

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18863

研究課題名(和文) 抗肥満薬開発を念頭においた分泌性因子neudesinの解析

研究課題名(英文) The analysis of neudesin, a secretory molecule, for developing an anti-obesity drug

研究代表者

太田 紘也(Ohta, Hiroya)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：40638988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は分泌性因子neudesinのエネルギー代謝における役割の解明に取り組んでいる。neudesin KOマウスではエネルギー消費の亢進が認められ、肥満しにくいことが分かっていた。研究代表者は本研究期間内にエネルギー消費の亢進が交感神経系の活性化に起因すること、さらにneudesinが交感神経に作用して、交感神経の働きに必須であるノルアドレナリンの産生を抑えることを見出した。またneudesinは神経だけでなく脂肪細胞に作用して、脂肪細胞に対する交感神経の刺激を抑制する働きを担うことも明らかにした。今後の研究の発展がneudesinを標的とした抗肥満薬創出に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the neudesin KO mice were resistant to diet-induced obesity. neudesin KO mice showed increased energy expenditure due to increased sympathetic nervous activity. We newly found that recombinant neudesin protein acted on differentiated PC12 cells to suppress tyrosine hydroxylase (Th), which is a rate-limiting enzyme of noradrenaline synthesis. We also found that neudesin directly acted on white adipocytes to suppress adrenergic stimuli on adipocytes.

研究分野：分子生物学

キーワード：neudesin ノルアドレナリン 交感神経系 脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

肥満は糖尿病を始めとする様々な疾患の基盤となる病態であり、その全世界的な増加が問題になっている。一方で薬物による肥満治療が十分な成果を収めているとは言えない状況なので、新規抗肥満薬の創出は重要な課題になっている。その際に肥満の発症に関わる因子を発見して、その作用機序を探ることで、抗肥満薬創出の可能性を拓げることが期待される。

研究代表者は所属するグループで発見した分泌性因子 neudesin の解析、特に neudesin KO マウス(以下 KO マウス)を用いて生理的意義の解明に取り組んできた。特に KO マウスが高脂肪食により誘導される肥満に強い耐性を示したことから neudesin がエネルギー代謝制御に与える影響を明らかにして、肥満症の病態形成における neudesin の意義に明らかにすることを目指している。

2. 研究の目的

研究代表者は KO マウスの抗肥満がエネルギー消費亢進によってもたらされること、さらにエネルギー消費亢進の背景には交感神経系の活性化があることを既に見出した。

そこで本研究課題では最初に、neudesin KO マウスで交感神経系が活性化する機序の解明を目指した。特に neudesin がカンナビノイド経路を介してニューロンのノルアドレナリン産生に与える影響に着目した。

また交感神経破壊を破壊したマウスの解析を通して、KO マウスの抗肥満の表現型には一部交感神経に依存しない側面があることも見出した。そこで、neudesin が直接白色脂肪細胞に作用して、脂肪細胞のエネルギー消費に与える影響を検証して、neudesin による交感神経系に依存しないエネルギー消費制御機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

研究の方法に関しては重要な部分を中心に記載する。

neudesin による交感神経活性制御機構の解明

ラット副腎髄質由来の培養細胞株である PC12 を常法通り NGF を用いて分化させて交感神経節後ニューロンのモデルとして用いた。また組換え neudesin たんぱくに関しては既報に従って(J Neurosci Res. 79: 287-94 (2005))、昆虫細胞を用いた発現系を用いて獲得した。

neudesin による交感神経系非依存的なエネルギー代謝制御機構の検討

交感神経系破壊モデルマウスは既報に従って作製した(Can. J. Physiol. Pharmacol. 69: 1868- 1874 (1991))。具体的には生後 2 日齢のマウスに 6-ヒドロキシドパミン(6-OHDA)を 50mg/kg(体重)で生後 10 日齢に至るまで隔日で投与した。その後生後 12 週

齢まで飼育して各種解析に用いた。なお交感神経破壊の成否は血中ノルアドレナリン濃度の低下によって評価した。

また脂肪細胞の培養にあたっては 4 週齢雄性マウスの皮下白色脂肪組織を獲得してコラゲナーゼ法により成熟脂肪細胞と、間質血管細胞群(SVF)を獲得した。この SVF に含まれる前駆脂肪細胞を、常法通りインスリン、デキサメタゾン、IBMX のカクテルを用いて脂肪細胞への分化誘導をかけた。脂肪細胞分化は脂肪滴の蓄積および aP2 や Pparg などの脂肪細胞マーカーの発現亢進をもって評価した。

4. 研究成果

研究代表者は本件研究期間内に以下の知見を得た。

neudesin による交感神経活性制御機構の解明

我々の先行研究により neudesin はニューロンに作用することが明らかになっている。そこで研究代表者は neudesin による交感神経活性制御もニューロンへの作用を介するのではないかと考えた。そこで交感神経の節後ニューロンのモデルとなる PC12 細胞に組換え neudesin たんぱくを添加したところ、ノルアドレナリン産生の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(Th)の発現が低下することが明らかになった。従って neudesin による交感神経活性制御機構として、Th 発現の抑制を介したノルアドレナリン産生の低下が想定される。

研究代表者はさらに neudesin により駆動されるシグナル経路の解明に着手した。研究代表者は neudesin による細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)活性化が、1 型カンナビノイド受容体(CB1R)阻害剤の SR141716 によって抑制されることを見出した。従って neudesin の作用がカンナビノイド経路を介する可能性が浮上した。さらに neudesin によるカンナビノイド経路制御をより正確に評価するために、CRISPR/Cas9 システムを用いた CB1R KO 細胞株の樹立に着手した。

カンナビノイド経路はエネルギー代謝制御において重要な経路の一つであり、CB1R KO マウスは neudesin KO マウスと酷似した表現型を示す。従って neudesin とカンナビノイド経路の関連性を探ることで neudesin によるエネルギー代謝制御機構を解明する上で有益な知見が得られることが期待される。

neudesin による交感神経系非依存的なエネルギー代謝制御機構の検討

研究代表者は交感神経系の活性化が KO マウスの抗肥満の表現型に与える影響をより直接的に評価するために、6-OHDA 投与による交感神経破壊を施して、体重への影響を検証した。その結果、交感神経を破壊した場合 KO マウスの抗肥満の表現型が一部消失する

ことが明らかになった。従って KO マウスの抗肥満の表現型は一部が交感神経系に依存することが確認された一方で、交感神経非依存的な機序も存在することが判明した。研究代表者は続いて、交感神経系に依存しない neudesin によるエネルギー代謝制御機序の実体解明に着手した。

我々の先行研究により、neudesin はニューロンだけでなく白色脂肪細胞に作用する可能性があることも分かっていた。そこで研究代表者は neudesin が白色脂肪細胞に作用することでエネルギー消費を制御する可能性を検証した。研究代表者は皮下白色脂肪組織由来の SVF を分化させることで脂肪細胞を得て、組換え neudesin たんぱく添加を行った。その結果、脂肪細胞の neudesin を添加することで、脂肪細胞に対するアドレナリン受容体刺激の効果が減弱することが明らかになった。具体的にはアドレナリン受容体アゴニストの CL316243 による脂肪分解の亢進や、熱産生に必須の因子 Ucp1 の発現が、neudesin 添加によって抑制されることが判明した。

以上より、neudesin による交感神経系非依存的なエネルギー代謝制御機序として、neudesin が脂肪細胞に直接作用して交感神経刺激の入力を抑制する可能性が示唆された。

総括

最後に得られた知見を総括する。研究代表者は neudesin KO マウスがエネルギー消費亢進に伴う抗肥満の表現型を示し、さらにエネルギー消費亢進には交感神経系の活性化が関わることを既に明らかにしていた。研究代表者は本研究期間内に上記の成果をより発展させた。その結果、neudesin は交感神経の節後神経に作用してノルアドレナリン産生を抑制する可能性があること、また neudesin の具体的な作用機序としてカンナビノイド経路を介する可能性があることを見出した。さらに neudesin によるエネルギー代謝制御に関して、交感神経非依存的な側面もあることも明らかにした。その機序として、neudesin は白色脂肪細胞に作用して脂肪細胞へのアドレナリン受容体刺激を抑制する可能性が考えられる。

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6件)

1. Nakayama Y, Masuda Y, Ohta H, Tanaka T, Washida M, Nabeshima Y, Miyake A, Itoh N, Konishi M
Fgf21 regulates late stages of T-cell development in the neonatal and juvenile thymus
Scientific Reports (in press) (2017)

2. Itoh N, Ohta H, Nakayama Y, Konishi M
Roles of FGF signals in Heart Development, Health, and Disease
Frontiers in Cell and Developmental Biology
4, 110 (2016)

3. Ohta H

Role of the secretory protein neudesin in energy metabolism
J Phys Fitness Sports Med
5, 229-233 (2016)

4. Itoh N, Ohta H, Konishi M

Endocrine FGFs: Evolution, Physiology, Pathophysiology, and Pharmacotherapy.
Frontiers in Endocrinology 6, 154 (2015)

5. Ohta H, Kimura I, Konishi M, Itoh N

Neudesin as a unique secreted protein with multi-functional roles in neural functions, energy metabolism, and tumorigenesis
Frontiers in Molecular Biosciences
2, 24 (2015)

6. Ohta H, Konishi M, Kobayashi Y, Kashio

A, Mochiyama T, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, Nakao K, Kimura I, Itoh N
Deletion of the neurotrophic factor neudesin Prevents Diet-induced Obesity by Increased Sympathetic Activity
Scientific Reports 5, 10049 (2015)

[学会発表](計6件)

1. 太田 紘也、小西守周、中尾一和 他、
新規分泌性因子 neudesin による
エネルギー代謝調節機構の解明
第 37 回日本肥満学会 (2016 年 10 月)
ポスター発表
2. 太田 紘也、小西守周、木村郁夫 他、
液性因子 neudesin によるエネルギー代謝
調節機構の解明
第 6 回 生理学研究所・名古屋大学医学系
研究科 合同シンポジウム (2016 年 9 月)
ポスター発表
3. 太田 紘也、齋藤優太、中山喜明 他、
分泌性因子 neudesin の遺伝子欠損マウス
では白色脂肪の褐色化が亢進した
第 63 回 日本生化学会 近畿支部例会
(2016 年 5 月) 口頭発表
4. 太田 紘也、小西守周、橋本大嗣 他、
分泌性因子 neudesin の遺伝子欠損マウス
は交感神経活性の亢進により食餌誘導性
肥満に耐性を示す

第 38 回日本分子生物学会(2015 年 12 月)
ポスター発表

研究者番号：

5. **太田 紘也**

シンポジウム 19「マイオカイン・アディポ
カイン-非免疫臓器が分泌するサイトカイン
の体力科学的意義」

「肥満に関わる分泌性因子 neudesin の同
定と解析」

第 70 回日本体力医学会大会 (2015 年)

口頭発表 (招待口演)

(4) 研究協力者

()

6. **太田 紘也**、小西守周、松村成暢 他、
神経栄養因子 neudesin の遺伝子欠損マウ
スは高脂肪食誘導性肥満に耐性を示した
第 20 回アディポサイエンス・シンポジウム
(2015 年 8 月) ポスター発表

〔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：
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

太田 紘也 (OHTA HIROYA)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：40638998

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()