

## 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 6月11日現在

機関番号：84404  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591189  
 研究課題名（和文）摂食調節・生活習慣病関連新規ペプチドの同定およびその機能解析  
 研究課題名（英文）Identification and functional analysis of novel bioactive peptides associated with feeding regulation and lifestyle-related disease  
 研究代表者  
 宮里 幹也（MIYAZATO MIKIYA）  
 独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・部長  
 研究者番号：50291183

研究成果の概要（和文）：摂食調節および生活習慣病に関連する新規生理活性ペプチドの探索を目的として、生活習慣病に関わる組織で発現しているオーファン受容体に対する内因性リガンド探索や新たに開発したスクリーニング法を用いて探索を進めた結果、数種類の新規活性因子候補を見出した。また、グレリンの交感神経抑制活性に基づく急性心筋梗塞モデルマウスの予後改善や、ニューロメジンSの中枢性循環制御について遺伝子改変マウスを用いて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To search for novel bioactive peptides associated with feeding regulation and lifestyle-related diseases, we used the orphan receptor strategy and newly established methods to find some candidates as novel bioactive substances. By using gene deficient mice of ghrelin or neuromedin S (NMS), we demonstrated that endogenous ghrelin suppresses sympathetic nerve activity and improves the prognosis after acute myocardial infarction, and that endogenous NMS may regulate cardiovascular function by activating the sympathetic nervous system.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ペプチド、摂食調節、生活習慣病、オーファン受容体

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

肥満は、高血圧・脂質異常症・心血管障害・糖尿病などの生活習慣病を頻発させ、その治療と予防は医学的・社会的に大きな課題である。摂食・エネルギー代謝調節の分子レベルでの病態の解明は、近年急速に進んでいる分野であり、肥満のみならずそれに起因する生活習慣病の病態解明および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る。

当研究室においては、これまでの系統的な生理活性ペプチドの探索およびリガンドの未知なオーファン受容体の発現細胞系を用いたアッセイ系によるリガンドスクリーニングにより、グレリンの発見やニューロメジン U (NMU) およびニューロメジン S (NMS) の同定に成功した。さらに、これらのペプチドの機能解析により、グレリンは成長ホルモン分泌促進のみならず、摂食・エネルギー代謝調節、循環調節など多彩な作用を有することが明らかになり、NMU はノックアウトマウスの解析により、その欠損が肥満、耐糖能異常、高脂血症など生活習慣病のモデルとなることを示した。2005年に単離したNMSも、サーカディアンリズム調節への関与に加え摂食抑制ホルモンとして機能している可能性を呈示し、さらに下垂体後葉ホルモンの分泌調節に関与していることを示した。以上のように、新規生理活性ペプチドの同定により、新しい生体内情報伝達系やその調節・制御機構が解明され、さらにその生理機能、各種病態における病態生理学的意義、新しい治療法の開発へと研究が展開してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らのこれまでの実績と経験を背景として、摂食調節や生活習慣

病に関わる新規生理活性ペプチドの探索・同定とその機能解析、既に生理作用の解析を進めているグレリン、ニューロメジン類について、肥満や循環器疾患などの生活習慣病との関連を中心にさらに機能解析を進展させることを目的とする。本研究の遂行により、摂食調節やエネルギー代謝調節機構の再構築ならびにそれらを基盤とした生活習慣病との関連性の解明へ貢献することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 摂食調節および生活習慣病に関連する新規生理活性ペプチドの同定

##### ① 摂食調節・生活習慣病に関連するオーファン受容体発現系を用いた新規ペプチドの同定

摂食調節・生活習慣病に関わる脳視床下部、脂肪組織、心血管系に発現するリガンドが不明なオーファン GPCR を選別し、全長 cDNA をクローニングした後、哺乳動物細胞へ導入し、オーファン受容体安定発現細胞株を得る。樹立したオーファン受容体安定発現細胞株に、ラットおよびブタ組織抽出物を添加し、細胞内シグナル変化を指標として、オーファン受容体の内因性リガンドの探索を行う。指標とする細胞内シグナルは、細胞内カルシウム上昇を FLIPR System (Molecular Devices 社) で、細胞内 cAMP 変動を  $\alpha$ -Screen 技法を用いて EnVision (Perkin Elmer 社) で測定する。

また、リガンド探索で重要なことは、鋭敏かつ高感度で再現性の高い活性検出法の確立であり、上記の細胞内カルシウム上昇、細胞内 cAMP 変動を指標とした活性検出系に加え、新たな活性検出法を確立する。

##### ② オーファン受容体発現系以外の新たなアッセイ系の確立

メタボリックシンドロームの発症基盤と

して重要な、脂肪細胞機能を制御する新規ペプチドの同定を目的として、脂肪細胞の有用な培養細胞系であるマウス胎仔由来線維芽細胞 (3T3-L1 細胞) を用い、各成熟脂肪段階に分化させた 3T3-L1 細胞に、ペプチド抽出サンプルを作用させ、細胞内カルシウム上昇や細胞内 cAMP 変動を指標として、脂肪細胞の増殖・分化に機能する生理活性ペプチドの探索を行う。また、より生体内に近い状態における脂肪細胞を用いたスクリーニングのため、ラット脂肪組織の初代培養細胞 (前駆脂肪細胞を含む stromal-vascular fraction (SVF) 細胞および脂肪滴を有する成熟脂肪細胞) に分化誘導を行い、成熟段階の異なる脂肪細胞に対して機能する新規因子のスクリーニングを行う。

また、培養肝細胞系 (HepG2 細胞) を用いて、インスリンの下流シグナルとして重要な Akt のリン酸化を高感度に検出するアッセイ系を構築し、肝臓におけるインスリン感受性を制御する新規生理活性ペプチドの探索を行う。

#### (2) 新たに同定した生理活性ペプチドの機能解析

ラット脳および小腸より新たに同定した新規ペプチドに関して、化学合成したペプチドを家兎に免疫して特異的抗体を作製し、高感度ラジオイムノアッセイ系を確立する。この定量系を用いて、ペプチドの脳内分布を明らかにする。また、ラットへの投与による内分泌学的解析、摂食・エネルギー代謝調節、行動量や行動リズムに関する解析を行う。

#### (3) グレリン、ニューロメジン類の生活習慣病における新たな機能の解明

内因性グレリンの急性心筋梗塞モデルにおける病態生理的意義を解明するため、グレリン欠損マウスに心筋梗塞モデルを作製し評価する。

ニューロメジン S (NMS) について、高感度ラジオイムノアッセイ系 (RIA) を確立し脳内分布を検討する。また、マウス脳室内投与による循環調節への影響や、NMS 欠損マウスにおける評価を行い内因性 NMS の循環調節系への関与を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 摂食調節および生活習慣病に関連する新規生理活性ペプチドの同定

##### ① 摂食調節・生活習慣病に関連するオーファン受容体発現系を用いた新規ペプチドの同定

摂食調節・生活習慣病に関連する新規ペプチドの同定を目的として、脳視床下部、脂肪組織、心血管系に発現するオーファン G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のクローニングを行い、哺乳動物培養細胞に導入し 22 種類のオーファン GPCR 安定発現細胞株を確立した。ラットおよびブタの組織抽出物 (ラットの脳、小脳、心房、心室、胃、小腸、腎臓、肝臓、骨格筋、内臓脂肪および精巣、ブタの視床下部、脳幹、嗅球、脊髄、下垂体、肝臓および胎盤) をオーファン GPCR 発現細胞に添加し、細胞内シグナル変化を指標 (細胞内カルシウム濃度上昇や cAMP 濃度変化) としてリガンドスクリーニングを行った結果、ブタ視床下部において摂食・エネルギー代謝に関与すると想定される 1 つのオーファン GPCR に対する細胞内カルシウム濃度上昇活性を検出した。本アゴニスト活性を示す物質は、ゲル濾過上低分子分画に存在し、精製を進めた結果、非ペプチド性因子である可能性が高いが、に高い比活性を持つ因子であり、現在、その構造解析を進めている。

また、従来 of 細胞内カルシウム濃度上昇や cAMP 濃度変化を指標にする検出系に加え、リガンドが細胞に作用した際に生ずる細胞の

微小形態変化に伴うインピーダンス変化を指標としてスクリーニングを行う系を確立した。本活性検出系は GPCR の活性化を共役する G タンパク質サブタイプの種類を問わず検出することが可能であり、また、共役している G タンパク質サブタイプにより異なったインピーダンス変化を示すことから、このアッセイ系を用いることにより、GPCR に共役する G タンパク質サブタイプを推測することもできる。本検出系によりスクリーニングを行った結果、アゴニスト活性を有する 3 種類のペプチドをラット組織より単離・精製した。構造解析の結果、これらは既知タンパク質の断片ペプチドが低比活性でアゴニスト活性を有しているものであることが判明した。本スクリーニング系は、従来の活性検出系より高感度で活性を検出でき、オーファン GPCR の内因性リガンド探索において非常に有効であり、今後の成果が期待される。

## ② オーファン受容体発現系以外の新たなアッセイ系の確立

オーファン受容体以外のアッセイ系として、メタボリックシンドロームの発症基盤として重要な脂肪細胞機能を制御する新規因子のスクリーニング法を、3T3-L1 細胞およびラット脂肪組織の初代培養細胞を用いて確立し、探索を行った結果、生体組織抽出物より NPY,  $\alpha$ -MSH, PYY, GIP, PACAP38 および adrenomedullin を単離・同定した。NPY, PYY および  $\alpha$ -MSH は中枢性の摂食調節因子として、また、GIP と PACAP は膵  $\beta$  細胞からのインスリン分泌を促進する因子として生体のエネルギー代謝調節に関与することが報告されている。脂肪細胞を標的とする探索によりこれらの生理活性ペプチドを同定した結果から、生体内において、脳、腸、膵臓及び脂肪組織を軸とした、生理活性ペプチドを介したエネルギー代謝調節システムの存在が

示唆された。

メタボリックシンドロームの発症基盤として重要なインスリンシグナルを制御する因子の探索法として、Akt のリン酸化をハイスループットでスクリーニングする方法を確立し、探索を開始した。脂肪組織より高い Akt リン酸化活性を有する因子の検出に成功した。

## (2) 新たに同定した生理活性ペプチドの機能解析

ラット脳および小腸より最近単離した 33 ないし 36 アミノ酸残基から構成される新規ペプチドに関して、特異的 RIA を確立し脳内分布を検討した結果、ペプチドは橋・延髄に高濃度で、中脳や視床下部にはそれより低い濃度で存在することが明らかとなった。機能解析を進めた結果、ラットの脳室内投与により下垂体からのプロラクチン分泌を強力に促進する作用を有すること、また、脳室内投与により摂食量、体温、エネルギー消費、行動量、行動リズムに影響を与えることが判明した。このペプチドに関しては、現在その欠損マウスの作製し、解析を開始している。

## (3) グレリン、ニューロメジン類の生活習慣病における新たな機能の解明

### ① グレリンの機能解析

内因性グレリンの急性心筋梗塞モデルにおける病態生理的意義を解明するため、グレリン欠損マウスに心筋梗塞モデルを作製し評価した結果、グレリン欠損マウスにおける死亡率や急性期の不整脈が野生型に比し有意に増加していた。グレリンの心筋梗塞急性期における致死性不整脈死抑制効果は、交感神経活性抑制及び副交感神経活性亢進によるものと推察され、グレリンの新たな機序の急性心筋梗塞治療薬としての可能性が示唆された。

### ② ニューロメジン S の機能解析

ニューロメジン S (NMS) について、高感度ラジオイムノアッセイ系を確立し脳内分布を検討した結果、遺伝子発現を認める視床下部に加えて、脳幹部でも高いペプチド含量を認め、視床下部からの神経線維の投射が示唆された。また、マウスへの NMS の脳室内投与によって心拍数の増加が生じ、この心拍数増加は交感神経遮断薬前投与により抑制されること、NMS 欠損マウスは野生型と比較して心拍数が有意に減少していることより、NMS は交感神経を介して中枢性に循環調節に寄与していると考えられた。

#### 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 21 件)

- 1) Mao Y, Tokudome T, Otani K, Kishimoto I, Nakanishi M, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin Prevents Incidence of Malignant Arrhythmia after Acute Myocardial Infarction through Vagal Afferent Nerves. *Endocrinology*, in press. 査読有  
DOI : 10.1210/en.2012-1065
- 2) Hino J, Miyazawa T, Miyazato M, Kangawa K. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) is expressed in adipocytes and inhibits adipogenesis as a unique complex. *Int J Obes*, 36: 725-734, 2012. 査読有  
DOI: 10.1038/ijo.2011.124
- 3) Kishimoto I, Tokudome T, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin and cardiovascular diseases. *J Cardiol*, 59: 8-13, 2012. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jjcc.2011.11.002
- 4) Matsumoto Y, Otsuka F, Hino J, Miyoshi T, Takano M, Miyazato M, Makino H, Kangawa K. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by counteracting Smad1/5/8 signaling. *Mol Cell Endocrinol*, 350: 78-86, 2012. 査読有  
DOI: 10.1016/j.mce.2011.11.023
- 5) Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Kume K, Yoshizawa-Kumagai K, Nishio H, Kato J, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Kojima M. Identification of the endogenous cysteine-rich peptide trissin, ligand for an orphan G-protein-coupled receptor in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*, 414: 44-48, 2011. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.018
- 6) Yamamoto I, Nakao N, Kaiya H, Miyazato M, Tsushima N, Arai T, Tanaka M. Two chicken neuromedin U receptors: Characterization of primary structure, biological activity and tissue distribution. *Gen Comp Endocrinol*, 174: 116-123, 2011. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ygcen.2011.08.004
- 7) Kaiya H, Koizumi Y, Konno N, Yamamoto K, Uchiyama M, Kangawa K, Miyazato M. Ghrelin receptor in two species of anuran amphibian, bullfrog (*Rana catesbeiana*) and Japanese tree frog (*Hyla japonica*). *Front Exp Endocrinol*, 2: 1-13, 2011. 査読有  
DOI: 10.3389/fendo.2011.00031
- 8) Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Maeda T, Shiotani H, Terajima S, Sano H, Mori K, Yoshida M, Miyazato M, Kato J, Murakami N, Kangawa K, Kojima M. Identification of the novel bioactive peptides dRYamide-1 and dRYamide-2, ligands for a neuropeptide Y-like receptor in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*, 410: 872-877, 2011. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.081
- 9) Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K. Recent advances in the phylogenetic study of ghrelin. *Peptides*, 32: 2155-2174, 2011. 査読有  
DOI: 10.1016/j.peptides.2011.04.027
- 10) Okano I, Miyazato M, Kangawa K. A Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP) reporter system based on the G-Kinase/CREB/CRE signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 407: 236-241, 2011. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.03.009
- 11) Sakamoto T, Nakahara K, Maruyama K, Katayama T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Neuromedin S regulates cardiovascular function through the sympathetic nervous system in mice. *Peptides*, 32: 1020-1026, 2011. 査読有  
DOI: 10.1016/j.peptides.2011.02.015
- 12) Maruyama K, Kaiya H, Miyazato M, Konno N, Wakasugi T, Uchiyama M, Shioda S,

- Murakami N, Matsuda K. Isolation and characterization of two cDNAs encoding the neuromedin U receptor from goldfish brain. *J Neuroendocrinol*, 23: 282-291, 2011. 査読有  
DOI:10.1111/j.1365-2826.2010.02106.x
- 13) Nakahara K, Katayama T, Maruyama K, Ida T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Comparison of feeding suppression by the anorexigenic hormones neuromedin U and neuromedin S in rats. *J Endocrinol*, 207: 185-193, 2010. 査読有  
DOI: 10.1677/JOE-10-0081
- 14) Nakahara K, Okame R, Katayama T, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Nutritional and environmental factors affecting plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J Endocrinol*, 207: 95-103, 2010. 査読有  
DOI: 10.1677/JOE-10-0062
- 15) Kaiya H, Miura T, Matsuda K, Miyazato M, Kangawa K. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol*, 327: 25-39, 2010. 査読有  
DOI: 10.1016/j.mce.2010.06.004
- 16) Nakashima Y, Ida T, Sato T, Nakamura Y, Takahashi T, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Kusukawa J, Kojima M. Neuromedin U is necessary for normal gastrointestinal motility and is regulated by serotonin. *Ann N Y Acad Sci*, 1200: 104-111, 2010. 査読有  
DOI:10.1111/j.1749-6632.2010.05504.x
- 17) Ida T, Miyazato M, Lin XZ, Kaiya H, Sato T, Nakahara K, Murakami N, Kangawa K, Kojima M. Purification and characterization of caprine ghrelin and its effect on growth hormone release. *J Mol Neurosci*, 42: 99-105, 2010. 査読有  
DOI: 10.1007/s12031-010-9379-0
- 18) Kaiya H, Kodama S, Ishiguro K, Matsuda K, Uchiyama M, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin-like peptide with fatty acid modification and O-glycosylation in the red stingray, *Dasyatis akajei*. *BMC Biochem*, 10: 30, 2009. 査読有  
DOI: 10.1186/1471-2091-10-30
- 19) Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K, Osaki T, Minamino N, Horio T, Sawai K, Kawano Y, Miyazato M, Sata M, Kohno M, Nakao K, Kangawa K. Impaired recovery of blood flow following hind-limb ischemia in mice lacking guanylyl cyclase-A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29: 1516-1521, 2009. 査読有  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.187526
- 20) Kaiya H, Mori T, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 153: 438-450, 2009. 査読有  
DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.04.612
- 21) Kaiya H, Riley L, Janzen W, Hirano T, Grau EG, Miyazato M, Kangawa K. Identification and Genomic Sequence of Ghrelin Receptor (GHS-R)-like Receptor in the Mozambique Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci*, 26: 330-337, 2009. 査読有  
DOI: 10.2108/zsj.26.330

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮里 幹也 (MIYAZATO MIKIYA)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・部長  
研究者番号: 50291183

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

寒川 賢治 (KANGAWA KENJI)  
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・所長  
研究者番号: 00112417

伊達 紫 (DATE YUKARI)  
宮崎大学フロンティア科学実験総合センター・教授  
研究者番号: 70381100