

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390044

研究課題名(和文) ネスファチン オキシトシン系による摂食・代謝・リズム制御と生活習慣病介入基盤

研究課題名(英文) Regulation by nesfatin and oxytocin of feeding, metabolism and circadian rhythm, as a basis for treating life style-related diseases

研究代表者

矢田 俊彦 (YADA, TOSHIHIKO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：60166527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：ラット視床下部室傍核のNesfatin-1発現は明期に上昇する概日リズム変動を示し、これが摂食概日リズムを駆動する。Nesfatin-1リズム障害は摂食リズム障害と過食・肥満の成因となり、Nesfatin-1補充が治療に有効である。室傍核Nesfatin-1ニューロンは、食事誘導性のグルコースとインスリン及び光誘導性神経ペプチドPACAPにより直接活性化され、効果系として室傍核オキシトシンニューロンに情報伝達する。高脂肪食誘発肥満(症)マウスで、オキシトシン末梢投与は過食・肥満・高血糖・脂肪肝を顕著に改善し、求心性迷走神経を介した中枢伝達が関与し、ヒト肥満(症)治療の基盤を提供する。

研究成果の概要(英文)：Nesfatin-1 mRNA expression in the paraventricular nucleus (PVN) of hypothalamus exhibits circadian rhythm with light phase rise, which drives circadian feeding rhythm in rats. Impairment of the nesfatin-1 rhythm causes impairment of feeding rhythm, hyperphagia and obesity. Supplementation of nesfatin-1 in light phase ameliorates these metabolic disorders. The PVN nesfatin-1 neuron is directly activated by meal-evoked factors, glucose and insulin, and by light-induced neuropeptide PACAP, while it signals to the PVN oxytocin neuron as the downstream effector.

Peripheral administration of oxytocin corrects hyperphagia, obesity, hyperglycemia and fatty liver in high fat diet-fed mice with obesity syndrome. These effects are partly mediated by the signal transfer to the brain via vagal afferent nerves. These results provide a basis for the treatment of human obesity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：Nesfatin-1 オキシトシン 視床下部室傍核 摂食 概日リズム 抗肥満 求心性迷走神経 肥満症

1. 研究開始当初の背景

(1) 視床下部室傍核 (PVN) は摂食の統合中枢として重要な役割を担うが、その機能を担うニューロン種は未解明であった。新規満腹ペプチド Nesfatin-1 (Oh-I et al. Nature 2006) は、PVN を含む摂食関連諸核に局在する。研究代表者は食事によって室傍核 (PVN) の Nesfatin-1 が選択的に活性化され (Kohno et al. Endocrinology 2008) 室傍核 Nesfatin-1 がパラクリンにオキシトシンを活性化し、さらに脳幹孤束核 Proopiomelanocortin (POMC) ニューロンに至る神経回路により摂食を抑制することを発見していた (Maejima et al. Cell Metab. 2009)。海外では Nesfatin-1 の血圧調節作用も報告されていた。これらの結果は、Nesfatin-1 が PVN の制御因子として摂食・自律機能の調節に関わっていることを示した。PVN は生体リズムの中核でもあるが、Nesfatin-1 と概日リズムとの関連の研究はなかった。ヒト肥満・過食はリズム障害を伴うことが多いことが最近の研究で明らかにされた。従って、摂食概日リズム形成とその障害の機構の理解は肥満・メタボリックシンドロームの成因の解明に極めて重要である。しかし摂食の概日リズムの機構は大部分未知であった。そこで、本研究は Nesfatin-1 を切り口にその解明を目指す。

(2) 有効で安全な肥満症治療薬はない現状であり待望されている。申請者が摂食抑制作用を確立したオキシトシンの作用として分娩・射乳と信頼感形成にほぼ限局されており、アミノ酸 8 個からなる比較的小さな分子であることから、肥満症治療薬として期待できる。そこで、本研究は、末梢投与オキシトシンの抗肥満症作用を検討し、その作用経路を求心性迷走神経に注目して解析し、臨床応用に向けた基盤を整備する。

(3) 過食、肥満を初め多くの中枢性疾患は十分な治療法が無い現状である。末梢から中枢に介入する方法が期待され、その経路として求心性迷走神経が注目される。そこで、本研究で求心性迷走神経による末梢物質の感受と中枢伝達の機構を、その実験方法の開発と合わせて行う。

2. 研究の目的

(1) Nesfatin-1・オキシトシンの生理的役割の解明：PVN Nesfatin-1 リズムが摂食概日リズムを規定し、Nesfatin-1 リズム障害が摂食リズム障害・過食の成因となるとの仮説を立てて検証する。siRNA 処理により PVN Nesfatin-1 をノックダウンして、摂食、エネルギー消費、体重、組織の変化を解析する。さらに PVN Nesfatin-1 ニューロンの上流制御因子を明らかにする。以上の解析から PVN Nesfatin-1 の生理的役割を明らかにする。

(2) Nesfatin-1・オキシトシンの治療的役割の解明：肥満動物へのオキシトシン末梢投与が摂食低下またはエネルギー消費亢進を起し、抗肥満効果を示すか、さらに抗メタボリック

シンドローム効果を示すかを明らかにする。これらの作用が求心性迷走神経活性化を介した脳へのシグナル伝達を介するかを明らかにする。オキシトシンによる生活習慣病介入の基盤を整備する。

(3) 末梢情報の求心性迷走神経を介した中枢伝達機構の解析：求心性迷走神経の末梢入力感受機構、神経伝達、中枢出力の解析方法を開発する。これにより、求心性迷走神経を経由した中枢介入の治療応用の基盤を作る。

3. 研究の方法

(1) 正常および過食・肥満 (症) モデル動物において視床下部 PVN Nesfatin-1, オキシトシンの遺伝子発現を RT-PCR で測定し、その概日リズムを解析する。

(2) 摂食、エネルギー代謝 (酸素消費量、呼吸商) 血糖値、脂肪量などを個体レベルで計測する。脂肪、肝臓を組織学的に観察する。

(3) AAV を用いて PVN 特異的に Nesfatin-1 shRNA を処理したマウスにおいて、摂食、エネルギー消費、体重、脂肪・肝臓組織の変化を解析する。

(4) PVN からニューロンを単離し細胞内 Ca^{2+} 画像濃度を測定し、食事および光誘導因子を添加してその効果を計測し、その後免疫染色により Nesfatin-1 ニューロンを同定して、Nesfatin-1 ニューロンの上流制御因子を明らかにする。

(5) 肥満 (症) モデル動物にオキシトシンを末梢連続投与し、病態改善効果を検討する。

(6) 求心性迷走神経ニューロンを単離し細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定し、オキシトシン・インスリン・膵ペプチド (PP)・PYY などの満腹物質を添加してその効果を計測し、その後の免疫染色により応答ニューロンの神経伝達物質を同定する。

4. 研究成果

(1) 正常ラットにおいて、明期に視床下部 PVN Nesfatin-1 mRNA 発現は上昇し摂食は低下し、暗期には PVN Nesfatin-1 mRNA 発現は低下し摂食は上昇し、Nesfatin-1 発現概日リズムと摂食概日リズムは逆位相で関連した (図 1)。肥満を呈する Zucker fatty (ZF) ラットにおいて、正常 Zucker Lean (ZL) ラットと比較して、明期の PVN Nesfatin-1 上昇が障害され、明期の摂食量が増加し、さらに 24 時間摂食量も増加していた (図 2)。Nesfatin-1 上昇が障害されている明期に Nesfatin-1 を脳室内投与すると摂食リズム障害と過食が改善した (図 3) (論文発表：Sedbazar et al. BBRC 434; 434-438, 2013)。以上の結果より、PVN Nesfatin-1 発現が概日リズム変動を示し、これが摂食概日リズムを制御していることが明らかになった。さらに、その障害が過食・肥満の成因となること、その補充が治療に有効であることが明らかになった。

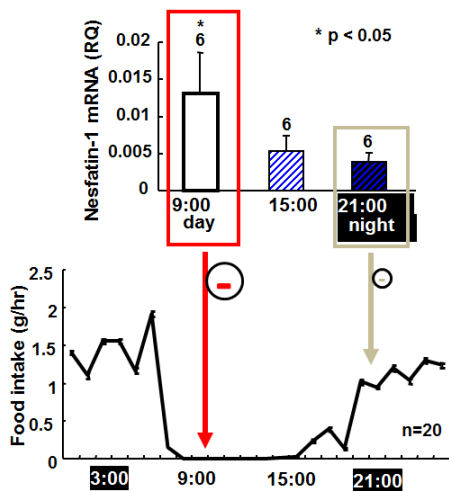


図1.正常ラットのPVN Nesfatin-1発現と摂食の日内リズム
 明期にNesfatin-1の発現増加があり、摂食量が減少する。一方暗期にはNesfatin-1発現の低下があり、摂食量が亢進する

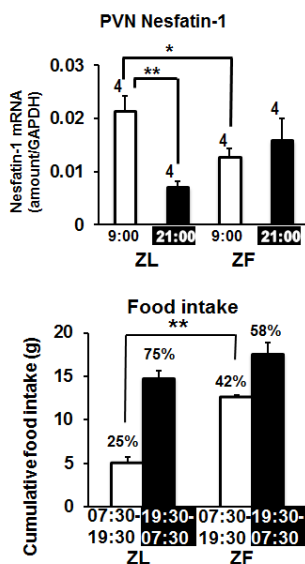


図2. 肥満Zucker Fatty (ZF)ラットのPVN Nesfatin-1発現(上)と摂食の日内リズム(下)

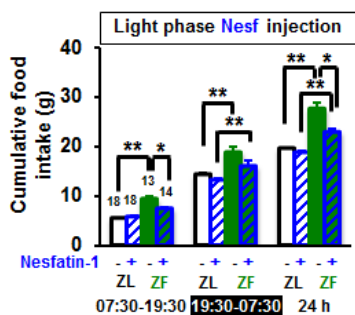


図3. 肥満ZFラットへ明期にNesfatin-1を脳室内投与すると過食の改善がみられる

(2) AAV ウイルスベクターで Nesfatin-1 shRNA を正常ラット PVN に局所投与して Nesfatin-1 mRNA 発現を低下させると摂食が亢進し、体重増加、内臓脂肪蓄積を示した。この結果から、PVN Nesfatin-1 は生理的摂

食・体重調節因子であることが明らかになった。

(3) PVN の Nesfatin-1 とオキシトシンの発現概日リズムが同調しており、Nesfatin-1 mRNA 発現抑制によりオキシトシン発現リズムが消失することから、Nesfatin-1 の下流効果系としてオキシトシンの重要な役割が明らかになった。

(4) グルコースとインスリン(図4)(論文発表: Gantulga et al. BBRC 420; 811-815,2012)、PACAP(図5)(論文発表: Maejima et al. Neurosci Lett 551;39-42,2013)が単離 PVN Nesfatin-1 ニューロンの細胞内 Ca^{2+} を増加させたことから、PVN Nesfatin-1 ニューロン上流調節因子として食事誘導因子のグルコースとインスリンおよび光誘導神経因子の PACAP を明らかにした。

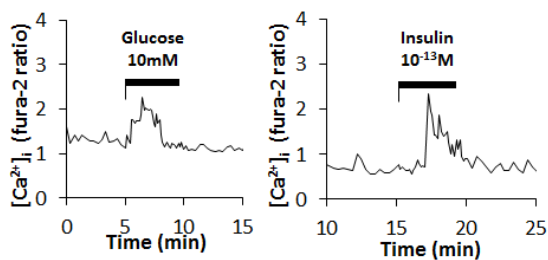


図4. グルコース(左)、インスリン(右)によるPVN Nesfatin-1ニューロンの活性化

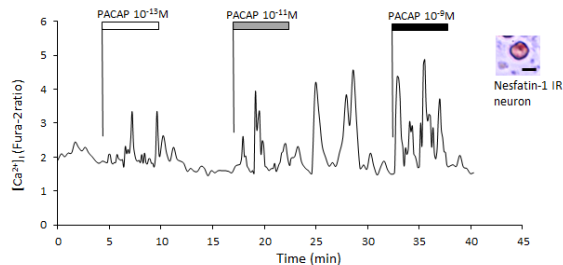


図5. PACAPによるPVN Nesfatin-1ニューロンの活性化

(5) 末梢投与オキシトシンの中枢伝達と抗肥満効果: 高脂肪食負荷による肥満マウスに、浸透圧ポンプを用いてオキシトシン皮下長期投与すると、摂食抑制、エネルギー消費亢進、内臓脂肪蓄積・脂肪肝・高血糖が改善し、抗メタボリックシンドローム効果を発揮し(図6)、延髄とPVNが活性化された(図7)(論文発表: Maejima et al. Aging 3;1-9, 2012-)。オキシトシンは単離した求心性迷走神経ニューロンに活動電位を誘導し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させて活性化した。以上の結果より、末梢投与オキシトシンは求心性迷走神経を經由して脳に情報伝達し過食・肥満(症)改善効果を発揮することが明らかになった。

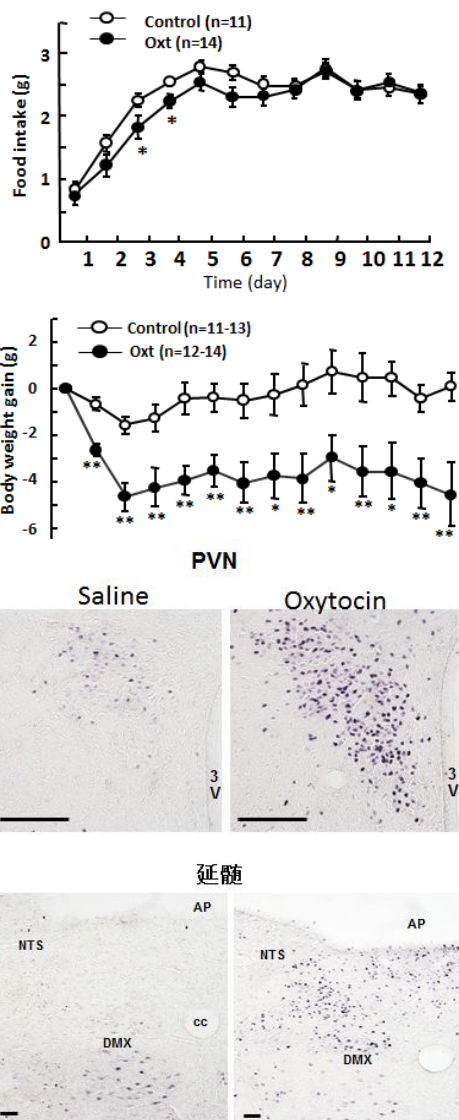


図7. オキシトシン末梢投与によるPVN(上)および延髄(下)の活性化(c-Fos発現)

(6) インスリン、PP, PYY は単離求心性迷走神経ニューロンを活性化した(論文発表: Iwasaki et al. *Neuropeptides* 47; 19-23, 2013, Iwasaki et al. *PLOS ONE* 8(6)e67198, 2013)。インスリンの細胞内シグナル伝達は、インスリン受容体-IRS2-脱分極-L/N型 Ca^{2+} チャネルを介しており、応答した細胞は神経伝達物質CARTを発現していた。さらに膵内に突起を持つ求心性迷走神経が膵内の比較的高濃度のインスリンを受容することが解かり、臓器局所のホルモン動態を感受して脳に伝える求心性迷走神経の新たな役割が示唆された。さらに IRS2 欠損マウスでは求心性迷走神経のインスリン受容が障害され、過食・肥満を呈することから、求心性迷走神経によるインスリン受容の抗過食・抗肥満作用が示唆された。

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 13件)

Mori M, Yamada M, Okada S, Hashimoto K, Satoh T, Shimizu H, Yada T.: Discovery of nesfatin-1 and overview of biological actions and new developments. *Curr Pharm Des* 19(39)6921-6928, 2013. 査読有

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537081>

Maejima Y, Shimomura K, Sakuma K, Yang Y, Arai T, Mori M, Yada T.: Paraventricular nucleus nesfatin-1 neurons are regulated by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Neuroscience Letters* 551:39-42, 2013. 査読有

doi: 10.1016/j.neulet.2013.07.006.

Sedbazar U, Maejima Y, Nakata M, Mori M, Yada T.: Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 rises in synchrony with feeding suppression during early light phase in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 434(3):434-438, 2013. 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.090.

Nakata M, Yada T.: Role of NUCB2/Nesfatin-1 In glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain. *Curr Pharm Des* 19(39)6960-6965, 2013. 査読有

<http://www.eurekaselect.com/118391/article>

Yang Y, Shimomura K, Sakuma K, Maejima Y, Iwasaki Y, Galvanovskis J, Dezaki K, Nakata M, Yada T.: Bupropion can close KATP channel and induce insulin secretion. *J Pediatr Endocrinol Metab* 26(3-4): 343-346, 2013. 査読有

doi: 10.1515/jpem-2012-0295.

Aoki H, Nakata M, Dezaki K, Lu M, Gantulga D, Yamamoto K, Shimada K, Kario K, Yada T.: Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. *Endocr J* 60(5): 571-581, 2013. 査読有

doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0371.

Iwasaki Y, Kakei M, Nakabayashi H, Ayush EA, Hirano-Kodaira M, Maejima Y, Yada T.: Pancreatic polypeptide and peptide YY3-36 induce Ca^{2+} signaling in nodose ganglion neurons. *Neuropeptides* 47(1): 19-23, 2013. 査読有

doi: 10.1016/j.npep.2012.07.006.

Damdindorj B, Dezaki K, Kurashina T, Sone H, Rita R, Kakei M, Yada T.: Exogenous and endogenous ghrelin counteracts GLP-1 action to stimulate cAMP signaling and insulin secretion in islet β -cells. *FEBS Lett* 586(16): 2555-2562, 2012. 査読有

doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.034.

Gantulga D, Maejima Y, Nakata M, Yada T.:

Glucose and insulin induce Ca²⁺ signaling in nesfatin-1 neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 420(4): 811-815, 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.079.

Maejima Y, Iwasaki Y, Yamahara Y, Kodaira M, Sedbazar U, Yada T.: Peripheral oxytocin treatment ameliorates obesity by reducing food intake and visceral fat mass. *Aging (Albany NY)* 3(12): 1169-1177, 2011. 査読有
<http://www.impactaging.com/papers/v3/n12/full/100408.html>

Maejima Y, Kohno D, Iwasaki Y, Yada T.: Insulin suppresses ghrelin-induced calcium signaling in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Aging (Albany NY)* 3(11): 1092-1097, 2011. 査読有
<http://www.impactaging.com/papers/v3/n11/full/100400.html>

Kohno D, Sone H, Tanaka S, Kurita H, Gantulga D, Yada T.: AMP-activated protein kinase activates neuropeptide Y neurons in the hypothalamic arcuate nucleus to increase food intake in rats. *Neuroscience Letters* 499: 194-198, 2011. 査読有
doi: 10.1016/j.neulet.2011.05.060

Nakata M, Manaka K, Yamamoto S, Mori M, Yada T.: Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca²⁺ influx through L-type channels in mouse islet β -cells. *Endocr J* 58(4): 305-313, 2011. 査読有
doi: org/10.1507/endocrj.K11E-056

〔学会発表〕(計 19 件)

岩崎有作, 下村健寿, 河野大輔, 出崎克也, Enkh-Amar Ayush, 中林肇, 窪田直人, 門脇孝, 加計正文, 中田正範, 矢田俊彦: 膵臓を支配する求心性迷走神経は膵臓から分泌されるインスリンを効率良く受容する. 第 34 回日本肥満学会, 2013. 10.11-12, 東京

前島裕子, 佐久間和哉, 楊怡飛, Otgon-Uul Zesendorj, Putra Santoso, 下村健寿, 矢田俊彦: 室傍核オキシトシン 弓状核 POMC の双方向性摂食抑制神経経路. 第 34 回日本肥満学会, 2013. 10.11-12, 東京

中田正範, Gantulga Darambazar, 小平美里, 矢田俊彦: 室傍核 Nesfatin-1/NUCB2 ニューロンによる代謝・循環調節. 第 34 回日本肥満学会, 2013. 10.11-12, 東京

矢田俊彦, 青木弘貴, 中田正範: 消化管・心・腎・脳連関による血圧調節. 第 19 回日本心臓リハビリテーション学会, 2013. 7.13-14, 仙台

中田正範, 森昌朋, 矢田俊彦: 膵島内 Nesfatin-1/NUCB2 による膵 β 細胞機能調節機構の多面性. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2013. 5.16-18, 熊本

岩崎有作, 加計正文, 中林肇, 小平(平野)美里, 前島裕子, 矢田俊彦: 膵ポリペプチドとペプチド YY₃₋₃₆ の求心性迷走神経への直接

作用. 第 33 回日本肥満学会, 2012. 10.11-12, 京都

中田正範, 笹沼秀幸, 中江淳, 矢田俊彦: 弓状核 AgRP ニューロン特異的 PDK1 欠損マウスの骨代謝異常. 第 33 回日本肥満学会, 2012. 10.11-12, 京都

前島裕子, 岩崎有作, Sedbazar Udval, 矢田俊彦: オキシトシンの生理的摂食調節作用と末梢投与による抗肥満効果. 第 33 回日本肥満学会, 2012. 10.11-12, 京都

中田正範, 矢田俊彦: DPP-4 阻害剤の標的としての膵島内 PACAP. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2012. 5.17-19, 横浜

中田正範, 森昌朋, 矢田俊彦: Nesfatin-1 による膵 β 細胞インスリン分泌調節機構の多様性. 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 2012. 4.19-21, 名古屋

前島裕子, Sedbazar Udval, 矢田俊彦: オキシトシンの摂食制御経路に弓状核 POMC ニューロンが関与する. 第 32 回日本肥満学会, 2011. 9.23-24, 淡路

前島裕子, Udval Sedbazar, 中田正範, 森昌朋, 矢田俊彦: 視床下部室傍核 Nesfatin-1-Oxytocin による摂食調節と病態的意義. 第 32 回日本肥満学会, 2011. 9.23-24, 淡路

〔図書〕(計 6 件)

前島裕子, 矢田俊彦: オキシトシンによる摂食代謝調節: 神経回路、末梢 中枢連関と肥満治療基盤. *血管医学、メディカルレビュー社*, 2013, 14(1), 53-57

川上正舒, 野田泰子, 矢田俊彦: In からだと病気のしくみ図鑑. 監修、法研、2012, 107-161

前島裕子, Udval Sedbazar, 矢田俊彦: 中枢・末梢ネスファチンによる摂食制御と神経経路. *Clinical Neuroscience*, 中外医学社, 2012, 30(2), 181-183

前島裕子, 矢田俊彦: Nesfatin-1 による摂食・糖代謝調節の機構と意義. *実験医学*, 羊土社, 2011, 29(8), 1240-1241

前島裕子, Sedbazar Udval, 岩崎有作, 高野英介, 矢田俊彦: Nesfatin-1 の摂食抑制神経経路およびストレス、循環、生殖における役割. *日本薬理学雑誌*, 金芳堂日本薬理学会誌出版部, 2011, 137(4), 162-165

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 肥満・メタボリックシンドローム治療薬、及びその動物の治療方法

発明者: 矢田俊彦(届出・代表)、前島裕子、岩崎有作

権利者: 自治医科大学

種類: 特許権

番号: 特願 2011-271652

出願年月日: 平成 23 年 12 月 12 日

国内外の別: 国内

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

(1)研究代表者

矢田 俊彦 (YADA, Toshihiko)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：60166527

(2)研究分担者

中田 正範 (NAKATA, Masanori)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10305120

前島 裕子 (MAEJIMA, Yuko)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：40438669

岩崎 有作 (IWASAKI, Yusaku)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：60528420