

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 マウスにおける視床下部分泌性小タンパク質 NPGL/NPGM がエネルギー代謝調節に及ぼす影響
(Effects of neurosecretory protein GL and neurosecretory protein GM on energy homeostasis in mice)

広島大学大学院統合生命科学研究科
生命医科学プログラム
学生番号 D214243
氏 名 成松 勇樹

論文の要旨

第 1 章 序論

肥満は 2 型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化などの生活習慣病を引き起こすとともに、脂肪組織における慢性炎症や新型コロナウイルス感染症の重症化に関与する。肥満は一般的に摂取エネルギーと消費エネルギーの収支によって決まることから、エネルギー代謝調節に関わる神経ペプチド・ホルモンがこれまで数多く同定されてきた。しかし、依然として肥満問題解決には至っておらず、エネルギー代謝調節に関わる分子メカニズムの解明が望まれている。

最近、鳥類のエネルギー代謝調節中枢である視床下部漏斗部より 2 種類の新規分泌性小タンパク質 (neurosecretory protein GL: NPGL、neurosecretory protein GM: NPGM) をコードする遺伝子が同定された。これら遺伝子は脊椎動物に広く保存されていることから、エネルギー代謝調節に重要な遺伝子であると考えられていた。NPGL は 80 アミノ酸残基からなる小タンパク質であり、ニワトリやラットを用いた脳室内投与や前駆体遺伝子の過剰発現実験により、過食や脂肪蓄積に関与することが示唆されてきた。しかし、遺伝学的知見が豊富なマウスを用いた解析はほとんど行われておらず、特に慢性炎症や糖・脂質代謝状態に及ぼす知見は得られていなかった。また、NPGM は 88 アミノ酸残基からなる小タンパク質であり、ニワトリにおいて NPGL と同様に過食や脂肪蓄積に関与することが示唆されてきた。しかし、哺乳類において NPGM の機能解析は行われておらず、NPGL と同様に慢性炎症や糖・脂質代謝状態に及ぼす影響は明らかにされていなかった。したがって本研究では、マウスにおいて NPGL 及び NPGM がエネルギー代謝調節に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

第 2 章 野生型マウスにおける *Npgl* 過剰発現が糖・脂質代謝に及ぼす影響

哺乳類において、NPGL が慢性炎症や糖・脂質代謝に及ぼす影響は明らかにされていなかった。第 2 章では遺伝学的知見が豊富であるマウスにおいてアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus: AAV) を用いた長期的な NPGL 前駆体遺伝子 (*Npgl*) 発現実験を行った。その結果、摂食量・体重・白色脂肪組織重量・肝臓重量が顕著に増加した。肝臓には脂肪が蓄積し、脂肪肝を呈していることが確認された。脂肪組織や肝臓における脂質代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現量を測定した結果、脂肪合成に関わる遺伝子の mRNA 発現量が増加した。また、呼吸代謝及び自発活動量を測定した結果、自発活動量に変化は認められなかったが、エネルギー消費量が減少した。

肥満動物は耐糖能やインスリン感受性が悪化し、高血糖症や高脂血症を併発することが知られているため、血中成分を測定した。その結果、*Npgl* 過剰発現により血中インスリン濃度が増加したが、血糖値や血中脂質に影響は認められなかった。そこで、*Npgl* 過剰発現マウスの耐糖能・インスリン感受性を評価した。その結果、肥満に伴う耐糖能異常やインスリン抵抗性は認められなかった。耐糖能異常やインスリン抵抗性の原因の一つに脂肪組織における慢性炎症が挙げられるため、脂肪組織及び血中における免疫細胞の出現頻度を解析した。その結果、内臓脂肪組織における抗炎症性マクロファージである M2 マクロファージに対する炎症性マクロファージである M1 マクロファージの存在比 (M1/M2 比)が減少した。

以上のことから、NPGL は脂肪組織における慢性炎症を抑制することで、糖・脂質代謝異常を伴わない代謝的に健康的な肥満 (metabolically healthy obesity: MHO)を誘導することが示唆された。

第 3 章 遺伝子改変マウスにおいて NPGM が糖・脂質代謝に及ぼす影響

マウスにおいて、NPGL のパラログ因子である NPGM の生理機能は明らかにされていなかった。第 3 章では、CRISPR-Cas9 システムを用いて、NPGM 前駆体遺伝子 (*Npgm*)の下流に DNA 組換え酵素である Cre を組み込んだ NPGM-Cre マウスを作製し、NPGM ニューロン特異的な解析を試みた。まず、作製した NPGM-Cre マウスの脳に Cre 依存的に mCherry を発現する AAV を導入し、NPGM の免疫染色を行った。その結果、NPGM 免疫陽性細胞と mCherry 陽性細胞の共局在が確認されたことから、作製した NPGM-Cre マウスは NPGM ニューロン特異的な遺伝子導入が可能であると考え、以降の解析でも用いた。

続いて、NPGM ニューロン特異的に *Npgm* 過剰発現を行った。その結果、摂食量や体重に影響は認められなかったが、白色脂肪組織重量が増加した。肝臓をはじめ、その他臓器重量や骨格筋重量に影響は認められなかった。

また、人工リガンド特異的に活性化する G タンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) である人工受容体 (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs: DREADD)を用いて、NPGM ニューロンの活動が全身のエネルギー代謝調節に及ぼす影響を検証した。CNO を慢性投与することで NPGM ニューロンの持続的な活性化を試みた。その結果、CNO 投与から 1 日後の体重増加量が増加した一方で、その効果は 2 日目以降には消失した。

さらに、NPGM ニューロン特異的にアポトーシス誘導酵素であるカスパーゼの改変型を発現させ、NPGM ニューロンを特異的に除去する実験を行った。その結果、摂食量や体重、脂肪組織重量に変化は認められなかった。一方で、耐糖能がわずかに悪化した。脂肪組織や血液中における免疫細胞の存在頻度を解析した結果、皮下脂肪組織における M1 マクロファージの存在比が有意に増加した。

以上のことから、NPGM は脂肪蓄積に関与し、NPGM ニューロンは脂肪組織における炎症反応を介して耐糖能を調節していることが示唆された。

第 4 章 結論

本研究により、マウスにおいて NPGL は脂肪組織における慢性炎症を抑制して MHO を誘導する因子であること、NPGM は脂肪蓄積や、脂肪組織における慢性炎症を抑制することで、耐糖能を維持する可能性を示した。本研究は NPGL と NPGM が脂肪蓄積のみならず、耐糖能やインスリン感受性の調節に関わることを示した初めての報告である。本研究における NPGL と NPGM の機能解析の結果を単純に比較することは困難であるが、これら 2 つの小タンパク質の機能の差異は、それぞれのニューロンが形成する神経回路や含有する神経伝達物質の違いに起因する可能性がある。したがって、NPGL ニューロン及び NPGM ニューロンの投射領域や発現する神経伝達物質を網羅的に解析していく必要がある。

近年、NPGL 及び NPGM の受容体の候補として、GPCR の 1 種である GPR83 が報告された。*Gpr83* のノックアウトマウスはエネルギー代謝調節に関与することや、GPR83 に対

する結合活性について、NPGL より NPGM の方が低いことが示唆されている。本研究では NPGL の脂肪蓄積効果の方が顕著であったが、この 2 つの小タンパク質の機能の差異は受容体に対する結合活性に起因する可能性もある。したがって、GPR83 が NPGL 及び NPGM が担うエネルギー代謝調節に関与する可能性を検討するために、*Gpr83* ノックアウトマウスを用いてそれぞれの遺伝子の機能解析をする必要がある。

代謝異常を伴わない脂肪蓄積は性成熟や冬眠、渡りといった生命現象に重要であることが示唆されているが、それらの分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。NPGL 及び NPGM は脊椎動物に広く保存されており、複数の動物種において脂肪蓄積に関与することが示唆されている。本研究により NPGL 及び NPGM は、代謝異常を伴わない脂肪蓄積に関与することが明らかになったことから、性成熟や冬眠、渡りにおける脂肪蓄積に関与する可能性が考えられる。今後、渡り鳥や冬眠動物において NPGL 及び NPGM に着目した研究を進めていくことで、生命維持に必要な脂肪蓄積の中核-末梢制御メカニズムの解明が期待される。