

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32206

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22126010

研究課題名（和文）肥満における食欲制御破綻機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of failure of appetite regulating system in obesity

研究代表者

清水 弘行 (Shimizu, Hiroyuki)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：20251100

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 61,100,000 円

研究成果の概要（和文）：ネスファチン過剰発現マウスを作製、食行動に及ぼす影響につき解析した。通常食摂取下では、摂取量や体重増加には全く影響がなく、その原因検索としてCARTの発現減少がネスファチン過剰発現に拮抗している可能性が示唆された。同マウスにて45%高脂肪含有食摂取下で同様の検討を実施してみると、摂取量には全く差異は認めなかったもののネスファチン過剰発現マウスにて有意な体重増加、皮下脂肪重量の増加、UCP-1の発現低下とともに脂肪肝の進展、高インスリン血症が観察された。長期間の4高脂肪含有食摂取では、非アルコール性脂肪肝炎（NAFLD）の病態とも一致する肝臓内の中心静脈周辺部の線維化の進行が観察された。

研究成果の概要（英文）：The present study used Nesf (nesfatin) transgenic (Tg) mice to investigate the metabolic role of Nesf. No differences were observed in daily food intake and body weight. Nesf Tg mice showed decreased mRNA expression of CART. Nesf Tg mice fed 45% high-fat diet (HFD) showed higher increase in body weight than their non-Tg littermates; however, no difference was observed in daily food intake between these 2 groups. Nesf Tg mice fed 45% HFD showed a significant increase in the weight of the liver, subcutaneous fat, and brown adipose tissue and decrease in the expression of uncoupling protein-1 in the subcutaneous fat. Insulin levels of these Tg mice were significantly higher. Histological analysis showed marked fat deposition in the hepatocytes surrounding the hepatic central veins in Nesf/NUCB2 Tg mice fed 45% HFD. It is indicated that Nesf/NUCB2 is involved in the development of insulin resistance and fat deposition in the liver, independent of the modulation of energy intake.

研究分野：肥満

キーワード：ネスファチン

1. 研究開始当初の背景

末梢組織から摂食中枢への代謝情報は、液性情報と神経性情報により制御されている。摂食中枢への液性情報の伝達には、脳血管内から神経細胞への物質の輸送を制御する血液-脳関門が重要な役割を果たしている。

新たに見出された摂食抑制蛋白、ネスファチン-1は摂食中枢とともに、末梢組織においても産生され、血液中にも存在することが明らかとなっているが、ネスファチン-1の液性因子としての末梢組織と摂食中枢の臓器連関への関与については、いまだ検討されていない。ネスファチン-1の前駆蛋白であるネスファチン/ヌクレオピンディン-2 (Nesf/NUCB2) も全身の組織内においてその遺伝情報が発現していることが明らかとされていたが、各組織における発現細胞やそのプロセッシングへの関与に関する詳細については不明な点が多いとともにそれらの細胞内における機能的な意義や肥満症の病態への関与については不明な点も少なくない。

2. 研究の目的

脂肪組織などの末梢組織と摂食行動をつかさどる中枢神経系の間において主に液性因子としてのネスファチン-1を介した臓器連関が存在する可能性を明らかとするともに、Nesf/NUCB2の遺伝子改変動物を用いてネスファチン-1を介した代謝性の食欲制御機構の乱れとともにNesf/NUCB2の細胞内における生理的意義を解明することによりその乱れが生じることによる肥満症の病態への関与を目指す。

3. 研究の方法

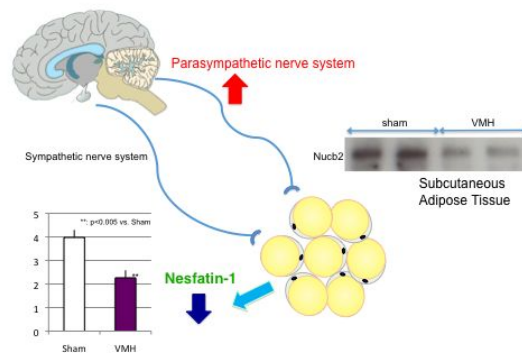
- (1) 代表的な実験的肥満動物とされる両側視床下部腹内側核 (VMH) の電氣的破壊動物において末梢における臓器別のネスファチン-1及びNesf/NUCB2の産生について検討する。
- (2) げっ歯類の末梢組織を用いて各組織内における種々の細胞内におけるNesf/NUCB2の発現を免疫組織染色法により解析することにより、各組織別にNesf/NUCB2を発現する細胞を明かとする。
- (3) 全身性にNesf/NUCB2過剰発現マウスを作成し、通常食または高脂肪食摂餌下にて20週齢まで個別に飼育、摂食量や体重変化など代謝学的な解析を実施することにより、Nesf/NUCB2の生理的意義とともに肥満症の病態への関与を解明する。
- (4) さらに同マウスの血圧、飲水量や尿量、尿中への電解質排泄の変化についても検証することにより、肥満症に伴う血圧上

昇機序へのNesf/NUCB2の関与の可能性の解明を試みる。

4. 研究成果

- (1) VMH破壊により、白色脂肪組織においてのみNesf/NUCB2の産生が低下することが明らかになるとともに、その採用機構には副交感神経系が関与している可能性が明らかとなり、中枢神経系から自律神経系を介して末梢組織における摂食抑制性蛋白の合成が制御されている可能性が明らかとなった。

Regulation of Nesfatin/NUCB2 Synthesis and Secretion from Adipose Tissue



- (2) Nesf/NUCB2は、脳内においては視床下部室傍核や弓状核を中心とした摂食行動の調節に関すると思われる神経細胞内に限局して存在するとともに、末梢臓器においては血管内皮細胞、横紋筋、心筋、脂肪細胞、膵β細胞や腎集合管細胞などに限局して存在することが明らかとなり、これら細胞の機能調節への関与が推察された。
- (3) Nesf/NUCB2過剰発現マウスを作製し、過剰なネスファチン産生状態が食行動に及ぼす影響につき解析した。通常食摂餌下では、20週齢までの1日摂餌量や体重増加には全く影響が認められなかった。その原因検索として視床下部神経ペプチドの発現を検討した結果では、摂食抑制性ペプチドの中でcorticotropin-releasing hormone (CRH)、オキシトシンの発現増加が確認された一方、cafein and amphetamine-related transcript (CART)の発現は明らかに抑制されており、CARTの発現減少がネスファチン過剰発現に拮抗している可能性が示唆された。そのような結果より、CRHやオキシトシン作動性ニューロンの下流に存在する可能性が示唆されるとともに、CART作動性ニューロンは、ネスファチン-1作動性ニューロンと相補的に調節がなされている可能性が示唆された。一方、本Nesf/NUCB2過剰発現マウスにおいては血中ネスファチン-1濃度には有意な上昇が認められず、今回作成さ

れたマウスにおいて過剰発現が観察された臓器においては、Nesf/NUCB2 からネスファチン-1 へのプロセッシングはそれほど行われていない、すなわち今回過剰発現が確認された臓器は血中ネスファチン-1 濃度を規定する部位ではない可能性が想定された。このように Nesf/NUCB2 過剰発現マウスにおいて血中ネスファチン-1 濃度の上昇が観察されなかったことが、Nesf/NUCB2 過剰発現マウスの食行動に有意な変動が観察されなかった一因とも推察された。

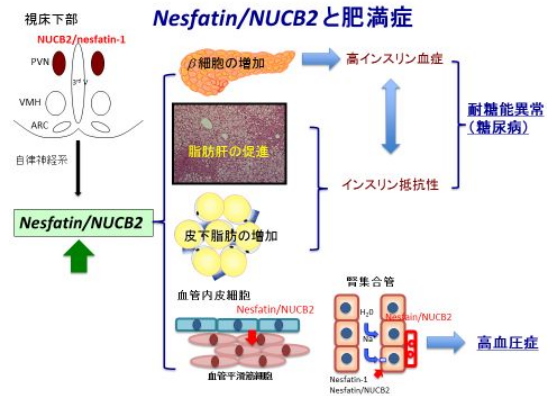
(4) Nesf/NUCB2 過剰発現マウスにおいて 45%高脂肪含有食摂餌下で同様の検討を実施してみると、やはり 20 週齢までの 1 日摂取量には全く差異は認められず、血中ネスファチン-1 濃度についても有意な増加を認めなかったもののネスファチン過剰発現マウスにおいて有意な体重増加が観察され、皮下脂肪重量の増加とともに脂肪肝の進展が認められた。また同マウスでは、血糖値には差異がないものの著しい高インスリン血症が観察された。さらに長期間の 45%高脂肪含有食摂餌実験を実施すると、脂肪肝のさらなる進展を認めるとともに、非アルコール性脂肪肝 (NASH) の病態とも一致する肝臓内の中心静脈周辺部の線維化の進行が観察されるようになり、ネスファチンの過剰発現がヒトにおける NASH の病態発現へ関与する可能性が示唆される結果が得られた。

(5) Nesf/NUCB2 過剰発現マウスを用いて Nesf/NUCB2 の血圧調節機構への影響について検証した。同マウスを個別に飼育し、飲水行動、尿排泄や血圧調節への変動につき解析を実施した。Nesf/NUCB2 過剰発現マウスでは、脈拍数には有意な変動を惹起することなく収縮期、平均及び拡張期血圧、すべてが野生型マウスに比較して有意に高値を示した。

また 1 日の飲水量の増加を認めるとともに、視床下部における epithelial sodium channel (ENaC)- γ mRNA の発現抑制が観察され、飲水行動調節への関与が示唆された。また同マウスにおいては 1 日の尿排泄量の増加と尿中ナトリウム濃度の減少も観察され、腎におけるナトリウム排泄量の減少が示唆されたが、血中電解質濃度には明らかな変化は認めなかった。同マウスの腎組織には、組織学的には明らかな変化は観察されなかった。このような結果より、ネスファチンは、中枢において飲水行動の制御に関与しているとともに、腎集合管においてナトリウムの再吸収に関与することにより血圧調節機構の一端を担っている可能性

が示唆され、肥満症における高血圧発現への関与も推察された。

(6) 下図にこれまで一連の本研究成果により明らかとなった結果より想定される Nesf/NUCB2 と肥満症発症との関連に関して図示した。



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 14 件)

Suzuki Y, Shimizu H (15 人中 2 番目), Inoue S*. Vagal hyperactivity due to ventromedial hypothalamic lesions increases adiponectin production and release. *Diabetes* 63: 1637-1648, 2014. 査読有 . doi: 10.2337/db13-0636.

Osaki A (2 人中 1 番目), Shimizu H* (2 人中 2 番目). Peripheral administration of nesfatin-1 increases blood pressure in mice. *Hypertens Res* 37: 185-186, 2013. 査読有 . doi: 10.1038/hr.2013.122.

Shimizu H* (2 人中 1 番目). Nesfatin-1: its role in the diagnosis and treatment of obesity and some psychiatric disorders. *Methods Mol Biol* 963: 327-338, 2013. 査読無 . doi: 10.1007/978-1-62703-230-8_20.

Osaki A, Shimizu H* (6 人中 2 番目). Enhanced expression of nesfatin/nucleobindin-2 (NUCB2) in white adipose tissue of ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats. *Neurosci Lett* 521: 46-51, 2012. 査読有 . doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.056.

Ishida E, Hashimoto K*, Shimizu H (8 人中 3 番目). Nesfatin-1 Induces the Phosphorylation Levels of cAMP Response Element-Binding Protein for Intracellular Signaling in a Neural Cell Line. *PLOS ONE* 7: e50918, 2012. 査読有 . doi:

10.1371/journal.pone.0050918.

Tsuchiya T*, Shimizu H (12人中2番目).
Fasting concentrations of nesfatin-1
are negatively correlated with body
mass index in non-obese males. *Clin
Endocrinol*, 73: 484-490, 2010. 査読有.
doi: 10.1111/j.1365-2265.

〔学会発表〕(計 6 件)

清水弘行, 田中満崇. ネスファチン/ヌクレオピンディン-2 (Nesf/NUCB2) 過剰発現マウスの代謝解析. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会、2015年5月21-24日、下関

Shimizu H. Transgenic Mice Over-expressing Nesfatin/Nucleobindin-2 (Nesf/NUCB2) Are Susceptible to High Fat Diet (HFD)-Induced Obesity. ENDO 2015, 2015年3月3-8日、San Diego、米国.

清水弘行, 荒井桃子, 田邊裕子, 大崎 綾. ネスファチン/ヌクレオピンディン-2 過剰発現は、高脂肪食摂餌時の体重増加を促進する. 第35回日本肥満学会、2014年10月24-25日、宮崎.

Shimizu H, Osaki A. Possible involvement of anorexigenic protein, nesfatin/nucleobindin-2 (NUCB2) in blood pressure regulation by regulating water reabsorption in renal collecting duct. 74th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 2014年6月13-17日、San Francisco、米国.

Shimizu H, Osaki A, Ehuchi H, Senoo A. Paradoxical reduction of body weight gain in mice lacking an anorexigenic protein, nesfatin/nucleobindin-2. 73rd Scientific Sessions of American Diabetes Association, 2013年6月21-25日、Chicago、米国.

大崎 綾, 清水弘行, 瀬野尾章, 江口広志. ネスファチン/ヌクレオピンディン-2 (Nesf/NUCB2) 欠損の糖代謝への影響. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会、2013年5月16-18日、熊本.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

清水 弘行 (SHIMIZU, Hiroyuki)
国際医療福祉大学・国際医療福祉大学病院・部長
研究者番号：20251100

(2) 研究分担者

大崎 綾 (OSAKI, Aya)
群馬大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30711387

(3) 連携研究者

土屋 天文 (TSUCHIYA, Takafumi)
獨協医科大学・越谷分院・講師
研究者番号：20396659