

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17494

研究課題名（和文）ノックアウトマウスを用いたNPGL/NPGMシステムの新たな生理機能解析

研究課題名（英文）Physiological function of NPGL/NPGM system

研究代表者

鹿野 健史朗（Shikano, Kenshiro）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：10825681

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らはこれまでに、エネルギー代謝調節機構に関わる新規脳内因子NPGL及びNPGMの生理機能についてNPGL及びNPGMの遺伝子欠損マウスを作製し解析してきた。本研究により、NPGL及びNPGM両遺伝子欠損マウスが摂食量の減少およびエネルギー代謝の亢進により、「痩せ」の表現型を示すことを明らかにした。さらに、その脳内メカニズムの一端として、本マウスにおいて摂食抑制系の神経回路が活性化することが明らかになった。本研究課題の遂行により、視床下部におけるエネルギー代謝調節機構の一端が明らかになり、肥満症改善のための基礎医学的知見の発見に結び付くことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代社会において肥満や肥満関連生活習慣病の増加が深刻な問題となっている。肥満の治療や予防法の確立には、食欲やエネルギー代謝調節機構の解明が必須である。本研究課題では、エネルギー代謝調節機構に関わるNPGL及びNPGM遺伝子欠損マウスが食事誘導性肥満を抑制することを明らかにした。さらに、本マウスでは摂食抑制系の神経回路が活性化することが示された。本研究課題のさらなる追究により、肥満を抑制する分子メカニズムの解明や抗肥満作用を持つ標的分子の同定に貢献できると期待している。

研究成果の概要（英文）：We analyzed physiological function of novel neurosecretory proteins (Neurosecretory protein GL; NPGL and Neurosecretory protein GM; NPGM) involved in energy metabolism. We aimed to elucidate the physiological function and molecular mechanism of NPGL and NPGM using NPGL and NPGM double knockout (dKO) mice. In this study, we found that NPGL and NPGM dKO mice suppressed diet-induced obesity because of decreased food intake and increased energy metabolism. Furthermore, dKO mice showed activation of neural pathway which suppresses feeding behavior. This finding will contribute to reveal the central mechanisms of energy metabolism. In the future, we would like to elucidate the detail mechanism of energy metabolism regulated by NPGL/NPGM system.

研究分野：神経内分泌代謝

キーワード：エネルギー代謝 視床下部 神経ペプチド 肥満 摂食行動

1. 研究開始当初の背景

世界中で蔓延している肥満症は、糖尿病や高血圧症などの生活習慣病を合併し、国民の健康寿命の短縮や QOL の低下、治療費の増大に繋がるため大きな問題となっている。このような背景から、近年、肥満の主な原因である過食のメカニズムや脂質が蓄積する脂肪細胞に着目した研究が多くなされている。中枢性摂食行動調節機構に関して、近年ではエネルギーホメオスタシスによる制御に加えて、報酬系や記憶などの脳内高次機能が摂食行動調節に関与することが報告されている。特に 2 型糖尿病のような、遺伝性因子に加え環境因子による影響が強いエネルギー代謝性疾患に関しては摂食行動異常が関与する脳内報酬系などの脳内高次機能との関連が示唆されるが、代謝性疾患と脳内高次機能に関する分子メカニズムは未だ判明していないことが多い。そこで、摂食行動及び脂質代謝などのエネルギー代謝調節機構やそれに関連する脳内高次機能の機能解明が求められている。一方で、現在までに報告されている既知の生理活性物質では未だエネルギー代謝調節機構の十分な解明には至っておらず、新規因子の探索も併行して精力的に行われている。研究代表者らは、鳥類を用いて間脳視床下部に特異的に発現する遺伝子を探査し、約 80 アミノ酸残基からなる分泌性の小タンパク質をコードする新規遺伝子 (**Neurosecretory protein GL ;NPGL** 及び **Neurosecretory protein GM ;NPGM**) を 2014 年に発見した (**Ukena K, Shikano K et al., BBRC 2014**)。研究代表者らはこれまでに、鳥類(ニワトリ)や哺乳類(ラット及びマウス)を用いて **NPGL** 及び **NPGM** の脳室内投与や前駆体遺伝子の過剰発現等の解析を行い、白色脂肪組織における糖質から脂質を合成する *de novo* 脂肪合成の亢進や高カロリー食給餌下における摂食行動の亢進により **NPGL/NPGM** システムが脂肪蓄積を引き起こすことを明らかにしてきた (**Iwakoshi-Ukena E and Shikano K et al., eLife 2017; Shikano et al., Sci. Rep. 2018; Matsuura D and Shikano K et al., Endocrinology 2017**)。

このようにこれまでは、野生型動物への中枢・末梢投与実験や遺伝子過剰発現実験による **gain of function** の側面からのアプローチにて生理機能解析を行ってきた。一方で、**NPGL** 及び **NPGM** 遺伝子欠損モデル等を用いた **loss of function** の側面からの解析は施行されていないため、内在性 **NPGL/NPGM** の生理作用は十分に明らかになっておらず、**NPGL/NPGM** システムの生理機能や生理的意義には未だ不明な点が多い。そこで、研究代表者らは **CRISPR/Cas9** システムを用いて、**NPGL** 及び **NPGM** の遺伝子欠損マウス (**NPGL KO** マウス及び **NPGM KO** マウス) を作製し、生理機能の解析を行うこととした。先行研究により、**NPGL** 及び **NPGM** は同様の生理作用を持つことが示唆されているため、**NPGL** あるいは **NPGM** の単独遺伝子欠損では両分子が代償的に働く可能性が考えられる。そこで本研究課題では、**NPGL KO** マウスと **NPGM KO** マウスを交配し、**NPGL/NPGM** 両遺伝子欠損マウス (**NPGL/NPGM dKO** マウス) を作製し、解析することで **NPGL/NPGM** システムの詳細な生理機能解析を行う。

2. 研究の目的

本研究では、**CRISPR/Cas9** システムを用いて作製した **NPGL/NPGM dKO** マウスを解析することで、**NPGL/NPGM** のエネルギー代謝ならびに脳内高次機能に関する生理作用及びその詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

冒頭で述べたように、近年、摂食制御機構についてエネルギーホメオスタシスによる調節機構に加えて報酬系や記憶などの脳内高次機能が深く関与する摂食行動調節機構の報告が増加している。研究代表者らの先行研究においても、**NPGL** が食餌嗜好性に関与することが示唆されている (**Iwakoshi-Ukena E and Shikano K et al., eLife 2017**) ため、**NPGL/NPGM** システムが報酬系などの脳内高次機能に関与することが推測されるがその脳内作用機序は不明である。よって、本研究課題では **NPGL/NPGM** システムにおけるエネルギーホメオスタシスに基づくエネルギー代謝調節機構について解析するとともに、脳内高次機能に関与する摂食行動調節機構に関与するか否かについて解析する。以上、本研究課題では、**NPGL/NPGM** 遺伝子欠損マウスの行動学的解析を含む表現型解析を進めることで、**NPGL/NPGM** のエネルギー代謝調節機構に関する分子メカニズムならびに新たな生理機能の解明を追究する計画である。

3. 研究の方法

本研究課題では主に **NPGL/NPGM dKO** マウスを用いて、摂食行動やエネルギー代謝、脂質代謝、高次脳機能に着目して解析を行った。まず初めに、普通食給餌条件ならびに高脂肪食給餌条件において野生型マウスと **NPGL/NPGM dKO** マウスの摂食量や体重、エネルギー代謝量、糖代謝、脂肪組織や肝臓における脂肪量を測定した。次に、視床下部における摂食調節関連因子の遺伝子発現量や末梢組織における糖・脂質代謝に関わる因子の発現量を、**RT-PCR** や **in situ hybridization**、免疫組織学的手法、ウエスタンブロットにより測定を行った。エネルギー代謝に関しては、代謝ケージ (**Oxymax : Columbus Instruments** 社) 及び赤外線ビームセンサー (**ACTIMO: シンファクトリー**) にて代謝量や行動量を測定した。また、糖代謝に関しては、経口グルコース負荷試験を行い、空腹時血糖やインスリン感受性を指標に評価した。脳や末梢組織における組織学的手法では、凍結切片あるいはパラフィン切片を作製し、**HE** 染色や免疫染色を

行い、**Axio Imager 2 (ZEISS)**にて観察および撮影を行った。脂肪組織におけるミトコンドリアは、透過型電子顕微鏡（日立ハイテクノロジーズ：**H-7650**）にて観察を行い、画像解析ソフト**ImageJ**を用いてミトコンドリアのサイズを測定した。**2**瓶選択嗜好性試験により、スクロースに対する嗜好性を評価した。水および**1%**スクロース水を同時にマウスに与えて、それぞれの飲水量を測定した。

4. 研究成果

本研究課題では、まず**NPGL/NPGM**両遺伝子欠損マウス(**NPGL/NPGM dKO**マウス)の体重や摂食量、エネルギー代謝量を普通食給餌条件および高脂肪食給餌条件において測定を行った。その結果、野生型マウスに比べて**NPGL/NPGM dKO**マウスでは、普通食給餌条件において、出生直後の体重に変化は認めなかったが、離乳時より体重が減少することが明らかになった。

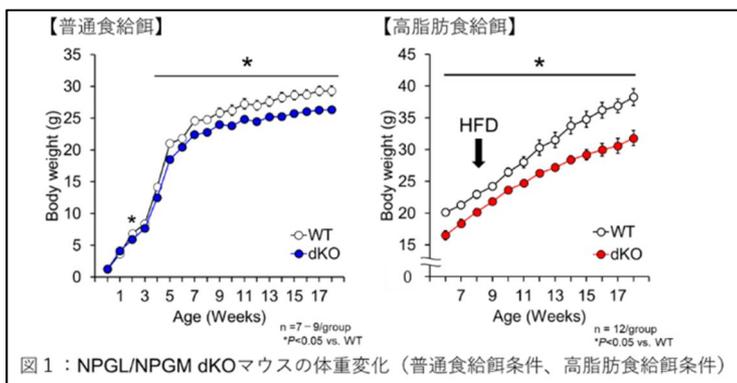


図1：NPGL/NPGM dKOマウスの体重変化（普通食給餌条件、高脂肪食給餌条件）

さらに、高脂肪食給餌条件においては、普通食給餌条件よりも顕著に体重が減少することが明らかになった（図1）。この時の摂食量とエネルギー代謝量を測定すると、普通食および高脂肪食給餌条件において、摂食量の減少を示した。一方で、呼吸代謝を測定すると、高脂肪食給餌条件の暗期において、**NPGL/NPGM dKO**マウスにおいて酸素消費量や二酸化炭素排出量が増加し、エネルギー代謝が亢進していた。この時、自発活動量や呼吸商に変化を認めなかった。これらの結果から、**NPGL/NPGM dKO**マウスでは基礎代謝や食事誘導性熱産生が亢進することが示唆された。次に、体重減少について末梢組織の測定を行った。普通食給餌条件下においては、皮下脂肪組織である鼠径部白色脂肪組織および腹腔内脂肪である精巣上体周囲白色脂肪組織の重量が**NPGL/NPGM dKO**マウスにおいて減少していた。高脂肪食給餌条件においては、**NPGL/NPGM dKO**マウスでは、上記白色脂肪組織に加えて褐色脂肪組織（**BAT**）重量および肝臓重量が減少していた。さらに、組織学的解析により、**BAT**や肝臓における異所性脂肪の蓄積が抑制されることが示された（図2）。一方で、野生型マウスに比べて**NPGL/NPGM dKO**マウスの空腹時血糖は低下していたが、経口グルコース負荷試験では耐糖能にこれらのことから、**NPGL/NPGM dKO**マウスでは、摂食量の減少ならびにエネルギー代謝の亢進により脂肪蓄積が抑制され、痩せを呈することが示された。

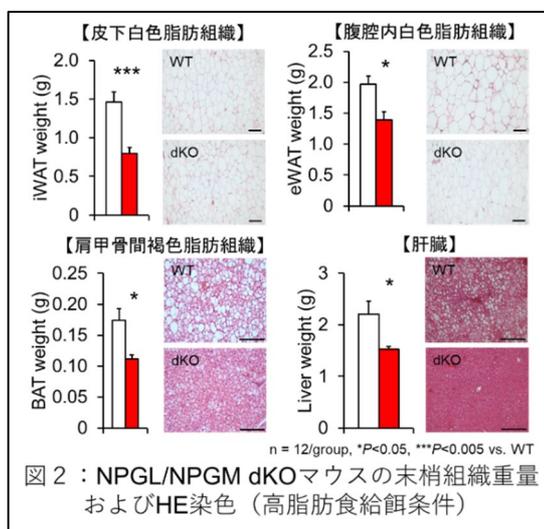


図2：NPGL/NPGM dKOマウスの末梢組織重量およびHE染色（高脂肪食給餌条件）

次に、**NPGL/NPGM dKO**マウスで認められた摂食行動の減少に関して、視床下部の摂食調節因子の発現量解析を行った。定量**RT-PCR**により、視床下部の摂食調節因子の測定を行ったところ、ニューロペプチド**Y** (**NPY**)などの食欲促進因子については**mRNA**発現量の変動は認められなかったが、摂食抑制因子であるα-メラニン細胞刺激ホルモン（**α-MSH**）の前駆体タンパク質であるプロオピオメラノコルチン（**POMC**）の**mRNA**発現量が**NPGL/NPGM dKO**マウスで増加することが示された（図3）。さらに、**in situ hybridization**においては、**POMC**に加えて、摂食抑制作用を持つコルチコトロピン放出ホルモン（**CRH**）および甲状腺刺激ホルモン（**TRH**）の発現量が増加することが示された。これらの結果から、**NPGL/NPGM dKO**マウスでは視床下部の摂食抑制系の神経回路が活性化することで、摂食量が抑制されることが示された。

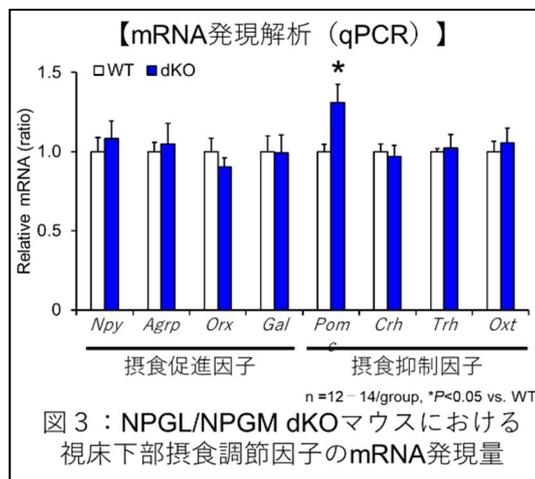


図3：NPGL/NPGM dKOマウスにおける視床下部摂食調節因子のmRNA発現量

次に、**NPGL/NPGM dKO** マウスにおけるエネルギー代謝の亢進に関して、熱産生に重要な **BAT** に着目して解析を行った。**NPGL/NPGM dKO** マウスの **BAT** では、ミトコンドリアに局在し、熱産生に重要な役割を果たす脱共役タンパク質 1 (**UCP1**) の mRNA およびタンパク質発現量が増加することが示された。さらに、ミトコンドリア量を組織学的に解析したところ、**NPGL/NPGM dKO** マウスの **BAT** においてミトコンドリア数が増加していた。次に、視床下部の **NPGL/NPGM** システムがどのように **BAT** を制御するかについて交感神経活動の測定を行った。その結果、**NPGL/NPGM dKO** マウスの **BAT** ではカテコラミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (**Tyrosine hydroxylase: TH**) 発現量が増加し、ノルアドレナリン含量が増加することが明らかになった。さらに、**BAT** 交感神経切除を施行し、**BAT** における交感神経系の影響を除外した際には野生型マウスと **NPGL/NPGM dKO** マウスにおける **Ucp1 mRNA** 発現量に変化が認められなくなった。以上の結果から、**NPGL/NPGM dKO** マウスでは、交感神経系を介して **BAT** の **UCP1** 発現量等を制御し、**BAT** 熱産生を亢進させることが示された (図 4)。

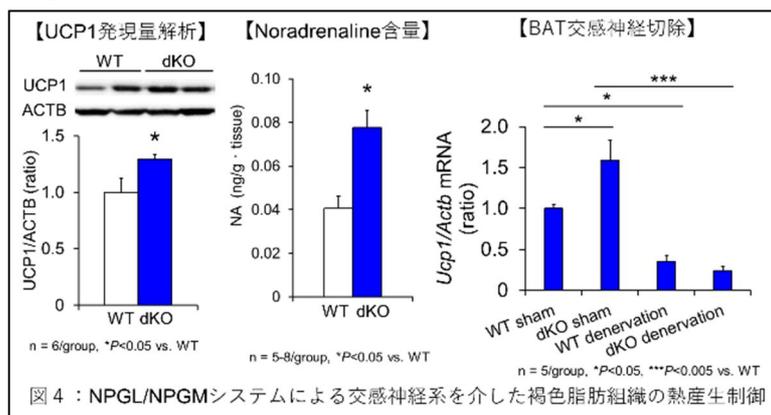


図 4 : NPGL/NPGMシステムによる交感神経系を介した褐色脂肪組織の熱産生制御

これらの解析により、**NPGL/NPGM dKO** マウスでは摂食行動の抑制ならびにエネルギー代謝の亢進により痩せを呈することが示された。**NPGL/NPGM dKO** マウスは普通食および高脂肪食給餌の両条件において摂食量が低下することが明らかになったが、嗜好性や脳内報酬系に關与しているかは不明であるため、**NPGL/NPGM dKO** マウスの糖嗜好性について評価を行った。2瓶選択嗜好性試験の結果、普通食給餌条件では有意な変化は認められなかった。一方、高脂肪食給餌下において、**NPGL/NPGM dKO** マウスはスクロース摂取量の割合が減少したことから、スクロースに対する嗜好性が低下したことが示された (図 5)。この結果から、**dKO** マウスにおける摂食抑制にはエネルギーホメオスタシスに基づく摂食調節に加えて、食事嗜好性が關与することが示唆された。

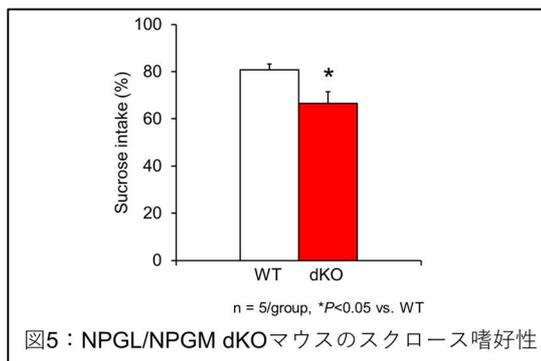


図5 : NPGL/NPGM dKOマウスのスクロース嗜好性

本研究課題の遂行により、**NPGL/NPGM dKO** マウスの表現型として、摂食行動の抑制およびエネルギー代謝の亢進により、痩せが生じることが明らかになった。この表現型はエネルギーホメオスタシスを基盤としたエネルギー代謝調節機構に加えて嗜好性や脳内報酬系が關わることが示唆された。今後、本モデルマウスを用いて、**NPGL/NPGM** システムの脳内高次機能への關与を解析することで、**NPGL/NPGM** システムによる新たなエネルギー代謝調節メカニズムを明らかにしていく。本研究課題を進展させることで、新たな中枢性エネルギー代謝調節機構の解明に繋がり、肥満症改善のための基礎医学的知見の発見に結び付くことが期待される。

<引用文献>

1. Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Bessho Y, Maejima S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M and Tachibana T. Identification of a cDNA encoding a novel small secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamic infundibulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446: 298-303, 2014.
2. Iwakoshi-Ukena E*, Shikano K*, Kondo K, Taniuchi S, Furumitsu M, Ochi Y, Sasaki T, Okamoto S, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Minokoshi Y and Ukena K. Neurosecretory protein GL stimulates food intake, de novo lipogenesis, and onset of obesity. *eLife* 6: e28527, 2017.
3. Matsuura D*, Shikano K*, Saito T*, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Ochi Y, Sato M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ and Ukena K. Neurosecretory protein GL, a hypothalamic small secretory protein, participates in energy homeostasis in male mice. *Endocrinology* 158: 1120-1129, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Fukumura Keisuke, Shikano Kenshiro, Narimatsu Yuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Furumitsu Megumi, Naito Mana, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 85
2. 論文標題 Effects of neurosecretory protein GL on food intake and fat accumulation under different dietary nutrient compositions in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1514 ~ 1520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umeda Ryohei, Teranishi Hitoshi, Hada Kazumasa, Shimizu Nobuyuki, Shiraishi Hiroshi, Urushibata Hirotaro, Lai Shaohong, Shide Masahito, Carrasco Apolinario Magdeline E., Higa Ryoko, Shikano Kenshiro, Shin Toshitaka, Mimata Hiromitsu, Hikida Takatoshi, Hanada Toshikatsu, Hanada Reiko	4. 巻 27
2. 論文標題 Vrk2 deficiency elicits aggressive behavior in female zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 254 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kadota Atsuki, Iwakoshi-Ukena Eiko, Fukumura Keisuke, Shikano Kenshiro, Narimatsu Yuki, Furumitsu Megumi, Ukena Kazuyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effects of Irregular Feeding on the Daily Fluctuations in mRNA Expression of the Neurosecretory Protein GL and Neurosecretory Protein GM Genes in the Mouse Hypothalamus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2109 ~ 2109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22042109	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9件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鹿野健史朗、森崎郁子、比嘉涼子、吉村充弘、花田俊勝、上田陽一、花田礼子
2. 発表標題 食事誘導性肥満の抑制作用を示す NPGL/NPGM 遺伝子改変マウスの生理機能解析
3. 学会等名 第28回西日本肥満研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鹿野健史朗、森崎郁子、比嘉涼子、吉村充弘、花田俊勝、上田陽一、花田礼子
2. 発表標題 NPGL/NPGM システムによる中枢性エネルギー代謝調節機構の解明
3. 学会等名 第72回西日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鹿野健史朗、森崎郁子、比嘉涼子、寺西仁志、吉村充弘、花田俊勝、上田陽一、花田礼子
2. 発表標題 NPGL/NPGM システムのエネルギー代謝調節機構における役割の解明
3. 学会等名 第25回アディポサイエンスシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shikano K, Morisaki I, Higa R, Teranishi H, Yahiro T, Yoshimura M, Hanada T, Nakamura K, Ueta Y, Hanada R
2. 発表標題 The central roles of NPGL/NPGM system in energy homeostasis
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鹿野健史朗、森崎郁子、比嘉涼子、花田俊勝、花田礼子
2. 発表標題 新規脳内因子NPGL/NPGM遺伝子欠損マウスを用いた生理機能解析
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鹿野健史朗、森崎郁子、比嘉涼子、吉村充弘、花田俊勝、上田陽一、花田礼子
2. 発表標題 NPGL/NPGMシステムのエネルギー代謝調節機構における生理的役割の解明
3. 学会等名 第71回西日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鹿野健史朗、花田礼子
2. 発表標題 摂食行動における脳内NPGL/NPGMシステムの役割の解明
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「食行動と脳内基盤と分子機構」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shikano Kenshiro, Hanada Reiko
2. 発表標題 Roles of endogenous NPGL/NPGM system in energy metabolism
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会第98回日本生理学会大会合同大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mino Haruna, Shikano Kenshiro, Higa Ryoko, Hanada Reiko
2. 発表標題 Physiological function of NPGL/NPGM system in the feeding behavior
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大分大学医学部神経生理学講座
<http://www.med.oita-u.ac.jp/seiri1/>

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
---------	---------