

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293188

研究課題名(和文) 脳腸ペプチドによる中枢および自律神経系を介した新たな循環調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of cardiovascular regulation based on the association with autonomic nerve and brain-gut peptides

研究代表者

宮里 幹也 (MIYAZATO, Mikiya)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：50291183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳腸ペプチドによる自律神経を介した新たな循環調節機構を明らかにすることを目的として、1) グレリン遺伝子欠損マウスにおける循環器疾患モデル(急性心筋梗塞および圧負荷心肥大モデル)での自律神経機能障害による病態悪化とグレリンによる治療的意義、2) ニューロメジンUおよびS(NMU/NMS)の機能解析ツールとしての受容体アゴニストの開発とNMU/NMS欠損マウスの機能解析、3) 新規制御因子の同定のための迷走神経節に発現するオーファンGPCRのリガンド探索に関する研究を推進した。

研究成果の概要(英文)：To clarify how the brain-gut peptide affects the cardiovascular regulatory system via the autonomic nerve, 1) we investigated the effect of ghrelin on myocardial infarction and cardiac hypertrophy models in ghrelin knockout mice, demonstrating that endogenous ghrelin suppresses sympathetic nerve activity and protects cardiac function after myocardial infarction and attenuates hypertrophy via a cholinergic anti-inflammatory pathway, 2) we developed selective agonists to neuromedin U receptors types 1 and 2 as tools for NMU/NMS-related research, 3) we selected orphan receptors expressed in the vagus nerve ganglion and searched for their endogenous ligands to find novel bioactive substances related to cardiovascular and autonomic nervous regulations.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：ペプチド グレリン ニューロメジン 自律神経 循環調節

1. 研究開始当初の背景

多様な標的や作用を有する生理活性ペプチドをターゲットとして、研究代表者の研究室では、生体内に存在する新たな生理活性ペプチドを同定し、その機能を解明することにより、未知の生体機能調節機構を明らかにすることをテーマとして研究を進めてきた。近年では、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、これらによる生体機能調節機構解明を進めてきた。

グレリンは胃から発見されたペプチドであり、NMU は脊髄から同定されたが、小腸における含量は脳に比べ約 50 倍高い脳腸ペプチドである。グレリンは強力な摂食促進作用に加え、心血管系に対しては直接的に、あるいは迷走神経求心路を介し中枢性の自律神経調節作用による循環制御を行う。急性心筋梗塞モデルマウスへのグレリンの急性期投与は、迷走神経を介してシグナルを延髄に伝達し、強力に交感神経活動を抑制することで、致死性不整脈を減少させ生存率を改善することより、グレリンが迷走神経求心路を介する自律神経制御による新たな機序の心筋梗塞治療薬としての可能性を有することを示している。

一方、NMU は中枢性の摂食抑制ペプチドであるが、脳室内あるいは脳幹部投与により交感神経活性化を介した血圧と心拍数の上昇作用を示す。最近、NMU の末梢投与により摂食・体重抑制作用を示すことが報告され、これらの作用は迷走神経求心路を介し、延髄弧束核を活性化することによる中枢性制御が示唆されている。また、申請者らが同定した新規神経ペプチド：ニューロメジン S (NMS) は、NMU と 2 種類の受容体を共有するペプチドであるが、この NMS の交感神経系を介した循環調節への関与も報告している。これらは、ニューロメジン類も直接的にあるいは末梢から迷走神経求心路を介して中枢性自律神経調節作用を発揮し、循環制御に関わっていることを示している。以上より、申請者らが同定してきた脳腸ペプチドは、自律神経系を介した消化管-脳-心血管系ネットワークにより循環制御に寄与しており、その制御機構を理解することは循環器疾患の新たな治療基盤構築に結びつくと考えられる。

また、申請者が従来から継続している系統的な新規生理活性ペプチドの探索研究に関しては、解決すべき重要な事項の一つとして、鋭敏かつ高感度な活性検出法の確立がある。最近、培養細胞の微小形態変化に基づくインピーダンス変化を指標とした高感度でハイスループットな新たな活性検出系 (Cell Key システム) を構築・導入し、スクリーニングに有用な系であることを示してきた。従来知見に新たな技術を導入することにより、循環調節に関与する新規因子の同定をもたらすことが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、脳腸ペプチドを軸として自律神経系を介した消化管-脳-心血管系の連関による循環調節機構について明らかにするために、グレリンによる循環制御や破綻との関連、治療応用への可能性を示す。また、ニューロメジン類の研究推進のためのツールとしての受容体アゴニストの開発、および遺伝子改変マウスを用いた自律神経機能の解析を行う。さらに、新規の生理活性ペプチドによる新たな循環調節機構の解明のために、これまでに申請者らが蓄積してきた知見や新たな技術を応用し、循環制御ネットワークに関与する新たな内因性ペプチドの同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) グレリンの自律神経活動制御による循環調節機構

心筋梗塞モデルにおける検討

グレリン遺伝子欠損 (KO) マウスに左冠動脈結紮心筋梗塞モデルを作製し、内因性グレリンの急性心筋梗塞発症後の死亡率、慢性期の心機能や自律神経活動に及ぼす影響を野生型マウスと比較して検討した。また、グレリンおよびグレリン受容体の合成アゴニスト (ヘキサレリン) の急性心筋梗塞モデルのグレリン KO マウスへの投与効果の検討を行った。

大動脈結紮心肥大モデルにおける検討

グレリン KO マウスに横行大動脈結紮による圧負荷心肥大モデルを作製し、内因性グレリンの心肥大モデルにおける心機能、炎症反応、自律神経活動に及ぼす影響を検討した。また、グレリンまたは副交感神経受容体アゴニストであるニコチンの心肥大モデルマウスへの投与効果の検討を行った。

(2) NMU/NMS による生理機能の解明

NMU/NMS 受容体選択的アゴニストの開発

脳腸ペプチドである NMU ペプチドファミリーの中枢および末梢における生理機能解析をさらに進めるためのツールとして、NMU/NMS 受容体の活性化に必須な構造である NMU と NMS の共通構造 (C 末端 7 アミノ酸: Phe-Leu-Phe-Arg-Pro-Arg-Asn-amide) を基盤とした構造活性相関研究を実施し、ヒト NMU/NMS 受容体 1 型 (NMUR1) および 2 型 (NMUR2) のそれぞれに選択的なアゴニストの開発を試みた。

NMU/NMS による体温制御と自律神経系

摂食、循環調節、交感神経活動に関与する NMU および NMS の体温制御への関与を明らかにする目的で、両ペプチドをラットの脳室内へ投与し、自由運動下の体表体温の変化を測定し、交感神経系の関与やそのメカニズムを検討した。また、両ペプチドそれぞれの KO マウスおよびダブル KO マウスを用いて、体

温変化を評価した。

(3) 循環制御ネットワークに關与する新規制御因子の探索

新たな活性検出系の構築・導入

生理活性ペプチドをリガンドとする受容体の多くはGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。内因性リガンドが不明なため機能が知られていないオーファンGPCRの内因性リガンド探索を推進するため、オーファンGPCR発現細胞株の細胞内シグナル変化を検出する方法として、細胞のインピーダンス変化やイノシトール3リン酸代謝産物の産生量を指標とする新たな活性検出系を開発・導入を行った。

新規制御因子のスクリーニング

自律神経制御や循環調節の中核である視床下部および延髄に高発現しているオーファンGPCRに加え、ペプチドがリガンドと想定される迷走神経節に発現するオーファンGPCRを選別し、オーファンGPCR安定発現細胞株を構築した。樹立したオーファンGPCR安定発現細胞株に、脳および消化管を中心とした迷走神経支配領域のラット、ブタ組織を材料として抽出したペプチドサンプルのゲル濾過クロマトグラフィーの分画の一部を作用させ、従来より用いている細胞内カルシウム濃度の上昇やcAMP濃度の変動に加え、上記で構築・導入した新たな細胞内シグナル変化を検出する方法を用いて、オーファンGPCRの内因性リガンドのスクリーニングを進めた。

4. 研究成果

(1) グレリンの自律神経活動制御による循環調節機構

心筋梗塞モデルにおける検討

グレリンKOマウスに心筋梗塞モデルを作製すると、2週間の観察期間内における心不全による死亡、心臓におけるANPおよびBNPの遺伝子発現、左室拡張末期容積は、同じ処置をした野生型マウスに比べ有意に増加し、左室駆出力は低下していた。また、心拍変動解析により自律神経活動を検討した結果、グレリンKOマウスの心筋梗塞モデルでは、野生型と比較して有意に交感神経活動が上昇しており、血漿アドレナリン・ノルアドレナリン濃度も上昇していた。グレリン投与により、死亡率や心機能低下、交感神経活動の活性化および血漿アドレナリン・ノルアドレナリン濃度は改善した。さらに、グレリン受容体の合成アゴニスト(ヘキサレリン)の心筋梗塞急性期の1回投与においても、心筋梗塞作製後2週間の死亡率が有意に低下するとともに、心機能も有意に改善し、交感神経活動の抑制、副交感神経活動の活性化を認めた。内因性グレリンは急性心筋梗塞の際の過剰な交感神経活動活性化の抑制に重要であり、グレリンおよびグレリン受容体アゴニスト

は、心筋梗塞への治療応用が期待されることが示すことができた。

大動脈結紮心肥大モデルにおける検討

グレリンKOマウスに横行大動脈結紮による圧負荷心肥大モデルを作製すると、心臓重量、左室壁厚、心臓におけるIL-6やIL-1などの炎症性サイトカイン発現、ANPやBNPなどの心肥大関連遺伝子発現、心臓線維化が野生型マウスの同モデルに比べ有意に増加していた。また、心拍変動解析の結果、副交感神経活動は有意に低下していた。さらに、グレリンKOマウスにグレリンあるいは副交感神経受容体アゴニストであるニコチンを投与して心肥大モデルを作製すると、副交感神経活動の増加に伴って、心肥大や炎症性サイトカイン産生、心肥大関連遺伝子発現が有意に抑制されたことから、内因性グレリンは、副交感神経活動の活性化することにより、肥大刺激に伴う心臓局所における炎症を抑制していることが明らかとなった。グレリンは、心肥大に対しても保護的作用を有することが示され、循環器疾患への治療応用が期待される。

2) NMU/NMSによる生理機能の解明

NMU/NMS受容体選択的アゴニストの開発

ヒトNMUR1、NMUR2のそれぞれ過剰発現細胞系を用いて、細胞内カルシウム動員を指標として、NMUとNMSの共通構造(C末端7アミノ酸)を基盤としたペプチド誘導体のスクリーニングを実施した。最初に、N末端Pheのアミノ基を除去したペプチドに有意なアゴニスト活性があることを確認し、リード化合物として用いた。さらにN末端アシル基およびアミノ酸側鎖構造を変換することにより、ヒトNMUR2を選択的に活性化する($EC_{50} = 6.4nM$)ヘキサペプチド誘導体(3-cyclohexylpropionyl-Leu-Leu-Dap-Pro-Arg-Asn-amide)ヒトNMUR1を強力に活性化するヘキサペプチド誘導体(2-thienylacetyl-Trp-Phe(4-F)-Arg-Pro-Arg-Asn-amide)を取得した。両ペプチド誘導体は、NMU/NMSに関する研究進展のための有力なツールになるとともに、ニューロメジン関連の創薬展開に寄与できると考える。

NMU/NMSによる体温制御と自律神経系

NMUおよびNMSをラットの側脳室に投与すると、明期・暗期ともに用量依存的に体表温度の有意な上昇を認め、NMSがより強い作用を示した。また、3アドレナリン受容体選択的遮断薬あるいはシクロオキシゲナーゼ阻害薬の前投与により、NMSによる体温上昇は抑制された。両ペプチドの投与により、視床下部のプロスタグランジンE2合成酵素とシクロオキシゲナーゼ2、褐色脂肪組織のミトコンドリア非共役蛋白質UCP1の遺伝子発現は有意に増加していた。さらに、KOマウスの解析により、活動期においてNMSKOマウ

スとダブル KO マウスは野生型と比較して有意に体温が低く、NMU KO マウスは変わらないが、低温暴露により3種の KO マウスのいずれも野生型と比較して体温が低下することが判明した。NMU および NMS が体温の調節に重要な役割を果たしており、その作用は交感神経系およびプロスタグランジン合成系を介してのものと推測された。

(3) 循環制御ネットワークに關与する新規制御因子の探索

新たな活性検出系の構築・導入

新規制御因子探索のための新たな活性検出系として、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する CellKey システムを用いた活性検出系を導入した。本システムは、共役する G タンパク質に依存しない GPCR 活性検出系であり、また GPCR 以外の受容体に対する反応も検出可能で、オーファン受容体発現系および初代培養細胞系のいずれの新規因子のスクリーニングにも有用である。本システムを用いて、視床下部に高発現しているオーファン GPCR 発現細胞でのスクリーニングを実施したところ、ラット組織抽出物より複数のペプチドの単離に成功した。構造解析の結果、いずれも異なるタンパク質由来の断片ペプチドであり、最終的には真の内因性リガンドではないと判断したが、これらは従来の活性検出系では組織抽出物から検出できず、CellKey システムが新規因子探索に有用なツールであると考えられた。

さらに、GPCR の活性化によって産生されたイノシトール 3 リン酸 (IP3) の代謝産物である IP1 を測定する系を新たな活性検出法として導入した。本検出法は、リガンド刺激時間が1時間であるために、細胞内カルシウム濃度変化の測定 (反応時間4分) では検出できない slow acting compound による GPCR の活性化を検出できる。さらに、GPCR をリガンドで刺激しない状態で単位時間当たりの IP1 産生量を定量できるため、近年その重要性が指摘されている GPCR の基礎活性を評価することができる。IP1 測定系は、高感度で簡便かつ再現性の高い生物活性検出法であり、今後の新規因子探索に有用なアッセイ系が構築できた。

新規制御因子のスクリーニング

マウス迷走神経節のマイクロアレイ解析により、発現量の変動が同定された3種類のオーファン GPCR を選別し検討を進めた。これら GPCR の全身臓器における発現分布をラットで検討した結果、いずれも中枢神経系および消化管で高発現していた。CHO 細胞を用いて受容体安定発現細胞株を構築し、ブタ脳、ラット脳・消化管より抽出したペプチドサンプルを材料として、細胞内カルシウム濃度や cAMP 濃度の変動に加え、上記 CellKey システムを用いた活性検出系によりリガンドスク

リーニングを行った。一つの受容体において、ラット脳および小腸の分子量約 2000 のペプチド分画にアゴニスト活性を認めており、今後、精製・単離、構造解析を進める。また、視床下部での発現の高いオーファン GPCR の安定発現細胞において、ブタ組織抽出物より細胞内カルシウム上昇活性を示す物質の単離に成功した。非常に収量が低かったため、このリガンド候補活性物質に関しても、今後、構造解析に必要な量を得るために活性物質の精製・単離を行い、活性物質の構造決定を進める。

さらに、結合するリガンドは報告されているが、細胞内シグナル伝達系が不明であった受容体の活性化機構を、CellKey システムを用いて解析した。その結果、リガンド刺激により、G q を介した細胞内カルシウム上昇活性および G 13-Rho 経路を介した血清応答因子による転写活性を有することが明らかになった。

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10件)

Tokudome T, Kishimoto I, Shindo T, Kawakami H, Koyama T, Otani K, Nishimura H, Miyazato M, Kohno M, Nakao K, Kangawa K. Importance of endogenous atrial and brain natriuretic peptides in murine embryonic vascular and organ development. *Endocrinology*, 157: 358-367, 2016. 査読有
DOI:10.1210/en.2015-1344

Nakahara K, Akagi A, Shimizu S, Tateno S, Qattali AW, Mori K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Involvement of endogenous neuromedin U and neuromedin S in thermoregulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 470: 930-935, 2016. 査読有
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.01.155

Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I, Otani K, Nishimura H, Yamaguchi O, Otsu K, Miyazato M, Kangawa K. Endogenous ghrelin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via a cholinergic anti-inflammatory pathway. *Hypertension*, 65: 1238-1244, 2015. 査読有
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04864

Takayama K, Mori K, Sohma Y, Taketa K, Taguchi A, Yakushiji F, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K, Hayashi Y. Discovery of potent hexapeptide agonists to human neuromedin U receptor 1 and identification of their serum

metabolites. ACS Med Chem Lett, 6: 302-307, 2015. 査読有
DOI:10.1021/ml500494j

Takayama K, Mori K, Taketa K, Taguchi A, Yakushiji F, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K, Hayashi Y. Discovery of selective hexapeptide agonists to human neuromedin U receptors types 1 and 2. J Med Chem, 57:6583-6593, 2014. 査読有
DOI:10.1021/jm500599

Tokudome T, Kishimoto I, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin and the cardiovascular system. Front Horm Res, 43: 125-133, 2014. 査読有
DOI:10.1159/000360593

Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I, Otani K, Miyazato M, Kangawa K. One dose of oral hexarelin protects chronic cardiac function after myocardial infarction. Peptides, 56: 156-162, 2014. 査読有
DOI:10.1016/j.peptides.2014.04.004

Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I, Otani K, Hosoda H, Nagai C, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K. Hexarelin treatment in male ghrelin knockout mice after myocardial infarction. Endocrinology, 154: 3847-3854, 2013. 査読有
DOI:10.1210/en.2013-1291

Akieda-Asai S, Koda S, Sugiyama M, Furuya M, Miyazato M, Date Y. Metabolic features of rats resistant to a high-fat diet. Obes Res Clin Pract, 7: e243-e250, 2013. 査読有
DOI:10.1016/j.orcp.2013.01.0004

Mao Y, Tokudome T, Otani K, Kishimoto I, Miyazato M, Kangawa K. Excessive sympathoactivation and deteriorated heart function after myocardial infarction in male ghrelin knockout mice. Endocrinology, 154: 1854-1863, 2013. 査読有
DOI:10.1210/en.2012-2132

〔学会発表〕(計 1件)

宮里幹也、徳留健、岸本一郎、寒川賢治 .
生理活性ペプチドの循環器疾患治療への応用の可能性～グレリンについて～
第 88 回日本内分泌学会学術総会
2015 年 4 月 23 日
ホテルニューオータニ(東京・千代田区)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮里 幹也 (MIYAZATO, Mikiya)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長
研究者番号：5 0 2 9 1 1 8 3

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

岸本 一郎 (KISHIMOTO, Ichiro)
国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長
研究者番号：8 0 3 1 2 2 2 1

伊達 紫 (DATE, Yukari)

宮崎大学・副学長
研究者番号：7 0 3 8 1 1 0 0