

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591100

研究課題名(和文) 新規視床下部ペプチドの発見と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel hypothalamic peptides

研究代表者

山口 秀樹(YAMAGUCHI HIDEKI)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：10305097

研究成果の概要(和文): 我々の共同研究グループが同定した新規生理活性ペプチド NERP (Neuroendocrine regulatory peptide)の機能解析を行った。NERP-2 はラット中枢投与で摂食を亢進させ、視床下部外側野でオレキシンと共存していた。NERP-2 の中枢投与は自発運動量、体温と酸素消費量の増加を来し、これらの生理作用はオレキシンシグナルの遮断でキャンセルされた。NERP-2 はオレキシンを介して機能する新たな生理活性ペプチドである。

研究成果の概要(英文): We have identified two novel carboxy-terminally amidated peptides, Neuroendocrine regulatory peptide (NERP)-1 and NERP-2. Icv administration of NERP-2 increased food intake in rats. NERP-2 expression localized to the lateral hypothalamus, colocalizing with orexins that activate feeding behavior and arousal. Icv administration of NERP-2 also increased body temperature, oxygen consumption, and locomotor activity in rats. Bioactivities of NERP-2 were abrogated by blunting orexin signaling pathway. NERP-2 plays a role in the control of food intake and energy homeostasis via the orexin pathway.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：生理活性ペプチド、摂食調節、エネルギー代謝調節、

1. 研究開始当初の背景

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いる。

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糖尿病や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分野である。新規摂食調節分子の同定により、新たなエネルギー代謝調節機序が解明されるとともに、ヒトでの病態生理学的意義や新たな治療法の開発へと研究が展開していくことは重要である。

2. 研究の目的

国立循環器病研究センターの佐々木一樹博士、南野直人博士らは、組織、細胞が産生するペプチドの一斉解析を行い、内在するペプチド総体をカタログ化した後、その中より構造特徴などに基づき生理活性ペプチド候補を見出す方法を開発してきた。本法をヒト甲状腺腫瘍培養細胞株に適用した結果、新規視床下部ペプチド NERP (NeuroEndocrine Regulatory Peptide, J Biol Chem, 2007)の同定に成功した。

本研究では、摂食・エネルギー代謝調節作用を有する新規生理活性ペプチド NERP の機能解析を行い、肥満症や糖尿病の新たな診断・治療法を目指した臨床応用へのシーズ発掘を最終目的とする。

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) 脳神経核内へのカニューレ挿入・留置と微量投与方法：

10週齢のWistar系雄ラット片側の視床下部室傍核(Bregmaより後方1.7 mm、側方0.4 mm、脳表より7.0 mm)、弓状核(Bregmaより後方2.4 mm、側方0.3 mm、脳表より9.0 mm)、外側野(Bregmaより後方1.2 mm、側方1.2 mm、脳表より7.1 mm)にNERP 1.0 nmol / 0.2・1を微量投与し、NERPs投与した。

(4) 免疫染色：

免疫染色は既報に従い行った。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：

視床下部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・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・-AGGGACGGAGATGGACT-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い行った。側脳室や神経核内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) 自発運動量の測定：

自発行動量は、行動解析システム(infrared light-beam detectors、室町、東京)を用いて、脳室内投与30分から90分まで60分間のケージ内ビーム遮断回数を15分ごとに計測した。

(8) 体温測定と酸素消費量の測定：

ラット体温は、直腸に挿入・留置したプローブを、酸素消費量はラット用代謝系計測システム(O₂/CO₂ Analyzer MM202R apparatus、室町、東京)を用いて測定した。

(9) 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) 結果

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(図1a, b)。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(図1c, d)。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(図1e)。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(図1h)。

NERP-2の摂食亢進作用とそのシグナル伝達システム

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(図2a)。

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 (図 2b)。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 (図 2b)。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 (data not shown) 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 (図 2c)。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 (図 3a)。オレキシン 1 受容体 (OX1R) 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 (図 3b)。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 (図 3c)。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 (図 3d)。NERP-2 の微量注入による摂食亢進作用は、弓状核 (ARC) への微量注入でのみ認め、室傍核 (PVN) や外側野 (LH) への投与では認められなかった (図 4)。

NERP-2 の体温上昇作用と自発活動亢進作用

NERP-2 の脳室内投与は、投与後の直腸温を有意に上昇させた (図 5a)。しかし NERP-1 や NERP-2 の非活性型である NERP-2-Gly には体温上昇作用はなかった (図 5a)。NERP-2 と orexin-A の脳室内投与は酸素消費量を有意に増加させたが、NERP-2-Gly や NERP-1 のその作用は認められなかった (図 5b)。抗 NERP-2 IgG 抗体の脳室内投与は正常ウサギ血清 (NRS) IgG 抗体と比べて酸素消費量を有意に減少させた (図 5c)。オレキシン 1 受容体 (OX1R) とオレキシン 2 受容体 OX2R の選択的阻害薬のラット脳室内前投与は、NERP-2 による自発運動の亢進をキャンセルした (図 5d)。またマウスにおいても、NERP-2 の自発運動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 (図 5e)。

(2) 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 (MCH) 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-2 は視床下部の外側野以外にも、弓状核や室傍核で NERP 陽性ニューロンを認めた (data not shown)。NERP-2 の摂食亢進作用の作用点を検討するため、NERP-2 の神経核内微量注入後の摂餌量を検討した。その結果、NERP-2 の微量注入による摂食亢進作用は弓状核でのみ認め室傍核や外側野では認められず、NERP-2 摂食亢進の作用点は弓状核であることが明らかとなった。弓状核は、外側野に局在するオレキシンニューロンがその神経線維を投射している神経核で、オレキシンの摂食亢進に重要な神経核とされている。NERP-2 はオレキシンを介して摂食亢進を発揮するが、オレキシンニューロンが局在する外側野で機能するのではなく、オレキシンの投射先である弓状核で NERP-2 の摂食亢進作用が発揮されることが明らかとなった。

オレキシンは摂食のみならず、自発行動、酸素消費量や体温に影響するため、NERP-2 がオレキシンを介して作用するかを検討した。NERP-2 の中枢投与は体温や酸素消費量を増加させ、抗 NERP IgG 抗体の投与は酸素消費量を減少させることから、NERP がエネルギー代謝亢進作用を有することが明らかとなった。NERP-2-Gly にはその作用がなく、C 端のアミド化が NERP の機能発現に必須であった。NERP-2 の自発運動亢進作用は野生型マウスでは認められたが、オレキシン受容体拮抗薬の前投与やオレキシン遺伝子欠損マウスではみられず、オレキシンを介して NERP-2 の機能が発揮され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) や各種イオンチャン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 が肥満や糖尿病の病態に關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4件)

Matsuo T, Yamaguchi H, Kageyama H, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M. Localization of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2 in human tissues, Regul Pept, 査読あり, 163:43-48 (2010).

Mishiro-Sato E, Sasaki K, Matsuo T, Kageyama H, Yamaguchi H, Date Y, Matsubara M, Ishizu T, Yoshizawa-Kumagaye K, Satomi Y, Takao T, Shioda S, Nakazato M, Minamino N. Distribution of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2, and proteolytic processing of their precursor VGF protein in the rat. J Neurochem. 査読あり, 114, 1097-1106 (2010)

Toshinai K, Yamaguchi H, Kageyama H, Matsuo T, Koshinaka K, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, and Nakazato M. Neuroendocrine regulatory peptide-2 regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus. Am J Physiol Endocrinol Metab. 査読あり, 299, E394-401 (2010).

山口 秀樹、中里 雅光、新規視床下部ペプチドNERPによる水・電解質代謝調節、医学のあゆみ、査読なしVol 227, 953-957 (2008)

[学会発表](計10件)

三城 恵美、Endogenous molecular forms of neuroendocrine regulatory peptides and their proteolytic processing from VGF protein in the rat、14th International Congress of Endocrinology (ICE2010)、2010年3月29日、京都

山口 秀樹、Neuroendocrine regulatory peptides (NERPs) suppress presynaptic glutamatergic neurons and activate GABAergic interneurons to inhibit vasopressin secretion、14th International Congress of Endocrinology (ICE2010)、2010年3月30日、京都

松尾 崇、Localization of novel neuroendocrine regulatory peptides, NERP-1 and -2, in human brain and pancreas、

14th International Congress of Endocrinology (ICE2010)、2010年3月30日、京都

松尾 崇、新規生理活性ペプチドNERPのヒト脳および膵臓での局在、第83回日本内分泌学会学術総会、2010年3月25日、京都

山口 秀樹、視床下部ペプチドNERPのAVP分泌抑制機序の解析、第82回日本内分泌学会総会、2009年4月25日、群馬

山口 秀樹、Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2、米国内分泌学会、2008年6月16日、サンフランシスコ

松尾 崇、Characterization and localization of novel neuroendocrine regulatory peptides, NERP-1 and -2, in the human plasma and the hypothalamus、米国内分泌学会、2008年6月16日、サンフランシスコ

山口 秀樹、新規視床下部ペプチドNERPの機能解析、第81回日本内分泌学会総会、2008年5月16日、青森

山口 秀樹、新規生理活性ペプチドNERPのヒトにおける血中濃度と生理学的変動の検討、第81回日本内分泌学会総会、2008年5月16日、青森

[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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 秀樹 (YAMAGUCHI HIDEKI)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：10305097

(2)研究分担者

十枝内 厚次 (TOSHINAI KOJI)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：80381101

(3)連携研究者

研究者番号：