

令和元年6月20日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01848

研究課題名(和文) 食欲・肥満制御への応用を目指した活性型グレリン分泌機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of octanoylated ghrelin secretion mechanism targeted towards regulating appetite and obesity

研究代表者

仮屋 博子 (KARIYAZONO, Hiroko)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20437958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胃がん細胞AGSの遺伝子改変によって作製したグレリン安定発現細胞AGS-GHRL8を用い、肥満制御への応用に向け、摂食亢進活性を示す活性型(オクタノイル)グレリンの分泌抑制物質の探索および分泌抑制機構を検討した。AGS-GHRL8細胞からのオクタノイルグレリン分泌抑制物質として、ドコサヘキサエン酸およびオレアノール酸を新たに見出した。この分泌抑制に、長鎖脂肪酸受容体GPR120の活性化を介した機序は関与しておらず、構造中のカルボキシ基とCoAとの結合体形成に伴うオクタノイルCoAの生成抑制を介したオクタノイルグレリンの産生・分泌抑制の機序が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂質異常症、糖尿病、高血圧症等の生活習慣病から虚血性心疾患、脳卒中等の動脈硬化性疾患にも発展しかねないメタボリックシンドロームならびに肥満の克服が医療費削減の側面からも重要視されている。摂食亢進活性を示すオクタノイルグレリンの産生・分泌抑制物質としてのドコサヘキサエン酸およびオレアノール酸の発見ならびにその抑制機序の解明は、新規機能性食品の開発等、肥満対策につながる成果として社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Octanoylated ghrelin is a peptide hormone with an appetite stimulating effect. We found that docosahexaenoic acid (DHA) and oleanolic acid suppressed octanoylated ghrelin secretion from AGS-GHRL8 cells established by transfecting ghrelin cDNA into human gastric carcinoma AGS cells. We attempted to determine the suppressive mechanism of octanoylated ghrelin secretion by these compounds. It was considered that the suppressive effects of both the compounds were neither caused by the downregulation of ghrelin-O-acyltransferase expression, or through the activation of G-protein coupled receptor 120. Examination using the free fatty acid assay kit indicated the following mechanism: acyl-CoA products formed between the carboxyl group of DHA or oleanolic acid and coenzyme A may cause inhibition of octanoyl-CoA generation essential for ghrelin octanoylation, resulting in suppressive secretion of octanoylated ghrelin. These findings could contribute to regulation of appetite and obesity.

研究分野：医療系薬学

キーワード：オクタノイルグレリン ドコサヘキサエン酸 オレアノール酸 AGS-GHRL8細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪型肥満を基盤とし、動脈硬化性疾患を引き起こす脂質異常症、糖尿病、高血圧症等の生活習慣病、さらにはそれらが複合的に絡み合ったメタボリックシンドロームの予防が課題とされる中、「摂食亢進作用を有するグレリンの活性阻害あるいは産生・分泌抑制を介した摂食抑制による肥満防止」の着想を得た。グレリンは、28 アミノ酸残基からなるペプチドホルモンであり、N 末端側 3 位のセリン残基がオクタン酸でアシル化修飾されたオクタノイルグレリンが摂食亢進作用を有する活性型とされている。オクタノイルグレリンの産生・分泌には、オクタン酸の細胞内への取り込み、酵素による 3 位のセリン残基のオクタノイル化、細胞外への分泌等の各過程において、受容体や酵素が関与している。

研究代表者らは、オクタノイルグレリンの産生・分泌抑制物質探索に有用な細胞評価系を構築している。本評価系は、ヒト胃がん細胞 AGS の遺伝子改変によって作製したグレリン安定発現細胞 AGS-GHRL8 の培地にオクタン酸とともに被験物質を添加し、24 時間培養後の培地中のオクタノイルグレリン濃度を測定することにより、被験物質の効果を判定するものである。AGS-GHRL8 細胞には、3 位セリンのオクタン酸アシル化に必須のグレリンアシル基転移酵素が発現していることを確認しており、培養培地に添加するオクタン酸の濃度依存的にオクタノイルグレリンの産生・分泌が亢進する。本評価系を用いた検討により、オレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸等の脂肪酸がオクタノイルグレリンの産生・分泌を抑制することを見出し、オレイン酸を投与したマウスの血中オクタノイルグレリン濃度は、対照群のそれより低く、細胞レベルでの検討結果と一致することを確認している [1, 2]。さらに、数種類の植物含有成分によるオクタノイルグレリン産生・分泌抑制効果も見出ししているが、その機序は不明であった。

そこで、AGS-GHRL8 細胞評価系を用い、肥満制御への応用に向け、摂食亢進活性を示すオクタノイルグレリンの分泌抑制物質の探索および分泌抑制機構を解明する本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

肥満制御への応用に向け、摂食亢進作用を有するオクタノイルグレリンの生成過程に必須のグレリンアシル基転移酵素 (GOAT) およびアシル CoA 合成酵素ならびにグレリン分泌に関与するとされる G タンパク質共役型の脂肪酸受容体に着目し、オクタノイルグレリンの産生・分泌抑制物質の探索および産生・分泌抑制機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) AGS-GHRL8 細胞評価系を用いたオクタノイルグレリンの産生・分泌抑制の評価

AGS-GHRL8 細胞は、10% FBS 添加 DMEM 培地中、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。被験物質を 100  $\mu$ mol/L オクタン酸とともに AGS-GHRL8 細胞の培地に添加し、24 時間培養後の培地中オクタノイルグレリン濃度を ELISA で測定することにより、被験物質のオクタノイルグレリンの産生・分泌抑制作用を評価した。各被験物質の使用濃度は、予め MTT 試験を行い、AGS-GHRL8 細胞の生存率に影響しない濃度に設定した。

### (2) AGS-GHRL8 細胞における酵素の発現解析

AGS-GHRL8 細胞から RNA を抽出後、RT-PCR により、エステル結合の加水分解酵素であるカルボキシエステラーゼ (CES) およびアシル CoA シンターゼ (ACS) ならびに G タンパク質共役型の長鎖脂肪酸受容体 GPR120 の発現を調べた。また、被験物質の影響を検討するために、リアルタイム PCR により GOAT の発現量の変化を調べた。

### (3) アシル CoA 生成反応

被験物質と CoA との結合体の形成を確認するために、遊離脂肪酸検出キットを用いた。本キットは、遊離脂肪酸のカルボキシ基と CoA から ACS によりアシル CoA が生成する反応を利用するもので、生成したアシル CoA を酸化することによって生成する過酸化水素をキット添付の発色試薬と反応させ、570 nm における吸光度を測定する。吸光度の増加をアシル CoA の生成量として評価した。

## 4. 研究成果

### (1) オクタノイルグレリン産生・分泌抑制物質

脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (DHA) のエチルエステル (DHA-ethyl) および植物含有成分のオレオノール酸を被験物質として検討した。25  $\mu$ mol/L の DHA-ethyl および 6.25  $\mu$ mol/L のオレオノール酸は、AGS-GHRL8 細胞の培地中オクタノイルグレリン濃度を有意に低下させたことから、両被験物質は、オクタノイルグレリン産生・分泌抑制作用を有すると判断した。

### (2) オレオノール酸のオクタノイルグレリン産生・分泌抑制における GOAT の関与

AGS-GHRL8 細胞に発現している GOAT がオレオノール酸により影響を受けるか否か調べた結果、GOAT の遺伝子発現に変化はなかった。このことから、オレオノール酸のオクタノイルグレリン産生・分泌抑制は GOAT の発現変化によるものではないと考えられた。

### (3) DHA のオクタノイルグレリン産生・分泌抑制における GPR120 の関与

G タンパク質共役型の脂肪酸受容体は、ペプチドの分泌に関与するとされる[3]。RT-PCR の結果、AGS-GHRL8 細胞における G タンパク質共役型の長鎖脂肪酸受容体 GPR120 の発現が確認されたことから、DHA-ethyl によるオクタノイルグレリンの産生・分泌抑制機序に GPR120 の活性化が関与しているか否か、GPR120 アンタゴニスト AH-7614 を用いて検討した。AH-7614 の濃度は、AGS-GHRL8 細胞の生存率に影響しなかった 25  $\mu\text{mol/L}$  とした。AH-7614 は、DHA-ethyl のオクタノイルグレリンの産生・分泌抑制効果に対し、有意な影響を示さなかった。したがって、DHA-ethyl のオクタノイルグレリン産生・分泌抑制作用は、GPR120 の活性化を介したものではないと考えられた。

### (4) DHA-CoA の生成

オクタン酸のカルボキシ基と CoA のチオール基の脱水縮合により生成するオクタノイル CoA が、グレリンのオクタノイル化の基質となることから、DHA のアシル CoA 体 (DHA-CoA) が生成するならばオクタノイル CoA の生成が抑制される可能性がある。この可能性を検証する目的で、遊離脂肪酸検出キットを用いて検討した結果、DHA-CoA の生成が示唆された (図 1)。図の吸光度は、アシル CoA 生成量の指標である。すなわち、オクタン酸によりアシル CoA (オクタノイル CoA) が生成し、吸光度が増加したが、エステル体の DHA-ethyl ではアシル CoA の増加が見られなかった。DHA-ethyl を加水分解した DHA (遊離体) ではオクタン酸添加時と同程度にアシル CoA が生成した。したがって、DHA-ethyl は細胞内でエステル結合の加水分解を受けた後、CoA との結合体を形成する可能性が示唆された。そこで、エステル結合の加水分解酵素である CES ならびにアシル CoA 合成酵素である ACS が AGS-GHRL8 細胞に発現しているか否かを RT-PCR で調べたところ、CES2 ならびに ACSS1、ACSL3 および ACSVL1 の発現が確認された (図 2)。このことから、AGS-GHRL8 細胞に取り込まれた DHA-ethyl は CES2 によるエステル結合の加水分解後、ACSL3 または ACSVL1 により CoA と結合する可能性とともに、DHA-CoA の生成に伴うオクタノイルグレリンの生成阻害の機序が存在する可能性が示された。

### (5) オクタノイルグレリン産生抑制に及ぼすオレアノール酸の構造中カルボキシ基の影響

オクタノイルグレリン産生抑制作用において構造中のカルボキシ基が役割を演じている可能性が上記 (4) により示されたことから、オレアノール酸の構造中カルボキシ基の影響を調べた。オレアノール酸のカルボキシ基がメチル基に置換された  $\beta$ -アミリンを用い、培地中オクタノイルグレリン濃度を測定したところ、 $\beta$ -アミリンは、オクタノイルグレリン濃度を低下させなかった。これにより、オレアノール酸のオクタノイルグレリン産生抑制におけるカルボキシ基の役割が示唆された (図 3、4)。

以上により、DHA およびオレアノール酸の構造中カルボキシ基と CoA との結合体形成に伴うオクタノイル CoA の生成抑制を介したオクタノイルグレリンの産生・分泌抑制機序の可能性が示唆された。

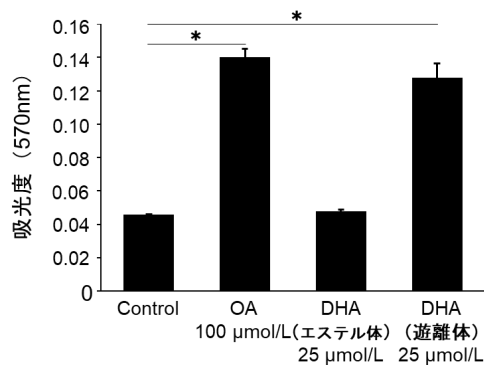


図 1 DHA-CoA の生成  $P < 0.05$  (Tukey's test)

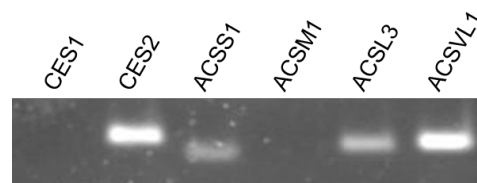


図 2 AGS-GHRL8 細胞における CES および ACS の発現

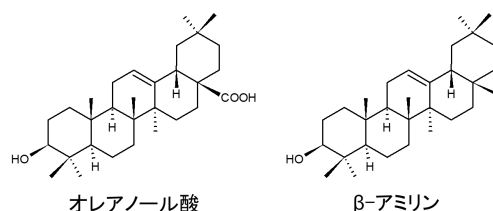


図 3 オレアノール酸および  $\beta$ -アミリンの構造式

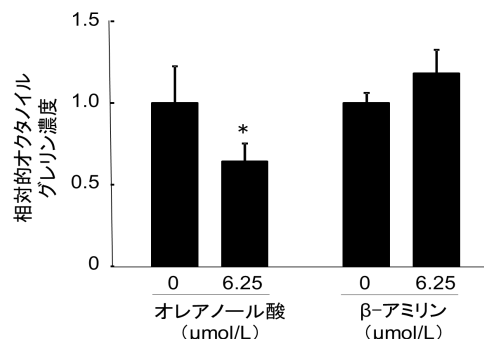


図 4 AGS-GHRL8 細胞のオクタノイルグレリン産生に及ぼすカルボキシ基の影響  $P < 0.05$  ( $t$ -test)

<引用文献>

1. Oiso S, Nobe M, Yamaguchi Y, Umemoto S, Nakamura K, Kariyazono H. Establishment of a gastric cell-based assay system for exploring inhibitors of octanoylated ghrelin production. *J Biomol Screen*. 2013;18(9):1035-1042.
2. Oiso S, Nobe M, Iwasaki S, Nii W, Goto N, Seki Y, Nakajima K, Nakamura K, Kariyazono H. Inhibitory effect of oleic acid on octanoylated ghrelin production. *J Oleo Sci*. 2015;64(11):1185-1192.
3. Moran BM, McKillop AM, O'Harte FP. Development of novel ligands for peptide GPCRs. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;31:57-62.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Nakajima K, Maeda N, Oiso S, Kariyazono H. Decreased plasma octanoylated ghrelin levels in mice by oleanolic acid. *J Oleo Sci*. 2019;68(1):103-109. doi: 10.5650/jos.ess18148.

Nakajima K, Oiso S, Kariyazono H. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on octanoylated ghrelin levels *in vitro* and *in vivo*. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(4):524-529. doi: 10.1248/bpb.b17-00805.

Tung NH, Nakajima K, Uto T, Hai NT, Long DD, Ohta T, Oiso S, Kariyazono H, Shoyama Y. Bioactive triterpenes from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Phytother Res*. 2017;31(9):1457-1460. doi: 10.1002/ptr.5877.

Uto T, Tung NH, Nakajima K, Ohta T, Oiso S, Kariyazono H, Shoyama Y. Bioactivities of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. leaf and its triterpenes. *J Pharmacogn Nat Prod* 2017;3:1. DOI: 10.4172/2472-0992.1000134.

Nakajima K, Oiso S, Uto T, Morinaga O, Shoyama Y, Kariyazono H. Triterpenes suppress octanoylated ghrelin production in ghrelin-expressing human gastric carcinoma cells. *Biomed Res*. 2016;37(6):343-349. doi: 10.2220/biomedres.37.343.

[学会発表](計15件)

中島健輔、前田成美、大磯茂、仮屋園博子、オレアノール酸のオクタノイルグレリン産生抑制効果とその機序、日本薬学会第139年会、2019年3月20-23日、幕張メッセ(千葉市)

濱田祐成、永瀬翔子、橋口夏海、大磯茂、中島健輔、仮屋園博子、オクタノイルグレリン産生・分泌に及ぼすドコサヘキサエン酸の影響とそのメカニズム、第35回日本薬学会九州支部大会、2018年11月17-18日、九州大学(福岡市)

橋口夏海、永瀬翔子、大磯茂、中島健輔、仮屋園博子、エイコサペンタエン酸およびドコサヘキサエン酸のオクタノイルグレリン産生・分泌抑制機序に関する因子の解析、日本薬学会第138年会、2018年3月25-28日、もてなしドーム(金沢市)

中島健輔、大磯茂、仮屋園博子、エピガロカテキン没食子酸のオクタノイルグレリン産生抑制効果とその抑制機序の検討、2017年3月24-27日、日本薬学会第137年会、仙台国際センター(仙台市)

大磯茂、永瀬翔子、中島健輔、仮屋園博子、In vitro および in vivo におけるドコサヘキサエン酸のオクタノイルグレリン産生・分泌抑制効果、2017年3月24-27日、日本薬学会第137年会、仙台国際センター(仙台市)

中島健輔、大磯茂、宇都拓洋、森永紀、正山征洋、仮屋園博子、マウス血漿中オクタノイルグレリン濃度に及ぼすエピガロカテキン没食子酸およびグリチルレチン酸の影響、2016年12月3-4日、第33回日本薬学会九州支部大会、鹿児島大学(鹿児島市)

仮屋園博子、大磯茂、野邊みゆき、山口祐平、岩崎集平、後藤夏美、関夕佳里、中島健輔、食欲・肥満制御を目指した活性型グレリン分泌抑制物質探索における AGS-GHRL8 細胞の有用性、2016年9月17-19日、第26回日本医療薬学会年会、国立京都国際会館(京都市)

その他、国内学会発表8件

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：食欲抑制剤

発明者：仮屋園博子、大磯茂、対馬忠広、田畑宏、三澤嘉久

権利者：備前化成株式会社、学校法人九州文化学園

種類：特許

番号：特許願 2017-146590

出願年：2017年

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大磯 茂

ローマ字氏名：OISO, shigeru

所属研究機関名：長崎国際大学

部局名：薬学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40513106

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：中島 健輔

ローマ字氏名：NAKAJIMA, kensuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。