

厚生科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

平成11年度 報 告 書

生活習慣病の中樞制御に関する研究（H10-長寿-005）

主任研究者 木山 博資（旭川医科大学）

生活習慣病の中樞制御に関する研究

主任研究者 木山 博資 旭川医科大学・教授

肥満、高血圧、脂質・糖代謝障害などのいわゆる生活習慣病と類似の病態を示すボンベシン受容体BRS-3欠損マウスにおいて味覚学習が障害されていること、個別飼育時により体重増加・過食を示し社会的反応が変化することを見いだした。ニューロテンシン受容体(NTR)のうちNTR1に続きNTR2欠損マウス作製が進行中である。また、視床下部に豊富で神経特異的な新規遺伝子の機能解析の結果、メタロエンドペプチダーゼであることが明らかになった。本遺伝子は、神経損傷により強い発現誘導がかかり、活性酸素の消去系酵素群を賦活化し活性酸素による細胞死を抑制することも明らかになった。本遺伝子の欠損動物は生直後に死亡するため、新たなコンストラクトを用いた欠損動物の作製に取り掛かった。さらに、アデノウイルスベクターを用いた神経特異的遺伝子導入法を開発した。

分担研究者

和田 圭司（国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部・部長）

A. 研究目的

加速的な超高齢化に向かっている日本の社会にとって、高齢者が健康で活力ある生活を送るためには、加齢に伴って多くの人が直面し寿命に多大な影響を及ぼす疾病、成人病を克服しなければならない。肥満、高血圧、脂質・糖代謝障害などのいわゆる成人病は生活習慣にもその原因があるとされ、「生活習慣病」とも云うことができる。最近の遺伝子欠損動物を用いた研究から、脳に局限するペプチド受容体のファミリーメンバーを欠損させると、「生活習慣病」の症状を呈する動物が得られることが明らかになってきた。このことはいわゆる成人病の原因として中枢由来のファクターが関与していること、すなわち神経ペプチドを中

心とした中枢制御の存在が明らかになったことである。脳の老化・加齢により中枢制御がうまく作動しなくなることが、成人病を惹起もしくは増悪させる一つの要因ではないかとの仮説が立てられる。本研究ではこのような仮説に基づいて成人病の中樞制御のメカニズムを解明することにある。解明の糸口として本研究組織で得られたBRS-3欠損動物が有効であると考えられる。また、神経特異的に局在し、かつニューロペプチドに関連する分子を新たに同定し、生活習慣病の中樞制御の新たな機構を解明し、それをモデル動物として生活習慣病の新しい治療法を開発を行うことも目的の一つである。このため3年に及ぶ申請期間のうち2年目にあたる平成11年度は、摂食との関連性が指摘されているボンベシン受容体BRS-3欠損動物の行動学的解析、第2のニューロテンシン受容体NTR2の欠損動物の作製などを進めるとともに、遺伝子探索

により得られた視床下部に局在する新規分子の機能探索と欠損モデル動物の作成を行った。

B. 研究方法

1. ボンベシン受容体の解析を通じた生活習慣病の分子機序解明及び予防・治療薬の開発

1) BRS-3の内因性リガンド並びにBRS-3機能に関連した遺伝子群の同定

生化学的アプローチの他、BRS-3欠損マウスと野生型間でRAP-PCR法などによるdifferential screeningを行った。

2) BRS-3欠損マウスの味覚選好性試験

甘味・苦味・塩味・酸味に対して2瓶法で行った。24時間にわたる全飲水量（水道水+試験液）中の試験液の占める割合を選好率として算出し比較した。

3) BRS-3欠損マウスの条件性味覚嫌悪学習試験

条件刺激として甘味：サッカリン水溶液、塩味：塩化ナトリウム溶液の摂水を使用し無条件刺激として塩化リチウムの腹腔内注射を使用した。2日間の条件付け試行に続いてテスト試行を行った。嫌悪得点は（テスト試行における条件刺激水溶液摂取量）÷（テスト試行における条件刺激水溶液摂取量+1回目の条件付け試行における条件刺激水溶液摂取量）で算出した。

4) BRS-3欠損マウスの個別飼育試験

個別飼育した際の摂食量、体重増加、自発活動性を集団飼育の場合と、並びに野生型マウスの場合と比較した。自発活動性は赤外線ビーム式の活動量測定装置を使用して測定した。また個別飼育したBRS-3欠損マウスの社会相互作用をレジデント・侵入者法により測定し同じく個別飼育した野生型マウスのスコアと比較した。

2. ニューロテンシン受容体の生体機能の

解明と老化研究への応用

1) ニューロテンシン受容体（NTR2）欠損マウスの作製

129系統由来ES細胞E14を使用し常法に従って相同組み換えES細胞を選別し、blastocyst injection法でキメラマウスを作製した。キメラマウスとC57BL/6Jマウスとの交配によりヘテロマウスを作製した。

3. 視床下部に局在する新規遺伝子の解析

1) 新規遺伝子のプロテアーゼ活性の検定

2) 神経細胞損傷による遺伝子発現誘導

3) 遺伝子欠損動物の作製

4) 新たな遺伝子欠損動物作製のためのベクターコンストラクトの構築

4. アデノウイルスを用いた神経特異的遺伝子導入系の確立。SCG10プロモーターの下流でCreを発現させるアデノウイルスコンストラクトを構築した。

（倫理面への配慮）

本研究ではヒトを対象としない。また、実験動物の取り扱い旭川医科大学及び国立精神神経センターの動物取り扱い規程に準じた。

C. 研究結果

1. ボンベシン受容体について

1) BRS-3の内因性リガンド並びにBRS-3機能に関連した遺伝子群の解析において、特定分子の同定には至らなかった。

2) BRS-3欠損マウスの味覚選好性において、甘味に対する選好性、苦味に対する嫌悪性が亢進していた。

3) BRS-3欠損マウスの条件性味覚嫌悪学習については、BRS-3欠損マウスでは野生型に比してサッカリンテスト、塩化ナトリウムテストともに嫌悪得点が低下していた。

4) BRS-3欠損マウスの個別飼育試験では、野生型マウスとは対照的に個別飼育条件下における摂食量が集団飼育の場合に比べて

多く体重増加も著しかった。また、個別飼育では野生型マウスで見られる自発活動性の亢進がBRS-3欠損マウスで認められず社会的相互作用も低回していた。

2. ニューロテンシン受容体について

1) ニューロテンシン受容体 (NTR2) 欠損マウスを作製するための相同組み換えES細胞を得、キメラマウスの作製にも成功した。

3. 新規遺伝子について

1) 本遺伝子はメタロエンドペプチダーゼであった。

2) 各種の神経細胞の損傷に対して発現が著しく亢進することが明らかになった。これより、本分子をDamage Induced Neuronal Endopeptidase (DINE)と命名した。

3) DINEの過剰発現により活性酸素消去系が賦活化し、活性酸素による神経細胞死防御の効果があることが明らかになった。

4) 本遺伝子の欠損動物は生後直ちに死に至ることから、これを回避しうる新たな欠損動物の作製のためのベクターコンストラクトの構築を開始した。

4. 遺伝子導入について

アデノウイルスベクターによる脳内への遺伝子導入系を確立した。さらに神経特異的遺伝子導入をめざすため、SCG10プロモーター下でcreを発現させることができるアデノウイルスベクターを作製した。

D. 考察

血圧・エネルギー収支など生体の恒常性の維持に生理活性ペプチドが重要な役割を担っていることは周知であり、この異常が生活習慣病を惹起する一因と考えられる。数多くのペプチドのなかでボンベシンやニューロテンシン及びその受容体については特異的アンタゴニストの不足や生理作用の多様性のために研究が遅れていた。しかし分担

研究者の和田は遺伝子欠損マウスの作製を通してBRS-3がエネルギー収支、血圧維持において実は極めて重要な分子であることを世界に先駆けて示した。BRS-3の内在性リガンドは未だ不明であるがその同定は抗肥満薬の開発に直結する成果を生み出す可能性が高い。今年度の研究ではBRS-3リガンドの同定には至らなかったが、BRS-3欠損マウスの行動学的解析から、BRS-3欠損マウスにおいて味覚嗜好性に変化が生じていること、味覚嫌悪条件づけの形成が促進されていることが明らかとなった。肥満と味覚反応性の変化が互に関連していることが考えられる。また、個別飼育のBRS-3欠損マウスがより過食ならびに体重増を示し、さらに自発活動性の亢進を示さず社会的相互作用も低下することを見出したが、ヒト肥満においても社会的刺激の剥奪が肥満を形成する因子の一つであるかもしれないという可能性を示す貴重な結果である。

ニューロテンシン受容体についてはその生理作用は不明の点が多い。NTR2欠損マウスの作出がいよいよ可能になったことで、既に作製されたNTR1欠損マウスと合わせその表現型を解析するとことで中枢機能におけるニューロテンシンシステムの役割の解明が進むと考えられる。

生活習慣病の中枢制御にとって最も重要な領域である視床下部に特異的に発現し、メタロエンドペプチダーゼ様活性を有する新規遺伝子(DINE)は、神経ペプチドのコンバーティングやプロセッシングに極めて重要な役割を有するものと考えられる。現在のところ、内因性の基質が不明であるが、神経損傷に対する強い発現応答性が明らかになった。サブスタンスPやガラニン、CGRPなど神経ペプチドの発現が神経系の障害に対して同様に応答することから、DINEがこれらのペプチドのプロセッシン

グ過程でなんらかの機能を果たしている可能性が高い。また、DINEは酸化ストレスの防御に貢献していることが示唆された。DINEが脳梗塞などのいわゆる生活習慣病関連の病態に関与していることは興味深く、脳を守るの観点からも今後の機能解析が急がれる。

通常の方法によるDINEの遺伝子ノックアウトは、生直後に死に至るため、成熟期になってから発症する生活習慣病の解析には適用できない。従って、成熟期になってから発現をOFFにするようなメカニズムが必要となる。そこで、いわゆるコンディショナルなノックアウトマウスを作成すべく戦術を変更した。Cre-loxPの系を用いることにより、活性部分のみを成熟動物で欠損させることを計画している。DINEが神経細胞で特異的に発現することから、Creを神経特異的に発現させることで神経選択的にノックアウトが可能になる。このため、神経特異的プロモーターであるSCG10のプロモーターを採用し、下流にcreをコードしたアデノウイルスベクターの構築を行った。本ウイルスの使用により神経系特異的に発現させることに成功し、今後の解析に十分適応できることが明らかになった。

E. 結論

新規の生活習慣病モデルマウスであるBRS-3欠損マウスにおいて味覚学習が障害されていること、個別飼育時により体重増・過食を示し社会的反応性が変化していることを見出した。味覚学習性の変化、社会的反応性の変化が肥満形成に寄与した可能性が示された。DINEは視床下部での神経ペプチドのコンバーティングやプロセッシングに関与するものと考えられ、神経損傷時に強い発現誘導がかかるだけでなく、活性酸素の消去系を賦活化することにより、細

胞死防御に働いていることが明らかになった。本分子の機能をさらに解明することにより、生活習慣病や関連疾患の新たな治療や予防につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, K., Wada, E., Imaki, J., Ohki-Hamazaki, H. and Wada, K., Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3 deficient) mice. **Physiol. Behav.**, 66, 863-867, 1999

Hotta, K., Matsukawa, Y., Nishida, M., Kotanai, K., Takahashi, M., Kuriyama, H., Nakamura, T., Wada, K., Yamashita, S., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y., Mutation in bombesin receptor subtype-3 is not a major cause of obesity in Japanese. **Horm. Metab. Res.**, in press

Yamada, K., Ohki-Hamazaki, H. and Wada, K., Differential effects of social rearing upon body weight, food consumption and responsiveness to novel and social environment in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice. **Physiol. Behav.**, in press

Namikawa K, Honma M, Abe K, Takeda M, Mansur K, Obata t, Miwa A, Okado H, Kiyama H (2000) Akt / Protein kinase B prevents injury-induced motor neuron death and accelerates axonal regeneration. **J. Neurosci.** 20:2875-2886.

Takano R, Hisahara S, Namikawa K, Kiyama H, Okano H, Miura M (2000) Nerve growth factor protects oligodendrocytes from TNF-a-induced injury through Akt-mediated signaling mechanisms. **J Biol Chem** in press

Kato H, Allen N, Emson PC, Kiyama H (2000) GAP-43 N-terminal translocation signal targetss beta-galactosidase to developing axons in a pan-neuronal transgenic mouse line. **Dev. Brain Res.** In press.

Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K,

Kiyama H, Miyake S, Tohyama M (1999) Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. **J. Neurochem** 73:2037-2046

Osako Y, Koike K, Kiyama H, Sakamoto Y, Masuhara K, Segawa T, Inoue M, Murata Y (1999) Insulin-induced hypoglycemia activates a chemokinergic neuronal pathway in the hypothalamo-pituitary system. **Neuropeptides** 33:271-275

Morihara T, Tanabe K, Yoneda T, Tanaka T, Kudo T, Gomi F, Kiyama H, Imaizumi K, Tohyama M, Takeda M (1999) IPP isomerase, an enzyme of mevalonate pathway, is preferentially expressed in postnatal cortical neurons and induced after nerve transection. **Mol Brain Res** 67:231-238

Tsujino H, Mansur K, Kiryu-Seo S, Namikawa K, Kitahara T, Tanabe K, Ochi T, Kiyama H (1999) Discordant expression of c-Ret and GDNF receptor alpha-1 mRNAs in response to motor nerve injury in neonate rats. **Mol. Brain Res.** 70:298-303

Li BS, Su QN, Kiyama H, Miki N, Robinow DR, Zhang L (1999) Expression of Gicerin, a novel cell adhesion molecule, is upregulated in the astrocytes after hypoglossal nerve injury in rats. **Neurosci. Lett.** 260:149-152.

Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Kimoto M, Emson PC, Kiyama H (1999) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) as a nerve injury associated molecule: The mRNA localization in the rat brain and its coincident up-regulation with neuronal NO synthase (nNOS) in axotomized motor neurons. **Eur. J. Neurosci.** 11:2160-2166.

和田圭司、和田恵津子：ボンベシンと食欲抑制、**BIOclinica**、14, 1224-1228, 1999

和田圭司、和田恵津子：ボンベシン受容体と肥満、**肥満研究**、5, 134-137, 1999

山田一之、和田圭司：遺伝子操作動物にお

ける情動・行動異常、**脳の科学**、21, 1109-1114, 1999

2. 学会発表

和田圭司: 受容体ノックアウト：ボンベシン受容体と摂食・行動. 日本生化学会関東支部会シンポジウム, 東京, 4. 10, 1999

和田圭司: ボンベシン受容体と肥満. 第72回日本内分泌学会学術総会シンポジウム, 横浜, 6. 2, 1999

木山博資、損傷神経細胞に見られる生存のための応答、第22回日本神経科学大会、イブニングフォーラム、大阪、7月6日1999年
瀬尾寿美子、佐々木雅彦、平山光久、中込咲綾、木山博資、神経損傷応答遺伝子DINEの同定、第22回日本神経科学大会、大阪、7月6日1999年

瀧川一彦、本間大、阿部浩史、K. Mansur、小幡達夫、三輪昭子、岡戸晴生、木山博資、活性型Akt発毛遠組換えアデノウイルスベクターによる傷害運動ニューロンの細胞死防御、第22回日本神経科学大会、大阪、7月6日1999年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病の中樞制御に関する研究

分担研究者 和田 圭司 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第四部長

ボンベシン、ニューロテンシンなど摂食との関連性が指摘されている神経ペプチド及びその受容体に焦点を当て、生活習慣病の中樞制御の分子機構解明に向けた研究を展開した。ボンベシンに関して本年度は新規の生活習慣病モデルマウスである BRS-3 欠損マウスにおいて味覚学習が障害されていること、個別飼育時により体重増・過食を示し社会的反応性が変化することを見出した。味覚学習性の変化、社会的反応性の変化が肥満形成に寄与した可能性が考えられる。ニューロテンシンについては NTR1 欠損マウスに加えて NTR2 欠損マウス作製の準備を行った。

A. 研究目的

本研究では3年の申請期間中に肥満、高血圧、糖尿病など生活習慣に密接に関連した疾患（生活習慣病）の中樞性制御機構について新たな知見を導き出し、さらに予防・治療薬開発の前身となる物質（リード物質）を見つけだすことを目標とする。そのため、ボンベシン、ニューロテンシンなど摂食との関連性が指摘されている神経ペプチド及びその受容体に焦点を当てた研究を展開する。分担研究者の和田はこれまでにボンベシン受容体サブタイプ3（BRS-3）欠損マウスが肥満、高血圧、糖代謝異常を呈することを見だし（Nature, 390, 165, 1997）、BRS-3 が中樞性の生活習慣病関連の新たな制御因子であることを同定している。なおボンベシン受容体には BRS-3 の他ニューロメジン B 受容体、ガストリン放出ペプチド受容体が存在する。ニューロテンシン受容体には高親和性（NTR1）と低親和性

（NTR2）の2種の受容体の存在が知られている。

B. 研究方法

1. ボンベシン受容体の解析を通じた生活習慣病の分子機序解明及び予防・治療薬の開発

1) BRS-3 の内因性リガンド並びに BRS-3 機能に関連した遺伝子群の同定

生化学的アプローチの他、BRS-3 欠損マウスと野生型間で RAP-PCR 法などによる differential screening を行った。

2) BRS-3 欠損マウスの味覚選好性試験

甘味・苦味・塩味・酸味に対して2瓶法で行った。24 時間にわたる全飲水量（水道水+試験液）中の試験液の占める割合を選好率として算出し比較した。

3) BRS-3 欠損マウスの条件性味覚嫌悪学習試験

条件刺激として甘味：サッカリン水溶液、塩味：塩化ナトリウム溶液の摂水を

使用し無条件刺激として塩化リチウムの腹腔内注射を使用した。2日間の条件付け試行に続いてテスト試行を行った。嫌悪得点は(テスト試行における条件刺激水溶液摂取量) ÷ (テスト試行における条件刺激水溶液摂取量 + 1回目の条件付け試行における条件刺激水溶液摂取量) で算出した。

4) BRS-3 欠損マウスの個別飼育試験

個別飼育した際の摂食量、体重増加、自発活動性を集団飼育の場合と、並びに野生型マウスの場合と比較した。自発活動性は赤外線ビーム式の活動量測定装置を使用して測定した。また個別飼育した BRS-3 欠損マウスの社会相互作用をレジデント・侵入者法により測定し同じく個別飼育した野生型マウスのスコアと比較した。

2. ニューロテンシン受容体の生体機能の解明と老化研究への応用

1) ニューロテンシン受容体 (NTR2) 欠損マウスの作製

129 系統由来 ES 細胞 E14 を使用し常法に従って相同組み換え ES 細胞を選別し、blastocyst injection 法でキメラマウスを作製した。キメラマウスと C57BL/6J マウスとの交配によりヘテロマウスを作製した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象としない。また、実験動物の取り扱いについては、国立精神神経センターの動物実験指針に準じた。

C. 研究結果

1. ボンベシン受容体について

1) BRS-3 の内因性リガンド並びに BRS-3 機能に関連した遺伝子群の解析
特定分子の同定には至らなかった。

2) BRS-3 欠損マウスの味覚選好性

甘味に対する選好性、苦味に対する嫌悪性が BRS-3 欠損マウスで亢進していた。

3) BRS-3 欠損マウスの条件性味覚嫌悪学習

BRS-3 欠損マウスでは野生型に比してサッカリンテスト、塩化ナトリウムテストともに嫌悪得点が低下していた。即ち BRS-3 欠損マウスでは条件性味覚嫌悪学習の増強が認められた。

4) BRS-3 欠損マウスの個別飼育試験

BRS-3 欠損マウスでは野生型マウスとは対照的に個別飼育条件下における摂食量が集団飼育の場合に比べて多く体重増加も著しかった。また、個別飼育では野生型マウスで見られる自発活動性の亢進が BRS-3 欠損マウスで認められず社会的相互作用も低回していた。

2. ニューロテンシン受容体について

1) ニューロテンシン受容体 (NTR2) 欠損マウスの作製

相同組み換え ES 細胞を得ることが出来キメラマウスの作製にも成功した。

D. 考察

生活習慣病の克服をめざして各研究機関、製薬企業等で盛んに研究が行われているがまだ対症療法の域を出ていないといっても過言でなく課題も多い。血圧、エネルギー収支、など生体の恒常性の維持に生理活性ペプチドが重要な役割を担っていることは周知でペプチドを題材にした研究も数多く展開されている。その中でボンベシンやニューロテンシン及びその受容体については特異的アンタゴニストの不足や生理作用の多様性のために研究が遅れていた。しかし分担研究者の和田は遺伝子欠損マウスの作製を通して

BRS-3 がエネルギー収支、血圧維持において実は極めて重要な分子であることを世界に先駆けて示した。BRS-3 の内在性リガンドは未だ不明であるがその同定は抗肥満薬の開発に直結する成果を生み出す可能性が高い。今年度の研究では BRS-3 リガンドの同定には至らなかったが次年度以降も引き続き精力的にその探索を行う予定である。他方、BRS-3 の機能に関連し BRS-3 欠損マウスにおいて行動学的解析からとられた所見は注目に値する。即ち BRS-3 欠損マウスにおいて甘いものをより好むなど味覚選好性に変化が生じていること、味覚嫌悪条件づけの形成が促進されていることが明らかとなった。肥満と味覚反応性の変化が互いに関連していることを示す結果である。ヒト肥満患者においておいしさに対する過剰反応が報告されているが今後学習性の嫌悪においてもマウスと同様な過剰反応性があるかどうか検討することは意味があると考えられる。また、個別飼育の BRS-3 欠損マウスがより過食ならびに体重増を示し、さらに自発活動性の亢進を示さず社会的相互作用も低下することを見出したが、ヒト肥満においても社会的刺激の剥奪が肥満を形成する因子の一つであるかもしれないという可能性を示す貴重な結果である。

ニューロテンシン受容体についてはその生理作用は不明の点が多い。NTR2 欠損マウスの作出がいよいよ可能になったことで、既に作製された NTR1 欠損マウスと合わせその表現型を解析するとことで中枢機能におけるニューロテンシンシステムの役割の解明が進むと考えられる。

E. 結論

新規の生活習慣病モデルマウスである BRS-3 欠損マウスにおいて味覚学習が障害されていること、個別飼育時により体重増・過食を示し社会的反応性が変化していることを見出した。味覚学習性の変化、社会的反応性の変化が肥満形成に寄与した可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada, K., Wada, E., Imaki, J., Ohki-Hamazaki, H. and Wada, K., Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3 deficient) mice. *Physiol. Behav.*, 66, 863-867, 1999

Hotta, K., Matsukawa, Y., Nishida, M., Kotanai, K., Takahashi, M., Kuriyama, H., Nakamura, T., Wada, K., Yamashita, S., Funahashi, T. and Matsuzawa, Y., Mutation in bombesin receptor subtype-3 is not a major cause of obesity in Japanese. *Horm. Metab. Res.*, in press

Yamada, K., Ohki-Hamazaki, H. and Wada, K., Differential effects of social rearing upon body weight, food consumption and responsiveness to novel and social environment in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice. *Physiol. Behav.*, in press

和田圭司、和田恵津子：ボンベシンと食欲抑制、*BIOClinica*, 14, 1224-1228, 1999

和田圭司、和田恵津子：ボンベシン受容体と肥満、*肥満研究*, 5, 134-137, 1999

山田一之、和田圭司：遺伝子操作動物における情動・行動異常、*脳の科学*, 21, 1109-1114, 1999

2. 学会発表

和田圭司: 受容体ノックアウト: ポンベシン受容体と摂食・行動. 日本生化学会関東支部会シンポジウム, 東京, 4. 10, 1999

和田圭司: ポンベシン受容体と肥満. 第72回日本内分泌学会学術総会シンポジウム, 横浜, 6. 2, 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生活習慣病の中枢制御に関する研究

分担研究者 木山 博資 旭川医科大学・教授

生活習慣病の中枢制御にとって最も重要な領域と考えられる視床下部に極めて豊富で、しかも神経系以外の組織には発現が見られない新規遺伝子の機能解析を進めた。人工ペプチドを基質として用いた薬理的な解析により、本遺伝子はメタロエンドペプチダーゼであり、神経細胞への傷害により発現が誘導されることが明らかになった。通常の方法による本遺伝子の欠損動物作成を試みたが、解剖学的な表現型の変化は全く見られないものの生直後に致死となる。このことから、本欠損動物は成熟期における生活習慣病の解析には適さないことが判明した。そこで、コンディショナルなノックアウトベクターの構築を新たに開始した。また、アデノウイルスによる遺伝子導入については、神経選択的に導入できる系の開発を行った。

A. 研究目的

肥満・高血圧・糖尿病などに代表される生活習慣に密接に関連した疾患、いわゆる生活習慣病の中枢制御機構の解明と、そのメカニズムから生活習慣病の新たな切れ目の治療法の開発を行うことが本研究の目標である。従来の研究より、これら生活習慣病と類似の病態を示すモデルとして、ボンベシン受容体やNPY、レプチン、オレキシンなどの、視床下部のニューロペプチドやその受容体の欠損マウスがある。このことから、今までに機能がよくわかっていなかった視床下部を中心に局在するニューロペプチド群が一躍脚光を浴びるに至った。我々の戦略は、生活習慣病の中枢制御の最も重要な中枢と考えられる視床下部に極めて特異的に局在し、かつニューロペプチドに関連する分子を同定し、生活習慣病の中枢制御の新たな機構を解明し、それをモデル動物として生活習慣病の新しい治療法の開発を行うことにある。このため3年に及ぶ申請期間のうち2年度目にあたる平成11年度

は、遺伝子探索により得られた遺伝子の機能探索と欠損モデル動物の作成をめざし、新規分子の薬理的な機能解析と発現制御について検討した。さらに、従来型の手法による遺伝子欠損動物の作成を行った。また、本遺伝子は特に視床下部の神経細胞に特異的に発現していることから、将来の遺伝子治療を視野に入れ、神経特異的な遺伝子発現を行う系の開発も試みた。

B. 研究方法

1) 新規遺伝子の機能解析

得られた新規遺伝子のアミノ酸配列より、本分子はメタロプロテアーゼであると予想されたので、発光型人工ペプチド基質のZ-Gly-Gly-Leu-pNAを用いプロテアーゼ活性を検討した。また、メタロプロテアーゼの阻害剤であるEDTA, Phosphoramidon, 1,10-phenanthroline, thiorphanなどを用いて活性の変化を解析した。細胞傷害に対する機能解析には、COS細胞を用いC2-ceramideによる細胞死を誘発し、新規遺伝子の発現

の有無による細胞の生存率を計測した。また、脳の外傷や虚血、浸透圧ストレス、拘束ストレスなどに対する新規遺伝子の発現応答をin situハイブリダイゼーション法により検討した。

2) ノックアウトベクターコンストラクトの構築と欠損マウスの作成。

得られた遺伝子構造をもとに、コンベンショナルなノックアウトを目指しポジティブ・ネガティブセレクション、PCRスクリーニングなど行えるよう計画した。標的組換えを起こしたES細胞のクローン化を行い、定法に従いブラストシストへの注入、キメラマウスの作成を行った。また、新たにCre-loxPシステムを導入したコンディショナルなノックアウトのベクターコンストラクトの構築を行った。

3) 遺伝子導入法の開発

以前より我々が行ってきた遺伝子の効率良い神経細胞への導入法に関して、アデノウイルスが最も効率良く神経細胞に導入することができたので、これを用いての遺伝子導入を検討した。また、発現制御を可能にするために、Cre-loxPを用いたコンストラクトの作成を試みた。さらに、神経特異的な発現を試みるために、Creを発現するベクターのプロモーターとして、SCG10のプロモーターを採用した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒトを対象としない。また、実験動物の取り扱いについては、旭川医科大学の動物取り扱い指針に準じた。

C. 研究結果

1) 新規遺伝子の機能解析

新規遺伝子の蛋白の全長と活性部位と予想される部位を除いた不活性型の蛋白をバキュロウイルスにて産生し、発光型の人工ペプチド(Z-Gly-Gly-Leu-pNA)を基質として

反応させた。その結果、全長型蛋白はこの人工基質を分解する活性を持つが、不活性型蛋白は基質を分解することができなかった。このことから、得られた蛋白はプロテアーゼ活性を有することが明らかになった。さらに、各種メタロプロテアーゼ阻害剤により、分解活性は著しく低下したことより、本蛋白はメタロエンドペプチダーゼであることが明らかになった。

また、ラット脳に外傷を加えたり、中大脳動脈梗塞モデル、さらに末梢運動神経や視神経の傷害モデルにおいて、本遺伝子はきわめて強い遺伝子発現誘導がかかることが明らかになった。一方、拘束ストレスや浸透圧ストレスなどでは本遺伝子の発現に変化は見られなかった。このことから、われわれは本遺伝子を Damage Induced Neuronal Endopeptidase(DINE)と命名した。神経細胞傷害時に遺伝子発現が誘導されることが明らかになったので、本遺伝子の発現と細胞死の関係を明らかにするため、COS細胞を用いC2-ceramide投与により細胞死を引き起こされる系で、DINEの発現が細胞死にいかなる影響を及ぼすかを検討した。その結果、DINEを強制発現させた場合には、C2-ceramideによる細胞死が抑制されることが明らかになった。

2) 遺伝子欠損動物の作成と新たなノックアウトベクターコンストラクトの構築

ATGを含む最初のエクソンをネオマイシン耐性遺伝子に変え、さらにプロテアーゼ活性部位にミューテーションを加え不活化させるノックアウトベクターを構築し、ES細胞に導入後、相同組換えを起こしているES細胞のクローンをスクリーニングした。約300クローンのスクリーニングの後、目的のESクローンが得られ、定法に従って欠損動物の作成を進めた。本遺伝子の欠損動物は生後直ちに死に至るが、解剖学上の表

現型の変化は認められなかった。このため、現状では成熟動物で見られる生活習慣病のモデル動物として用いることは困難であり、新たなノックアウトベクターを構築し、いわゆるコンディショナルなノックアウトをめざした。そこで、第12エクソンの前と第13エクソンの後にloxP配列を挿入し、サイレントノックアウトを作製し、後にCreをアデノウイルスで投与するか、成熟期にCreを発現するトランスジェニック動物と掛け合わせることにした。現在、本ベクターコンストラクトを構築中であり、3年目の平成12年度前中には欠損動物の作製を行う予定である。

3) 遺伝子導入法の開発

アデノウイルスを用いた遺伝子導入系が比較的効率良いことが明らかになったので、実際に機能分子を導入することによって、神経細胞死を防御できるかどうかを検討した。神経成長因子受容体の下流に位置するAktを幼弱なラットの運動ニューロンに導入し、軸索損傷に起因する神経細胞死を防ぐことができるかどうかを検討した。その結果、アデノウイルスを用いてAktを強制発現させることにより、神経細胞死は回避できた。さらに、現在のシステムでは、神経系に導入した遺伝子はグリアと神経細胞の両者に発現するので、神経細胞にのみ選択的に導入することをめざした。リポーターとしてのLacZ遺伝子の upstream にloxP配列ではさんだ停止コドンを含むStufferを導入したウイルスベクターを作成した。さらに、Cre遺伝子の upstream に神経特異的に発現するプロモーターとしてSCG10のプロモーターを組み込んだアデノウイルスベクターを作成した。これらのウイルスベクターを同時に感染させることにより、神経特異的に目的の遺伝子(リポーター遺伝子)を発現させることが期待された。実際にラットの筋

組織に注入したところ、筋組織ではほとんど発現が見られなかったが、筋を支配している運動神経ではその発現が認められた。これにより本システムを用いることにより目的遺伝子を神経細胞に特異的に導入することが可能であることが明らかになった。

D. 考察

生活習慣病の中枢制御にとって最も重要な領域である視床下部に特異的に発現し、メタロエンドペプチダーゼ様活性を有する新規遺伝子は、神経ペプチドのコンバーティングやプロセッシングに極めて重要な役割を有するものと考えられる。ボンベシン、ニューロテンシン、NPY、オレキシンなど生活習慣病に関連した多くの神経ペプチドが視床下部に豊富に局在することから、DINEはこれら視床下部神経ペプチドに関連があると考えられた。

本年度の研究により、DINEが実際にメタロプロテアーゼとしての機能を有することが明らかになった。DIENは中枢神経系でよく知られているエンケファリネースとも構造上の類似しており、神経ペプチド特異的なコンバテースあるいはプロテアーゼであると考えられる。現在のところ、内因性の基質が何であるかは不明であるが、本年度の解析により、新たな機能として神経損傷に対する高い発現応答が明らかになった。従来サブスタンスPをはじめガラニン、CGRPなど神経ペプチドの発現が神経系の障害に対して応答することは周知の事実であり、DINEがこれらのペプチドのプロセッシング過程でなんらかの機能を果たしている可能性が高い。また、培養細胞を用いた実験からDINEの発現はスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)などの活性酸素の消去系酵素群の発現や活性を促進することから、酸化ストレスの防御に貢献して

いることが考えられた。実際C2-ceramideを用いて活性酸素による細胞死をCOS細胞に誘導する系では、DINEの発現により細胞死を抑制することに成功した。DINEが脳梗塞などのいわゆる生活習慣病関連の病態に関与していることは興味深く、「脳を守る」の観点からも今後の機能解析が急がれる。

通常の方法によるDINEの遺伝子ノックアウトの結果、欠損マウスは生直後に死に至ることが確認された。解剖学的な表現型には異常は認められず、肺に空気が入っていないことから呼吸不全による致死と考えられている。このため、通常の手法で得られる欠損動物は、成熟期になってから発症する生活習慣病の解析には適用できないことが明らかになった。従って、成熟期になってから発現をOFFにするようなメカニズムが必要となる。そこで、いわゆるコンディショナルなノックアウトマウスを作成すべく戦術を変更した。DINEの活性部位であるエクソン12と13の前後のイントロンにloxP配列を挿入することでサイレントな相同組換えを起こしておき、後にCreリコンビナーゼを発現させることで、活性部分のみをノックアウトさせることを計画している。Creの導入には、成熟期に作動するプロモーター下にCre配列を組み込んだ遺伝子のトランスジェニックマウスを用いる方法と、同様の遺伝子をアデノウイルスを用いて導入する方法が考えられる。DINEが神経細胞で特異的に発現することから、Creを神経特異的に発現させることで神経選択的にノックアウトが可能になる。このため、神経特異的プロモーターであるSCG10のプロモーターを採用し、下流にcreをコードしたアデノウイルスベクターの構築を行った。実際に本アデノウイルスベクターとloxP-stuffer(stop)-loxP-LacZをコード

するアデノウイルスを共感染させると、筋組織などではほとんど発現せずに神経系特異的に発現させることに成功し、今後のサイレントノックアウトマウスに十分適応できることが明らかになった。

E. 結論

新規の視床下部に局在するメタロエンドペプチダーゼDINEは視床下部での神経ペプチドのコンバーティングやプロセッシングに関与するものと考えられ、神経損傷時に強い発現誘導がかかるだけでなく、活性酸素の消去系を賦活化することにより、細胞死防御に働いていることが明らかになった。また、遺伝子欠損動物は異なる戦術で作成する必要があることが明らかになり、新たなシステムでの欠損動物の作成を開始した。本分子の機能をさらに解明することにより、生活習慣病や関連疾患の新たな治療や予防につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 発表論文

Namikawa K, Honma M, Abe K, Takeda M, Mansur K, Obata t, Miwa A, Okado H, Kiyama H (2000) Akt / Protein kinase B prevents injury-induced motor neuron death and accelerates axonal regeneration. **J. Neurosci.** 20:2875-2886.

Takano R, Hisahara S, Namikawa K, Kiyama H, Okano H, Miura M (2000) Nerve growth factor protects oligodendrocytes from TNF- α -induced injury through Akt-mediated signaling mechanisms. **J Biol Chem** in press

Kato H, Allen N, Emson PC, Kiyama H (2000) GAP-43 N-terminal translocation signal targets beta-galactosidase to developing axons in a pan-neuronal transgenic mouse line. **Dev. Brain Res.** In press.

Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K,

Kiyama H, Miyake S, Tohyama M (1999) Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. **J. Neurochem** 73:2037-2046

Osako Y, Koike K, Kiyama H, Sakamoto Y, Masuhara K, Segawa T, Inoue M, Murata Y (1999) Insulin-induced hypoglycemia activates a chemokinergetic neuronal pathway in the hypothalamo-pituitary system. **Neuropeptides** 33:271-275

Morihara T, Tanabe K, Yoneda T, Tanaka T, Kudo T, Gomi F, Kiyama H, Imaizumi K, Tohyama M, Takeda M (1999) IPP isomerase, an enzyme of mevalonate pathway, is preferentially expressed in postnatal cortical neurons and induced after nerve transection. **Mol Brain Res** 67:231-238

Tsujino H, Mansur K, Kiryu-Seo S, Namikawa K, Kitahara T, Tanabe K, Ochi T, Kiyama H (1999) Discordant expression of c-Ret and GDNF receptor alpha-1 mRNAs in response to motor nerve injury in neonate rats. **Mol. Brain Res.** 70:298-303

Li BS, Su QN, Kiyama H, Miki N, Robinow DR, Zhang L (1999) Expression of Gicerin, a novel cell adhesion molecule, is upregulated in the astrocytes after hypoglossal nerve injury in rats. **Neurosci. Lett.** 260:149-152.

Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Kimoto M, Emson PC, Kiyama H (1999) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) as a nerve injury associated molecule: The mRNA localization in the rat brain and its coincident up-regulation with neuronal NO synthase (nNOS) in axotomized motor neurons. **Eur. J. Neurosci.** 11:2160-2166.

2. 学会発表

木山博資、損傷神経細胞に見られる生存のための応答、第22回日本神経科学大会、イブニングフォーラム、大阪、7月6日1999年
瀬尾寿美子、佐々木雅彦、平山光久、中込

咲綾、木山博資、神経損傷応答遺伝子DINEの同定、第22回日本神経科学大会、大阪、7月6日1999年

瀧川一彦、本間大、阿部浩史、K. Mansur、小幡達夫、三輪昭子、岡戸晴生、木山博資、活性型Akt発毛遠組換えアデノウイルスベクターによる傷害運動ニューロンの細胞死防御、第22回日本神経科学大会、大阪、7月6日1999年

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし