

## 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14日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390190

研究課題名（和文） 新規視床下部ペプチドの網羅的探索と機能解析

研究課題名（英文） Comprehensive determination and functional analysis of novel peptides in the hypothalamus

研究代表者

中里 雅光（NAKAZATO MASAMITSU）

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10180267

研究成果の概要（和文）：視床下部は生体調節を統合し、生体の行動を制御する重要な器官である。視床下部から新規生理活性ペプチドを発見することは、新たな生理機能の解明や創薬の観点から重要である。我々が開発した網羅的解析法によって新規ペプチドを発見し、機能解析から新たな生体調節システムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The main function of the hypothalamus is homeostasis, or maintaining the body's status. Discovering novel bioactive peptides and their functions are an important role to elucidate unknown biological function and drug discovery. We discovered novel peptides in the hypothalamus by our newly developed comprehensive analyses, and from that discovery we clarified the new system of biological regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：摂食調節，視床下部，ペプチド，細胞内情報伝達，エネルギー代謝

### 1. 研究開始当初の背景

視床下部は生体活動調節の統合部位であり、摂食・エネルギー代謝、体液量、自律神経、体温、体内リズム、性行動および下垂体機能を制御している。ヒトの視床下部には計36に及ぶ神経核と野があり、特異的なペプチドが産生され、これらを介して視床下部は末梢臓器、下

垂体および脳の他の部位と密に連携して生体調節に働いている。視床下部機能に作動しているペプチドの発見は、生理作用、病態との関連および臨床応用につながることから、先駆的な研究となる。これまで我々は摂食・エネルギー代謝調節に作用するグレリン、神経ペプチドW、神経ペプチドY、オレキシンなどに関する広汎

な研究成果を報告し、消化管からの迷走神経求心性情報が視床下部ニューロンに伝達される神経回路の発見につなげた。

近年、我々は国立循環器病センターグループと共同で網羅的ペプチド解析法を開発し、NERP-1 と NERP-2 を発見した。またこの探索を通じて novel hypothalamic peptide (NHP)-3 と NHP-4 を新たに同定した。現在、EST データベースによる *in silico* 情報と系統的生理活性スクリーニングから新規のペプチドを探索している。これら新規ペプチドの生理的役割の解明は、新たな生体調節システムの発見につながると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) NERP 1 と NERP-2 の分泌調節機序の解析と新たな生物活性の探索

(2) 新規ペプチド NHP-4 の機能解析

①NHP-4 産生細胞の同定

②インスリン分泌機能の解析

(3) 新規ペプチドの同定と機能解析

①新規ペプチドの同定と構造解析

②生体内分布の解析

③新規ペプチドの行動薬理的解析

## 3. 研究の方法

(1) NERP 1 と NERP-2 の分泌調節機序の解析と新たな生物活性の探索

①バソプレシン神経が集積する視床下部室傍核と視索上核を標的に、NERP-1 と NERP-2 投与によるグルタミン酸変化とバソプレシン細胞の膜電位変化を、それぞれ *in vivo* マイクロダイアリス法とラット脳スライスをを用いた Whole cell パッチクランプ法で解析する。

②NERP-1 と NERP-2 全身臓器発現を解析した結果、脳、下垂体に加えて膵臓に発現が認められたことから、膵臓における NERPs の発現細胞の同定と膵ホルモンの分泌調節機能を *in vivo* および *in vitro* で解析する。

(2) 新規ペプチド NHP-4 の機能解析

①NHP-4 特異抗体を作製し、ヒト、ラット、マウス免疫組織学的に NERP-4 産生細胞を同定する。

②NHP-4 組織化学的解析により、膵臓での発現を認めたことから、膵臓での分泌調節機能を *in vivo* および *in vitro* で解析する。

(3) 新規ペプチドの同定と機能解析

①EST データベースによる *in silico* 情報から新規ペプチドを探索し、質量分析型で内因性分子の構造を決定する。

②新規ペプチドの特異抗体を作製し、RIA 測定系を構築して、生体内分布を解析する。

③ラット、マウスを用いて、摂食、体温、血圧、新規ペプチドの行動薬理的解析を実施する。

## 4. 研究成果

①NERP-1 は、バソプレシン神経に接続するシナプス前細胞のグルタミン酸神経終末に作用し、直接グルタミン酸分泌を抑制した。一方、NERP-2 はシナプス前グルタミン酸神経終末を抑制する GABA 介在神経を活性化することで、バソプレシン分泌を抑制した。同一の前駆蛋白から合成される2つのペプチドが異なるシステムでバソプレシン分泌を抑制することを明らかにした。

②免疫染色の結果、NERP-1 と NERP-2 のいずれも、膵β細胞に強く発現した。NERP-2 は高グルコース環境下で、膵β細胞のカルシウムを増加させ、インスリン分泌を増やした。一方 NERP-1 はインスリン分泌に機能しなかった。自己分泌的あるいは傍分泌的にインスリン分泌を調節する新たな生体システムを明らかにした。

③神経内分泌細胞由来 cell line の培養上精から発見した NHP-4 は、視床下部や下垂体のカルシウムを上昇させることから生物活性が推定されているが、その役割は不明である。NHP-4 特異抗体を作製し、免疫染色した結果、ヒトとマウスでインスリンと共存し、膵β細胞での発現を認めた。

④NHP-4 とインスリン分泌との関連を解析した結果、マウスβ細胞由来 MIN6 細胞において、NERP-4 は高グルコース環境下で、インス

リン分泌を増やした。また糖取り込みを改善する基礎的知見も得られた。新たな糖尿病治療薬のシーズを発見した。

⑤データベースから、前駆蛋白質転換酵素の標的となる連続した塩基性アミノ酸配列を検索したところ、20 アミノ酸残基からなる新規ペプチド候補が同定された。内因性の分子型を解析した結果、新規ペプチドが内因性の主要な分子型であることを確認した。

⑥新規ペプチドのRIA 測定系を確立し、組織分布を検証した。新規ペプチドは、下垂体に最も多く、視床下部、膵臓、副腎の順に高い発現が認められ、神経内分泌に関与していると考えられる。

⑦新規ペプチドの脳室内投与は、短期的に摂食を抑制、エネルギー代謝の亢進、血圧の上昇を引き起こした。条件付け味覚嫌悪試験において、新規ペプチドが不快を惹起しないことを確認した。視床下部に作用して摂食を抑制する新規ペプチドを発見した。

#### 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. Matsuo T, Yamaguchi H, Kageyama H, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M.: Localization of neuroendocrine regulatory peptide-1 and-2 in human tissues. Regul Pept, 163: 43-48 (2010)
2. Date Y, Mondal MS, Kageyama H, Ghamari-Langroudi M, Takenoya F, Yamaguchi H, Shimomura Y, Mori M, Murakami N, Shioda S, Cone RD, Nakazato M.: Neuropeptide W: an anorectic peptide regulated by leptin and metabolic state. Endocrinology, 151: 2200-2210 (2010)
3. Mishiro-Sato E, Sasaki K, Matsuo T, Kageyama H, Yamaguchi H, Date Y, Matsubara M, Ishizu T, Kumagaye K, Satomi Y, Takao T, Shioda S, Nakazato M, and Minamino N.: Distribution of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2, and proteolytic processing of their precursor VGF protein in the rat. J Neurochem, 114: 1097-1106 (2010)
4. Toshinai K, Yamaguchi H, Kageyama H, Matsuo T, Koshinaka K, Sasaki K,

Shioda S, Minamino N, and Nakazato M.: Neuroendocrine regulatory peptide-2 regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus. Am J Physiol Endocrinol Metab, 299: E394-401 (2010)

5. Koshinaka K, Toshinai K, Mohammad A, Noma K, Oshikawa M, Ueno H, Yamaguchi H, Nakazato M.: Therapeutic potential of ghrelin treatment for unloading-induced muscle atrophy in mice. Biochem Biophys Res Commun, 412: 296-301 (2011)
6. Noguchi H, Masaki T, Kakuma T, Nakazato M, Yoshimatsu H.: Ghrelin in small intestine, its contribution to regulation of food intake and body weight in cross-intestinal parabiotic rats. Endocr J, 58: 625-632 (2011)
7. Moin AS, Yamaguchi H, Rhee M, Kim JW, Toshinai K, Waise TM, Naznin F, Matsuo T, Sasaki K, Minamino N, Yoon KH, Nakazato M.: Neuroendocrine regulatory peptide-2 stimulates glucose-induced insulin secretion in vivo and in vitro. Biochem Biophys Res Commun, 428: 512-517 (2012)
8. Tsuchimochi W, Kyoraku I, Yamaguchi H, Toshinai K, Shiomi K, Kangawa K, Nakazato M: Ghrelin prevents the development of experimental diabetic neuropathy in rodents. Eur J Pharmacol, 702: 187-193 (2013)

[学会発表] (計 17 件)

1. Nakazato M: Clinical application of ghrelin and GLP-1 for the treatment of type 2 diabetes mellitus. 36th Autumn congress of Korean Diabetes Associatio. 釜山 (2010.10.16)
2. 中里雅光: 肥満と糖尿病の治療におけるパラダイムシフト. 第 42 回日本内科学会九州支部主催生涯教育講演会 鹿児島 (2010.11.14)
3. Nakazato M.: Translational research of ghrelin. 5th International Peptide Symposium, Kyoto Japan. (2010.12.7)
4. Nakazato M: Provention and reversal of diabetic neuropathy by treatment with ghrelin. ENDO2010 San Diego, USA (2010.6.20)
5. 中里雅光: 栄養・脳機能ネットワーク: 食欲関連ペプチドの役割. Neuro2010

- 神戸 (2010.9.4)
6. 中里雅光: 機能性ペプチドの臨床応用の実績. 第 122 回日本薬理学会関東部会. 静岡 (2010.6.5)
  7. 中里雅光: 加齢におけるアナボリックペプチドグレリンの意義とトランスレシヨナルリサーチ. 第 32 回日本臨床栄養学会第 31 会日本臨床栄養協会総会第 8 回大連合大会 名古屋 (2010.8.29)
  8. 中里雅光: グレリンのトランスレシヨナルリサーチ. 第 84 回日本内分泌学会総会. 神戸 (2011.4.21)
  9. 中里雅光: 消化管ホルモンから糖尿病治療戦略を考える 糖尿病治療の新次代へ摂食調節機構を視野に入れてへ. 第 54 回日本糖尿病学会年次集会. 京都 (2011.6.10)
  10. 中里雅光: 脳による摂食調節. 第 29 回日本肥満症治療学会. ワークショップ, 京都. (2011.6.10)
  11. 中里雅光: 肥満症の内科的治療の展望. 第 32 回日本肥満学会. 兵庫. (2011.9.24)
  12. 中里雅光: 肥満研究の新たな展開と糖尿病への臨床応用. 第 49 回日本糖尿病学会九州地方会. 福岡 (2011.10.14)
  13. 中里雅光: Gut-Brain Network of Appetite Regulation in Obesity. The Korea-Japan Joint Symposium in KSSO Meeting. 韓国 (2011.10.15)
  14. 中里雅光: 中枢と末梢を結ぶエネルギー代謝調節機構. 第 85 回日本内分泌学会学術総. 名古屋 (2012.4.12)
  15. 中里雅光: 摂食亢進ペプチド グレリンのトランスレシヨナルリサーチ. 第 53 回日本心身医学会. 鹿児島 (2012.5.26)
  16. 中里雅光: 消化管ペプチドの発見によるエネルギー代謝調節の新たな理解とその臨床応用. 第 20 回西日本肥満研究会. 愛媛 (2012.7.15)
  17. 中里雅光: ヒトから初めて見つかった食欲亢進ホルモン: グレリンの機能と臨床応用展開. 第 69 回日本呼吸器学会・日本血管病学会九州支部・秋季学術講演会. 北九州国際会議場 (2012.11.17)

[図書] (計 4 件)

1. 中里雅光: 内分泌・代謝性疾患 肥満症. 今日の診断のためにガイドライン外来診療 2010 日経メディカル開発 224-228, 2010
2. 山口秀樹、中里雅光: 実験医学増刊 代謝・内分泌 ネットワークと医薬応用. 生理活性ペプチドと疾患・臨床応用 羊土社 752-758, 2011
3. 中里雅光: ペプチド医薬の最前線. 次世代バイオ医薬品の製剤設計と開発戦略 シーエムシー出版 150-154, 2012

4. 中里雅光: インスリノーマ, 消化管ホルモン産生腫瘍. 総編: 今日の治療指針 2013 年版 医学書院 122-126, 2013

[産業財産権]  
○出願状況 (計 1 件)

名称: インスリン分泌促進剤  
発明者: 山崎基生、中里雅光  
権利者: 宮崎大学、協和発酵  
種類: 特願  
番号: 2010-2936912  
出願年月日: 2010 年 12 月 28 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 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]  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中里 雅光 (NAKAZATO MASAMITSU)  
宮崎大学・医学部・教授  
研究者番号: 1 0 1 8 0 2 6 7

##### (2) 研究分担者

山口 秀樹 (YAMAGUCHI HIDEKI)  
宮崎大学・医学部・講師  
研究者番号: 1 0 3 0 5 0 9 7  
上野 浩晶 (UENO HIROAKI)  
宮崎大学・医学部・助教  
研究者番号: 0 0 3 8 1 0 6 2  
十枝内 厚次 (TOSHINAI KOJI)  
宮崎大学・医学部・講師  
研究者番号: 8 0 3 8 1 1 0 1  
土持 若葉 (TSUCHIMOCCHI WAKABA)  
宮崎大学・医学部・医員  
研究者番号: 9 0 5 7 3 3 0 3

##### (3) 連携研究者

なし