

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15833

研究課題名(和文) 摂食抑制ホルモンのニューロメジンUによる摂食リズム形成機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of feeding rhythm by the neuromedin U.

研究代表者

相澤 清香 (AIZAWA, SAYAKA)

岡山大学・自然科学学域・准教授

研究者番号：90754375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NMUは摂食を抑制する作用をもち、エネルギー代謝の制御に関わるホルモンとして知られている。今回の研究では内因性NMUの機能解析のため、NMU欠損ラットを作製して摂食や肥満度への影響を解析した。その結果、NMU欠損ラットは摂食量も増えず肥満にもならなかった。これは一般飼料の給餌下だけでなく、高脂肪食を慢性的に給餌した場合でも同様であった。さらに、ラットの摂食制御に関わる脳領域では、NmuとNmur2 mRNAはほとんど発現していないことも明らかとなった。これまでNMUは摂食抑制ホルモンとして注目されていたが、生物種が違えば、たとえ非常に近縁な種であっても、その働きが異なることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、摂食抑制ホルモンであるニューロメジンUが生物種によって全く異なる作用を示すことが明らかになりました。またホルモンやその受容体の発現部位を変化させることで、同じホルモンに異なる機能をもたせることが可能になることが示されました。本研究では、マウスとラットという非常に近縁な種間での違いを示しました。生物は、私たちが考えている以上に多様性に富んでいるのかもしれませんが、マウスやラットは哺乳類の代表的なモデル生物ですが、その実験で得られた結果が他の生物にも当てはまるかどうかは十分な検討が必要です。本研究は、動物実験結果のヒトへの応用に警鐘を鳴らすとともに、生物の多様性を強く示しました。

研究成果の概要(英文)： This study aims to elucidate the role of endogenous NMU in rats. We generated NMU knockout (KO) rats that unexpectedly showed no difference in body weight, adiposity, circulating metabolic markers, body temperature, locomotor activity, and food consumption in both normal and high fat chow feeding. Furthermore, unlike reported in mice, expression of Nmu and NMU receptor type 2 (Nmur2) mRNA were hardly detectable in the rat hypothalamic nuclei regulating feeding and energy metabolism, including the arcuate nucleus and paraventricular nucleus, while Nmu was expressed in pars tuberalis and Nmur2 was expressed in the ependymal cell layer of the third ventricle. These results indicate that endogenous NMU does not function as an anorexigenic hormone in rats. Taken together with the expression pattern of Nmu and Nmur2 in the hypothalamus, the species-specific expression pattern may allow NMU to have distinct functions across species.

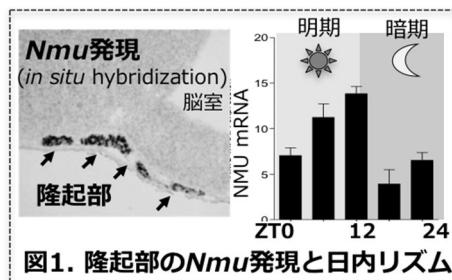
研究分野：内分泌学

キーワード：概日リズム 摂食 肥満 内分泌 下垂体

## 1. 研究開始当初の背景

近年になって体内時計の異常が摂食に影響し、肥満や代謝異常を誘発することがわかったが、体内時計が摂食を制御するメカニズムはよくわかっていない。本研究で対象とするペプチドホルモンニューロメジン U (NMU) は摂食制御に関与する因子であり、ラットでの脳室内投与実験により、摂食を抑制するとの報告が多くある。NMU 遺伝子 (*Nmu*) は、ラットでは脳下垂体隆起部 (以下、隆起部) で高発現し、申請者はこれまでに、*Nmu* 発現がメラトニンや時計遺伝子の制御を受けて概日リズムを示すことを明らかにした (図 1) (Aizawa et al. PLoS One 2013 & Mol Cell Endocrinol 2019)。ラットの摂食量が少ない明期に発現が高く、摂食量が多い暗期に発現が低かったことから、摂食の概日リズム形成と隆起部の NMU との関連性が考えられた。

以上の背景より、申請者は *Nmu*<sup>-/-</sup> ラットを新規に作出した。NMU の摂食抑制作用を考えると、*Nmu*<sup>-/-</sup> ラットは摂食リズムが乱れ、代謝異常が生じ、肥満となる可能性が考えられる。この仮説が正しければ、時間依存的な摂食リズムに関する次のようなモデルが提唱できる。すなわち、一般にラットは暗期に摂食するが、これは摂食抑制ホルモン NMU が明期に発現が高くなり、明期の摂食を抑えていることによる。*Nmu*<sup>-/-</sup> ラットではこの明期の摂食抑制が起こらないため、明期にも摂食し、リズムが乱れ、その結果として代謝異常、肥満となることが予想される。



## 2. 研究の目的

本研究では、NMU が摂食リズムの形成を担うホルモンであるかどうかを明らかにすることを目的とする。摂食リズム形成に摂食抑制ホルモンである NMU がどのように関わるか、特に、脳内摂食制御中枢への作用はあるのかを、*Nmu*<sup>-/-</sup> ラットを解析することで明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) NMU の摂食量・摂食リズムへの影響

*Nmu*<sup>-/-</sup> ラットと野生型ラットの摂食量と摂食リズムを 12h 明期 12h 暗期の光環境下で測定する。まずは、明期、暗期それぞれの摂食量から明期/暗期の比を算出して摂食リズムの乱れを判定する。

### (2) NMU の代謝機能への影響の解析

*Nmu*<sup>-/-</sup> ラットと野生型ラットの体重、脂質量および脂質・糖代謝能への影響を解析する。

#### 体重の測定

離乳時 (4 週齢) から 6 ヶ月齢まで体重を 1 週間に 1 度測定する。より詳細に、解剖して脂肪重量も測定する。まずは普通食で測定するが、嗜好性に影響がある場合も考えられるので、高脂肪食 (Research Diet 社) の給餌下でも同様に解析する。

#### 脂質・糖代謝の測定

コレステロール、中性脂肪、グルコースの血中濃度を血液生化学的検査 (依頼検査) で解析する。肝臓の脂質蓄積をオイルレッド O 染色で組織学的に観察し、さらに脂質合成転写因子 SREBP や CREBH 発現も比較する。自由摂食下の血中インスリン、レプチン濃度も ELISA で測定する。

### (3) NMU の作用メカニズムの解析

NMU の欠損が中枢性摂食制御因子の発現量に及んでいる可能性を検証するため、間脳視床下部の摂食促進因子 (NPY, AgRP, MCH, オレキシン) および摂食抑制因子 (MSH, CRH) の発現を解析する。視床下部の各神経核サンプルはレーザーマイクロダイセクションで採取する。

## 4. 研究成果

### (1) NMU の欠損が肥満の程度に及ぼす影響

NMU KO ラットは肥満となることが予想されたため、NMU 欠損が及ぼす肥満の程度への影響を検討した。その結果、今回作製した NMU KO ラットは、同腹仔の WT ラットと比較して、外観に特別な違いは見られなかった (図 2)。また体重は、離乳直後の 4 週齢から 24 週齢まで測定したが、予想に反して、NMU KO ラットの体重は WT ラットと変わらなかった (図 2)。体重に差はなかったものの、さらなる詳細な解析を行い肥満の程度への影響を検討した。しかしながら、内臓脂肪 (精巣上体脂肪、後腹膜脂肪、腎周囲脂肪) の重量、脂肪細胞の大きさともに、NMU KO ラットと WT ラットで違いはなかった。脂肪蓄積の影響を受ける肝臓も解析したが、脂肪肝の発症といった異常は観察されなかった。

さらに、血中のグルコース、総コレステロール、およびトリグリセリドの濃度を生化学分析で測定し、代謝に関わるホルモンのインスリンやレプチンも ELISA で測定したが、いずれの項目も WT ラットと NMU KO ラットの間で差はなかった。これらのことから、ラットにおいて NMU の欠損は、肥満を引き起こさないことが示された。

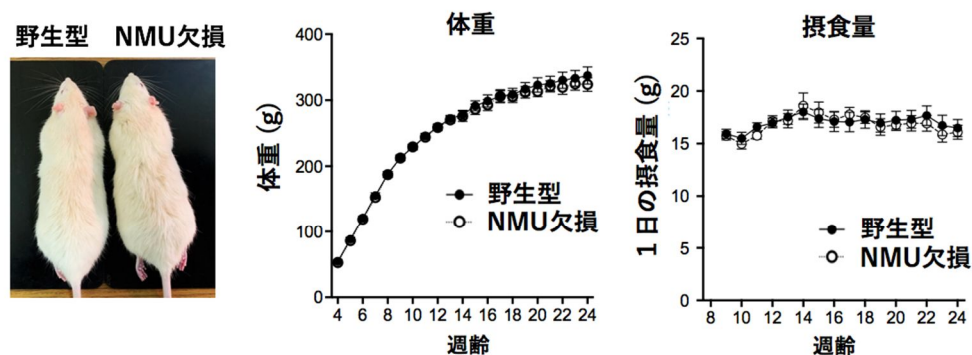


図2 野生型とNMU欠損ラットの体重と摂食量  
(Scientific Reports, 12 (1) :17472 (2022)より改変転載)

### (2) NMU の欠損が摂食量と摂食リズムに及ぼす影響

NMU の摂食抑制の作用が知られているため、次に、NMU 欠損による摂食への影響を検討した。9~24 週齢にかけて摂食量を測定したが、こちらも予想に反した結果となり、NMU KO ラットと WT ラットで差はなかった (図 2)。我々は以前に、ラットの下垂体隆起部における *Nmu* 発現が概日リズムを示すことを明らかにしており、NMU が摂食リズムの形成に関与する可能性を考えていた。そこで摂食リズムの有無の解析のため、明期および暗期の摂食量をそれぞれ測定した。しかしながら、NMU KO ラットも WT ラットと同様に、主に暗期に摂食する明瞭な 1 日の摂食パターンを示した。以上より、ラットにおける NMU の欠損は、摂食量および摂食リズムに影響を与えないことが示された。

### (3) NMU の欠損が自発活動と体温に及ぼす影響

NMU の機能として、エネルギー代謝の調節に関与することが報告されている。そこでテレメトリーシステムを用いて、飼育ケージ内での活動量と体温を測定した。その結果、1 日の活動量は NMU KO ラットと WT ラットで変わらなかった。概日リズムの観点からも解析したが、NMU KO ラットも WT ラットと同程度に、主に暗期に活動する明瞭な活動パターンがみられた。また、NMU KO ラットの平均体温も WT ラットと変わらず、明期に低く暗期に高くなるという体温の日内変動も認められた。以上の結果から、ラットにおける NMU の欠損は、自発活動や体温といったエネルギー代謝の制御には影響を与えないと考えられた。

### (4) ラットの脳における *Nmu* および *Nmur2* mRNA 発現分布

マウスの視床下部では、*Nmu* は背内側核 (DMH)、腹内側核 (VMH)、弓状核 (ARC) で発現し、NMU 受容体 2 型 (*Nmur2*) は室傍核 (PVN)、DMH、VMH、ARC で発現することが報告されている。これら神経核は、摂食やエネルギー代謝の制御に関与する脳領域である。今回の NMU KO ラットを用いた研究では、摂食やエネルギー代謝に影響が見られなかったため、ラットのこれら脳領域での *Nmu* と *Nmur2* の発現について疑問が生じた。そこで *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) と RT-qPCR で、ラットの視床下部における *Nmu* と *Nmur2* の mRNA 発現と局在を解析した。*Nmu* の ISH では、DMH、VMH、ARC などでは陽性シグナルが観察できず、その一方で、PT で *Nmu* mRNA の強い陽性シグナルが観察された (図 3)。レーザーマイクロダイセクション (LMD) で採取した各脳領域のサンプルを使用して RT-qPCR で解析したところ、*Nmu* 発現は PT において高レベルで検出されたが、DMH、VMH、ARC、PVN では検出限界に近かった (図 3)。次に、*Nmur2* の発現を ISH で調べると、ラットの視床下部の第三脳室の上衣層 (EC) でのみ、陽性シグナルが観察された (図 3)。LMD サンプルを用いた RT-qPCR 分析では、EC での *Nmur2* の高発現が検出されたが、PVN、ARC、DMH、VMH では、低発現もしくは検出限界以下であった (図 3)。これらの結果より、マウスとは異なり、ラットでは視床下部の摂食制御に関わる脳領域において、*Nmu* と *Nmur2* の発現は極めて低いことが示された。

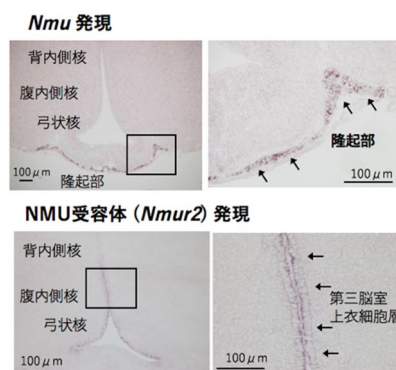


図3 野生型ラットの *Nmu* と *Nmur2* の発現分布  
(Scientific Reports, 12 (1) :17472 (2022)より改変転載)

## 本研究のまとめ

NMU は摂食を抑制する作用をもち、エネルギー代謝の制御に関わるホルモンとして知られている。これは遺伝子改変マウスの知見によって強く支持されてきた。今回の研究では同じげっ歯類のモデル生物であるラットを用いて、NMU を欠損したラットを作製した。すると予想に反して、NMU 欠損ラットでは摂食量も増えず肥満にもならないことが明らかとなった。これは一般飼料の給餌下だけでなく、高脂肪食を慢性的に給餌した場合でも同様であった。NMU 欠損の影響がマウスとラットで異なった原因として、*Nmu* とその受容体の *Nmur2* の発現分布の違いによることが考えられた。マウスの視床下部では、*Nmu* は ARC, DMH, VMH で発現し、*Nmur2* は PVN, DMH, VMH, ARC で発現すると報告されている。これら発現分布は、マウスの NMU が摂食やエネルギー代謝を調節する可能性を強く支持している。しかしながら、我々のラットを用いた解析では、これらの摂食制御に関わる脳領域では、*Nmu* と *Nmur2* mRNA はほとんど発現していないことが明らかとなった。それゆえ、ラットで NMU を欠損させても、体重や摂食に影響が見られないのだと考えている。

本研究では、NMU KO ラットを用いて、ラットの内因性の NMU が摂食やエネルギー代謝の制御には重要ではないことを示した。これまで NMU は摂食抑制ホルモンとして注目されていたが、生物種が違えば、たとえ非常に近縁な種であっても、その働きが異なることが明らかになった。NMU は生物種特異的に遺伝子発現パターンを変えることで、異なる機能をもたらすのかもしれない。今後は、ラットにおける NMU の欠損がどのような影響をもたらすのか、つまり NMU の新規の生理機能を明らかにすることが期待される。

本研究は Neuromedin U-deficient rats do not lose body weight or food intake (Yokogi K, Goto Y, Otsuka M, Ojima F, Kobayashi T, Tsuchiba Y, Takeuchi Y, Namba M, Kohno M, Tetsuka M, Takeuchi S, Matsuyama M, Aizawa S) と題して Scientific Reports, 12 (1) :17472 (2022) に発表した。

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 Yokogi Kyoka, Goto Yuki, Otsuka Mai, Ojima Fumiya, Kobayashi Tomoe, Tsuchiba Yukina, Takeuchi Yu, Namba Masumi, Kohno Mayumi, Tetsuka Minami, Takeuchi Sakae, Matsuyama Makoto, Aizawa Sayaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Neuromedin U-deficient rats do not lose body weight or food intake	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-21764-6	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横木杏香・小島史也・竹内 栄・松山 誠・相澤清香
2. 発表標題 ラットにおけるニューロメジンU遺伝子欠損の摂食と肥満への影響
3. 学会等名 生物系三学会 中四国地区合同大会 香川大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横木杏香・小島史也・竹内 栄・松山 誠・相澤清香
2. 発表標題 ニューロメジンU遺伝子改変ラットにおける摂食と脂肪蓄積の解析
3. 学会等名 日本動物学会 第92回米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤佑紀, 横木杏香, 小島史也, 竹内栄, 松山誠, 相澤清香
2. 発表標題 ニューロメジンU遺伝子改変ラットを用いたストレス応答機構の解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横木 杏香・大塚 舞・小島 史也・竹内 優羽・手塚 都仁・竹内 栄・松山 誠・相澤 清香
2. 発表標題 ラットにおけるニューロメジンUの欠損は体重も摂食量も減少させない
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022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

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