

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380173

研究課題名(和文) グレリン、ニューロメジンU/Sによる自律神経様作用の生理・生化学的解析

研究課題名(英文) Physiological and biochemical analysis of the autonomic nerve-like action by ghrelin and neuromedin U/S

研究代表者

中原 桂子 (NAKAHARA, KEIKO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90315359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：グレリンの腹腔内投与は呼吸商を上昇させ、体温の低下を招いた。高温下での、デスアシルグレリン末梢投与は生存率を上昇させた。ニューロメジンS(NMS)はラットの体表温度を上昇させた。この上昇は、ノルアドレナリン 3受容体選択的遮断薬であるSR59230Aの前投与で阻止された。PGE2の合成に必要なシクロオキシゲナーゼを阻害するIndomethacinの前投与によっても完全に抑制された。NMSノックアウトマウスとwildマウスを寒冷条件(4℃)下に90分間曝露し、その体表温度の変化を比較したところ、NMSノックアウトマウスの体表温度はワイルドマウスの体表温度に比べて有意に低い値を示した。

研究成果の概要(英文)：The intraperitoneal administration of the ghrelin raised respiratory quotient and decreased the body temperature. Peripheral administration of des acyl ghrelin increased a survival rate of rats maintained under the high temperature. The interventricular administration of neuromedin S (NMS) increased the body surface temperature. This rise was prevented by the pre-administration of SR59230A which was selective blocker for noradrenaline 3 receptors. In addition, it was also completely prevented by the pre-administration of indomethacin which inhibited cyclooxygenase for the synthesis of PGE2. NMS knockout mouse exhibited significant decrease of body surface temperature under cold exposure (4C x 90 min), in comparison with wild mouse.

研究分野：農学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ グレリン ニューロメジンS

1. 研究開始当初の背景

私達の研究室では新規ペプチドの新たな生理作用の探索あるいは新たなペプチドホルモンの探索を行っている。その主な成果には、2001年のグレリンの摂食促進作用の発見や2005年の新たな摂食抑制ペプチドのニューロメジンSの発見などがある。我々はこれまでに、グレリンの乳腺でのミルク合成促進作用 (Nakahara *et al.* Biochem Biophys Res Commun 303(3):751-755, 2003) や胎児での成長促進作用、細胞増殖促進作用 (Nakahara *et al.* Endocrinology 147(3):1333-1342, 2006) を、また、ニューロメジンUの環境への適応や感覚反射の亢進作用 (Nakahara *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 323:615-620, 2004) や生体リズムへの作用 (Nakahara *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 318:156-161, 2004) を報告した。これらの研究を通して、胃、腸、脊髄および視床下部から分泌されるグレリンやニューロメジンU (あるいはS) が、血液を介して標的器官に達して作用するという通常ホルモンと異なり、中枢神経様の作用 (生体リズムの調節や摂食の調節あるいは感覚の調節) を示すユニークな新規ホルモンと感じられた。そこで、最近、グレリンを中枢へ投与し循環器系、消化器系あるいは体温系への効果を見てみると、血圧の低下、心拍数の減少、体温の低下、胃酸分泌の増加など、あたかも副交感神経系の作用を示す結果が得られた。一方、ニューロメジンSは逆に血圧の上昇、心拍数の増加、体温の増加などを示し交感神経様の作用が認められた。さらに、自律神経系が外部環境やストレスの反射によって制御されるのと同様に、グレリンも環境温度やストレスなどに反応して分泌されることが判明した (Nakahara *et al.* J. Endocrinology 207:95-103, 2010)。これらの結果から推測すると、このグレリンやニューロメジンUあるいはSは恒常性の維持に関わる極めて重要な神経様ホルモンではないかと推測された。このような観点からすれば摂食抑制ホルモンのレプチンもまた、同様なホルモンと言える。レプチンは白色脂肪組織から分泌され、摂食を抑制し、エネルギー消費を促進し、体温を増加させる。我々は、レプチンの摂食抑制作用がニューロメジンSの抗体の前投与で阻止される事を見だし、ニューロメジンSがレプチンの下流にあることを証明した (Nakahara *et al.* J. Endocrinology 207:185-193, 2010)。

以上のような背景から、本研究では、グレリン、ニューロメジンU (あるいはS) を、自律神経系を介した、あるいは自律神経系様の作用を示すペプチドホルモンと位置づけ、その作用の解明を行うものである。このような内因性ペプチドホルモンにおいて自律神

経系様の作用の詳細が判明すれば、副作用が少なく、分解も容易で安全な神経薬開発へ結びつく可能性は極めて大きい。そのため本研究を創薬への橋渡しの研究とも考えている。

2. 研究の目的

哺乳動物の個体としての恒常性は、主に自律神経系 (交感神経と副交感神経) と内分泌系によって制御されている事は周知の事実である。最近、私達はペプチドのグレリンやニューロメジンU/Sが内分泌作用以外に、自律神経系様の作用を示すことを発見し、これらが体の恒常性維持に関与している可能性を示した。例えばグレリンの中枢投与は、血圧、心拍数、体温の低下を招き、一方、ニューロメジンU/Sの投与は、血圧、心拍数、体温の増加を招いた。このような自律神経様作用を示すペプチドホルモンは珍しく、ペプチドによる内分泌と自律神経系のクロストークを介した個体の恒常性維持機構の存在を示唆している。本研究では、このようなペプチドホルモンと内分泌系 - 神経系のクロストーク機構を様々な手法で解明し、ペプチドによる自律神経系創薬への橋渡しをすることにある。

具体的には、グレリンの副交感神経様作用は運動や代謝 (呼吸商) などにも影響を及ぼすのか、デスアシルグレリンの体温低下作用はラットの熱中症の予防効果を示すか、NMSもNMU同様に体温上昇作用を示すか、もしそうであれば、どのような機序で体温を上昇するのか、を調べることにした。特にこの機序については、交感神経遮断薬・シクロオキシゲナーゼ阻害剤を用いてNMSの体温への作用機序を検討した。また、内因性のNMSの作用を調べるため、NMSノックアウトマウスの室温もしくは寒冷下における体温についても調べた。

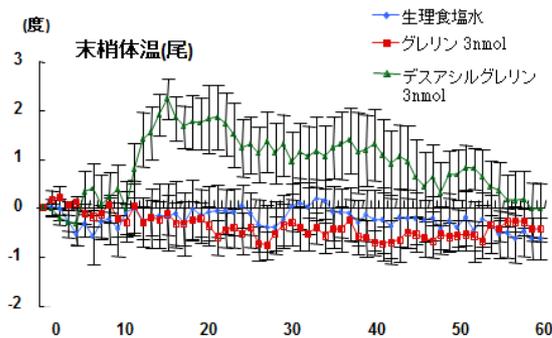
3. 研究の方法

ラットは、体重300~400gのWistar (日本チャールズ・リバー株式会社) の雄ラットを用いた。マウスは、NMSノックアウトマウスおよび同系統のC57BL6Jマウス (日本チャールズ・リバー株式会社) の、12-15週齢の雄を用いた。それぞれ少なくとも一週間、一定の明暗サイクル (7:00-19:00点灯) と室温 (23±1) で飼育した。餌と水は自由摂食し、すべての行程はJapan Physiological Society's guidelines for animal care に法って行った。

グレリンの副交感神経様作用は運動や代謝 (呼吸商) などにも影響を及ぼすのか、ラットを輪回し付きの代謝ケージに入れ、順化させた後に、腹腔内にグレリンを投与し、運動量あるいは酸素消費と二酸化炭素排出

量を測定し、呼吸商を求めた。また生理食塩水投与においても同様な測定を行い、これをコントロールとした。

デスアシルグレリンの体温低下作用はラットの熱中症の予防効果を示すか、高温下での体温上昇をデスアシルグレリンが阻止するか否か調べるために、35度の高



温下にラットを入れ、生理食塩水とデスアシルグレリン(10nmol/rat)を末梢に投与し、その後の生存率を比較した。また、生化学的指標として、肝臓でのアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、腎臓のクレアチンおよび尿素窒素 (BUN) の血液中の値を測定した。さらに、血液中のカリウムイオンとヘマトクリット値を測定した。

NMS も NMU 同様に体温上昇作用を示すか、

ラットの側脳室にカニューレを装着した。術後4日目にハミルトンシリンジで、10 μ l の生理食塩水または NMS (Peptide Institute Inc., Osaka, Japan) の溶液を側脳室投与した。ラット・マウスの背中の体表温度は SC-620 (FLIR SC620, FLIR Systems, Danderyd, Sweden) 赤外線サーモグラフィを各動物の上方 (ラット 1.3 m、マウス 70cm) に設置して測定した。アドレナリン β 1,2 受容体遮断薬である Timolol (Sigma-Aldrich Co., 0.5mg/rat/200 μ l) もしくはノルアドレナリン β 3 受容体遮断薬である SR59230A (Tocris bioscience, USA, 0.1mg/kg) をそれぞれ腹腔投与した。そして遮断薬投与30分後に NMS (明期 0.5nmol、暗期 0.05nmol) または saline を側脳室投与した。また、シクロオキシゲナーゼ阻害剤である Indomethacin (Sigma-Aldrich Co.) は、100 μ g/5 μ l を側脳室投与し、さらに阻害剤投与30分後に NMS (明期 0.5nmol、暗期 0.05nmol) または saline を側脳室投与した。

NMS ノックアウトマウスの寒冷曝露は暗期条件下において行い、実験開始時 (18:30) に水と餌を取り除き、実験条件へ1時間順化した。その後30分間体温の基準値を測定してから、20:00より4の寒冷条件下に90分

間曝露した。

4. 研究成果

グレリンの代謝や運動の恒常性維持について

グレリンの腹腔内投与は呼吸商を有意に上昇させた。一方、酸素消費量 (熱生産量) には影響しなかった。走行運動はグレリン投与によって減少したが、2日間の合計では有意な差は認められなかった。これはグレリンを投与する事で5分以内から摂食の亢進が起るために、摂食亢進による一時的な減少と考えられた。そこで、グレリン投与直前に餌を外して投与し、走行への影響を調べた結果、グレリン投与直後の走行運動の低下は認められなかった。

以上の結果、グレリンは運動や代謝に極めて消極的 (抑える方向) な作用であることが推測される。このことは同化作用を促進し動物の恒常性を増体に向かわせるための物質かも知れない。

デスアシルグレリンのラットの熱中症防止効果の検討

我々は以前、デスアシルグレリンに背中の体表温度の低下作用と尾部の体表温度の上昇作用があることを報告した。このことは、デスアシルグレリンが積極的に背中の褐色脂肪の熱生産を抑制し、尾部においては熱放散を積極的に促進することで体温低下を起こしていることを示唆している。そこで、今回は、高温下での体温上昇をデスアシルグレリンが阻止するか否かを詳細に検討した。まず、35度の高温下で、生理食塩水とデスアシルグレリン (10nmol/rat) を末梢に投与したラットの110分後の生存率を比較した結果、生理食塩水投与では12匹中11匹が熱中症で死亡したのに対し、デスアシルグレリン投与ではわずか1匹しか死亡しなかった。そこで、その熱中症防止作用のメカニズムを調べるため、肝臓と腎臓機能を解析した。その結果、熱中症で見られる肝臓でのアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) の上昇や腎臓のクレアチンおよび尿素窒素 (BUN) の上昇がデスアシルグレリン投与で完全に抑制されている事が判明した。さらに、デスアシルグレリンは血中のカリウムイオンやヘマトクリット値の上昇も抑制していた。

以上の結果、デスアシルグレリンの熱中症防止の効果はこのような血中イオンの安定性の維持や肝臓、腎臓機能の維持を通してのものかも知れない。

NMS の側脳室投与の体表温度への影響
まず、NMU を側脳室に投与した結果、明

期と暗期の両方において NMU0.5、1.0nmol で背中体表温度が約 1 有意に上昇し、60 分間持続した。また、60 分間の体表温度の変化量の平均をみると、NMU の効果の強さは濃度依存的であった。NMS の側脳室投与によっても NMU と同様に明期、暗期ともにラットの体表温度上昇が見られたが、その効果の強さには明期と暗期で違いがあった。明期では NMS 0.5、1.0nmol の側脳室投与で体表温度の上昇がみられたが、NMS 0.1nmol では体表温度の上昇は見られなかった。一方で、暗期では、NMS 0.1、0.5、1.0nmol の全ての濃度で 1 以上の有意な体表温度の上昇がみられた。このことから、暗期においてのみ NMS の作用は NMU よりも強いことが示唆された。

以上の結果、NMU および NMS は強い体温上昇作用を示すことが判明した。

ノルアドレナリン受容体遮断薬の NMS による体表温度上昇への影響

先の NMS の体温上昇作用の機序を明らかにするために、ノルアドレナリン受容体遮断薬の前投与がこの体温上昇作用を阻止するか否かを検討した。

まず、遮断薬投与時の NMS 濃度を決定するために、NMS がより低濃度でも体表温度に影響するかをさらに調べた。明期では 0.5nmol で有意に体温上昇が見られ、0.1nmol では体温上昇が見られなかったことから、0.25nmol NMS の側脳室投与を行った。しかし、ラットの体表温度は上昇しなかった。一方、暗期では 0.1nmol でも体表温度上昇が見られたため、0.05、0.01nmol の NMS を側脳室投与した。0.05nmol 投与ではラットの体表温度は有意に上昇したが、0.01nmol 投与ではラットの体表温度は上昇しなかった。これらの結果から、遮断薬投与と実験では NMS の投与濃度を明期 0.5nmol、暗期 0.05nmol とした。

まず、ノルアドレナリン β_1 、 β_2 受容体遮断薬である Timolol の前投与を行った。その結果、Timolol の前投与後 saline 投与群および Timolol 前投与後 NMS 投与群共にその体表温度の変化に有意な差は認められなかった。この結果は明期と暗期の両方において同じように見られた。次にノルアドレナリン β_3 受容体選択的遮断薬である SR59230A の前投与と実験を行った。まず明期において SR59230A 前投与後 saline 投与群ではその体表温度の変化量の値はほとんど変化がなかったのに対して、SR59230A 前投与後 NMS 投与群では NMS 投与による体表温度上昇が有意に抑制された。暗期においても同様に、SR59230A 前投与後 NMS 投与群では NMS 投与による体表温度上昇が有意に抑制された。

以上の結果、 β_3 受容体選択的遮断薬である SR59230A が NMS の体温上昇作用を抑制したことから、交感神経系を介して、特に β_3

受容体を介した熱生産を NMS は促進していると推測された。

シクロオキシゲナーゼ阻害剤の NMS による体表温度上昇への影響

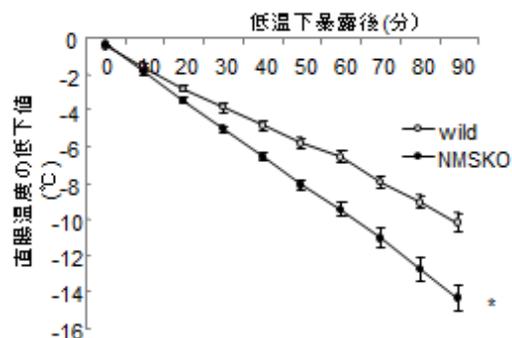
先の末梢交感神経様作用とは別に、中枢において体温上昇に關与するプロスタグランジン E_2 (PGE_2) との關与を調べるために、 PGE_2 の合成に必要なシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害する Indomethacin を用いて、NMU、NMS の体温上昇作用が中枢でのプロスタグランジン合成を介している可能性を調べた。

明期において Indomethacin 前投与後 saline 投与群ではその変化量の値にほとんど変化がなかったのに対して、Indomethacin 前投与後 NMS 投与群では NMS 投与による体表温度上昇は完全に抑制され、saline 投与群とほとんど同じ値を示した。暗期においても同様に Indomethacin 前投与によって NMS 投与による体表温度上昇は有意に抑制された。

以上の結果、NMS の体温上昇の一部の機序に中枢におけるプロスタグランジン合成促進が含まれていることが推測される。

NMS ノックアウトマウスと wild マウスの体表温度の比較

先の結果から、NMS の外因性投与が体温を上昇させることが判明したので、果たして内因性の NMS も体温維持に関わっているのかを KO マウスを用いて調べた。まず、NMS ノックアウトマウスと wild マウスの体表温度を室温 (23 ± 1) で明期開始と暗期開始の 60 分間ずつ測定した。その結果、明期においても暗期においても両者の体表温度に有意な差は認められなかった。また、NMS ノックアウトマウスの体表温度は wild マウスの体



通常状態 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) から 4°C の寒冷条件下に NMS ノックアウトマウスと wild マウスを 90 分間曝露し、その時の直腸温度の経時的变化を測定した (○)。グラフは、寒冷曝露前 10 分間の平均体表温度を 0 とした、その後の変化量を示している。それぞれの値は wild マウス (○) $n=4$ 、NMSKO マウス (●) $n=4$ の平均を示す。

(* $p < 0.001$, NMSKO vs wild)

表温度と同様に明期に 36~37、暗期に 37~38 の体表温度を示し、その体表温度に明暗周期が見られた。

次に、NMS ノックアウトマウスと wild マウスを寒冷条件(4℃)下に 90 分間曝露し、その体表温度の変化を比較した。これまでの実験では暗期により強い効果が見られたことから、暗期のみの実験とした。体表温度の変化は寒冷条件曝露前 10 分間の体表温度の平均を 0 とした、その後の変化量で見ている。その結果、NMS ノックアウトマウスの体表温度はワイルドマウスの体表温度に比べて有意に低い値を示し、その差は約 4℃もあった。

以上の結果、内因性 NMS が寒冷下での体温維持に重要な役割を演じていることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1 . Y Suzuki, K. Nakahara, K Maruyama, R Okame, Y Inoue, N Murakami: Changes in mRNA expression of hypothalamic appetite-regulating peptides during different phases of lactation in rats. **J. Mol. Endocrinol.** 52:97-109,2014 査読有り

2 K. Nakahara, aruyama, Y Suzuki, R Okame, N Murakami: Characterization of a novel genetically obese mouse model demonstrating early-onset hyperphagia and hyperleptinemia. **Am. J. Physiology, Endocrinology and Metabolism** 305(3):E451-463, 2013 査読有り

3 . M Bannai, N Kawai, K Ono, K. Nakahara, N Murakami: The effects of glycine on subjective daytime performance in partially sleep-restricted healthy volunteers **Front Neurol.** 3:61-68, 2012 査読有り

4 .Inoue Y, Nakahara K, Maruyama K, Suzuki Y, Hayashi Y, Kangawa K, Murakami N. Central and peripheral des-acyl ghrelin regulates body temperature in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 430:278-283, 2012 査読有り

5 . K. Nakahara, S Takata, M Ishii, K Nagao, M Bannai, M Takahashi, N Murakami: Hypothalamic gene expression involved in anorexia in rodents fed valine-deficient diet. **Amino Acids.** 42:1397-1404,2012 査読有り

6 . T Sakamoto, K. Nakahara, K Maruyama, T Katayama, K Mori, M Miyazato, K Kangawa, N Murakami: Neuromedin S regulates cardiovascular function through the sympathetic nervous system in mice. **Peptides** 32:1020-1026, 2011 査読有り

7 . T.Ida, M.Miyazato, X.Zi.Lin, H.Kaiya,

T.Sato, K.Nakahara, N.Murakami, K.Kangawa, M.Kojim: "Identification of the endogenous cysteine-rich peptide trissin, a ligand for an orphan Gprotein-coupled receptor in Drosophila" **Biochemical and Biophysical Research Communications** 414. 44-48 (2011), 査読有り

〔学会発表〕(計 11 件)

1 . Y. Hayashi, Y. Inoue, K. Nakahara, K. Maruyama, Y. Suzuki, K. Kangawa, N. Murakami: "Des-acyl ghrelin protects against body damage by heat stroke in rats" 2013 Society for Endocrinology Annual Meeting. San Francisco, USA (2013.6.17)

2 .村上 昇、中原桂子、寒川賢治: "ニューロメジン S とその関連ペプチドの生理作用について" 第 40 回日本神経内分泌学会、第 36 回日本比較内分泌学会合同シンポジウム(招待講演)。(2013 年 10 月 25 日) 宮崎

3 .鈴木 喜博、中原 桂子、延生 卓也、村上 昇: "ラットの泌乳期間中の弓状核摂食関連ペプチド遺伝子発現による摂食亢進機序の解析" 第 156 回日本獣医学会(2013 年 9 月 20 日) 秋季大会. 岐阜

4 .延生 卓也、中原 桂子、村上 昇: "ニューロペプチド S による明期の交感神経を介した体温及び血圧への作用" 第 156 回日本獣医学会 (2013 年 9 月 20 日) 秋季大会. 岐阜

5 .鈴木 喜博 中原 桂子、村上 昇: "ラットの泌乳期中の摂食亢進機序の解析、特に視床下部摂食関連ペプチド遺伝子発現について" 第 154 回日本獣医学会(2012 年 9 月 16 日) 秋季大会. 盛岡

6 .延生 卓也中原 桂子、村上 昇: "ニューロペプチド S のラットの体温および血圧におよぼす効果" 第 154 回日本獣医学会(2012 年 9 月 16 日) 秋季大会. 盛岡

7 .赤木 愛、中原 桂子、村上 昇: "NMS の体温上昇作用の機序について" 第 154 回日本獣医学会 (2012 年 9 月 16 日) 秋季大会. 盛岡

8 .井上 賀之、中原 桂子、村上 昇: "グレリン及びデスアシルグレリンによる体温低下作用の作用機序について" 第 154 回日本獣医学会(2012 年 9 月 16 日) 秋季大会. 盛岡

9 . 村上昇、中原桂子: "エネルギー代謝・バランス制御" 第 82 回日本動物学会. (2011 年 09 月 21 日). 旭川(招待講演)

10 . 井上貴之、中原桂子、中村潤子、村上昇: "デスアシルグレリンの副交感神経系を介した体温低下作用について" 第 152 回日本獣医学会秋季大会. (2011 年 09 月 19 日). 大坂

11 . 静谷成晃、中原桂子、村上昇: "高脂肪食給餌および自由走行運動がマウスの摂食と体重におよぼす影響" 第 152 回日本獣医学会秋季大会. (2011 年 09 月 19 日). 大坂

〔図書〕(計 1 件)

K.Nagao, M.Bannai, K.Nakahara, N.Murakami
Chapter Title : Functions of Dietary Valine, as Revealed by Dietary Valine-Deficiency. Title of book 「Valine: Dietary Sources, Functions and Health Benefits」Nova Science Publishers, Inc. NY 2011/08/11 p105-121

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 高体温治療剤

発明者 : 村上昇、中原桂子、寒川賢治、林友二郎

権利者 : 宮崎大学

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2011/070077

出願年月日 : 2011 年 9 月 2 日

国内外の別 : 国外

○取得状況

該当無し

〔その他〕

・新聞報道

該当なし

・受賞

該当なし

・ホームページ等

http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/vet_phy/index.htm

6 . 研究組織

研究代表者

中原 桂子 (NAKAHARA KEIKO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号 : 90315359