

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19743

研究課題名(和文)サルコペニア肥満モデル動物の確立と病態解明

研究課題名(英文) Establishment of sarcopenia obesity-model animal and elucidation of its pathophysiology

研究代表者

浮穴 和義 (Ukena, Kazuyoshi)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・教授

研究者番号：10304370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、視床下部から新規分泌性小タンパク質NPGLを発見している。NPGLは摂食行動の亢進や白色脂肪組織における脂肪蓄積を生じさせるが、骨格筋量を減少させることがわかった。近年、脂肪が増えるが筋肉が減少するサルコペニア肥満が注目されている。したがって、本研究課題では、NPGLの作用を亢進することで、サルコペニア肥満様状態を呈するモデル動物の産出が可能であると考え研究を行った。マウスやラットを用い、NPGL遺伝子過剰発現やNPGL投与を行った結果、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて過剰発現をさせたラットがサルコペニア様モデル動物として適していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、筋肉量の減少(サルコペニア)と肥満が組み合わさった状態であるサルコペニア肥満の増加が問題となっている。我々が独自に見出した因子であるNPGLの作用を亢進した動物は、短期間でサルコペニア肥満を模倣している可能性あり、これまで未解明であったサルコペニア肥満の病態解明を行う上で貴重なモデル動物に成り得ると考えている。そのため、リハビリテーション科学、スポーツ科学、体育、栄養学、健康科学の幅広い分野において重要な科学的知見を加える可能性を示すことができたことから、学術的及び社会的意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：We have discovered a novel secretory small protein, NPGL, in the hypothalamus. It has been found that NPGL stimulates feeding behavior and induces fat accumulation in the white adipose tissue, although the weight gain is not remarkable, and the cause is a decrease in bone length and the mass of skeletal muscle. Recently, attention has been focused on sarcopenia obesity, which increases fat and decreases muscle. Therefore, in this research, we considered that it is possible to produce model animals exhibiting sarcopenia obesity-like state by effectively utilizing the physiological function of NPGL. As a result of various NPGL gene overexpression and NPGL administration using mice and rats, it was found that rats overexpressed using an adeno-associated virus vector are suitable as sarcopenia-like model animals.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：視床下部 小タンパク質 脂肪蓄積 筋肉

1. 研究開始当初の背景

筋肉量の減少(サルコペニア)は、運動不足、怪我や入院、加齢に伴い生じ、運動機能に影響を及ぼすため、ロコモティブシンドロームの原因と考えられる。科学技術の進歩により「歩くこと」の頻度が減少した現代社会における筋肉量の維持は、リハビリテーション科学やスポーツ科学において重要課題である。一方、世界中に蔓延している肥満は、高脂血症、糖尿病、高血圧症などの生活習慣病や膝関節症等のリスクを高めるため、近年、メタリックシンドローム対策が叫ばれている。肥満の原因となる過食や脂肪蓄積メカニズムに関して、栄養学、健康科学、神経科学、内分泌代謝学などの分野において様々な知見が集積されてきているが、肥満解決には至っていない。特に、加齢に伴う肥満の原因や継時的変化の実態は、不明な点が多い。近年、サルコペニアと肥満が組み合わさった状態であるサルコペニア肥満の増加が問題となっている。サルコペニア肥満はメタリックシンドロームよりも健康への危険度が高く、高血圧のリスクが2倍、糖尿病のリスクは20倍程度と言われている。サルコペニア肥満の原因は、加齢、栄養学的に偏ったダイエット、運動不足などが指摘されているものの、不明なことが多い。筋力の低下は転倒骨折や寝たきりに繋がるため、サルコペニア肥満の発症や実態解明へ向けた研究は、老齢期のQOLの向上や健康長寿の延伸に向け、早期の着手と遂行が必要である。また、これまでサルコペニア肥満モデル動物の報告は殆ど無く、動物実験が活発に行えなかったことも研究の進展を阻んでいる要因である。

我々は、鳥類の間脳視床下部に特異的に発現している遺伝子の探索から、80アミノ酸残基からなる分泌性の小タンパク質(長鎖ペプチド)をコードする新規の遺伝子を最近発見している。また、この遺伝子は、我々ヒトを含めた脊椎動物に広く存在していることも見出している。この小タンパク質をC末端部分の配列の特徴から neurosecretory protein GL(NPGL)と命名した。ラットにおけるNPGLの脳室内投与や前駆体遺伝子の過剰発現の解析から、白色脂肪組織での脂肪蓄積に加え、骨格筋重量の減少を引き起こし、サルコペニア肥満様状態を生じさせることを見出している。

2. 研究の目的

以上の背景から、NPGLの作用を過剰にした動物は、短期間でサルコペニア肥満を模倣するモデル動物としての利用が期待できる。そのため本研究の目的は、我々が発見した新規脳因子であるNPGLの生理作用を有効に活用することで、我々ヒトのサルコペニア肥満を模倣するモデル動物として利用可能なシステムを確立することである。そのために、哺乳類モデル動物のマウスとラットを用い、NPGL作用を亢進させることでサルコペニア肥満様状態を作り出せるかどうかを検討した。

加齢の過程において様々な要因を伴い発症するサルコペニア肥満は、「筋肉量の減少と脂肪量の増加」という表現型であり、野生動物ではほぼ発症せず、ヒト特有の疾患の一つと言える。上述の通り、現代社会において本疾患の理解、予防、改善が注目されているが、未だ「サルコペニア肥満モデル動物」は殆ど確立されていない。本研究課題では、新規脳因子の作用を利用してサルコペニア肥満モデル動物の確立と病態解析を目指すものであり、これまでの学術の体系や方向を大きく変革、転換させる潜在性を有する挑戦的研究である。さらに、新規脳因子は最近になって我々が発見したものであるため、芽生え期の研究計画であると言える。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウスによる表現型解析

ユビキタス発現を可能にするCMVプロモーターの下流にNPGL遺伝子を連結したベクターをICR系統マウスの受精卵に注入し、NPGL遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。摂食量、体重、脂肪組織重量、筋肉重量、骨長等を測定し、表現型を解析した。

(2) NPGL産生細胞特異的活性化マウスによる表現型解析

NPGL遺伝子の下流にDNA組換え酵素Creリコンビナーゼ遺伝子をノックインしたC57BL/6マウスを作製し、DREADDシステムによりNPGL産生細胞特異的に活性化させた。摂食量、体重、脂肪組織重量、筋肉重量等を測定し、表現型を解析した。

(3) アデノ随伴ウイルスを用いたNPGL遺伝子過剰発現マウスによる表現型解析

上記(1)のトランスジェニックマウス作製に用いたベクターをアデノ随伴ウイルスにてC57BL/6マウスの視床下部領域に感染させ、NPGL遺伝子過剰発現マウスを作製した。摂食量、体重、脂肪組織重量、筋肉重量、骨長等を測定し、表現型を解析した。

また、ヒトのサルコペニア肥満では抑うつなどの気分障害も併発することが知られているため、行動薬理的評価を行った。具体的には、NPGL遺伝子過剰発現マウスにうつ様状態を誘発するリポ多糖(LPS)を腹腔内投与し、オープンフィールドテストや強制水泳テストを実施することで、うつ病様行動にNPGLが関与しているかどうかを検討した。

(4) 浸透圧ポンプを用いた NPGL 脳室内慢性投与マウスによる表現型解析

上記の(1)~(3)までの解析では、NPGL 遺伝子の過剰発現や NPGL 産生細胞を活性化させるマウスによる解析であったが、小タンパク質である NPGL そのものを浸透圧ポンプを用いて脳室内に慢性投与し、表現型を解析した。具体的には、摂食量、体重、脂肪組織重量、筋肉重量、骨長等を測定し、表現型を解析した。

(5) ラットを用いた NPGL 脳室内慢性投与及び NPGL 遺伝子過剰発現による表現型解析

上記のマウスを用いた解析と並行して、先行研究で確立している NPGL 投与・遺伝子過剰発現ラットを用い、骨長や筋肉量に与える影響を解析し、サルコペニア肥満様状態になる作用機序を解析した。

4. 研究成果

(1) トランスジェニックマウスによる表現型解析

NPGL 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、普通食給餌条件下での表現型解析を行ったところ、摂食量に変化は認められなかったが、26 週齢のマウスでは有意に体重が増加した。体重増加の原因は、白色脂肪重量がコントロール群と比べて 3 倍ほど増加したためであることが分かった。この時、筋肉量及び大腿骨長には影響が認められなかった。したがって、本 NPGL トランスジェニックマウスはサルコペニア肥満様モデル動物としては使用できない可能性が示唆された。さらに高脂肪食等の給餌条件下での解析を行おうとしたが、継代を重ねるうちに脂肪蓄積の表現型が認められにくくなり、途中で解析を中断せざるを得なくなった。

(2) NPGL 細胞特異的活性化マウスによる表現型解析

DREADD システムにより NPGL 産生細胞を時期特異的に活性化し、普通食給餌条件下での表現型解析を行った。その結果、摂食量、体重、脂肪組織重量、筋肉量に有意な変化は認められなかった。新型コロナウイルス感染症の影響により、途中、研究中断を余儀なくされ Cre マウスの作出や繁殖が大幅に遅れたため、今後は高カロリー食給餌条件下での実験を進めていく予定である。

(3) アデノ随伴ウイルスを用いた NPGL 遺伝子過剰発現マウスによる表現型解析

本研究手法は、先行研究によりラットで確立しており、その解析手法に基づいて実験を進めた。普通食・高カロリー食給餌条件下のどちらでも過食により早期に肥満を呈することを見出したが、筋肉量や骨長に対する有意な影響は認められなかった。

一方、ヒトのサルコペニア肥満ではうつ病等の気分障害の発症が高いことが知られており、本 NPGL 遺伝子過剰発現マウスに LPS を投与し、うつ病様状態にし、オープンフィールドテストと強制水泳テストを行い、NPGL のうつ病様行動への影響を解析した。その結果、コントロール群のマウスと比較して有意な差は認められず、NPGL がうつ病様行動へ関与している可能性は低いと判断した。

(4) 浸透圧ポンプを用いた NPGL 脳室内慢性投与マウスによる表現型解析

本研究手法も、先行研究によりラットで確立できている。そこで、普通食・高カロリー食給餌条件下で NPGL の脳室内慢性投与を行い、表現型を解析した。その結果、どちらの給餌条件下でも白色脂肪組織重量の増加が認められ、さらに、高カロリー食給餌により過食が生じることを見出した。一方、高カロリー食給餌条件下で筋肉重量の有意な低下が認められた。この結果から、高カロリー食給餌下で NPGL を脳室内慢性投与した C57BL/6 マウスは、サルコペニア肥満様モデル動物として利用できる可能性が高いと考えられる。

(5) ラットを用いた NPGL 脳室内慢性投与及び NPGL 遺伝子過剰発現による表現型解析

ラットを用いた先行研究から、普通食給餌下での NPGL の脳室内慢性投与により、体重減少作用が顕著に生じることを見出している。そこで、高脂肪食、高ショ糖食、中程度脂肪・ショ糖食、マクロ栄養素食を用い、NPGL 脳室内慢性投与ラットにおける体重増加量と骨長への影響を解析した。その結果、普通食給餌下で認められた体重増加抑制作用はどの飼料摂餌下でも認められなかったものの、体重増加量を摂食量で割った飼料効率については、マクロ栄養素飼料給餌以外では低下していた。このことは、高脂肪食、高ショ糖食、中程度脂肪・ショ糖食の給餌下では、摂食量が増えたとしてもそれが体重増加に結び付いていないことを意味していると考えた。特に、高脂肪食給餌下では NPGL 投与により骨長が有意に低下していることを見出した。これまでに NPGL は脂肪組織での de novo 脂肪合成により脂肪が蓄積することを見出している。高脂肪食には de novo 脂肪合成のための基質である炭水化物が十分に含まれておらず、少ない炭水化物を脂肪合成に回した結果、骨長の成長低下に結びついたものと考えられる。一方、マクロ栄養素飼料給餌下では、動物が成長遅延を生じないように適度な栄養素を摂取し、飼料効率を回復させる能力が発揮されたものと考えられる。

NPGL 遺伝子過剰発現ラットを用い、脂肪蓄積と筋肉重量の減少が生じることを再度確認し、その際の脳下垂体ホルモンレベル及び血中ホルモンレベルを解析した。NPGL は成長ホルモン

の合成・分泌の抑制を介して、脂肪分解の阻害、骨と筋肉の成長を抑制していると仮説を立てた。しかしながら、脳下垂体中の成長ホルモン mRNA 量及び血中成長ホルモンレベル、さらに、インスリン様成長因子(IGF-1)の血中レベルにも変化は認められなかった。本研究により、NPGLの脂肪蓄積・骨と筋肉の成長抑制作用は、成長ホルモンの作用とは独立して生じていることが示唆された。

本研究の遂行により、NPGL の作用を利用して肥満と筋肉重量の低下の状態を併せ持つサルコペニア肥満様モデル動物の確立を目指した。その結果、上述の通り、NPGL 脳室内慢性投与マウスと NPGL 遺伝子過剰発現ラットにおいて肥満と筋肉重量の低下が認められた。特に NPGL 遺伝子過剰発現ラットは隠れ肥満状態を示すことが顕著である。また、給餌する餌との組み合わせにより、表現型の強度が異なることも示された。今後、老化に伴う表現型を解析することで、サルコペニア肥満の発症メカニズムの詳細な解析が可能になるとと思われる。

サルコペニア肥満や加齢に伴う中年太りは、ヒトでは長い年月や生活習慣と共に進行する現象であり、げっ歯類の実験動物レベルでの模倣は難しいと思われてきた。本研究では、NPGL 作用を亢進した動物がサルコペニア肥満様モデル動物として利用できる可能性を示すことができた。したがって、本研究成果は萌芽的な研究として、学術的、社会的、医科学的にも重要な知見を示すことができたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Fukumura Keisuke, Shikano Kenshiro, Narimatsu Yuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Furumitsu Megumi, Naito Mana, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 85
2. 論文標題 Effects of neurosecretory protein GL on food intake and fat accumulation under different dietary nutrient compositions in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1514 ~ 1520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab064	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 Fukumura Keisuke, Narimatsu Yuki, Moriwaki Shogo, Iwakoshi-Ukena Eiko, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effects of Overexpression of Neurosecretory Protein GL-Precursor Gene on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4681 ~ 4681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22094681	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 -
1. 著者名 Narimatsu Yuki, Fukumura Keisuke, Iwakoshi-Ukena Eiko, Mimura Ayaka, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Subcutaneous infusion of neurosecretory protein GL promotes fat accumulation in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e07502 ~ e07502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e07502	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 -
1. 著者名 Narimatsu Yuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Fukumura Keisuke, Shikano Kenshiro, Furumitsu Megumi, Morishita Masahiro, Bentley George E., Kriegsfeld Lance J., Ukena Kazuyoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Hypothalamic Overexpression of Neurosecretory Protein GL Leads to Obesity in Male C57BL/6J Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000518969	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 該当する

1. 著者名 Fukumura Keisuke, Narimatsu Yuki, Moriwaki Shogo, Iwakoshi-Ukena Eiko, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Overexpression of the Gene Encoding Neurosecretory Protein GL Precursor Prevents Excessive Fat Accumulation in the Adipose Tissue of Mice Fed a Long-Term High-Fat Diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 6006 ~ 6006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26196006	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 -

1. 著者名 Naito Mana, Iwakoshi-Ukena Eiko, Moriwaki Shogo, Narimatsu Yuki, Kato Masaki, Furumitsu Megumi, Miyamoto Yuta, Esumi Shigeyuki, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Immunohistochemical Analysis of Neurotransmitters in Neurosecretory Protein GL-Producing Neurons of the Mouse Hypothalamus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 454 ~ 454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10020454	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 -

1. 著者名 Narimatsu Yuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Naito Mana, Moriwaki Shogo, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Neurosecretory Protein GL Accelerates Liver Steatosis in Mice Fed Medium-Fat/Medium-Fructose Diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2071 ~ 2071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042071	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 -

1. 著者名 Shikano K, Iwakoshi-Ukena E, Saito T, Narimatsu Y, Kadota A, Furumitsu M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K.	4. 巻 244
2. 論文標題 Neurosecretory protein GL induces fat accumulation in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Endocrinol.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0112.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福村圭介、成松勇樹、鹿野健史朗、齋藤鷹也、近藤邦裕、古満芽久美、岩越栄子、浮穴和義
2. 発表標題 視床下部分泌性小タンパク質の脂肪蓄積作用
3. 学会等名 第5回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浮穴和義
2. 発表標題 新規神経分泌因子の発見とその機能
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浮穴和義
2. 発表標題 新規視床下部因子によるエネルギー代謝調節 脳と食欲・脂肪・筋肉との関係に着目して
3. 学会等名 第27回日本運動生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019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	岩越 栄子 (Iwakoshi Eiko) (50311296)	広島大学・統合生命科学研究科(総)・研究員 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	長谷川 博 (Hasegawa Hiroshi) (70314713)	広島大学・人間社会科学研究科（総）・教授 (15401)	

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