

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08348

研究課題名(和文) サーチュインはグレリンの抗炎症作用に与するか

研究課題名(英文) Do sirtuins contribute to the anti-inflammatory effects of ghrelin?

研究代表者

武田 宏司 (Takeda, Hiroshi)

北海道大学・薬学研究院・名誉教授

研究者番号：60261294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：グレリン受容体刺激が、SIRT1/3を介して抗炎症作用を示す可能性を検討した。グレリン受容体を安定的に発現したHEK293において、SIRT1 mRNA量/蛋白量はグレリン添加後有意に増加した。SIRT3 mRNAは一過性に減少したのち増加、SIRT3蛋白量も増加する傾向を示した。さらに、ミトコンドリアに局在するp53のアセチル化の減少がみられた。以上より、ミトコンドリア近傍に局在するSIRT1が活性化したことが示唆された。さらに、ミトコンドリア新生に与するPGC-1、NRF-1、TFAMの各mRNAは、グレリン添加後いずれも増加したことから、ミトコンドリア新生が促進されたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グレリンは、グレリン受容体を介して細胞内SIRT1/3を活性化し、ミトコンドリア新生を促進する可能性が示された。これらは、グレリンによる抗炎症作用の一部である可能性が高いと考えられる。この点がさらに明らかとなり、さらに慢性炎症状態におけるグレリン抵抗性の機序を解明することができれば、慢性炎症性疾患における炎症の持続機構の解明、ならび同機構の解除を目指す新規治療の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：I investigated the possibility that ghrelin receptor stimulation exerts anti-inflammatory effects through activation of intracellular SIRT1 and/or SIRT3. In HEK293 cells stably expressing the ghrelin receptor, SIRT1 mRNA and protein levels were significantly increased after addition of ghrelin. SIRT3 mRNA transiently decreased and then increased, and the SIRT3 protein level tended to increase. Furthermore, acetylation of mitochondria-localized p53 was decreased upon ghrelin stimulation. These results suggested that ghrelin receptor stimulation activated cytoplasmic SIRT1 localized near mitochondria. Furthermore, PGC-1, NRF-1, and TFAM mRNAs, were increased after ghrelin addition, suggesting that mitochondrial biogenesis was also promoted.

研究分野：消化器内科学

キーワード：グレリン サーチュイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、児島らによって発見された 28 個のアミノ酸よりなる消化管ホルモンである。主に胃より分泌され、迷走神経末端および視床下部弓状核の NPY/AgRP ニューロン上に発現するグレリン受容体 (GHSR1a) に作用して、成長ホルモン分泌を促進するほか、上部消化管運動および食欲を強力に亢進させる。消化器疾患においては、ピロリ菌除菌後の体重増加、あるいは減量手術における体重減少の主要なエフェクターであることが知られている。さらに、グレリン受容体作動薬である anamorelin は、消化器癌などにおける癌悪液質/食欲不振症候群の治療薬として使用されており、消化器疾患におけるグレリンの役割が注目されている。

これらの作用に加えて、グレリンは強力な抗炎症作用を有することも知られており、さまざまな慢性炎症性疾患への応用が期待されている。消化器疾患に関しても、炎症性腸疾患 (IBD)、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、アルコール性肝障害などのモデルにおいて、グレリンあるいはグレリン受容体作動薬の効果が確認されている。しかしながら、グレリンの抗炎症作用の機序はほとんど明らかになっていない。一方、癌悪液質や加齢などの慢性炎症状態ではグレリン抵抗性が生じることが報告されている。実際、IBD 患者や NASH 患者では、血中のグレリン濃度が高値であり、グレリン抵抗性の存在が示唆されている。グレリン抵抗性は、慢性炎症の持続に關与する可能性があり、さらには、グレリンを臨床応用する際の妨げとなる可能性もある。

サーチュインファミリーのひとつである SIRT1 は、ヒストン蛋白や p53, p65 などの非ヒストン蛋白を基質とする脱アセチル化酵素であり、寿命制御に関わっている。SIRT1 は強力な抗炎症作用を示すことが知られており、その機序として、p65 を脱アセチル化することで直接的に NF- κ B を抑制する。さらに、近年オートファジーやミトコンドリアの品質管理が炎症の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなってきたが、SIRT1 はこれらの抗炎症プロセスに関わっている可能性も指摘されている。

われわれは、機能性消化器疾患に頻用される漢方薬である六君子湯が、老化マウスにおいてグレリン抵抗性を解除し、健康寿命を延長することを最近明らかにした (Fujitsuka N, et al. *Mol Psychiatry*. 21:1613-1623, 2016)。この研究において、六君子湯はグレリン受容体依存的に視床下部 SIRT1 活性を上昇させ、ミクログリアの活性化を抑制していた。以上より、グレリン受容体刺激が、細胞内 SIRT1 の活性化を介して抗炎症作用を示す可能性が考えられるが、これまでのところこの仮説の妥当性は検証されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、グレリン受容体活性化から SIRT1 活性上昇に至るまでの細胞内機序およびグレリンによる SIRT1 活性化の生物学的意義を明らかにすることである。また、ミトコンドリアに局在するサーチュインである SIRT3 が、グレリン受容体刺激によって活性化する可能性についても検討する。

3. 研究の方法

実験方法としては GHSR1a 安定発現 HEK293 細胞 (GHSR1a-HEK293 細胞) および mock HEK293 細胞、GHSR1a を有しないラット筋管細胞 (C2C12 細胞) を用い、グレリン刺激による細胞内 SIRT1、SIRT3 mRNA および蛋白量の増加を、qRT-PCR およびウェスタンブロットで確認した。細胞内 SIRT1 の活性化状態は、主要な標的蛋白質である p53 のアセチル化状態を、特異抗体 (Ac-K382 抗体) を用いたウェスタンブロットで評価した。ミトコンドリア蛋白の分離は、市販のキット (ab110171) を用いた。

4. 研究成果

SIRT1 mRNA は、グレリン (100nM) 添加 6 時間後に一過性に増加した後 24 時間後には前値に復したが、SIRT1 mRNA の変化は GHSR1a インバーサブストラットである [D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7,9, Leu11] substance P (SP-A) により抑制された。一方、細胞内 SIRT1 蛋白量はグレリン添加

24 時間後に有意に増加することが確認された。なお、mock HEK293 細胞、C2C12 細胞においてはこれらの変化は観察されなかった。以上より、GHSR1a-HEK293 細胞において、グレリンはグレリン受容体依存的に SIRT1 の転写を誘導し、細胞内 SIRT1 蛋白質を増加させることが示された。

SIRT3 mRNA は、グレリン(100nM)添加 6 時間後に著明に減少した後、24 時間後以降に有意に増加した。細胞内 SIRT3 蛋白質は、グレリン添加 24 時間後に増加する傾向を示した。以上の変化は、mock HEK293 細胞および C2C12 細胞においては観察されなかった。以上より、GHSR1a-HEK293 細胞において、グレリンはグレリン受容体依存的に SIRT3 の転写を誘導する可能性および細胞内 SIRT3 蛋白質を増加させる可能性が示された。次に、SIRT3 の転写を誘導する PGC-1 α について検討を行った。PGC-1 α mRNA は、グレリン(100nM)添加 6 時間後に著明に減少し、24 時間後以降に有意に増加した。この結果から、SIRT3 mRNA は PGC-1 α の活性化によって誘導された可能性が示唆された。PGC-1 α の活性化はミトコンドリア新生を誘導するとされていることから、ミトコンドリア新生を制御する転写因子 NRF-1、TFAM およびミトコンドリア局在蛋白 SOD2 について検討した。NRF-1 mRNA は、グレリン(100nM)添加後 6 時間で有意に増加し、TFAM mRNA は 6 時間~24 時間で増加傾向を示した。さらに、SOD2 の mRNA は、グレリン(100nM)添加 24 時間以降、特に 72 時間で著明に増加した。以上より、グレリン刺激はミトコンドリア新生を促進する可能性が示唆された。

グレリン刺激により細胞内 SIRT1/3 活性が上昇したことを確認するために、基質蛋白のアセチル化状態を評価した。SIRT1/3 の標的蛋白の一つである p53 について、アセチル化 p53 に対する特異抗体 (Ac-K382 抗体) を用いてウェスタンブロットをおこなった。GHSR1a-HEK293 細胞において、グレリン(100nM)添加 24 時間後において、whole cell lysate のアセチル化 p53(K382)は有意に増加した。p53 は、核・細胞質だけでなく、ミトコンドリア外膜上にも局在することが知られている。そこで、ミトコンドリア画分を分離し、ミトコンドリア局在 p53 のアセチル化状態を評価した。グレリン(100nM)添加 24 時間後、ミトコンドリア画分の p53 のアセチル化(K382)は著明に減少した。SIRT1 はミトコンドリア外膜にも局在し、SIRT3 はミトコンドリアマトリクスに局在してそれぞれ脱アセチル化反応を行う。このことから、ミトコンドリア p53 の脱アセチル化は、細胞質もしくはミトコンドリア外膜に局在する SIRT1 の活性化によってもたらされた可能性が高いと考えられる。なお、グレリン刺激によって細胞内全 p53 のアセチル化 p53 が増加した理由は不明である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamada C, Iizuka S, Nahata M, Hattori T, Takeda H.	4. 巻 177
2. 論文標題 Vulnerability to psychological stress-induced anorexia in female mice depends on blockade of ghrelin signal in nucleus tractus solitarius.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 4666-4682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15219. Epub 2020 Sep 2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada C, Hattori T, Ohnishi S, Takeda H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Ghrelin Enhancer, the Latest Evidence of Rikkunshito.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Nutr.	6. 最初と最後の頁 761631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnut.2021.761631. eCollection 2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nahata M, Mogami S, Sekine H, Iizuka S, Okubo N, Fujitsuka N, Takeda H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Bcl-2-dependent autophagy disruption during aging impairs amino acid utilization that is restored by hochuekkito.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NPJ Aging Mech Dis.	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41514-021-00065-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nahata M, Fujitsuka N, Sekine H, Shimobori C, Ohbuchi K, Iizuka S, Mogami S, Ohnishi S, Takeda H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Decline in Liver Mitochondria Metabolic Function Is Restored by Hochuekkito Through Sirtuin 1 in Aged Mice With Malnutrition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Physiol.	6. 最初と最後の頁 848960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.848960. eCollection 2022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto C, Sekine H, Nahata M, Mogami S, Ohbuchi K, Fujitsuka N, Takeda H.	4. 巻 45
2. 論文標題 Role of Mitochondrial Dysfunction in the Pathogenesis of Cisplatin-Induced Myotube Atrophy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 780-792
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00171. Epub 2022 Apr 8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Mogami S, Nahata M, Sekine H, Fujitsuka N, Takeda H.
2. 発表標題 Impaired activation of sympathetic nervous-autophagy system is involved in the vulnerability of aged mice to undernutrition.
3. 学会等名 DDW2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nahata M, Mogami S, Sekine H, Fujitsuka N, Takeda H.
2. 発表標題 Activation of hepatic autophagy improves the impaired glucose-alanine cycle in undernourished aged mice.
3. 学会等名 DDW2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 .Matsumoto C, Sekine H, Nahata M, Mogami S, KOhbuchi K, Fujitsuka N, Takeda H
2. 発表標題 Muscle atrophy after chemotherapy is induced by mitochondrial damage and prolonged by myoblast determination protein-1 downregulation in mice.
3. 学会等名 DDW2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mogami S, Nahata M, Sekine H, Fujitsuka N, Ohnishi S, Takeda H.
2. 発表標題 Deteriorations of gluconeogenesis and locomotor activity due to age-related impairment of sympathetic nervous autophagy activation in mice.
3. 学会等名 DDW2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nahata M, Fujitsuka N, Sekine H, Ohbuchi K, Mogami S, Ohnishi S, Takeda H.
2. 発表標題 Hepatic sirtuin-1: the key regulator in recovering metabolic disorder through impaired mitochondrial biogenesis in undernourished aged mice.
3. 学会等名 DDW2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関