

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590223

研究課題名（和文） 新規摂食抑制蛋白、ネスファチン-1 欠損マウスの樹立とその行動学的解析

研究課題名（英文） Establishment of nesfatin-1 deficient mice and behavioral analysis of nesfatin-1 deficient mice

研究代表者

清水 弘行 (SHIMIZU HIROYUKI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20251100

研究成果の概要：ネスファチン-1 の活性部位の同定を試み、中央部分の M30 部分のペプチドのみがネスファチン-1 と同様の摂食抑制作用が認められた。M30 250 pmol/g 体重の単回投与による代謝に及ぼす影響を検討した。雄性 ICR マウスに M30 を腹腔内投与し、その後1時間の酸素消費量の変化や各種血中代謝マーカーに対する影響について検討を行ったが、明期における M30 の単回投与実験条件下においては M30 投与による明らかな酸素消費量への影響は認められず、血糖値や脂質濃度にも有意な変動は観察されなかった。また褐色脂肪組織における uncoupling protein (UCP)-1 の発現にも有意な急性効果は認められなかった。更に予備的な検討として、のネスファチン/ヌクレオビンディン-2 遺伝子欠損雄性マウスの酸素消費量の変動に関する検討を行ってみたが、明期中期のみにおいて3時間にわたり測定した酸素消費量に関する検討結果では、明らかな酸素消費へのネスファチン/ヌクレオビンディン-2 遺伝子欠損の影響は認められていない。更に自発運動量の計測も予備的に行ってみたが、有意な変動は認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：肥満、ネスファチン-1、摂食行動、酸素消費量、自発運動量、血糖値、中性脂肪、コレステロール

1. 研究開始当初の背景

肥満は世界レベルに急増していることが報告されるようになった。本邦においても肥満は国民の注目を浴びているメタボリッ

ク・シンドロームの根幹をなす重要な病態である。肥満、特に内臓肥満の治療を行うことは、糖尿病、高血圧、高脂血症の改善並びに心血管疾患の予防に非常に重要な意味をなす。肥満症の治療としては、エネルギー摂取

量の減少とエネルギー消費量の亢進を図る必要がある。エネルギー摂取の増加の要因として過食が重要であるが、摂食量の調節を行うことは臨床的に困難な場合が少なくない。特に現在までに知られている薬物治療では、リバウンドの問題も大きく、なかなか有効な治療方法がなかった。脂肪細胞由来の初めての摂食抑制蛋白であるレプチンでは、肥満者においてはレプチンに対する抵抗性（中枢への移行障害、等により）の障害の存在により臨床的に肥満者において有意な体重減少を呈するには血中濃度を正常者の50倍程度まで上昇させないとその効果が認められないことが米国に於ける臨床試験成績から判明している。一方、レプチンによる血圧上昇や血小板凝集促進作用等の好ましくない末梢作用の存在も障害になるものと考えられ、レプチンの臨床応用では有効な効果が得られる可能性が少ないものと考えられる。そこで臨床の場においては新たな肥満の治療法の開発が切望されている。

2. 研究の目的

このたび、我々は新たな摂食抑制蛋白としてネスファチン-1を同定した。ネスファチン/NUCB2は、視床下部を中心とした脳内において合成され、prohormone convertase-1によるプロセッシングにより活性型であるネスファチン-1となり、分泌されて作用を示し摂食抑制作用を呈する。ネスファチン-1は、摂食行動に密接に関係する室傍核等の視床下部を中心に発現し、絶食時などにラット室傍核における発現が変動する強力な摂食抑制蛋白と考えられるとともに、ラットの第三脳室内への急性投与により、等モルにてレプチンに比しより強力な食欲抑制を示すとともに、第三脳室内への抗ネスファチン-1抗体の投与が食欲を刺激することが判明し、新たな摂食抑制蛋白と考えられる。更にネスファチン-1の慢性的な第三脳室内への投与によりラットの体重、体脂肪量、特に内臓脂肪量の明らかな減少を示すことがこれまでに判明しているとともに、抗ネスファチン-1抗体の第三脳室内への慢性投与が食欲を増加し、その結果とした体重増加を示すことも明らかとなり、生理的に摂食の抑制的な調節に関与する新たな蛋白として注目される。また我々は最近ネスファチン-1の Maus 腹腔内や皮下への末梢投与により食欲が低下することも明らかとしてきた。しかしながら、ネスファチン-1はまだ同定されたばかりなので、その特異的な受容体も判明していない。更に詳細な脳内作用機構についてもまだ明らかとされていない。ネスファチン-1が末梢投与においてもその摂食抑制作用を示すことより、その作用機構やエネルギー代謝へ

の関与、末梢組織に対する直接作用の有無についてもまだ全く検討が行えていないので、このような点を今後早急に明らかとする一貫としてネスファチン-1の活性部位の同定を試みるとともに、ネスファチン/ヌクレオペンディン-2 遺伝子欠損マウスを作成し、その行動科学的な解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) ネスファチン-1の活性部位の同定

コンピューター解析結果に基づき、82個のアミノ酸からなるネスファチン-1を3分割したペプチド（N-端側23個(N23)、中央部分30個(M30)、C-端側29個(C29))を合成、それぞれのペプチドを250 pmol/g体重にてICRマウスの腹腔内へ暗期直前に投与し、その投与後の3時間における摂食量の変動を検討することにより、その活性部位の特定を試みた。更に褐色脂肪組織における uncoupling protein (UCP)-1 の発現変動を投与後1時間において褐色脂肪組織を得て、western blot 解析を行うことにより検討した。

(2) ネスファチン/ヌクレオペンディン欠損マウスの系の樹立

マウスゲノム DNA ライブラリーよりクローニングを行い、ターゲティングベクターを構築、ES細胞を用いてエレクトロポレーションを実施する。その後、スクリーニングを実施し、4-5個のポジティブクローンを取得し、Southern blot 法、等により確認作業を行う。相同組換え ES細胞をマウスの胚に注入し、ネスファチン-1欠損のキメラマウスを数系統作製、キメラ率の高いマウスを用いてキメラマウスの交配後 F1ヘテロマウスを取得する。PCR法にて確認を行い、その後継代を行い、ネスファチン/ヌクレオペンディン欠損マウスの系の樹立を行う。

(3) 代謝計測システム

2チャンネル・マウス用代謝計測システム（室町機械社製、MK-202R/02）を用いて雄性ICRマウスへのネスファチン-1の活性部位の急性投与時やネスファチン/ヌクレオペンディン-2欠損雄性マウスの明期における酸素消費量の変動について解析を行った。更に電子ビームを用いた自発運動量計測も同時に行った。

4. 研究成果

(1) ネスファチン-1の活性部位の同定

N23 及び C29 の投与では全く摂食行動には影響を与えなかったが、中央部分の M30 部分のペプチドのみがネスファチン-1 と同様の摂食抑制作用を示した。この結果より、ネスファチン-1 の活性部位は M30 部分に存在することが明らかとなり、その後の検討は M30 を用いて行った。次に M30 の単回投与による代謝に及ぼす影響を検討した。M30 の単回投与では、血糖値、中性脂肪値、総コレステロール値には明らかな影響を来さないことが明らかとなった。今回の検討により、ネスファチン-1 の活性部位が明らかにされることにより、今後のネスファチン-1 を応用した創薬に向けて、貴重なデータを得ることが出来た。

(2) 酸素消費量への影響

雄性 ICR マウスに M30 250 pmol/g 体重を腹腔内投与し、その後 2 時間の酸素消費量の変化を検討した。明期における M30 の単回投与実験条件下においては M30 投与による明らかな酸素消費量への急性効果は認められなかった。この活性ペプチドの腹腔内への急性投与実験結果では酸素消費量の増加作用が認められない可能性が示唆された。また更にこの活性ペプチドの腹腔内への急性投与時の褐色脂肪組織における UCP-1 の発現に関する検討も行って見たが、M30 投与による有意な急性投与効果は認められなかった。

またネスファチン/ヌクレオビンディン-2 遺伝子欠損マウスの作成を行った。現時点においては、まだ最終的なバッククロスが終了していない状況にはあるが、予備的な検討としてネスファチン/ヌクレオビンディン-2 遺伝子欠損及び野生型雄性マウスを用いて明期中期のみにおいて 3 時間にわたり測定した酸素消費量の変動に関する検討を行って見た。その予備的な実験結果結果においては、明期においてはネスファチン/ヌクレオビンディン-2 遺伝子欠損マウスと野生型マウスとの間には有意な差異は認められず、明らかな酸素消費へのネスファチン/ヌクレオビンディン-2 遺伝子欠損の影響は認められなかった。

(3) 自発運動量への影響

更に自発運動量の計測を確立し、同マウスを用いて酸素消費量の変動計測と同時に予備的に行って見た。その検討結果に於いても明期におけるネスファチン/ヌクレオビンディン-2 遺伝子欠損雄性マウスの運動量と野生型マウスとの間には、有意な差異は認められなかった。自発運動量は暗期に大きく変動

する可能性もあり、それに伴う酸素消費量の増加パターンにもネスファチン/ヌクレオビンディン-2 遺伝子欠損の影響が生じうる可能性は高いものと推察され、バッククロスの終了を急ぐとともに、その終了後に得られたマウスを用いて今後、暗期も含めた長時間にわたる継続的な観察を行うことによりネスファチン/ヌクレオビンディン-2 の行動生理学的意義を明らかとして最終的な結論をえて行きたいと考えている。

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 4 件)

1. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada K, Yamada M, Yada T, Mori M: Peripheral Administration of Nesfatin-1 Reduces Food Intake in Mice: The Leptin-Independent Mechanism. *Endocrinology* 150: 662-671, 2009、査読有.
2. Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides* 30: 995-998, 2009、査読有.
3. 清水弘行, 森 昌朋: ネスファチン-1 と食欲調節。実験医学増刊、肥満・糖尿病の病態を解明するエネルギー代謝の最前線: 159-163, 2009、査読無.
4. Shimizu H, Oh-I S, Okada S, Mori M. Nesfatin-1: an overview and future clinical application. *Endocrine Journal* (in press)、査読有.

[学会発表] (計 3 件)

1. 清水弘行, 柴田 綾, 岡田秀一, 矢田俊彦, 森 昌朋: メインシンポジウム 2 中枢性摂食機構と肥満の最前線: ネスファチン-I の活性部位の同定と末梢投与効果。第 82 回日本内分泌学会総会、前橋、2009. 4. 24
2. 清水弘行, 森 昌朋: ネスファチン-I: 末梢投与による食行動調節への関与。群馬大学生体調節研究所シンポジウム

「生体調節のケミカルバイオロジー」グ
ローバルCOE
「生体調節シグナルの統合的研究」共催、
前橋、2009. 3. 27

3. Shimizu H, Mori, M. A satiety molecule,
Nesfatin-1 in the hypothalamus, The
International Symposium on
Neuropeptides and Neuroendocrinology,
Tokyo, 2008. 8. 29

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 弘行 (SHIMIZU HIROYUKI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20251100