

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 19 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03153

研究課題名(和文)新規ペプチド“NURP”と“NSRP”のトランスレショナルリサーチ

研究課題名(英文)Translational research of novel peptides "NURP and NSRP"

研究代表者

中原 桂子(Keiko, Nakahara)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90315359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ニューロメジンU(NMU)とニューロメジンS(NMS)の前駆体中には、それぞれ新たなペプチドNURP(NMU前駆体関連ペプチド)とNSRP(NMS前駆体関連ペプチド)が含まれており、実際に中枢に広く存在することを明らかにした。cFos発現部位の探索から、NMUは主に室傍核のCRHニューロン、弓状核のドーパミンニューロンに直接作用し、一方で、NURPは扁桃体の腹側海馬台に作用し、セロトニンに作用することが示唆された。同じ前駆体から切り出されるにもかかわらず、NMUとNURPの中枢における標的領域と生理作用は明らかに異なり、NURPも中枢において重要な生理的役割を果たしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たなペプチドの機能解析は、創薬などにつながる可能性を秘めている。ニューロメジンU(NMU)およびニューロメジンS(NMS)の前駆体にはNURP(ニューロメジンU前駆体関連ペプチド)とNSRP(ニューロメジンS前駆体関連ペプチド)と言う新たな機能性ペプチドが含まれていたことから、それらの生理機能や作用機序を解明した。その結果、これら新規ペプチドにも交感神経様作用があるが、一方で、プロラクチン分泌に関して、NMUは抑制、NURPは促進作用と言う逆の作用を示した。すなわち、同じ前駆体中のホルモンにもかかわらず作用や作用部位などが異なることが判明し、今後の創薬への道を開くものである。

研究成果の概要(英文)：We found that the precursors of neuromedin U (NMU) and neuromedin S (NMS) contain novel peptides NURP (neuromedin U precursor-related peptide) and NSRP (neuromedin S precursor-related peptide), respectively, which are indeed widely present in the central region. cFos expression site-search suggested that NMU acts directly on CRH neurons mainly in the paraventricular nucleus and dopamine neurons in the arcuate nucleus, while NURP acts on the ventral hippocampal stand of the amygdala and on serotonin. Despite being excised from the same precursor, the target regions and physiological actions of NMU and NURP in the CNS were clearly different, suggesting that NURP also plays an important physiological role in the CNS.

研究分野：神経生理学、内分泌学、薬理学

キーワード：ニューロメジン 新規ペプチド プロラクチン 自律神経

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

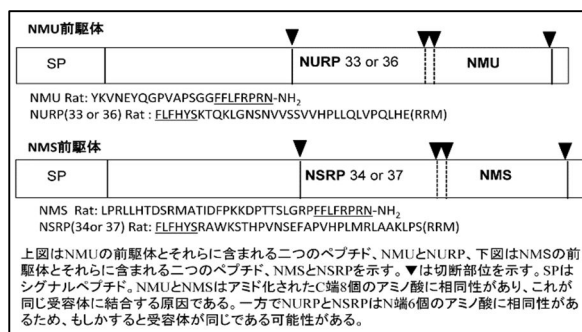
新たなペプチドの発見は、これまでの生理機能や生理作用機序の解釈を大きく変えると同時に、新薬に結びつく可能性が極めて高い。申請者は、これまでに犬、猫、牛のグレリンの同定や、グレリンの動物での摂食促進作用や体温低下作用を発見してきた。また、国立循環器病センターとの共同研究により、ニューロメジン U (NMU) を同定し、さらに 2005 年には、同じ受容体に結合する新たなペプチド、ニューロメジン S (NMS) が同定された。両者のペプチドは同じ受容体に同程度の親和性を持って結合するが、全く別の染色体の遺伝子にコードされており、アミノ酸配列も異なる。生理作用の探索では両者ともに、摂食抑制作用、生体時計調節作用、反射促進作用、および様々な自律神経(特に交感神経)様作用を示した。近年、先の NMU と NMS のそれぞれの前駆体中には、新たなペプチド NURP (Neuromedin U Related Peptide ニューロメジン U 前駆体関連ペプチドと命名) と NSRP (Neuromedin S Related Peptide ニューロメジン S 前駆体関連ペプチドと命名: 未発表) が含まれていること(下図)、また、それらが実際に中枢に存在することを明らかにした (Scientific Reports, 2017)。さらに、同じ前駆体中に存在する NMU と NURP はプロラクチンの分泌に関して全く相反的な制御を行っていることを最近、明らかにした。本研究は、今回新たに同定され、神経でその存在が判明した NURP と NSRP は、中枢でどのような生理的意義を有しているのか? NMU と NURP あるいは NMS と NSRP はそれぞれ同じ前駆体から同時に切り出されるのか? あるいは部位特異的に切り出されるのか? どのように臨床に応用されるのか? などを解明することにある

2. 研究の目的

本研究は、申請者が最近報告した新たな二つのペプチド NURP と NSRP について先の「背

景」に記したような疑問を基礎的および応用的研究を通して解明して行くことにある。この報告書では、「はたして新規ペプチド NURP と NSRP は NMU や NMS と異なる部位に作用するのか」を研究課題の(1)として掲げ、これらのペプチドの中枢投与後の cFos 発現を指標に解明することとした。これは、「研究開始当初の背景」で記した「NMU と NURP あるいは NMS と NSRP はそれぞれ同じ前駆体から同時に切り出されるのか? あるいは部位特異的に切り出されるのか?」の解明につながると思われる。ところで、我々は、同じ前駆体中に存在する NMU と NURP がプロラクチン分泌に関して、全く逆の作用を示すことをすでに見出したが、その原因は未だ不明である。そこで、研究課題の(2)として、NMU と NURP のプロラクチン分泌作用機序はどのように異なるのかを掲げた。そして、これらのペプチドが臨床的に応用できるのか? を検討するため、近年、東京薬科大学で開発された NMU のアナログ CPN129 の生理作用を検討することとした。

3. 研究の方法



実験(1) : NMU と NURP、NMS と NSRP を投与後、中枢において活性化した神経細胞 (cFos 発現神経細胞) を探索し、作用部位の検討を行った。投与 4 日前に側脳室カニューレを装着した成熟雄 Wistar ラットに、生理食塩水、1nmol/10 μ l の NMU、NURP をそれぞれマイクロシリンジで投与し、投与後 90 分に脳を採取した。直ちに OCT コンパウンドで凍結包埋した後、17 μ m の厚さで連続脳切片を作成し、c-Fos 抗体を用いた蛍光免疫組織染色を行った。

実験(2) : NMU と NURP のプロラクチン分泌に対する作用機序の違いを解明するために、成熟雄ラットの側脳室に 0.2 あるいは 1nmol/10 μ l の NMU、NURP を投与し、投与直前および投与 30 分と 60 分後に尾部切開法により採血し、プロラクチン濃度を測定した。さらに、90 分後に断頭屠殺し脳を取り出した。直ちに OCT コンパウンドで凍結包埋した後、連続脳切片を作成し、c-Fos 抗体および抗 Tryptophan hydroxylase 抗体(セロトニン神経細胞の同定のため)あるいは、c-Fos 抗体および抗 Tyrosine hydroxylase 抗体(ドーパミン細胞の同定のため)を用いた二重染色を行い、蛍光免疫組織染色を行った。

実験(3) : NMU のアナログ CPN129 が果たして NMU と同様の作用を示すのか以下の実験を行った。(ア) 摂食量への影響 : CNP129 が果たして NMU と同様に夜間の摂食量を抑制するか否かを検討した。暗期(19:00~7:00)開始 1 時間前の 18:00 に NMU, CNP129 (以下 CNP) あるいは生理食塩水を投与し、19:00~7:00 の 12 時間の摂食量を調べた。(イ) ラットの生理的高プロラクチン状態(泌乳期、ストレス期等)において、CNP129 がプロラクチンの上昇を抑制するか否かを調べた。泌乳期の高プロラクチンへの影響には、分娩 5 日後の泌乳ラット(母親)を使用した。すべての母親ラットの乳児数は分娩後、6 匹にそろえ、CNP, NMU あるいは生理食塩水を 15 時に中枢投与し、10, 20 および 60 分後に尾部切開法で採血し、血中プロラクチン値を測定した。次にストレス条件下の高プロラクチンに対する CNP あるいは NMU の作用を比較するために、拘束ストレスラットを使用した。成熟雄ラットの側脳室にステンレスチューブを埋没し、4 日後の 9:00 に尾部切開法で採血した後(0 分) CNP, NMU あるいは生理食塩水を中枢投与し、投与直後に軽くエーテルで麻酔した。その後、直ちに腹ばいにして四肢をガムテープで 20 分間固定した。固定後 10, 20 分後に採血し、拘束を解除した。解除 40 分後に再度採血し、血中プロラクチン値を測定した。(ウ) 上記の結果を受けて、CNP129 のプロラクチン抑制作用が果たして、弓状核のドーパミンニューロンへの作用であるのか否かを cFos 発現で検証した。1nmol/10 μ l の NMU、CNP をそれぞれ投与し、投与後 90 分に脳を採取した。OCT コンパウンドで凍結包埋した後、連続脳切片を作成し c-Fos 抗体を用いた蛍光免疫組織染色を行った。

4 . 研究成果 実験(1) : 同じ前駆体中に存在する機能性ペプチドの NURP と NMU の脳室内投与後の cFos 発現部位において顕著な相違がみられた部位を右上表にまとめた。表中の(+)印が発現量の相対値を示している。NMU の側脳室投与が、視床下部の中でも、室傍核、視索前野、視交叉上核に cFos を発現させたのに対し、

NMUとNURPの側脳室投与によるcFos発現の部位(領域)の比較

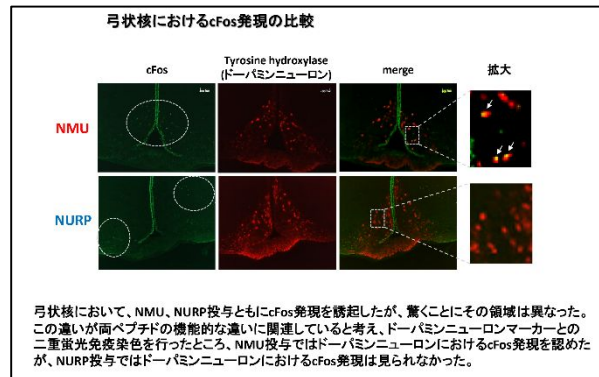
cFos 発現部位	NMU	NURP
室傍核(視床下部)	++++	+
視索前野(視床下部)	++	+
視索上核(視床下部)	+++	-
弓状核(視床下部)	+	+*
扁桃体中心核	++	-
腹側海馬台	-	++

* 発現細胞の分布が異なる

cFos発現量の+の数や-はボランティア3名の評価によって決定した。

NURP は腹側海馬台にかなり特異的に cFos を発現させ、視床下部においては、NMU よりもかなり少ない発現に留まった。

また非常に興味深いことに、視床下部弓状核においては、両者ともに cFos 発現を誘起したが、発現部位に相違が認められた（右下写真）。そこで、cFos を発現した細胞がドーパミン細胞か否かを検討した結果、NMU 投与ではドーパミン陽性細胞の一部に cFos が発現しているのに対し、NURP 投与では、ドーパミン陽性細胞には cFos は発現しなかった。

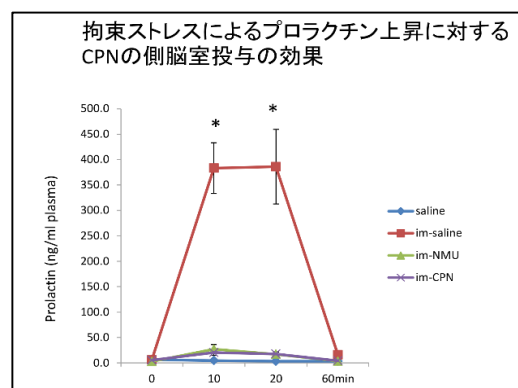


実験(2): 実験1において、NURPのプロラクチン分泌促進作用が弓状核のドーパミン神経細胞では無いことが判明したため、腹側海馬台の関与を調べた。腹側海馬台にはセロトニン神経細胞が存在するため、抗 Tryptophan hydroxylase 抗体と cFos 抗体による二重染色を行った結果、セロトニン陽性細胞に cFos の発現が認められた。すなわち、NURP は腹側海馬台のセロトニン神経細胞に作用し、セロトニン分泌を促進させ、これが弓状核のドーパミン神経細胞からのドーパミン分泌を抑制させている可能性が示唆された。

実験(3)(ア): 生理食塩水投与ラットの夜間 12 時間の摂食量は 23.04 ± 1.47 g に対して NMU 投与では 19.24 ± 0.52 g であり、CPN 投与では 14.15 ± 1.51 g であった。すなわち、NMU および CPN は有意に夜間の摂食量を抑制した。

(イ): まず、泌乳期の母親ラットにおいて 15 時に生理食塩水を側脳室投与したラットでは投与 10、20、60 分後のプロラクチン値は 62.33 ± 6.55 、 68.28 ± 4.39 および 73.10 ± 8.55 ng/ml であったのに対して、同時刻に NMU を投与した群の 10、20、60 分後のプロラクチン値は 8.11 ± 2.22 、 12.36 ± 4.91 、 18.77 ± 3.05 ng/ml であり、CPN 投与群は 6.33 ± 3.21 、 8.14 ± 0.91 、 12.31 ± 2.66 ng/ml であった。NMU と CPN 投与群は生理食塩水投与群に比較して 10、20、60 分のいずれにおいても有意に低い値を示した。一方で、NMU と CPN 群との間には投与後 60 分のみ有意差が認められた。

拘束ストレスによる高プロラクチンへの影響では、生理食塩水投与後に拘束(20分間)ストレスを付加すると、血中プロラクチン値は拘束 10 分後に著しく上昇し、この上昇は 20 分後にも高い値を示した。拘束を解除し、その 40 分後には元の基礎レベルに戻った(右図)。一方で、拘束直前に NMU あるいは CPN を側脳室投与したラットでは、拘束によるプロラクチンの上昇は完全に阻止された。



(ウ) CPN の側脳室投与は、NMU 投与と同様に、弓状核において cFos の発現を誘起した。またその発現細胞の弓状核内分布は極めて類似していた。CPN のプロラクチン抑制作用が果た

して、NMU と同様に弓状核のドーパミンニューロンへの作用であるのか否かを抗 Tyrosine hydroxylase 抗体との二重免疫染色で確認したところ、ドーパミンニューロンに cFos の発現が認められた。

以上の結果より以下のように考えられる。以前に我々の研究室ではプロラクチンに関しては、NMU と NURP が全く逆の作用を示すことを見出した。前者がプロラクチン分泌抑制を後者が促進を起こした。同じ前駆体から切り出される NMU と NURP が全く逆の作用を示すという興味深い知見を題材として、NMU と NURP はそれぞれ同じ前駆体から同時に切り出されるのか？あるいは部位特異的に切り出されるのか？を検討するため、まず、NMU と NURP の作用部位を cFos 発現を指標に調べた。その結果、視床下部においては両者ともに多くの神経核において cFos を発現させたが、両者の作用部位は一致しなかった。また NURP は腹側海馬台など、NMU では全く作用しなかった部位の神経細胞を活性化した。この事実は、NMU と NURP はそれぞれ同じ前駆体から同時に切り出される。あるいは部位特異的に切り出される可能性を示唆するものである。さらに、NURP の側脳室投与で神経細胞が活性化された腹側海馬台にはセロトニンニューロンが多く存在し、このセロトニンニューロンは弓状核にも投射している。そこで、NURP により活性化された神経細胞がセロトニン細胞か否かを調べた結果、NURP の側脳室投与でセロトニン陽性細胞に cFos が発現することが判明した。以上の事から、NMU は弓状核のドーパミン細胞に作用し、ドーパミンを分泌促進する事でプロラクチンの分泌を抑制する。一方、NURP は腹側海馬台のセロトニン細胞に作用し、セロトニンを分泌促進し、このセロトニンは弓状核のドーパミンの産生を抑制することでプロラクチン分泌を促進すると推測された。

NMU のアナログである CPN は NMU の受容体に結合するが、その生理作用については不明であった。今回の研究において、CPN のラット側脳室投与では、以下の作用において、ほぼ NMU と同じ効力で同じ作用を示した。すなわち、夜間の NMU による摂食抑制作用は CPN 投与でも同様に認められ、同じ投与量では、やや CPN の方が強かった。また、泌乳期、拘束ストレスなどによるプロラクチンの上昇に対しても、NMU と同様に CPN は抑制作用を示した。さらに、CPN のプロラクチン抑制作用は、今回の二重免疫染色の研究結果、弓状核のドーパミン細胞に作用し、ドーパミン分泌を促進する事によると推察された。この結果は、NMU によるプロラクチン抑制機序とほぼ同じである。すなわち、NMU 受容体に結合する NMU のアナログの CPN は、NMU とほぼ同様の作用を示すことが判明し、将来的な臨床での応用が期待できるのではないかと推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Yukie, Taguchi Shimon, Maruyama Keisuke, Mori Kenji, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Murakami Noboru, Nakahara Keiko	4. 巻 534
2. 論文標題 Comparison of physiological functions between neuromedin U-related peptide and neuromedin S-related peptide in the rat central nervous system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 653 ~ 658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田 玖瑠実、丸山 圭介、村上 昇、中原 桂子
2. 発表標題 ラットにおける走行運動と摂食行動の両報酬系の相対的調節の特性について
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山 和気、松居 裕司、村上 昇、丸山 圭介、中原 桂子
2. 発表標題 偽妊娠ラットにおけるニューロメジンUとNMU前駆体関連ペプチドの発現解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	丸山 圭介 (Maruyama Keisuke) (20612386)	宮崎大学・農学部・准教授 (17601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永延 清和 (Naganobu Kiyokazu) (40264353)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	
研究分担者	井上 賀之 (Inoue Yoshiyuki) (60807436)	宮崎大学・農学部・助教 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関