4　新たに発見した脳因子による肥満誘導機構の解明	浮穴　和義

【目的】飽食やストレス社会である現代において、食生活の乱れ及びライフスタイルの欧米化に伴う「肥満」や無理なダイエットから生じる健康被害が老若男女問わず問題となっている。中でも肥満対策は、高脂血症、高血圧症、糖尿病の疾病予防や治療に繋がることは明白であり、QOL の向上や健康長寿の延伸のためにも肥満の予防・対策・解決は必要不可欠である。肥満は過食や偏食、エネルギー収支バランスの破綻により生じることから、特に脳内視床下部に存在する中枢性摂食調節因子の探索と機能解析が精力的に進められている。我々は、脳内視床下部に存在する未知の摂食調節因子の探索の結果、80 アミノ酸残基からなる分泌性の小タンパク質をコードする新規の遺伝子を最近発見した。この小タンパク質を C 末端部分の配列の特徴から Neurosecretory Protein GL（NPGL）と命名した。ラットにおける NPGL の脳室内投与や前駆体遺伝子（*Npgl* ）の過剰発現の解析から、白色脂肪組織（WAT）での *de novo* 脂肪合成亢進による脂肪蓄積が生じることを見出している。本研究では、肥満を誘導しやすい系統のマウスを用いることで NPGL が早期に肥満を惹起すると予想し、その肥満誘導機構の解明を行うことを目的とした。

【方法】肥満を誘導しやすい C57BL/6J マウスを用いて、アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いた前駆体遺伝子 *Npgl* 過剰発現実験を行った。脳手術により、NPGL 産生細胞が局在するマウスの弓状核後外側部に *Npgl* を過剰発現する AAV ベクターを局所注入した。脳手術後のマウスを普通食給餌群あるいは高カロリー食給餌群の 2 群に分け、9 週間飼育した。飼育中は摂食量と体重を毎週測定した。さらに、各組織重量の測定や形態学的解析、脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現解析、呼吸代謝・活動量解析を行った。

【結果】9 週間の *Npgl* 過剰発現を行った結果、普通食・高カロリー食両給餌条件において摂食量および体重が顕著に増加した。また、白色脂肪組織重量が顕著に増加した。さらに臓器重量を測定したところ、*Npgl* 過剰発現により肝臓重量が有意に増加した。Oil Red O 染色により肝臓の中性脂肪を染色した結果、*Npgl* 過剰発マウスでは顕著な脂肪蓄積が認められた。また、WAT において脂質代謝関連因子の mRNA 発現量が有意に増加した。最後に、NPGL がエネルギー消費に及ぼす影響を評価するために、呼吸代謝および自発活動量の測定を行った。その結果、*Npgl* 過剰発現マウスにおいて自発活動量に変化はみられなかったが、マウスの活動期である暗期のエネルギー消費量が有意に減少した。以上の解析から、NPGL は下図のような機構により、肥満を誘導することが示唆された。

新規脳因子 NPGL による肥満誘導機構



4. 新たに発見した脳因子による肥満誘導機構の解明

浮穴　和義

広島大学 大学院統合生命科学研究科 神経代謝調節学研究室

Key words：視床下部，新規脳因子，摂食行動，脂肪蓄積，肥満

緒　言

肥満は、高脂血症、高血圧症、糖尿病などの生活習慣病を引き起こすリスクを高めるため、近年、メタボリックシンドローム対策が叫ばれている。肥満の直接原因となる過食や脂肪蓄積メカニズムに関して、様々な知見が集積されてきているが、その解決は難しい。肥満問題の解決のためには、過食や肥満の発生に関わる分子メカニズムの解明に関する研究が必要不可欠である。

我々は、独自の研究遂行により、鳥類や哺乳類の脳内視床下部に特異的に発現している遺伝子の探索から、80 アミノ酸残基からなる分泌性の長鎖ペプチド（小タンパク質）をコードする新規の遺伝子を最近発見している［1］。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出している［2］。この遺伝子にコードされた小タンパク質を C 末端部分の配列の特徴から Neurosecretory Protein GL（NPGL）と命名した［1］。ラットにおいて、NPGL の脳室内投与や前駆体遺伝子（*Npgl* ）の過剰発現の解析から、高カロリー食給餌下において NPGL は摂食行動を促進させ、早期に肥満を惹起することが示唆された［3］。加えて、NPGL は炭水化物を基質とし、末梢組織での *de novo* 脂肪合成を高める作用を有する初めての脳因子であることを明らかにしている［3］。

本研究では、NPGL による食欲・エネルギー代謝調節の分子メカニズムの解析を通し、中枢性に起因する過食と肥満の誘導機構を解明することを目的とした。そのため、食餌誘発性肥満を簡単に引き起こせる系統である C57BL/6J マウスを用いて、普通食もしくは高カロリー食給餌条件下での *Npgl* 過剰発現の影響を解析した。

方　法

1. 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中程度脂肪食（32% Fat kcal%・20% Sucrose kcal%、4.4 kcal/g）を用いた。

2. *Npgl* 前駆体遺伝子の過剰発現

マウスの *Npgl* 前駆体遺伝子配列を含むアデノ随伴ウイルス（AAV）を視床下部領域に微量注入し（両側、5.0×10^{8} genome copies/site）、過剰発現させた。対照群には、緑色蛍光タンパク質 *Gfp* を過剰発現するベクターを注入した。12 時間の明暗周期条件にて飼育し、1 週間ごとに摂食量と体重を測定した。9 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・脂肪細胞分化等に関係する脂質代謝関連因子群に関して mRNA 発現量をリアルタイム PCR 装置により測定した。肝臓での脂肪蓄積の組織形態解析のために Oil Red O 染色を行った。また、普通食給餌下のマウスを用い、呼吸代謝量と活動量を測定した。

結　果

1. *Npgl* 過剰発現による摂食行動及び体重への影響

Npgl 前駆体遺伝子を視床下部領域に過剰発現し、その後 9 週間観察を行ったところ、有意な摂食行動の亢進と体重増加が認められた（図 1）。9 週間後に脂肪組織と肝臓を含む各組織重量を測定したところ、脂肪組織重量と肝臓重量が有意に増加した（図 2）。肝臓での脂肪を染色する Oil Red O 染色を行ったところ、*Npgl* 前駆体遺伝子過剰発現群において、脂肪蓄積が認められた。

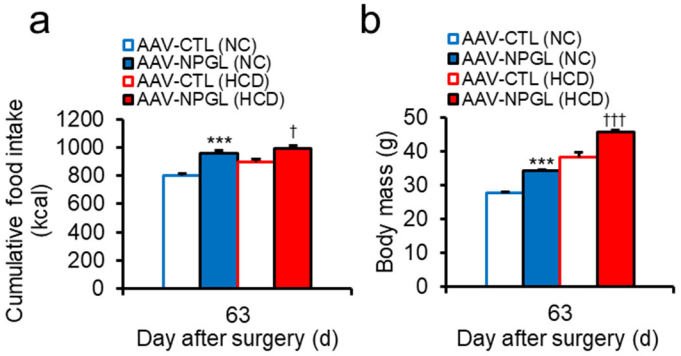


図1. *Npgl* 過剰発現による摂食行動及び体重への影響

a）過剰発現 9 週間の累積摂食量。

b）過剰発現 9 週間後の体重。

NC：普通食給餌群、HCD：高カロリー食給餌群。

各給餌群内のコントロールベクター過剰発現群（CTL）と比較した統計検定（t 検定）。

***P< 0.005 vs. AAV-CTL（NC）；†P< 0.05, †††P< 0.005 vs. AAV-CTL（HCD）.

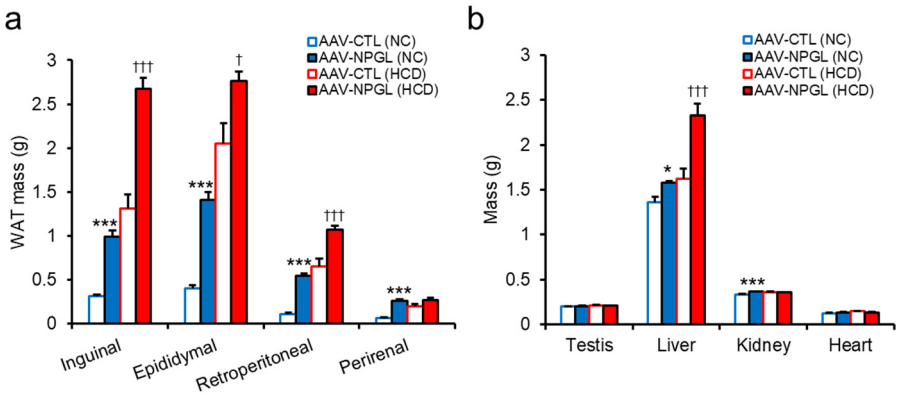


図2. *Npgl* 過剰発現による白色脂肪組織及び末梢組織重量への影響

a）過剰発現 9 週間後の白色脂肪組織（WAT）重量。

b）過剰発現 9 週間後の末梢組織重量。

NC：普通食給餌群、HCD：高カロリー食給餌群。

各給餌群内のコントロールベクター過剰発現群（CTL）と比較した統計検定（t 検定）。

*P< 0.05, ***P< 0.005 vs. AAV-CTL（NC）；†P< 0.05, †††P< 0.005 vs. AAV-CTL（HCD）.

2. *Npgl*過剰発現による脂肪合成・酸化・取込及び脂肪細胞分化に関する因子への影響

脂肪組織及び肝臓組織において、脂肪合成・脂肪酸化・脂肪取込等に関係する因子の mRNA 発現を解析した。まず、普通食給餌下の脂肪組織では脂肪合成に関わる GPAT1・ChREBPα、脂肪酸化に関わる酵素 CPT1a・ATGL・HSL、グルコース輸送に関わる SLC2A4（GLUT4）、脂肪酸取込に関わる CD36、脂肪細胞分化に関わる PPARγ、アディポサイトカインの ADIPOQ（Adiponectin）の mRNA 発現の上昇が認められた（図 3a）。逆に、炎症性サイトカインである TNFαの発現が低下していた（図 3a）。高カロリー食給餌下では、CHREBPαの上昇と TNFαの発現低下が認められた（図 3a）一方、肝臓では、両給餌条件下で、解糖系の酵素 GAPDH と脂肪酸取込に関わる CD36 の mRNA 発現の上昇が認められた（図 3b）。

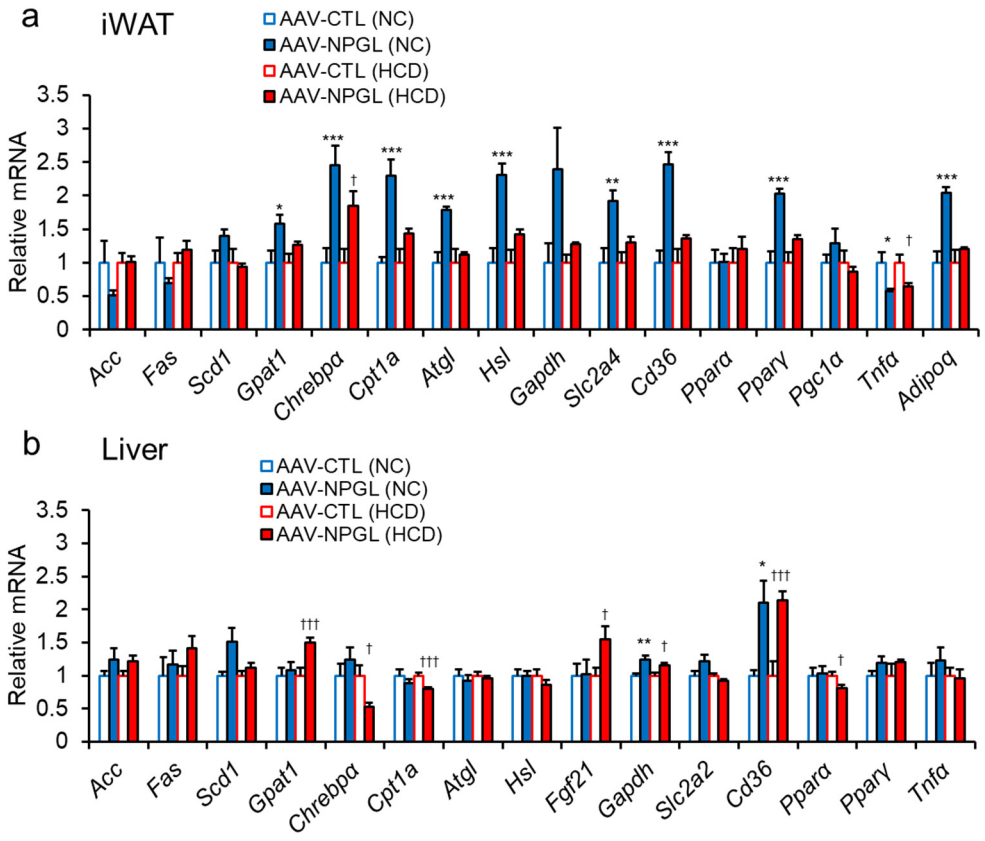


図3. *Npgl* 過剰発現による脂肪合成・酸化・取込及び脂肪細胞分化に関する因子への影響

a）鼠径部白色脂肪組織（iWAT）での脂質代謝関連因子 mRNA 発現量。

b）肝臓組織（Liver）での脂質代謝関連因子 mRNA 発現量。

NC：普通食給餌群、HCD：高カロリー食給餌群。

各給餌群内のコントロールベクター過剰発現群（CTL）と比較した統計検定（t 検定）。

*P< 0.05, **P< 0.01, ***P< 0.005 vs. AAV-CTL（NC）；†P< 0.05, †††P< 0.005 vs. AAV-CTL（HCD）.

3. *Npgl*過剰発現による呼吸代謝及び活動量への影響

呼吸代謝装置にて酸素消費量（VO_2）と二酸化炭素排出量（VCO_2）を測定し、エネルギー消費量を求めた。その結果、*Npgl* 過剰発現により、暗期の VO_2、VCO_2、エネルギー消費量の減少が認められた（図 4a）。一方、活動量には変化が認められなかった（図 4b）。

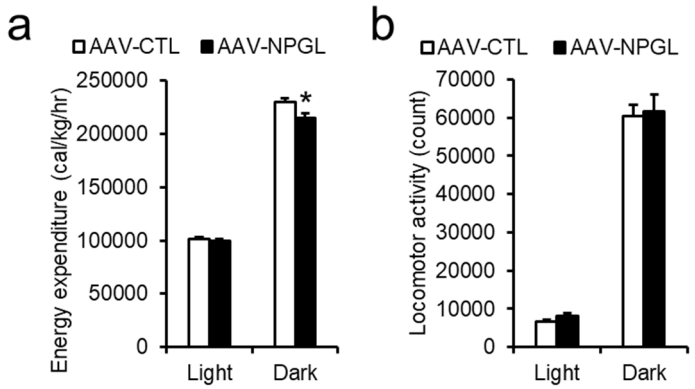


図4. 普通食給餌条件下での*Npgl* 過剰発現による呼吸代謝及び活動量への影響

a）エネルギー消費量。

b）自発活動量。

コントロールベクター過剰発現群（CTL）と比較した統計検定（t 検定）。

* $P < 0.05$ vs. AAV-CTL.

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 は普通食給餌下では顕著な摂食亢進効果は認められないものの、高カロリー食給餌下での摂食量を増加し、早期に肥満を呈することを見出している［3］。本研究から、同じげっ歯類であるマウスでは、高カロリー食のみならず、普通食給餌下でも摂食行動の亢進と体重増加が認められた。次に、脂肪組織及び肝臓での脂肪合成・酸化・取込及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、脂肪組織において、*Npgl* 過剰発現により、グルコース取込、脂肪合成、脂肪酸取込、脂肪酸化、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。一方、肝臓では脂肪組織と比べ、脂質代謝関連因子の発現には顕著な変化は認められなかった。その中で、肝臓において顕著な発現上昇が認められた遺伝子は、脂肪酸取込に関わる CD36 であった。さらに、肝臓重量の増加と Oil Red O 染色による脂肪蓄積が観察された。以上の結果から、脂肪組織で合成された脂肪が酸化され、肝臓に脂肪酸として取り込まれ、脂肪が蓄積している可能性が考えられる。

一方、呼吸代謝及び活動量の測定から、活動期である夜間のエネルギー消費量の有意な減少が観察された。この結果から、これら活動期のエネルギー消費量の減少が脂肪蓄積に寄与していると考えられる。

なお、現在、NPGL の作用機序の詳細を解析する目的で、*Npgl* 遺伝子改変動物の作製と表現型解析を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、広島大学大学院統合生命研究科神経代謝調節学研究室の成松勇樹氏、岩越栄子博士、福村圭介博士、鹿野健史朗博士、古満芽久美氏である。本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げる。

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. 2014 Mar 28;446(1):298-303. Epub 2014 Feb 28. PMID: 24582750 DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.090.

2) Ukena K. Avian and murine neurosecretory protein GL participates in the regulation of feeding and energy metabolism. Gen Comp Endocrinol. 2018 May 1;260:164-170. Epub 2017 Sep 23. PMID: 28951261. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.09.019.

3) 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. 2017 Aug 11;6:e28527. PMID: 28799896 DOI: 10.7554/eLife.28527.