

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09427

研究課題名(和文)ニューロメジンU/ニューロメジンSシステムの新たな生理機能の解明。

研究課題名(英文)New functions of NMU/NMS system

研究代表者

花田 礼子 (Hanada, Reiko)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00343707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経ペプチド・ニューロメジンU(NMU)システムの生理機能の解析として、「炎症が関わる神経疾患や肥満関連疾患」、「脳内高次機能」に着目して研究を行った。その結果、肥満に関連する病態である非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスの肝臓ではNMU発現が亢進し、肝臓にてNMUを強制発現させたマウスではNASH病態に伴う炎症反応が増強し、病状を増悪させることが明らかとなった。一方、中枢性炎症モデル(EAEモデル)におけるNMUシステムの関与ならびにNMUシステムの脳内高次機能への関与についてはNMU/NMS両遺伝子欠損マウスを用いた解析にて、現在、詳細を解析中である。

研究成果の概要(英文)：Neuromedin U (NMU) and Neuromedin S (NMS) are neuropeptides, shared with common receptors, and those physiological roles reported before are reduction of food intake and increasing energy expenditure. In this project, we have examined the new functions of NMU/NMS system, which are related with inflammation or higher brain functions. We have established NMU/NMS double KO (dKO) mice and examined a series of behavior tests. It was confirmed of decreasing stereotypic behavior in open field test, and increasing context and cued freezing ratio in feared conditioned test in NMU/NMS dKO mice compared with wild type mice. On the other hand, we have investigated the functional relevance of the NMU system in NAFLD/NASH, obesity related inflammation disease, pathogenesis. For the first time, to our knowledge, we confirmed that NMU and NMU receptor 1 (NMUR1) production in liver tissue increased with the severity of NASH, and that activation of the NMU system exacerbated NAFLD/NASH pathogenesis.

研究分野：内分泌学

キーワード：神経ペプチド 神経内分泌 新規生理機能

1. 研究開始当初の背景

ニューロメジンU(NMU)は1985年に南野直人ら(現国立循環器病研究センター研究所)により同定された生理活性ペプチドであり、2000年に申請者らのグループをはじめ世界の数カ国の研究グループにより2種類のニューロメジンU受容体(NMUR1、NMUR2)が同定されたのを機に生理機能の解析が進み、現在に至っている(BBRC2000,276:435)。申請者らのグループによるNMU欠損マウスの解析により、NMUが摂食・エネルギー代謝や自律神経系の調節、睡眠・覚醒などのサーカディアンリズムの調節や炎症反応の制御等に関与することが明らかとなった(Nat.Med2007,13:1234, J Exp Med 2005, 202:217, Nat.Med 2004,10:1067, BBRC 2004,323:615, BBRC 2004,318:156, BBRC 2001,289:225, BBRC 2000,277:191)。さらに2005年、NMU受容体の新たな内因性リガンドであるニューロメジンS(NMS)が申請者らのグループの森健二(現国立循環器病研究センター研究所)により同定され、その生理機能としてサーカディアンリズムに関与している事が報告され(EMBO J. 2005, 24:325)、現在も新たな生理機能の解析が進められている。このような背景のもと、申請者らはNMU/NMS 両遺伝子欠損マウス(NMU/NMS double KO)を樹立し、予備実験をおこなったところ、NMUシステムが中枢における炎症病態モデルや脳内高次機能に関与することが示唆された。本研究ではNMU/NMS double KOマウスを用いた予備実験にて見出したNMU/NMS システムの新たな生理機能に焦点をあて、その機能の解明をおこなうとともにその機能が関与するヒト病態での分子メカニズムを追究する。

2. 研究の目的

本研究ではNMU、NMS システムの生理機能解析に関し、特に「中枢性炎症」ならびに「脳内高次機能」に重点を置き、独自に樹立したNMU/NMS double KOマウスを用いて解析を

おこなう。得られた知見から、新たな生理機能に関与する分子メカニズムを明らかにし、関連する病態におけるNMUシステムの意義について検討する。

3. 研究の方法

本研究では申請者らが新たに作出したNMU/NMS double KOマウスを用いた解析によりNMU/NMS システムの新たな生理機能を解明する。申請者らの行なった予備実験の結果から、「中枢性炎症モデルにおけるNMU/NMS システムの意義」ならびに「NMU/NMS システムの脳高次機能・脳内報酬系への関与」に焦点をあてて、申請者が従来行なってきた遺伝子改変マウスモデルでのloss of functionにおける機能解析とマウスへの脳室内投与によるgain of functionの側面からの機能解析による両面からのアプローチにより新規生理機能を追究した。

①中枢性炎症モデルにおけるNMU/NMSシステムの意義

申請者らの予備実験の結果ではNMU/NMS double KOマウスにおいてEAE 脳炎の病態の増悪が認められた。まず、この表現型をもとに、EAE 脳炎誘導後7日目(発症初期)、14日目(急性期)、21日目(発症後期:慢性期)における脊髄局所ならびに関連する免疫組織(2次リンパ組織である脾臓ならびにNMS mRNA 発現が認められる胸腺組織)でのサイトカインレベルを定量PCR やELISAにて確認し、さらにFlow Cytometry (FACS)を用いて各免疫細胞における割合の変化、細胞数の増減等を解析した。

EAEの病態の進行具合に関してはClinical scoreのみならず脊髄の免疫組織学的変化の解析もおこなった。同時に野生型マウスを用いたEAEモデルに関して、脊髄やEAEの発症や病態の進展に関連する免疫組織におけるNMU/NMSの発現部位ならびにNMUR1、NMUR2受容体の発現部位をin situ

hybridization や免疫組織学的手法を用いて解析した。さらにEAE誘導時の各組織におけるNMU/NMS 発現ならびにNMUR1、NMUR2 発現動態の解析を試みた。

②NMU/NMS システムの脳高次機能・脳内報酬系への関与

すでに樹立しているNMU/NMS double KO マウスを用いて、それぞれの遺伝子単独欠損マウスでは明確にはならなかった脳内高次機能・脳内報酬系とNMU/NMSシステムの関与を検討した。まずはNMU/NMS double KO マウスとコントロールマウスにおける体重ならびに病的反射の有無などを検討した。一方、脳内高次機能や報酬系に関しては、評価系として汎用されている①Y字型迷路試験、②ロータロッド試験、③オープンフィールドテスト、④受動回避試験、⑤放射状迷路試験、⑥Morris水迷路試験、⑦elevated plus maze テスト、⑧ソーシャルインターアクションテスト、⑨明暗室テスト⑩コカインを用いた嗜好テスト(CPPtest)などを用いて不安様行動や鬱傾向、社会的行動の解析ならびに記憶・学習や報酬系に関与する一連の行動実験を行なった。

さらに、一連の行動解析にて差異をみとめた行動におけるNMU/NMS double KO マウスならびにコントロールマウスでの神経の活性化部位をc-fos蛋白を指標とした免疫染色法にて同定し、c-fos 陽性神経細胞部位を中心に脳内ニューロトランスマッター等の解析をおこなった。具体的には①脳内モノアミン(カテコールアミン系ならびにセロトニン系、アセチルコリン系)、②脳内アミノ酸(興奮性グルタミン酸系、抑制系GABA系)の動態の解析を脳の標的部位のpunch out サンプルからの抽出液を用いたGC-MS/MS測定系を用いて、脳内NMU/NMSシステムがどのような神経伝達経路を介して、標的となる行動を制御しているかを検討した。

4. 研究成果

①中枢性炎症モデルにおけるNMU/NMSシステムの意義

NMU/NMS double KO マウスにおいては予備実験にて、EAE誘導時の脊髄炎の増悪が認められていた。申請者の異動によるマウス飼育施設環境の変化や予期せぬ飼育施設における感染などによりEAEモデル実験に使用するNMU/NMS double KO マウスの作出に時間を要した。現在、予備実験の表現型の検証を進めている。

②NMU/NMS システムの脳高次機能・脳内報酬系への関与

NMU/NMS double KO マウスでは神経学的異常や反射異常は認めず、コントロールマウスと比較して明らかな体重の増加が認められた(11週齢雄における両者の体重の平均値はコントロールマウス:28.08 ± 0.31g、NMU/NMS double KO マウス29.91 ± 0.32gであり、 $p < 0.005$ と有意であった)。一連の行動解析の結果に関しては、Open Field testにおいて、総移動距離ならびに常同行動に関しては有意にNMU/NMS double KO マウス群にて低下していることが明らかとなった。また、恐怖条件付け試験においては文脈記憶(Context)ならびにCue(音刺激に対する条件付け)の強さも増していることが判明した。

その他の一連の行動解析に関しては、明暗箱選択テストならびにElevated Plus mazeに関しては、NMU/NMS double KO マウス群にて総移動距離が有意に低下し、Social Interaction testでは、トータルコンタクト時間に関しては、NMU/NMS double KO マウス群ではコントロールマウス群に比べて有意に増加していたが、コンタクト回数などに関しては両群間で有意差は認めなかった。Hot Plate test、ロータロッド試験、Pre-pulse Inhibition test、Y字型迷路試験、強制水泳試験、尾懸垂試験では両群間で有意な差は見

られなかった。

一連の行動解析の結果より、NMU/NMS システムが「不安・ストレス反応」に関与していることが明らかとなったため、NMU/NMS double KO マウスへの慢性拘束ストレス負荷時の脳内神経伝達物質動態を解析を検討しているが、現時点ではサンプル調整条件の最適化を行っている。

以上、NMU/NMS システムが「不安・ストレス反応」に関与していることが明らかとなり、現在、さらなる詳細な分子メカニズムを解析中である。

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 3 件)

① Teranishi H, Hayashi M, Higa R, Mori K, Miyazawa T, Hino J, Amano Y, Tozawa R, Ida T, Hanada T, Miyazato M, Hanada R, Kangawa K, Nakao K. Role of neuromedin U in accelerating of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Peptides* 99: 134-141, 2018. (査読有)

② Higa R, Hanada T, Teranishi H, Miki D, Seo K, Hada K, Shiraiishi H, Mimata H, Hanada R, Kangawa K, Murai T, Nakao K. CD105 maintains the thermogenic program of beige adipocytes by regulating Smad2 signalling. *Mol Cell Endocrinol* : 2018, in press. (査読有)

③ 花田俊勝, 比嘉涼子, 花田礼子: 褐色脂肪研究の今. *肥満研究*. 23:137. 2017 (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

① 花田礼子: 第95回日本生理学会大会・教育講演(平成30年3月29日):高松

② 花田礼子: 第60回日本甲状腺学会学術集会・基礎甲状腺学セミナー(平成29年10月6日):大分(招待講演)

③ 花田礼子: 第22回アディポサイエンス・シンポジウム(平成29年8月19日):大阪(招待講演)

④ 寺西仁志, 花田礼子 et al.: 第90回日本内分泌学会学術総会(平成29年4月21日):京都

⑤ 寺西仁志, 林 将文, 花田礼子 et al.: 第94回日本生理学会大会(平成29年3月28日):浜松

⑥ 花田礼子: 第17回 Clinical Science Club, (平成28年2月17日):東京(招待講演)

⑦ 花田礼子: 第2回腎と生活習慣病先端医学セミナー, (平成28年2月12日):熊本(招待講演)

⑧ 谷口香織, 寺西仁志, 花田礼子 et al.: 第88回日本内分泌学会学術総会(平成27年4月23日):東京

[図書] (計 1 件)

① 花田礼子 :chapter 1 「その他の臓器における RANKL の役割」:『ファーマナビゲーター抗 RANKL 抗体編』松本俊夫編集 メディカルレビュー社 435: (90-96). 2016. (分担執筆)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等;

<http://www.med.oita-u.ac.jp/seiril/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花田 礼子 (HANADA Reiko)

大分大学・医学部・神経生理学講座・教授

研究者番号: 00343707

(2) 研究分担者; なし

(3) 連携研究者; なし

(4) 研究協力者; なし