

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02354

研究課題名(和文) Neuromedin U/Sとそれらの新規関連ペプチドの機能探索および橋渡し研究

研究課題名(英文) Functional exploration and translational research of Neuromedin U / S and these novel related peptides

研究代表者

村上 昇 (MURAKAMI, NOBORU)

宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・特別教授

研究者番号：80150192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ニューロメジンU(NMU)およびニューロメジンS(NMS)の前駆体それぞれに、もう一つの機能性ペプチドが存在する。それらはNURP(NMU前駆体関連ペプチド)およびNSRP(NMS前駆体関連ペプチド)と名づけられた。それらのペプチドの生理機能(摂食、体温、エネルギー代謝、心拍数、あるいは下垂体ホルモン)への作用や、作用部位をラットの側脳室投与実験で調べてみると、NURPやNSRPはNMUやNMSとは全く異なる部位に作用し、それぞれが特異的な生理作用を有することが判明した。以上の結果は、これらの新規ペプチドは、脳の部位時的に切り出され、特異的受容体に作用していると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内には未だ同定されていないペプチドが数多く存在する。新規ペプチドの発見とその生理作用の解明は、生体内の様々な生理機能や機序に新たな解釈を与え、新薬の開発につながる可能性が極めて大きい。これまでに、我々はグレリン、ニューロメジンU(以下NMUと略)やニューロメジンS(以下NMSと略)などの新規ペプチドの同定や作用を解明し、摂食機構の新たな仕組み、ホルモンの自律神経様作用の発見、ホルモンと神経のクロストークなど、これまでの常識や解釈を覆す事実を提示してきた。本研究は、新規ペプチドNURPとNSRPの機能をNMUやNMSと比較しながら、網羅的に解明し、創薬への橋渡しをすることにある。

研究成果の概要(英文)：There is another functional peptide for each of the precursors of Neuromedin U (NMU) and Neuromedin S (NMS). They were named NURP (NMU precursor-related peptide) and NSRP (NMS precursor-related peptide). Physiological functions of these peptides (effects on feeding, body temperature, energy metabolism, heart rate, or pituitary hormones secretion), and action site of these peptides was examined in a rat with the experiment of icv injection. It was found that NURP and NSRP act on the other sites with NMU or NMS, and each has a specific physiological action. From the above results, it was speculated that these novel peptides were excised at the site of the brain in a timely manner and acted on specific receptors.

研究分野：神経生理学

キーワード：ニューロメジンU ニューロメジンS 新規ペプチド 自律神経 下垂体ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

生体機能の恒常性は主に自律神経系と内分泌系によって維持されている。内分泌系の中でも生体機能を担っているものの多くがペプチドホルモンである。ところで、生体内にはオーファン受容体(受容体に結合して作用するリガンドが不明な孤児受容体のこと)と呼ばれるものが数百種同定されている。このことは生体内には、未だ発見されていないペプチドが数多く存在する事を意味する。新たなペプチドの発見は、これまでの生理機能や機序の解釈を大きく変えると同時に新薬に結びつく可能性が極めて高い申請者は、これまでにグレリンの同定(犬、猫、牛のグレリンの同定)や摂食促進作用の発見(Nature, 2001年、Endocrinology, 2006年 他 32 編)、ニューロメジン S(NMS)の発見と作用の解明、ニューロメジン U(NMU)の作用の解明(Nature Medicine, 2004年、Endocrinology 2005年、他 19 編)などを行い、それらを臨床への応用に発展させてきた。本研究では今回新たに同定し、神経でその存在が判明した NMU 前駆体関連ペプチド(以下 NURP と略)と NMS 前駆体関連ペプチド(以下 NSRP と略)の受容体の同定と網羅的生理作用の解明および、それらの創薬への橋渡し研究を展開する。NMU, NMS および NURP, NSRP の関係を下記の図 1 に示した。

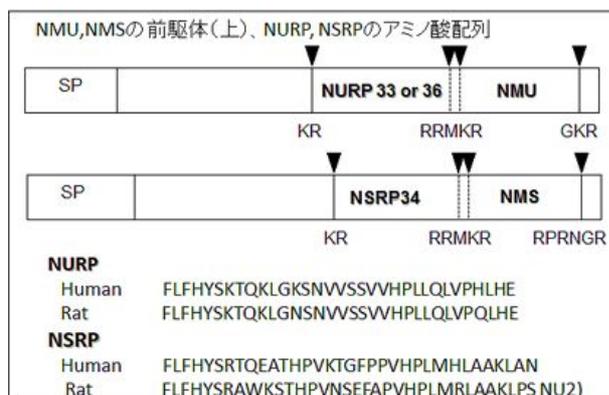
## 2. 研究の目的

本研究は以下のそれぞれの課題を解決することを目的にしている。

1) NMU, NMS、NURP および NSRP の生理機能と作用部位は同じか否か。

NURP と NSRP の受容体は未だ明らかになっていない。NURP と NSRP の受容体がどこに分布し、どのようなものか(G 蛋白質共役受容体なのかなど)を明らかにすることは、それらの

ペプチドの作用部位の探索、作用機序の解明、あるいは作動薬(アゴニスト)あるいは拮抗薬・遮断薬(アンタゴニスト)を作成する上で極めて重要になる。また、NURP, NSRP は NMU や NMS と同時に切り出されるのか?あるいは部位特異的に切り出されるのか?またそれらの最終的な作用部位は?なども興味ある課題である。もし、NURP と NSRP が NMU あるいは NMS と異なる部位に存在すれば、独自の作用を示している可能性が示唆されると同時にプロセッシング酵素が NMU や NMS のものと違う可能性がある。それらの疑問に答えるためには、作用部位を判定するための cFos 発現部位を調べる事が重要と思われる。その発現部位がそれぞれのペプチド投与で異なれば、作用部位(受容体)と作用そのものが異なる可能性、あるいは切り出し(プロセッシング)がそれぞれ異なる可能性が考えられる。また、これらのペプチドを投与した時、その生理作用にどのような違いがあるかを調べることも上記についての課題解決の糸口になる。



## 2) NMU はデクレチンか否か

インスリン分泌抑制消化管ホルモン(デクレチン)の本体は長い間不明であったが、2015年、ショウジョウバエの分泌性ペプチドのリモスタチンがデクレチンとして同定された。また、リモスタチン受容体は哺乳類ではニューロメジンU受容体(NMU-R)であること、ヒトNMUが培養膵島からのインスリン分泌を抑制することが示され、ショウジョウバエのリモスタチンに相当する哺乳類のデクレチンはNMUであると推測された。そこで本研究では、NMUが生理的にデクレチンとして機能しているか否かを検討することとした。

## 3) NMU、NMS、NURP および NSRP は下垂体前葉、および後葉ホルモン分泌に対して同じ作用を及ぼすか否か

NURPの中樞作用を調べている過程で、NURPがプロラクチン分泌を促進することを見出し、一方でNMUはプロラクチン分泌を抑制することが判明した。そこで、以下の2点について詳細に検討する。(ア)NURPとNMUの下垂体前葉ホルモンのプロラクチン(PRL)に対する作用とその機序の比較 (イ)下垂体後葉ホルモン分泌への作用に対するNMU、NURP、NMSおよびNSRPの投与効果の比較

## 3. 研究の方法

### 1) NMU、NMS、NURP および NSRP の生理機能と作用部位の比較

(ア)各ペプチド1nmをWistar成熟雄ラットの側脳室に単一投与し、摂食量、体温、エネルギー代謝、行動量に及ぼす影響を比較した。体温は背中体表温度を赤外線カメラで経時的に録画し、サーモグラフィー解析ソフトで体温に変換した。エネルギー代謝に対する作用は、酸素消費量と二酸化炭素排出量を測定して、エネルギー消費量を計算した。行動量は室町科学の赤外線行動測定装置を用いて計測した。心拍数は非観血系測定装置で、尾部血管から測定した。

(イ)各ペプチド1nmをWistar成熟雄ラットの側脳室に単一投与し、90分後に断頭屠殺し、脳を取り出した。脳は凍結保存し、クリオスタットで連続切片の作成に供した。凍結切片を用いて、免疫蛍光染色法を行い、cFos発現を調べた。cFos発現細胞を脳地図内にドットで示し、それぞれのペプチド投与の効果を比較した。

### 2) NMU が生理的にデクレチンとして機能しているか否か

雄のC57black/6J野生型およびNMU/NMSダブルKO(D-KO)マウスを使用した。D-KOマウスでは、NMUおよびNMS mRNA発現の消失を確認して使用した。血漿グルコースはDRI-CHEM3500V機器(富士メディカルシステム、東京、日本)を使用して測定し、血漿インスリンおよびレプチンは、マウスインスリンELISAキット(シバヤギ、群馬、日本)およびマウスレプチンELISAキット(モリナガ)をメーカーのプロトコルに従って測定した。すべての血液サンプルは、EDTAとアプロチニン(プロテアーゼ阻害剤)を含むチューブに集めた。

グルコースおよびインスリン耐性試験は、D-KOおよび10週齢の野生型マウスを使用した。グルコース(1.5 mg/g 体重)またはインスリン(0.75 mU/g 体重、Humulin R; Eli Lilly)

は、絶食することなく雄の D-KO および野生型マウスに腹腔内投与した。ブドウ糖注射後 0、10、30、60 分に尾部切開法により採血し、上記の方法で血漿インスリンと血糖値を測定した。

3) NMU、NMS、NURP および NSRP の下垂体前葉、および後葉ホルモン分泌に及ぼす影響  
各ペプチド 1nmol を Wistar 成熟雄ラットの側脳室に投与し、30 分後に断頭屠殺して、血液を回収した。すぐに遠心分離して血漿を採取し、測定まで凍結保存した。測定した下垂体前葉ホルモンは、LH (黄体形成ホルモン)、FSH (卵胞刺激ホルモン)、ACTH (副腎皮質刺激ホルモン)、GH (成長ホルモン)、TSH (甲状腺刺激ホルモン) および PRL (プロラクチン) であり、下垂体後葉ホルモンは OXT (オキシトシン) と VA (バゾプレッシン) である。すべてのホルモンは市販の ELISA キットを使用し、それぞれのガイドラインに従って測定した。尚、対象には生理食塩水投与ラットを使用し、それぞれの群で 6 匹を使用した。また、同じ実験を 2 度繰り返し、全部で 12 匹のラットの値を平均した。

#### 4. 研究成果

##### 1) NMU、NMS、NURP および NSRP の生理機能と作用部位の比較

(ア) 摂食への影響では、NMU と NMS の側脳室投与が摂食を抑制したのに対し、NURP と NSRP の側脳室投与は、明期では促進し、暗期では変化がなかった。体温に対しては、NMU および NMS が上昇を起こしたのに対し、NURP は明期で体温低下を、暗期で体温上昇を起こし、これは NSRP 投与でも同様であった。エネルギー代謝への影響では、すべてのペプチド投与で消費量は増加した。同様に、心拍数に対しても、これら 4 つのペプチドはすべて促進した。一方で、行動量に対しては、NMU および NMS は顕著な増加を誘起したが、NURP、NSRP は微増に留まり、有意な上昇には至らなかった。

(イ) 各ペプチドの側脳室投与によって、様々な部位で c-Fos 発現が認められたが、発現レベルには部位によって大

きく異なっていた。視交叉上核 (SCN)、室傍核 (PVN)、視索上核 (SON)、および中枢扁桃核 (CeA) では、NURP および NSRP の注射後の c-Fos 発現レベルは、NMU および NMS の注射後よ

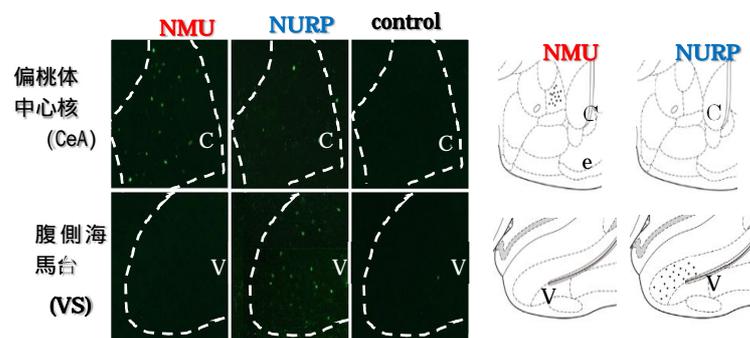


図 2

りも低かった(図 2)。視床下部前部 (AHA) およびエディンガー ウェストファル核 (EW) では、すべてのペプチド投与により、生理食塩水注射グループよりも高い発現レベルを示した。NMU および NMS の側脳室投与グループでは、c-Fos の発現は主に弓状核 (Arc) の内側部分で観察された。一方、NURP および NSRP 注射群では、c-fos の免疫反応性は、主

に Arc の外側部分で検出された。腹側海馬 (vSub) では、c-Fos の発現は、NURP の注射後のラットの脳でのみで観察された。腹内側視床下部核 (VMH) と外側視床下部領域 (LH) では、すべてのグループ間で差は認められなかった。

2) NMU が生理的にデクレチンとして機能しているか否かを検討した。成熟マウスの視床下部および膵臓の NMU-R mRNA の発現を解析した結果、膵臓での発現量は極めて少なかった。NMU の腹腔内投与後の血中インスリン濃度を経時的に測定した結果、血中インスリン濃度に有意な減少は認められなかった。NMU と NMS の両遺伝子欠損マウスと wild マウスの通常食や高脂肪食給餌下での血中インスリンとグルコース濃度の比較を行った結果、両遺伝子欠損マウスと wild マウス間で、血中グルコース濃度や血中インスリン濃度に有意な差はなかった。内因性または外因性の NMU が血漿インスリン レベルに及ぼす影響を実証できなかったため、野生型および D-KO マウスに耐糖能試験を実施した。血漿グルコースとインスリンのレベルは、野生型マウスと D-KO マウスのグルコース投与後 10 分と 30 分で増加し、それらの間でこれらのレベルに有意差はなかった。インスリンの腹腔内投与後、血漿グルコースおよびインスリンレベルは、すべてのマウスでそれぞれ時間依存的に減少および増加した。野生型マウスと D-KO マウスの間で、グルコースまたはインスリンのレベルに有意差はなかった。膵臓組織中の NMU 濃度を RIA で測定した結果、膵臓の NMU 含量は検出限界に近い低濃度であった。以上の結果および以前測定した血中 NMU 濃度が検出不可能だった点から考えると、消化管から分泌された NMU がデクレチンとして機能している可能性は非常に少ないと推測された。一方で、今回の結果は、膵臓の NMU がオートクライン、パラクライン的にデクレチンとして作用している可能性を否定するものではない。

3) 下垂体前葉ホルモン分泌への効果を比較すると、ACTH 分泌に対しては、NMU と NURP は著しく分泌促進を起こしたが、NMS と NSRP ではわずかな分泌促進に留まった。TSH、FSH、LH および GH 分泌に対しては、いずれも有意な変化は見られなかった。PRL に対しては、以前に報告した通りである。一方で、下垂体後葉ホルモンに対しては、非常に興味深い結果が得られた。すなわち、VP に対して、NURP のみが有意な減少を起こした。OXT に対しては、いずれも変化を起こさなかった。また下垂体細胞の培養系に、NMU、NMS、NURP あるいは NSRP を添加しても、前葉ホルモンの分泌には影響を与えなかった。以上の結果、これら 4 つのペプチドは共通した受容体があるにも関わらず、一方で、それぞれに、独自の受容体を有している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakahara Keiko, Maruyama Keisuke, Ensho Takuya, Mori Kenji, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Uemura Ryoko, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu, Murakami Noboru	4. 巻 521
2. 論文標題 Neuromedin U suppresses prolactin secretion via dopamine neurons of the arcuate nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 521 ~ 526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.156	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 -
1. 著者名 Maruyama Keisuke, Kaiya Hiroyuki, Miyazato Mikiya, Murakami Noboru, Nakahara Keiko, Matsuda Kouhei	4. 巻 517
2. 論文標題 Purification and identification of native forms of goldfish neuromedin U from brain and gut	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 433 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.07.108	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 -
1. 著者名 ENSHO Takuya, MARUYAMA Keisuke, QATTALI Abdul Wahid, YASUDA Masahiro, UEMURA Ryoko, MURAKAMI Noboru, NAKAHARA Keiko	4. 巻 81
2. 論文標題 Comparison of glucose tolerance between wild-type mice and mice with double knockout of neuromedin U and neuromedin S	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1305 ~ 1312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0320	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 -
1. 著者名 Terao R, Murata A, Sugamoto K, Watanabe T, Nagahama K, Nakahara K, Kondo T, Murakami N, Fukui K, Hattori H, Eto N	4. 巻 10 (1)
2. 論文標題 Immunostimulatory effect of kumquat (Fortunella crassifolia) and its constituents, - cryptoxanthin and R-limonene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food &Function.	6. 最初と最後の頁 38-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8fo01971a	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口 史門、延生 卓也、森 健二、宮里 幹也、寒川 賢治、丸山 圭介、村上 昇、中原 桂子
2. 発表標題 ニューロメジンS前駆体中の新規ペプチド（NSRP）の生理機能の探索
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 倬恵、村上 昇、中原 桂子
2. 発表標題 ニューロメジンUおよび前駆体関連ペプチドの側脳室投与後のc-Fos発現部位の比較
3. 学会等名 第162回日本獣医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 昇、森 健二、宮里幹也、中原桂子、大谷 瞳、筆谷麻未、井田隆徳、丸山圭介、寒川賢治
2. 発表標題 ニューロメジンU（NMU）、ニューロメジンS（NMS）とそれらの前駆体関連ペプチドのプロラクチン分泌への影響について
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上 昇、中原桂子
2. 発表標題 プロラクチン分泌調節の謎
3. 学会等名 平成30年度日本獣医師会獣医学術会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上 昇、中原桂子
2. 発表標題 走行運動と摂食機構の相反的制御機構について
3. 学会等名 2018年度日本栄養・食糧学会 九州・沖縄支部大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	井上 賀之 (Inoue Yosiyuki) (60807436)	宮崎大学・農学部・助教  (17601)	
研究分担者	中原 桂子 (Nakahara Keiko) (90315359)	宮崎大学・農学部・教授  (17601)	

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