

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05333

研究課題名(和文)新規生理活性ペプチドの同定と摂食調節機序の解明

研究課題名(英文)Identify the novel bioactive peptides and their role in feeding regulation

研究代表者

中里 雅光(Nakazato, Masamitsu)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10180267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：後脳と自律神経だけでGHSRを発現するPhox2B-GHSRマウスでは、迷走神経節におけるGHSRとグレリンの結合が約60%に減少し、グレリン刺激による摂食量亢進や成長ホルモン分泌を抑制した。迷走神経節で十分量のGHSR発現が、グレリン作用に重要であると考えられた。ニューロメジンUはオートクライン・パラクライン作用で、膵細胞からのブドウ糖によるインスリン分泌作用を抑制するとともに、ミトコンドリア機能障害から細胞機能を低下した。4週間以上の高脂肪食を摂取したマウスは、迷走神経節と視床下部のグレリン受容体発現が低下して、グレリンによる摂食亢進作用が消失したが、カロリー制限による減量で回復した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドによる生体制御と病態との関連解析、そして治療応用に至る一貫した成果に基づく申請である。末梢からのペプチド情報が経神経性に脳内の特定の部位に伝達され、自律神経を介して免疫系を調節している。過栄養や糖代謝異常による慢性炎症が、迷走神経節や視床下部にも及び、ペプチド受容体の発現低下から摂食行動の異常に至る分子機序を明らかにした。膵細胞にオートクリン、パラクリンとして作用してインスリン分泌を調節し、膵細胞の維持や機能に重要な役割を果たすペプチドの解析は、糖尿病の病態理解と新規の治療法開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：GHSR is selectively expressed in the hindbrain and vagus nerve of Phox2B-GHSR mice. GHSR-expressing neurons in the nodose ganglion are less abundant in the mice than in wild-type mice. Intraperitoneal ghrelin administration did not induce food intake or growth hormone release, suggesting that the abundance of GHSR-expressing neurons is critical for peripheral ghrelin action.

NMU acts directly on cells through NMUR1 in an autocrine or paracrine fashion to suppress insulin secretion. NMU also induces mitochondrial dysfunction and ER stress, eventually leading to impaired cell functions.

Ghrelin's orexigenic activity was abolished after 2-4 weeks HFD-fed mice, consistent with the timing of accumulation and activation of macrophage/microglia in the nodose ganglion and hypothalamus. Calorie-restricted weight loss restored ghrelin responsiveness and alleviated the upregulation of macrophage/microglia activation markers and inflammatory cytokines in the nodose ganglion and hypothalamus.

研究分野：神経内分泌

キーワード：生理活性ペプチド 摂食中枢 肥満 糖脂質代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自律分散統合系として存在している生体を、調和しながら制御しているのは、内分泌、自律神経、免疫系である。臓器からの栄養素や物理・化学的情報は、副交感神経でもある迷走神経の求心路を介して延髄孤束核に運ばれ、視床下部に存在する摂食、運動、自律神経、睡眠・覚醒の中樞へと伝達される。申請者は、内分泌機能に作動しているペプチドの発見、生理作用、病態との関連および臨床応用について、多くの先駆的な業績を挙げてきた。グレリン、神経ペプチドW、神経ペプチドY、レプチン、オレキシン、NERP-1 とNERP-2など広汎な研究成果を報告している。

特に、ペプチドと自律神経との関連を主題とした研究から、消化管内分泌に由来する摂食とエネルギー代謝情報は、自律神経求心路により脳に運ばれ、自律神経遠心路を介して全身臓器や免疫系、血管、骨格筋を制御することを明確にした。また、高脂肪食による腸管上皮細胞での炎症情報が、自律神経求心路を介して延髄から視床下部へ伝播され、視床下部でアストロサイトとミクログリアを活性化し、摂食制御ニューロンに傷害を与えることも初めて示している。その結果、自律神経遠心路と免疫系が障害され、肥満の成因となる結論を得ている。

申請者は、脳をターゲットとした網羅的ペプチド解析法を開発し、室傍核と視索上核で産生され、バゾプレシン分泌を抑制する新たな2種類の神経内分泌機能を有するペプチドNeuroEndocrine Regulatory Peptides (NERP-1 とNERP-2)を発見した。パッチクランプとマイクロダイアリシスによる室傍核の神経伝達物質解析ならびに詳細なin vivo 研究から、NERP-1 はバゾプレシンニューロンのシナプス前の興奮性グルタミン酸ニューロンに直接作用して、一方NERP-2 は抑制性のGABA ニューロンを活性化することにより、いずれもバゾプレシンニューロンの活動電位を抑制して、バゾプレシン分泌を低下させることを明確に示した。NERP-2 は、齧歯類への中樞投与により視床下部外側野のオレキシン系を介して摂食を促進する。NERP-2 の単離臍島への投与は、BETA2/NeuroD やPdx-1 などの細胞の転写因子と、SUR1, Kir6.2, SCG2, SCG6 などのインスリン分泌関連蛋白を減少させ、NERP-2 は内因性のインスリン分泌制御因子と考えられた。

2. 研究の目的

in vivo でのペプチド活性探索ツールとして確立したエクオリン発光トランスジェニックマウスを駆使して、新規の生理活性ペプチドを探索することが目的である。

高脂肪食肥満モデル動物では、1) 迷走神経節と視床下部弓状核にIba1+, CD11b+, CD86+のマクrophage/ミクログリアによる炎症反応が起きる、2) 迷走神経と視床下部でのグレリン受容体発現が低下し、下流のMAPK-ERK系とAMPK系のシグナル伝達系が減弱する、3) グレリン投与による迷走神経の電気活動制御、摂食亢進と成長ホルモン分泌作用が消失する、ことを明らかにした(JOE 2015)。これらの成果を踏まえ、神経を介する摂食・エネルギー代謝情報のセンシング機構を細胞レベルで解明する、ことを第2の目的とする。肥満やいそいそにおけるペプチドの病態生理学的意義を解明する、ことを第3の目的とする。新規に同定したペプチドについて病態との関連を含め、臨床応用に向けたPOC研究を推進する。

上記の研究実績と方法論を基に、1) 新規の生理活性ペプチドの同定、2) 摂食・エネルギー代謝情報の神経を介するセンシング機構の分子論的解析、3) 延髄と視床下部における情報制御系の解析、4) エネルギー代謝調節に作動する新規のGPCR受容体の同定、5) ペプチドによる自律神経調節と肥満およびカヘキシアとの関連の解析、を研究する。

3. 研究の方法

1) 摂食・エネルギー代謝情報の神経を介するセンシング機構の分子論的解析

軸索を伸長させたマウスの培養迷走神経節ニューロンに消化管で産生されるペプチド、胆汁酸、モノアミン、アミノ酸、サイトカインなどを投与し、オールインワン蛍光顕微鏡を用いた細胞内カルシウムの濃度変化による電氣的興奮性の解析を行う。測定後、シングルセルPCRを行い、発現している受容体を確認する。

2) 消化管ペプチドの糖代謝における役割の解析

消化管ペプチドをラット・マウスに投与した時の、インスリン分泌・糖代謝を詳細に解析し、生理的意義を明らかにする。肥満と糖尿病病態モデル動物におけるペプチドとその受容体の発現量変化を解析して、病態生理学的意義を明らかにする。

3) 新規に同定したペプチドの機能解析

新規に同定したペプチドやその抗体をラット・マウスの脳室内および末梢に投与して、摂食、エネルギー消費、糖・脂質代謝、水・電解質代謝、下垂体や消化管、膵ホルモン分泌調節作用などを解析する。ペプチド投与後の他の内分泌因子の発現量の変動を解析し、作用機序を解明する。また関連疾患モデル動物におけるペプチドとmRNAを定量し、病態生理学的意義を提示する。

4) 高脂肪摂取による腸管での炎症が迷走神経求心路を介して、延髄、視床下部へと神経性に炎症を波及させる機序の解明

マウスに高脂肪食あるいはLPSを投与後、腸管、迷走神経、延髄、視床下部、脾臓、肝臓、脂肪組織で炎症関連マーカーの多重染色とmRNA定量を行う。高脂肪食は1日でも炎症をもたらすことから、経時的に組織別の炎症反応を検討する。

4. 研究成果

1) エネルギー代謝調節に作動する新規のGPCR受容体とペプチドの探索：高脂肪食性肥満や遺伝的肥満マウスの迷走神経節を採取して抽出したRNAを用いて、マイクロアレイ解析を行い、対照と比べ発現量が変動しているオーファン受容体を網羅的に検索した。その結果、2つの候補GPCRを特定した。同定したGPCRをCHO細胞やHEK293細胞に導入した発現系細胞を樹立した。ラット脳、胃、十二指腸、小腸をそれぞれ酢酸抽出後にゲルろ過HPLCにて分画した。この抽出物の分画で、候補GPCR発現細胞を刺激し、CellKeyとCypHerのアッセイ系を用いて、新規ペプチド探索を進めており、今後も研究を継続していく。

2) ペプチドの自律神経調節作用と病態との関連解析：loxP-stop KI GHSRマウスとPhox2B-Creマウスを交配して、後脳と自律神経だけでGHSRを発現するマウス(Phox2B-GHSRマウス)を作製した。Phox2B-GHSRマウスは、迷走神経節におけるGHSRとグレリンの結合が約60%に減少していた。体重や摂食量に差を認めなかったが、グレリン刺激による摂食亢進や成長ホルモン分泌は抑制した。これらの結果から、迷走神経節に十分量のGHSRが発現していることが、グレリン作用に重要であると考えられた。

3) 新規に同定したペプチドの機能解析：ニューロメジンUは交感神経活性化と摂食抑制効果を有する。ニューロメジンUとその受容体NMUR1が膵島に発現して、オートクライン・パラクライン作用で、膵細胞からのブドウ糖によるインスリン分泌作用を抑制した。ニューロメジンUは、ミトコンドリア機能障害から細胞機能を低下してインスリン分泌低下、糖尿病発症悪化の一因となる可能性を見出した。

4) 高脂肪摂取による腸管での炎症が迷走神経求心路を介して、延髄、視床下部へと神経性に炎症を波及させる機序の解明：高脂肪食を负荷したマウスを用いて、腸管と神経の炎症とグレリン作用を経時的に観察した。4週間以上の高脂肪食を摂取したマウスは、迷走神経節と視床下部のグレリン受容体発現が低下して、グレリンによる摂食亢進作用が消失した。12週間の高脂肪食负荷後にカロリー制限により減量したところ、グレリン受容体の発現量とグレリンによる摂食亢進作用はコントロールマウスと同等に回復した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計17件)

1. Okada T, Mita Y, Sakoda H, Nakazato M.: Impaired adaption of energy intake induces severe obesity in aged mice on a high-fat diet. *Physiol Rep*, 7: e13989. doi:10.14814/phy2.13989 (2019) **査読あり**
2. Ueno H, Nakazato H, Ebihara E, Noma K, Kawano T, Nagamine K, Sakoda H, Nakazato M.: Effects of ipragliflozin on postprandial glucose metabolism and gut peptides in type 2 diabetes: A pilot study. *Diabetes Ther*, 9: 403-11 (2018) doi: 10.1007/s13300-018-0366-8. **査読あり**
3. Yanagi S, Sato T, Kangawa K, Nakazato M.: The homeostatic force of ghrelin. *Cell Metab*, 27: 786-804 (2018) doi: 10.1016/j.cmet.2018.02.008 **査読あり**
4. Okamoto S, Sato T, Tateyama M, Kageyama H, Maejima Y, Nakata M, Hirako S, Matsuo T, Kyaw S, Shiuchi T, Toda C, Sedbazar U, Saito K, Asgar NF, Zhang B, Yokota S, Kobayashi K, Fougelle F, Ferre P, Nakazato M, Masuzaki H, Shioda S, Yada T, Kahm BB, Minokoshi Y.: Activation of AMPK-regulated CRH neurons in the PVH is sufficient and necessary to induce dietary preference for carbohydrate over fat. *Cell Rep*, 22: 706-721 (2018) doi:10.1016/j.celrep.2017.11.102. **査読あり**
5. Okada T, Waise TMZ, Toshinai K, Mita Y, Sakoda H, Nakazato M.: Analysis of peripheral ghrelin signaling via the vagus nerve in ghrelin receptor-restored GHSR-null mice. *Neurosci Lett*, 681: 50-55 (2018) doi: 10.1016/j.neulet.2018.05.035 **査読あり**
6. Namkoong C, Toshinai K, Waise TM, Sakoda H, Sasaki K, Ueta Y, Kim MS, Minamino N, Nakazato M.: NERP-2 regulates gastric acid secretion and gastric emptying via the orexin pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 485: 409-413 (2017) doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.

064 査読あり

7. Matsumoto N, Tsubouchi H, Imazu Y, Arimura Y, Yanagi S, Iiboshi H, Nakazato M.: Clinical application of ghrelin for chronic respiratory failure. *Endocrine J*, 64: S1-S3 (2017) doi: 10.1507/endocrj.64.S1. **査読あり**
8. Tsubouchi H, Onomura H, Saito Y, Yanagi S, Miura A, Matsuo A, Matsumoto N, Nakazato M.: Ghrelin does not influence cancer progression in a lung adenocarcinoma cell line. *Endocrine J*, 64: S41-S46 (2017) doi: 10.1507/endocrj.64.S41. **査読あり**
9. Ueno H, Shiiya T, Nagamine K, Tsuchimochi W, Sakoda H, Shiomi K, Kangawa K, Nakazato M.: Clinical application of ghrelin for diabetic peripheral neuropathy. *Endocrine J*, 64: S53-S57 (2017) doi:10.1507/endocrj.64.S53 **査読あり**
10. Zhang W, Sakoda H, Miura A, Shimizu K, Mori K, Miyazato M, Takayama K, Hayashi Y, Nakazato M.: Neuromedin U suppresses glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 493: 677-683 (2017) doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.132 **査読あり**
11. 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: 1259-1271 (2017) doi:10.1210/js.2017-00277 **査読あり**
12. Naznin F, Toshinai K, Waise TM, Okada T, Sakoda H, Nakazato M.: Restoration of metabolic inflammation-related ghrelin resistance by weight loss. *J Mol Endocrinol*, 60: 109-118 (2017) doi:10.1530/JME-17-0192 **査読あり**
13. Ishii N, Tsubouchi H, Miura A, Yanagi S, Ueno H, Shiomi K, Nakazato M.: Ghrelin alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathy by reducing oxidative stress and enhancing mitochondrial anti-oxidant functions in mice. *Eur J Pharmacol*, 819: 35-42 (2017) doi:10.1016/j.ejphar.2017.11.024 **査読あり**
14. Naznin F, Sakoda H, Okada T, Tsubouchi H, Waise TM, Arakawa K, Nakazato M.: Canagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, attenuates obesity-induced inflammation in the nodose ganglion, hypothalamus, and skeletal muscle of mice. *Eur J Pharmacol*, 794: 37-44 (2016) doi:10.1016/j.ejphar.2016.11.028. **査読あり**
15. Kimura K, Tanida M, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H.: Central insulin-action activates Kupffer cells by suppressing hepatic vagal activation through nicotinic $\alpha 7$ acetylcholine receptor. *Cell Rep*, 14: 2362-2374 (2016) doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.032 **査読あり**
16. Ueno H, Nakazato M.: Is ghrelin a glucagon-like peptide-1 secretagogue? *J Diabetes Investig*, 7: 466-467 (2016) doi:10.1111/jdi.12431 **査読あり**
17. Ueno H, Nakazato M.: Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. *J Diabetes Investig.*;7: 812-818 (2016) doi:10.1111/jdi.12492 **査読あり**

[学会発表](計 29 件)

1. Nakazato M.: Single cell analyses on vagal nodose ganglion neurons verify functional interaction of feeding-regulatory gut peptides. Cell Symposia 「Single Cells: Technology to Biology」 2019.02.24-26. シンガポール
2. 中里雅光: 中枢性糖代謝調節. 第 53 回糖尿病学の進歩 2019.3.1 青森
3. 中里雅光: 中枢神経を介する糖代謝 第 52 回 糖尿病学の進歩 2018.3.3 福岡国際会議場
4. Nakazato M.: Discoveries of novel peptides involved in energy homeostasis. ICN 2018.07.16 トロント
5. 中里雅光: 自律神経・内分泌・免疫系によるエネルギー代謝の統括的制御. 第 71 回日本自律神経学会 教育講演 2018.10.26 埼玉
6. 中里雅光: 摂食とエネルギー代謝調節に作動するペプチドの研究. 第 39 回日本肥満学会 学会賞受賞講演. 2018.10.8 神戸

7. 中里雅光：ペプチドによるエネルギー代謝調節。
第 39 回日本肥満学会教育講演。 2018.10.8 神戸
8. 中里雅光：学会賞受賞講演
第 45 回日本神経内分泌学会学術集会 2018.10.27-28 東京
9. 中里雅光：糖尿病と内分泌疾患のかかわり糖尿病と間脳・下垂体疾患。
第 51 回 糖尿病学の進歩。 2017.2.17 京都。
10. 中里雅光：糖代謝のホメオスターシス臓器ネットワークから。
日本内分泌学会学術総会 2017.4.21 京都
11. 中里雅光：Improvements of energy metabolism by a SGLT2 inhibitor.
グレリン国際シンポジウム：2017.4.23
12. 中里雅光：グレリン研究アップデート。
第 90 回日本内分泌学会学術総会 2017.4.21 京都
13. 中里雅光：生理活性ペプチドの同定と機能解析、臨床応用に関する研究。
第 90 回日本内分泌学会 学会賞受賞講演：2017.4.22 京都
14. 中里雅光：Hypothalamic peptides in energy homeostasis.
2017 International Congress on Obesity and Metabolic Syndrome：September 1, 2017
15. 中里雅光：自律神経・内分泌・免疫系を介するエネルギー代謝調節。
第 27 回臨床内分泌代謝 Update 2017.11.24
16. 中里雅光：高脂肪食による摂食調節機構の破綻。
第 42 回日本比較内分泌学会シンポジウム 2017.11.19
17. 中里雅光：糖代謝のホメオスターシス臓器ネットワークから。
第 50 回 糖尿病学の進歩。 2016.2.20 東京。
18. 中里雅光：摂食とエネルギー代謝調節に作動するペプチド探索と機能解析に関する研究。
第 30 回日本糖尿病・肥満動物学会「米田賞」。 2016.3.11 大宮。
19. 中里雅光：Discovery of novel peptides involved in glucose homeostasis and energy balance. The 4th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism. 2016 4.30 ソウル。
20. 中里雅光：生活習慣病における食事と運動についての新たな理解。
第 113 回日本内科学会総会・講演会。 2016.4.17 東京。
21. 中里雅光：Moving from 'Diagnose and Treat' to 'Predict and Pre-empt'。
第 65 回宮崎大学イブニングセミナー 医療創生の円環シンポジウム。 2016.5.18 宮崎。
22. 中里雅光：生活習慣病における食事と運動についての新たな理解。第 24 回西日本肥満研究会 特別講演。 2016.7.24 長崎。
23. 中里雅光：糖代謝のホメオスターシス臓器ネットワークから。
第 34 回日本肥満症治療学会学術集会 ランチョンセミナー1。 2016.7.1 東京。
24. 中里雅光：今、内分泌学がオモシロイ。
第 16 回日本内分泌学会 四国支部学術集会。 2016.9.3 愛媛。
25. 中里雅光：今、内分泌学がオモシロイ。
第 16 回日本内分泌学会九州支部学術集会 教育講演。 2016.9.10 鹿児島。
26. 中里雅光：肥満症治療薬の未来。
第 37 回日本肥満学会。 2016.10.7 東京。
27. 中里雅光：Gut controls Brain。
第 69 回日本自律神経学会総会。 2016.11.10 熊本。
28. 中里雅光：エネルギー代謝調節中枢としての視床下部。
第 50 回日本小児内分泌学会学術集会(JSPE), 第 9 回アジア太平洋小児内分泌学会(APPES)。 2016.11.16 東京。
29. 中里雅光：Hypothalamic regulation of energy homeostasis。
KNSG 5th Annual Meeting with PEMA & INF。 2016.12.2 - 3 濟州。

〔図書〕(計 7 件)

1. 十枝内厚次、中里雅光：グレリン
栄養・運動で予防するサルコペニア診療ガイドライン 2017 版準拠。医歯薬出版(東京)
総 pp192 (2018) 172-177
2. 上野浩晶、中里雅光：グレリン

脳腸相関 各種メディエーター、腸内フローラから食品の機能生まで．医歯薬出版（東京）
pp178（2018）91-96

3. 上野浩晶、中里雅光：視床下部と摂食調節．
内科学書（2018）．中山書店（東京）印刷中
4. 上野浩晶、中里雅光：カンナビノイド系
内科学書（2018）．中山書店（東京）印刷中
5. 上野浩晶、中里雅光：末梢臓器と摂食調節
内科学書（2018）．中山書店（東京）印刷中
6. 上野浩晶、中里雅光：末梢と中枢をつなぐネットワーク
内科学書（2018）．中山書店（東京）印刷中
7. 石井信之、上野浩晶、中里雅光：摂食・エネルギー代謝における自律神経の関与
鈴木則宏、祖父江 元、荒木信夫、宇川義一、河原信隆 編
Annual Review 2016 神経．中外医学社（東京）総 pp276（2016）241-245

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上野 浩晶

ローマ字氏名：Hiroaki Ueno

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00381062

(2)研究分担者

研究分担者氏名：山口 秀樹

ローマ字氏名：Hideki Yamaguchi

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：10305097

(3)研究分担者

研究分担者氏名：迫田 秀之

ローマ字氏名：Hideyuki Sakoda

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：50376464

(4)研究分担者

研究分担者氏名：柳 重久

ローマ字氏名：Shigehisa Yanagi

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60404422

(5)研究分担者

研究分担者氏名：坪内 拓伸

ローマ字氏名：Hironobu Tsubouchi

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：60573988