

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11054

研究課題名(和文)末梢由来GALPを中心とした臓器間代謝ネットワーク制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on metabolic network between organs via peripheral GALP

研究代表者

平子 哲史(Hirako, Satoshi)

人間総合科学大学・人間科学部・講師(移行)

研究者番号：90644261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ガラニン様ペプチド(GALP)は、視床下部弓状核ニューロンで産生される神経ペプチドである。我々はGALPの末梢臓器への影響を調べる目的で、in vitroの系にて検討した。マウス初代培養肝細胞にGALP添加後の遺伝子発現をReal-time PCR法を用いて検討した結果、脂肪酸合成に関与する遺伝子発現および脂肪酸酸化に関与する遺伝子発現はGALP投与による影響はみられなかった。GALPを脳室内投与した場合、肝臓の脂肪酸酸化が亢進したが、今回は異なる結果となった。代謝に及ぼす影響はGALPが標的臓器に直接作用するのではなく、神経など他の経路を介していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではGALPによる末梢臓器への直接作用の影響を検討した。これまでの研究では脳室内投与や点鼻投与による研究が主であり、末梢組織由来のGALPに着目した研究はなかった。本研究により末梢に直接作用したGALPのエネルギー代謝への作用の一部が解明されたことにより、今後神経ペプチドGALPを中心とした全身性の代謝制御機構の理解が深まることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Galanin-like peptide (GALP) is a neuropeptide produced in the arcuate nucleus of the hypothalamus. We investigated the effect of GALP on the intracellular metabolic pathway directly in an in vitro system in order to investigate the effect of GALP on peripheral organs. As a result of examining the gene expression after GALP addition to primary cultured mouse hepatocytes using the real-time PCR method, the gene expression involved in fatty acid synthesis and fatty acid -oxidation was not affected by the addition of GALP. Intracerebroventricular administration of GALP increased hepatic fatty acid -oxidation, but the results in this study are different. It was suggested that the effect of GALP on metabolism does not act directly on the target organ, but through other pathways such as nerves.

研究分野：栄養学および健康科学関連

キーワード：GALP エネルギー代謝 肥満

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ガラニン様ペプチド(GALP)は、視床下部弓状核ニューロンで産生される神経ペプチドであり、我々は主に形態学的手法によりこのペプチド含有ニューロンの分布・局在などを明らかにしてきた。また、GALPには摂食抑制作用がある事が知られているが、すでに様々な生理作用がある事もわかっている。そのひとつに抗肥満作用があることが知られており、我々は脳室内投与されたGALPが交感神経を介して肝臓での脂肪酸β酸化および白色脂肪組織での脂肪分解を増加させる事を明らかにした。加えてはタモキシフェン誘導型Cre-loxPシステムを利用した時・空間的に黄色蛍光たんぱく質を発現する遺伝子改変動物を用いてGALP産生細胞の分布局在を同定した。その結果、これまでGALP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、白色脂肪組織にも強く発現していることが明らかとなった。また、qPCR法およびwestern blot法によってもGALPは白色脂肪組織に高発現していることを明らかにした。さらに、GALPを静脈内投与したところ、交感神経系が活性化されることに加え、求心性迷走神経肝枝、胃枝の活性を抑制した。一連の結果からGALPは末梢組織でも産生され、循環血液中に存在することを見出した。

### 2. 研究の目的

GALPの末梢臓器への影響を調べる目的で、株化細胞株を用いた *in vitro* の系にて GALP そのものによる細胞内代謝経路に及ぼす影響について検討した。

### 3. 研究の方法

はじめに株化細胞にて GALP をアデノウイルスベクターによって一過性に強制発現させる系を構築し、その影響について検討することを目的とし検討を行った。まず、マウス GALP の発現レベルの高い視床下部領域から GALP 全長をクローニングした。クローニングした GALP 遺伝子配列を確認し、Gateway システムによるプラスミドからアデノウイルスベクターへと相同組み換えを起こす目的で、エントリーベクターへと組み換えた。その後、クローナーゼ反応にてデスティネーションベクターへと相同組み換えを起こし、HEK293 細胞へと遺伝子導入後、アデノウイルスを作製した。アデノウイルスの精製は塩化セシウムによる濃度勾配を利用した遠心法により調製し、実験に使用した。HEK293 細胞へとアデノウイルスベクターによる遺伝子導入を行ったが、期待されたウイルスの力価が得られなかった。遺伝子導入試薬も複数種類試したが一様に成果が得られず、*in vitro* レベルでも実験を行うのに十分な量を確保することに難航したため、ウイルスベクターの使用を断念した。

続いて、マウス肝臓を用いた初代培養肝細胞を用いて GALP 添加による糖・脂質代謝への影響について解析を行った。8 週齢の雄性マウスを深麻酔し、門脈からコラゲナーゼ溶液を灌流後に、肝細胞を単離した。12well プレート 1 ウェル辺りに単離した肝細胞を  $2.0 \times 10^5$  個ずつ播種し、24 時間の培養後に実験に使用した。細胞に添加した GALP(Phoenix 社)は滅菌水に溶解し、終濃度  $1\mu\text{M}$  になるように各ウェルに添加し、1 及び 3 時間後に細胞を回収し遺伝子発現解析に供した。

### 4. 研究成果

マウス初代培養肝細胞に GALP 添加後の遺伝子発現を Real-time PCR 法を用いて検討した結果、GalR3 遺伝子発現が vehicle 群と比較しおよそ 1.5 倍増加した。しかし、脂肪酸合成に關与する FAS、SCD1 遺伝子発現および脂肪酸 β 酸化に關与する CPT1、MCAD や転写因子である PPARα 遺伝子発現は GALP 投与による影響はみられなかった。GALP を脳室内投与した場合、肝臓の脂肪酸 β 酸化が亢進したが、今回は異なる結果となった。

これまでに、遺伝子改変マウスを用い褐色脂肪組織や白色脂肪組織で GALP が産生されることを見出した。また、血中に GALP が存在することも報告されており、末梢で GALP が産生され分布しているが、代謝に及ぼす影響は GALP が標的臓器に直接作用するのではなく、神経など他の経路を介していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iizuka Y, Chiba K, Kim H, Hirako S, Wada M, Matsumoto A.	4. 巻 76
2. 論文標題 Impact of discontinuation of fish oil after pioglitazone-fish oil combination therapy in diabetic KK mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nutr Biochem.	6. 最初と最後の頁 108265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jnutbio.2019.108265.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takenoya F, Hirako S, Wada N, Nonaka N, Hirabayashi T, Kageyama H, Shioda S.	4. 巻 24
2. 論文標題 Regulation of Feeding Behavior and Energy Metabolism by Galanin-like Peptide (GALP): A Novel Strategy to Fight Against Obesity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Pharm Des.	6. 最初と最後の頁 3926-3933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1381612824666181106111623.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iizuka Y, Kim H, Hirako S, Chiba K, Wada M, Matsumoto A.	4. 巻 26
2. 論文標題 A. Benefits of combination low-dose pioglitazone plus fish oil on aged type 2 diabetes mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Food Drug Anal.	6. 最初と最後の頁 1265-1274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jfda.2018.05.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平子哲史、金賢珠、飯塚穰、松本明世
2. 発表標題 KKマウスへの高コレステロール食給餌による肝臓への脂質蓄積を抑制する魚油の作用
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平子哲史、和田亘弘、影山晴秋、竹ノ谷文子、塩田清二
2. 発表標題 神経ペプチドGALPの点鼻投与による抗肥満作用の検討
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirako S, Wada N, Kageyama H, Takaenoya F, Shioda S.
2. 発表標題 Intranasal administration of GALP reduces body weight and hepatic lipids accumulation.
3. 学会等名 26th European Congress on Obesity. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平子哲史、和田亘弘、影山晴秋、竹ノ谷文子、塩田清二.
2. 発表標題 抗肥満ペプチドGALPによる末梢組織でのエネルギー代謝調節の解明
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平子哲史、和田亘弘、影山晴秋、竹ノ谷文子、塩田清二.
2. 発表標題 神経ペプチドGALPによる末梢組織での糖・脂質代謝への影響
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	竹ノ谷 文子  (Takenoya Fumiko)  (30234412)	星薬科大学・薬学部・准教授   (32676)	
研究 分担者	塩田 清二  (Shioda Seiji)  (80102375)	星薬科大学・先端生命科学研究所・教授   (32676)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------