

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09439

研究課題名(和文) 新規グラニン由来ペプチドNERP-4の摂食エネルギー・糖代謝機能の検討

研究課題名(英文) Identification of biological functions of granin-derived peptide NERP-4 on energy balance and glucose metabolism

研究代表者

山口 秀樹 (YAMAGUCHI, HIDEKI)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10305097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規グラニン由来ペプチドNERP-4は膵ラ氏島に局在し、インスリンと同じ分泌顆粒内に存在した。MIN6細胞へのNERP-4添加で、細胞内Ca濃度が上昇した。NERP-4は高グルコース条件下で、単離膵ラ氏島からのインスリン分泌を用量依存性に促進した。ラット腹腔内へのNERP-4投与でグルコース誘発性インスリン分泌を促進した。NERP-4はグルコース応答性インスリン分泌反応を促進する新たな生理活性ペプチドである。

研究成果の概要(英文)：Neuroendocrine Regulatory Peptide-4 (NERP-4) was co-expressed with insulin in the pancreatic cells of human, mice and rat. Ca²⁺ imaging analyses showed that NERP-4 accelerated intracellular Ca²⁺ influx in MIN6 cells. NERP-4 potentiated glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) from isolated mouse islets. Peripheral administration of NERP-4 increased plasma insulin level under glucose load in rats. NERP-4 is a novel regulator of GSIS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生理活性ペプチド 糖尿病 インスリン 膵 細胞

1. 研究開始当初の背景

新規生理活性ペプチドの同定は、未知な生体の情報伝達・制御機構の発見に繋がり、発症原因に即した治療法や診断法の開発、新たな調節機構に基づく生体内物質を活用した創薬へと展開できる。このような基盤に立ち、細胞間情報伝達・制御に機能するペプチド研究を実施し、生体内ペプチドの情報調節機構に基づく有効な診断・治療法を開発することで、医療へ貢献するためペプチド研究を推進している。

国立循環器病研究センターの佐々木、南野らは、培養細胞の分泌刺激後培養液を用いた網羅的ペプチドミクス解析法にて、夾雑物の多い従来のプロテオーム解析では発見できなかった新規生理活性ペプチドを、ゲノム側とペプチド側の両方面からの情報を駆使して多数同定することに成功した。本法をヒト甲状腺様癌培養細胞株に適用した結果、新規視床下部ペプチド NERP (NeuroEndocrine Regulatory Peptide, J Biol Chem, 2007)の同定に成功した¹⁾。

2. 研究の目的

本研究では、摂食・エネルギー代謝調節作用を有する新規生理活性ペプチド NERP-4 の機能解析を行い、肥満や糖尿病の新たな診断・治療法を目指したシーズ研究を実施する。

3. 研究の方法

(1) 動物

Wistar ラット (9 週齢, Charles River Laboratories)、C57BL/6J マウス (8~9 週齢, Charles River Laboratories, 滋賀)、*vgf* 遺伝子欠損マウス (9 週齢, Dr. Stephen R. J. Salton, Mount Sinai School of Medicine, NY より分与)を、室温・湿度を一定に保った 12 時間明暗サイクルの部屋に個別のケージにて自由摂餌・自由摂水で飼育した。動物実験に関しては学内倫理委員会の承認を得て、当研究施設での動物実験指針に従い動物愛護の精神に基づいて行った。

(2) 免疫染色

免疫染色は既報 (J Biol Chem 282: 26354-26360, 2007) に従って行った。DAB (3,3'-diaminobenzidine) 染色は、マウス (C57BL6/J and *vgf* knockout mice) 膵組織を摘出し、4% paraformaldehyde で 24 時間、4°C で固定し、30% sucrose で包埋した。クライオスタットで 7 μm スライス厚の切片を作製した。1% 正常ヤギ血清でブロッキングした後に抗 NERP-4 抗体 (最終希釈濃度 1:100) にて 24 時間、4°C で反応させた。ABC Kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) を用いて発色させ、Nikon A1Si microscope (Nikon, 東京) で検鏡・観察した。

二重免疫染色では、guinea-pig anti-insulin antiserum (DAKO, Carpinteria, CA) を用いて 24 時間、4°C で反応させ、PBS で洗

浄後に抗 NERP-4 抗体にて 24 時間、4°C で反応させた。Alexa Fluor™ 568 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) で発色させ、OLYMPUS AX-7 fluorescence microscope (Olympus, 東京) で検鏡・観察した免疫電顕用に、10 週齢の Wistar 系雄ラットを colchicine (200 μg) 脳室内投与 2 日後、0.1% glutaraldehyde を含む 4% PFA で灌流固定し免疫染色用に脳を摘出した。免疫染色および免疫電顕は、既報の方法に従って行った^{2), 3), 4)}。

(3) *in vitro* 実験

collagenase digestion method で単離した膵ラ氏島を、PP チューブ 1 本あたり 10 個、実体顕微鏡下でピックアップした。37°C、95% air/5% CO₂ atmosphere の条件下で 24 時間培養した。低グルコース溶液 (単離膵ラ氏島では 2.8 mM)、高グルコース溶液 (単離膵ラ氏島では 16.7 mM) にラット NERP-4 (10⁻¹⁰ M, Peptide Institute, 大阪)、ヒト GLP-1 (10⁻⁸ M, S Bio Co., Menlo Park, CA) を添加し、培養液中に分泌されたインスリンを Mouse Insulin EIA Kit (Morinaga Institute of Biological Science, Inc., 横浜) にて測定した。実験終了後に Protein Assay Kit I (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて、各 well または PP チューブ内のタンパク量を測定した。Silencer® Select Pre-designed siRNA, s117809 (ThermoFisher, Carlsbad, CA) により、マウス *vgf* siRNA を設計し、ViaFect (Promega, Madison, WI) キットを用いて MIN6 細胞に導入した。

(4) *in vivo* 実験

9 週齢の Wistar 系雄ラットを 18 時間絶食後、ペントバルビタール (250 mg/kg 体重、Dainippon Sumitomo Pharma, 大阪) で麻酔し、右大腿静脈内にカテーテルを挿入・留置した。ラット静脈内にラット NERP-4 (30 nmol/kg 体重) またはヒト GLP-1 (10 pmol/kg 体重) を投与し、30 分後にブドウ糖 (0.5 g/kg 体重) 投与し、90 分まで経時的に採血した。血中インスリン濃度を Rat Insulin EIA Kit (Morinaga Institute of Biological Science, Inc.) を用いて測定した。

(5) 細胞内 Ca 濃度測定

MIN6 細胞培養株を HKRB バッファーで灌流し、灌流液を低グルコース溶液 (2.8 mM)、高グルコース溶液 (22 mM) に置換し、ラット NERP-4 (1 μM, Peptide Institute)、ヒト GLP-1 (10 nM) を添加後の細胞内 Ca 濃度の変化を Functional Imaging Cell-Sorting System (IMACS, Hamamatsu Photonics, 浜松) を用いて測定した。実験終了前に、陽性コントロールとしてトルブタミド (100 nM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用いた。

(6) 統計解析

得られた結果は means ± SEM で表記した。統計解析は ANOVA、Fisher's LSD test、unpaired t-test、Bonferroni's post-test for multiple comparisons を用い、危険率

0.05 以下を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) NERP-4 は膵ラ氏島に局在し膵細胞の分泌顆粒内でインスリンと共存した

マウス膵ラ氏島に NERP-4 (Fig. 1a)陽性細胞を認めた。膵ラ氏島に存在するインスリン (Fig. 1b)と NERP-4 の二重免疫染色で、NERP-4 はインスリンと共存した (Fig. 1c, merge 像, scale bars, 50 μ m)。MIN6 細胞株の免疫染色では、NERP-4 (Fig. 1d)とインスリン (Fig. 1e)は共存していた (Fig. 1f, merge 像, scale bars, 5 μ m)。*vgf* 遺伝子欠損マウスの膵ラ氏島では、NERP-4 陽性細胞を認めなかったが (Fig. 1g)、インスリンは染色された (Fig. 1h, scale bars, 50 μ m)。マウス膵を用いた免疫電顕では、NERP-4 (Fig. 1i, 黒矢頭, 5 nm 顆粒)とインスリン (Fig. 1i, 白矢頭, 10 nm 顆粒)は同一顆粒内に存在していた (scale bars, 50 nm)。NERP-4 は、グルカゴンとは一部共存するも、ソマトスタチンとの共存は認めなかった (data not shown)。

(2) NERP-4 は *in vitro* において高グルコース条件下でのインスリン分泌を促進した

マウス単離膵ラ氏島を用いた *in vitro* のインスリン分泌実験で、2.8 mM の低グルコース培養液中で、NERP-4 インスリン分泌を促進しなかったが、高グルコース (16.7 mM glucose) 存在下でインスリン分泌を促進した (Fig. 2, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。NERP-4 によるインスリン分泌反応は用量依存的で、 10^{-10} M で最大の効果を示した (data not shown)。高グルコース培養液中への NERP-4 の添加は有意に細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させたが、低グルコース条件下では MIN6 細胞内の Ca^{2+} 濃度に変化なかった (data not shown)。*Vgf* siRNA を導入した MIN6 細胞では、NERP-4 による GSIS が 63%まで低下した (data not shown)。

(3) NERP-4 は *in vivo* においてグルコース応答性インスリン分泌反応 (GSIS) を促進した

ラット腹腔内への NERP-4 先行投与後のブドウ糖負荷で、グルコース単独投与群に比べて血中インスリン濃度を有意に増加させた (Fig. 3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。NERP-4 投与後のインスリン AUC (血中インスリン濃度 - 時間曲線下面積、45 分間) は、GLP-1 投与群と同様にグルコース単独投与群よりも有意に増加した。ラット腹腔内へのグルコースと NERP-4 の同時投与では、血糖 (AUC、90 分間) に有意な変化を認めなかった (Fig. 3, ns, not significant)。

(4) 新規グラニン蛋白由来ペプチド NERP-4 の今後の展開

NERP-4 が膵ラ氏島のインスリン分泌顆粒に局在し、ブドウ糖応答性のインスリン分泌を促進する生理作用を有することを本研究で明らかにした。現在、ミトコンドリア機能の改善や膵細胞の生存に NERP-4 が機能する知見を得ており、機能解析を進めている

(論文投稿中) NERP-2 など VGF 蛋白由来の生理活性ペプチドの受容体は未だ同定されていない。NERP-4 受容体の同定は、インスリン分泌促進作用を有する NERP-4 や NERP ファミリーペプチドの膵細胞での情報伝達機構の解明に重要である。今後、インスリン分泌促進作用を有する NERP-4 を初めとする NERP ファミリーと現在糖尿病治療薬として上市されている GLP-1 アナログ製剤との併用療法を目指した臨床応用に向けたさらなる基盤研究を行う。グラニン由来ペプチドの網羅的機能解析で、インスリン分泌機構におけるグラニン蛋白の機能を解明したい。

Fig.1

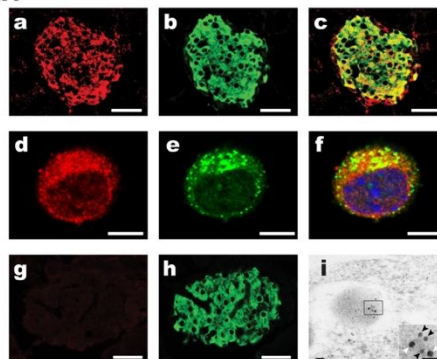


Fig.2

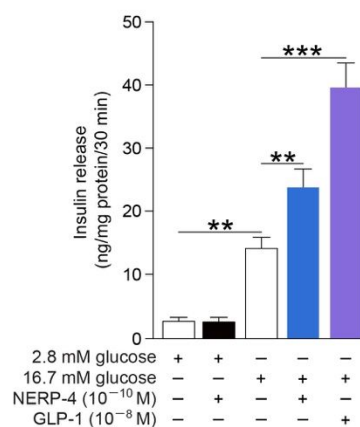
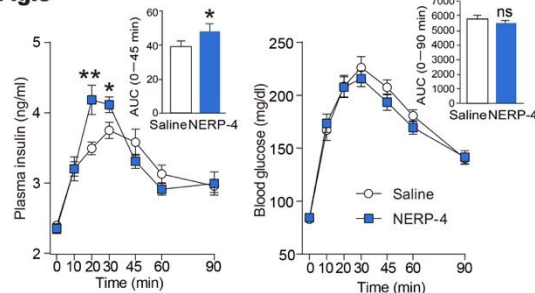


Fig.3



参考文献

- 1) Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, González LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N. (2007) J. Biol Chem, 282, 26354-26360
- 2) Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S,

Matsukura S, Kangawa, K, and Nakazato M.: (2003) Endocrinology, 144, 1506-1512
3) Gies U, and Theodosios DT.: (1994) J Neurosci, 14, 2861-2869
4) Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M.: (1999) Proc Natl Acad Sci USA, 96, 748-753

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1件)

1) Shimizu K, Yonekawa T, Yoshida M, Miyazato M, Miura A, Sakoda H, Yamaguchi H, Nakazato M.: Conformational Change in the Ligand-Binding Pocket via a KISS1R Mutation (P147L) Leads to Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency. J Endocr Soc. 1(10):1259-1271 (2017). 査読あり

[学会発表](計12件)

1) 串間千奈見, 山口秀樹, 長嶺和弘, 清水浩一郎, 米川忠人, 中里雅光: 高Ca血症の病因に難渋しているパセドウ病合併乳癌術後の1例, 第27回日本臨床内分泌代謝Update, 2017年11月24日・25日, 神戸

2) 米川忠人, 山口秀樹, 清水浩一郎, 中里雅光: 下垂体への転移性甲状腺濾胞癌により視野障害と下垂体機能低下症を呈しレンバチニブ投与により腫瘍縮小した一例, 第45回神経内分泌学会, 2017年10月23日, 東京

3) 中島知太郎, 山口秀樹, 長嶺和弘, 清水浩一郎, 米川忠人, 中里雅光: ¹¹¹In-ペンテトレオチドによる腫瘍シンチで異常集積を認めた異所性ACTH症候群の一例, 第17回日本内分泌学会九州支部学術集会, 2017年9月2日, 福岡

4) 米川忠人, 山口秀樹, 柴田伸弘, 清水浩一郎, 中里雅光: レンバチニブ投与の開始と中断により下垂体腫瘍が縮小と増大を呈したため転移性甲状腺濾胞癌と推定された一例, 第17回日本内分泌学会九州支部学術集会, 2017年9月2日, 福岡

5) 清水浩一郎, 米川忠人, 長嶺和弘, 山口秀樹, 梅北佳子, 中里雅光, 肺癌の甲状腺転移に甲状腺中毒症を併発した2例の検討, 第90回日本内分泌学会学術総会, 2017年4月20日~22日, 京都

6) 米川忠人, 山口秀樹, 田中弘之, 長嶺和弘, 佐藤勇一郎, 中里雅光: 多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1)に合併した胸腺腫と胸腺カルチノイドの2例, 第90回日本内分泌学会学術総会, 2017年4月20日~22日, 京都

7) 長嶺和弘, 山口秀樹, 清水浩一郎, 米川忠人, 中里雅光: hungry bone 症候群を来した家族性副甲状腺機能亢進症術後の一例, 第90回日本内分泌学会学術総会, 2017年4月20日~22日, 京都

8) 山口秀樹, 米川忠人, 長嶺和弘, 中里浩子, 海老原枝美, 清水浩一郎, 中里雅光: 先端巨大症に対するランレオチドの治療成績, 第90回日本内分泌学会学術総会, 2017年4月20日~22日, 京都

9) 米川忠人, 山口秀樹, 清水浩一郎, 長嶺和弘, 中里雅光: 口渇感の乏しい中枢性尿崩症を呈する頭蓋咽頭腫術後患者に対してDDAVP皮下注射から口腔内崩壊錠へ切り替えた3症例, 第27回日本間脳下垂体腫瘍学会, 2017年2月24日~25日, 東京

10) 山口秀樹, 米川忠人, 清水浩一郎, 迫田秀之, 吉田守克, 宮里幹也, 中里雅光: 新規キスペプチン受容体変異(Pro147Leu)による思春期欠損症の機能解析, 第89回日本内分泌学会学術集会, 2016年4月21日~23日, 京都

11) 長嶺和弘, 山口秀樹, 野田智穂, 清水浩一郎, 迫田秀之, 上野浩晶, 米川忠人, 中里雅光: 家族性大腸腺腫症家系に副甲状腺機能亢進症を合併した甲状腺乳頭癌の一例, 第89回日本内分泌学会学術集会, 2016年4月21日~23日, 京都

12) 米川忠人, 山口秀樹, 清水浩一郎, 中里雅光: 女性高プロラクチン血症患者の臨床転帰, 第89回日本内分泌学会学術集会, 2016年4月21日~23日, 京都

[図書](計4件)

1) 山口秀樹, 『内分泌代謝科専門医研修ガイドブック』第6章 82番 下垂体前葉ホルモン, 診断と治療社(2018) P761

2) 山口秀樹, 米川忠人, 清水浩一郎, 中里雅光: キスペプチン受容体変異と思春期遅発症, 内分泌・糖尿病・代謝内科 第44巻, 第1号, 50-56 科学評論社(2017) P88

3) 山口秀樹, 『第111回医師国家試験問題解説』QUESTION BANK 2018, D-125 メディックメディア(2017) P383

4) 山口秀樹, 中里雅光: 低ナトリウム血症性脳症, 日本内科学会雑誌, 105巻, 4号, 667-675, (2016) P247

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 秀樹(宮崎大学・医学部・講師)

研究者番号: 10305097

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

三浦 綾子(宮崎大学・医学部・研究員)

研究者番号: 70710903