

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22126004

研究課題名（和文）摂食・エネルギー代謝調節に関わる摂食調節ペプチドの機能形態学的解析

研究課題名（英文）Morphofunctional analysis of regulation of feeding and energy metabolism by feeding regulating peptides

研究代表者

塩田 清二（SHIODA, SEIJI）

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80102375

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 68,000,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は摂食抑制神経ペプチドであるガラニン様ペプチド（GALP）に注目し、遺伝子改変動物を作成してGALP産生ニューロンの分布局在と求心路を調べた。視床下部弓状核にGALPニューロンは存在し、脳内の各部位から神経投射を受けている事が分かった。またGALPによる肝臓の脂質代謝系に与える影響も調べた。GALPの脳室内投与により肝臓中の脂肪酸酸化に關与する遺伝子発現が増加しメタボローム解析によりPalmitoyl carnitineが増加した。交感神経遮断薬の前投与によりこの変化が抑制された。GALPは点鼻投与により抗肥満作用を示し、交感神経系を介して肝臓及び脂肪組織での脂質代謝が亢進する事も分かった。

研究成果の概要（英文）：We studied a feeding inhibiting neuropeptide Galanin-like peptide (GALP) to identify distribution and localization and afferent neuronal input in brain by use of transgenic (Tg) mice. It appeared that GALP-containing neurons were localized in the hypothalamic arcuate nucleus by Tg mice which expressed GFP under the promoter of GALP gene. Also, GALP-containing neurons were innervated from several neurons distributed in both hypothalamic and extra-hypothalamic regions in mouse brain. We studied the effect of GALP on lipid metabolism in liver. After intraventricular infusion of GALP, the gene expression of several lipid metabolism-relating enzymes and also it appeared the increase of palmitoyl carnitine by a metabolome analysis. These findings were completely canceled by treatment of guanitidine which blocked the sympathetic nerve. These may indicate that GALP inhibits appetite through sympathetic nervous system and it also affects on lipid metabolism in liver and adipose tissue..

研究分野：医歯薬学

キーワード：接触調節 エネルギー代謝 機能形態学的解析 神経ネットワーク 遺伝子工学的的手法

## 1. 研究の背景

ここ10年間に摂食調節ペプチドが相次いで発見され、報告されている。近年脳内で見つかった摂食調節ペプチドの中には発現量が極めて低いにもかかわらず、摂食調節機構にとっては極めて重要な働きをしているものが多い。特にグレリンはその典型的なペプチドである。このような摂食調節ペプチド含有ニューロンを免疫染色によって可視化し、ニューロンネットワークを解明していくことは極めて困難である。そこで本計画研究の構想は、寒川、児島らの研究組織で新規に見出したペプチドの産生ニューロン特異的に緑色蛍光タンパク質(GFP)または順行性あるいは逆行性に軸索輸送が可能なGFPを過剰発現するトランスジェニックマウスを開発し、新規摂食ペプチド産生ニューロンの脳内分布・局在およびそのニューロンに対する遠心路および求心路を、緑色蛍光をトレースすることで神経解剖学的に解析し、中枢のニューロンネットワークを解明する。また内在性にトレーサーを発現するトランスジェニックマウスの開発は、生理学的な摂食調節機構解明や、臓器間神経ネットワークの解明につながる。

## 2. 研究の目的

脳における摂食やエネルギー代謝調節機構を明らかにすることは、食欲や脂肪蓄積の制御さらにはそれらの破綻の病因解明につながると考えられる。最近では中枢における神経ネットワークだけでなく、中枢と末梢間の神経ネットワークも重要視されつつあることから、本研究は従来の神経解剖学の常識を遥かに超えた神経ネットワーク解析の新技术と細胞内シグナル伝達機構解析の全く新しい技術を開発することを目的としている。摂食・エネルギー代謝に関与する新規リガンド産生ニューロンの求心路や遠心路、局在を解析する遺伝子間変動物の開発を目指し、神経による末梢臓器統御機構を解明する。さらにGPCR発現細胞中で細胞内CaとcAMPシグナルを時間的・空間的にも同時に測定し、2つのシグナルの時・空間的相互作用について解析する

系を開発する。この方法によって細胞内CaおよびcAMP濃度の変化の生理的意義の理解を深めることができる。遺伝子改変動物作製の技術や動物実験施設、顕微鏡、電顕レベルでの観察など、本研究に必要となる技術や経験は申請者の教室に存在する。また平成20年度からスタートした私立大学戦略的研究基盤形成支援事業によって共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーターなどの設備を整備した。申請者は、これまでにグレリン、ガラニン様ペプチドやニューロペプチドWなどの摂食調節ペプチドを産生するニューロン間の神経相関を顕微鏡あるいは電顕レベルで観察し、神経ネットワークを解明してきた。これまでの研究成果をもとに、本研究領域内で神経解剖学的に脳と末梢臓器間の神経ネットワークを解明することは、末梢臓器、特に脂肪組織の生理機能の制御における分子基盤の解明につながり、医学的にもインパクトのあるテーマとなる。新規摂食調節因子が関わる摂食調節のニューロンネットワークの入出力系が網羅的に解明できる。そして中枢神経系における複雑な摂食調節のネットワークのなかで新規摂食調節因子の位置づけが明らかとなる。また新規摂食調節因子を支配する神経核やニューロンが明らかになれば、食欲という漠然かつ複雑な現象の一端が解明できる。これはメタボリックシンドロームの根底にある肥満の成因につながる摂食障害(過食や拒食症)あるいは代謝異常の病因究明の手がかり、あるいは画期的な肥満の予防や治療への応用につながる可能性が高い。そしてこのCre-loxPシステムの確立は脳内に微量しかないが重要な生理作用を持つペプチドや、また特異的な抗体が作りにくいものの場合にも応用でき、ニューロンネットワーク解析において強力なツールとなる。さらに今回のloxP導入マウスをもちいれば、将来、Creを発現する遺伝子改変動物を作出し、loxPを導入した遺伝子改変動物と交配するだけで、迅速にニューロンネットワークの解析ができるようになり、遺伝子改変動物作出の多大な労力と時間、費用が少なくなる。細胞内シグナルと

cAMP シグナルを同時に画像変化として記録し、時間・空間動態を解析する。この研究を進めることによって、ニューロンモデルとしてのPC12細胞の2シグナル伝達系(カルシウムイオン濃度とcAMP濃度)の相互作用を時間・空間動態の変化として画像化することが可能となり、その生理的意義の理解を飛躍的に深めることができると考えられる。さらには生体内ニューロンの刺激-分泌連関の理解が深まり、シグナル伝達系の異常による摂食調節系のみならず他の神経疾患の病態解明につながると予測される。

### 3. 研究の方法

神経ネットワーク解析の新技法の開発

本計画研究ではタモキフェン誘導型Cre-loxPシステムを構築し、時・空間的に蛍光タンパク質やトレーサーを発現する系を構築する。DNA組換え酵素Creを導入した遺伝子改変動物と

loxP-Neo<sup>r</sup>-loxPカセットの下流に蛍光タンパク質(Venus)あるいはトレーサーcDNAを導入した遺伝子改変動物を作出する。Creを発現する遺伝子改変マウスを作出するために、新規摂食調節因子あるいは既存の摂食調節ペプチド(グレリン、NERP (NeuroEndocrine Regulatory Peptideなど) 遺伝子の遺伝子発現調節領域下流にDNA組換え酵素Creと変異エストロゲン受容体(ER)との融合タンパク質(CreER)をコードしているcDNAを結合させたトランスジーンを構築する。

-galactosidaseと破傷風毒素(TTC)の融合タンパク質は神経終末から取り込まれることが報告されている。この性質を応用して、Masckosらは緑色蛍光タンパク質とTTCの融合タンパク質(GFP-TTC)発現遺伝子改変(Tg)マウスを作出して、求心性ニューロンの同定法を報告している(Proc Natl Acad Sci USA. 2002 99(15): 10120-5)。

本研究ではCAGプロモーター-loxP-Neo<sup>r</sup>-loxP(CAG-LNL)カセットの下流に緑色蛍光タンパク質とTTCの融合タンパク質をコードしているcDNAを結合したトランスジーンを構築する。さらにアタキシンをCAG-LNLカセットの下流に結合

したトランスジーンを構築する。一方、緑色蛍光タンパク質と順行性トレーサーとの融合タンパク質は報告されていないので、本年度に遺伝子工学的に発現する系を開発する。

神経ネットワークの解析については、以前に構築したトランスジーンを微量注入し、新規摂食調節因子、グレリンあるいはNERP遺伝子の転写調節領域の制御下でCreERを発現している遺伝子改変マウスを作出する。またCAG-LNL-Venus、CAG-LNL-GFP-TTC融合タンパク質、CAG-LNL-ataxinを導入した遺伝子改変マウスを作製する。CreER発現マウスとCAG-LNL導入マウスを交配して、Cre-loxPシステムをもつダブルトランスジェニックマウスを作出する。そのダブルトランスジェニックマウスにタモキシフェンを投与し、Creを活性化し、loxP間で組換えを起こさせ、蛍光タンパク質、トレーサー、神経毒素を高発現させる。これらの蛍光タンパク質を検出、あるいはトレースすることで、既知および新規GPCRリガンド含有ニューロンの求心性神経支配ニューロンの起始部位を同定する。とくに本研究では、既知のリガンドとしてグレリンおよびNERP含有ニューロンの支配ニューロンを同定するとともに、新規GPCRリガンド含有ニューロンについても同様の実験・観察を行ない、摂食調節をおこなうニューロンネットワークを解明する。必要であれば、神経相関を電子顕微鏡レベルで調べ、ニューロン同士のシナプス形成を観察する。このニューロンネットワークの生理学的意義については、摂食調節ペプチドを脳室内に投与し、生理活性を調べた。

### 4. 研究成果

本研究は、脳内の摂食およびエネルギー代謝調節を制御するニューロンネットワークの神経解剖学的な解析を行うために新規の遺伝子工学的手法を開発し実現化することを目的として実験観察研究を行った。そのために遺伝子工学的手法を応用した神経ネットワークを解析する新技法と細胞内シグナル伝達機構解析の新しい技術を開発し、摂食・エネルギー代謝に関するリガンド

産生ニューロンの分布・局在、求心路や遠心路を同定し、脳内のみならず脳-末梢臓器間の神経ネットワークを解明することも行った。また脳と末梢臓器間の神経ネットワークを解明することにより、末梢臓器、特に脂肪組織の生理機能の制御の分子基盤の解明も行なうことを目的として研究を行った。

初年度は、計画実施期間が極めて短いために、十分な研究成果をあげるまでに至っていなかったが、2年目および3年目には遺伝子改変動物を作成して形態解析まで行なうことができた。ただその動物は繁殖力が弱く、生理実験を行なうまでの個体数を十分に与えることができなかった。実験としては、まず最初にタモキシフェン誘導型 Cre-loxPシステムを構築し、時・空間的に蛍光タンパク質やトレーサーを発現する系を構築するために以下の実験を行なった。既存の摂食調節ペプチド(グレリン、NERP: NeuroEndocrine Regulatory Peptide)およびSF-1遺伝子の遺伝子発現調節領域下流にDNA組換え酵素Creと変異エストロゲン受容体(ER)との融合タンパク質(CreER)をコードしているcDNAを結合させたトランスジーンを構築した。β-galactosidase と破傷風毒素(TTC)の融合タンパク質は神経終末から取り込まれることが報告されていることから、緑色蛍光タンパク質とTTCの融合タンパク質(GFP-TTC)をコードしているcDNAをCAGプロモーター-loxP-Neor-loxP(CAG-LNL)カセットの下流に結合したトランスジーンを構築することに成功した。さらに、トランスジーンを受精卵に微量注入し、遺伝子改変マウスを作成して動物をえたので脳内のニューロンネットワーク解析につながる研究を行った。とくにグレリンの脳内における産生部位については不明であったが、本研究によってグレリンの遺伝子発現が視床下部の弓状核のみに限定して発現することを世界に先駆けて我々の研究チームが発表した。これにより脳内におけるグレリンのニューロンネットワーク解析が飛躍的にすすみ、脳内のグレリンニューロンの理解が進んだ。

食欲や脂肪蓄積の制御を明らかにするためには、脳内の摂食およびエネルギー代謝調節を統御するニューロンネットワークの神経解剖学的な解析が必須である。さらに脳と末梢臓器間の神経ネットワークを解明することは末梢臓器の生理機能の制御の分子基盤の解明につながる。摂食・エネルギー代謝に関与するリガンド産生細胞の分布・局在、求心路や遠心路を同定し、脳内のみならず脳-末梢臓器間のネットワークの解明を行なうことを目的として研究を行った。ガラニン様ペプチド(GALP)は摂食調節とエネルギー代謝にかかわるペプチドである。タモキシフェン誘導型Cre-loxPシステムを利用した時・空間的にガラクトシダーゼを発現する遺伝子改変動物をもちいてGALP産生ニューロンの分布局在を同定した。これまでラットにおいてGALPニューロンは視床下部弓状核に局在していることが報告されているが、今回我々のマウスを用いた抗EGFP抗体による蛍光染色およびβ-ガラクトシダーゼ反応アッセイによる観察結果より、GALP産生のマーカーとなるβ-ガラクトシダーゼ反応を嗅球の僧帽細胞層、梨状葉、室傍核、弓状核、海馬、青斑核に認めた。また、視床下部室傍核、弓状核、小脳、中隔、内側視索前野のニューロンがGALPニューロンの神経支配受けることが示唆された。

さらに、GALPの生理学的検討として、脳室内投与後の酸素消費量、発熱量および呼吸商の経時的観察を行い、GALP投与約2時間で呼吸商の低下を認め、肝臓における脂肪酸合成系遺伝子発現の減少および脂肪酸酸化関連遺伝子発現についてメタボローム解析を行い脂質代謝および胆汁酸やコレステロールトランスポーターなどの遺伝子発現を網羅的に遺伝子解析を行った。その結果、パルミチン酸など脂質代謝を肝臓内で促進することが分かり、さらに肥満動物を用いたGALP投与によって摂食量の減少及び体重減少が顕著におきるが、その作用機序の一つとして肝臓での脂質代謝亢進機構の存在が今回の研究で明らかとなった。

さらに我々はセルキーシステム(CellKey™ System; モレキュラーデバイス)を用いて GALP 刺激時の細胞内シグナルの変動の時間・空間動態解析を行った。原理的には、培養細胞に交流電流を流し、インピーダンスの変化を経時的に測定することで GALP 刺激時の細胞のシグナル伝達を解析した。これにより GALP は摂食促進ニューロンの NPY を抑制し、摂食抑制ニューロンの POMC ニューロンを興奮させること、さらに細胞内シグナル伝達については Gi 系を介する系であることが分かった。また他の神経ペプチドである NPW が視床下部の CRH の不死化培養神経細胞を用いた実験で Gi 系を介した細胞内シグナル伝達機構の存在が明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Kageyama H, et al, Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. Neuropeptides 44. 133-138(2010)、査読有

Shiba K, et al, Galanin-like peptide and the regulation of feeding behavior and energy metabolism. FEBSJ277. 5006-5013(2010)、査読有

Date Y, et al, Neuropeptide W: An Anorectic Peptide Regulated by Leptin and Metabolic State. Endocrinology 151. 2200-2210(2010)、査読有

Yamazaki S, et al, Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche Cell147. 1146-1158, (2011)、査読有

Takenoya F, Neuropeptide w. Front Endocrinol(Lausanne)、査読有、3 巻、2012、171  
DOI:10.3389/fendo.2012.00171

Kageyama H, Neuronal circuits involving neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus-mediated feeding regulation. Neuropeptides、査読有、46 巻、2012、285-289  
DOI:10.1016/j.npep.2012.09.007

塩田清二・竹ノ谷文子・影山晴秋、視床下部弓状核、腹内側核の摂食調節ニューロンの機能形態、肥満研究、査読有、19 巻、2013、29-38  
DOI:なし

Ito K,Kageyama H,Hirako S,Wang L,Takenoya F,Ogawa T,Shioda S, Interactive effect of galanin-like peptide(GALP) and spontaneous exercise on energy metabolism. Peptides、査読有、49 巻、2013、109-116  
DOI:10.1016/j.peptides.2013.09.003

Izumida Y,Yahagi N,Takeuchi Y,Nishi M,Shikama A,Takarada A,Masuda Y,Kubota M,Matsuzaka T,Nakagawa Y,Iizuka Y,Itaka K,Kataoka K,Shioda S,Niijima A,Yamada T,Katagiri R,Nagai R,Yamada N,Kadowaki T,Shimano H, Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. Nat Commun、査読有、4 巻、2013、2316-2316  
DOI:10.1038/ncomms3316

Suzuki Y,Shimizu H,Ishizuka N,Kubota N,Kubota T,Senoo A,Kageyama H,Osaka T,Hirako S,Kim HJ,Matsumoto A,Shioda S,Mori M,Kadowaki T,Inoue S, Vagal hyperactivity due to ventromedial hypothalamic lesions increases adiponectin production and release. Diabetes、査読有、63(5)巻、2014、1637-1648  
DOI:10.2337/db13-0636

Wada N,Hirako S,Takenoya F,Kageyama H,Okabe M,Shioda S, Leptin and its receptors. J Chem Neuroanat、査読有、61-62 巻、2014、191-199  
DOI:0.1016/j.jchemneu.

[学会発表](計 13 件)

影山晴秋・塩田清二・他、摂食調節ペプチド GALP による肥満克服の新戦略、第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会、(20110328)、横浜

竹ノ谷文子・他、Effect of intranasal infusion of GALP(galanin-like peptide) on feeding and body weight regulation、16<sup>th</sup> Annual Congress of the European College of Sport Science.(20110709).Liverpool、UK

影山晴秋・他、Anti-obese effect of intranasal infusion of GALP in obese mice、Satellite Symposium of the 20<sup>th</sup> Annual Meeting of The Israel Society for Neuroscience~Basic and Clinical Research of GPCRs~.(20111213)、Eilat、Israel

竹ノ谷文子・他、Effect of neuropeptide W(NPW) on feeding regulation with voluntary exercise、Satellite Symposium of the 20<sup>th</sup> Annual Meeting of The Israel Society for Neuroscience ~ Basic and Clinical Research of GPCRs ~ .(20111213)、Eilat、Israel

塩田清二、GALP による抗肥満の臨床応用に向けた基礎研究、第 27 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2013 年 02 月 22 日 ~ 2013 年 02 月 23 日、東京

竹ノ谷文子、ニューロペプチド W(NPW)の CRH を介した摂食抑制作用について、第 27 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2013 年 02 月 22 日 ~ 2013 年 02 月 23 日、東京

平子哲史、肝臓脂質代謝に及ぼすガラニン様ペプチド(GALP)の影響、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 03 月 28 日 ~ 2013 年 03 月 30 日、香川

平子哲史・影山晴秋・竹ノ谷文子・太田英司・和田亘弘・塩田清二、ガラニン様ペプチド(GALP)による交感神経を介した肝臓脂質代謝調節作用、第 18 回アディポサイエンスシンポジウム、2013 年 08 月 24 日 ~ 2013 年 08 月 24 日、大阪

平子哲史・影山晴秋・竹ノ谷文子・太田英司・和田亘弘・塩田清二、ガラニン様ペプチド(GALP)投与による肥満症軽減メカニズムの解明、第 34 回日本肥満学会、2013 年 10 月 11 日 ~ 2013 年 10 月 12 日、東京

Hirako S、Kageyama H、Takenoya F、Ota E、Wada N、Shioda S、Galanin-like peptide(GALP): a key player in the regulation of feeding and energy metabolism.、Galanin SFN pre-meeting 2013、2013 年 11 月 08 日 ~ 2013 年 11 月 09 日、San Diedo, CA

Takenoya F、Kageyama H、Hirako S、Ota E、Wada N、Yamamoto N、Ryushi T、Shioda S、Neuropeptide W induced hypophagia is mediated via a CRH neurons.、43st Annual meeting Society for Neuroscience、2013 年 11 月 09 日 ~ 2013 年 11 月 13 日、San Diedo, CA

Hirako S、Kageyama H、Takenoya F、Ota E、Wada N、Shioda S、Galanin-like peptide(GALP) have anti-obesity effect via the activation of hepatic lipid metabolism.、The 2014 obesity summit、2014 年 04 月 01 日 ~ 2014 年 04 月 03 日、London, UK

Takenoya F、Kageyama H、Hirako S、Ota E、Wada N、Yamamoto N、Ryushi T、Shioda S、Interactive effect galanin-like peptide(GALP) and spontaneous exercise on energy metabolism.、19th Annual Congress of the ECSS、2014 年 07 月 02 日 ~ 2014 年 07 月 05 日、Amsterdam, Netherland

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩田 清二 (SIODA, Seizi)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：80102375

### (2) 研究分担者

影山 晴秋 (KAGEYAMA, Haruaki)

桐生大学・医療保健学部・准教授

研究者番号：00433839

柴 加奈子 (SIBA, Kanako)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：40551263

竹ノ谷 文子 (TAKENOYA, Fumiko)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30234412

姜 奇成 (KAN, Kison)

昭和大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：80613083

小川 哲夫 (OGAWA, Tetuo)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：60384210

太田 英司 (OOTA, Eizi)

昭和大学・医学部・歯学部

研究者番号：10644263

平子 哲史 (HIRAKO, Satoshi)

昭和大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：90644261

和田 亘弘 (WADA, Nobuhiko)

昭和大学・医学部・普通研究生

研究者番号：30724661