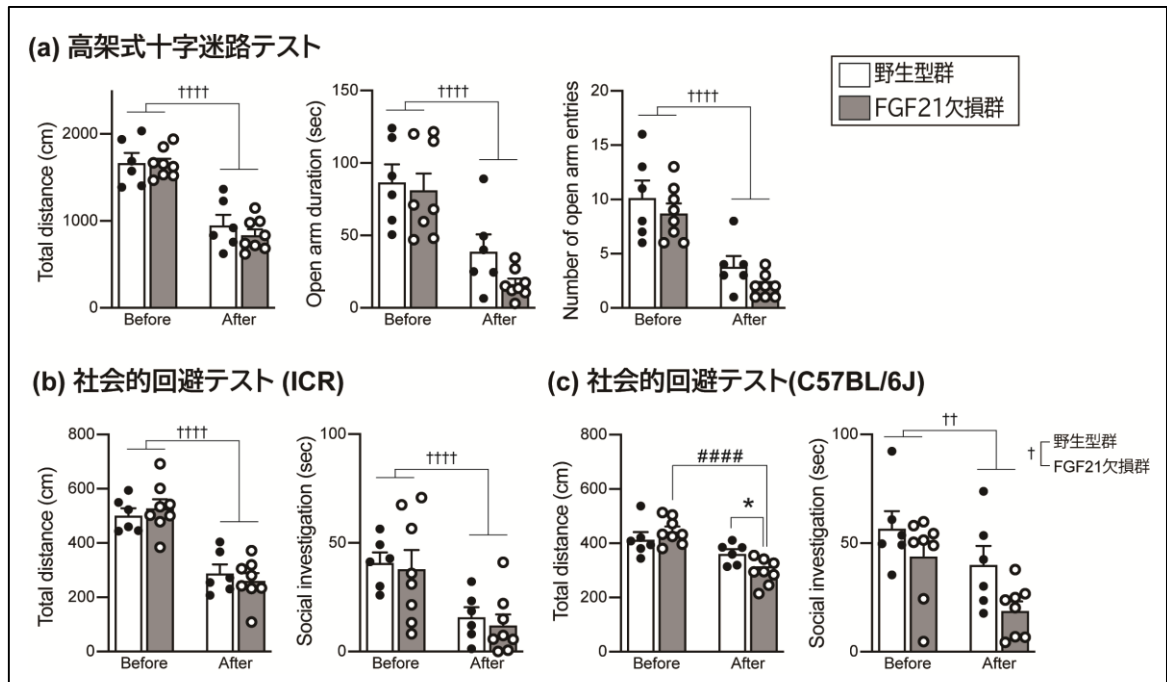


図 17 FGF21 欠損下における社会的敗北ストレス前後の行動実験①(投稿中論文から改変)

(a)高架式十字迷路テストにおける総移動距離(Total distance)及びオープン通路内での滞在時間(Open arm duration)、オープン通路への侵入回数(Number of open arm entries)を示す。いずれも社会的敗北ストレス暴露前と比較して社会的敗北ストレス暴露後に有意に減少したが野生型マウスと FGF21 欠損マウスとの間に有意な差は認めなかった。社会的敗北ストレスを受けると不安様行動は増加するが、FGF21 はこの増加に不可欠ではないことが示唆された。

(b)社会的回避テストにおける総移動距離(Total distance)及び ICR マウスへの探索時間(Social investigation)を示す。いずれも社会的敗北ストレス暴露前と比

較して社会的敗北ストレス暴露後に有意に減少したが野生型マウスと FGF21 欠損マウスとの間に有意な差は認めなかった。

(c) 社会的回避テストにおける総移動距離(Total distance)及び C57BL/6J への探索時間(Social investigation)を示す。総移動距離(Total distance)は FGF21 欠損マウスにおいて社会的敗北ストレス暴露により有意に減少し、野生型マウスと比較して有意に減少していた。C57BL/6J マウスへの探索時間(Social investigation)は社会的敗北ストレス暴露前と比較して社会的敗北ストレス暴露後に有意な減少を認め、FGF21 欠損マウスでは野生型マウスより有意に減少した。

野生型マウス群 $n = 6$ 、FGF21 欠損マウス群 $n = 8$

†† $P < 0.01$ 、†††† $P < 0.0001$ ストレス前 対 ストレス後

† $P < 0.05$ 野生型マウス群 対 FGF21 欠損マウス群

* $P < 0.05$ ストレス後の野生型マウス群 対 ストレス後の FGF21 欠損マウス群

$P < 0.0001$ ストレス前の FGF21 欠損マウス群 対 ストレス後の FGF21 欠損マウス群

重複測定二元配置分散分析とその後の Bonferroni テスト

3-3-4 社会相互作用テスト

明期において社会的敗北ストレスの暴露によって活動量(locomotor activity)及び接触時間(contact time)が有意には変化せず、野生型マウス群と FGF21 欠損マウス群との間に有意な差は認めなかった(図18 活動量(locomotor activity) グループの効果 $F(1,12) = 0.751$, $P = 0.403$; 時間の効果 $F(1,12) = 7.506$, $P = 0.0179$; 交互作用, $F(1,12) = 0.049$, $P = 0.828$; 接触時間(contact time) グループの効果 $F(1,12) = 0.546$, $P = 0.474$, 時間の効果 $F(1,12) = 0.510$, $P = 0.489$; 交互作用 $F(1,12) = 0.115$, $P = 0.740$ 重複測定二元配置分散分析)。暗期においては社会的敗北ストレス暴露により活動量(locomotor activity)は有意に減少したが、接触時間(contact time)は有意に変化しなかった。

また、明期と同様に野生型マウス群と FGF21 欠損マウス群との間にも有意な差は認めなかった(図18 活動量(locomotor activity) グループの効果 $F(1,12) = 0.751$, $P = 0.403$; 時間の効果 $F(1,12) = 7.506$, $P = 0.0179$; 交互作用 $F(1,12) = 0.049$, $P = 0.828$; 接触時間(contact time) グループの効果 $F(1,12) = 0.364$, $P = 0.557$; 時間の効果 $F(1,12) = 0.933$, $P = 0.353$; 交互作用 $F(1,12) = 0.362$, $P = 0.559$; 重複測定二元配置分散分析)。

これらの結果はホームケージにおける社会的敗北ストレス暴露は暗期における活動量(locomotor activity)の低下を引き起こしたが、野生型マウスと FGF21 欠

損マウスの両方において C57BL/6J との接触時間(contact time)には影響を与えないことを示唆している。

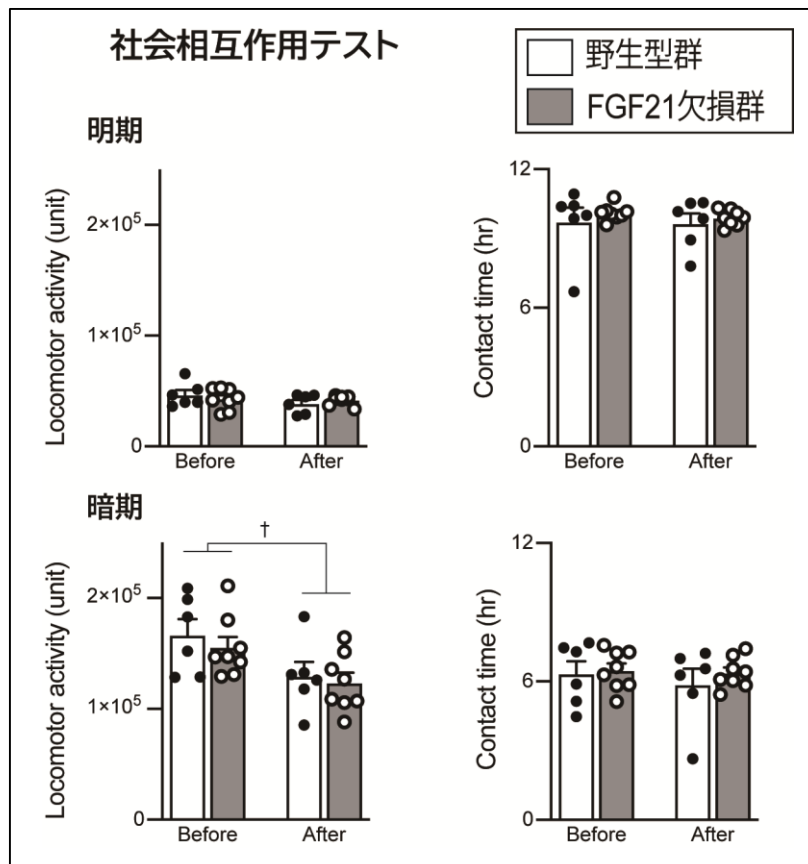


図 18 FGF21 欠損下における社会的敗北ストレス前後の行動実験②(投稿中論文から改変)

社会相互作用テストにおける活動量(Locomotor activity)と接触時間(Contact time)を明期、暗期別にそれぞれ示す。暗期における活動量(Locomotor activity)は社会的敗北ストレス暴露前と比較して社会的敗北ストレス暴露後に有意に減少したが、野生型マウスと FGF21 欠損マウスとの間に有意な差は認めなかった。

野生型マウス群 $n = 6$ 、FGF21 欠損マウス群 $n = 8$

† $P < 0.05$ ストレス前 対 ストレス後

重複測定二元配置分散分析

3-3-5 強制水泳テスト

社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス暴露により無動行動 (immobility behavior) が有意に増加した。FGF21 欠損マウス群の無動行動 (immobility behavior) は野生型に比べ、社会的敗北ストレス暴露により有意に増加していた(図 19 グループの効果 $F(1, 12) = 2.796$, $P = 0.120$; 時間の効果 $F(1, 12) = 73.687$, $P = 1.81 \times 10^{-6}$; 交互作用 $F(1, 12) = 8.520$, $P = 0.0129$; 重複測定二元配置分散分析; ストレス前の野生型マウス群 対 ストレス後の野生型マウス群, $P = 0.00278$; ストレス前の FGF21 欠損マウス群 対 ストレス後の FGF21 欠損マウス群, $P = 1.42 \times 10^{-6}$; ストレス前の野生型マウス群 対 ストレス前の FGF21 欠損マウス群, $P = 0.986$; ストレス後の野生型マウス群 対 ストレス後の FGF21 欠損マウス群, $P = 0.0315$, Bonferroni テスト)。

この結果は内因性の FGF21 が社会的敗北ストレスに伴う抑うつ行動に対し抑制的に働いていることを示唆している。

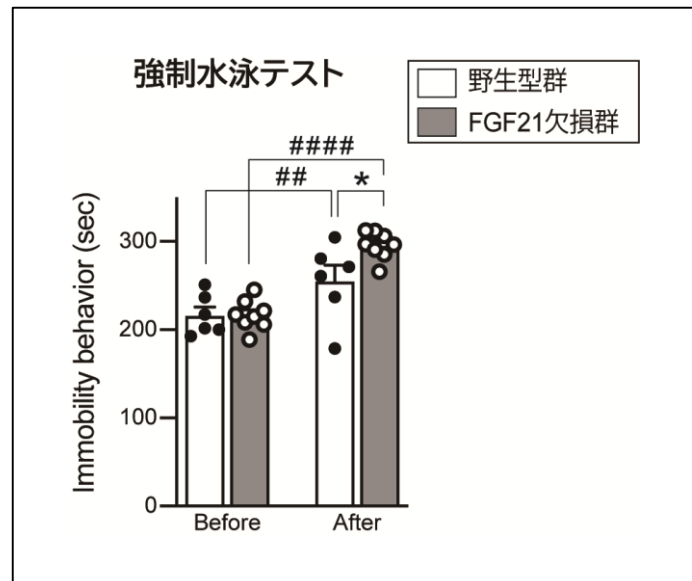


図 19 FGF21 欠損下における社会的敗北ストレス前後の行動実験③(投稿中論文から改変)

強制水泳テストにおける無動時間(Immobility behavior)を示す。社会的敗北ストレス暴露前と比較して社会的敗北ストレス暴露後に有意に増加した。社会的敗北ストレス暴露後において野生型マウスと比較して FGF21 欠損マウスで有意に増加していた。野生型マウス群 $n = 6$ 、FGF21 欠損マウス群 $n = 8$

* $P < 0.05$ ストレス後の野生型マウス群 対 ストレス後の FGF21 欠損マウス群

$P < 0.01$ ストレス前の野生型マウス群 対 ストレス後の野生型マウス群

$P < 0.0001$ ストレス前の FGF21 欠損マウス群 対 ストレス後の FGF21 欠損マウス群 重複測定二元配置分散分析とその後の Bonferroni テスト

3-4 FGF21 過剰発現下での社会的敗北ストレスの影響

FGF21 の過剰発現が社会的敗北ストレス暴露後の表現型に影響を与えるかを検討した。この目的で AAV-FGF21 を投与し FGF21 過剰発現させたマウスと AAV-hrGFP を投与したコントロールマウスとを用いて社会的敗北ストレス前後に行動テストを行った。

3-4-1 飲水量、摂食量、体重

本実験においても FGF21 過剰発現下における社会的敗北ストレスに伴う飲水量、摂食量、体重変化について検討を行った。

その結果、水分摂取量は AAV-hrGFP を投与したコントロールマウスと比較して、AAV-FGF21 を 1×10^9 vg の量を投与することで有意に増加した（図 20 グループの効果 $F(2,34) = 4.599$, $P = 0.0171$; 時間の効果 $F(1.09,37.20) = 84.659$, $P = 1.50 \times 10^{-11}$; 交互作用 $F(2.19,37.20) = 1.438$, $P = 0.250$; 重複測定二元配置分散分析 AAV-hrGFP 対 AAV-FGF21: 1×10^9 vg, $P = 0.0165$; 投与前 対 ストレス前, $P = 1.068 \times 10^{-8}$; ストレス前 対 ストレス後, $P = 2.78 \times 10^{-9}$ Bonferroni テスト)。

ストレスを負荷することでも飲水量が有意に増加した。FGF21 を過剰発現させることで、このストレス負荷による飲水量の増加反応は有意に変化しなかった。

($P=0.879$ Kruskal-Wallis テスト)。

また摂食量に関しては AAV-hrGFP を投与したコントロールマウスと比較して AAV-FGF21 を投与しただけでは有意には変化しなかった(図 20 グループの効果 $F(2,34) = 0.103$, $P = 0.902$; 時間の効果 $F(2,68) = 2.363$, $P = 0.102$; 交互作用, $F(4,68) = 2.899$, $P = 0.0282$; 重複測定二元配置分散分析)。

しかし AAV-FGF21 を 5×10^8 vg の量を投与した群に社会的敗北ストレスを負荷すると有意に摂食量が減少した(図 20 AAV-FGF21: 5×10^8 vg のストレス前対 AAV-FGF21: 5×10^8 vg のストレス後 $P = 0.049$ Bonferroni テスト)。

飲水量の結果と同様に群間で比較すると、社会的敗北ストレスによる摂食量に有意な差は認めなかった($F(2,34) = 2.187$, $P = 0.128$ 一元配置分散分析)。

体重は AAV-FGF21 投与後に有意に増加し (図 20 グループの効果 $F(2,34) = 2.978$, $P = 0.064$, 時間の効果 $F(2,68) = 144.883$, $P = 3.041 \times 10^{-25}$, 交互作用, $F(4,68) = 7.587$, $P = 4.091 \times 10^{-5}$ 重複測定二元配置分散分析)、5 日間の社会的敗北ストレスでの体重増加は AAV-FGF21: 5×10^8 vg 投与群において有意に小さかった (図 20 $P = 0.0169$ Kruskal-Wallis テスト, AAV-FGF21: 5×10^8 vg 対 AAV-hrGFP, $P = 0.0093$; Dunn テスト)。

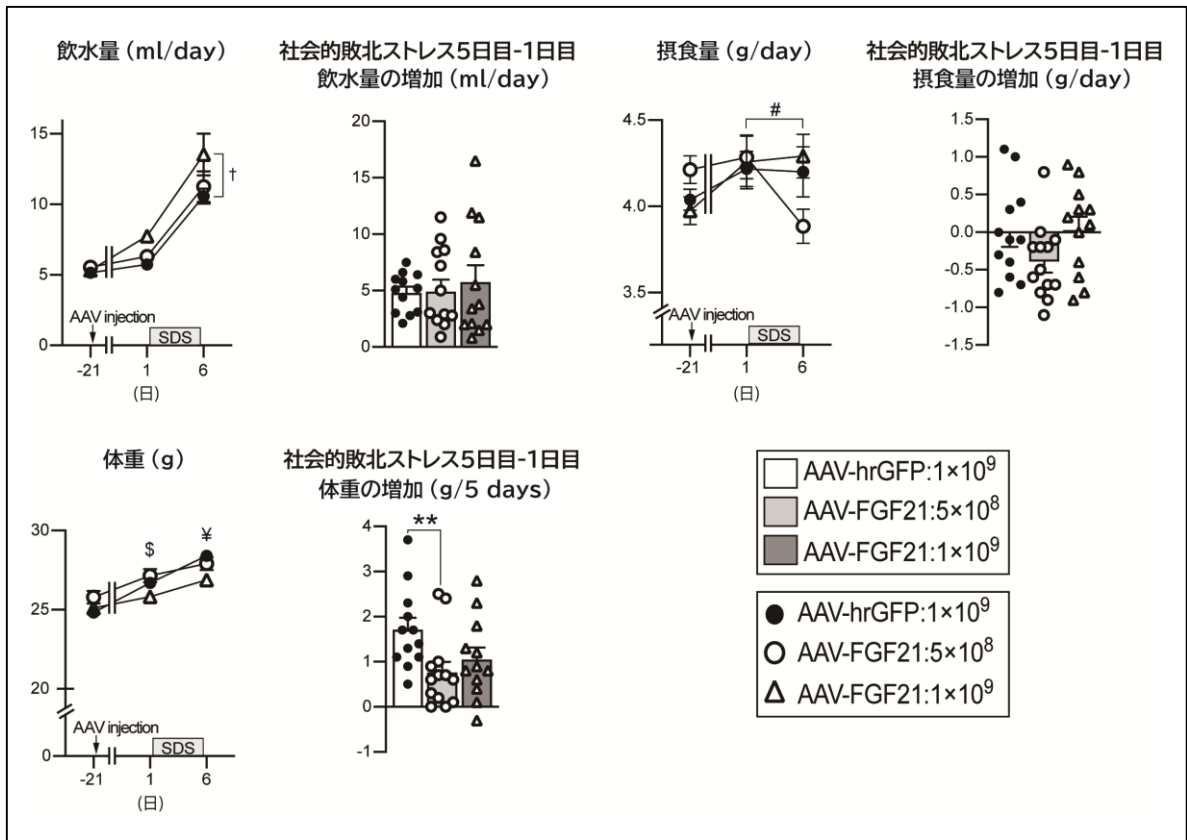


図 20 FGF21 過剰発現下における飲水量、摂食量及び体重変化(投稿中論文から
改変)

(左)AAV 投与前、社会的敗北ストレス暴露前、社会的敗北ストレス暴露後の 1 日あたりの飲水量、摂食量及び体重を示す。

(右)社会的敗北ストレスによる飲水量、摂食量及び体重のストレス前後の増加量を示す。

飲水量は AAV-hrGFP 投与群と比較して AAV-FGF21:1×10⁹ vg 投与群で有意に増加した。社会的敗北ストレス後の体重は、AAV-FGF21:1×10⁹ vg 投与群で有意に低かった。社会的敗北ストレス中の体重増加量は、AAV-hrGFP 投与群

と比較して AAV-FGF21: 5×10^8 vg 投与群で有意に低かった。

AAV-FGF21(1×10^9 vg)投与群 $n = 12$ 、AAV-FGF21(5×10^8 vg)投与群 $n = 13$ 、

AAV-hrGFP 投与群 $n = 12$

† $P < 0.05$ AAV-FGF21: 1×10^9 vg 投与群の飲水量 対 AAV-hrGFP 投与群
の飲水量

$P < 0.05$ ストレス前の AAV-FGF21: 5×10^8 vg 投与群の摂食量 対 ストレス
後の AAV-FGF21: 5×10^8 vg 投与群の摂食量

\$ $P < 0.05$ ストレス前の AAV-FGF21: 1×10^9 vg 投与群の体重 対 ストレス前
の AAV-FGF21: 5×10^8 vg 投与群の体重

¥ $P < 0.05$ ストレス後の AAV-FGF21: 1×10^9 vg 投与群の体重 対 ストレス後
の AAV-hrGFP 投与群の体重

重複測定二元配置分散分析とその後の Bonferroni テスト

** $P < 0.01$ AAV-FGF21: 5×10^8 vg 投与群の体重増加 対 AAV-hrGFP 投与群
の体重増加

Kruskal-Wallis テストとその後の Dunn テスト

正規性の検定の結果に従って社会的敗北ストレス暴露後の飲水量と体重の増加
量は Kruskal-Wallis テストとその後の Dunn テストを用いて統計学的分析を行
い食物摂取量の増加量は、一元配置分散分析を用いて統計学的分析を行った。

3-4-2 高架式十字迷路テスト

社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス後に総移動距離(total distance)およびオープン通路内での滞在時間(open arm duration)、オープン通路への侵入回数(number of open arm entries)が有意に減少したが AAV-FGF21 を投与した群と AAV-hrGFP を投与した群との間に有意差はみられなかった

(図 21 a 総移動量(total distance), グループの効果 $F(2, 34) = 1.590$, $P = 0.219$; 時間の効果 $F(1, 34) = 81.342$, $P = 1.53 \times 10^{-10}$; 交互作用 $F(2, 34) = 0.253$, $P = 0.778$; オープン通路内での滞在時間(open arm duration), グループの効果 $F(2, 34) = 2.070$, $P = 0.142$; 時間の効果 $F(1, 34) = 61.024$, $P = 4.31 \times 10^{-9}$; 交互作用 $F(2, 34) = 1.334$, $P = 0.277$; オープン通路への侵入回数(number of open arm entries), グループの効果 $F(2, 34) = 2.254$, $P = 0.120$; 時間の効果 $F(1, 34) = 77.806$, $P = 2.62 \times 10^{-10}$; 交互作用 $F(2, 34) = 0.842$, $P = 0.439$ 重複測定二元配置分散分析)。

これらの結果は FGF21 を過剰発現させても、社会的敗北ストレス後の不安様行動の増加には有意な影響を与えなかったことを示唆している。

3-4-3 社会的回避テスト

3-4-3-1 セッション 1 (ICR マウスに対する回避テスト)

社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス後において総移動距離 (total distance) と ICR マウスへの探索時間 (social investigation) が有意に減少した。AAV-FGF21 投与群と AAV-hrGFP 投与群との間に有意差はみられなかった (図 21 b 総移動距離 (total distance), グループの効果 $F(2,34) = 0.551$, $P = 0.582$; 時間の効果 $F(1,34) = 52.303$, $P = 2.27 \times 10^{-8}$; 交互作用 $F(2,34) = 0.303$, $P = 0.740$; ICR への探索時間 (social investigation), グループの効果 $F(2,34) = 0.025$, $P = 0.975$; 時間の効果 $F(1,34) = 165.798$, $P = 1.247 \times 10^{-14}$; 交互作用 $F(2,34) = 0.017$, $P = 0.983$ 重複測定二元配置分散分析)。

3-4-3-2 セッション 2 (C57BL/6J マウスに対する回避テスト)

セッション 1 の結果と同様に社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス後において総移動距離 (total distance) と C57BL/6J マウスに対する探索時間 (social investigation) に有意な減少を認めた。AAV-FGF21 投与群と AAV-hrGFP 投与群との間に有意差はみられなかった (図 21 c 総移動距離 (total distance), グループの効果 $F(2,34) = 0.145$, $P = 0.865$; 時間の効果 $F(1,34) = 35.555$, $P = 9.62 \times 10^{-7}$; 交互作用 $F(2,34) = 0.118$, $P = 0.889$; C57BL/6J マ

ウスへの探索時間(social investigation), グループの効果 $F(2,34) = 0.211$, $P = 0.811$; 時間の効果 $F(1,34) = 45.352$, $P = 9.74 \times 10^{-8}$; 交互作用 $F(2,34) = 0.101$, $P = 0.904$ Bonferroni テスト)。

これらの結果は FGF21 の過剰発現は社会的敗北ストレスに伴う社会的回避の変化に影響を与えなかったことを示唆している。

3-4-4 強制水泳テスト

社会的敗北ストレス前と比較して社会的敗北ストレス後における無動時間 (immobile behavior) が有意に増加した。AAV-FGF21 を投与した群と AAV-hrGFP を投与した群との間に有意差はみられなかった(図 21 d グループの効果 $F(2,34) = 1.587$, $P = 0.219$, 時間の効果 $F(1,34) = 264.292$, $P = 1.33 \times 10^{-17}$, 交互作用 $F(2,34) = 0.050$, $P = 0.951$ 重複測定二元配置分散分析)。

この結果は FGF21 の過剰発現は社会的敗北ストレスに伴う抑うつ症状の変化に影響を与えないことを示唆している。

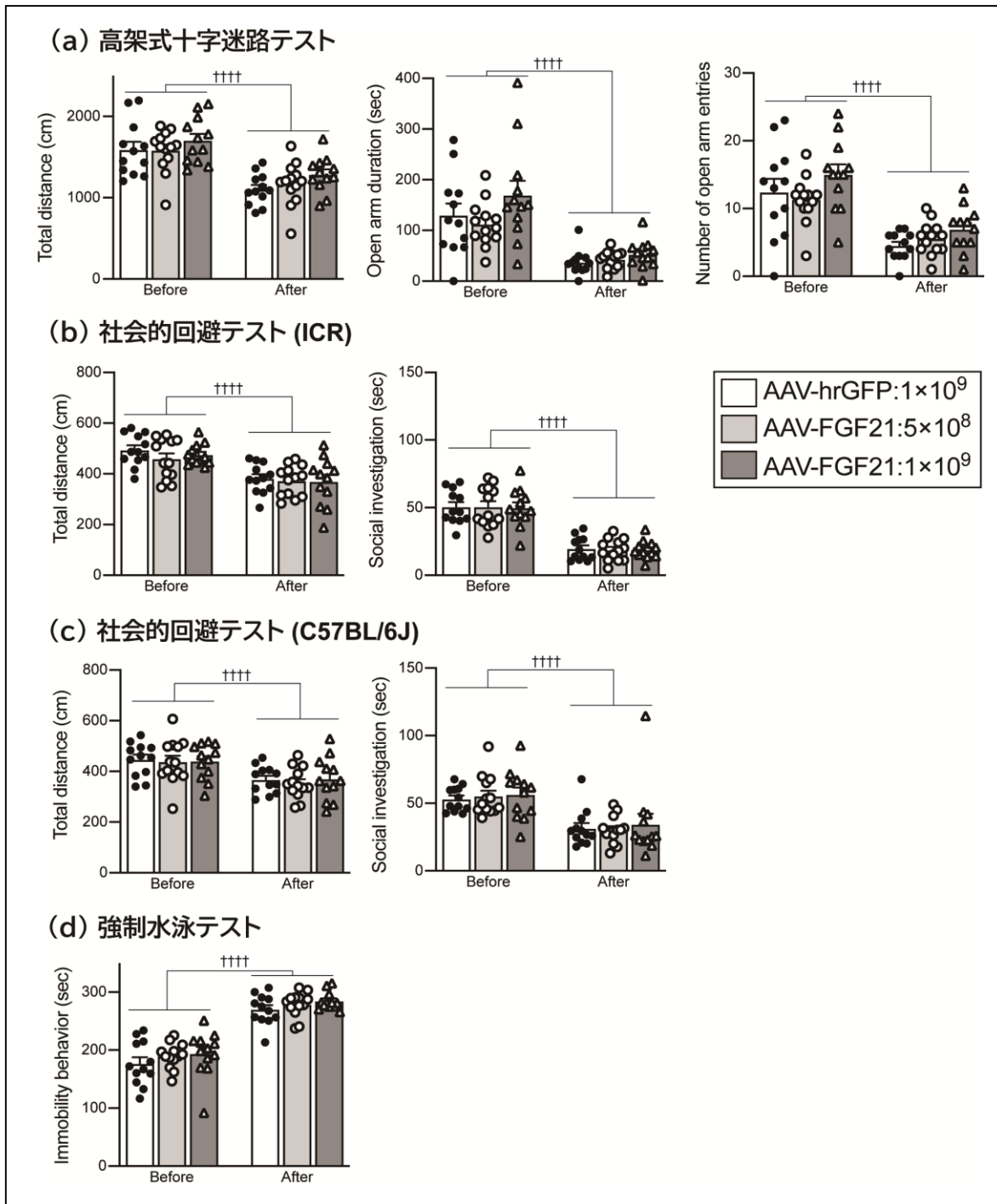


図 21 FGF21 過剰発現下における社会的敗北ストレス前後における行動実験

(投稿中論文から改変)

(a)高架式十字迷路テストにおける総移動距離(Total distance)及びオープン通

路内での滞在時間(Open arm duration)、オープン通路への侵入回数(Number of open arm entries)を示す。いずれも社会的敗北ストレス暴露前と比較して社会的敗北ストレス暴露後に有意に減少したが AAV-hrGFP 投与群と AAV-FGF21 投与群との間に有意な差は認めなかった。

(b)社会的回避テストにおける総移動距離(Total distance)及び ICR への探索時間(Social investigation)を示す。いずれも社会的敗北ストレス暴露前と比較して社会的敗北ストレス暴露後に有意に減少した。AAV-hrGFP 投与群と AAV-FGF21 投与群との間に有意な差は認めなかった。

(c) 社会的回避テストにおける総移動距離(Total distance)及び C57BL/6J への探索時間(Social investigation)を示す。いずれも社会的敗北ストレス暴露前と比較して社会的敗北ストレス暴露後に有意に減少した。AAV-hrGFP 投与群と AAV-FGF21 投与群との間に有意な差は認めなかった。

(d) 強制水泳テストにおける無動時間(Immobility behavior)を示す。社会的敗北ストレス暴露前と比較して社会的敗北ストレス暴露後に有意に増加した。AAV-hrGFP 投与群と AAV-FGF21 投与群との間に有意な差は認めなかった。

AAV-FGF21(1×10^9 vg)投与群 n = 12、AAV-FGF21(5×10^8 vg)投与群 n = 13、AAV-hrGFP 投与群 n = 12

† † † † $P < 0.0001$ ストレス前 対 ストレス後 重複測定二元配置分散分析

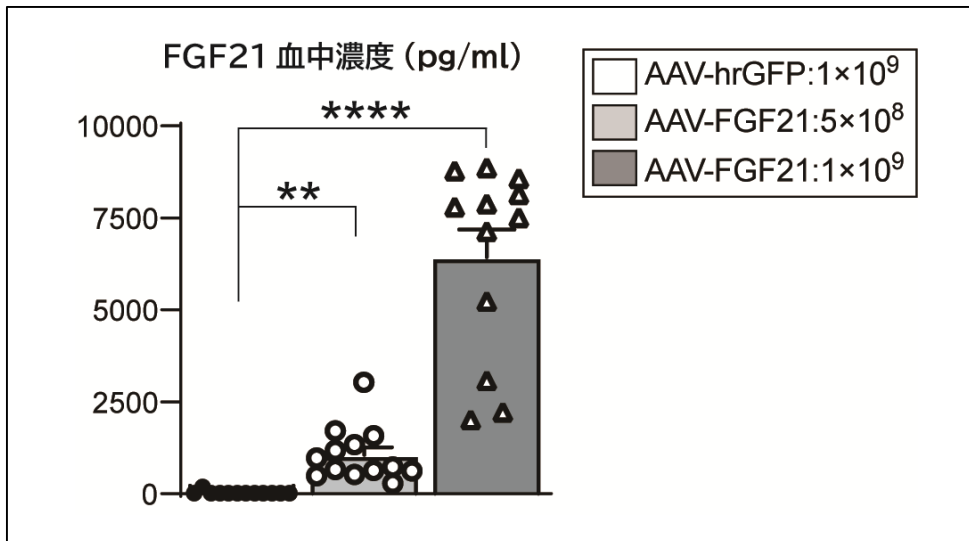


図 22 AAV 投与後の血中 FGF21 濃度

AAV 投与 33 日後の各群の FGF21 血中濃度を示す。

血中 FGF21 濃度は AAV-hrGFP 投与群と比較して AAV-FGF21:1×10⁹vg 投与群と AAV-FGF21:5×10⁸vg 投与群で有意に高値であった。

AAV-FGF21(1×10⁹vg)投与群 n = 12、AAV-FGF21(5×10⁸vg)投与群 n = 13、

AAV-hrGFP 投与群 n = 12

** $P < 0.01$ AAV-FGF21:5×10⁸vg 投与群 対 AAV-hrGFP 投与群

**** $P < 0.0001$ AAV-FGF21:1×10⁹vg 投与群 対 AAV-hrGFP 投与群

4 考察

双極性躁病患者において血清 FGF21 濃度が有意に高いことが示され、向精神薬による治療後に有意に減少することが報告されており、このような気分障害における FGF21 の関与が示唆されている²³⁻²⁵。

本研究では社会的敗北ストレス暴露後に血中 FGF21 濃度が増加し、FGF21 欠損下での社会的敗北ストレス暴露において抑うつ様行動が有意に増加した。

これらの結果は内因性の FGF21 が社会的敗北ストレス誘発性の抑うつ様行動を減弱させることを示唆している。

本研究での社会的敗北ストレス群における有意な血中コルチコステロン濃度の増加は先行文献^{38, 39}での社会的敗北ストレス暴露後の血中コルチコステロン濃度の増加と同程度であり、またテストマウスは定型的な社会的敗北姿勢を示していたことからテストマウスに対して適切なストレス刺激の付与ができたと考えられる。

FGF21 は受容体である FGFR1c と共受容体である β Klotho で構成される受容体複合体にて生体に作用する。FGFR1c が広く分布しているのに対し β Klotho は中枢においては延髄孤束核、最後野および視床下部といった限局した部位に発現することが示されている¹²。

また β Klotho はホメオボックス遺伝子でありノルアドレナリン作動性ニュー

ロンにおけるドパミン β ヒドロキシラーゼの発現誘導に不可欠である Phox2b を発現する細胞で発現することが報告されており、本研究では FGF21 の中枢投与後に孤束核、最後野のチロシン水酸化酵素(TH)陽性細胞が活性化されたことがわかった。

従って FGF21 が β Klotho を発現している延髄孤束核領域のカテコラミン作動性ニューロンを直接的に活性化させたと考えると興味深い。

しかし、カテコラミン作動性ニューロンの活性化が孤束核領域の β Klotho に依存するのか、これらのカテコラミン作動性ニューロンが β Klotho を発現するのかどうかを明らかにするための更なる検証が必要である。

延髄孤束核のノルアドレナリン作動性ニューロンは視床下部に投射し、ストレス刺激に応答してオキシトシン⁴⁰またはコルチコトロピン放出ホルモン⁴¹ニューロンの活性化を含む神経内分泌の応答を仲介することが示唆されている。オキシトシンとコルチコトロピン放出ホルモンは、行動、自律神経、代謝系のさまざまなストレス反応を調節することが示されており、FGF21 は視床下部のコルチコトロピン放出ホルモンニューロンの末梢の交感神経系を活性化し、エネルギー消費を増加させるとの報告がある³⁷。

これらの過去の報告と今回のデータから、社会的敗北ストレスにより放出された FGF21 が孤束核のノルアドレナリン作動性求心性投射を活性化し、社会的

敗北ストレスによって誘発される神経内分泌、行動、および代謝反応を調節していると考えすることは興味深く、これらについては今後の検証が必要である。

また FGF21 の過剰発現は、概日リズムの乱れと血中コルチコステロン濃度の上昇を誘発することが示唆されており⁹、慢性的な概日リズムの乱れと血中グルココルチコイド濃度の上昇は、抑うつ様症状の悪化に影響を与えることが示唆されている^{42, 43}。このことが FGF21 過剰発現で社会的敗北ストレスによる抑うつ様行動を改善させなかったことの一因かもしれない。

以前の研究において、FGF21 の投与が飲水量を増加させることが報告されており³⁵、本研究における FGF21 の過剰発現が飲水量の増加を誘導したものと矛盾しないと考えらえる。

社会的敗北ストレスは脂肪酸利用能の低下やインスリン抵抗性の誘発など、脂質代謝や糖代謝を攪乱させることが示唆されている⁴⁴。慢性ストレス後に観察される交感神経系と副交感神経系の不均衡な活動と、視床下部-下垂体-副腎系の活動の増加がこれらの代謝性変化に関与している可能性があり⁴⁵、本研究において社会的敗北ストレスは一時的に血中 FGF21 の濃度を増加させた。エネルギー代謝に対する FGF21 の一時的な増加の働きは不明なままである。しかし、FGF21 は脂肪組織や視床下部に作用することで脂質の利用を増加させることが示されているため、ストレス後に増加した FGF21 は、慢性ストレス後の

脂質代謝障害を軽減する可能性が考えられる^{2,3}。

本研究では FGF21 欠損動物において社会的敗北ストレスにより誘発される抑うつ様行動が有意に増加した。一方、AAV ベクターの末梢投与による FGF21 の慢性的な過剰発現動物においては抑うつ様行動は有意に変化しなかった。

現在はまだこの内因性 FGF21 と外因性 FGF21 の抑うつ様行動に対する効果の不一致の原因は解明できていない。しかし、FGF21 欠損マウスは遺伝的に FGF21 をノックアウトしているのに対して FGF21 過剰発現マウスは成体期において AAV を用いて FGF21 を過剰発現させているため、胎生期や発達期における FGF21 の発現がないことが抑うつ症状に影響を与えている可能性は否定できず今後更なる検証の余地がある。

また本研究での AAV を用いた FGF21 の過剰発現実験では実験後に各群の血中 FGF21 濃度を確認しており、投与濃度依存性に FGF21 血中濃度の上昇を認めた。各群の FGF21 血中濃度は AAV-FGF21: 1×10^9 vg 投与群では平均 6437 pg/ml、AAV-FGF21: 5×10^8 vg 投与群では平均 1059 pg/ml、AAV-hrGFP 投与群では平均 34 pg/ml であった。

今回の FGF21 の過剰発現量はケトン食や高脂肪食をマウスに付与した際の血中 FGF21 濃度⁴⁶⁻⁴⁸と比較し、同程度またはそれよりも低値であり内因性 FGF21 血中濃度から逸脱してはいないものの、本研究における社会的敗北ストレス後

に有意に増加を認めた FGF21 血中濃度よりもはるかに高値であった。これより FGF21 の抑うつ症状の抑制には社会的敗北ストレス後に認められた FGF21 の低いレベルの血中濃度の上昇で十分である可能性があり、FGF21 の過剰発現は天井効果のためコントロール群と比較して過剰発現群において抑うつ症状の抑制効果が認められなかった可能性も考えられる。今後、延髄孤束核における β Klotho を発現している神経細胞の同定なども含め更なる検証が必要である。

おわりに

本研究では内因性の FGF21 の社会的敗北ストレスにおける働きと β Klotho の延髄孤束核における局在の検証を行った。

まず初めに FGF21 がストレス応答に関連するとされている延髄孤束核のカテコラミンニューロンを活性化させるかどうかを検証するため、成体ラットに対して FGF21 の脳室内投与を行った。

脳室内投与を行ったラットの脳切片を用いてチロシン水酸化酵素 (TH) 産生ニューロン及びプロラクチン放出ペプチド (PrRP) 産生ニューロンと神経細胞活動の指標である Fos 蛋白質の二重免疫組織化学染色を行ったところ TH 産生ニューロンにおいて有意な Fos 蛋白質発現の増加を認めたが PrRP 産生ニューロンにおける Fos 蛋白質の有意な増加は認めなかった。

これにより FGF21 の脳室内投与により延髄孤束核の PrRP 陰性カテコラミンニューロンが活性化されたことが示唆された。

続いて社会的敗北ストレス暴露後に血中 FGF21 と生体内ストレスの指標であるコルチコステロンがともに上昇することを見出した。

これによりコルチコステロンだけでなく FGF21 がストレス暴露によって放出されたことが示唆された。

次に社会的敗北ストレス後の行動学的変化に FGF21 が関わっているかを検証

するため FGF21 欠損マウスを用いて社会的敗北ストレス暴露前後に行動テストを行い野生型マウスとの比較を行った。

その結果、抑うつ行動を評価する強制水泳テストにおいて FGF21 欠損マウスの群で有意に無動時間(immobility behavior)が減少した。これにより内因性の FGF21 がストレス暴露による抑うつ行動を抑制していることが示唆された。

しかし、FGF21 をウィルスベクター投与により過剰発現させても社会的敗北ストレスによる行動学的変化は有意には変わらなかった。

これにより成体野生型マウスに FGF21 を過剰発現させてもストレス暴露前後の行動に影響を与えないことが示唆された。

以上から、内因性の FGF21 は社会的ストレスに対する抑うつ反応を抑制していることが示唆され、この作用に脳幹部のカテコラミン作動性ニューロンが関与する可能性が出てきた。

引用文献

1. Markan KR, Naber MC, Ameka MK, Anderegg MD, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, Mohammadi M, Potthoff MJ. Circulating fgf21 is liver derived and enhances glucose uptake during refeeding and overfeeding. *Diabetes*. 63:4057-4063, 2014.
2. Kharitonov A, DiMarchi R. Fgf21 revolutions: Recent advances illuminating fgf21 biology and medicinal properties. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 26:608-617, 2015.
3. Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of fgf21. *Annual review of physiology*. 78:223-241, 2016.
4. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Integrated stress response stimulates fgf21 expression: Systemic enhancer of longevity. *Cellular signalling*. 40:10-21, 2017.
5. Kuro OM. The klotho proteins in health and disease. *Nature reviews. Nephrology*. 15:27-44, 2019.
6. Lewis JE, Ebling FJP, Samms RJ, Tsintzas K. Going back to the biology of fgf21: New insights. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 30:491-504, 2019.
7. Geng L, Lam KSL, Xu A. The therapeutic potential of fgf21 in metabolic diseases: From bench to clinic. *Nature reviews. Endocrinology*. 16:654-667, 2020.
8. Tezze C, Romanello V, Sandri M. Fgf21 as modulator of metabolism in health and disease. *Frontiers in physiology*. 10:419, 2019.
9. Bookout AL, de Groot MH, Owen BM, Lee S, Gautron L, Lawrence HL, Ding X, Elmquist JK, Takahashi JS, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Fgf21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nature medicine*. 19:1147-1152, 2013.
10. Hsueh H, Pan W, Kastin AJ. The fasting polypeptide fgf21 can enter brain from blood. *Peptides*. 28:2382-2386, 2007.
11. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, Kuro-o M. Tissue-specific expression of betaklotho and fibroblast growth factor (fgf) receptor isoforms determines metabolic activity of fgf19 and fgf21. *The Journal of biological chemistry*. 282:26687-26695, 2007.
12. Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Kuro-o M. Betaklotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:7432-7437, 2007.
13. Kuroda M, Muramatsu R, Maedera N, Koyama Y, Hamaguchi M, Fujimura H, Yoshida

- M, Konishi M, Itoh N, Mochizuki H, Yamashita T. Peripherally derived fgf21 promotes remyelination in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation*. 127:3496-3509, 2017.
14. Mäkelä J, Tselykh TV, Maiorana F, Eriksson O, Do HT, Mudò G, Korhonen LT, Belluardo N, Lindholm D. Fibroblast growth factor-21 enhances mitochondrial functions and increases the activity of pgc-1 α in human dopaminergic neurons via sirtuin-1. *SpringerPlus*. 3:2, 2014.
 15. Douris N, Stevanovic DM, Fisher FM, Cisu TI, Chee MJ, Nguyen NL, Zarebidaki E, Adams AC, Kharitononkov A, Flier JS, Bartness TJ, Maratos-Flier E. Central fibroblast growth factor 21 browns white fat via sympathetic action in male mice. *Endocrinology*. 156:2470-2481, 2015.
 16. BonDurant LD, Ameka M, Naber MC, Markan KR, Idiga SO, Acevedo MR, Walsh SA, Ornitz DM, Potthoff MJ. Fgf21 regulates metabolism through adipose-dependent and -independent mechanisms. *Cell metabolism*. 25:935-944.e934, 2017.
 17. Talukdar S, Owen BM, Song P, Hernandez G, Zhang Y, Zhou Y, Scott WT, Paratala B, Turner T, Smith A, Bernardo B, Müller CP, Tang H, Mangelsdorf DJ, Goodwin B, Kliewer SA. Fgf21 regulates sweet and alcohol preference. *Cell metabolism*. 23:344-349, 2016.
 18. Jimenez V, Jambrina C, Casana E, Sacristan V, Muñoz S, Darriba S, Rodó J, Mallol C, Garcia M, León X, Marcó S, Ribera A, Elias I, Casellas A, Grass I, Elias G, Ferré T, Motas S, Franckhauser S, Mulero F, Navarro M, Haurigot V, Ruberte J, Bosch F. Fgf21 gene therapy as treatment for obesity and insulin resistance. *EMBO molecular medicine*. 10, 2018.
 19. Yu Z, Lin L, Jiang Y, Chin I, Wang X, Li X, Lo EH, Wang X. Recombinant fgf21 protects against blood-brain barrier leakage through nrf2 upregulation in type 2 diabetes mice. *Molecular neurobiology*. 56:2314-2327, 2019.
 20. Schlein C, Talukdar S, Heine M, Fischer AW, Krott LM, Nilsson SK, Brenner MB, Heeren J, Scheja L. Fgf21 lowers plasma triglycerides by accelerating lipoprotein catabolism in white and brown adipose tissues. *Cell metabolism*. 23:441-453, 2016.
 21. Charles ED, Neuschwander-Tetri BA, Pablo Frias J, Kundu S, Luo Y, Tiruchera GS, Christian R. Pegbelfermin (bms-986036), pegylated fgf21, in patients with obesity and type 2 diabetes: Results from a randomized phase 2 study. *Obesity (Silver Spring, Md.)*. 27:41-49, 2019.
 22. Lu Y, Li R, Zhu J, Wu Y, Li D, Dong L, Li Y, Wen X, Yu F, Zhang H, Ni X, Du S, Li X, Xiao J, Wang J. Fibroblast growth factor 21 facilitates peripheral nerve regeneration through suppressing oxidative damage and autophagic cell death. *Journal of cellular and*

- molecular medicine*. 23:497-511, 2019.
23. Hu Q, Wang C, Liu F, He J, Wang F, Wang W, You P. High serum levels of fgf21 are decreased in bipolar mania patients during psychotropic medication treatment and are associated with increased metabolism disturbance. *Psychiatry research*. 272:643-648, 2019.
 24. Liu Y, Wang M, Tan X, Wang X, Yang X, Xiao J, Li X, Wang F. Negative correlation between cerebrospinal fluid fgf21 levels and bdi scores in male chinese subjects. *Psychiatry research*. 252:111-113, 2017.
 25. Chiavaroli A, Recinella L, Ferrante C, Martinotti S, Vacca M, Brunetti L, Orlando G, Leone S. Effects of central fibroblast growth factor 21 and irisin in anxiety-like behavior. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 31:797-802, 2017.
 26. Onaka T. Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress. *Journal of neuroendocrinology*. 16:308-312, 2004.
 27. Isingrini E, Perret L, Rainer Q, Amilhon B, Guma E, Tanti A, Martin G, Robinson J, Moquin L, Marti F, Mechawar N, Williams S, Gratton A, Giros B. Resilience to chronic stress is mediated by noradrenergic regulation of dopamine neurons. *Nature neuroscience*. 19:560-563, 2016.
 28. Jin HM, Shrestha Muna S, Bagalkot TR, Cui Y, Yadav BK, Chung YC. The effects of social defeat on behavior and dopaminergic markers in mice. *Neuroscience*. 288:167-177, 2015.
 29. Oizumi H, Kuriyama N, Imamura S, Tabuchi M, Omiya Y, Mizoguchi K, Kobayashi H. Influence of aging on the behavioral phenotypes of c57bl/6j mice after social defeat. *PloS one*. 14:e0222076, 2019.
 30. Iñiguez SD, Riggs LM, Nieto SJ, Dayrit G, Zamora NN, Shawhan KL, Cruz B, Warren BL. Social defeat stress induces a depression-like phenotype in adolescent male c57bl/6 mice. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*. 17:247-255, 2014.
 31. Nakano T, Shiizaki K, Miura Y, Matsui M, Kosaki K, Mori S, Yamagata K, Maeda S, Kishi T, Usui N, Yoshida M, Onaka T, Mizukami H, Kaneda R, Karasawa K, Nitta K, Kurosu H, Kuro OM. Increased fibroblast growth factor-21 in chronic kidney disease is a trade-off between survival benefit and blood pressure dysregulation. *Scientific reports*. 9:19247, 2019.
 32. Golden SA, Covington HE, 3rd, Berton O, Russo SJ. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature protocols*. 6:1183-1191, 2011.
 33. Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T. Impairment of social and emotional behaviors in cadm1-knockout mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 396:703-708, 2010.

34. Turner T, Chen X, Zahner M, Opsahl A, DeMarco G, Boucher M, Goodwin B, Perreault M. Fgf21 increases water intake, urine output and blood pressure in rats. *PloS one*. 13:e0202182, 2018.
35. Song P, Zechner C, Hernandez G, Cánovas J, Xie Y, Sondhi V, Wagner M, Stadlbauer V, Horvath A, Leber B, Hu MC, Moe OW, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. The hormone fgf21 stimulates water drinking in response to ketogenic diet and alcohol. *Cell metabolism*. 27:1338-1347.e1334, 2018.
36. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, Kharitonov A. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology*. 149:6018-6027, 2008.
37. Owen BM, Ding X, Morgan DA, Coate KC, Bookout AL, Rahmouni K, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. Fgf21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss. *Cell metabolism*. 20:670-677, 2014.
38. Macedo GC, Morita GM, Domingues LP, Favoretto CA, Suchecki D, Quadros IMH. Consequences of continuous social defeat stress on anxiety- and depressive-like behaviors and ethanol reward in mice. *Hormones and behavior*. 97:154-161, 2018.
39. Tanaka K, Furuyashiki T, Kitaoka S, Senzai Y, Imoto Y, Segi-Nishida E, Deguchi Y, Breyer RM, Breyer MD, Narumiya S. Prostaglandin e2-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32:4319-4329, 2012.
40. Onaka T, Takayanagi Y. Role of oxytocin in the control of stress and food intake. *Journal of neuroendocrinology*. 31:e12700, 2019.
41. Rinaman L. Hindbrain noradrenergic $\alpha 2$ neurons: Diverse roles in autonomic, endocrine, cognitive, and behavioral functions. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 300:R222-235, 2011.
42. McClung CA. How might circadian rhythms control mood? Let me count the ways. *Biological psychiatry*. 74:242-249, 2013.
43. Tafet GE, Nemeroff CB. The links between stress and depression: Psychoneuroendocrinological, genetic, and environmental interactions. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 28:77-88, 2016.
44. Chuang JC, Cui H, Mason BL, Mahgoub M, Bookout AL, Yu HG, Perello M, Elmquist JK, Repa JJ, Zigman JM, Lutter M. Chronic social defeat stress disrupts regulation of lipid synthesis. *Journal of lipid research*. 51:1344-1353, 2010.
45. Oster H. The interplay between stress, circadian clocks, and energy metabolism. *The Journal of endocrinology*. 247:R13-r25, 2020.

46. Yang W, Liu L, Wei Y, Fang C, Zhou F, Chen J, Han Q, Huang M, Tan X, Liu Q, Pan Q, Zhang L, Lei X, Li L. Exercise ameliorates the fgf21-adiponectin axis impairment in diet-induced obese mice. *Endocrine connections*. 8:596-604, 2019.
47. Singhal G, Douris N, Fish AJ, Zhang X, Adams AC, Flier JS, Pissios P, Maratos-Flier E. Fibroblast growth factor 21 has no direct role in regulating fertility in female mice. *Molecular metabolism*. 5:690-698, 2016.
48. Badman MK, Koester A, Flier JS, Kharitonov A, Maratos-Flier E. Fibroblast growth factor 21-deficient mice demonstrate impaired adaptation to ketosis. *Endocrinology*. 150:4931-4940, 2009.

謝辞

本研究におきまして手厚い御指導と適切な御助言を賜りました神経脳生理学部門の尾仲達史教授、高柳友紀先生、吉田匡秀先生、犬束歩先生、及び御協力賜りました抗加齢医学研究部の黒尾誠教授、黒須洋先生、遺伝子治療研究部の水上浩明教授に深く感謝申し上げます。

また、このような研究の機会を与えて頂きました歯科口腔外科学講座の森良之教授にお礼申し上げます。