

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590210

研究課題名(和文) ラット CGRP を用いた脳内カルシトニン受容体の生理作用に関する検討

研究課題名(英文) Central effects of rat calcitonin-gene related protein on energy homeostasis in rats

研究代表者

澤田 浩武 (SAWADA HIROTAKE)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：40332895

研究成果の概要(和文):これまで CGRPについては生理作用が報告されていたが, CGRPは生理作用が報告されておらず,一般に生理作用はないとされていた.しかし,今回の我々の実験結果から CGRPには CGRPよりも強い生理作用があることが明らかになり, CGRPがヒトおよびラットの脳内カルシトニン受容体の内因性リガンドである可能性が強まった.

研究成果の概要(英文): We demonstrated that rat CGRP can function as a specific ligand for CT-R and a catabolic signaling molecule in the rat CNS.

These results suggest that rat CGRP functions as a specific ligand for the CT-R and a catabolic signaling molecule in the CNS.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：受容体・細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

カルシトニンとは、甲状腺C細胞から分泌される。カルシトニンが末梢において骨、腎のカルシトニン受容体を介して、血漿カルシウム濃度低下作用を有する。このカルシトニン受容体は末梢のみならず視床下部など中枢神経系にも広く分布、発現しているが、その役割については不明であった。1980年代に入り、サケやブタのカルシトニンを実験的にラットの脳室内に投与すると、摂食抑制、胃酸分泌抑制、体温上昇、運動抑制、鎮痛、プロラクチン分泌抑制がみられ、中枢のカルシトニン受容体が摂食、エネルギー代謝、行動に関与することが報告された。しかし、脳内にカ

ルシトニンの遺伝子発現はなく、甲状腺由来のカルシトニンが血液脳関門を通過して中枢に到達するとは考えにくい。このことから、カルシトニンとは異なる脳内カルシトニン受容体の内在性リガンドが存在すると推察され、これまでいくつかの研究グループで同定が試みられてきたが、その本体は不明のままであった。われわれは、ブタ脳由来の2次元 HPLC 分離試料を、ブタ腎臓上皮由来細胞株で内在性にカルシトニン受容体を発現する LLC-PK細胞に投与し、投与後の細胞内 cAMP 上昇活性を指標とするスクリーニング法とブタ脳のペプチドーム解析の結果を組み合わせ、脳内カルシトニン受容体の内在性リ

ガンド探索を行った。その結果、既知の活性ペプチドに一致しない画分に活性が観測され、2003年にブタ脳抽出物から38アミノ酸残基からなる新規生理活性ペプチド calcitonin receptor-stimulating peptide (CRSP) -1を同定した。CRSP-1はLLC-PK1細胞でカルシトニンの約10倍、ブタカルシトニン受容体遺伝子導入により選択的にブタカルシトニン受容体を発現させたCOS-7細胞系においてはカルシトニンの約100倍のcAMP上昇作用があり、脳内カルシトニン受容体の内在性リガンドである可能性が示された。次にわれわれは、CRSP-1の中樞作用を検討した。ブタを用いたin vivo実験が困難であるため、ラットを用いてブタCRSP-1の生物学的作用を評価した。CRSP-1の脳室内投与では、摂食抑制、胃酸分泌抑制、体温上昇、運動抑制作用が観測され、これらの中樞作用はカルシトニンよりも強力であった。連日中樞投与では摂食抑制だけでなく体重減少作用が認められた。このようにCRSP-1の末梢作用はCTよりも弱く、中樞作用はCTよりも強く、当初予想された様にCRSP-1は中樞カルシトニン受容体を介して強力な摂食抑制、異化亢進作用を有することを明らかにした。しかし、これらの結果はブタの内因性リガンドをラットに投与した結果であり、CRSP-1の生理作用とは言い難い。このCRSP-1の生理作用を明らかにするためには同種のCRSP-1の脳室内投与と実験が必要である。しかし、ヒト、ラットについては徹底した探索を実施しているにも関わらずCRSP-1のオルソログが同定できなかった。そこでブタとラットの遺伝子座を比較検討(syteny)したところ、ブタCRSP-1の遺伝子座の位置に一致するラットの遺伝子座に存在する遺伝子がCGRPであることが分かった。これまでにラットCGRPの中樞作用に関する報告はないが、われわれのこれまでの研究経過からラットCGRPがブタCRSP-1と同様の中樞作用を有することが示唆される。

2. 研究の目的

ラットを用いてラットCGRPの中樞作用について検討し、CGRPさらにはCRSPファミリーの生理作用およびその作用機序を明らかにしたい。

3. 研究の方法

ラット脳室内にCGRPを投与し中樞作用を検討する。中樞作用はブタCRSP-1の中樞作用を検討した時と同様に、単回投与では摂食抑制作用(暗期、明期)、体温上昇作用、運動抑制作用、胃酸分泌抑制作用、および毒性について評価し、長期慢性投与では摂食抑制作用および体重減少作用について評価を行う。また、カルシトニン受容体やCGRP受容体のアンタゴニストを前投与することでこれらの中樞作用がキャンセルされるかを確

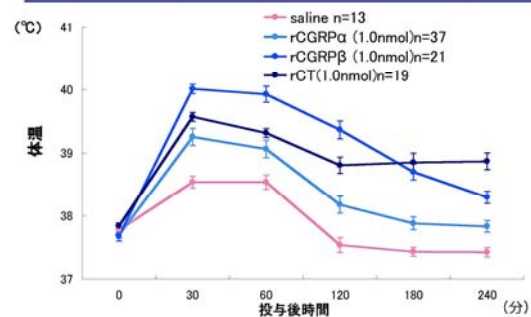
認し、ターゲットとしている受容体を介して投与したペプチドが作用しているのかを確認する。

4. 研究成果

CRSPスーパーファミリーに属するペプチド(ラットカルシトニン、ラットCGRP、ラットCGRP)の脳室内投与を行い、体温変化、摂食抑制効果、脳内で刺激を受けた神経核の評価を行った。

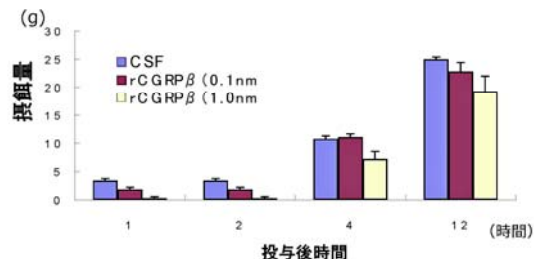
- (1) ペプチド投与によりラットの体温上昇がみられた。その作用強度、作用時間ともにCGRPが最も強力であり、次にCGRP、の作用が強くみられた。次にカルシトニン受容体のアンタゴニストであるCT8-32を前投与したが、中樞作用の低下はみられなかった。

脳室内rCGRP投与時の体温変化

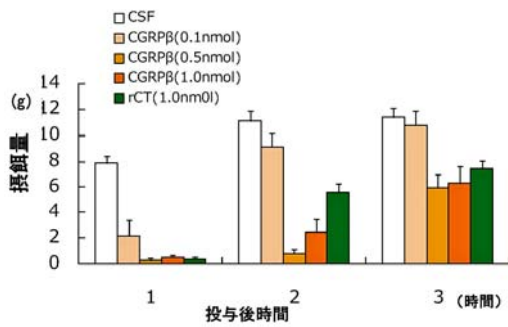


- (2) ペプチド投与により暗期、明期ともに摂食抑制がみられた。ratCGRPの作用強度、作用時間ともにratCGRPやratCTよりも強く、特に暗期ではペプチド間の作用強度の違いが顕著となった。次にカルシトニン受容体のアンタゴニストであるCT8-32を前投与したが、中樞作用の低下はみられなかった。

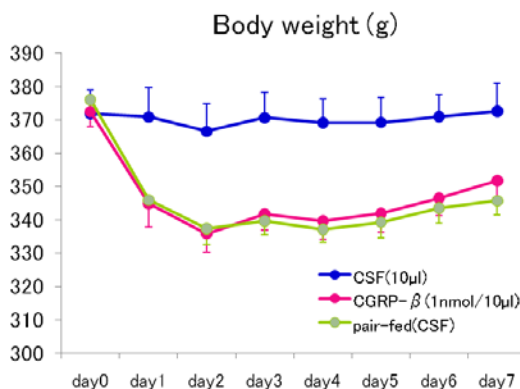
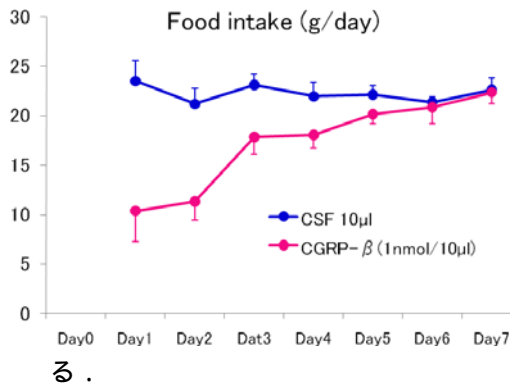
脳室内 rCGRPβ 投与時の摂食量(暗期)



脳室内 rCGRP β 投与時の摂餌量(明期)



- (3) さらに慢性投与により、摂食抑制作用は持続したが、投与を持続するにつれてその作用は減弱した。また慢性投与により体重減少作用がみられたが、これについても投与を継続するにつれてその作用は減弱した。さらに、CGRP 投与群と同じ摂餌量を与えた Pair-fed 群よりも CGRP 投与群の体重減少が強くみられたことは、CGRP の体重減少作用は摂食低下作用だけではないことを示唆している。



CRSP-1 はその発見が待ち望まれていた中枢性カルシトニン受容体に対する内在性リガンドであり、これまでにカルシトニンで想定されていた種々の作用を発揮できること

が明らかになったが、その作用機序は不明な点が多い。CRSP-1 の発見は中枢カルシトニン受容体の機能を解明する上で大きな進歩であり、CRSP-1 の機能解明により、複雑なカルシトニン、CGRP 系全体の機能が初めて明らかにできるものと思われる。そのためにはヒト、ラット、マウス CRSP-1 の同定が今後の研究を推進するための大きな課題であり、その候補と考えられるラット CGRP の中枢作用に関する検討は非常に重要であると考えられる。今回、CGRP の予想された中枢作用を確認することができたが、その作用機序を明らかにすることはできなかった。

CRSP の CGRP に対する高い配列類似性とカルシトニンに対する極めて低い相同性に反して、CRSP-1 がカルシトニン受容体に特異的に作用し、CGRP 受容体には全く作用しない点は、受容体とこれらリガンドとの相互作用、特異的な受容体活性化薬剤などの開発に重要な知見を提供すると考えられ、構造・活性相関や受容体結合様式の解明は意義あるものとする。臨床的研究意義としては、現在、魚類のサケカルシトニンやウナギカルシトニンが骨粗鬆症やその疼痛の治療薬として用いられているが、CRSP-1 や CGRP に同様の作用が認められれば同様に骨粗鬆症の予防・治療や鎮痛に有用な薬剤になると考えられる。また、CRSP-1 や CGRP の摂食抑制および慢性投与による体重減少の作用機序が明らかになれば、中枢のカルシトニン受容体をターゲットとした食欲抑制、抗肥満薬の開発につながることを期待される。

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0件)

[学会発表](計3件)

澤田浩武, 「脳内カルシトニンの機能解析」, ヒューマトロープ発売 20 周年記念講演会, 2009 年 11 月 21 日, 福岡

澤田浩武, 「脳内カルシトニン受容体の機能解析および内因性リガンド探索」, 第 14 回小児分子内分泌研究会, 2010 年 7 月 3 日, 北海道

Minamino Naoto,
Peptidomics-based discovery of biologically active peptides,
International Symposium: Frontier in Biologically Active Peptide Research,
December 7, 2010, Kobe

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/pharmacology/001/index.html#-a>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 浩武 (SAWADA HIROTAKE)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：40332895

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

南野 直人 (MINAMINO NAOTO)

国立循環器病センター・薬理部・部長

研究者番号：50124839