

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590247

研究課題名（和文）摂食抑制ホルモンNesfatin-1の脂肪分化抑制機構の解明と肥満治療への応用

研究課題名（英文）

Clinical application of Nesfatin-1 to obesity from the point of the suppression of adipogenesis.

研究代表者

岡田 秀一 (OKADA SHUICHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20260474

研究成果の概要（和文）：

【目的】 Nucleobindin-2（以下 Nucb2）の脂肪細胞分化に対する作用を検討した。

【方法と結果】 3T3-L1 細胞を用いた。ウエスタンブロットによると、Nucb2 の発現は脂肪細胞へ分化するに従い減少した。3T3-L1 細胞の conditional medium とヒトの血漿中に Nucb2 が存在することをウエスタンブロットで確認し、血漿中には凡そ 50 nM の濃度で存在すると計算された。種々の濃度の GST-Nucb2 を 3T3-L1 細胞の培養液中に、脂肪細胞への分化開始 48 時間前から、24 時間または 48 時間ごとに添加し、分化開始後 8 日目に oil red 染色で脂肪細胞への分化の程度を評価した。その結果、50 nM で明らかな抑制効果を得た。RT-PCR にて PPAR $\gamma$ 、adipsin の mRNA 量を、ウエスタンブロットにて発現量を評価したところ、同様の結果を得た。Nucb2 からは Nesfatin-1 が形成されるので、GST-Nesfatin-1、GST- $\Delta$ Nesfatin-1[Nucb2 から Nesfatin-1 部分を除いたもの]について同様の検討を行ったが、脂肪細胞への分化抑制作用は認められなかった。

【考察】 Nucb2 には脂肪細胞への分化抑制作用が存在する。

研究成果の概要（英文）：

Nucleobindin-2 is a 396 amino acid EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding protein that can be further processed to generate an 82 amino terminal peptide termed Nesfatin-1. To examine the function of Nucleobindin-2 in adipocyte differentiation, cultured 3T3-L1 adipogenesis were incubated with various concentrations of GST, GST-Nucleobindin-2, GST-DNesfatin-1 or GST-Nesfatin-1 prior to and during the initiation of adipocyte differentiation. Nucleobindin-2 treatment at physiological concentrations decreased neutral lipid accumulation (Oil-Red O staining) and expression of several marker genes for adipocyte differentiation (PPAR $\gamma$ , aP2, and adipsin). In contrast, deletion of the Nesfatin-1 domain in Nucleobindin-2 (DNesfatin-1) had no significant effect on 3T3-L1 adipocyte differentiation. Although Nesfatin-1 treatment alone also reduced 3T3-L1 adipocyte differentiation and expression of marker genes, this required super physiologic concentrations. Moreover, 3T3-L1 cells stably over expressing Nucleobindin-2 displayed

a significant reduction of adipocyte differentiation. In contrast, reduced expression of Nucleobindin-2 by shRNA resulted in a marked increase of adipocyte differentiation. Taken together, these data indicate that Nucleobindin-2 is secreted from preadipocytes and functions as a suppressor of adipocyte differentiation.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：代謝

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：肥満、脂肪分化

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は、procolipase を前駆体とする enterostatin が (i) 炭水化物や蛋白質摂取に比べて脂肪摂取を選択的に抑制すること、(ii) 高脂肪食を好み食事性肥満を来し易い Osborne-Mendel ラットでは enterostatin の level が低く、高炭水化物食を好み高脂肪食を嫌い食事性肥満には抵抗性を示す S5B/P1 ラットでは enterostatin の level が高いこと、(iii) enterostatin を持続的に末梢投与すると高脂肪食を与えた Osborne-Mendel ラットにおいて体重増加が有意に減少することを報告した。脂肪摂取を選択的に抑制するアプローチは、我が国における欧米化した食生活を背景に増加傾向を示す肥満症の治療には有効な対策法の一つと考えられる。しかしながら、enterostatin のヒト肥満者への臨床応用の成果は満足のいくものではなかった (David A. York 等)。

昨年我々は、新たな食欲抑制物質として Nesfatin1 を発見し、肥満の成因に関わっている事実とともに報告した。肥満の治療においては、強力に食欲を抑制することは有力な方策であるが、抑制の度合いが強過ぎると体重の減少以外に、栄養のバランスを欠く等の弊害をもたらす可能性がある。

肥満を治療する上で、食欲の抑制だけでなく、同時に直接的に脂肪組織の増大や脂肪細胞の肥大化を抑制することを併せて行うことが出来れば、より効果的で、より確実に弊害の更に少ない治療法となり得るのではなからうか。この様な観点から、今回我々は、Brain-Adipose Axis なる概念に着目し、摂食を抑制する因子は脂肪組織にも存在し脂肪

分化の抑制等にも深く関わっているのではないかと考え、新規摂食抑制因子である Nesfatin1 の肥満治療薬への応用を踏まえ、その脂肪細胞への分化抑制作用について研究を行うこととした。

#### 2. 研究の目的

レプチン (Leptin) は有力な肥満治療候補分子であったが、ヒト肥満者にはレプチン抵抗性が存在するので、現在迄の所、レプチンの肥満治療薬としての可能性は否定的である。一方、Nesfatin1 はレプチン抵抗性を有する肥満動物モデルにおいても、摂食抑制効果、体重の減少効果が認められることを我々は確認し報告をした。従って、肥満治療薬としてヒトへの臨床応用を考えると、Nesfatin1 には大きな期待が持てると思われる。本研究は、Nesfatin1 に脂肪分化抑制作用が認められるか否かに端を発し、その作用機序等を含め Nesfatin1 の摂食抑制作用以外の生理的機能について、新たな肥満治療戦略の確立を目指して、総合的にアプローチするものである。従って、新たな有力な肥満治療法を開発出来る可能性が強いことに加えて、脂肪細胞の分化・誘導の機序に関して新たな機序が見出されることが期待される。

#### 3. 研究の方法

本研究プロジェクトは、以下の4つの異なる研究から成る。

(A) 3T3L1 脂肪細胞を用いた *in vitro* の系で、細胞培養液へ種々の濃度の Nesfatin1 を前駆脂肪細胞の段階から添加することにより、Nesfatin1 に脂肪細胞への分化抑制作用が認

められるか否かを oil red 染色にて定量的に検討する。また、real time PCR にて脂肪細胞のマーカー分子 (PPAR $\gamma$ 、Glut4 等) の増減を定量的に検討する。(平成 20 年度)。

(B) 3T3L1 前駆脂肪細胞の細胞膜に存在する分子で Nesfatin1 と特異的に結合する分子を同定・クローニングする。GST-pull down 法に LC/MS (液体クロマトグラフ質量分析装置) を併用して行う。クローニングを終えたら、3T3L1 前駆脂肪細胞に過剰発現させたり、RNAi で knock down を行い、脂肪細胞への分化・誘導に関連する生理的機能を確認する。(平成 20~21 年度)。

(C) Nesfatin1 を 3T3L1 前駆脂肪細胞に添加した際の細胞内シグナルの解析を網羅的に RNA array で行う。このアプローチにより、脂肪細胞への分化を抑制的に調節する新たなシグナル伝達系が明らかになる可能性がある。(平成 20~21 年度)。

(D) Nesfatin (Nesfatin1 の前駆体) の T290 は Akt によりリン酸化され得るモチーフ内に存在する。Nesfatin が Akt によりリン酸化されるか否かや Nesfatin が Akt にリン酸化されることの生理的意義 (Nesfatin1 の合成・分泌を制御しているかも知れない等) について検討する。

#### 4. 研究成果

A. Nucleobindin-2 には脂肪分化抑制作用が存在することを明らかにした。

B. その主作用部位は、Nesfatin-1 の部分ではなく、Nucleobindin-2 全長にあることを見出した。

C. Nucleobindin-2 には細胞増殖抑制作用が存在することを見出した。

#### 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 7 件)

1. Yamada M, Okada S, et al  
Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ , stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene.

Endocrinology 151 2010 2492-2503

査読あり

2. Tshchiya T, Okada S et al  
Fasting Concentrations of Nesfatin-1 Are Negatively Correlated with Body Mass Index in Non-Obese Males.

Clin. Endocrinol. 73 2010 2494-2503

査読あり

3. Ando T, Okada S et al  
Impaired glucose tolerance, but not impaired fasting glucose, is a risk factor for early-stage atherosclerosis.

Diabet. Med. 27. 1430-5, 2010

査読あり

4. Shimizu H, Okada S et al  
Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism.

Endocrinology. 150, 662-671, 2009

査読あり

5. Horiguchi K, Okada S, et al  
Aberrant histone modifications at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone: analysis of F455S mutant thyroid hormone receptor.

Ryohei Umezawa, Masanobu Yamada,

Endocrinology. 150. 3425-3432, 2009

査読あり

6. Shimizu H, Okada S, et al  
Administration time difference of Candesartan effect on albuminuria in type 2 diabetic patients.

Hypertension Research. 32, 527-528, 2009

査読あり

7. Hashimoto K, Okada S, et al  
Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) gene expression is positively regulated by thyroid hormone.

Endocrinology. 150. 3417-3424, 2009

査読あり

[学会発表] (計 1 件)

1. Okada S, et al  
CDK5 inhibition restores TNF- $\alpha$  induced insulin resistance in 3T3L1 adipocytes.

70th Scientific sessions (ADA)

2010. 6. 25-29 Orlando, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 秀一 (OKADA SHUICHI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号：20260474