

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591361

研究課題名(和文)ニューロメジンU関連ペプチドの生体内機能および関連疾患に関する研究。

研究課題名(英文)Molecular mechanism of Neuromedin U system on obesity related diseases.

研究代表者

花田 礼子(Reiko, Hanada)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00343707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではニューロメジンU(NMU)の生理機能に関して、肥満関連疾患である非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)/非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に着目して解析を行った。食事誘導性NASHモデルマウスの肝臓組織においては、正常肝臓組織にて検出することができないNMUならびにNMUR1 mRNA発現量の増加が認められ、ヒトNASH患者の肝臓においても抗NMU抗体陽性細胞が認められた。さらに野生型マウスの肝臓においてNMUを過剰発現させたところ、NASH病態が増悪することが判明した。以上から、NASH病態時の肝臓におけるNMUシステムはNASH病態の増悪作用を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：Neuromedin U (NMU) is a neuronal peptide with multiple physiological functions of regulating appetite, inflammation and so on. NMU has two specific receptors, NMU R1 and NMU R2, and NMU R1 is mainly expressed in the peripheral tissues. With that background, we have attempted to verify the participation of NMU system in obesity related inflammation disease such as nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH). Normally, it is not detected NMU mRNA in liver tissue without any pathological change, however, NMU R1 and NMU expression levels are markedly increased in NASH liver in mice. Not only in mice but also in human, NMU immunoreactive cells are detected in liver tissue of NASH patients. Furthermore, wild type mice with NMU overexpressing in the liver have worsened NASH pathogenesis. Based on these data, NMU system has important roles in NASH pathophysiology.

研究分野：内分泌学

キーワード：神経ペプチド 肥満 脂肪肝 NAFLD/NASH

1. 研究開始当初の背景

内分泌・代謝機構は末梢・中枢の様々な生理活性ペプチドが密接に関連し、高等生物における神経系や免疫系等の生体高次機能の調節に複雑に関与しており、これらのシステムの破綻により様々な病態をひき起こすことが知られている。

申請者はこれまでに生理活性物質である神経ペプチド・ニューロメジンUおよび骨代謝調節因子である Receptor activator or NF- κ B ligand (RANKL) とその受容体 (RANK) に関して、遺伝子改変マウスモデルを用いた系統的な研究を行い、新たな機能を解明し、報告してきた (Hanada R et al., Nat.Med., 2004、 Hanada R et al., Nature, 2009)。

ニューロメジンUは1985年に平滑筋収縮アッセイにより豚の脊髄から単離された生理活性ペプチドであるが、長年その生理作用は不明であった。2000年に申請者らのグループをはじめ世界数カ国の研究グループにより2種類のニューロメジンU受容体が同定され (BBRC 2000,276:435) その後、申請者らは自らのグループで作製した世界発のニューロメジンU遺伝子欠損マウスを用いた解析により、ニューロメジンUが摂食・エネルギー代謝調節や自律神経系の調節、中枢性骨量調節、睡眠・覚醒等サーカディアンリズムの調節並びに炎症反応の制御に関与する事を見いだしてきた (Nat.Med 2007,13:1234, J Exp Med 2005, 202:217, Nat.Med 2004,10:1067, BBRC 2004,323:615, BBRC 2004,318:156, BBRC 2001,289:225, BBRC 2000,277:191) 申請者らのグループはこれまでに新規生理活性ペプチドの探索・同定において、国内のみならず国際的にも高く評価されており、ニューロメジンUに関してはその機能解析においても世界をリードしてきた。これらの実績を踏まえ、本研究ではニューロメジンUの更なる研究展開から新たな生理機能やエネルギー代謝調節機構等の解明が期待される。さらに、2005年、申請者らのグループの森健二ら (現国立循環器病研究センター研究所) はニューロメジンU受容体の新たな内因性リガンド・ニューロメジンSを同定し、ニューロメジンSがサーカディアンリズムに深く関与する事を報告した (Mori K et al., EMBO

J. 2005)。その後、申請者らのグループによるニューロメジンSの新たな生理機能の解析も進んでいる。

一方で、ニューロメジンUがエネルギー代謝機構や炎症に関与していることから、ニューロメジンU、ニューロメジンSなど一連のニューロメジンU関連ペプチドが非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)/非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や動脈硬化、脳血管性痙攣症などの代謝関連疾患に関与していることが示唆されている。

これらの背景をもとに、本研究においては、一連のニューロメジンU関連ペプチドの生理機能に関して、エネルギー代謝機構、慢性炎症等に注目し、ニューロメジンU関連ペプチドが生体内において相互に織りなす多様な生理機能を明らかにし、その機能破綻が関与する病態の解明を目指す。

2. 研究の目的

本研究では一連のニューロメジンU関連ペプチド (ニューロメジンU; NMU、ニューロメジンS; NMS) の新たな生理機能を解明することを目的とする。今までの知見ならびに申請者らの行なった予備実験の結果に基づき、肥満・代謝疾患の中でも慢性炎症作用が強く関与しているといわれている NAFLD/NASH に着目して解析をおこなう。具体的には、NAFLD/NASH 病態におけるニューロメジンUシステムの意義を追究する。

3. 研究の方法

ニューロメジンUシステムの新規生理機能の解析に関して、NAFLD/NASH に着目して解析をおこなう。具体的には、NAFLDモデルマウス、NASHモデルマウスを作製し、それぞれの病態におけるニューロメジンUシステムの動態の解析やその病態に伴う炎症性変化、肝臓の線維化の解析等をおこなう。一方、マウスモデルのみならず、ヒトNASH病態での肝臓ニューロメジンU動態についても解析する。さらに肝臓におけるニューロメジンU強制発現モデルマウスを作製し、NASH病態時のニューロメジンUシステムの意義について検討する。

1) C57BL/6野生型マウスへの高脂肪食負荷によるNAFLD病態時の肝臓における炎

症の程度を炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)の発現量を指標に解析し、さらに線維化の有無をマーカーである α -SMA発現量を指標に解析する。併せて、その際のNMU、NMS、NMUR1受容体、NMUR2受容体の発現量を検討する。

2) KKA ν マウスへのNASH食負荷(コリン・メチオニン欠乏食)によるNASH病態時の肝臓におけるNMU、NMS、NMUR1受容体、NMUR2受容体の発現量をおこない、発現部位の検討については免疫組織学的解析にて検討する。同時にNASH病態時の評価に関しては炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)の発現量を指標に解析し、さらに線維化の有無をマーカーである α -SMA発現量を指標に解析する。

3) ヒトNASH患者ならびに非NASH患者の肝臓におけるNMU発現動態について、抗ヒトNMU抗体を用いた免疫組織学的解析にて検討する。

4) NASH病態時における肝臓でのニューロメジンUシステムの意義の検討。
Sleeping beauty transposon systemを用いて、NMUあるいはGFPを発現させたプラスミドをICR野生型マウスの尾静脈からHydrodynamic injection法にて急速注入させ、肝臓にNMU(NM-SBマウス)あるいはGFP(GFPマウス)を発現させる。これらのマウスにNASH食を負荷して病態への影響を検討する。NASH病態の評価法としては肝臓における炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)の発現量を指標に解析し、さらに線維化の有無をマーカーである α -SMA発現量を指標に解析する。併せて、組織化学的解析にて細胞浸潤の程度や線維化の程度を解析する。

4. 研究成果

1) 野生型マウスへの高脂肪食負荷によるNAFLD病態時には、通常食群のマウスに比べ、肝臓での炎症性サイトカインTNF- α mRNAが有意に増加し、マクロファージマーカーであるMCP-1 mRNA量が有意に増加している事を確認した。さらに、通常、肝臓にて発現を認めないNMUR1のmRNA量が

発現する事が判明した。一方でNMU、NMS、NMUR2の発現は高脂肪食負荷群、通常食群ともに認めなかった。

2) 食事誘導性NASHモデルマウスの肝臓組織においては、非NASHモデルマウスの肝臓組織にて殆ど検出する事ができないNMUならびにNMUR1 mRNAの発現量の増加が認められた。一方、NMS、NMUR2の発現は認めなかった。また、NASH病態において通常認められる炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6、IL-1 β)の発現量の増加や肝臓組織へのマクロファージの浸潤に関しては、食事誘導性NASHモデルマウスの肝臓組織においても同様に認められた。さらに、NASHモデルマウスの肝臓の免疫組織染色にて、抗NMU抗体とマクロファージのマーカーであるF4/80抗体の染色を行ったところ両者の共染色が認められた。

3) ヒトのNASH患者の肝臓標本にて、抗NMU抗体陽性細胞を認めた。一方、非NASH患者の肝臓標本では、抗NMU抗体陽性細胞は認められなかった。

4) NASH病態時における肝臓でのニューロメジンUシステムの意義を検討するために、マウスの肝臓にNMU(NMU-SBマウス)あるいはGFP(GFPマウス)を強制発現させるモデルを作製し、NASH食を負荷したところ、NMU-SBマウスではコントロールマウス(GFPマウス)に比べて有意にNASH病態が増悪している事が判明した。NMU-SBマウスでは炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-6、IL-1 β のmRNA発現量がGFPマウスに比べ、著しく増加し、線維化のマーカーである α -SMA mRNA量も有意に増加している事が判明した。

以上より、NASH病態の進行に伴って肝臓ではNMU、NMUR1発現上昇が認められることが明らかとなった。また、NASH病態時の肝臓におけるNMU発現はマウスのみならずヒトにおいても認められる事が判明した。さらに肝臓におけるニューロメジンUシステムの意義としてはNASH病態の増悪を促す事が明らかとなった。

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 5 件)

Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, Tricherau J, Ishiguro H, Paolino M, Sigl V, Hanada T, Hanada R, Lipinski S, Wild B, Cmargo SM, Singer D, Richter A, Kuba K, Fukamizu A, Schreiber S, Clevers H, Verrey F, Rosenstiel P, Penninger JM.: ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* 487: 477-481. 2012 (査読有)
10.1038/nature11228.

*花田礼子: RANKL/RANK による中枢性体温調節機構

日本薬理学会雑誌 139:277,2012. (査読無)
<http://www.pharmacol.or.jp/fpj/>

*花田礼子: RANKL/RANK システム-最近の知見.

Annual Rev. 2013 糖尿病・代謝・内分泌: 162-170. 2013. (査読無)
<http://www.chugaiigaku.jp/item/list.php?AnnualReview>

Hanada T, Weitzer S, Mair B, Bernreuther C, Wainger B, Ichida J, Hanada R, Orthofer M, Cronin SJ, Komnenovic V, Minis A, Sato F, Mimata H, Yoshimura A, Tamir I, Rainer J, Kofler R, Yaron A, Eggan KC, Woolf CJ, Glatzel M, Herbst R, Martinez J, Penninger JM.: The RNA kinase CLP1 links tRNA metabolism to progressive motor neuron loss. *Nature* 495: 474-480. 2013 (査読有)
10.1038/nature11923.

*花田礼子, 寺西仁志: ニューロメジン U, ニューロメジン S.

日本臨床 増刊号: 最新肥満症学 -基礎・臨床研究の最前線- 28: 903-906. 2014. (査読無)
http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7205himan.html

[学会発表](計 5 件)

寺西仁志、Boban Stanojevic、天野雄一郎、兔澤隆一、森健二、日野純、宮澤崇、宮里幹也、花田礼子、寒川賢治、中尾一和: 「末梢におけるニューロメジン U システムの NAFLD/NSH への関与」.

第 34 回日本肥満学会 ポスター発表
2013.10.11.東京

花田礼子: 「私の "VIVE HODIE" な研究生生活」.

第 40 回日本神経内分泌学会, 2013.10.26.
宮崎市; (シンポジウム・招待講演)

花田礼子: 「ニューロメジンU関連ペプチドの新規生理機能解析」.

第 92 回神経化学学会大会, 2014.9.30. 奈良市; (シンポジウム・招待講演)

谷口香織、寺西仁志、花田礼子: 「ニューロメジンU/ニューロメジンSシステムの脳内における新規生理機能の解析」

第 92 回日本生理学会, ポスター発表
2015.3.22. 神戸市

寺西仁志、谷口香織、花田礼子: 「NAFLD/NASH 病態におけるニューロメジン U システムの生理作用の解析」

第 92 回日本生理学会, ポスター発表
2015.3.22. 神戸市

[図書](計 1 件)

花田礼子: chapter 1 「その他の臓器における RANKL の役割」: 『ファーマナビゲーター 抗 RANKL 抗体編』松本俊夫編集 メディカルレビュー社 2015.

分担執筆 in press

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等;

<http://www.mic.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

花田 礼子 (HANADA Reiko)
京都大学・大学院医学研究科・特定准教授
研究者番号：00343707

(2)研究分担者；なし

(3)連携研究者；なし

(4)研究協力者；

寒川 賢治 (KANGAWA Kenji)
宮里 幹也 (MIYAZATO Mikiya)
森 健二 (MORI Kenji)
日野 純 (HINO Jun)
花田 俊勝 (HANADA Toshikatsu)
Josef Penninger (Josef Penninger)