

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390255
 研究課題名(和文) 代謝制御における新たな鍵分子NRDcの発見：そのメタボリックシンドロームでの意義
 研究課題名(英文) Identification of NRDC, a novel key molecule for energy metabolism. Pathophysiological role of NRDC in Metabolic Syndrome
 研究代表者
 西 英一郎 (NISHI EIICHIRO)
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：30362528

研究成果の概要(和文)：我々は、HB-EGFの結合タンパク質として同定したNRDcがHB-EGFのみならずTNF- α など広範な膜タンパク質シェディングの活性化因子であることを明らかにした。NRDc欠損マウスを作製したところ、メタボリックシンドロームと正反対の代謝系表現型を呈していた。欠損マウスの脂肪組織、肝臓の解析から、NRDcがTNF- α のシェディング制御や転写コアクチベーターPGC-1 α の発現制御を介して、エネルギー代謝を制御していることが明らかになり、NRDcがメタボリックシンドロームの病態にも深く関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：NRDC, a metalloendopeptidase of the M16 family, is a potent activator for ectodomain shedding of multiple membrane proteins. Homozygous mutant of NRDC-deficient mice (NRDC^{-/-}) showed lean phenotype. Metabolic phenotypes of NRDC^{-/-} are opposite to those in metabolic syndrome, suggesting that NRDC could be a novel therapeutic target for metabolic syndrome. Analysis of NRDC^{-/-} adipose tissue and liver demonstrated that NRDC critically controls glucose and lipid homeostasis through the regulation of TNF- α shedding and the modulation of transcriptional co-activator, PGC-1 α function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー代謝、メタボリックシンドローム、メタロプロテアーゼ、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

肥満(内臓脂肪の蓄積)とインシュリン抵抗性を基盤とし、複数の動脈硬化の危険因子(高脂血症、耐糖能障害、高血圧)が個人に集積する病態が、メタボリックシンドロームとして提唱された。その成因としては、脂肪細胞が分泌するアディポサイトカイン、脂肪

組織における炎症、遊離脂肪酸の作用などが重要だと考えられているが、それらを統合的に制御する因子の存在についてはよくわかっていない。一方我々は、HB-EGFの新規結合タンパク質として同定したNRDc(nardilysin, N-arginine dibasic convertase)がHB-EGFのみならずTNF- α など広範な膜タンパク質

シェディングの活性化因子であることを明らかにした。

また、NRDc 欠損マウスを作製したところ、1) 内臓脂肪量減少、2) 中性脂肪低下、3) インシュリン感受性上昇、4) 血圧低下、とメタボリックシンドロームの診断基準（日本内科学会 2005）全項目において、それとは正反対の表現型を呈していることが明らかになった。この結果は、NRDc が新規代謝ホメオスターシス調節因子として、メタボリックシンドロームの病態にも深く関わっている可能性を強く示唆した。

2. 研究の目的

NRDc がいかなる分子機能を介して代謝恒常性制御およびメタボリックシンドロームの病態に関わっているのかを明らかにし、新規治療法への糸口をつかむため、1) NRDc-/-の心血管代謝系のさらなる表現型解析、2) メタボリックシンドロームにおける NRDc の病態生理学的意義の検討、3) NRDc-/-のメタボリックリモデリングにおける特徴的な遺伝子発現パターンの解析、4) 表現型発現の分子機構の解明、を目的とした。

3. 研究の方法

目的 1) NRDc-/-の心血管代謝系のさらなる表現型解析：

(1) 代謝調節に関わるホルモンなど生理活性物質の測定、(2) 関連臓器の組織学的解析
(3) 心機能評価

目的 2) メタボリックシンドロームにおける NRDc の病態生理学的意義の検討：

(1) チャレンジ実験、(2) 疾患モデル動物との交配実験、(3) メタボリックシンドローム患者における血清 NRDc 濃度の検討

目的 3) NRDc-/-のメタボリックリモデリングにおける遺伝子発現パターンの解析

目的 4) NRDc-/-の表現型発現の分子機構解明と、それに立脚した抗 NRDc 機能中和抗体の開発：NRDc の分子機能を (1)プロテアーゼとしての機能、(2)シェディング活性化因子としての機能、(3)核内における機能、に分け、いかなる分子機能の喪失が表現型発現につながっているのかを検討する。

4. 研究成果

目的 1) NRDc-/-の心血管代謝系のさらなる表現型解析

(1) 代謝調節に関わるホルモンなど生理活性物質の測定：①予想に反して血中カテコラミン値は野生型マウスと比較して明らかな高値を呈した。②エネルギー消費量の解析：エネルギー消費の総和としての酸素消費量を、自動間接熱量計を用いて測定したところ、NRDc-/-マウスにおいて、体重あたりの酸素消費量は明らかに増加していた。野生型マウスと比較して、体重あたりの食事摂取量に有意な差は認めなかったが、一日の移動距離を積算して求めた運動量は NRDc-/-マウスにおいて有意に増加していた。

(2) 関連臓器の組織学的解析：H&E 染色にて、NRDc-/-マウスの白色脂肪組織では、脂肪細胞の明らかな小型化を認めた。一方、熱産生の主要器官である褐色脂肪組織では、著明な脂肪蓄積の減少を認め、熱産生が亢進していることが示唆された。(3) 心機能評価：組織切片の解析では NRDc-/-マウス心臓の低形成を認めたが、心臓エコーによる評価では心機能（収縮能）に明らかな低下は認めなかった。

目的 2) メタボリックシンドロームにおける NRDc の病態生理学的意義の解明：(1) 野生型および NRDc-/-マウスにおける高脂肪食負荷試験を行ったが、NRDc-/-マウスが著明な成長遅延を呈することから、その体重や肥満度の評価は困難であった。そのため、普通食下では、体重や糖代謝に野生型と全く差のない、NRDc+/-マウスを用いて高脂肪食負荷を行ったところ、NRDc+/-マウスにおいて明らかな肥満抵抗性を認めた。また、高脂肪食後の糖負荷テスト、インシュリン負荷テストにおいても、NRDc+/-マウスが耐糖能、インシュリン感受性ともに、野生型マウスより良好であることが明らかになった。(2) 肥満モデルマウス (ob/ob マウス) と NRDc 欠損マウスとの交配実験は現在進行中である。(3) NRDc の臨床的意義を検討するため、我々はヒト NRDc 高感度測定系の開発を行い、成功した。パキユロウィルスのシステムを用いて作製したヒトリコンビナント NRDc を抗原とし、7 クローンの IgG 型マウスモノクローナル抗体を樹立し、それらの組み合わせを検討して、サンドイッチ ELISA システムを構築した。同方法での検出感度は 50pg/ml であり、血清中の NRDc 濃度（健康成人における平均約 200 pg/ml）の測定を可能にした。現在、メタボリックシンドローム患者血清における NRDc 測定を進めている。

目的 3) NRDc-/-のメタボリックリモデリングにおける遺伝子発現パターンの解析：肝臓、褐色脂肪組織、心臓、大脳などで DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行ったところ、全ての臓器で共通して NRDc-/-において、転写コアクチベーターである PGC-1 α の発現が上昇していることが明らかになった。同分子はミトコンドリア産生、酸化率的

ン酸化を統合的に制御していることが知られており、NRDc^{-/-}マウスにおけるエネルギー消費亢進の、少なくとも一部はPGC-1 α および、その下流遺伝子の発現上昇によることが推測された。

目的 4) NRDc^{-/-}の表現型発現の分子機構解明：NRDc^{+/-}マウスにおける高脂肪食負荷後の肝臓、脂肪組織での、TNF- α のタンパク質発現パターンを解析したところ、野生型と比較してNRDc^{+/-}マウスで、TNF- α の前駆体の発現が増加し、切断型の発現が低下していること、すなわちNRDc^{+/-}マウスにおいて、TNF- α のシェディングが減少している可能性が示唆された。TNF- α はシェディングを受けることで活性化され、肝臓や脂肪組織における慢性炎症の惹起および増強に寄与していると考えられていることから、そのシェディング低下が慢性炎症の減弱、さらには糖代謝形態の改善につながっていると考えられた。

以上の結果から、NRDcがPGC-1 α の発現制御やTNF- α のシェディング制御を介して、エネルギー代謝ホメオスタシスの維持に必須であることが明らかになった。

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 8 件)

- ① Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, Hosokawa, S Elbahrawy A, Soeda T, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi M, Takaori K, Doi R, Nishi E, Kakinoki R, Deng JM, Behringer RR, Nakamura T, and Uemoto S. Continuous cell supply from the Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. Nat. Genet. 査読有. 2011; 43: 34-41.
- ② Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, and Furuse M. Angulin/LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. J. Cell. Sci. 査読有. 2011; 15: 548-55.
- ③ Horie T, Ono K, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Kuwabara Y, Nakashima Y, Takanabe-Mori R, Nishi E, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway. Cardiovasc Res. 査読有. 2010;

87: 656-64.

- ④ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Tomimoto H, Takao K, Miyakawa T, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, and *Nishi E. Nardilysin Regulates Axonal Maturation and Myelination in the Central and Peripheral Nervous System. Nat. Neurosci. 査読有. 2009; 12: 1506-1513
- ⑤ Hoshino K, Horiuchi H, Tada T, Tazaki J, Nishi E, Kawato M, Ikeda T, Yamamoto H, Akao M, Furukawa Y, Shizuta S, Toma M, Tamura T, Saito N, Doi T, Ozasa N, Jinnai T, Takahashi K, Watanabe H, Yoshikawa Y, Nishimoto N, Ouchi C, Morimoto T, Kita T, Kimura T. Clopidogrel Resistance in Japanese Patients Scheduled for Percutaneous Coronary Intervention. Circ J. 査読有. 2009; 73: 336-42
- ⑥ Mitsuoka H, Kume N, Hayashida K, Inui-Hayashiada A, Aramaki Y, Toyohara M, Jinnai T, Nishi E, Kita T. Interleukin 18 stimulates release of soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1). Atherosclerosis. 査読有. 2009; 202: 176-82
- ⑦ Hiraoka Y, Yoshida K, Ohno M, Matsuoka T, Kita T, Nishi E*. Ectodomain shedding of TNF- α is enhanced by nardilysin via activation of ADAM proteases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有. 2008; 370: 154-8
- ⑧ Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, Nishi E, Tsukita S, Furuse M. Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. Exp Cell Res. 査読有. 2008; 314: 939-49

[学会発表] (計 19 件)

- ① 西 英一郎: Nardilysin regulates axonal maturation and myelination through modulating ectodomain shedding of neuregulin1、シンポジウム『Ectodomain shedding biology-細胞膜蛋白質の機能変換機構-』 BMB2010 (2010年12月9日、神戸)

- ② Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Kita T, Kimura T, Nishi E. The role of a metalloendopeptidase nardilysin in adaptive thermogenesis. ポスター発表 BMB2010 (2010年12月7-10日、神戸)
- ③ Matsuoka T, Hiraoka Y, Ohno M, Ohshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, Nishi E. NRDC controls lipid and glucose metabolism through the modulation of PPARalpha activity. ポスター発表、BMB2010 (2010年12月7-10日、神戸)
- ④ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Kimura T, Kita T, Nishi E. シェディング活性化因子ナルディライジンの多発性硬化症における意義の解明、ポスター発表 BMB2010 (2010年12月7-10日、神戸)
- ⑤ Matsuoka, T, Hiraoka, Y, Ohno, M, Nishi, K, Kimura, T, Kita, T, Nishi, E. A Metalloendopeptidase Nardilysin controls Lipid and Glucose metabolism through the modulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha activity. American Heart Association Sessions 2010 November 13-17 Chicago, Illinois
- ⑥ 神田啓太郎、米門秀行、妹尾浩、千葉勉、西英一郎：ナルディライジンによる IL-6/Stat3 シグナルを介した胃癌細胞の増殖制御、第 69 回日本癌学会学術総会 2010.09.22-24 大阪
- ⑦ 松岡 龍彦、平岡 義範、大野 美紀子、大島 尚子、清成 寛、木村 剛、北 徹、西 英一郎. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for glucose and lipid metabolism、第 47 回 日本臨床分子生物学会 2010 年 4 月 10-11 日 東京
- ⑧ 大野 美紀子、平岡 義範、松岡 龍彦、木村 剛、北 徹、西 英一郎. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system、第 47 回 日本臨床分子生物学会 2010 年 4 月 10-11 日 東京
- ⑨ Ohno, M, Matsuoka, T, Hiraoka, Y, Niizuma, S, Shioi, T, Kita, T, Kimura, T, Nishi, E. A Metalloendopeptidase Nardilysin is a Regulator of Blood Pressure and Heart Rate, Oral Presentation, The 74rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 5-7, 2010, Kyoto
- ⑩ Matsuoka, T, Ohno, M, Hiraoka, Y, Kita, T, Kimura, T, Nishi, E. Nardilysin, a Novel Transcriptional Co-regulator of PPARalpha, Controls Glucose and Lipid Metabolism, Poster Presentation, The 74rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 5-7, 2010, Kyoto
- ⑪ Matsuoka, T, Ohno, M, Hiraoka, Y, Kita, T, Kimura, T, Nishi, E. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for glucose and lipid metabolism. Poster presentation, The 82th Scientific Sessions of American Heart Association, November 15-18, 2009, Orland, Florida
- ⑫ Nishi, E : Nardilysin Regulates Axonal Maturation and Myelination in the Central Nervous System. Gordon Research Conference (Matrix Metalloproteinases) (Aug 30 - Sep 4, 2009, Les Diablerets, Switzerland) 招待講演
- ⑬ Ohno, M, Matsuoka, T, Hiraoka, Y, Kita, T, Nishi, E. Nardilysin Regulates Axonal Maturation and Myelination in the Central and Peripheral Nervous System. Poster presentation, Gordon Research Conference (Matrix Metalloproteinases) (Aug 30 - Sep 4, 2009, Les Diablerets, Switzerland)
- ⑭ 西 英一郎 : A metalloendopeptidase nardilysin is a critical regulator for lipid and glucose metabolism, ポスター、第 41 回 日本動脈硬化学会・学術集会 (2009年7月17-18日、下関)
- ⑮ Ohno, M, Matsuoka, T, Hiraoka, Y, Kita, T, Nishi, E. Nardilysin, a Metalloendopeptidase, is a Novel Regulator of Blood Pressure and Heart Rate, Featured Research Session, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20-22, 2009, Osaka
- ⑯ Matsuoka, T, Ohno, M, Hiraoka, Y, Kita, T, Nishi, E. Nardilysin Deficiency

Causes Lean Phenotype with Hypotriglyceridemia and Hypoinsulinemia, Oral Presentation, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20-22, 2009, Osaka

- ⑰ Tada, T, Horiuchi, H, Nagai, K, Tazaki, J, Nishi, E, Touma, M, Tamura, T, Akao, M, Furukawa, Y, Kimura, T, Kita, T. Clopidogrel Resistance in Japanese Patients Scheduled for Percutaneous Coronary Intervention, Poster Session, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20-22, 2009, Osaka
- ⑱ 西 英一郎: 細胞外ドメインシェディングの制御におけるナルディライジンの役割、シンポジウム『膜結合性プロテアーゼとその制御』第13回 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会 (2008年8月22-23日、大阪)
- ⑲ Hiraoka, Y, Ohno, M, Matsuoka, T, Kita, T, Nishi, E. A metalloendopeptidase nardilysin, activator for ectodomain shedding, is an essential regulator for growth and energy metabolism, ミニシンポジウム「膜近傍におけるプロテオリシス」: Mini-symposium "Proteolysis in the Perimembrane Region" 第60回日本細胞生物学会、(2008年6月29日-7月1日、横浜)

[図書] (計2件)

- ① 西 英一郎: 『神経軸索と髄鞘形成におけるシェディング活性化因子ナルディライジンの役割』、BIO Clinica 25 (9): 818-22 (2010)
- ② 西 英一郎: 『ナルディライジンによる細胞外ドメインシェディング制御機構と、その神経軸索・髄鞘形成における役割』、特集: 細胞外プロテオリシス研究の最前線、生化学 82 (10): 931-939 (2010)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ナルディライジンの高感度免疫測定法

発明者: 西 英一郎、平岡 義範、松本 恭一、國近 誠

権利者: 京都大学 (50%)、三洋化成工業株式会社 (50%)

種類: 特許

番号: 特願 2009-160792

出願年月日: 2009年7月7日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 英一郎 (NISHI EIICHIRO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号: 30362528