

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591045

研究課題名（和文）摂食抑制ホルモンNesfatin-1の細胞内シグナル伝達経路の解明

研究課題名（英文）Analysis of intracellular signaling pathway of an anorexic hormone 'Nesfatin-1'.

## 研究代表者

橋本 貢士 (HASHIMOTO KOSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30396642

## 研究成果の概要（和文）：

新規摂食抑制ホルモンNesfatin-1及びNesfatin-1の活性中心であるM30を添加するとマウス神経芽細胞腫由来の細胞(MNB)内のcAMP応答配列結合蛋白のリン酸化が増加し、かつNesfatin-1特異的受容体はマウス視床下部及びMNB細胞膜画分に存在するという結果を得た。さらにNesfatin-1の細胞内シグナル伝達機構にメラノコルチン4受容体を介したシグナル伝達経路が不可欠であることが判明した。

## 研究成果の概要（英文）：

Nesfatin-1, which is a novel anorexic hormone, induces phosphorylation of intracellular cAMP response element binding protein (CREB) in MNB cells derived from mouse neuroblastoma. M30, which is a truncated peptide of Nesfatin-1(24-53aa), also exerts a similar effect as Nesfatin-1. Nesfatin-1 specific receptor is located in cell membrane fraction of mouse hypothalamus and MNB cells. Melanocortin 4 receptor per se and its signaling pathway is essential to the intracellular signaling machinery exerted by Nesfatin-1/M30.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：中枢性摂食調節

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム、Nesfatin-1、摂食抑制、遺伝子、受容体、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 私達は最近、新規視床下部ホルモンであるNesfatin-1をクローニングし、Nesfatin-1が視床下部に作用して強力な摂食抑制作用を示すことを発見した (Oh-I S, et al: Nature

443: 709-712, 2006)。Nesfatin-1の脳室内及び末梢投与によって摂食抑制と体重減少が持続的に認められ、皮下脂肪だけでなく内臓脂肪も著明に減少する。

(2) 摂食抑制と内臓脂肪減少効果と言う特色から Nesfatin-1 はメタボリックシンドロームに対する有望な治療薬となることが期待されるが、臨床応用のためには Nesfatin-1 受容体を同定する必要があり、その受容体アゴニストの開発は新薬創薬につながるものと考えられる。

(3) さらに我々は $\alpha$ -メラニン細胞刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) を脳室内投与すると、Nesfatin-1 をコードする NUCB2 遺伝子 mRNA 発現が視床下部で増加すること、またさらにメラノコルチン(MC)4 受容体 (MC4R) の特異的アンタゴニストである SHU9119 を脳室内に投与すると Nesfatin-1 の摂食抑制作用が消失することを見いだした。これにより、Nesfatin-1 の薬理作用に MC4R によるシグナル伝達系が大きな影響を与えていることが示唆されたが、Nesfatin-1 は MC4R を介した cAMP 産生、カルシウムの細胞内流入に影響を与えなかった。これらの知見から Nesfatin-1 自体は MC4R のリガンドではないが、Nesfatin-1 の作用には MC4R によるシグナル伝達系の存在が不可欠であることが予想される。この Nesfatin-1 の作用における MC4R の役割を解明することは Nesfatin-1 の作用の解明に貢献するのみならず、Nesfatin-1 の臨床応用に向けての重要な新知見をもたらすと考えられる。

(4) これらの経緯を踏まえて、

Nesfatin-1 の細胞内シグナル伝達経路を解明するという観点から研究を行った。

## 2. 研究の目的

(1) Nesfatin-1 による細胞内シグナル伝達経路を解明し、Nesfatin-1 特異的受容体を同定する。

(2) さらに Nesfatin-1 による細胞内シグナル伝達における MC4R の役割を解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 様々な神経細胞由来の株細胞に CRE(cAMP response element) を Luciferase (LUC) レポーターに組み込んだベクター (CRE-LUC レポーター) を遺伝子導入し Nesfatin-1 を投与してレポーター活性を測定、およびラジオイムノアッセイによる細胞内 cAMP 測定および CRE 結合蛋白 (CREB) のリン酸化を定量した。

(2) 上記の実験を Nesfatin-1 の中心部分となる 24 番目から 53 番目アミノ酸残基の 30 アミノ酸 (M30) を用いて行った。

(3) MNB 細胞にマウス MC4R 特異的 small interfering (si)RNA を遺伝子導入し、MC4R の発現を減少させるもしくは MC4R の特異的アンタゴニストである SHU9119 の添加下に、Nesfatin-1 もしくは M30 を添加して細胞内 CREB のリン酸化を定量した。

(4) マウス視床下部及び MNB 細胞の細胞膜画分を用いた、 $^{125}\text{I}$ -Nesfatin-1 に

よるラジオレセプターアッセイを行った。

#### 4. 研究成果

(1) CRE-LUC レポーターを遺伝子導入した MNB 細胞に Nesfatin-1 または M30 を添加すると用量依存的にレポーター活性が上昇した。CRE-LUC レポーターを恒常発現する細胞株においても同様な結果を得た。

(2) さらに Nesfatin-1 または M30 の添加によって濃度依存的に MNB 細胞内 CREB のリン酸化が増加した。ただし細胞内 cAMP の増加は認めなかった。この結果から Nesfatin-1、M30 ともにその添加により細胞内 CREB のリン酸化を促進することが判明した。しかしその機序には必ずしも細胞内 cAMP の上昇を伴わない事が示唆された。

(3) 一方 SHU9119 との共添加並びに siRNA による MC4R の knockdown (mRNA level で 30-60% の reduction) では、Nesfatin-1 または M30 による CREB のリン酸化の増加は消失した。これらの結果から Nesfatin-1 または M30 による MNB 細胞での CREB のリン酸化には、MC4R の存在もしくは MC4R を経由する細胞内シグナル伝達経路が必要であることが判明した。

(4) マウスの視床下部の細胞膜画分を用いたラジオレセプターアッセイを行った。マウス視床下部より調整した膜分画には  $^{125}\text{I}$ -Nesfatin-1 が特異的に結合し、Kd 値は  $0.79 \pm 0.24 \text{ nM}$  であった。同様の結果は MNB 細胞の膜画分を用いても得られた。これらの結果によりマウス視床下部ならびに MNB 細胞に Nesfatin-1 特異的受容体が存在することが示唆された。

#### 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 5 件)

① Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males.

Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, Oh-I S, Ariyama Y, Takahashi H, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Kojima M, Mori M. Clin Endocrinol (Oxf). 2010 73:484-490.

査読有

② 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.

Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Satoh T, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Endocrinology. 2010 151:2494-2503.

査読有

③ Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway.

Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Dietrich MO, Tanaka S, Dezaki K, Oh-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Nakata M, Mori M, Yada T.

Cell Metab. 2009 10:355-365.

査読有

④ Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism.

Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M.

Endocrinology. 2009 150:662-671.

査読有

⑤ The satiety molecule nesfatin-1 is co-expressed with melanin concentrating hormone in tuberal hypothalamic neurons of the rat.

Fort P, Salvert D, Hanriot L, Jego S, Shimizu H, Hashimoto K, Mori M, Luppi PH. Neuroscience. 2008 155:174-181.

査読有

[学会発表] (計9件)

①山田正信, 堀口和彦, 梅澤良平, 田口亮, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 清水弘行, 森昌朋, チアゾリジン誘導体の NUCB2 mRNA 安定性制御機構 第31回日本肥満学会、2010.10.2 前橋テルサ(群馬県)

②石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 摂食抑制ペプチド nesfatin-1 に対する細胞内シグナル伝達と Melanocortin Receptor の関連 第31回日本肥満学会、2010.10.1 前橋テルサ(群馬県)

③石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 摂食抑制ペプチド nesfatin-1 の細胞内シグナル伝達機構の解析. 第53回日本糖尿病学会年次学術集会 2010.5.28 岡山国際交流センター(岡山県)

④Emi Ishida, Koshi Hashimoto, Tetsurou satoh, Shuichi Okada, Masanobu Yamada, Hiroyuki Shimizu, Masatomo Mori Melanocortin 3/4 receptor is essential to the intracellular signaling pathway of nesfatin-1. 14th International Congress of Endocrinology(ICE2010) 2010.3.30 京都国

際会館(京都府)

⑤三浦敦子, 岡田秀一, 清水弘行, 土屋天文, 上原豊, 橋本貢士, 山田正信, 高橋洋樹, 大崎綾, 大島喜八, 森昌朋 Nesfatin/Nesfatin-1はadipogenesisを抑制する. 第82回日本内分泌学会学術総会 2009.4.23 群馬県民会館(群馬県)

⑥石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 摂食抑制蛋白 nesfatin-1 の細胞内シグナル伝達と Melanocortin Receptor の関与. 第82回日本内分泌学会学術総会 2009.4.23 群馬県民会館(群馬県)

⑦石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 新規摂食抑制蛋白 nesfatin-1 の細胞内シグナル伝達経路の解析 第35回日本神経内分泌学会 2008.8.29 政策研究大学院大学(東京都)

⑧石田恵美, 橋本貢士, 堀口和彦, 松本俊一, 吉野聡, 梅澤良平, 中島康代, 石塚高広, 橋田哲, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋 新規摂食抑制蛋白 nesfatin-1 の細胞内シグナル伝達経路の解析 第81回日本内分泌学会学術総会 2008.5.16 ホテル青森(青森県)

⑨梅澤良平, 山田正信, 堀口和彦, 石塚高広, 橋田哲, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 清水弘行, 森昌朋 ヒトネスファチン1(NUCB2)遺伝子構造と発現制御機構の解析 第81回日本内分泌学会学術総会 2008.5.16 ホテル青森(青森県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 貢士 (HASHIMOTO KOSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30396642