

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19390254  
 研究課題名 (和文) 摂食調節に機能する新規ペプチドの同定と機能解析  
 研究課題名 (英文) Identification and functional analysis of novel bioactive peptides on 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

## 研究成果の概要 (和文)：

新規生理活性ペプチド NERP の生体内分布と生理作用を検討した。NERP の免疫活性をヒトおよびラットの視床下部に認め、その一部は視床下部外側野に存在するオレキシンと同じニューロンに認めた。NERP-2 のみラット中枢投与にて摂食亢進作用を有し、その生理作用に C 端のアミド化が必須であった。オレキシン受容体阻害薬やオレキシン遺伝子欠損マウスを用いた検討で、NERP-2 の摂食亢進作用はオレキシンを介して機能することが明らかとなった。

## 研究成果の概要 (英文)：

We have investigated the tissue localization and biological functions of novel bioactive peptides NERPs. Immunoreactive NERPs were present in lateral nucleus of the hypothalamus and colocalized with orexin. NERP-2, but not NERP-1, enhanced food intake in a manner dependent on the neuropeptides orexins. Bioactivity of NERPs required carboxy-terminal amidation. This study demonstrated that NERP-2 is a novel orexigenic bioactive peptide.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009 年度	3,700,000	1,111,000	4,811,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,201,000	18,201,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌

キーワード：摂食亢進、視床下部、新規生理活性ペプチド、NERP、オレキシン

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は糖尿病、高脂血症、動脈硬化や高血圧等の原因となる病態である。肥満の有病率は国内外を問わず年々増加傾向にあり、摂食行動ならびにエネルギー代謝調節系の分子機構の解明、予防および治療に向けて

の取り組みは急務である。肥満症の分子レベルでの病態解明は、肥満症のみならず肥満に起因する生活習慣病を総合的に治療する新しい治療法の開発につながるものと期待され、国内外で精力的に研究されている。肥満症や生活習慣病改善薬の創薬や特許取

得は、国際間の競争が顕著な分野である。

摂食の開始や終了は脳で決定されることから、神経ペプチドは摂食を調節している重要な因子である。遺伝子改変マウス、脳室内投与による行動薬理的解析、細胞内情報系の可視化技術などにより、今まで以上に摂食調節ペプチドの機能解析が進展できるようになっている。

本申請の学術的な特色は、(1) 生体内ペプチドに至適化したペプチドミクス技術を用いて新たな生理活性ペプチドを同定した点、(2) 摂食・エネルギー代謝機能解析に必要な *in vitro*、*in vivo* のペプチド活性評価システムが既に確立された我々の研究施設で新規摂食調節分子を同定した点にある。新規生理活性ペプチドの同定は、未知の生体の情報伝達・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、我々は細胞間情報伝達・制御に関与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したいと考え、ペプチド研究を推進してきた。

## 2. 研究の目的

申請者は近年、国立循環器病センターグループとの共同研究により、生体内ペプチドのデータベース化とプロファイリング法を組み合わせた網羅的なデータベース ペプチドーム (peptidome) を構築している。この方法論を用い、ヒトとラットの視床下部に存在する新たな摂食調節ペプチド Neuroendocrine Regulatory Peptide (NERP) を発見した。本研究では、今までに確立した技術と新たな方法論を基に、NERP のエネルギー代謝調節における統合的理解を目指して機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

9~10週齢のWistar系雄ラット(日本チャールズ・リバー、横浜)は、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・自由摂水下で飼育した。オレキシン遺伝子欠損マウスは桜井武博士により分与頂いた。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) 脳室内カニューレ挿入・留置法

Pxinson & Watson の脳図譜に従い定位脳固定手術装置(ナリシゲ(株)、東京)にラット頭蓋を固定し、側脳室(ラットはBregmaより後方0.8 mm、側方3.0 mm、脳表より1.8 mm、マウスはBregmaより後方

0.2 mm、側方1.0 mm、脳表より2.5 mm)に直径0.9 mmのカニューレを挿入し、セメントで固定した。

### (3) ヒト組織

本研究で得られた試料はその後、解析されることを前提としているため、その扱いに関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について(平成10年厚生科学審議会答申)」を遵守した。患者への説明には、本研究に関しては当院に設けられている倫理委員会に諮り許可を得た文書を作成し、説明の後、文書にて同意を得た。

### (4) 免疫染色

免疫染色は既報に従って行った<sup>1)</sup>。用いた抗体の最終濃度は、ラット/ヒト NERP-1 (1:2,500)、ラット NERP-2 (1:5,000)、goat anti-orexin-A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 1:1,000)、chicken anti-MCH (Chemicon International, Temecula, CA, 1:2,000)であった。

### (5) 定量PCR法

外側野を含む脳スライスを作製し、2mm直径の金属で外側野をパンチアウトし神経核を得た。RNAをTRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて抽出した。ラット *vgf* mRNA プライマー; 5'-CATCTTGGTGAGACTTTGAC-3' and 5'-AGGGACGAGATGGACT-3' (GenBank accession number, M74223) と LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics)、LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて、定量PCRを施行した。

### (6) 摂食実験

摂食実験は既報に従って行った。側脳室に留置したカテーテルを用いて薬剤やペプチドを投与し、投与後の摂餌量を測定した。

### (7) 統計解析

得られた結果は means ± SEM で表記した。統計解析は ANOVA and *post-hoc* Fisher's test 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) ヒトおよびラットにおける NERP の局在

ラット視床下部外側野に NERP-1 および NERP-2 陽性ニューロンを認めた。NERP-2 は NERP-1 に比べ多数陽性ニューロンを認めた。外側野に存在する神経ペプチドである orexin-A とメラニン凝集ホルモン(MCH)との二重免疫染色で、NERP-2 は orexin-A と多く共存し、MCH との共存はわずかであった。ヒト剖検で得られた視床下部外側野

においても、NERP-2 陽性ニューロンを認めた。ラット視床下部弓状核において、NERP-2 と orexin-A 陽性の神経線維を認め、二重染色にて NERP-2 と orexin-A の共存を認めた。

#### (2) NERP-2 の摂食亢進作用とそのシグナル伝達システムの解析

48 時間絶食負荷でラット視床下部外側野の *vgf* 遺伝子発現の増強を認め、再摂食 2 時間後に *vgf* 遺伝子発現量は低下した。自由行動下のラット側脳室に NERP を投与すると、NERP-2 は明期において用量依存的に摂餌量を亢進させ、その最少有効量は 0.1 nmol であった。NERP-1 や NERP-2 の非アミド体である NERP-2-Gly は摂餌を亢進させなかった。暗期直前での NERP-2 脳室内投与は摂餌量に影響を与えなかったが、暗期直前の抗 NERP-2 IgG の脳室内投与は、投与後 24 時間の摂餌量を抑制した。抗 orexin-A/抗 anti-orexin-B IgGs の NERP-2 投与 3 時間前の脳室内投与は、NERP-2 による摂餌量亢進をキャンセルした。オレキシン 1 受容体 (OX<sub>1</sub>R) の選択的拮抗薬の脳室内前投与は、NERP-2 の摂食亢進作用をキャンセルした。また、NERP-2 の摂食亢進作用は、オレキシン遺伝子欠損マウスでは認められなかった。AgRP IgG 抗体の脳室内前投与は NERP-2 による摂食亢進作用に影響を与えなかった。

#### (3) 考察

新規生理活性ペプチドである NERP-2 は中枢投与により摂食を亢進する新たな生理活性ペプチドであり、その生理作用はオレキシンを介して機能することが明らかとなった。

NERP 前駆体たんぱくをコードする *vgf* 遺伝子欠損マウスは、代謝が亢進してやせを来すことが報告されている。これまで VGF 蛋白由来のペプチドが多数報告されるも、摂食亢進をきたすペプチドは同定されていなかった。本研究にて、ラット視床下部外側野での *vgf* 遺伝子発現が絶食で増加し再摂食で低下すること、摂食亢進中枢とされる視床下部外側野に NERP ペプチドがヒトやラットで局在することから、NERP が摂食エネルギー代謝調節に機能することが示唆された。NERP-1 の中枢投与は摂餌に影響を与えなかったが、NERP-2 の中枢投与は用量依存的に摂餌を亢進させた。抗 NERP-2 IgG の脳室内投与による中和実験で暗期の摂餌量が減少したことから、NERP-2 は内在性の摂食亢進ペプチドであることが明らかとなった。

視床下部外側野は摂食、覚醒などの自律神経系を統合する中枢である。外側野には摂食亢進をきたす 2 つの神経ペプチドであるオレキシンとメラニン凝集ホルモンが局

在し、オレキシンは覚醒、エネルギー代謝、情動、報酬や自律神経機能に関与する。摂食亢進をきたす NERP-2 は外側野においてオレキシンと共存することから機能連関が推定された。抗オレキシン抗体やオレキシン受容体拮抗薬の前投与で NERP-2 の摂食亢進がキャンセルされること、NERP-2 の摂食亢進作用がオレキシン遺伝子欠損マウスで認められないことから、NERP-2 の摂食亢進作用はオレキシンを介して機能することが明らかとなった。

NERP の受容体は未同定であるため、Orphan GPCR (G 蛋白共役型受容体) や各種イオンチャネルをスクリーニングし、NERP の細胞内シグナル情報伝達機構を明らかにすることは重要な課題である。今後 NERP の基礎的な機能解析を進めるとともに、NERP が肥満症や摂食障害の病態に関与するかを探索し臨床医学へフィードバックしたい。

#### 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 20 件)

- ① Yanagi S, Kishimoto H, Kawahara K, Sasaki T, Sasaki M, Nishio M, Yajima N, Hamada K, Horie Y, Kubo H, Mak TW, Nakano T, Nakazato M, Suzuki A.: Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas. *J Clin Invest*, 117: 2929-2940 (2007)
- ② Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, Gonzalez LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N.: Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. *J Biol Chem*, 282: 26354-26360 (2007)
- ③ Toshinai K, Mondal MS, Shimbara T, Yamaguchi H, Date Y, Kangawa K, Nakazato M.: Ghrelin stimulates growth hormone secretion and food intake in aged rats. *Mech Ageing Dev*, 128: 182-186 (2007)
- ④ Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M.: Elevated levels of antimicrobial peptides in bronchoalveolar lavage fluid in patients with chronic eosinophilic pneumonia. *Respiration*, 74: 69-75 (2007)
- ⑤ Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M.: Elevated alpha-defensin levels in

- plasma of patients with pulmonary sarcoidosis.  
Respirology, 12: 339-345 (2008)
- ⑥ Toshinai T, Kawagoe T, Shimbara T, Tobina T, Nishida Y, Mondal MS, Yamaguchi H, Date Y, Tanaka H, Nakazato M.: Acute incremental exercise decreases plasma ghrelin level in healthy men.  
Horm Metab Res, 39: 849-851 (2007)
- ⑦ Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M.: The role of PYY in feeding regulation.  
Regul Pept, 145: 12-16 (2008)
- ⑧ Ueno H, Shiiya T, Mizuta M, Mondal MS, Nakazato M.: Plasma ghrelin concentrations in different clinical stages of diabetic complications and glycemic control in Japanese diabetics.  
Endocrine J, 54: 895-902 (2007)
- ⑨ Mondal MS, Yamaguchi H, Date Y, Tsuruta T, Shimbara T, Toshinai K, Shimomura Y, Mori M, Nakazato M.: Ontogeny of a new enteric peptide, neuropeptide W (NPW), in the developing rat stomach.  
Regul Pept, 145: 141-146 (2008)
- ⑩ Ogawa N, Yamaguchi H, Shimbara T, Toshinai K, Kakutani M, Yonemori F, Nakazato M.: The vagal afferent pathway does not play a major role in the induction of satiety by intestinal fatty acid in rats.  
Neurosci Lett, 433: 38-42 (2008)
- ⑪ Toshinai K, Nakazato M.: Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2: novel bioactive peptides processed from VGF.  
Cell Mol Life Sci, 66: 1939-1945 (2009)
- ⑫ Toshinai K, Yamaguchi H, Kageyama H, Matsuo T, Koshinaka K, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M.: A hypothalamic peptide, neuroendocrine regulatory peptide-2, modulates the orexin system.  
Am J Physiol, in press
- ⑬ Yano Y, Toshinai K, Inokuchi T, Kangawa K, Shimada K, Kario K, Nakazato M.: Plasma des-acyl ghrelin, but not plasma HMW adiponectin, is a useful cardiometabolic marker for predicting atherosclerosis in elderly hypertensive patients.  
Atherosclerosis, 204: 590-594 (2009)
- ⑭ Kyoraku I, Shiomi K, Kangawa K, Nakazato M.: Ghrelin reverses experimental diabetic neuropathy in mice.  
Biochem Biophys Res Commun, 389: 405-408 (2009)
- ⑮ Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M.: Effect on octanoic acid-rich formula on plasma ghrelin levels in cachectic with chronic respiratory diseases.  
Nutritional J, 16:8:25 (2009)
- ⑯ Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M.: Ghrelin and its therapeutic potential for cachectic patients.  
Peptides, 30: 1951-1956 (2009)
- ⑰ Arif M, Chikuma T, Ahmed MM, Nakazato M, Smith MA, Kato T.: Effects of memantine on soluble Alpha beta (25-35)-induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's disease model rat brain regions.  
Neuroscience, 164: 1199-1209 (2009)
- ⑱ Saitoh Y, Hongwei W, Ueno H, Mizuta M, Nakazato M.: Telmisartan attenuates fatty acid-induced oxidative stress and NAD(P)H oxidase activity in pancreatic  $\beta$ -cells.  
Diabetes Metab, 35: 392-397 (2009)
- ⑲ Matsuo T, Yamaguchi H, Kageyama H, Sasaki M, Shioda S, Minamino N, Nakazato M.: Localization of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2 in human tissues.  
Regul Pept, in press
- ⑳ Ueno H, Shiiya T, Nakazato M.: Translational research of ghrelin.  
Ann NY Acad Sci, in press
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 中里雅光: 新規視床下部ペプチドによる摂食調節. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会
- ② 中里雅光: 摂食関連ペプチドのネットワーク. 第 80 回日本内分泌学会総会
- ③ 中里雅光: ペプチドによる神経性の摂食調節機構.
- ④ 中里雅光: グレリン治療の応用指針. 第 34 回日本神経内分泌学会
- ⑤ 中里雅光: 消化管と脳を結ぶペプチド性摂食調節機構. 07BMB 第 80 回日本生化学会
- ⑥ 中里雅光: AVP 分泌調節に関わる新規視床下部ペプチド NERP の発見と機能解析. 第 81 回日本内分泌学会学術総会
- ⑦ 中里雅光: Ghrelin and novel peptides in the regulation of energy homeostasis. 17th International

- Symposium on Regulatory peptides
- ⑧ 中里雅光: 加齢におけるアナボリックペプチド グレリンの意義とトランスレーショナルリサーチ. 第9回日本抗加齢医学会総会
  - ⑨ 中里雅光: Feeding Regulatory System Connecting. The 82nd Annual Meeting of the Japan Endocrine Society
  - ⑩ 中里雅光: Role of ghrelin in the central regulation of feeding. XXXVI International Congress of Physiological Sciences
  - ⑪ 中里雅光: Discovery of novel neuropeptides NERPs that suppress vasopressin secretion. VIIIth World Congress on Neurohypophysial Hormones
  - ⑫ 中里雅光: Translational Research of Gastrointestinal Peptides. Satellite Symposium of the 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides
  - ⑬ 中里雅光: 胃で産生されるアナボリックペプチドグレリンの臨床応用の展開. Japan Digestive Disease week 2009
  - ⑭ 中里雅光: Recent progresses in neuropeptide research: from discovery to clinical application. The 2009 Annual Meeting of Korean Endocrine Society
  - ⑮ 中里雅光: ペプチドによる中枢と末梢を結ぶ摂食調節機構. 第82回日本生化学会大会
  - ⑯ 中里雅光: 摂食調節ペプチドのトランスレーショナルリサーチ. 第30回日本肥満学会
  - ⑰ 中里雅光: 摂食調節物質とトランスレーショナルリサーチの実際. 第44回糖尿病学の進歩

[図書] (計4件)

- ① Nakazato M, Ueno H: Springer, New frontiers in Lifestyle-Related Diseases, 2007, 159
- ② Takenoha F, Kageyama H, Date Y, Nakazato M, Shioda S: Springer, New Frontiers in Neuroscience, Feeding regulation in the brain: Involvement of neuropeptide W, 2009, 210
- ③ 中里雅光: 羊土社, 実験医学増刊 肥満・糖尿病の病態を解明するエネルギー代謝の最前線ーミトコンドリア・脂肪細胞の機能理解から, 臓器間神経ネットワークによる代謝調節まで, 摂食調節
- 2. 視床下部における摂食調節物質の新知見, 2009, 213
- ④ 中里雅光: メディカルレビュー社, 糖

尿病ナビゲータ, in press

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計4件)

名称: 脳血管疾患の診断法  
 発明者: 塩見一剛、中里雅光、浜窪隆雄、児玉龍彦、相良三奈  
 権利者: 塩見一剛、中里雅光、浜窪隆雄、児玉龍彦、相良三奈  
 種類: 特許  
 番号: 2007-184373  
 取得年月日: 平成19年7月13日 (2007)  
 国内外の別: 国内

名称: 鼻腔内投薬装置  
 発明者: 藤原光輝、中里雅光  
 権利者: 藤原光輝、中里雅光  
 種類: 特願  
 番号: 2007-331207  
 取得年月日: 2007年12月22日  
 国内外の別: 国内

名称: グレリン及びその誘導体又はGHS-R1a アンタゴニストを有効成分とする慢性呼吸器感染治療  
 発明者: 中里雅光、芦谷淳一、小玉剛士、寒川賢治、林友二郎  
 権利者: 中里雅光、芦谷淳一、小玉剛士、寒川賢治、林友二郎  
 種類: 特願  
 番号: 2008-88324  
 取得年月日: 2008年3月28日  
 国内外の別: 国内

名称: 糖尿病性神経障害治療薬  
 発明者: 中里雅光、京楽 格、塩見一剛、林友二郎、寒川賢治  
 権利者: 中里雅光、京楽 格、塩見一剛、林友二郎、寒川賢治  
 種類: 特願  
 番号: 2007-122897  
 取得年月日: 2007年5月7日  
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中里 雅光 (Nakazato Masamitu)  
 宮崎大学・医学部・教授  
 研究者番号: 10180267

(2)研究分担者

山口 秀樹 (Yamaguchi Hideki)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10305097

十枝内 厚次 (Toshinai Koji)

宮崎大学・医学部・特任助教

研究者番号：80381101