

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

生活習慣病の中樞制御に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木山 博資

平成 13 (2001) 年 4 月

## 目 次

I.総括研究報告書	
生活習慣病の中樞制御に関する研究	1
木山博資	
II.分担研究報告書	
1.生活習慣病の中樞制御に関する研究	6
和田圭司	
2.生活習慣病の中樞制御に関する研究	9
木山博資	
III.研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV.研究成果の刊行物・別刷	14

## 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 大阪市立大学大学院医学研究科・教授

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。新規の生活習慣病モデルマウスであるボンベシン受容体BRS-3欠損マウスが通常飼育に比べて社会的刺激剥奪（個別飼育）時に、より体重と摂食量の増加を示すことを見いだした。情動と肥満との関連性を示す重要な発見である。またGRF受容体欠損マウスがグルコース負荷時インスリン反応性の低下と耐糖能障害を示すことを世界に先駆けて見いだした。ニューロテンシンについてはNTR2欠損マウスを作製した。新規のメタロペプチダーゼDINEのコンディショナル欠損動物作成は継続中である。また、別の新規遺伝子TC10については、神経細胞のグルコース取り込みを制御していることが明らかになった。神経細胞特異的な発現については、SCG10プロモーターに神経特異的サイレンサーエレメントを複数追加配置することにより、かなり特異的な神経選択的導入が可能になった。また、アストロサイトへの特異的遺伝子導入もGFAPのプロモーターを用いることにより成功した。

### 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」とも言うことができる。最近の遺伝子欠損動物を用いた研究から、脳に限局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うること、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の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3年目にあたる平成12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、GRF受容体欠損動物のインスリン応答性について検討した。また、第2のニューロテンシン受容体NTR2の欠損動物の作製を行った。このほか、昨年度作成した、DINE欠損マウスは生直後に致死に至るため、本年度は改めてコンディショナルな欠損動物の作成を進めた。また、別の遺伝子としてRhoファミリーに属するTC10と呼ばれる遺伝子のクローニングに成功した。本遺伝子の機能解析についても検討を行った。また、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昨年来継続しており、本年度は、特異的発現のためのツールがほぼ確立した。

### 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欠損マウスの社会的刺激剥奪試験

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。

## 3) GRP受容体欠損マウスの内分泌学的解析

グルコース経口負荷前、負荷後10分、30分、60分の血漿インスリン値、血糖値を測定し野生型の結果と比較した。

## 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ヘテロマウス同士の交配により遺伝子欠損マウスを作製した。

### 3. 新規遺伝子のコンディショナル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。

昨年度コンベンショナルなノックアウトでは生直後に致死となるため、コンディショナルなノックアウトを作成する必要が生まれた。Cre-loxPを用いる通常のコンベンショナルノックアウトを行うためのベクターコンストラクトを作成の後、常法に従ってノックアウトマウスを作成中である。

### 4. TC10遺伝子の解析

神経突起の伸展に関与している可能性のある遺伝子として得られたRhoファミリーのTC10遺伝子のグルコース取り込み能を検討するため、TC10を発現するアデノウイルスベクターを作製し、分化させたPC12に強制発現させ、アイソトープ標識したグルコースの取り込みの変化を検出した。

### 5. 遺伝子導入法の開発

アデノウイルスベクターを用いて神経細胞種特異的に遺伝子発現制御を可能にするために、Cre-loxPを用いた特殊なベクターの開発を行った。神経特異的な発現のために、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、さらに特異性を向上させるために神経特異的サイレ

ンサーエレメント(NRSE)の付加をさまざまな領域に試みた。このほか、アストロサイトやシュワン細胞への特異的発現系についても検討した。

(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、大阪市立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

特定分子の同定には至らなかった。

### 2) BRS-3欠損マウスの社会的刺激剥奪実験

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下していた。

### 3) GRP受容体欠損マウスの内分泌学的解析

野生型に比してGRP受容体欠損マウスではグルコース負荷時のインスリン反応性が低下しており、耐糖能も障害されていた。

### 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

遺伝子欠損マウスホモ接合体を作製し、現在表現型を解析中である。

### 3. 新規ペプチダーゼDINEのコンディショナルノックアウト

昨年度の結果から、DINEのコンディショナルノックアウトを行うことにした。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でコンディショナルなノックアウトを目指している。ノックアウトベクターのコンストラクトの作製に引き続き、標的組換えを起こしたES細胞のスクリーニングを行った。何度かのスクリーニングの後、現在ES陽性クローンを得ており、今後も本研究を継続する予定である。

### 4. 新たなグルコース取り込みに関与する遺伝子TC10

我々が得た遺伝子の中にTC10と呼ばれるRhoファミリーに属する遺伝子が存在した。本遺伝子は

Cdc42と構造的に最も近く、培養細胞に強制発現させると、神経成長円錐様の構造を呈したり突起の伸展が見られた。また、今回新たに本遺伝子の導入により細胞外グルコースの取り込みが増加することを見いだした。アデノウイルスベクターを用いて本遺伝子をPC12細胞に発現させると、コントロールのLacZを発現させた細胞や、通常の細胞に比べてグルコースの取り込みが約4倍増加した。このことから、本遺伝子は神経細胞におけるグルコース代謝に極めて重要な役割を有するものと考えられた。

#### 5. 遺伝子導入法の開発

神経系の細胞に遺伝子導入する際、比較的良い効率の得られるアデノウイルスを用いて、生活習慣病の中枢制御に関連する遺伝子を神経系に導入するために、神経特異的な遺伝子導入法が開発されねばならない。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、神経細胞のみまたはグリア細胞のみに選択的に遺伝子を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5'上流に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5'上流に発現細胞特異性のある分子のプロモーターを用いる。このプロモーターの特性が目標の細胞種特異性を発揮する上で鍵となる。神経特異的に発現するプロモーターとしてSCG10のプロモーターに、神経特異的サイレンサーエレメント(NRSE)を複数または、その位置を変えたプロモーターを構築し、アデノウイルスベクターを作成した。この結果、SCG10プロモーターに新たに4つのNRSEを2つずつコアプロモーターの前後に挿入したものが最も特異的に神経細胞に発現させることに成功した。また、同時にアストロサイト特異的に発現させるためにGFAPのプロモーターを用いると、概ねアストロサイトにのみ発現することが確かめられた。Schwann細胞に特異的に発現させるプロモーターとして、BDNFのプロモーターが考えられるが、本プロモーターは5 k B以上の長さがあり、アデノウイルスベクターでは利用しにくいので、軽量化を図っている。

#### 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。今回の研究ではBRS-3リガンドの同定には至らなかったが今後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。昨年はBRS-3欠損マウスにおいて甘いものをより好むなど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を明らかにしたが、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重要な結果であった。今年度はさらに、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。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。またこれまで肥満との関連性が低いと考えられていたGRP受容体欠損マウスにおいてグルコース負荷時のインスリン反応性の低下と耐糖能障害を示したことは極めて重要である。ヒトの生活習慣病において、BRS3のみならずGRP受容体も関連している可能性が高まった。BRS3やGRP受容体遺伝子のSNP解析などをとおしてヒト生活習慣病の発症機序解明と予防・治療薬の開発が進展することが期待される。

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欠損マウスが作出されたことで、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。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。

昨年度よりDINEのノックアウトマウスを作成す

ることで本研究の核心にせまることが期待されているが、今のところ目的のコンディショナルなノックアウトを得るにいたっていない。しかし、現在までコンディショナルなノックアウトマウスを作成するためのES細胞が得られており、今後さらに研究を進める予定である。

また本年度に、神経細胞のグルコースの取り込みに関与していると考えられるTC10が得られたが、最近本遺伝子が末梢の脂肪細胞にも発現しており、生体の糖代謝に関与しているのではないかという報告が出はじめています。従って、本遺伝子は神経系におけるグルコース制御に関与している新たな分子として位置づけることができる可能性がある。生活習慣病の中核制御を考えるうえで、今後より詳細な分子メカニズムについて検索してゆきたい。

神経細胞種特異的な遺伝子発現については、Creをドライブするプロモーター特異性が極めて重要である。さらにアデノウイルスに組み込むためにプロモーターのサイズが3キロベース程度に押さえなければならぬ。神経細胞特異的発現を得るために我々は神経特異的分子であるSCG10のプロモーターをコアに用い、さらに特異性を高めるために、神経特異的サイレンサーエレメント(NRSE)の数を順次増加させてみた。NRSEの数の増加にともない神経細胞特異性は増加するものの、プロモーター自身の活性は減弱することが明らかになり、我々は4個程度が最も適しているとの結論に至った。また、コアプロモーターの上流と下流の両方にNRSEを配置したほうがより特性が高くなることが明らかになった。今回得られたプロモーターが実際の程度生体内で神経特異的発現を可能にするかについては現在詳細に検討中であるが、少なくともin vitroでは良好な結果が得られている。同様に、GFAPのプロモーターを用いることによりアストロサイト特異的な遺伝子発現はかなりうまくいっている。今後、このような神経系細胞種特異的な発現のためのツールを用いることにより、中枢神経系において生活習慣病を制御していると考えられる遺伝子の発現制御を可能にし、治療への道が開けるよう、さらに研究を展開してゆきたい。

#### 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社会的刺激剥奪時の行動変化が野生型と異なること、GRP受容体欠損マウスがインスリン反応性と耐糖能に障害を持つことを見出した。

DINEのコンディショナルなノックアウトマウス

の作成が進行中である。TC10と呼ばれる新たな分子が、神経細胞でのグルコースの取り込みに関与していることが明らかとなった。アデノウイルスを用いた神経特異的発現のためのシステムがほぼ確立した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.**, 32, 33-34, 2000

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.**, 68, 555-561, 2000

Ohinata, K., Inui, A., Asakawa, A., Wada, K., Wada, E. and Yoshikawa, M., Proadrenomedullin N-terminal 20 peptides (PAMP) elevates blood glucose levels via bombesin receptor in mice. **FEBS Lett.**, 473, 207-211, 2000

Yamada, K., Wada, E. and Wada, K., Male mice lacking the gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) display elevated preference for conspecific odors and increased social investigatory behaviors. **Brain Res.**, 870, 20-26, 2000

Persson, K., Gingerich, R.L., Nayak, S., Wada, K., Wada, E. and Ahren, B., Reduced GLP-1 and insulin responses and glucose intolerance after gastric glucose in GRP receptor-deleted mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 279, E956-E962, 2000.

Yamada, K., Wada, E. and Wada, K., Bombesin like peptides: studies on food intake and social behaviour with receptor knock-out mice. **Ann. Med.**, 32, 519-529, 2000

Yamada, K., Wada, E. and Wada, K. Female

gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) deficient mice exhibit altered social preference for male conspecifics: implications for GRP/GRP-R modulation of GABAergic function. **Brain Res.**, in press

Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M (2001) Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. **J Biol Chem**276(7): 5256-5264

Ishida-Yamamoto A, Kato H, Kiyama H, Armstrong DK, Munro CS, Eady RA, Nakamura S, Kinouchi M, Takahashi H, Iizuka H.(2000) : Mutant Loricrin is Not Crosslinked into the Cornified Cell Envelope but is Translocated into the Nucleus in Loricrin Keratoderma. **J. Invest Dermatol.** 115:1088-1094.

Kato H, Chen S, Kiyama H, Ikeda K, Kimura N, Nakashima K, Taga T (2000) Identification of a novel WD repeat-containing gene predominantly expressed in developing and regenerating neurons. **J Biochem (Tokyo)**128:923-932.

Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2000) Endothelin converting enzymes and endothelin receptor B mRNAs are expressed in different neural cell species and these mRNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury. **Neuroscience**101:441-449

Tanabe K, Tachibana T, Yamashita T, Che YH, Yoneda Y, Ochi T, Tohyama M, Yoshikawa T, Kiyama H (2000) The small GTP-binding protein TC10 promotes growth cone-like formation and nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. **J. Neurosci.** 20:4138-4144.

Takeda M, Kato H, Takamiya A, Yoshida A and Kiyama H (2000) Injury specific expression of activating transcription factor-3 (ATF-3) in nerve injured retinal ganglion cells, and its co-localized expression with phosphorylated c-Jun. **Invest Ophth Vis Sci**41:2412-2421

Kiryu-Seo S, Sasaki M, Yokohama H, Nakagomi S, Hirayama T, Aoki S, Wada K, Kiyama H (2000) Damage induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97: 4345-4350.

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 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、生活習慣病の中枢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 欠損マウスが通常飼育に比べて社会的刺激剥奪（個別飼育）時により体重と摂食量の増加を示すことを見いだした。情動と肥満との関連性を示す重要な発見である。また GRP 受容体欠損マウスがグルコース負荷時インスリン反応性の低下と耐糖能障害を示すことを世界に先駆けて見いだした。ニューロテンシンについては NTR1 欠損マウスに加えて NTR2 欠損マウスを作製した。

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）の中枢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いだし（Nature, 390, 165, 1997）、BRS-3が中枢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

の分子機構解明及び予防・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 欠損マウスの社会的刺激剥奪試験

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。

3) GRP 受容体欠損マウスの内分泌学的解析

グルコース経口負荷前、負荷後10分、30分、60分の血漿インスリン値、血糖値を測定し野生型の結果と比較した。

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ヘテロマウス同士の交配により遺伝子欠損マウスを作製した。

## 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 欠損マウスの社会的刺激剥奪実験

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下していた。

#### 3) GRP 受容体欠損マウスの内分泌学的解析

野生型に比して GRP 受容体欠損マウスではグルコース負荷時のインスリン反応性が低下しており、耐糖能も障害されていた。

### 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

遺伝子欠損マウスホモ接合体を作製し、現在表現型を解析中である。

## 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。今回の研究では BRS-3 リガンドの同定には至らなかったが今後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。昨年は 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を明らかにしたが、肥満と味覚反応性の変化が互に関連していることを示す重要な結果であった。今年度はさらに、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。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。またこれまで肥満との関連性が低いと考えられていた GRP 受容体欠損マウスにおいてグルコース負荷時のインスリン反応性の低下と耐糖能障害を示したことは極めて重要である。ヒトの生活習慣病において、BRS3 のみならず GRP 受容体も関連している可能性が高まった。BRS3 や GRP 受容体遺伝子の SNP 解析などをおしてヒト生活習慣病の発症機序解明と予防・治療薬の開発が進展することが期待される。

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 欠損マウスが作出されたことで、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社会的刺激剥奪時の行動変化が野生型と異なること、GRP 受容体欠損マウスがインスリン反応性と耐糖能に障害を持つことを見出した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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.**, 32, 33-34, 2000

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.**, 68, 555-561, 2000

Ohinata, K., Inui, A., Asakawa, A., Wada, K., Wada, E. and Yoshikawa, M., Proadrenomedullin N-terminal 20 peptides (PAMP) elevates blood glucose levels via bombesin receptor in mice. **FEBS Lett.**, 473, 207-211, 2000

Yamada, K., Wada, E. and Wada, K., Male mice lacking the gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) display elevated preference for conspecific odors and increased social investigatory behaviors. **Brain Res.**, 870, 20-26, 2000

Persson, K., Gingerich, R.L., Nayak, S., Wada, K., Wada, E. and Ahren, B., Reduced GLP-1 and insulin responses and glucose intolerance after gastric glucose in GRP receptor-deleted mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 279, E956-E962, 2000.

Yamada, K., Wada, E. and Wada, K., Bombesin like peptides: studies on food intake and social behaviour with receptor knock-out mice. **Ann. Med.**, 32, 519-529, 2000

Yamada, K., Wada, E. and Wada, K., Female gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) deficient mice exhibit altered social preference for male conspecifics: implications for GRP/GRP-R modulation of GABAergic function. **Brain Res.**, in press

## 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 大阪市立大学・大学院医学研究科・機能細胞形態学・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のメタロペプチダーゼDINEのコンディショナル欠損動物作成は継続中である。また、別の新規遺伝子TC10については、神経細胞のグルコース取り込みを制御していることが明らかになった。また、Cre-loxPの系を用いたアデノウイルスによる遺伝子導入については、Creをドライブするプロモーターの検討を行った。神経細胞特異的な発現については、SCG10プロモーターに神経特異的サイレンサーエレメントを複数追加配置することにより、かなり特異的な神経選択的導入が可能になった。また、アストロサイトへの特異的遺伝子導入もGFAPのプロモーターを用いることにより成功した。

### 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口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3年度目にあたる平成12年度

は、遺伝子探索により得られた遺伝子(DINE)の機能探索と欠損モデル動物の作成をめざした。昨年度作成した、DINE欠損マウスは生直後に致死に至るため、本年度は改めてコンディショナルな欠損動物の作成を進めた。また、別の遺伝子としてRhoファミリーに属するTC10と呼ばれる遺伝子のクローニングに成功した。本遺伝子の機能解析についても検討を行った。また、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昨年来継続しており、本年度は、特異的発現のためのツールがほぼ確立した。

### B. 研究方法

1) 新規遺伝子のコンディショナル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。

昨年度コンベンショナルなノックアウトでは生直後に致死となるため、コンディショナルなノックアウトを作成する必要が生まれた。Cre-loxPを用いる通常のコンベンシ

ナルノックアウトを行うためのベクターコンストラクトを作成の後、常法に従ってノックアウトマウスを作成中である。

## 2) TC10遺伝子の解析

神経突起の伸展に関与している可能性のある遺伝子として得られたRhoファミリーのTC10遺伝子のグルコース取り込み能を検討するため、TC10を発現するアデノウイルスベクターを作製し、分化させたPC12に強制発現させ、アイソトープ標識したグルコースの取り込みの変化を検出した。

## 3) 遺伝子導入法の開発

アデノウイルスベクターを用いて神経細胞種特異的に遺伝子発現制御を可能にするために、Cre-loxPを用いた特殊なベクターの開発を行った。神経特異的な発現のために、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、さらに特異性を向上させるために神経特異的サイレンサーエレメント(NRSE)の付加をさまざまな領域に試みた。このほか、アストロサイトやシュワン細胞への特異的発現系についても検討した。

(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、旭川医科大学および、大阪市立大学の動物取り扱い指針に準じた。

## C. 研究結果

### 1) 新規ペプチダーゼDINEのコンディショナルノックアウト。

昨年度の結果から、DINEのコンディショナルノックアウトを行うことにした。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でコンディ

ショナルなノックアウトを目指している。ノックアウトベクターのコンストラクトの作製に引き続き、標的組換を起こしたES細胞のスクリーニングを行った。何度かのスクリーニングの後、現在ES陽性クローンを得ており、今後も本研究を継続する予定である。

### 2) 新たなグルコース取り込みに関与する遺伝子TC10

我々が得た遺伝子の中にTC10と呼ばれるRhoファミリーに属する遺伝子が存在した。本遺伝子はCdc42と構造的に最も近く、培養細胞に強制発現させると、神経成長円錐様の構造を呈したり突起の伸展が見られた。また、今回新たに本遺伝子の導入により細胞外グルコースの取り込みが増加することを見いだした。アデノウイルスベクターを用いて本遺伝子をPC12細胞に発現させると、コントロールのLacZを発現させた細胞や、通常の細胞に比べてグルコースの取り込みが約4倍増加した。このことから、本遺伝子は神経細胞におけるグルコース代謝に極めて重要な役割を有するものと考えられた。

### 3) 遺伝子導入法の開発

神経系の細胞に遺伝子導入する際、比較的良い効率の得られるアデノウイルスを用いて、生活習慣病の中核制御に関連する遺伝子を神経系に導入するために、神経特異的な遺伝子導入法が開発されねばならない。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、神経細胞のみまたはグリア細胞のみに選択的に遺伝子を導入することをめざした。リポーターとしてのLacZ遺伝子の上流に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遺伝子の上流に発現細胞特異性のある分子のプロモーターを用い

る。このプロモーターの特性が目標の細胞種特異性を発揮する上で鍵となる。神経特異的に発現するプロモーターとしてSCG10のプロモーターに、神経特異的サイレンサーエレメント(NRSE)を複数または、その位置を変えたプロモーターを構築し、アデノウイルスベクターを作成した。この結果、SCG10プロモーターに新たに4つのNRSEを2つずつコアプロモーターの前後に挿入したものが最も特異的に神経細胞に発現させることに成功した。また、同時にアストロサイト特異的に発現させるためにGFAPのプロモーターを用いると、概ねアストロサイトにのみ発現することが確かめられた。Schwann細胞に特異的に発現させるプロモーターとして、BDNFのプロモーターが考えられるが、本プロモーターは5 k B以上の長さがあり、アデノウイルスベクターでは利用しにくいので、軽量化を図っている。

#### D. 考察

生活習慣病の中樞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DINEは、神経ペプチドのコンバージョン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。

昨年度よりDINEのノックアウトマウスを作成することで本研究の核心にせまることが期待されているが、今のところ目的のコンディショナルなノックアウトを得るにいたっていない。しかし、現在までコンディショナルなノックアウトマウスを作成するためのES細胞が得られており、今後さらに

研究を進める予定である。

また本年度に、神経細胞のグルコースの取り込みに関与していると考えられるTC10が得られたが、最近本遺伝子が末梢の脂肪細胞にも発現しており、生体の糖代謝に関与しているのではないかという報告が出はじめている。従って、本遺伝子は神経系におけるグルコース制御に関与している新たな分子として位置づけることができる可能性がある。生活習慣病の中樞制御を考えるうえで、今後より詳細な分子メカニズムについて検索してゆきたい。

神経細胞種特異的な遺伝子発現については、Creをドライブするプロモーター特異性が極めて重要である。さらにアデノウイルスに組み込むためにプロモーターのサイズが3キロベース程度に押さえなければならない。神経細胞特異的発現を得るために我々は神経特異的分子であるSCG10のプロモーターをコアに用い、さらに特異性を高めるために、神経特異的サイレンサーエレメント(NRSE)の数を順次増加させてみた。NRSEの数の増加にともない神経細胞特異性は増加するものの、プロモーター自身の活性は減弱することが明らかになり、我々は4個程度が最も適しているとの結論に至った。また、コアプロモーターの上流と下流の両方にNRSEを配置したほうがより特性が高くなることが明らかになった。今回得られたプロモーターが実際の程度生体内で神経特異的発現を可能にするかについては現在詳細に検討中であるが、少なくともin vitroでは良好な結果が得られている。同様に、GFAPのプロモーターを用いることによりアストロサイト特異的な遺伝子発現はかなりうまくいっている。今後、このような神経系細胞種特異的な発現のためのツールを用いることにより、中枢神経系において生活習慣病を制御していると考えられる

遺伝子の発現制御を可能にし、治療への道が開けるよう、さらに研究を展開してゆきたい。

## E. 結論

視床下部に局在し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るメタロエンドペプチダーゼDINEのコンディショナルなノックアウトマウスの作成が進行中である。TC10と呼ばれる新たな分子が、神経細胞でのグルコースの取り込みに関与していることが明らかとなった。中枢神経系におけるグルコース代謝に重要な役割を果たしていると考えられる。アデノウイルスを用いた神経特異的発現のためのシステムがほぼ確立した。本システムを利用することにより、中枢神経系に発現する生活習慣病関連遺伝子の発現を調節することが可能になり、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

Yamaguchi A, Tamatani M, Matsuzaki H, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M (2001) Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J Biol Chem* 276(7): 5256-5264

Ishida-Yamamoto A, Kato H, Kiyama H, Armstrong DK, Munro CS, Eady RA, Nakamura S, Kinouchi M, Takahashi H, Iizuka H.(2000) : Mutant Loricrin is Not Crosslinked into the Cornified Cell Envelope but is Translocated into the Nucleus in Loricrin Keratoderma. *J. Invest Dermatol.* 115:1088-1094.

Kato H, Chen S, Kiyama H, Ikeda K, Kimura N, Nakashima K, Taga T (2000) Identification of a novel WD repeat-containing gene predominantly expressed in developing and regenerating

neurons. *J Biochem (Tokyo)* 128:923-932.

Nakagomi S, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2000) Endothelin converting enzymes and endothelin receptor B mRNAs are expressed in different neural cell species and these mRNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury. *Neuroscience* 101:441-449

Tanabe K, Tachibana T, Yamashita T, Che YH, Yoneda Y, Ochi T, Tohyama M, Yoshikawa T, Kiyama H (2000) The small GTP-binding protein TC10 promotes growth cone-like formation and nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats. *J. Neurosci.* 20:4138-4144.

Takeda M, Kato H, Takamiya A, Yoshida A and Kiyama H (2000) Injury specific expression of activating transcription factor-3 (ATF-3) in nerve injured retinal ganglion cells, and its co-localized expression with phosphorylated c-Jun. *Invest Ophth Vis Sci* 41:2412-2421

Kiryu-Seo S, Sasaki M, Yokohama H, Nakagomi S, Hirayama T, Aoki S, Wada K, Kiyama H (2000) Damage induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metallopeptidase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4345-4350.

## 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

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表紙名	巻名	ページ	出版年
和田 圭司	Mutation in bombesin receptor subtype-3 is not a major cause of obesity in Japanese.	Horm. Metab. Res.	32	33-34	2000
和田 圭司	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.	68	555-561	2000
和田 圭司	Proadrenomedullin N-terminal 20 peptides (PAMP) elevates blood glucose levels via bombesin receptor in mice.	FEBS Lett.	473	207-211	2000
和田 圭司	Male mice lacking the gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) display elevated preference for conspecific odors and increased social investigatory behaviors.	Brain Res.	870	20-26	2000
和田 圭司	Reduced GLP-1 and insulin responses and glucose intolerance after gastric glucose in GRP receptor-deleted mice.	Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.	279	E956-E962	2000
和田 圭司	Bombesin like peptides: studies on food intake and social behavior with receptor knock-out mice.	Ann. Med.	32	519-529	2000
和田 圭司	Female gastrin-releasing peptide receptor (GRP-R) deficient mice exhibit altered social preference for male conspecifics: implications for GRP/GRP-R modulation of GABAergic function.	Brain Res. (in press)			
木山 博資	Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53.	J Biol Chem	276	5256-5264	2001
木山 博資	Mutant Loricrin is Not Crosslinked into the Cornified Cell Envelope but is Translocated into the Nucleus in Loricrin Keratoderma.	J. Invest Dermatol.	115	1088-1094	2000
木山 博資	Identification of a novel WD repeat-containing gene predominantly expressed in developing and regenerating neurons.	J Biochem (Tokyo)	128	923-932	2000
木山 博資	Endothelin converting enzymes and endothelin receptor B mRNAs are expressed in different neural cell species and these mRNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury.	Neuroscience	101	441-449	2000
木山 博資	The small GTP-binding protein TC10 promotes growth cone-like formation and nerve elongation in neuronal cells, and its expression is induced during nerve regeneration in rats.	J. Neurosci.	20	4138-4144	2000
木山 博資	Injury specific expression of activating transcription factor-3 (ATF-3) in nerve injured retinal ganglion cells, and its colocalized expression with phosphorylated c-Jun.	Invest Ophthalmol Vis Sci	41	2412-2421	2000
木山 博資	Damage induced neuronal endopeptidase (DINE) is a unique metalloproteinase expressed in response to neuronal damage and activates superoxide scavengers.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	97	4345-4350	2000

20000166

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。