

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月21日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590222

研究課題名（和文）ガラニン様ペプチドの中樞神経系-末梢臓器のクロストークの解明

研究課題名（英文）Analysis of crosstalk between the central nervous system and peripheral organs involving galanin-like peptide (GALP)

研究代表者

影山 晴秋 (KAGEYAMA HARUAKI)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：00433839

研究成果の概要（和文）：摂食とエネルギー代謝調節に関与しているガラニン様ペプチド (GALP) は視床下部と血中に存在していることから、GALP による中枢神経系と末梢臓器間の連関について検討した。GALP 遺伝子は広く発現が認められた。GALP 静脈内投与後の自律神経と除神経時の自律神経の活動を測定した結果、末梢臓器から分泌された GALP は迷走神経求心路を介して脳に情報を送り、自律神経の出力調節に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Galanin-like peptide (GALP) is a neuropeptide related to feeding behavior and energy metabolism. GALP is produced in the hypothalamus arcuate nucleus. GALP also is present in the circulation. We hypothesized a linkage between the central nervous system (CNS) and peripheral organs. In order to demonstrate our hypothesis, we identified GALP mRNA expression in the several organs using RT-PCR, and measured neuronal activities of autonomic nervous system after GALP intravenous injection using electrophysiological techniques. We found that GALP mRNA expressed in the many organs. In addition, we found that GALP activated efferent sympathetic nerve. Vagotomy blocked the activation by GALP. GALP suppressed both afferent and efferent vagus nerves. These results suggest that GALP in circulation sends information to the CNS through vagal afferents and then regulates outputs of autonomic nerves in the CNS.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：遺伝子改変動物、緑色蛍光タンパク質、視床下部、自律神経

1. 研究開始当初の背景

ガラニン様ペプチド (GALP) は視床下部弓状核と下垂体後葉で産生され、脳内で摂食抑制およびエネルギー代謝亢進作用をもつ神経ペプチドである。脳内におけるGALPの摂食調節やエネルギー代謝作用は国内外で注目され

ている。我々のグループもこれまでにGALPによる摂食調節のニューロンネットワークの解析を行い、神経相関や摂食調節機構を同定している(Kageyama H et al, Regul Pept, 2008, Nonaka N et al, J Pharmacol Exp Ther, 2008, Kageyama H et al, J Neuroendocrinol, 2006,

Takenoya F et al, Peptides, 2006, Kageyama H et al, Regul Pept, 2005)。これらの成果を申請者は国内外の学会（日本内分泌学会サテライトシンポジウム、日本解剖学会シンポジウム、国際ガラニンシンポジウム）で発表し、さらに GALP の熱産生機構の解明で第22回日本糖尿病・肥満動物学会 若手研究奨励賞を受賞している。

近年、摂食調節やエネルギー代謝を含めた恒常性維持における臓器間相互作用の重要性が注目されている。GALP は循環血流中にも存在し、その血中濃度は栄養状態（摂食、絶食）によって影響を受けることが報告されている (Kastin AJ et al., Neuroendocrinology, 2001)。しかも興味深いことに GALP の血中濃度は主に胃で産生される摂食亢進ペプチドのグレリンと同程度である。この血中濃度を視床下部弓状核と下垂体後葉からの産生のみで維持している可能性は低いと考えられるが、他の産生臓器においては不明である。すでに我々は末梢臓器（特に胃や脂肪細胞などの内分泌臓器）において GALP mRNA の発現を見いだしている。したがって末梢臓器でも産生されている可能性は高い。GALP 産生細胞の正確な分布・局在を観察するために平成 19 から 20 年度の科研費萌芽研究で「Cre-loxP システムで GALP 産生細胞特異的に緑色蛍光タンパク質を過剰発現する遺伝子改変動物」(代表者：塩田、分担研究：影山)を完成させている。この遺伝子改変マウスは Cre-loxP システムによりコンディショナルに緑色蛍光タンパク質を発現する特徴をもっている。このマウスを用いることで、GALP 産生細胞を正確に同定することができ、さらに GALP ニューロンがどのようなホルモンや摂食調節ペプチドによって調節を受けているのかが明らかになれば、GALP による新しい視床下部-末梢臓器間のクロストークが解明できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、GALP 発現細胞特異的に緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変マウスを用い、緑色蛍光タンパク質の蛍光を指標にした末梢臓器における GALP 発現細胞の分布・局在の同定、および自律神経系の神経活動に対する GALP の効果を解明し、GALP の脳-末梢臓器間相互作用を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各臓器における GALP mRNA の発現

10 週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウスの大脳、小脳、視床下部、消化管などの腹部臓器、精巣、骨格筋、白色および褐色脂肪組織から全 RNA を TRIzol 試薬で調製した。全 RNA から d(N)₆ ランダムプライマーと逆転写酵素

(SuperScript III) を用いて cDNA を合成した。TaqMan RT-PCR 法 (ABI7900HT) を用いて、GALP mRNA の発現のパターンを調べた。GALP mRNA のプライマー配列とプローブは 5'-GCTGGACCCTCAATAGTGCT-3'、5'-GTCGGCCTTGGAGGAAAC-3' および 5'-FAM-CCTCCTGG-Dark quencher-3' である。

(2) ウェスタンブロッティング法による Cre タンパク質と緑色蛍光タンパク質の検出

タモキシフェン誘導型 Cre-loxP システムによって GALP 産生細胞特異的に緑色蛍光タンパク質 (Venus) を発現する雄性あるいは雌性 GALP-CreER-Venus トランスジェニックマウスに 3 mg タモキシフェンを 1 週間腹腔内に連続投与した。ネンブータル麻酔後、視床下部、精巣上部周囲白色脂肪組織あるいは子宮周囲白色脂肪組織を摘出し、各組織をホモジナイズした。脂肪組織 30 μg、視床下部 50 μg のホモジネートを Ready J gel (16.4% gel, Bio-Rad) にて電気泳動した。セミドライ法にてメンブレンに転写後、ウサギ抗 GFP 抗体 (2000 倍希釈、Invitrogen Corp) あるいはウサギ抗 Cre 抗体 (10000 倍希釈、Novagen) と反応した。二次抗体としてウサギ抗 IgG 抗体 (3000 倍希釈、GE) と反応させた後、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) で発色させ、X 線フィルムに感光した。

(3) GALP 産生細胞特異的に緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変動物を用いた GALP 産生細胞の局在

(2) の方法と同様に GALP-CreER-Venus トランスジェニックマウスを用い、褐色と白色脂肪組織における変異緑色蛍光タンパク質の検出を試みた。コーン油に溶解した 3 mg タモキシフェンを 1 週間腹腔内に連続投与した後、4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液で灌流固定した。それぞれの脂肪組織から凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(4) GALP が自律神経に与える影響

麻酔下で雄性 Wistar ラットの右下大静脈にカテーテルを留置し、GALP を静脈内投与した。交感神経副腎枝、交感神経腎臓枝、迷走神経腹腔枝、迷走神経胃枝および迷走神経肝臓枝を分離し、中枢側より遠心性神経活動を、末梢側より迷走神経の求心性神経活動を記録した。さらに迷走神経胃枝および腹腔枝切断したときの交感神経副腎枝の遠心性神経活動も記録した。

4. 研究成果

(1) 各臓器における GALP mRNA の発現

大脳、小脳、視床下部、消化管などの腹部臓器、精巣、骨格筋、白色および褐色脂肪組織から全 RNA を調製し、TaqMan PCR 法を用いて、GALP mRNA の発現を精確に調べた結果、各組織間で発現量に違いが認められた。しかし膵臓での GALP mRNA の発現は検出できなかった (図 1)。

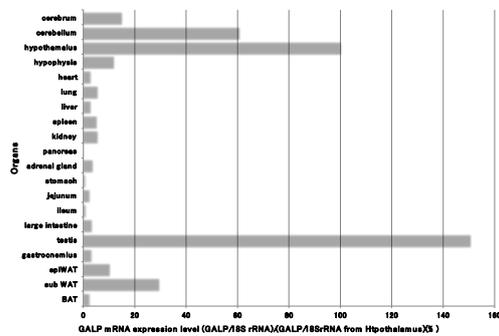


図1 Real-Time PCR法によるC57BLマウスの各臓器におけるGALP mRNAの発現

(2) ウェスタンブロッティング法による Cre タンパク質と緑色蛍光タンパク質の検出

ウェスタンブロッティング法でも、GFP および Cre の発現を検出した。しかし GALP 特異的抗体がないために、GALP ペプチドそのものは検出できなかった。

(3) GALP 産生細胞特異的に緑色蛍光タンパク質を発現する遺伝子改変動物を用いた GALP 産生細胞の局在

メタボリックシンドロームに関与する白色脂肪組織、エネルギー代謝に関与する褐色脂肪組織のそれぞれの脂肪細胞で緑色蛍光タンパク質の発現を観察した。緑色蛍光タンパク質は脂肪組織に含まれる結合組織ではなく、脂肪脂肪に局在していた。

(4) GALP が自律神経に与える影響

GALP の静脈内投与により、遠心性の交感神経腎臓枝と交感神経副腎枝の神経活動が促進した (図 2)。一方、GALP は迷走神経

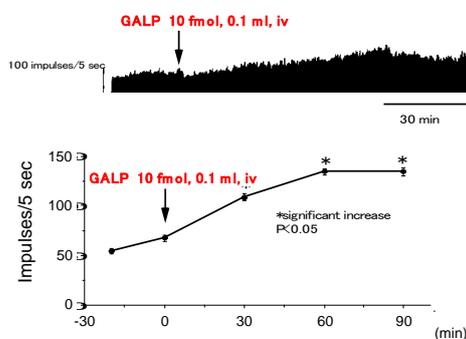


図2 GALP投与による遠心性交感神経副腎枝に対する効果
腎臓枝の遠心性神経活動を抑制した。両側

の迷走神経胃枝かつ腹腔枝の除神経は GALP による交感神経副腎枝の遠心性神経活動に影響を及ぼさなかった (図 3)。GALP

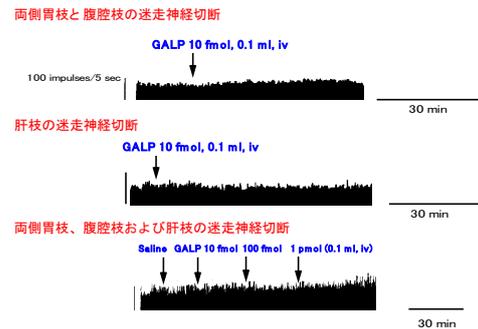


図3 迷走神経遮断によるGALPの遠心性交感神経副腎枝への作用

は迷走神経胃枝と迷走神経肝臓枝の求心性神経活動を抑制したが、迷走神経腹腔枝の神経活動には影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、末梢血中の GALP は各臓器から分泌されたものである可能性が考えられる。また末梢血中の GALP は求心性の迷走神経を介して中枢神経系へ情報を送り、視床下部機能を修飾したのち、自律神経の出力調節に関与していることが示唆された。GALP は中枢神経系においてニューロンネットワークを形成して摂食やエネルギー代謝調節に関与しているが、今回の結果より末梢臓器と中枢神経系との間にも自律神経を介したネットワークが存在している可能性を示した。

本研究によって、GALP の産生場所が視床下部弓状核だけではなく、いろいろな臓器では産生している可能性を示したことは、国内外で初めての発見である。また GALP の生理作用を明らかにする上で、産生部位の特定は重要な結果である。今後、どの臓器が主要なのかをペプチドレベルでの GALP 含有量の解析が必要となる。そのためには GALP に特異的な抗体の作製が急務であると考えられる。

GALP の中枢神経系と末梢臓器、特に脂肪組織間相互作用のさらなる解明によって、メタボリックシンドロームの根底にある肥満の成因である摂食障害やエネルギー代謝異常の病因究明の手がかり、あるいは新しい視点に立った画期的な肥満の予防や治療法開発へのターゲットとなりうる可能性が高いので、今後 GALP の創薬としての展開に期待する。

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 16 件)

1. Shioda S, Kageyama H, Takenoya F, Shiba K. Galanin-like peptide: a key player in the homeostatic regulation of feeding and energy metabolism? *Int J Obes (Lond)* 35: 619-628, 2011. (総説) 査読有
 2. Toshinai K, Yamaguchi H, Kageyama H, Matsuo T, Koshinaka K, Sasaki K, Shioda S, Minamino N, Nakazato M. Neuroendocrine regulatory peptide-2 regulates feeding behavior via the orexin system in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E394-401, 2010. 査読有
 3. Takenoya F, Yagi M, Kageyama H, Shiba K, Endo K, Nonaka N, Date Y, Nakazato M, Shioda S. Distribution of neuropeptide W in the rat brain. *Neuropeptides* 44: 99-106, 2010. 査読有
 4. Shiba K, Kageyama H, Takenoya F, Shioda S. Galanin-like peptide and the regulation of feeding behavior and energy metabolism. *FEBS J* 277: 5006-5013, 2010. (総説) 査読有
 5. 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* 114: 1097-1106, 2010. 査読有
 6. 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* 163: 43-48, 2010. 査読有
 7. Kageyama H, Takenoya F, Shiba K, Shioda S. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* 44: 133-138, 2010. (総説) 査読有
 8. Kageyama H, Takenoya F, Shiba K, Shioda S. Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* 44: 133-138, 2010. 査読有
 9. Date Y, Mondal MS, Kageyama H, Ghamari-Langroudi M, Takenoya F, Yamaguchi H, Shimomura Y, Mori M, Murakami N, Shioda S, Cone RD, Nakazato M. Neuropeptide W: an anorectic peptide regulated by leptin and metabolic state. *Endocrinology* 151: 2200-2210, 2010. 査読有
 10. Shiuchi T, Haque MS, Okamoto S, Inoue T, Kageyama H, Lee S, Toda C, Suzuki A, Bachman ES, Kim YB, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S, Imoto K, Minokoshi Y. Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab* 10: 466-480, 2009. 査読有
 11. Kintaka Y, Osaka T, Suzuki Y, Hashiguchi T, Nijima A, Kageyama H, Fumiko T, Shioda S, Inoue S. Effects of gastric vagotomy on visceral cell proliferation induced by ventromedial hypothalamic lesions: role of vagal hyperactivity. *J Mol Neurosci* 38: 243-249, 2009. 査読有
 12. Hongo S, Watanabe T, Arita S, Kanome T, Kageyama H, Shioda S, Miyazaki A. Leptin modulates ACAT1 expression and cholesterol efflux from human macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E474-482, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 24 件)
1. 影山晴秋: 遺伝子工学的手法を用いた GALPニューロンの求心路の同定. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会 (甲府, 2012. 3. 27)
 2. 影山晴秋: 肥満動物モデルへの GALP の点鼻投与による摂食調節と抗肥満効果. 第26回日本糖尿病・肥満動物学会 (名古屋, 2012. 2. 17) (シンポジスト)
 3. Kageyama H: Anti-obese effect of intranasal infusion of GALP in obese mice. Satellite Symposium of the 20th Annual Meeting of The Israel Society for Neuroscience~Basic and Clinical Research of GPCRs~ (Eilat, Israel, 2011. 12. 13) (シンポジスト)
 4. Kageyama H: Galanin-like peptide (GALP) facilitates energy metabolism via the astrocytes in the brain. Satellite Symposium of the 20th Annual Meeting of The Israel Society for Neuroscience~Basic and Clinical Research of GPCRs~ (Eilat, Israel, 2011. 12. 13)
 5. Kageyama H: The anti-obese effects by intranasal administration of GALP in mice. 41st Annual meeting Society for Neuroscience. (Washington DC, USA, 2011. 11. 12)
 6. 影山晴秋: ガラン様ペプチドの点鼻投与による肥満症軽減の基盤研究. 第32回日本肥満学会 (淡路, 2011. 9. 23)
 7. 影山晴秋: 肥満マウスにおけるガラニン様ペプチド (GALP) 点鼻投与による抗肥満効果. 第32回日本肥満学会 (淡路, 2011. 9. 23)
 8. 影山晴秋: 神経ペプチドW (NPW) の視床下部-下垂体-副腎系を介した摂食抑制機構について. 第66回日本体力医学会大会 (下関, 2011. 9. 16)
 9. 影山晴秋: 摂食調節ペプチド GALP による肥満克服の新戦略. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 (横浜, 2011. 3. 29) (シンポジスト、震災のため誌上発表)
 10. 影山晴秋: 摂食調節ペプチド GALP の摂

食調節とエネルギー代謝調節機構. 第 31 回日本肥満学会 (前橋, 2010. 10. 1) (シンポジスト)

11. Kageyama H: Morphological analysis of galanin-like peptide (GALP)-producing cells using a line of transgenic mice that expresses fluorescent protein under the control of mouse transcription regulatory regions of GALP. XI International Congress of Obesity (ICO2010) (Stockholm, Sweden, 2010. 7. 12)
12. Kageyama H: Feeding regulation by GALP. Official satellite symposium of the 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) (GPCR2010) (Kyoto, 2010. 3. 31) (シンポジスト)
13. 影山晴秋: 末梢臓器におけるガラニン様ペプチド (GALP) の分布局在. 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (盛岡, 2010. 3. 28)
14. Kageyama H: Morphological analysis of galanin-like peptide (GALP)-producing cells using transgenic mice that express fluorescent protein driven by the transcription regulatory regions of mouse GALP. Yakushima 2009 (Satellite Symposium of the 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides) Phylogenetic Aspects of Neuropeptides - from Invertebrates to Humans (Yakushima, Kagoshima, 2009. 10. 2)
15. Kageyama H.: Effects of galanin-like peptide (GALP) on the autonomic nervous system in the rat. A joint international Meeting. The 5th International Symposium PEPTIDE RECEPTORS & KININ2009, The Inaugural Meeting of the Canadian Branch of the international Neuropeptide Society (Québec City, Québec, Canada, 2009. 6. 28)

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 晴秋 (KAGEYAMA HARUAKI)
昭和大学・医学部・助教
研究者番号 : 00433839

(2) 研究分担者

塩田 清二 (SHIODA SEIJI)
昭和大学・医学部・教授
研究者番号 : 80102375

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :