

機関番号：17601

研究種目：基盤研究 (C)

研究機関：2008～2010

課題番号：20580324

研究課題名(和文)：新規ペプチド、ニューロメジン S および U の生体時計と摂食機構の調節に関する研究

研究課題名(英文)：Study on the regulation of novel peptide, neuromedin S and U for the circadian clock and feeding

研究代表者：

中原 桂子 (NAKAHARA KEIKO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90315359

研究成果の概要(和文)：2005年に新たなペプチドとして同定されたニューロメジン S あるいはその関連ペプチドのニューロメジン U における新たな生理機能の探索を行った。その結果、これらのニューロメジン S/U が様々な知覚情報のメディエーターとして作用し、オキシトシンの分泌を制御していること、あるいは摂食抑制ホルモンであるレプチンの下流で摂食を制御していることが判明した。またニューロメジン S のノックアウトマウスでは心拍数が減少しており、自律神経系を介した循環器系への作用も推測された。

研究成果の概要(英文)：I investigated physiological functions of neuromedin U and neuromedin S which was identified as a novel peptide in 2005. Both neuromedin S and neuromedin U play important role for oxytocin release as a mediator of sensory information. In addition, neuromedin S regulate feeding by acting downstream of the leptin signaling pathway. Neuromedin S *KO* mice decrease the heart rate, suggesting that endogenous neuromedin S may regulate cardiovascular function by acting on sympathetic nerve.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ニューロメジン S, ニューロメジン U, 生体時計、摂食、自律神経、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

2005年にニューロメジン U (以下 NMU と略) の受容体 NMUR1 および NMUR2 に結合する新たなペプチドとして、ニューロメジン S (以下 NMS と略) が同定された。NMS は 35 個のアミノ酸からなり、NMU と N 末の 7 個のアミノ酸は同じであるが、その塩基は異なった染色体にコードされている。NMS は NMU が中枢や末梢に広く分布するのとは対照的にかなり視

交叉上核(生体時計の局在部位)に限局して発現しており、生体時計の調節に関係していることがすでに判明している。また最近、NMU や NMS が強力な摂食抑制作用を有することを明らかにした。このような新たなペプチドの生理機能を明らかにすることは創薬への道に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は先の背景をもとに、(1) NMU と NMS の摂食抑制機構の解明と両者の相違を明らかにする事、また、特に(2) NMS の新たな生理機能を探索することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) NMU および NMS の摂食抑制機構について

まず、NMU および NMS を、慢性的に側脳室カニューレを装着したラットの側脳室内に暗期開始直前に投与し、暗期の摂食量におよぼす効果を比較した。次にレプチン投与ラットに NMU あるいは NMS の抗血清を投与し、レプチンの摂食抑制効果が阻止されるか否かを判定した。さらに、NMU および NMS の摂食抑制機構を解明するため、これらを側脳室内投与し、90 分後に視床下部を採取して、摂食関連遺伝子 AGRP, NPY, POMC の mRNA 発現をリアルタイム PCR で測定した。さらに、弓状核あるいは室傍核のスライス培養下で NMU および NMS を添加し、培養皿の底に張り巡らした電極から、神経の発火頻度の測定を行った。

(2) NMS の新たな生理作用について
オキシトシン分泌への作用

まず、NMU あるいは NMS をラットの側脳室内に投与し、室傍核および視索上核の凍結切片で cFos (神経活性化の指標となる) 発現を免疫染色を用いて観察した。次に、同じ切片を用いて抗オキシトシン抗体で染色し、cFos 発現細胞にオキシトシン細胞が含まれているかを検討した。さらに、NMU あるいは NMS を側脳室内に投与し、投与後 5 分と 60 分でオキシトシンの血中レベルを ELISA により測定した。最後に、乳児の吸乳刺激に対する乳汁分泌効果への NMS の影響を検討するため、まず母親から 8 時間乳児を離し、母親に戻す 30 分前に NMS の抗体あるいは NMS を母親の脳室に投与した。乳児を戻して 15 分後の乳児の体重増加量を測定し、乳汁分泌量を推定した。

循環器系への作用

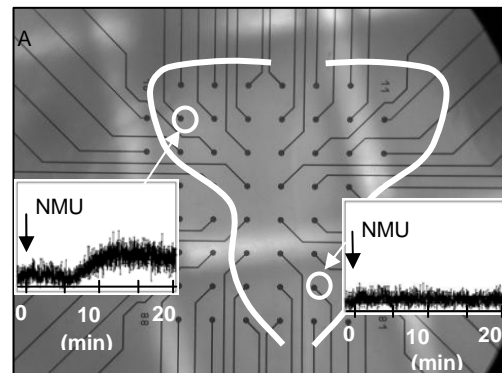
まず NMS 0.1~1.0nmol をマウスの側脳室内に投与し、非観血系に心拍数と血圧を測定した。また NMS のノックアウトマウスを作成し、これらの心拍数と血圧を測定した。さらに、NMS ノックアウトマウスの心電図を記録し、解析した。NMS ノックアウトマウスの心拍数の低下が観察されたので、その原因を検討するため、NMS ノックアウトマウスに交感神経遮断薬あるいは副交感神経遮断薬を投与し、同様の処置を行った正常マウスの心拍数と比較検討した。最後に、NMS の心臓への直接作用の有無を検討するため、マウスの心

臓での NMUR1, NMUR2 の mRNA および NMS mRNA の発現量をリアルタイム PCR で測定した。

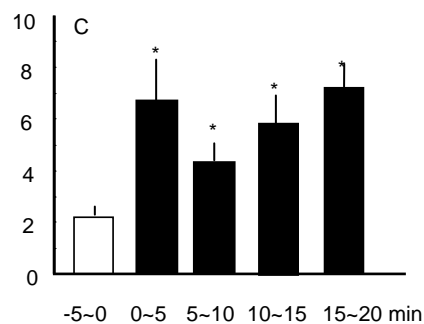
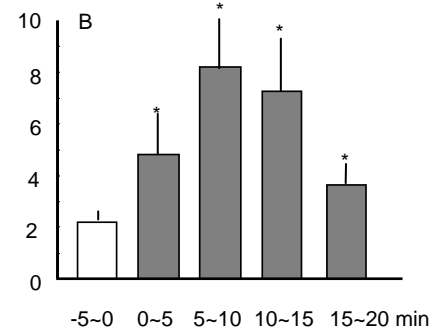
4. 研究成果

(1) NMU および NMS の摂食抑制機構について

NMU および NMS の側脳室内投与は投与量依存的にラットの夜間の摂食量を抑制した。またこの抑制は NMU よりも NMS の方が強力であった。レプチンの側脳室内投与あるいは腹腔内投与は夜間の摂食量を減少させたが、この減少は NMS の抗体の前投与で阻止された。一方 NMU の抗体では阻止できなかった。NMU および NMS の側脳室内投与により、視床下部の摂食抑制ペプチドの CRH あるいは POMC の遺伝子発現が増加した。NMU では CRH が NMS では POMC の発現が強く促進された。室傍核や弓状核のスライス培養液に NMU および NMS を添加すると、いくつかの神経細胞に特異的な



MUA(Average Spike x 10³/30 sec)



発火頻度の上昇が認められた。図(前のペー

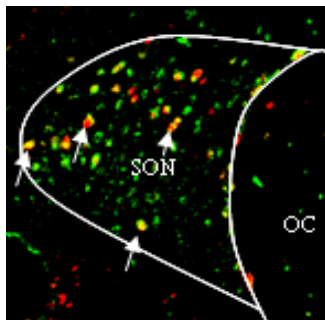
ジ)のAは室傍核のスライス培養の電気記録の写真でBとCがNMUとNMSをそれぞれ添加した時の発火頻度の総計である。詳しくはJ. Endocrinology 207:185-193, 2010 に発表している。

以上の結果、NMUとNMSは摂食抑制作用を有するが、その機序は異なり、NMSは主にPOMC系を活性化し、NMUは主にCRH系を活性化することによると推測される。またNMSはレプチンの下流において摂食抑制を示す可能性が示唆された。

(2) NMSの新たな生理作用について
オキシトシン分泌への作用

NMSの脳室内投与により室傍核および視索上核にcFosの発現が認められた。またその発現した細胞の一部はオキシトシンの抗体でも染色されたので、オキシトシン分泌細胞がNMS投与によって刺激されていると推測された。下図は視索上核の染色像で、赤がcFosを緑がオキシトシンを示し、黄色は両者が染まった細胞を示す。

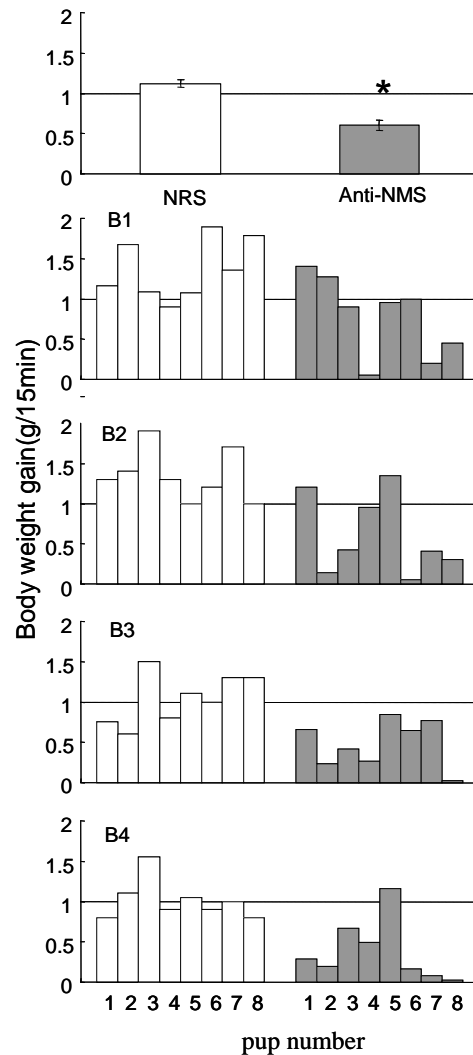
次にNMSの側脳室内投与は投与量依存的に血液中のオキシトシン濃度を上昇させた。一方、NMUではその効果は弱かった。乳児の吸乳刺激に伴う乳汁分泌に対するNMSの関与を調べ



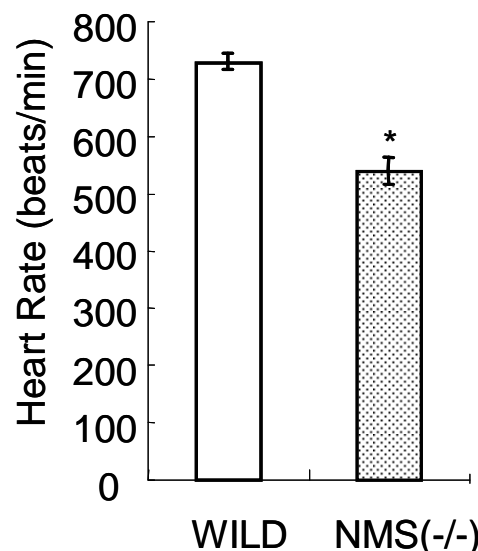
るため、8時間母親から離乳した乳児を母親に戻す30分前に、母親の脳室へNMSの抗血清を投与した。その結果、乳児の吸乳刺激に伴う乳汁分泌が著しく減少した(右上図)。以上の結果から、NMSは乳児の吸乳刺激をオキシトシン細胞に伝達する仲介物質であると推測された。

循環器系への作用

NMSをマウスの脳室内に投与すると、投与量依存性に心拍数の増加が認められた。一方、NMSのノックアウトマウスでは、心拍数の減少が認められた(右下図)。心電図を調べて見ると、ノックアウトマウスではPQ間隔の延長が起きている。次にNMSのノックアウトマウスと正常マウスに交感神経遮断薬、あるいは副交感神経遮断薬を投与し、心拍数への影響を調べたところ、副交感神経遮断薬投与では、正常マウスもノックアウトマウスも心拍数の増加が起こったのに対し、交感神経遮断薬投与では正常マウスで心拍数が有意に減少したが、ノックアウトマウスでは変化が認められなかった。以上の結果はNMSノックアウトマウスの心拍数の減少が交感神経



系の機能低下によるものと推測された。心臓におけるNMUR1, R2mRNAの発現は認められず、NMSが心臓に直接作用している可能性は低いと考えられた。



以上の結果、NMSは自律神経系を介して心拍数の調整に寄与していると推測された。

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)

K. Fukumoto, K. Nakahara, T. Katayama, M. Miyazatao, K. Kangawa, N. Murakami: Synergistic action of gastrin and ghrelin on gastric acid secretion in rats. Biochemical and Biophysical Research Communications 374:60-63, 2008 (査読有り)

T. Sakamoto, K. Mori, M. Miyazato, K. Kangawa, H. Sameshima, K. Nakahara, N. Murakami: Involvement of neuromedin S in the oxytocin release response to suckling stimulus. Biochemical and Biophysical Research Communications 375:49-53, 2008 (査読有り)

Y. Inoue, K. Nakahara, K. Kangawa, N. Murakami: Transitional change in rat fetal cell proliferation in response to ghrelin and des-acyl ghrelin during the last stage of pregnancy. Biochemical and Biophysical Research Communications 393(3):455-460, 2010 (査読有り)

K Nakahara, R Okame, T Katayama, M Miyazato, K Kangawa, N Murakami: Nutritional and environmental factors affecting plasma ghrelin and leptin levels in rats J. Endocrinology 207(1):95-103, 2010 (査読有り)

K Nakahara, T Katayama, T Ida, K Mori, M Miyazato, K Kangawa N Murakami: Comparison of feeding suppression by the anorexigenic hormones neuromedin U and neuromedin S in rats J. Endocrinology 207(2):185-193, 2010 (査読有り)

K Nakahara, S Takata, M Ishii, K Nagao, M Bannai, M Takahashi, N Murakami Hypothalamic gene expression involved in anorexia in rodents fed valine-deficient diet Amino Acid (in press)(査読有り)

T Sakamoto, K Nakahara, K Maruyama, T Katayama, K Mori, M Miyazato, K Kangawa, N Murakami: Neuromedin S regulates cardiovascular function through the sympathetic nervous system in mice Peptides 32:1020-1026, 2011 (査読有り)

その他査読有りの英文論文 4 編

〔学会発表〕(計 23 件)

坂本拓己 ニューロメジン S は幼児の吸乳刺激による射乳反射を仲介する 第 146 回日本獣医学会 秋季大会(宮崎) 2008 年 9 月 24 日

山下弘太 ニューロメジン U および S の中枢投与が循環器系に及ぼす影響 第 148 回日本獣医学会 秋季大会(栃木県総合文化センター 2009 年 3 月 26 日

赤木 愛 ニューロメジン S および U のラット体温に及ぼす効果の比較 第 150 回日本獣医学会 秋季大会(帯広) 2010 年 9 月 16 日

Kenji Nagao Dietary valine deficiency induces anorexia that is reversed by neither ghrelin, NPY nor AGRP. Society for Neuroscience 39th Annual Meeting (Shicago) 2009 年 11 月 19 日

〔図書〕(計 2 件)

中原桂子 「実験で学ぶ生理学」学窓社 獣医生理学・生理化学教育懇談会編 170 頁 分担「摂食機構 p157 - 162」2009 年 10 月 5 日

村上 昇、中原桂子、寒川賢治「食餌誘導性肥満モデル(Diet Induced Obesity Model)」日本臨床社、2010

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: 加療中動物の回復促進治療剤
発明者: 村上 昇、中原桂子、寒川賢治、林友二郎

権利者: 同上

種類:

番号: 特願 2010-6557

出願年月日: 2010 年 1 月 15 日

国内外の別: 国内

名称: 加療中動物の回復促進治療剤
発明者: 村上 昇、中原桂子、寒川賢治、林友二郎

権利者: 同上

種類:

番号: PCT/JP2011/050579

出願年月日: 2011 年 1 月 14 日

国内外の別: 国外(20 カ国)

名称: 高体温治療剤

発明者: 村上 昇、中原桂子、寒川賢治、林友二郎

権利者: 同上

種類:

番号: 特願 2011-47025

出願年月日：2011年3月3日
国内外の別：国内

取得状況（計1件）

名称：Mouse developing visceral fat type
obesity and diabetes

発明者：村上 昇、中原桂子

権利者：同上

種類：

番号：US 7,847,147B2

取得年月日：2010年12月7日

国内外の別：USA

〔その他〕

ホームページ等

http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/vet_phy/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中原 桂子 (NAKAHARA KEIKO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90315359

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 研究協力者

村上 昇 (MURAKAMI NOBORU)

宮崎大学・農学部・准教授

宮里 幹也 (MIYAZATO MIKIYA)

国立循環器病研究センター研究所・生化学・部長

寒川 賢治 (KANGAWA KENJI)

国立循環器病研究センター研究所・所長