

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：17601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K19553
研究課題名(和文)肥満減量手術モデルラットの消化管から分泌される機能性タンパク質の生理機能の解明
研究課題名(英文)Study on endocrinological mechanism underlying body weight loss and improvement of glucose metabolism after bariatric surgery model rat
研究代表者
丸山 圭介(MARUYAMA, KEISUKE)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：20612386
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肥満減量手術モデルラットを確立して、減量手術における体重減少、糖代謝改善に寄与する内分泌的メカニズムの解明を目的とした。そこで、Wistar系肥満ラットを用いて、減量手術を模したモデルラット(RYGBラット)を作製した。術後、グルコース負荷試験を実施したところ、RYGBモデルラットにおいてグルコース応答性インスリン分泌(GSIS)が著しく亢進していた。このGSISの亢進の“一部”にはGLP-1の関与が示唆された。そこで、本モデルラットのGSISの亢進に関与する生理活性ペプチドを、遺伝子の網羅的発現解析や、膵細胞株をアッセイ系に使用したペプチド精製により同定することを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満減量手術に関する基礎研究により、体重減少、糖代謝改善のメカニズムを解明していくことは、急速に普及している肥満外科治療の有効性、安全性を検証し、さらなる発展を目指すうえで、決して欠かしてはならないものである。また、肥満減量手術の体重減少、糖代謝改善効果に関連した内因性因子の探索は、創薬へと繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the endocrinological mechanism underlying body weight loss and improvement of glucose metabolism in the bariatric surgery model rat. We established the bariatric surgery model rat (RYGB rat) using Wistar fatty rat. Body weight of the RYGB group was reduced after surgery, and maintained approximately 90% of that of the Sham group. To evaluate the insulin secretory capacity in our RYGB model rats, we performed an oral glucose tolerance test (OGTT). Blood insulin level during the OGTT was markedly higher the RYGB group compared with Sham group. In addition, our examinations suggest that GLP-1 is partially involved in the enhancement of GSIS in RYGB rat. Therefore, we attempted to identify bioactive peptides involved in the enhancement of GSIS in this model rat using RNA-seq analysis and peptide purification with Ca²⁺ assay system.

研究分野：内分泌学

キーワード：肥満減量手術 肥満減量手術モデルラット インスリン分泌 膵細胞 ペプチドホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、肥満症が糖尿病や高血圧をはじめ様々な疾患の基盤となることが明らかにされているが、一方で肥満そのものに対する有効な治療薬はなく、生活習慣の指導が治療の中心となっている。しかしながら、BMI 値が 35 以上の重度の肥満に対しては、食事、運動療法といった内科的治療には限界があると考えられている。そこで、重度肥満に対して体重減少を目的とした肥満減量手術が開発され、海外において積極的に行われている。いくつかの術式があるが、主に胃容積を制限する方法と小腸をバイパスし、長さを短縮することで、吸収能を制限する方法に分けられる。この減量手術の治療効果は著しく、約 20~40%の体重減少をもたらし、長期に渡ってその効果が維持されることがわかっている。

様々な知見が蓄積していく中で、Pories WJ らは減量手術により得られる体重減少効果よりも早く、血糖値と血中インスリン値の改善が認められることを報告した(Pories WJ et al., 1995)。すなわち、減量手術には体重減少効果とは別に糖尿病に対する効果があることを意味している。その後の多数の症例を用いたメタ解析でも、減量手術には確かに糖尿病に対する効果があることが示された(Buchwald H et al., 2009)。この糖代謝改善効果の機序は諸説言われているが、小腸バイパスを伴う術式において糖尿病寛解率が高いことから、体重減少や糖代謝改善効果に関与する消化管由来の何らかの因子が存在するのではないかと考えている。しかしながら、減量手術の治療効果に関して、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。

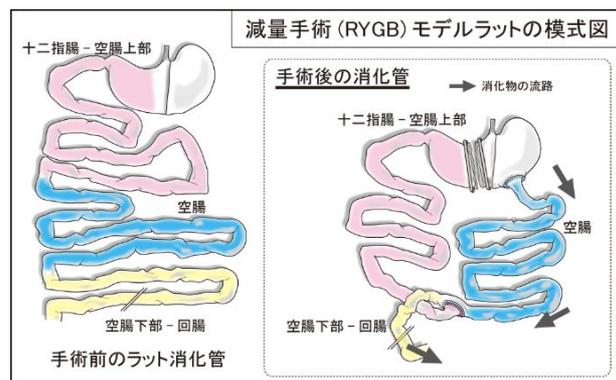
2. 研究の目的

上記の背景に基づき本研究は、減量手術における体重減少、糖代謝改善に寄与する内分泌的メカニズムの解明を目指して、減量手術モデルラットを確立するとともに、その表現型を明らかにすることを目的とする。さらに、このモデルラットを基盤として、インスリン分泌を含む糖代謝調節、エネルギー代謝調節に関連する機能性タンパク質(ペプチドホルモン)の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) 肥満減量手術モデルラットの確立

本研究では、Wistar 系肥満ラットを用いて Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) を模したモデルラットを作製した(以下、RYGB ラットと記載する)。RYGB は、肥満減量手術の中でも小腸バイパスを伴う術式のひとつである。右図は、作製した RYGB ラットの消化管の構造を模式化したものである。



(2) RYGB ラットの表現型の解析

作製した RYGB ラットの体重や摂食量、血糖値等の各種血液パラメータを経時的に測定するとともに、グルコース負荷試験を実施した。グルコース負荷試験においては、血中 GLP-1 濃度の測定も行った。また、膵臓の機能的変化を明らかにするため、生化学的、形態学的手法による解析を行った。

RYGB ラットにおいては消化管の構造を大きく変化させており、ペプチドホルモン(所謂、消化管ホルモン)の発現が変化していることが十分予想された。そこで、RYGB ラットの消化管各領域における既知のペプチドホルモン遺伝子の発現変化を調べた。

(3) RNA-Seq 解析を用いた、減量手術の治療効果に関する因子の探索

RYGB ラット及び Sham ラットの消化管をサンプルにした RNA-Seq 解析を実施し、RYGB ラットの消化管においてのみ発現が変化している遺伝子をデータから抽出することを試みた。遺伝子を選択する際には、変動の大きさや分泌性タンパク質に必要なシグナルペプチドの有無、コードするタンパク質の分子量を基準とした。

(4) 減量手術の治療効果に関するペプチドホルモンの探索と同定

膵β細胞株を用いたカルシウムアッセイ系を活性評価に使用して、消化管組織抽出物から、減量手術の治療効果に関連するペプチドホルモンの探索を試みた。具体的には、RYGB ラットおよび Sham ラットの消化管を部位ごとに採取し、ペプチド画分を含む組織抽出物を作製した。両群から得られた組織抽出物を、各種カラムを使用した HPLC により展開後、各画分の生理活性を確認した。RYGB ラットの組織抽出物由来の画分と Sham ラットの組織抽出物由来の画分の生理活性を比較し、RYGB ラットにおいて特異的に増加、あるいは減少している活性画分に着目して精製・探索を進めた。

4. 研究成果

(1) 肥満減量手術モデルラットの確立

Wistar 系肥満ラットに対して、空腸の一部を切断、下流側を胃の前半部に吻合し、上流側は空腸の下部に吻合して RYGB と呼ばれる術式のモデルラットを確立した。本研究におけるモデルラットの作製方法では、9 割以上のラットが生存することを確認した。作製したモデルラットの体重変化を観察したところ、RYGB 群の体重は、術後長期にわたり Sham 群の約 90% を維持することができたことから、体重減少効果を伴った肥満減量手術のモデルラットの作製に成功したと考えている。

(2) RYGB ラットの表現型の解析

(2)-1 体重、摂食量、血糖値の変化

RYGB 群、Sham 群および RYGB 群の摂食量に合わせたペアフェド群 (Sham-PF 群) の 3 群を設け、体重変化、摂食量、自由摂食条件下における血糖値、インスリン値の変化を 13 週間にわたって観察した。先ほども記述した通り、RYGB 群の体重は Sham 群の約 90% を維持した。RYGB 群に摂食量を合わせた Sham-PF 群の体重も RYGB 群と同程度であった。さらに、自由摂食条件下における血糖値を測定したところ、RYGB 群の血糖値が、Sham 群と比べて低下しており、血糖改善効果があるように考えられた。一方、Sham-PF 群の血糖値の変化を調べたところ、RYGB 群と同程度に低下していた。つまり、RYGB ラットの体重減少及び血糖改善効果は摂食量の減少が要因であることが明らかになった。

(2)-2 グルコース負荷試験

次に、術後 3 週、7 週、11 週時に、経口グルコース負荷試験 (OGTT) を実施し、インスリン分泌能の変化を調べた。その結果、術後 3 週時点の OGTT においては、Sham 群、Sham-PF 群、RYGB 群の血中インスリン濃度に有意な違いはなかった。しかし、術後 7 週時に実施した OGTT において、グルコース負荷から 10、30、60 分後の RYGB 群の値が、Sham 群、Sham-PF 群と比べて有意に高い値を示した。Sham 群と Sham-PF 群には違いはなかった。すなわち、体重減少とは無関係にグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) が亢進していることが認められた。

そこで、再度モデルラットを作製して、長期実験を行い、OGTT と経腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT) における血中インスリン濃度の変化を比較した。その結果、OGTT (術後 7 週) で

は、RYGB 群においてグルコース負荷から 30 分後の著しいインスリン濃度の上昇が再度観察された一方、IPGTT (術後 10 週) においてこのインスリン濃度の上昇は認められなかった。この結果は、RYGB ラットで観察された GSIS の亢進には、消化管由来の何らかの因子が関与している可能性を示唆している。

そこで、OGTT および IPGTT における血中 GLP-1 濃度を比較した。その結果、術後 7 週での OGTT ではグルコース負荷から 30 分後に GLP-1 濃度の上昇が観察されたが、IPGTT では観察されなかった。つまり、本モデルラットの GSIS の亢進には GLP-1 の関与が示唆されるが、不思議なことに術後 3 週時の OGTT では、RYGB 群においても GSIS の亢進は認められないにも関わらず、GLP-1 の上昇が RYGB 群特異的に観察された。従って、本研究において作製した RYGB ラットの GSIS の著しい亢進は、GLP-1 の関与だけでは説明できない。

(2)-3 膵臓の生化学的、形態学的解析

RYGB ラットにおいて、GSIS の著しい亢進が観察されたことから、膵臓の機能的な変化について、生化学的、形態学的手法により検討した。その結果、RYGB 群の膵臓組織重量が他の群と比較して、増加していた。しかし、インスリン含有量に変化はなかった。形態学的解析においても、免疫染色によりインスリン陽性反応を示す面積を指標に β 細胞の量を測定したところ、各群間で有意な差は認められなかった。さらに、Ki67 をマーカーにして、 β 細胞の増殖についても検討したが、各群間で有意な差はなかった。以上の結果より GSIS の亢進は、膵臓の β 細胞が増加、あるいはインスリン産生量が増加しているのではなく、グルコースに応答してインスリンを分泌する機能だけが亢進している可能性を示唆している。そこで、各群の膵臓をサンプルに GeneChip 解析を行い、RYGB 手術により発現変動する遺伝子を検索した。その結果、膵臓 β 細胞においてインスリン分泌に関わる ATP 感受性 K^+ チャンネルを構成する Kir6.2 (遺伝子名: *Kcnj11*) の発現が減少していることを見出した。しかしながら現時点において、この *Kcnj11* 遺伝子の発現低下と GSIS の亢進の、機能的関連性あるいは因果関係について明らかにはできていない。

(2)-4 消化管ホルモンの遺伝子発現変化

RYGB モデルラットの表現型解析の一環として、消化管各部位を採取し、既知の消化管ホルモンの遺伝子発現をいくつか調べた。その結果、GLP-1 (遺伝子名: *Gcg*)、PYY 遺伝子の発現量が増加し、GIP 遺伝子の発現量が減少していることが明らかとなった。GLP-1 に関しては、消化管各部位の組織抽出物を作製して GLP-1 含有量を測定したが、遺伝子発現の結果と同様、RYGB 群において GLP-1 含有量が増加していることが確認された。

(3) RNA-Seq 解析を用いた、減量手術の治療効果に關与する因子の探索

RYGB ラット及び Sham ラットの消化管各部位をサンプルにした RNA-Seq 解析を実施し、RYGB ラットにおいて発現変動している遺伝子を検索した。その結果、上記の消化管ホルモン遺伝子の発現解析でも確認された GLP-1 (遺伝子名: *Gcg*) 遺伝子が、やはり発現増加していることが検出された。

2018 年に Kaplan らが報告した論文 (*Ge X et al., 2018*) において、彼らは本研究と同様に、減量手術スリーブ法のモデル動物をサンプルに生理活性物質の探索を行っており、エネルギー代謝調節に關連する因子として *Leap2* 遺伝子を同定している。本研究において実施した RYGB ラットの RNA-Seq 解析においても、この *Leap2* 遺伝子は変化の大きい遺伝子として検出、リストアップされたが、機能解析等において間に合わなかった。

さらにこの *Leap2* 以外にも発現が変化している、分泌性タンパク質をコードすると予想され

る未知の遺伝子がいくつか存在することを確認した。これらの遺伝子については cDNA クローニングや機能解析等をさらに進めたが、タンパク質として分泌されているか否か、GSIS に関与しているか否か確認するには至っていない。

(4) 減量手術の治療効果に関与するペプチドホルモンの探索と同定

本研究では RYGB ラットおよび Sham ラットの消化管を部位ごとに採取し、ペプチド画分を含む組織抽出物を作製した。両群から得られた組織抽出物をゲル濾過 HPLC でそれぞれ展開後、カルシウムアッセイ系を用いて活性を評価したところ、複数の興味深い活性画分を見出すことができた。特に、分子量約 1000 付近の物質が含まれる画分では、RYGB ラット由来の組織抽出物の方が強い活性を示した。これらの活性画分を、様々な種類のイオン交換カラム、逆相カラムを用いて精製を進めたところ、既知の生理活性ペプチドの断片が検出された。しかしながら、このペプチド断片が、RYGB ラットのグルコース応答性のインスリン分泌の亢進に関与しているのか否かが明らかにできていない。今後、このペプチド断片の含有量やインスリン分泌における生理活性の有無などを明らかにし、その機能を同定することが重要である。

(5) 総括

本研究では Wistar 系肥満モデルラットを用いて、人と同様に体重減少効果、血糖値改善効果を伴った減量手術モデル動物の作製に成功した。これらの効果は、摂食量の減少に起因するものであった。ただし、Wistar 系肥満ラット（レプチン受容体欠損）をベースの動物に用いたことにより、RYGB ラットにおいても過食は是正されず、糖や脂質などのエネルギー代謝調節機構が正常化することはなかった。人とげっ歯類の生理的メカニズムの違いや、摂食行動の様式の違いもあり、動物モデルにおいて得られた知見の全てが臨床医学に応用できるわけではないが、基礎研究により減量手術の治療効果のメカニズムを解明していくことは、さらなる発展を目指すうえで必須であり、本研究において減量手術モデル動物を作製し、表現型の解析ができたことは今後の研究にとって重要な起点となったと考える。

さらに、RYGB ラットにおいては摂食量の減少と関係なく、グルコース応答性のインスリン分泌の著しい亢進が認められた。本研究における検討の結果、この効果には GLP-1 以外にも、消化管由来の何らかの因子が関与している可能性が考えられた。しかしながら、この因子を同定することはできなかった。近年、ペプチドホルモンの探索は非常に困難になっており、新たなペプチドホルモンはほとんど発見されていない。しかし、減量手術モデルのようなある種の異常な状態である、病態モデル動物を基盤とする本研究のようなアプローチは、新たなペプチドホルモンの発見への突破口となりうると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ensho Takuya, Maruyama Keisuke, Mori Kenji, Miyazato Mikiya, Kangawa Kenji, Nakahara Keiko, Murakami Noboru	4. 巻 492
2. 論文標題 Neuromedin U precursor-related peptide (NURP) exerts neuromedin U-like sympathetic nerve action in the rat	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 412 ~ 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.08.084	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 -
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 Islam Md Nurul, Mita Yuichiro, Maruyama Keisuke, Tanida Ryota, Zhang Weidong, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu	4. 巻 244
2. 論文標題 Liver-expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effect of ghrelin in rodents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 13 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0102	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 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 丸山圭介、宮澤崇、中尾一和、寒川賢治
2. 発表標題 肥満減量手術の動物モデルを基盤とした新規生理活性ペプチドの探索
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山圭介、宮澤崇、中尾一和、寒川賢治
2. 発表標題 肥満減量手術モデルラットにおけるグルコース応答性インスリン分泌の改善
3. 学会等名 第89回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 丸山圭介、宮澤崇、中尾一和、寒川賢治
2. 発表標題 肥満減量手術モデル動物からの生理活性ペプチドの探索
3. 学会等名 第13回GPCR研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 丸山圭介、宮澤崇、中尾一和、寒川賢治
2. 発表標題 病態モデル動物からの生理活性ペプチドの探索
3. 学会等名 第37回日本肥満学会
4. 発表年 2016年

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回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019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
研究協力者	宮澤 崇 (MIYAZAWA TAKASHI) (30443500)	九州大学・医学部・講師	