

概日リズムリセット時の運動意欲における 摂食促進ホルモン・グレリンの新たな役割

久留米大学 御船弘治

(共同研究者) 田尻祐司

同 満園良一

New Roles of Ghrelin, Appetite Regulating Hormone, in the Motivation for Voluntary Exercise at the Reset Time of the Circadian Rhythm

by

Hiroharu Mifune

*Institute of Animal Experimentation,
Kurume University School of Medicine*

Yuji Tajiri

Division of Endocrinology, Kurume University

Ryouichi Mitsuzono

*Institute of Health and Sports Science,
Kurume University*

ABSTRACT

Ghrelin is involved in the brain reward circuits via dopamine neurons related to motivational properties. Here, we showed the relevance of ghrelin as an initiator of voluntary exercise in ghrelin knockout (GKO) mice. The plasma ghrelin concentration

showed a bimodal diurnal rhythm with peaks at the beginning and end of the dark phase in the wild type (WT) mice. Although predominant increases in wheel running activity were observed accordant to both peaks of plasma ghrelin in the WT mice, those were severely attenuated in the GKO mice. A single injection of ghrelin receptor agonist brought about marked enhancement of wheel running activity, in contrast to no effect by the continuous administration. The brain dopamine level was attenuated in GKO mice compared to that in WT mice. These findings suggested that the surge in ghrelin should play a crucial role in the motivation for voluntary exercise via the central hedonic dopamine system.

要 旨

グレリンは、ドーパミン神経を介して摂餌行動のモチベーションや脳内報酬系に関与している。今回我々は、グレリンノックアウト (GKO) マウスを用いて、グレリンの自発運動発動因子としての役割を明らかにした。野生型 (WT) マウスの血中グレリン濃度は、暗期の始まりと終わりの二峰性にピークを示し、その両ピークと同じ時間帯に、WT マウスでは回転カゴの回転数は顕著に増加したが、GKO マウスでの増加は軽微であった。GKO マウスに対するグレリン受容体アゴニストの単回連続投与は、回転カゴの回転数を大幅に増加させたが、浸透圧ミニポンプによる持続投与では増加は認められなかった。脳内ドーパミンレベルに関して、WT マウスと比較して GKO マウスでは減弱していた。以上の結果から、血中グレリン濃度のサージ的な上昇は中枢ドーパミンシステムを介した自発運動に対するモチベーションに重要な役割を演じていることが示唆された。

緒 言

ヒトや実験動物にとって、運動が神経系や認知効果などを含めた心身の健康に良い効果をもたらすことは広く知られている^{1,2)}。食事制限と定期的な運動は、現在世界中で重大な問題である肥満

症の予防と治療に対し、適切な方法と考えられる。しかし、肥満者では、運動不足や過食・夜食を含めた生活リズムの乱れがしばしば同時に認められ³⁾、肥満の治療を複雑化し体重減少の達成も困難なものにしている。運動はエネルギー消費の増加による体重減少を目的として推奨されるが、多くの肥満者にとって定期的な運動を長期間行うことは一般的に難しい。ゆえに、運動を行い、習慣化するためのモチベーションを生み出すメカニズムを探ることは、特に肥満者にとって重要なことである。

グレリンは成長ホルモン分泌促進物質 (GHS) として単離・同定され、現在では摂食促進ホルモンとしても知られている。本ペプチドは28個のアミノ酸から構成されており、胃底部の酸分泌腺にある X/A-like 内分泌細胞から産生される⁴⁾。グレリンの主な機能は摂食促進作用⁵⁾、GH 分泌促進作用であるが、その他にエネルギー代謝⁶⁾ や自律神経系⁷⁾、心臓血管系の調節⁸⁾ などを含む様々な生物学的役割が報告されている。グレリンは N 末端側 Ser₃ でのオクタン酸修飾によって生物学的活性を得、この脂肪酸修飾は ghrelin O-acyltransferase (GOAT) によって触媒されている⁹⁾。

絶食下でグレリンを投与すると、摂食行動およびその直前に自発活動量が亢進すること (食物予

期活動, food anticipatory activity; FAA) が報告されている。更に, グレリン受容体欠損マウスでは FAA は減少していることから¹⁰⁾, グレリンは FAA について重要な役割を演じていると考えられる。従って, グレリンはエネルギー代謝や, 摂食行動や自発活動を含む日常生活のリズムにも関与していると考えられてきた。適切なエネルギーバランスを維持するため, 摂食行動は脳皮質や側坐核 (NAc)¹¹⁾ など, 様々な脳域の活性化により機能する報酬系や空腹感により調整されている。最近の研究から, グレリン受容体が腹側被蓋野 (VTA) のドーパミンニューロンに高発現していることが明らかとなったため, NAc に投射する VTA の中脳辺縁系ドーパミンニューロンが摂食行動を起こすグレリンの重要な作用点であることが示唆された¹²⁾。このことからグレリンは, 摂食行動のモチベーションや食嗜好性に基づく摂食を司っている脳内報酬回路に関与している可能性が考えられる。

我々は, 高脂肪食 (HFD) による肥満ラットモデルを用いた実験で, 自発運動は摂食行動異常を改善すると共にグレリン産生を回復させることを報告し¹³⁾, 運動とグレリンに関連性がある可能性を提唱した。上述したように, グレリンは摂食行動のモチベーションや自発活動量の亢進に関与しているため, 自発運動や摂食行動のイニシエーターとして重要な役割を担っていることが推察される。そこで本研究では, 自発運動を行うモチベーションにおけるグレリンの関与について, グレリンノックアウト (GKO) マウスを用いて検証した。

1. 方法

1. 1 使用動物

使用動物としては野生型 (WT) 雄マウスおよびグレリン遺伝子欠損 (GKO) 雄マウス¹⁴⁾ を用い, 両マウス共に 12 時間ごとの照明 (明期: 7:00-19:00, 暗期: 19:00-7:00, Zeitgeber time: 明

期の開始時刻を ZT0, 暗期の開始時刻を ZT12 とする 12 / 12 時間の明暗周期における体内時計の時刻) のもとで, 一定の環境に維持された (室温: 25±2℃, 湿度: 60±10%) 飼育室で飼育した。また, 摂餌方法は, 標準粉末飼料 (10 kcal% fat, produced by Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA: open source diet code D12450B) を自由給餌とした。尚, 全ての動物実験は, 久留米大学動物実験委員会の承認を得て遂行した。

1. 2 自由給餌下での実験プロトコール

WT マウスと GKO マウスを 4 群に分けた: 非運動群 (WT-Se および GKO-Se; 各群 n=8) および自発運動群 (WT-Ex および GKO-Ex; 各群 n=8)。全てのマウスは, 実験に用いる前に一般的な TPX[®] ケージ (W22×D32×H13cm) にて単独飼育を行った。一週間の馴化後 12 週齢時に, 自発運動群 (WT-Ex および GKO-Ex) として回転カゴ (直径 15cm, 幅 5cm) 付き飼育チャンバー (W32×D20.5×H26.5cm) にて単独飼育し, 摂餌量, 自発活動量, 回転カゴによる自発運動量を自動監視システム (ACTIMO-1M combined with MFD-100-CH; 株シンファクトリー, 福岡) にて 13-14 週齢の間, ACTIMO-DATA ソフトウェアにより測定記録した。摂餌量は 0.01 g の秤量精度にて 3 分毎に測定記録し, 自発運動量は 1 分間の回転カゴの回転数を記録計測した。

1. 3 グレリン受容体アゴニストの介入試験

グレリン受容体アゴニストとして GHRP-6 (Bachem, Bubendorf, Switzerland) を使用した。単回連続投与群として, 13 週齢の GKO マウスに毎日 18 時 30 分に 14 日間 GHRP-6 (1 μg/ 体重 g) または生理食塩水を腹腔内投与した。その間, 回転カゴの回転数を実験方法 1. 2 に従い測定した。持続投与群として, 浸透圧ミニポンプ (Alzet Model 1004; Duret Corporation, Cupertino, CA) に

GHRP-6 (42ng/0.11 μ L/hr/ 体重 g) または生理食塩水を注入し, 12 週齢の GKO マウスへ麻酔下にて腹腔内への挿入術を施行し, 一週間の馴化後, 単回連続投与群と同様, 回転カゴの回転数を測定した.

1. 4 側坐核ドーパミン活性の測定

WT-Se, GKO-Se, WT-Ex, GKO-Ex に対して, I-型カニューレを用いたマイクロダイアリス法¹⁵⁾を施行した. 自発運動群(Ex 群)と非運動群(Se 群)の 13-14 週齢のマウスの片側の側坐核 (NAc) 領域に, 麻酔下にマイクロダイアリスプローブを挿入した (NAc 領域として頭蓋骨 Bregma と硬膜から A/P 1.4mm, L/M 0.6mm, V/D4.5mm の位置にプローブを挿入). 手術後, マウスは専用のアクリル箱 (W30×D30×H40cm) に 48 時間単頭飼育し, 回復後マイクロダイアリス法を施行した. 24 時間の絶食後, 各群のマウスに通常食を 20 分間与え, その後餌を回収した. 20 分間で摂食した摂餌量は WT-Se (156.5±46.1mg) と GKO-Se (123.3±30.8mg) の間, WT-Ex (114.4±65.6 mg) と GKO-Ex (113.2±38.1 mg) の間で差異はなかった. 摂食前 (基準値) と摂食後 15 分おきの透析液を回収し, ドーパミンレベル (DA) を高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (HPLC-ECD) により定量した.

1. 5 ラジオイムノアッセイ (RIA) による血漿グレリン濃度測定

グレリン濃度測定用の血漿は, 塩酸 (最終濃度 0.1N) を加えた後, Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Milford, MA) を用いて抽出した. 抽出物は凍結乾燥を行い, -80°C で保存した. 実験当日, 凍結乾燥した検体は RIA buffer を用いて溶解した. 活性化グレリンは, ラットグレリンの N 末端 (Gly¹-Lys¹¹ with O-n-octanoylation at Ser³) を用いて検出した. 本測定系はグレリンの

Ser3 n-octanoylated form を特異的に認識し, des-acyl ghrelin を認識しないが, ヒト, マウス, ラットのグレリンには完全に交差反応し, 他の acyl-modified ghrelin にもかすかに交差反応を示す.

1. 6 統計処理

全ての統計学的データは, SPSS 統計学バージョン 23 (IBM 社 NY) を用いて解析し, 各パラメータの正規性評価は Kolmogorov-Smirnov 検定により判定した. 統計学的有意差は Student's t 検定もしくは Mann-Whitney U 検定により, 危険率 5% 未満をもって有意差ありと判定した.

2. 結果

2. 1 自由給餌下での摂餌行動, 自発活動量, 回転カゴによる自発運動量

摂餌行動 (図 1A, B) や自発活動量 (図 1C, D) の日内リズムに関しては野生型自発運動群 (WT-Ex) とグレリン遺伝子欠損自発運動群 (GKO-Ex) 間で違いは認められなかった. また, 明期および暗期の摂餌量や自発活動量においても両群に大きな差はみられなかった (図 1E, F). さらに, 両群の回転カゴによる自発運動量は, 明-暗サイクルにおいてそのほとんどは暗期に観察され (図 2A, B), WT-Ex マウスでは, 暗期の始めと終わりに回転カゴによる自発運動量の顕著な増加が見られ (図 2A), 摂餌量の増加時期と同調していた. 一方, GKO-Ex マウスの回転カゴによる自発運動量は WT-Ex マウスと比較して有意に低下していた (図 2B, C).

2. 2 自由給餌下の回転カゴによる自発運動パターン

暗期における 2 時間ごとの回転カゴによる自発運動量を解析したところ, WT マウスと GKO マウスの両方で, 自発運動の持続性は ZT (Zeitgeber time) 20 (明記の開始時刻を ZT0, 暗期の開始時

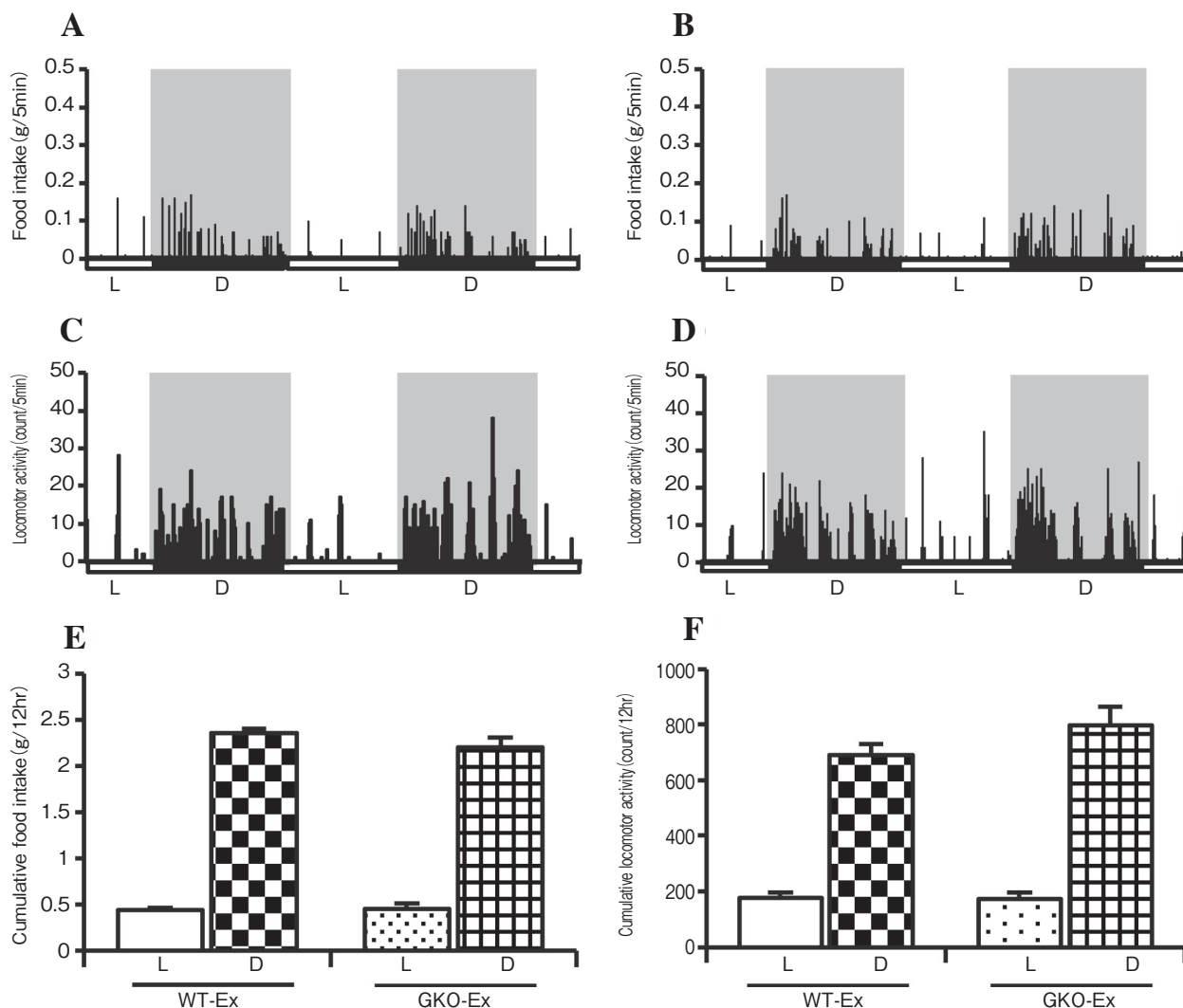


図1 The food intake and locomotor activity under ad libitum feeding

There is no difference in the diurnal rhythm of the food intake (A, B) or locomotor activity (C, D) between WT-Ex (A, C) and GKO-Ex (B, D) mice. The cumulative food intake and locomotor activity during the light and dark phases were also comparable in both exercise groups (E, F). Error bars, s.e.m. (WT, n=8 mice; GKO, n=8 mice). L: Light period, D: Dark period.

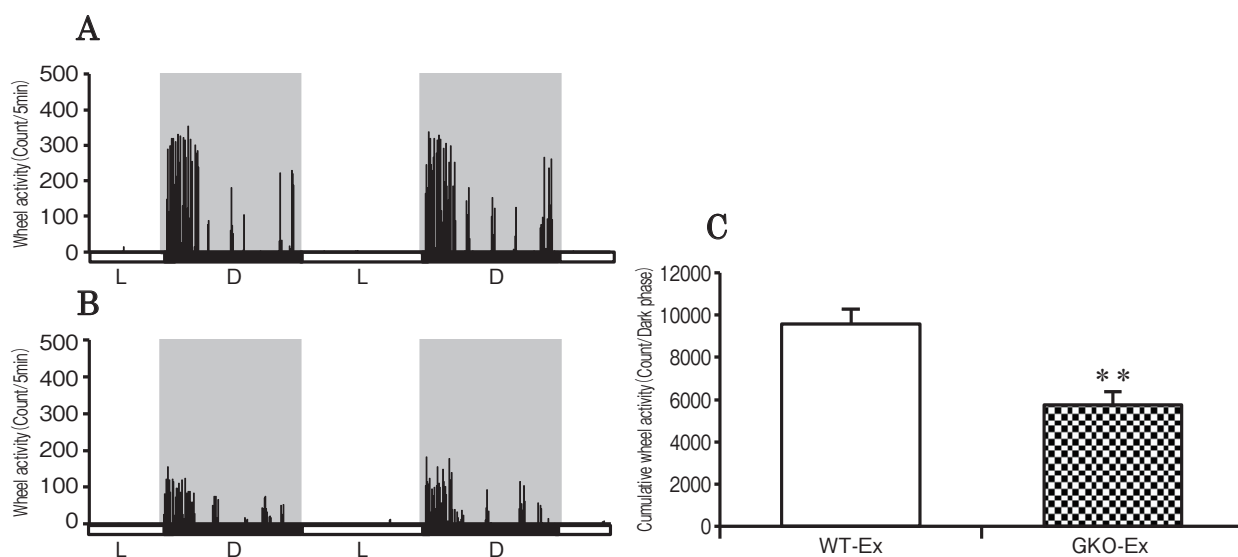


図2 Voluntary wheel-running activity under ad libitum feeding

In WT-Ex mice (A), a marked increase in voluntary wheel-running activity was observed at both the beginning and end of the dark phase, concomitant with an increase in the food intake in these periods. In the GKO-Ex mice (B), however, the level of voluntary exercise was markedly reduced in comparison to the WT mice (C). **P<0.01 versus WT-Ex mice by Student's t-test. Error bars, s.e.m. (WT, n=8 mice; GKO, n=8 mice). L: Light period, D: Dark period.

刻を ZT12 とする体内時計の時刻で、ZT20 は明暗周期の午前 3 時に相当) に近づくにつれて減少した。更に、暗期が終わる直前の時間帯では、両者の自発運動量はやや増加した。また、自由給餌下の GKO-Ex マウスの自発運動量は、ZT20-22 を除いたすべての時点において WT-Ex マウスに比べて有意に減少した (図 3)。

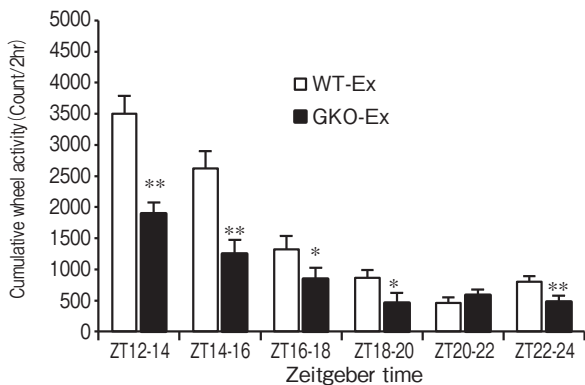


図3 The wheel-running activity patterns of mice under *ad libitum* feeding. With the exception of ZT20-22, the wheel-running activity of the GKO-Ex mice under *ad libitum* feeding was significantly reduced in comparison to WT-Ex mice at all time points. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus WT-Ex by Student's *t*-test. Error bars, s.e.m. (WT, $n=8$ mice; GKO, $n=8$ mice).

2. 3 自発運動環境下の血中グレリン濃度の変化および GKO マウスにおけるグレリン受容体アゴニストの効果

WT-Se (sedentary: 自発運動なし) 群, および WT-Ex 群の両者において血中グレリン濃度は ZT0 と ZT12 にピークを迎える二峰性の日周リズムを示した (図 4A)。また, WT-Ex マウスでは, 暗期 (ZT12, 18, 0) での血中グレリン濃度は WT-Se マウスと比較して有意に高かった。

GKO マウスに対するグレリン受容体アゴニスト (GHRP-6) の 1 日 1 回の単回連続投与群および持続投与群の結果を, 図 4B と 4C にそれぞれ示した。GHRP-6 の単回連続投与を 14 日間行った場合, 暗期における回転カゴによる自発運動量は生理食塩水投与群と比較して, すべての時点で有意に増加し (図 4B), WT-Ex マウスの自発運

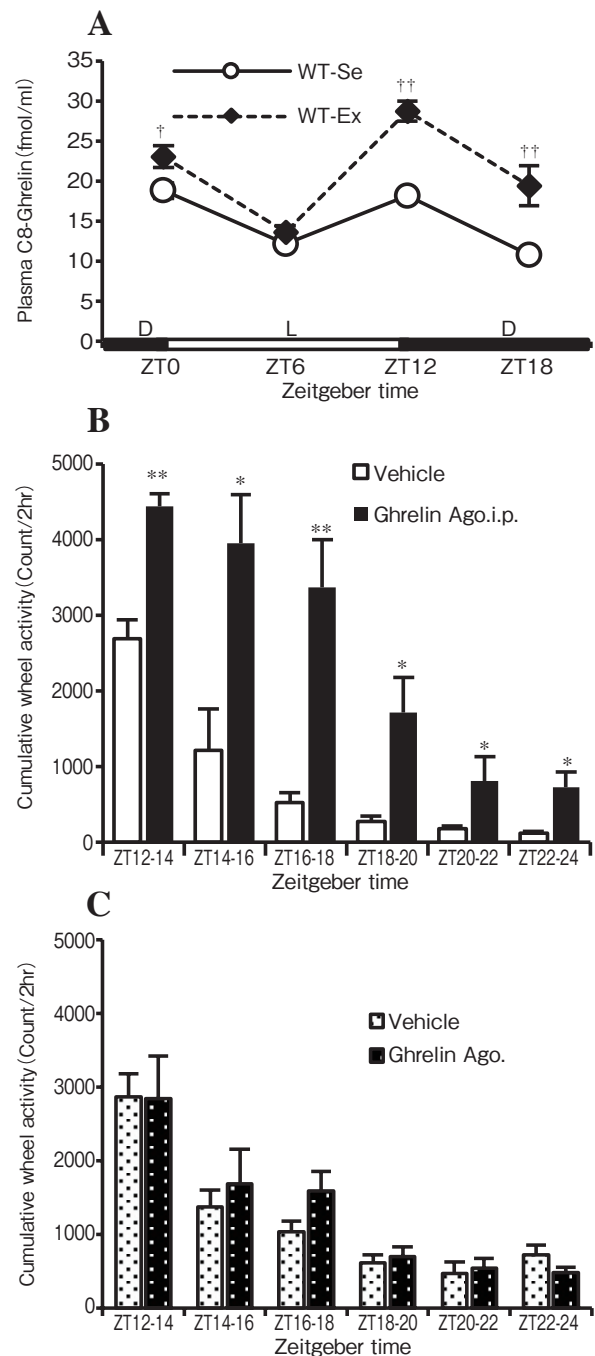


図4 The plasma concentration of ghrelin in the sedentary and exercise groups (A) and the effect of a ghrelin receptor agonist in GKO mice (B, C)

The plasma ghrelin levels in both WT-Se and Ex mice showed a bimodal diurnal rhythm with peaks at ZT12 and 0. These levels during the dark phase (ZT12, 18 and 0) were significantly higher in WT-Ex mice than in WT-Se mice (A). After the once-daily administration (B) of GHRP-6 for 14 days, the wheel-running activity during the dark phase was significantly increased in comparison to vehicle-treated mice at each time point, and the activity was almost restored to the WT-Ex level (Fig. 5a). In contrast, the continuous administration (C) of GHRP-6 by an osmotic mini-pump for two weeks had no effect on the wheel-running activity during the dark phase in GKO mice. (A) † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ and ††† $P < 0.001$ versus WT-Se at the same time point by Student's *t*-test. Error bars, s.e.m. (WT-Se, $n=9$ mice; WT-Ex, $n=10$ mice). (B) * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus vehicle by Student's *t*-test. Error bars, s.e.m. (Vehicle, $n=6$ mice; Ghrelin Ago. i.p., $n=6$ mice).

動量とほぼ同等の結果となった (図 3)。反対に、浸透圧ミニポンプを用いて GHPR-6 を 2 週間持続投与した場合、生理食塩水投与群と比較して暗期の回転カゴによる自発運動量に変化はなかった (図 4C)。

2. 4 側坐核ドーパミンレベルに対する自発運動の影響

自発運動下の WT マウスと GKO マウスの両者において、側坐核におけるドーパミンの基本放出量に違いは認められなかった (図 5A)。WT-Ex マウスの摂餌後のドーパミン (DA) レベルは直ちに基本レベルの 150% まで増加し、摂餌後の DA レベルの増加は 140 分程度持続した (図 5B)。しかし、GKO-Ex マウスの DA レベルの増加は WT-Ex マウスで認められたものよりも有意に小さかった (図 5B)。

考 察

本研究では、まず、自発運動は主に暗期の始まりと終わりに認められ、GKO マウスでは WT マウスと比較して自由給餌下で著しく減弱した。次

に、血中グレリン濃度は暗期の始まりと終わりにピークを持つ二峰性の日周リズムを示し、自発運動により増加することを明らかにした。また、GKO マウスに対して暗期の始めにグレリン受容体アゴニストを投与すると、WT マウスと同等レベルまで自発運動量は増加した。一方で、浸透圧ミニポンプによる持続投与では、同じ用量を投与しても、自発運動量の明らかな改善は見られなかった。最後に、NAc におけるドーパミン基礎レベルおよび食後のドーパミンレベル共に自発運動により有意に上昇したが、GKO マウスではこれらの上昇は WT マウスと比較すると軽度であった。

グレリンは空腹感と食欲を促進させる。それゆえに摂食促進ホルモンとして知られている。生存に必要なエネルギーを保つために起こる「恒常性のための空腹」の他に、現代社会に生きる私達は、脂質や糖質たっぷりの美味しい食事によって生まれる「快樂的な空腹」を感じるようになってきている。快樂的な空腹は、摂食モチベーションに支配された反応と考えられている¹⁶⁾。また、グレリンは FAA に見られるように、食べ物を探すと

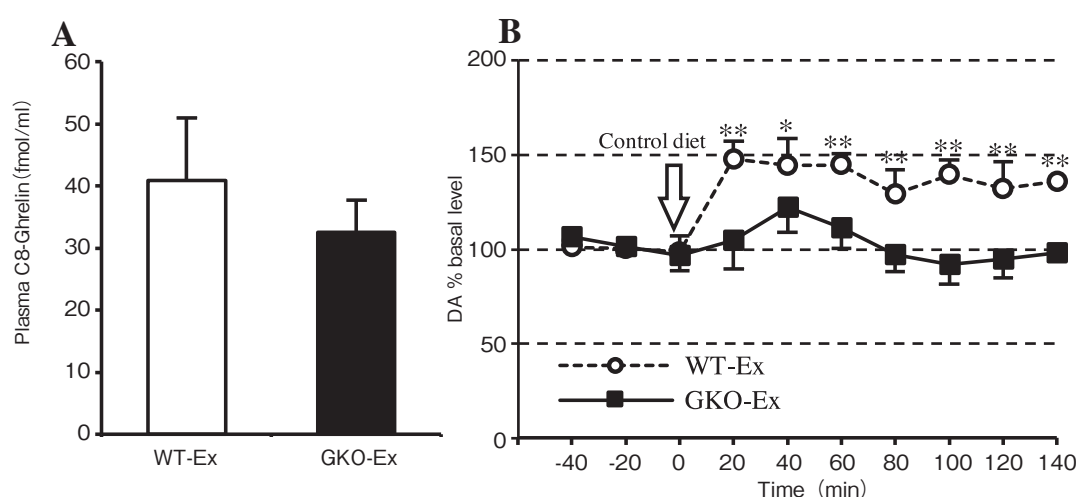


図5 The effect of voluntary wheel running activity on the dopamine levels in the unilateral NAc

In GKO mice, the basal dopamine level in the NAc (A) was also enhanced under exercise condition (GKO-Ex), but to a lower degree than that observed in WT-Ex mice. In the WT-Ex mice, the food consumption-induced increase in the DA levels (B) was persistently higher and did not return to the basal levels for up to 140 min. However, in the GKO-Ex mice, these increases in the DA levels were much smaller and were significantly lower than those observed in the WT-Ex mice. The values are expressed as the mean \pm SE. Arrow: the time point at which the mice in each group began to be fed regular food for a period of 20 min after 24 hours of food deprivation. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. GKO-Ex by Student's t-test. Error bars, s.e.m. (WT, n=5 mice; GKO, n=5 mice).

いうモチベーションに関連していることが知られている¹⁷⁾。ゆえに、グレリンが肥満者にしばしば見られる異常なやけ食いのような「快楽的な空腹」の形成に重要な役割を演じていると考えられる。実際、高脂肪食による肥満ラットモデルを自発運動下で飼育すると、異常な摂餌行動が劇的に改善され、と同時に低下していたグレリン産生能が正常化することを我々は以前報告した¹³⁾。この結果から、グレリンと運動の間には何らかのクロストークが存在し、グレリンは「快楽的な食行動」と同様に運動を行う際のモチベーションにも関連があることが考えられた。我々はグレリンが自発運動のイニシエーターとして重要な役割を担っていると仮定し、本研究ではグレリンノックアウトマウスを用いて自発運動量を測定した。

自由摂餌下では、摂餌行動と自発活動は主に暗期に観察され、これらの一般身体的行動は暗期の始まりにもっとも多く認められ、次に暗期の終わりに多く認められた。また、回転カゴによる自発運動量は、摂餌行動と自発活動が多く観察された時間帯と同じ時間帯に集中していた。このことから、摂餌行動と自発運動は、同様なモチベーション活動として重要な関連性があることが示唆される。更に、GKO マウスと WT マウスの間で、摂餌量および自発活動量に差は認められなかったのに対し、GKO マウスの自発運動量は WT マウスと比較して著しく減少していた。そのため、特に暗期の始まりと終わりにおいて、グレリンと自発運動の間に何らかの関連性があることが推察された。

本研究で我々は、血中グレリン濃度が暗期の始まりと終わりである 19 時と 7 時にピークを持つ二峰性リズムを示すことを初めて明らかにした。上述したように、運動と食欲調節ホルモンの間には関連性があると思われる。実際、自由摂餌下の自発運動群では、持続的な自発運動は主に暗期の始めに見られ、その後は少なくなっていく、暗期

の終わり直前に一時的に増加し、これらの時間帯に同調するかの如く血中グレリン濃度の著しい上昇が認められることは、グレリン産生のピークが自発運動の発動に必要であることを示唆している。そこで我々は、GKO マウスに外因性のグレリン受容体アゴニスト (GHRP) を投与することで、WT マウスで見られたような自発運動リズムに回復するかどうか検討した。GKO マウスへ GHRP を暗期の始めに一日 1 回投与した場合、特に暗期の前半の間、自発運動量の著しい増加を引き起こした。反対に、浸透圧ミニポンプを用い GHRP を持続的に投与すると、効果は認められなかった。これらの結果は、グレリンが摂餌行動と同様に自発運動にとって重要なイニシエーターであること、また血中グレリン濃度に関しては、持続的ではなく、一時的な上昇が自発運動が発動するのに重要であるということが明らかとなった。

自発運動によって脳内側坐核 (NAc) におけるドーパミン量の基礎値と食後レベルは著しく増強されたが、この変化は GKO マウスにおいては非常に小さいものであった。NAc に投射する腹側被蓋野 (VTA) のドーパミンニューロンでグレリン受容体 mRNA は高発現しているため、これらは摂餌行動に対するモチベーションを引き起こすグレリンの作用部位と考えられている¹²⁾。加えてグレリンは、摂食や食嗜好性などを含む脳内報酬経路に関与していることは良く知られている¹⁷⁾。また、自発活動量は摂食関連行動を表す重要な指標である。なぜなら、動物は食前に食物を探索し、狩猟する本能を備えているからだ。マウスではグレリンを第三脳室に直接投与した場合、自発活動量は増加する¹⁸⁾。このことから、グレリンは脳内報酬回路を介したモチベーション行動に対するイニシエーターであることが考えられる。

本研究では、GKO マウスにおいては自発活動量よりも回転カゴによる自発運動量が低下した。

GKO マウスではNAcにおけるドーパミンレベルは低下していることを考えると、脳内報酬系は自発運動のイニシエーターとしてのグレリンと何れかにおいて関連していると考えられる。本研究で示された、末梢で産生されたグレリンのような分子が中枢神経系に送られ、ドーパミンシステムを介した報酬回路へ働くという点は注目すべきことである。VTA へのグレリン直接投与は、ドーパミンの分泌や摂餌行動の動機付けと関連があることが示されてきたが¹⁵⁾、グレリンの腹腔内投与がVTAのドーパミンニューロンに作用することが可能であることを証明した論文は、ほとんどない。胃におけるグレリン産生は、空腹や摂食行動、または照明のオン・オフといった様々な（未だ明らかになっていない）条件に関連して、主に暗期の始まりに促進される。産生されたグレリンは中脳辺縁系に送られ、そこで脳内報酬回路が活性化され、自発運動のモチベーションを活性化した。この脳内報酬回路を介した、グレリンと運動モチベーションとの関連性は本研究の新たな成果である。

WT マウスでは暗期の始まりに認められる血中グレリン濃度の明らかなサージは中枢ドーパミンシステムを介しての摂餌行動の他に、自発運動の発動やモチベーションにおいて重要な役割を果たしており、グレリンもしくはグレリン類似物の末梢投与が、将来、肥満治療に応用されることが期待される。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました、公益財団法人石本記念スポーツ科学振興財団に深く感謝いたします。さらに、本研究を遂行するにあたり、ご協力して頂きました関係各位に深謝します。

文 献

- 1) Haskell-Luevano, C. et al., Voluntary exercise prevents the obese and diabetic metabolic syndrome of the melanocortin-4 receptor knockout mouse, *FASEB J.*, **23**, 642-655 (2009)
- 2) Patterson, C. M. & Levin, B. E., Role of exercise in the central regulation of energy homeostasis and in the prevention of obesity, *Neuroendocrinology*, **87**, 65-70 (2008)
- 3) Marcus, M. D. & Wildes, J. E., Disordered eating in obese individuals, *Curr. Opin. Psychiatry.*, **27**, 443-447 (2014)
- 4) Kojima, M. et al., Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature*, **402**, 656-660 (1999)
- 5) Nakazato, M. et al., A role for ghrelin in the central regulation of feeding, *Nature*, **409**, 194-198 (2001)
- 6) De Vriese, C., Perret, J. & Delpoite, C., Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis, *Nutrition*, **26**, 579-584 (2010)
- 7) Matsumura, K., Tsuchihashi, T., Fujii, K., Abe, I. & Iida, M., Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits, *Hypertension*, **40**, 694-699 (2002)
- 8) Tesauro, M., Schinzari, F., Caramanti, M., Lauro, R. & Cardillo, C., Cardiovascular and metabolic effects of ghrelin, *Curr. Diabetes. Rev.*, **6**, 228-235 (2010)
- 9) Gutierrez, J. A. et al., Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 6320-6325 (2008)
- 10) LeSauter, J., Hoque, N., Weintraub, M., Pfaff, D. W. & Silver, R., Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 13582-13587 (2009)
- 11) Phillips, P. E., Walton, M. E. & Jhou, T. C., Calculating utility: preclinical evidence for cost-benefit analysis by mesolimbic dopamine, *Psychopharmacology (Berl)* **191**, 483-495 (2007)
- 12) Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B. & Elmquist, J. K., Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain, *J. Comp. Neurol.*, **494**, 528-548 (2006)
- 13) Mifune, H. et al., Voluntary exercise contributed to an amelioration of abnormal feeding behavior, locomotor activity and ghrelin production concomitantly with a weight reduction in high fat

- diet-induced obese rats, *Peptides.*, **71**, 49-55 (2015)
- 14) Sato, T. et al., Ghrelin deficiency does not influence feeding performance, *Regul. Pept.*, **145**, 7-11 (2008)
 - 15) Kawahara, Y. et al., Food reward-sensitive interaction of ghrelin and opioid receptor pathways in mesolimbic dopamine system, *Neuropharmacology*, **67**, 395-402 (2013)
 - 16) Lowe, M. R. & Butryn, M. L., Hedonic hunger: a new dimension of appetite? *Physiol. Behav.*, **91**, 432-439 (2007)
 - 17) Menzies, J. R., Skibicka, K. P., Leng, G. & Dickson, S. L., Ghrelin, reward and motivation, *Endocr. Dev.*, **25**, 101-111 (2013)
 - 18) Jerlhag, E. et al., Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward, *Addict. Biol.*,