

<平成 29 年度助成>

新規視床下部神経ペプチドによる 新たな高カロリー食嗜好性の分子メカニズムの解明

岩越 栄子

(広島大学大学院 総合科学研究科)

背 景

本来、我々ヒトを含めた動物は一定の体重を維持するためのエネルギーホメオスタシスを有しているが、高カロリー食はこのホメオスタシスの破綻を引き起こし、過食を生じさせることが知られている。飽食の現代社会においては、この高カロリー食への嗜好性の分子メカニズムの理解が、過食や肥満防止のために必要不可欠である。一方で、美味しく栄養価の高い食物を摂取したいという本能も存在する。そこで、生活の質の向上のためにも、美味しいものを適量摂る食生活の維持はこれからの高齢社会にとって重要である。

研究代表者らは、独自の研究遂行により、鳥類や哺乳類の間脳視床下部に特異的に発現している遺伝子の探索から、分泌性の長鎖神経ペプチド (Neurosecretory Protein GL: NPGL と命名) をコードする新規の遺伝子を最近発見した¹⁾。また、この遺伝子は、我々ヒトを含めた脊椎動物に広く存在していることも見いだしている。ラットを用いた NPGL の脳室内投与や前駆体遺伝子の過剰発現の解析から、高カロリー食摂餌下において NPGL は摂食行動を顕著に促進させ、早期に肥満を惹起することが分かった²⁾。

以上の背景から、本研究では、NPGL が関与する高カロリー食嗜好性の分子メカニズムを解明することを目的とした。主に哺乳類モデル動物のげっ歯類を用いて、NPGL の生理機能・作用機序の解析を行った。

方 法

実験動物・飼料

実験動物として C57BL/6J 系統の 8 週齢・雄マウスと Wistar 系統の 8 週齢・雄ラットを用いた。

飼料は、普通食として日本クレア社のげっ歯類用の普通食 (15% Fat kcal%, 3.5 kcal/g)、高カロリー食としてリサーチダイエット社のショ糖含有脂肪食 (32% Fat kcal%・20% Sucrose kcal%, 4.4 kcal/g) を用いた。

NPGL の 2 週間の脳室内投与

NPGL は、ペプチド合成機で合成し、マウスでは 3.75 nmol/day、ラットでは 15 nmol/day の投与量になるように溶解し、Alzet 社の浸透圧ポンプに充填した。脳室内投与カニューレを装着し、背側皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプと接続し、2 週間の慢性投与を行った。12 時間の明暗周期条件にて飼育し、毎日、摂食量と体重を測定した。摂食量はカロリー表示とした。また、呼吸代謝量と活動量を測定した。投与開始の 2 週間後に脂肪組織と肝臓をサンプリングし、脂肪合成・酸化・取込・脂肪細胞分化に関係する遺伝子群に関して mRNA 発現量をリアルタイム PCR 装置により測定した。

NPGL の標的部位を解析するために、最初期遺伝子の c-Fos の発現やシグナル伝達に関わるシグナル調節キナーゼ Akt の発現を、NPGL 投与後の脳切片を用いて免疫組織化学的手法を用い解析した。

最後に、NPGL 産生細胞の特徴を解析するために、既知の神経ペプチドに対する抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。

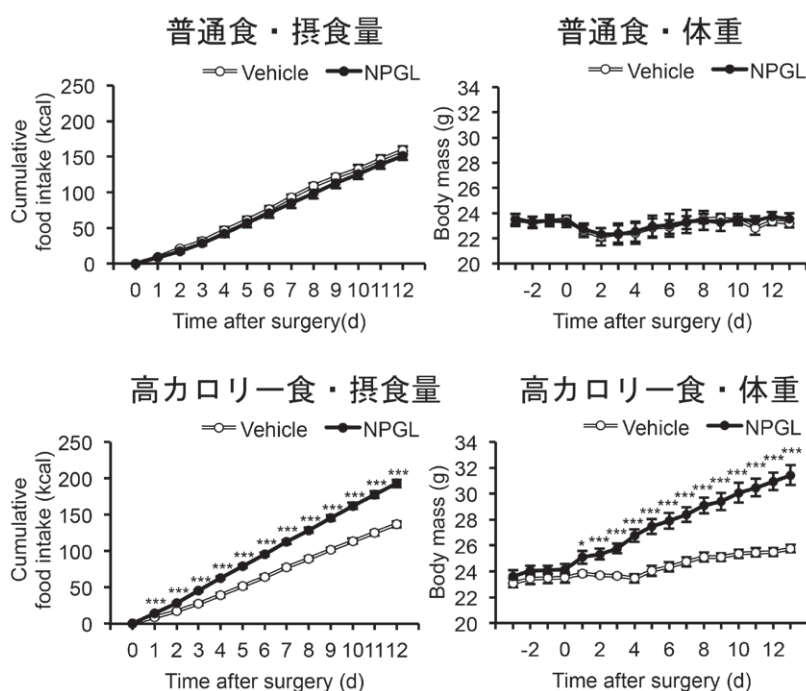


図1 普通食と高カロリー食摂餌下でのNPGL投与による摂食量と体重への影響
累積摂食量(左)と体重変化(右)、Vehicle; 溶媒投与のコントロール群
n=6-8/group, * $P<0.05$, *** $P<0.005$.

結 果

本研究ではマウスとラットを用いて研究を行ったが、紙面の都合上、マウスで得られた結果のみを記す。

NPGL による摂食行動への影響

普通食および高カロリー食摂餌下で、NPGLを2週間脳室内投与したところ、普通食摂餌下では摂食量と体重には変化が認められなかったが、高カロリー食摂餌下では顕著な摂食行動の亢進と体重増加が認められた(図1)。2週間のNPGL投与終了時に脂肪組織と肝臓重量を測定したところ、肝臓重量に変化は認められなかったが、普通食および高カロリー食摂餌下のどちらのNPGL投与群においても、脂肪組織重量が増加した(図2)。体重当たりの脂肪組織重量を見ると、高カロリー食摂餌下で顕著な脂肪蓄積が認められた(図2)。

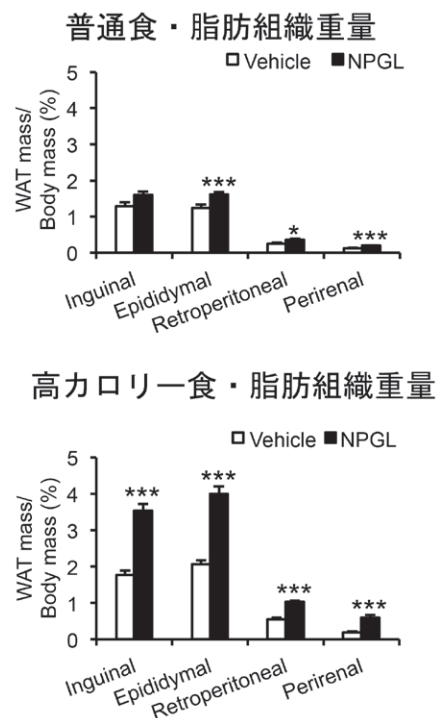


図2 普通食と高カロリー食摂餌下でのNPGL投与による脂肪組織重量への影響
Inguinal; 鼠径部脂肪、Epididymal; 精巣上体脂肪、Retroperitoneal; 後腹膜脂肪、Perirenal; 腎周囲脂肪、Vehicle; 溶媒投与のコントロール群
n=6-8/group, * $P<0.05$, *** $P<0.005$.

NPGL による脂肪合成・酸化・取込および脂肪細胞分化に関する因子への影響

脂肪組織および肝臓組織において、脂肪合成・脂肪酸化・脂肪酸取込等に関する因子の mRNA 発現を解析した。まず、普通食摂餌下では、脂肪組織では有意な変化は認められなかったが、肝臓において、解糖系に関わる酵素である GAPDH の mRNA 発現の上昇が認められた (図 3)。

一方、高カロリー食摂餌下では、脂肪組織で脂肪酸の不飽和化に関わる酵素 SCD1 と脂肪酸化に関わる酵素 CPT1a の mRNA 発現の上昇が認められた (図 4)。肝臓では、脂肪合成に関わる調節因子の ChREBP α 、解糖系の酵素 GAPDH、グルコース輸送に関わる SLC2A2 (GLUT2)、脂肪酸取込に関わる CD36、脂肪細胞分化に関わる PPAR γ の mRNA 発現の上昇が認められた (図 4)。

NPGL によるエネルギー消費および活動量への影響

呼吸代謝装置にて酸素消費量と二酸化炭素排出量を測定し、エネルギー消費量を求めた。その結果、普通食および高カロリー食摂餌共に、NPGL 投与によりエネルギー消費量の減少が認められた (図 5)。加えて、暗期の活動量の低下が認められた (図 5)。

NPGL の標的細胞および産生細胞の形態学的特徴

NPGL の標的細胞を同定する目的で、神経活動の指標となる c-Fos やリン酸化 Akt の発現解析を試みたが、顕著な差を検出することはできなかった。

既知の神経ペプチドに対する抗体を用いた免疫組織化学的解析から、脳腸ペプチドの一つであるガラニンが NPGL 産生細胞の一部で共発現していた (図 6)。

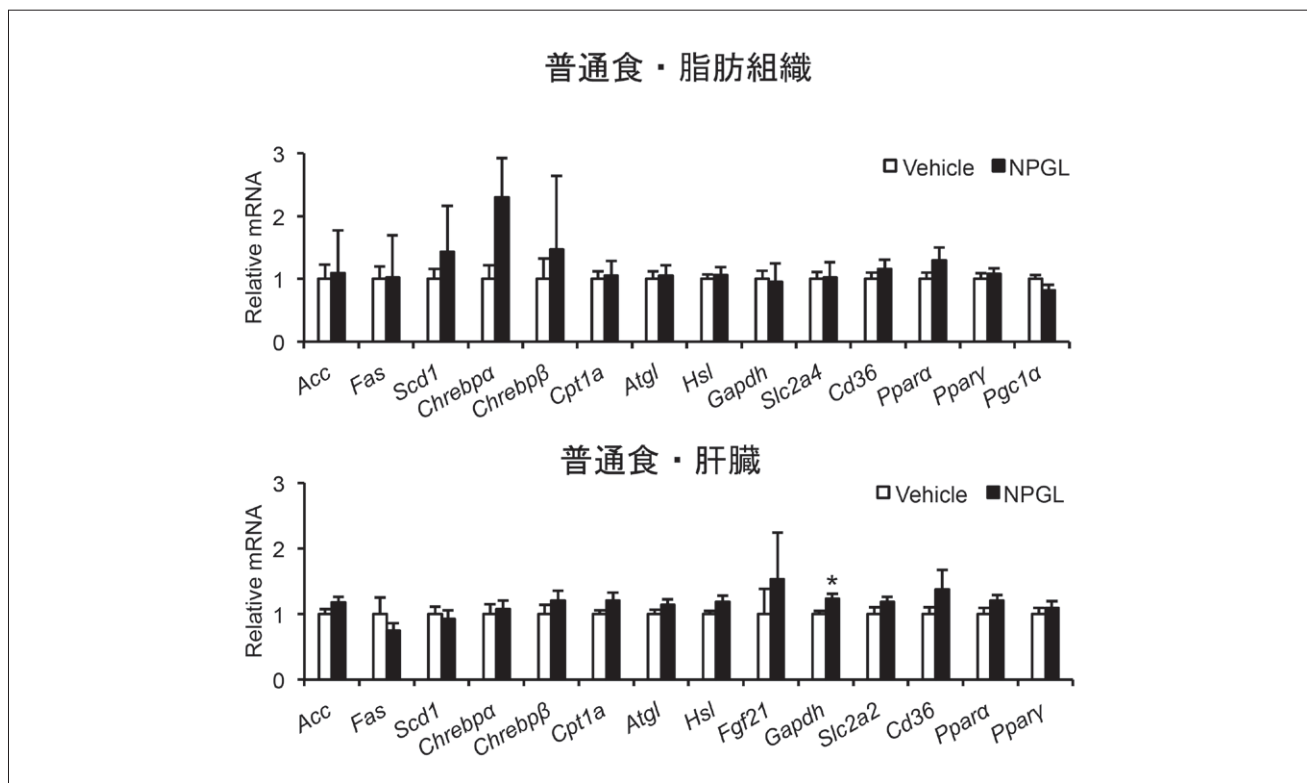


図 3 普通食摂餌下での NPGL 投与による脂肪合成・酸化・取込および脂肪細胞分化に関する因子の mRNA 発現への影響
脂肪組織 (上) と肝臓 (下)、Vehicle; 溶媒投与のコントロール群
n=8/group, *P<0.05

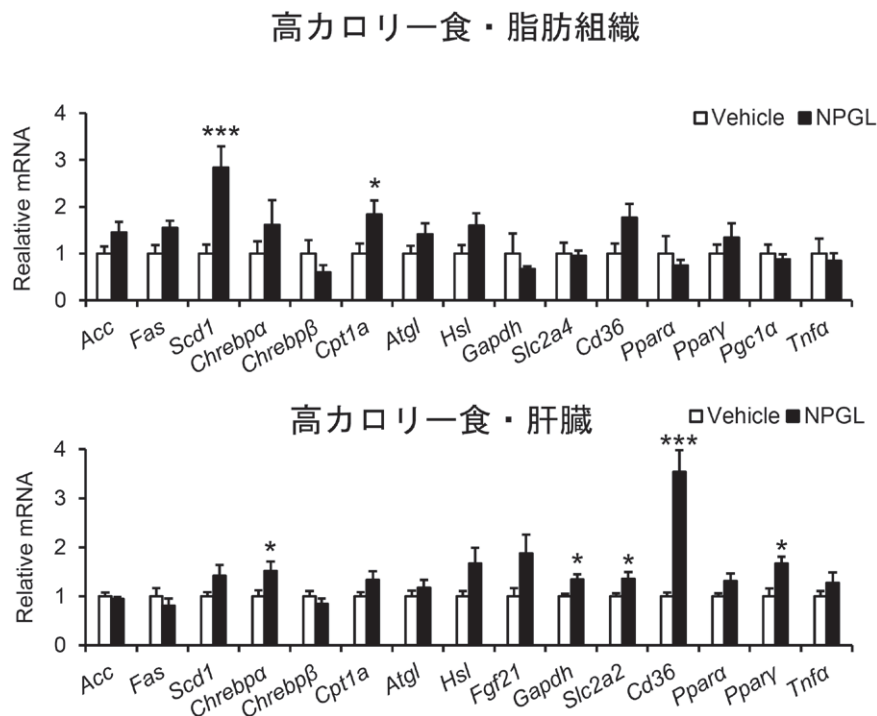


図4 高カロリー食摂餌下での NPGL 投与による脂肪合成・酸化・取込および脂肪細胞分化に関する因子の mRNA 発現への影響
脂肪組織 (上) と肝臓 (下)、Vehicle; 溶媒投与のコントロール群
 $n=6-8/\text{group}$, $*P<0.05$, $***P<0.005$.

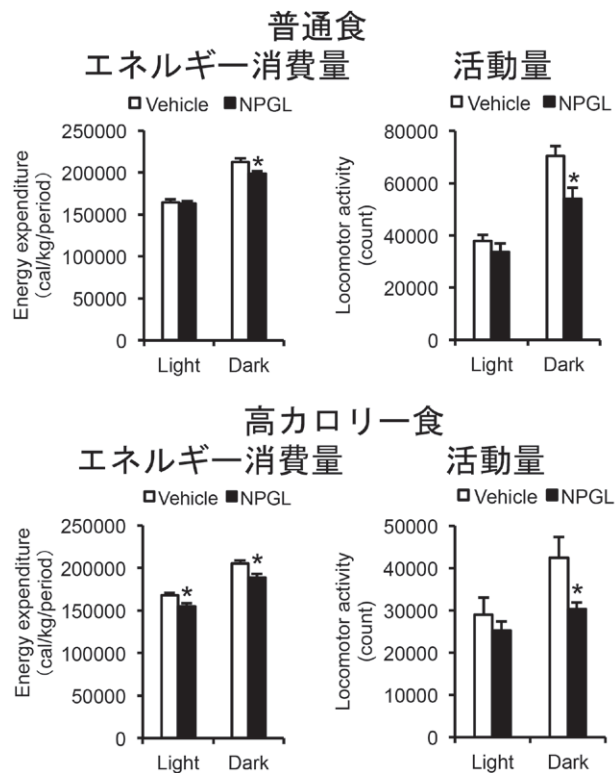


図5 普通食と高カロリー食摂餌下での NPGL 投与によるエネルギー消費量と活動量への影響
エネルギー消費量 (左) と活動量 (右)、Vehicle; 溶媒投与のコントロール群
 $n=5-8/\text{group}$, $*P<0.05$.

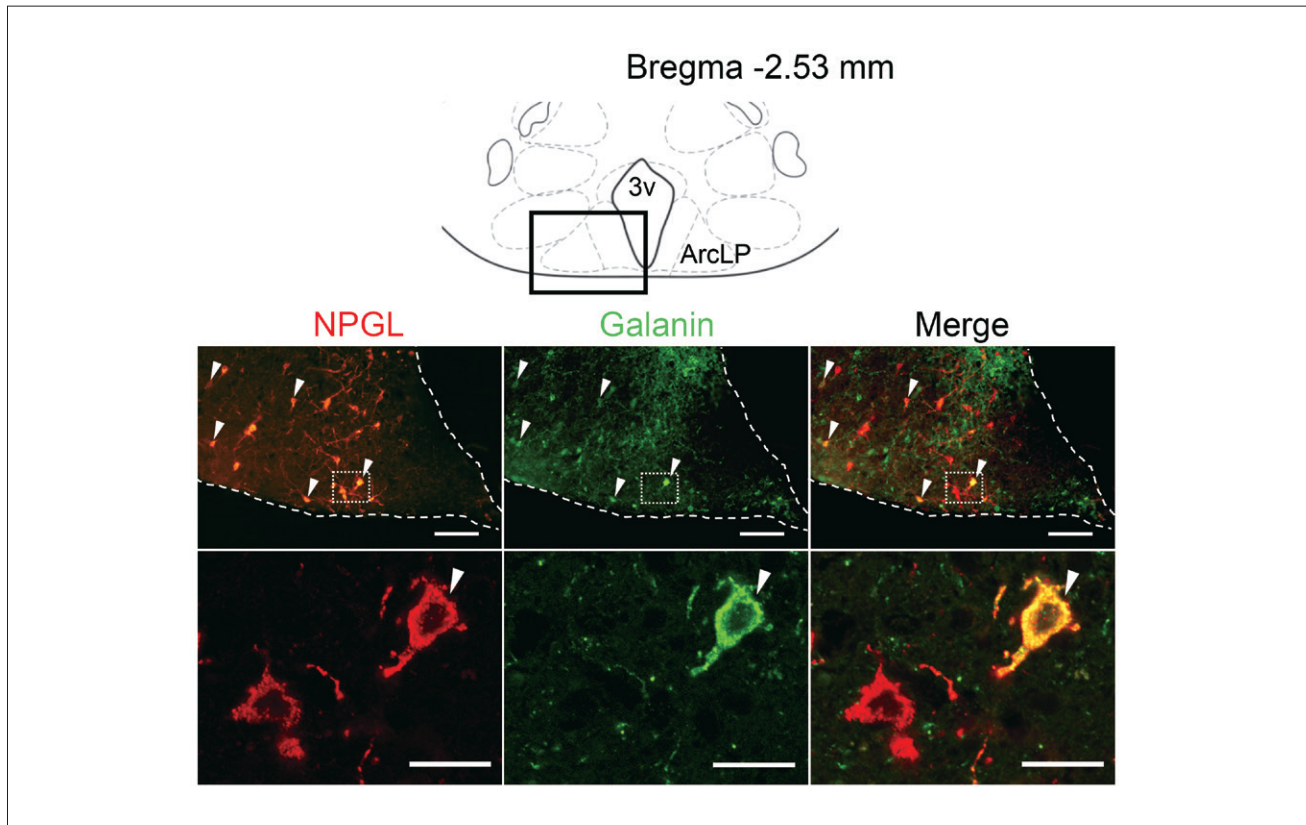


図6 免疫組織化学的解析によるNPGL産生細胞とガラニン産生細胞の検出
視床下部後部領域（イラスト）におけるNPGL（左）およびガラニン（中央）免疫陽性細胞、マージ画像（右）
ArcLP; 弓状核後外側部、3v; 第三脳室
矢頭; 免疫陽性細胞、Scale bars=100 μ m（上段の写真）、10 μ m（下段の写真）

考 察

我々の先行研究であるラットを用いたNPGLの生理機能解析から、NPGLは高カロリー食の摂食量を増加し、早期に肥満を呈することを見いだしている²⁾。今回の研究から、同じげっ歯類であるマウスにおいてもNPGLの高カロリー食への嗜好性が高まることが示された。しかしながら、ラットでは高カロリー食摂餌下でも体重増加はわずかなものであったが（本研究の成果、データ未発表）、マウスでは高カロリー食の摂食行動および体重増加が顕著であることが分かった。特に、肝臓ではなく脂肪組織重量の増加が顕著であった。また、普通食摂餌下では、摂食量・体重増加には変化が認められないものの、脂肪組織重量の増加が認められており、摂食量に依存しない脂肪蓄積のメカニズムの存在が示唆された。これは、同一カロリー摂取でもNPGLが作用すると脂肪が付きやすくなり、体重増加を伴わない隠れ肥満

を引き起こすことを示している。我々ヒトにおける隠れ肥満やサルコペニア肥満の発症メカニズムと関係がある可能性が考えられる。

次に、脂肪組織および肝臓での脂肪合成・酸化・取込および脂肪細胞分化に関する因子の遺伝子発現解析を行ったところ、高カロリー食摂餌下の肝臓において、NPGL投与により、グルコース取込、解糖系、脂肪合成、脂肪酸取込、脂肪細胞分化誘導に関する遺伝子発現の上昇が認められた。肝臓の組織重量には影響がなかったため、これらの遺伝子発現の上昇が、高カロリー食嗜好性の亢進に関与している可能性が考えられる。肝臓からも様々なホルモンが分泌されていることが知られており、これら肝臓が分泌する因子に関しても今後解析を進めていく必要がある。

呼吸代謝および活動量の測定から、普通食および高カロリー食摂餌下のどちらにおいても、エネルギー消費量と活動量の有意な減少が観察された。上述の通り、普通食では摂食量の増加は認められな

かったことから、これらエネルギー消費量と活動量の減少は脂肪蓄積には寄与していると思われるが、高カロリー食嗜好性への影響は小さいものと考えられる。

最後の形態学的解析から、NPGLの標的細胞の特定には至らなかったが、NPGL産生細胞の一部が脳腸ペプチドであるガラニンを産出していることを見いだした。ガラニンは、脂肪食摂取亢進に寄与していることが報告されているため、高カロリー食の中でも脂肪に対する嗜好性が高まり、結果として高カロリー食嗜好性を惹起した可能性がある。今回、ラットでも同様の形態学的解析を行ったところ、マウスと同様にラットにおいてもNPGLとガラニンを共発現する神経細胞の存在を見いだした(データ未発表)。

一方、マウスを用いた我々の先行研究から、NPGLの神経終末が摂食抑制ニューロンであるプロオピオメラノコルチン(POMC)産生細胞に投射していることが示唆されている³⁾。この結果から、NPGLが摂食抑制ニューロンを抑制することで、高カロリー食嗜好性の惹起に関与している可能性が考えられる。今後、NPGL／ガラニン産生細胞とPOMCニューロンの相互作用を解析していく予定でいる。

本研究の成果を要約する。哺乳類のモデル動物であるラットに加え、マウスでもNPGLによる高カロリー食嗜好性の亢進が認められた。同じげっ歯類でもマウスの表現型が強いことが明らかとなり、マウスは高カロリー食嗜好性のための良い実験モデルとなり得ることを見いだした。げっ歯類は哺乳類のモデル動物であり、我々ヒトにおいてもNPGLが高カロリー食嗜好性に関与している可能性がある。NPGL投与により肝臓重量には影響が見られないが、主に脂肪合成・蓄積に関わる因子の遺伝子発現の亢進が認められた。NPGLの肝臓への作用が高カロリー食嗜好性に関与している可能性がある。高カロリー食嗜好性を惹起する脳内作用機序として、先行研究において脂肪摂取亢進因子として知られているガラニンをNPGL産生細胞が産出していることが示された。今回の高カロリー食は高脂肪・高ショ糖からなり、現代社会の飽食を再現している食組成である。我々

が見いだした新規の脳因子であるNPGLの作用機序の解析を進めることで、過食や肥満の発症メカニズムの解明や予防対策に対し、新規の知見を加えることができると考えている。本研究では、そのための足掛かりとなる貴重な基礎的データを得ることができた。

本報告書に記載したマウスの結果は、文献4として公表した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、学術研究助成をいただいた公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に心より感謝申し上げる。

また、本研究の遂行は、所属研究室の浮穴和義博士、鹿野健史朗博士、齋藤鷹也氏、古満芽久美氏、成松勇樹氏、門田惇希氏、後藤春菜氏、カリフォルニア大学バークレー校のLance J. Kriegsfeld博士とGeorge E. Bentley博士らの協力によりなされた。

参考文献

- 1) Ukena K, Iwakoshi-Ukena E, Taniuchi S, Bessho Y, Maejima S, Masuda K, Shikano K, Kondo K, Furumitsu M, Tachibana T. Identification of a cDNA encoding a novel small secretory protein, neurosecretory protein GL, in the chicken hypothalamic infundibulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446:298-303 (2014)
- 2) Iwakoshi-Ukena E, Shikano K, Kondo K, Taniuchi S, Furumitsu M, Ochi Y, Sasaki T, Okamoto S, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Minokoshi Y, Ukena K. Neurosecretory protein GL stimulates food intake, de novo lipogenesis, and onset of obesity. *eLife* 6:e28527 (2017)
- 3) Matsuura D, Shikano K, Saito T, Iwakoshi-Ukena E, Furumitsu M, Ochi Y, Sato M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Neurosecretory protein GL, a hypothalamic small secretory protein, participates in energy homeostasis in male mice. *Endocrinology* 158:1120-1129 (2017)
- 4) Shikano K, Iwakoshi-Ukena E, Saito T, Narimatsu Y, Kadota A, Furumitsu M, Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Ukena K. Neurosecretory protein GL induces fat accumulation in mice. *J. Endocrinol.* 244:1-12 (2020)

Study on the regulatory mechanism of food preference for a high calorie diet by a novel hypothalamic neuropeptide, neurosecretory protein GL

Eiko IWAKOSHI

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

We recently discovered a novel gene encoding a hypothalamic neuropeptide, neurosecretory protein GL (NPGL), which stimulates feeding behavior toward a high calorie diet and fat accumulation in rodents. These findings suggest that the dysregulation of NPGL contributes to obesity and metabolic disease. To explore the regulatory mechanism of food preference for a high calorie diet, we investigated the impact of prolonged exposure to NPGL through 2 weeks of chronic intracerebroventricular infusion, and examined food preference, body composition, expressions of lipid metabolic factors, respiratory metabolism, and locomotor activity in mice and rats fed a standard chow diet and a high calorie diet. Under the standard chow diet, NPGL increased white adipose tissue mass without affecting feeding behavior or body mass. In contrast, when fed a high calorie diet, NPGL stimulated feeding behavior and increased body mass concomitant with marked fat accumulation. A quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed that the mRNA expressions of key enzymes and related factors involved in lipid metabolism were increased in the liver. Likewise, analyses of respiratory metabolism and locomotor activity revealed that both energy expenditure and locomotor activity were significantly decreased by NPGL. In addition, an immunohistochemical analysis revealed that NPGL-containing cells produce galanin, a neuropeptide that stimulates fat intake. Taken together, these results provide further support for NPGL as a novel regulator of feeding under a high calorie diet.

