

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22249038

研究課題名（和文） 摂食調節ホルモンアピタイトカインによるネスファチン受容体制御機構の解明

研究課題名（英文） Studies on signal activating systems induced by an anorexigenic appetitekine, Nesfatin-1

研究代表者

森 昌朋 (MORI MASATOMO)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80174382

研究成果の概要（和文）：マウス神経芽細胞腫由来の NB41A3 細胞に Nesfatin-1 を添加すると、その濃度依存性に cAMP response element (CRE) レポーター活性を認め、マウス視床下部と同様、NB41A3 細胞に高親和性に Nesfatin-1 受容体が発現していることが判明した。その作用は、MAPK もしくは L 型 Ca channel を介して CREB のリン酸化を促進した。一方、膵β細胞では Nesfatin-1 により、その濃度依存性に insulin 分泌を刺激するが、そのシグナル伝達系は中枢とは異なることが分かった。また、このレポーター活性化を用いて、49 種類の GPCR をクローニングして Nesfatin-1 による活性を検討したが、高親和性に活性化される受容体を見出すことは出来なかった。Nesfatin-1 受容体のリガンドである Nesfatin-1 前駆体 Nucleobindin-2 遺伝子プロモーターをクローニングして検討したところ、トログリタゾンはその遺伝子の mRNA stabilization を安定化することを見出した。さらに、Nesfatin-1 は EGF シグナルを正に制御することで脂肪細胞の分化・増殖を抑制していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Nesfatin-1 administration promoted a dose-dependent increase in CRE reporter activities in mouse NB41A3 cells, and Nesfatin-1 bound plasma membranes derived from mouse hypothalami and NB41A3 cells in a high affinity manner. Using a CRE reporter assay in each of 49 GPCRs, we tried to identify a receptor specific to Nesfatin-1, but these efforts resulted in failure. Troglitazone, an activator for PPAR γ , possessed a significant stabilizing activity of NUCB2 gene mRNA, and Nesfatin-1 activated EGF signaling to suppress adipogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2011年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2012年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
年度			
年度			
総計	36,000,000	10,800,000	46,800,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：Nesfatin-1, 肥満、シグナル伝達、摂食抑制、脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

肥満を基盤として高血圧、高脂血症、高血糖、脂肪肝、睡眠時無呼吸などが高頻度に合併し、肥満にこれらの疾病の一つが合併すると、肥満症と診断される。また内臓脂肪蓄積を基盤にしてメタボリックシンドロームの診断基準も確立されつつある。この肥満症またはメタボリックシンドロームの病態においては動脈硬化病変が生じ易くなり、脳心臓末梢血管病変が高い頻度で発症する。我が国における肥満は成人男性の約25%、成人女性の約20%に認められる。肥満を従来の食事療法と運動療法で治療するには限界があり、肥満抑制に作用する新たな薬物療法の開発が求められている。すなわち、薬物療法によりいかにして肥満の発症を抑制し、治療するのが我が国においてもまた諸外国においても大きな課題となっている。肥満はエネルギーホメオスターシス制御の破綻により生来する。摂食と消費エネルギーはエネルギーホメオスターシスを構成する重要な因子であり、その制御は脳視床下部に局在する活性因子アピタイトカインにより制御されている。それらは摂食を抑制的に作用するアピタイトカインと亢進性に作用するアピタイトカインとに分類される。私達は脳視床下部で作用し、摂食抑制的に作用する Nesfatin-1 を発見した。Nesfatin-1 受容機構の解明により、新たな肥満抑制性物質の開発につながる事が可能となる。

2. 研究の目的

Nesfatin-1 は 82 アミノ酸より構成され、ラット脳脊髄液中に存在する分泌蛋白であり、Nesfatin-1 はまた、胃粘膜、十二指腸粘膜および膵β細胞にも存在することが認められているアピタイトカインの一種である。モル濃度比では Leptin とほぼ同程度の摂食抑制作用を示し、Nesfatin-1 の脳室内への慢性的投与により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の腸間膜脂肪重量が著明に減少する。さらに、Leptin 抵抗性のモデル動物である Leptin 受容体変異を有する Zucker (*fa/fa*) ラットでも Nesfatin-1 による摂食抑制効果を認める。ヒト肥満者では血中 Leptin 濃度が高いにも拘わらず、摂食量は減少せず、また外来性に Leptin を投与してもその十分な摂食抑制作用を認めない Leptin 抵抗性が存在する。私達の発見した Nesfatin-1 は Leptin 抵抗性状態でも効果があるので、将来抗肥満薬になる可能性が高い。これらの経緯を踏まえて、本研究では(1) Nesfatin-1 受容体 GPCRn の細胞内シグナル伝達刺激機構を明らかにし、(2) Nesfatin-1 受容体結合アピタイトカインアナログの開発を行う。これらの成果により、新規アピタイトカインによる Nesfatin-1 受

容体活性化機構が明らかにされ、エネルギーホメオスターシス制御機構が解明されて、Nesfatin-1 の臨床応用への展開が可能となる。

3. 研究の方法

(1) Nesfatin-1 受容体 GPCRn の細胞内シグナル伝達刺激機構の解明

オーファン受容体 GPCR12 が Nesfatin-1 受容体であることを発見したが、それは Nesfatin-1 に対して low affinity activation しか示さない事が漸次明らかとなった。そこで、種々の神経系培養細胞に既知のシグナル応答配列を付加した cAMP response element (CRE) luciferase レポーターを遺伝子導入し、Nesfatin-1 添加によるレポーター活性を測定することにより、Nesfatin-1 受容体のシグナル伝達活性化機構を検討した。また、CRE レポーター系を用いて、orphan GPCR を中心に再度、Nesfatin-1 受容体のクローニングも引き続き検討した。さらに、Nesfatin-1 受容体のリガンドである Nesfatin-1 の前駆体 NUCB2 遺伝子をクローニングしてそのシグナル伝達経路を解明した。

(2) Nesfatin-1 受容体結合アピタイトカインアナログの開発

Nesfatin-1 の前駆体である NUCB2 の 3T3-L1 の脂肪細胞分化・増殖に関与する機能未解明なシグナル伝達系を検討し、CREB リン酸化、MAPK-Erk リン酸化、EGF リン酸化などの細胞内シグナル伝達経路の関与を検討した。さらに、中枢神経と膵β細胞における、Nesfatin-1 添加後のシグナル伝達機構を検討した。

4. 研究成果

(1)-1 マウス神経芽細胞腫由来の NB41A3 細胞に Nesfatin-1 を添加すると、その濃度依存性に CRE レポーター活性化を認めた。M30 は Nesfatin-1 中央部付近の 23-52 アミノ酸からなる mid-segment のペプチドであるが、マウスへの投与ではその濃度依存性に有意な摂食抑制作用を示す。M30 は NB41A3 細胞における CRE レポーター活性も濃度依存性に促進することが判明した。一方、メラノコルチン 3/4 受容体 (MC3/4R) アンタゴニストである SHU9119 の前投与により、また *in vivo* で摂食抑制効果のない変異 M30 投与により、CRE レポーター活性化作用は消失した。さらに Nesfatin-1 は NB41A3 細胞内のリン酸化 CRE 結合蛋白 (p-CREB) を増加させたが、細胞内 cAMP 濃度の増加を認めなかった。種々の kinase inhibitor を用いた実験により、MAPK および L 型 Ca channel 阻害剤により M30 による CREB リン酸化反応が消失することが判明した。マウス視床下部と NB41A3 細胞の膜分画を用いて、¹²⁵I-Nesfatin-1 によるレセプターアッセイを行うと、その Kd 値は各々約

0.79nM、約 0.165nM の高親和性であり、Nesfatin-1 との特異的結合反応を認めた。興味あることに、膵β培養細胞では p-CREB は Nesfatin-1 濃度依存性に減少した。これらの成績は、マウス視床下部及び NB41A3 細胞には Nesfatin-1 受容体が発現し、また Nesfatin-1 は NB41A3 細胞において MAPK もしくは L 型 Ca channel の作用を介して p-CREB を増加させることが判明した。一方、膵β細胞では Nesfatin-1 は中枢神経系とは異なるシグナル伝達経路を活性化することが示唆された。以上から Nesfatin-1 受容体による組織特異的細胞内シグナル伝達機構が存在することが明らかになった。

Nesfatin-1 受容体としての検討を行った GPCR は以下の 49 種類であったが、いずれも高親和性に Nesfatin-1 反応を示さなかった。GPR3, GPR6, GPR12, GPR19, GPR21, GPR22, GPR25, GPR26, GPR35, GPR39, GPR45, GPR50, GPR56, GPR61, GPR64, GPR68, GPR75, GPR81, GPR82, GPR83, GPR84, GPR85, GPR87, GPR92, GPR101, GPR108, GPR116, GPR119, GPR124, GPR135, GPR139, GPR139, GPR142, GPR146, GPR148, GPR152, GPR153, GPR174, GPCR5A, GPCR5B, GPCR5C, LGR4, MAS1, MC3R, MC4R, MRGPRF, MRGPRX1, MRGPRX2, P2RY5, P2RY12

(1)-2 Nesfatin-1受容体のリガンドである Nesfatin-1前駆体の Nucleobindin-2 遺伝子をクローニングして、その全構造を決定し、さらに遺伝子プロモーター領域の解析を行った。また、抗糖尿病薬である PPAR γ 活性化剤のチアゾリジン誘導体 トログリタゾンによる NUCB2 mRNA 発現増加機構を検討し、トログリタゾンは NUCB2 遺伝子を転写レベルで制御しているのではなく、mRNA の安定性を増すことにより、NCUB2 mRNA 発現を増加させることが明らかとなった。

(2)-1 Nesfatin-1 の前駆体である Nucleobindin-2 は、Nesfatin-1 乃至は Nucleobindin-2 の未同定の受容体を介して脂肪細胞の分化・増殖を抑制することを発見した。更に、その作用は EGF シグナルを正に制御することで機能することも明らかにした。

(2)-2 中枢性の Nesfatin-1 は視床下部・下垂体・副腎系を活性化し、ストレス応答に関与することが判明した。室傍核 Nesfatin-1 ニューロンは食事誘発因子のグルコースとインスリンにより活性化され、食後の満腹感形成に関与することが示唆された。さらに、中枢性 Nesfatin-1 の摂食抑制作用を介して、アピタイトカインとして作用するオキシトシンを末梢投与すると、肥満動物の過食・内臓脂肪・脂肪肝・高血糖の代謝異常が改善した。Nesfatin-1 は膵のグルコース誘発インスリン分泌を促進することも明らかにした。これらの成績により、Nesfatin-1 が生理的満腹形

成に加えて、ストレス時の摂食抑制に関与する可能性や、さらに Nesfatin-1 とオキシトシンの末梢投与がエネルギー代謝および糖代謝異常を改善することが示された。

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 8 件)

(1) Gantulga D, Maejima Y, Nakata M, Yada T: Glucose and insulin induce Ca²⁺ signaling in nesfatin-1 neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 420(4): 811-815, 2012. 査読有

(2) Ishida E, Hashimoto K, Shimizu H, Okada S, Satoh T, Kato I, Yamada M, Mori M Nesfatin-1 Induces the Phosphorylation Levels of cAMP Response Element-Binding Protein for Intracellular Signaling in a Neural Cell Line. *PLoS One* 2012 7:e50918 査読有

(3) Tagaya Y, Osaki A, Miura A, Okada S, Ohshima K, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Shimizu H, Mori M. Secreted Nucleobindin-2 inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Protein Pept. Lett.* 19: 997-1004, 2012. 査読有

(4) Tagaya Y, Miura A, Okada S, Ohshima K, Mori M. Nucleobindin-2 is a positive modulator of EGF-dependent signals leading to enhancement of cell growth and suppression of adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 153: 3308-3319, 2012. 査読有

(5) Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, Mori M, Yada T: Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet b-cells. *Endocr J* 58(4): 305-313, 2011. 査読有

(6) Maejima Y, Iwasaki Y, Yamahara Y, Kodaira M, Sedbazar U, Yada T: Peripheral oxytocin treatment ameliorates obesity by reducing food intake and visceral fat mass. *Aging (Albany NY)* 3(12): 1169-1177, 2011. 査読有

(7) Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Satoh T, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene. *Endocrinology* 151:2494-2503, 2010.査読有

(8) Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, Ando A, Kurita H, Damdindorj B, Takano E, Gantulga D, Iwasaki Y, Kurashina T, Onaka T, Dezaki K, Nakata M, Mori M, Yada T: Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging (Albany NY)* 2(11): 775-784, 2010.査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

橋本貢士、森昌朋他：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とその特異的受容体の探索 第 86 回日本内分泌学会、2013 年 4 月 25 日、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 昌朋 (MORI MASATOMO)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80174382

(2) 研究分担者

岡田 秀一 (OKADA SHUICHI)
群馬大学・医学部・講師
研究者番号：20260474
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
矢田 俊彦 (YADA TOSHIHIKO)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：60166527
山田 正信 (YAMADA MASANOBU)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90261833

(3) 連携研究者

()

研究者番号：