

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08268

研究課題名(和文)肥満症の病態形成における液性因子neudesinの意義

研究課題名(英文)The role of neudesin, a secretory protein, in the

研究代表者

太田 紘也(Ohta, Hiroya)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：40638988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが得た成果は2つに大別される。まず液性因子neudesinによる交感神経活性制御メカニズムについて明らかにした。neudesinは神経細胞および脂肪細胞から分泌されて、神経細胞のチロシンヒドロキシラーゼ発現を抑制することで、交感神経活性抑制作用を示した。その結果、neudesin欠損時には白色脂肪でのエネルギー消費が亢進することが明らかになった。次にマクロファージにおけるneudesinの意義に関する知見を得た。マウス骨髄細胞由来マクロファージを用いた解析の結果、neudesinは炎症促進性のM1マクロファージに比べ、炎症抑制性のM2マクロファージで高発現することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題を遂行することで、液性因子neudesinによる肥満症の病態形成および、マクロファージによる炎症応答制御の一端が明らかになった。生活習慣病の増加は全世界的に問題になっており、肥満や、軽度の炎症が持続する慢性炎症と呼ばれる状態が生活習慣病の発症と密接に関わることが明らかになっている。脂肪細胞由来のホルモンであるレプチンの発見以降、液性因子による肥満や慢性炎症制御に関する研究を推進することで、新たな生活習慣病治療薬の創出につながることを期待されている。従って研究代表者らが推進するneudesin研究も、将来的な生活習慣病治療薬の創出に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The results of the study can be summarized into two main points. First, we elucidated the regulatory mechanism of sympathetic nervous activity by neudesin. neudesin was secreted by neurons and adipocytes and inhibited the expression of tyrosine hydroxylase in neurons, thereby inhibiting sympathetic nervous activity. Thus, depletion of neudesin resulted in increased energy expenditure in white adipose tissue. Next, we examined the roles of neudesin in macrophages. Analysis using mouse bone marrow derived macrophages showed that neudesin was highly expressed in anti-inflammatory M2 macrophages compared to pro-inflammatory M1 macrophages. Thus, neudesin might be important for regulation of inflammatory responses by macrophages.

研究分野：分子生物学

キーワード：neudesin 交感神経系 脂肪細胞 エネルギー消費 マクロファージ アミノ酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究課題を開始するまでに、研究代表者らは液性因子 *neudesin* の遺伝子欠損(以下 KO)マウスが高脂肪食負荷で誘導される肥満に耐性を示したことから、*neudesin* が肥満症の病態形成に関わることを明らかにしていた。さらに *neudesin* KO マウスが肥満しにくい背景には、交感神経活性化に伴うエネルギー消費の亢進が認められることも明らかにした。以上の知見に基づいて、研究代表者らはエネルギー代謝調節因子としての *neudesin*、特に *neudesin* が肥満症の病態形成で担う役割の解明に着目した。*neudesin* が交感神経活性制御に関わることは明らかになったが、実際に交感神経活性を制御するメカニズムは不明であった。

また *neudesin* は成体マウスにおいては中枢末梢を問わず、広範な組織において発現が認められ、エネルギー代謝制御以外の作用も有することが理解できる。研究代表者らは、*neudesin* がマクロファージや制御性 T 細胞などの免疫担当細胞においても発現することを見出しており、*neudesin* が免疫系においても何らかの機能を有する可能性が高いことを見出していたが、その実態に関しては、全く不明であった。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景を踏まえ、本研究課題を遂行するにあたり、以下の2つの目的を設定する。まず、*neudesin* による肥満症の病態形成制御に、*neudesin* による交感神経活性調節に関わることは明らかになったが、詳細なメカニズムに関しては不明なので、**1: *neudesin* による交感神経活性制御のメカニズムを明らかにすることが目的の一つ**である。また免疫担当細胞における *neudesin* の役割にも着目した研究を開始する。マクロファージはその発見以来、炎症誘導や貪食といった機能を果たす、比較的同質的な細胞集団とみなされてきた。しかし近年では、炎症促進性の M1 型マクロファージおよび抗炎症性の M2 型マクロファージという概念や、骨髄細胞由来マクロファージと組織特異的マクロファージという概念が示すように、比較的多様性に富むことが明らかにされつつある。*neudesin* がマクロファージにも発現することは既に分かっていたので、**2: マクロファージ機能における *neudesin* の役割を明らかにすること**を、目的にする。

3. 研究の方法

1: 交感神経活性制御における *neudesin* の役割

野生型マウス(以下 WT マウス)および *neudesin* KO マウスを用いた *in vivo* の実験と、交感神経細胞のモデルとして PC12 細胞、脂肪細胞のモデルとして 3T3-L1 細胞を使った、*in vitro* の実験を行った。マウスを用いた実験は、いずれも 10 週齢の雄性マウスを使用した。また *in vitro* の実験に関して、PC12 細胞の分化は NGF 添加、3T3-L1 細胞の分化は、インスリン/デキサメタゾン/IBMX のカクテルを添加する、一般的な方法で行った。また *in vitro* 系で *neudesin* 機能を阻害する目的で、siRNA による *neudesin* ノックダウン(以下 KD)実験を行った。上記の分子生物学的な手法に加え、交感神経活性を外的に制御する目的で、ヘキサメトニウム添加による節遮断や、カフェインあるいはニコチン添加による交感神経活性化誘導など、薬理的な実験も遂行した。また、組換え *neudesin* タンパク質の添加実験も必要に応じて行ったが、組換え *neudesin* タンパク質の発現系に関しては、既に樹立した昆虫細胞を用いた系により獲得した。

2: マクロファージ機能における *neudesin* の役割

マクロファージ機能に関する研究は、マウス由来のマクロファージを用いた *in vitro* の系で行った。WT マウスの腹腔内への 3%チオグリコレートにより獲得したマクロファージ(腹腔内マクロファージ、以下 *periMΦ*)と、マウスの大腿骨および脛骨の骨髄細胞を分化させて獲得した、骨髄細胞由来マクロファージ(以下 BMDM)を用いて実験を行った。さらに必要に応じて、獲得した BMDM を M1 分極化(20ng/ml IFN- γ 処理 24hr)あるいは M2 分極化(10ng/ml IL4 処理 24hr)して、それぞれ M1 マクロファージ、M2 マクロファージとして実験に用いた。特筆すべき実験系として、セリン欠乏状態を反映するために、DMEM の組成をベースにした、セリン・グリシン欠乏培地(以下 Δ SG 培地)と対照培地(全アミノ酸含有培地)を作製して使用した。セリンに加えてグリシンも欠乏させた理由として、グリシンがセリンから合成される一方で、セリン欠乏時にはグリシンからセリンが供給されるので、両アミノ酸を同時に欠乏させた培地を使用した。

4. 研究成果

本研究課題を遂行することで、以下の成果を得た。

1: 交感神経活性制御における *neudesin* の役割

1-1: 交感神経節における *neudesin* 発現

neudesin は皮下白色脂肪組織(以下 sWAT)や副腎で高発現することを既に示したが、新たに交

感神経節においても、sWAT や副腎に匹敵する発現が認められた。また寒冷曝露や、カフェインあるいはニコチン投与で交感神経活性化を誘導すると、交感神経節における neudesin 発現が亢進する一方で、ヘキサメトニウム投与により交感神経活性を抑制した場合は、交感神経節における neudesin 発現は低下した。

1-2: neudesin によるチロシンヒドロキシラーゼ発現制御

研究代表者らは、交感神経細胞のモデルとして用いられる PC12 細胞に組換え neudesin を添加することで、ノルアドレナリン合成の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(以下 Th)が抑制されることを見出した。本研究課題を遂行するにあたり、neudesin KO マウス由来の交感神経節および siRNA により neudesin KD を行った PC12 細胞で Th 発現を検討した。その結果、いずれの場合も Th 発現の有意な上昇が認められ、**neudesin 欠損に伴って、交感神経における Th 発現が亢進することが示された。**さらに HPLC 法により PC12 細胞の培養上清中のノルアドレナリン濃度を測定したところ、**neudesin を KD した PC12 細胞由来の培養上清では、ノルアドレナリン濃度が上昇する**ことが確認され、Th 発現の亢進と合致する結果が得られた。

1-3: neudesin による白色脂肪細胞エネルギー消費調節

エネルギー消費を担う脂肪細胞としては、褐色脂肪細胞が知られているが、近年では主に交感神経刺激により白色脂肪細胞の性質が変化して、褐色脂肪細胞様の性質を帯びる「白色脂肪の褐色化」が注目を集めている。研究代表者らは、neudesin KO マウス由来の白色脂肪細胞で、Serca2a をはじめとする褐色化マーカーの発現亢進が認められた。また分化させた 3T3-L1 細胞に、組換え neudesin タンパク質を添加すると、褐色化マーカーの発現は低下した。

以上、本研究課題を遂行することで得られた知見を改めて整理する。**①: neudesin は交感神経活性を抑制する、②: neudesin は脂肪細胞に投射する交感神経あるいは脂肪細胞から産生され局所的に作用する、③: neudesin は、交感神経では Th 発現の抑制作用を、脂肪細胞では褐色化マーカー類の発現抑制作用を示す。**

2: マクロファージ機能における neudesin の役割

2-1: 各種マクロファージにおける neudesin 発現解析

マウス由来の periMΦ および BMDM で neudesin が発現していることが確認された。また、BMDM にさらなる分化誘導をかけることで得られる、M1 マクロファージおよび M2 マクロファージで neudesin 発現を比較すると、**M1 マクロファージに比べて、M2 マクロファージで neudesin 発現が高い可能性がある**ことが判明した。M2 マクロファージは抗炎症作用のみならず、多様な生体機能調節に関わることが明らかになり、その一例としてノルアドレナリンのクリアランスを介して交感神経活性を制御することが報告されている。今後、neudesin によるマクロファージ機能制御、特に M2 マクロファージ機能に及ぼす影響を明らかにする。

2-2: アミノ酸代謝によるマクロファージ機能制御

並行して、アミノ酸代謝がマクロファージ機能に及ぼす影響に関する研究も開始した。過剰な脂質や糖質がマクロファージによる炎症誘導を亢進することは知られているが、アミノ酸によるマクロファージ機能制御に関する報告は少ない。研究代表者らは、一般には非必須アミノ酸として知られているセリンが、マクロファージではその供給を細胞外に依存すること、**セリン欠乏に伴って、マクロファージによるサイトカイン産生の変化、特に IL10 産生が顕著に低下する**ことを明らかにした。さらに IL10 産生低下は、細胞内代謝、特に解糖系の異常に起因するピルビン酸産生の低下に起因することが明らかになった。これらの結果はアミノ酸によるマクロファージ機能制御の新たな一面を解き明かすものであり、細胞内代謝の変化による免疫担当細胞の機能制御、いわゆる「Immunometabolism」がアミノ酸代謝による制御を受けるという観点でも、興味深い結果である。

現在は上記 2 つの研究を並行して進めているが、neudesin 発現も栄養状態の変動に応じて変化することが分かっている。今後、セリンを含めたアミノ酸代謝の変化が neudesin 発現に影響するか明らかにして、2 つの研究が互いに関連する可能性についても検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakayama Y, Masuda Y, Ohta H, Tanaka T, Washida M, Nabeshima Y, Miyake A, Itoh N, Konishi M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Fgf21 Regulates T-cell Development in the Neonatal and Juvenile Thymus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-00349-8.	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ohta H, Kurita K, Shirakawa I, Ito A, Tanaka M, Arima H, Ogawa Y, Suganami T
2. 発表標題 The role of serine, a non-essential amino acid, in the production of cytokines in macrophages
3. 学会等名 第50回生理研国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田紘也, 栗田研人, 白川伊吹, 岡田純, 大野由佳, 荻野敦, 田中都, 有馬寛, 小川佳宏, 菅波孝祥
2. 発表標題 マクロファージのアミノ酸代謝による新たな炎症制御機構の解明
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田紘也, 白川伊吹, 岡田純, 大野由佳, 荻野敦, 田中都, 小川佳宏, 菅波孝祥
2. 発表標題 マクロファージのアミノ酸代謝が炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響の解明
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 迎武紘, 太田紘也, 小川新, 中橋麻友, 増田有紀, 中山喜明, 伊藤信行, 小西守周
2. 発表標題 傍分泌因子ニューデシンを介する交感神経制御および肥満調節機構の解明
3. 学会等名 第23回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田紘也, 白川伊吹, 岡田純, 栗田研人, 田中都, 小川佳宏, 菅波孝祥
2. 発表標題 マクロファージのアミノ酸代謝が炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 第8回生理研・名大医合同シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田紘也, 栗田研人, 白川伊吹, 岡田純, 大野由佳, 荻野敦, 田中都, 有馬寛, 小川佳宏, 菅波孝祥
2. 発表標題 マクロファージのアミノ酸代謝による新たな炎症制御機構の解明
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 迎武紘, 太田紘也, 山田祐維, 中山喜明, 増田有紀, 木村郁夫, 伊藤信行, 小西守周
2. 発表標題 新規肥満症鍵分子neudesinの寒冷ストレス暴露による発現変化および機能解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田紘也, 小西守周, 木村郁夫, 菅波孝祥, 伊藤信行
2. 発表標題 液性因子neudesinによるエネルギー代謝調節機構
3. 学会等名 第7回名大医・生理研合同シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田紘也, 小西守周, 中山喜明, 中尾一和, 菅波孝祥, 木村郁夫, 伊藤信行
2. 発表標題 液性因子neudesinによるエネルギー代謝調節機構の解明
3. 学会等名 第90回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 迎武紘, 柿木一成, 後藤春花, 太田紘也, 増田有紀, 中山喜明, 伊藤信行, 小西守周
2. 発表標題 自己/傍分泌因子Neudesinによる神経活性調節機構の解明とK0マウス表現型解析
3. 学会等名 日本薬学会第139回年会
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