

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460065

研究課題名(和文)新規分泌性因子 Neudesin の高脂肪食誘導肥満形成における役割の解明

研究課題名(英文) Roles of Neudesin in high-fat diet induced obesity

研究代表者

伊藤 信行 (Itoh, Nobuyuki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：10110610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Neudesin KOマウスでは高脂肪食による血糖値、肝臓への中性脂肪の蓄積、インスリン抵抗性の出現が改善し、そのエネルギー消費量、脂肪酸酸化も亢進していた。Neudesin KOマウスの心拍数、脂肪組織中、血漿中のNE濃度が増加し、その脂肪組織で熱産生因子や脂肪酸酸化関連因子の発現が増加した。さらに、その脂肪組織でリポリシスが亢進していた。さらに交感神経系を破壊したNeudesin KOマウスでは抗肥満の表現型が一部消失し、Neudesin添加によるERK活性化が、カンナビノイド経路の阻害によって抑制された。従って、本研究成果は肥満症成因解明に重要な手掛かりを与えるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Some neurotrophic factors have recently been implicated in the control of energy balance by increasing energy expenditure. We previously identified neudesin as a novel neurotrophic factor with potential roles in the central nervous system. Although neudesin is also expressed in various peripheral tissues including adipose tissue, its physiological roles have not yet been elucidated. We found that neudesin knockout (KO) mice were resistant to high-fat diet-induced obesity and obesity-related metabolic dysfunctions. neudesin KO mice exhibited increased energy expenditure due to increased sympathetic activity, which resulted in increased heat production and fatty acid oxidation in brown adipose tissue and enhanced lipolysis in white adipose tissue. Thus, neudesin, which may be a negative regulator of sympathetic activity, could represent a novel regulator of the development of obesity and obesity-related metabolic dysfunctions.

研究分野：分子生物学

キーワード：分泌性タンパク質 マウス 遺伝子欠損 肥満 エネルギー代謝

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 分泌性因子(タンパク質)は増殖・分化因子あるいはホルモンとして、代謝調節・形態形成に重要な役割をはたしている。申請者らは主として Bioinformatics の手法を用いて、ゲノム・遺伝子データベースから、9種類の新規 FGF 遺伝子をはじめ、15種類以上の新規分泌性因子遺伝子を発見し、その代謝調節・形態形成における役割の解明を解明してきた。その中で、申請者らは FGF21 が脂肪細胞の脂質代謝調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた(1-3)。

(2) 申請者らはマウスの胎児の脳神経組織に特異的に発現する新規分泌性因子(タンパク質)を発見し、Neudesin と命名した。また、申請者らは Neudesin をヒト、ゼブラフィッシュなどでも見出し、Neudesin が脊椎動物に共通した分泌性因子であることも明らかにした。さらに、申請者らは Neudesin が培養神経前駆細胞の分化と生存を促進することも明らかにした(4,5)。しかし、Neudesin の生理的役割は不明であった。申請者らは Neudesin の生理的役割を解明するために Neudesin 欠損マウスを作成した。Neudesin 遺伝子欠損マウスは見かけ上正常であり、脳神経系の発達に顕著な異常は見出されなかった。一方、Neudesin 遺伝子欠損マウスを高脂肪食で12週間飼育しても高脂肪食誘導肥満を形成しなかった。しかし、その摂食量は野生型マウスとほぼ同程度であった。これらの結果は Neudesin が高脂肪食誘導肥満形成とエネルギー代謝調節に重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

## 2. 研究の目的

(1) Neudesin は申請者らがヒト及びマウスで発見した新規分泌性タンパク質である。

申請者らは Neudesin の生理的役割を解明する目的で、Neudesin 遺伝子欠損マウスを作成した。Neudesin 遺伝子欠損マウスは見かけ上正常であったが、高脂肪食誘導肥満形成が著しく抑制された。これらの結果は Neudesin が高脂肪食性肥満形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(2) 従って、本研究では、Neudesin 遺伝子欠損マウスの解析により、1) Neudesin 遺伝子欠損マウスの高脂肪食性肥満形成の抑制メカニズム、2) Neudesin のエネルギー代謝調節における役割、3) Neudesin 受容体の同定と細胞内シグナル伝達経路、などの解明を試みる。さらには、Neudesin 遺伝子過剰発現マウスの作成と解析を進める。これらの研究により、高脂肪食誘導肥満形成とエネルギー代謝調節における Neudesin の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) Neudesin 遺伝子欠損マウスの解析による Neudesin の高脂肪食誘導肥満形成とエネルギー代謝調節における役割の解明：高脂肪食飼育した Neudesin 遺伝子欠損マウスのエネルギーの吸収量と消費量を調べる。また、そのエネルギー代謝状態の指標となる様々な血中パラメータやエネルギー代謝に重要な役割を果たしている臓器の形態的観察や脂質代謝、エネルギー代謝に関与している様々な遺伝子の発現量を調べる。

(2) Neudesin 受容体の同定とそのシグナル伝達機構の解明：培養細胞を用いて Neudesin 受容体タンパク質を同定する。さらに、Neudesin 受容体 cDNA を単離し、Neudesin 受容体高発現細胞系を確立して、Neudesin 細胞内情報伝達系とその制御メカニズムを解明する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 高脂肪食飼育時の Neudesin 欠損マウスの体重、組織重量に関する検討

Neudesin 欠損マウスは高脂肪食による体重増加が抑制されており、また、その肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織重量の増加が著しく抑制されていた(図 1)。

##### (2) Neudesin 欠損マウスの血中パラメーター、耐糖能、インスリン抵抗性、肝臓の中性脂質に関する検討

Neudesin 欠損マウスでは高脂肪食による血糖値・血中インスリン濃度の増加が抑制されていた(図 2A)。また、その耐糖能やインスリン抵抗性の改善が見られた(図 2B)。さらに、その肝臓への中性脂肪の蓄積は殆ど認められなかった(図 2C)。

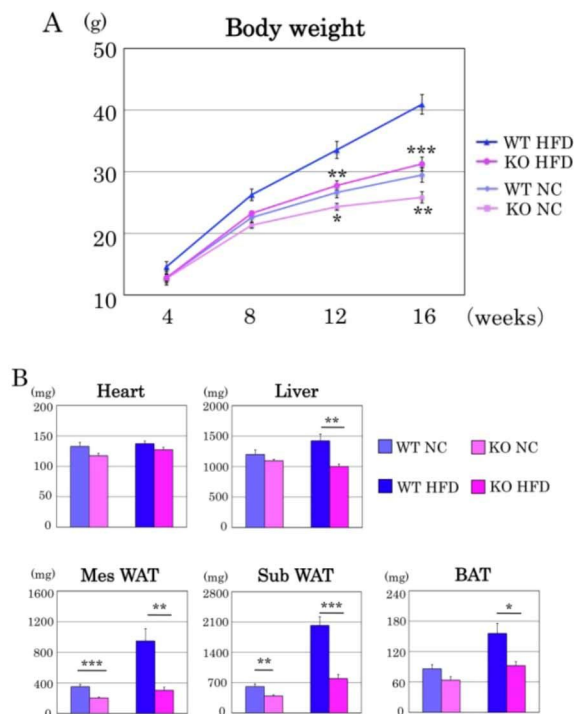
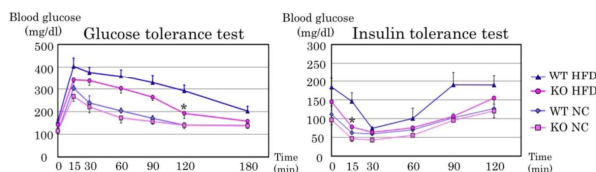


図 1. 野生型と Neudesin 欠損マウスの体重 (A) と組織重量 (B). WT: 野生型、KO: Neudesin 欠損、NC: 通常食、HFD: 高脂肪食。

##### A

	WT NC	KO NC	WT HFD	KO HFD
Blood glucose (mg/dl)	126±7.42	112±5.14	168±10.0	135±7.56*
Plasma insulin (ng/ml)	1.38±0.20	0.95±0.30	3.45±0.51	0.79±0.16**

##### B



##### C

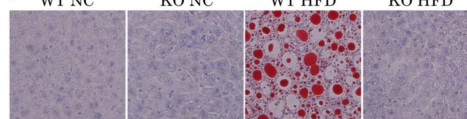


図 2. 野生型と Neudesin 欠損マウスの血糖値・インスリン値 (A)、耐糖能・インスリン感受性 (B)、肝臓の中性脂質. WT: 野生型、KO: Neudesin 欠損、NC: 通常食、HFD: 高脂肪食。

##### (3) 高脂肪食飼育時の Neudesin 欠損マウスにおけるエネルギー摂取・消費に関する検討

Neudesin 欠損マウスは自発行動量が変化していないが、体温の上昇が認められた。また、エネルギー消費の指標となる酸素消費量が増加し、その呼吸商の値が減少傾向を示した。さらに、その脂肪酸酸化が亢進していた(図 3)。

##### (4) 高脂肪食飼育時の Neudesin 欠損マウスの脂肪組織における熱産生関連、脂肪酸酸化関連遺伝子の発現の検討

高脂肪食飼育時の脂肪酸酸化の亢進に寄与する組織を明らかにするために、エネルギー消費の調節に主要な組織において熱産生因子や脂肪酸酸化関連因子の発現を測定した。その結果、褐色脂肪組織の熱酸性因子、脂肪酸酸化関連因子の発現が増加していた(図 4A)。さらに、白色脂肪組織の脂肪酸酸化関連因子の発現も増加していた(図 4B,C)。

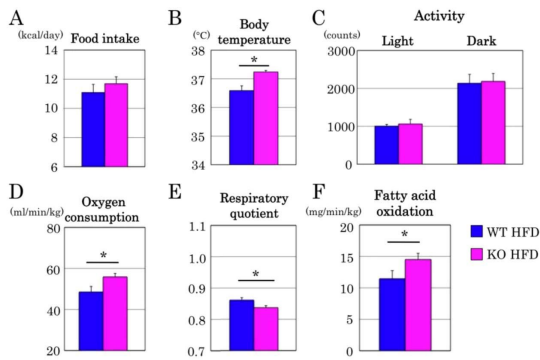


図 3. 野生型と Neudesin 欠損マウスの摂食量(A)、体温(B)、自発運動量(C)、酸素消費量(D)、呼吸商(E)、脂肪酸酸化(F). WT:野生型、KO:Neudesin 欠損、HFD:高脂肪食.

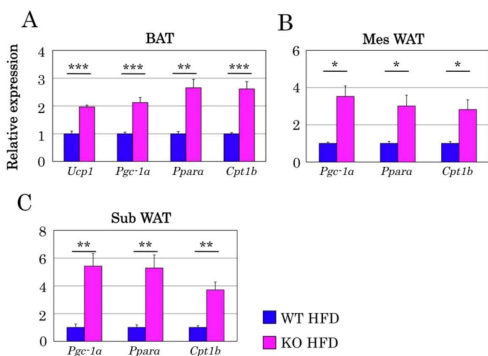


図 4. 野生型と Neudesin 欠損マウスの褐色脂肪組織(A)、白色脂肪組織(B,C)の熱産生、脂肪酸酸化関連遺伝子の発現. WT:野生型、KO:Neudesin 欠損、HFD:高脂肪食.

(5) 高脂肪食飼育時の Neudesin 欠損マウスの交感神経活性の検討

交感神経が活性化するとエネルギー消費も亢進する。高脂肪食飼育時における Neudesin 欠損マウスのエネルギー消費の亢進における交感神経の活性化の寄与を検討した。交感神経の活性を反映する心拍数(図 5A)や褐色脂肪組織における Norepinephrine の含量が増加した(図 5B)。さらに、その血中の Norepinephrine 濃度も増加した(図 5C)。これらの結果から、高脂肪食飼育時において Neudesin 欠損マウスの交感神経が活性化している可能性が示唆された。

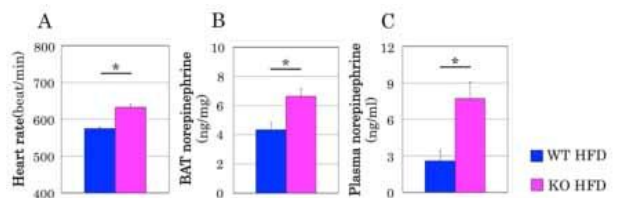


図 5. 野生型と Neudesin 欠損マウスの心拍数(A)、褐色脂肪組織の Norepinephrine 含量(B)血中 Norepinephrine 量(C). WT:野生型、KO:Neudesin 欠損、HFD:高脂肪食.

(6) 高脂肪食飼育時の Neudesin KO マウス視床下部における神経ペプチド遺伝子の発現検討

高脂肪食飼育した WT および Neudesin KO マウスの視床下部における神経ペプチド遺伝子の発現を比較検討した。その結果、いずれの因子に関してもジェノタイプ間で発現に変化は認められなかった(図 6)。

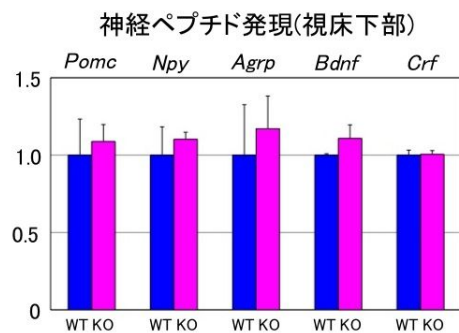


図 6 高脂肪食飼育群の視床下部における神経ペプチド遺伝子発現の解析(WT: 野生型 KO: Neudesin 欠損)

(7) PC12 細胞を用いた neudesin がノルアドレナリン産生に与える影響の検討

ラット副腎髄質由来の PC12 細胞に適切な分化誘導をかけると、交感神経の節後ニューロン様の性質を帯びる<sup>7)</sup>。そこで既報に基づき分化誘導をかけた PC12 細胞に組換え neudesin タンパクを添加したところ、ノルアドレナリン産生の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(Th)の遺伝子発現

が低下した。

<引用文献>

- (1) Hotta, H. Nakamura, M. Konishi, Y. Murata, H. Takagi, S. Matsumura, K. Inoue, T. Fushiki, N. Itoh, Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* 150, 4625-4633 (2009)
- (2) Y. Murata, M. Konishi, N. Itoh, FGF21 as an endocrine regulator in lipid metabolism: from molecular evolution to physiology and pathophysiology. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2011:98 (2011)
- (3) W. Chen, R.L. Hoo, M. Konishi, N. Itoh, P. Lee, H. Ye, K.S.L. Lam, A. Xu, Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 34559-34566 (2011).
- (4) I. Kimura, M. Konishi, A. Miyake, M. Fujimoto, N. Itoh, Neudesin, a secreted factor, promotes neural cell proliferation and neuronal differentiation in mouse neural precursor cells. *J. Neurosci. Res.* 83, 1415-1424 (2006)
- (5) I. Kimura, Y. Nakayama, H. Yamauchi, M. Konishi, A. Miyake, M. Mori, M. Ohta, N. Itoh, M. Fujimoto, Neurotrophic activity of neudesin, a novel extracellular heme-binding protein, is dependent on the binding of heme to its cytochrome b5-like heme/steroid-binding domain. *J. Biol. Chem.* 238, 4323-4331 (2008)

5. 主な発表論等

[雑誌論文] (計7件)

- (1) Ohta H, Konishi M, Kobayashi Y, Kashio A, Mochiyama, T, Matsumura S, Inoue K, Nakao K, Kimura I, Deletion of the neurotrophic factor neudesin prevents diet-induced obesity by increased sympathetic activity. *Sci. Rep.* (査読有) 5, 2015, 10049.  
doi: 10.1038/srep10049.
- (2) Ohta H, Kimura I, Konishi M, Itoh N, Neudesin as a unique secreted protein with multi-functional roles in neural functions, energy metabolism, and tumorigenesis. *Front Mol Biosci* (査読有) 2, 2015, 24.  
doi: 10.3389/fmolb.2015.00024.
- (3) Ohta H, Itoh N, Roles of FGFs as adipokines in adipose tissue development, remodeling, and metabolism. *Front Endocrinol.* (査読有) 5, 2015, 18.  
doi: 10.3389/fendo.2014.00018.
- (4) Di Lisa F, Itoh N, Cardiac Fgf21 synthesis and release: an autocrine loop for boosting up antioxidant defenses in failing hearts. *Cardiovasc Res.* (査読有) 106, 2015, 1-3.  
doi: 10.1093/cvr/cvv050.
- (5) Ornitz D, Itoh N, The fibroblast growth factor signaling pathway. *WIREs Dev Biol.* (査読有) 4, 2015, 215-266.  
doi: 10.1002/wdev.176.
- (6) Itoh N, FGF10: A multifunctional mesenchymal-epithelial signaling growth factor in development, health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* (査読有) 28, 2016, 63-69.  
doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.10.001

(7) Itoh N, Nakayama Y, Konishi M, Roles of FGFs as paracrine or endocrine signals in liver development, health, and disease. *Front Cell Dev Biol* (査読有) 4,2016, 30.  
doi: 10.3389/fcell.2016.00030.

[学会発表] (計4件)

- (1) 太田紘也、櫻尾篤樹、小西守周、伊藤信行、分泌性因子 Neudesin の遺伝子欠損マウスは食餌誘導性肥満に耐性を示す。第19回アディポサイエンス・シンポジウム (2014年8月23日)
- (2) 持山喬之、太田紘也、小西守周、伊藤信行、分泌性因子 neudesin の欠損マウスは、交感神経の亢進により食餌誘導性肥満に耐性を示す。第37回日本分子生物学会(2014年11月25日)
- (3) 太田紘也、小西守周、松村成暢、伊藤信行、神経栄養因子 neudesin の遺伝子欠損マウスは高脂肪食誘導性肥満に耐性を示した。第20回アディポサイエンス・シンポジウム (2015年8月22日)
- (4) 太田紘也、小西守周、橋本大嗣、伊藤信行、分泌性因子 neudesin の遺伝子欠損マウスは交感神経活性の亢進により食餌誘導性肥満に耐性を示す。第38回日本分子生物学会(2015年12月3日)

[図書]

該当無し

[知的財産権]

該当なし

[その他]

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 信行 (ITOH Nobuyuki)

京都大学・薬学研究科・名誉教授

研究者番号: 10110610

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

小西守周 (KONISHI Morichika)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 00322165

太田紘也 (OHTA Hiroya)

神戸薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号: 40638988

(4) 研究協力者

該当なし