

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790891

研究課題名 (和文) グレリン細胞株の樹立とグレリン生合成分泌機構の解明

研究課題名 (英文) A study on the mechanisms of ghrelin production and secretion by using a novel ghrelin-producing cell line.

研究代表者

岩倉 浩 (Iwakura Hiroshi)

研究者番号：20378615

研究成果の概要 (和文)：今回の研究で、世界で初めてグレリン分泌細胞株 MGN3-1 の樹立に成功した。この細胞では、生理的修飾を受けたグレリンが、生理的調節を維持した状態で分泌され、グレリンの生合成分泌機構解明のための有用な研究ツールとなると考えられた。さらに、この細胞を用いたスクリーニングにより、オキシトシン、エピネフリン、ドーパミンがグレリン分泌を刺激することを見いだした。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we developed a ghrelin producing cell line MGN3-1, which secretes high amount of ghrelin with physiological acyl-modification and maturation under the physiological regulation, making this cell line one of the best tools to study the mechanisms of ghrelin production and secretion *in vitro*. Further, we examined the effects of peptide hormones and neurotransmitters on ghrelin secretion from MGN3-1 cells and found that oxytocin, epinephrine and dopamine significantly stimulated ghrelin secretion from MGN3-1 cells *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学

1. 研究開始当初の背景

グレリン血中濃度は、絶食で上昇し、再摂食で低下する、あるいは、やせで上昇し肥満で低下することから、グレリン分泌は、短期、長期のエネルギーバランスによって調節を受けることが示唆されてきた。しかし、具体的な直接のグレリン分泌調節因子や、細胞レベルでのグレリン生合成、分泌調節機構には、適当な *in vitro* での実験系が存在しないこと

もあり、不明な点が多かった。

2. 研究の目的

グレリン分泌細胞株を樹立することで、細胞レベルでのグレリン生合成、分泌調節機構を明らかにする。

3. 研究の方法

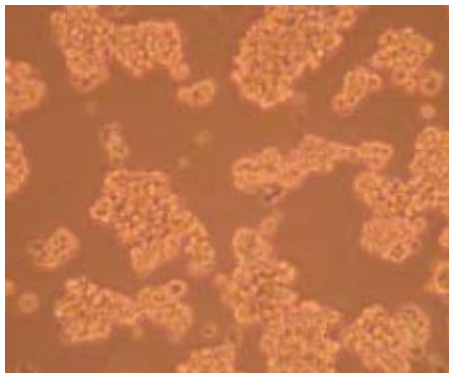
前年度までに、グレリンプロモーターの下

流に発癌遺伝子 SV40T 抗原を結合したコンストラクトを用いて、グレリン産生細胞腫瘍化トランスジェニックマウスを作成した。SV40T 抗原によって増殖した、グレリン分泌細胞由来の腫瘍を採取、コラゲナーゼ、ディスパーゼにて消化、10%FBS 入り DMEM を用いて 37°C10%CO₂ の条件下で培養した。さらに、混在する間葉系細胞を分離排除し、限界希釈法にて、クローン化を行い、細胞株を樹立した。樹立した細胞株に、ペプチドホルモン、神経伝達物質を添加培養、メディウム中のグレリン濃度を RIA 法で測定し、これらの因子が、グレリン分泌へ与える影響を検討した。

4. 研究成果

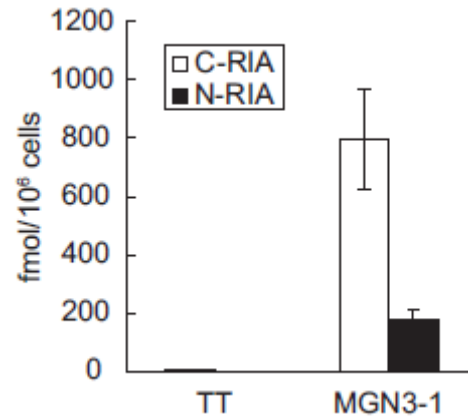
前年度までにすでに完成済みであった、グレリン産生細胞腫瘍化トランスジェニックマウス (岩倉ら、*Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009年) の胃に発生したグレリン産生腫瘍を採取し、コラゲナーゼ、ディスパーゼを用いて、消化、個々の細胞に分離した後、10%FBS 入り DMEM を用いて 37°C10%CO₂ の条件下で培養した。混在する間葉系細胞を除去した後、96 well を用いて限界希釈法により、サブクローニングした。

図1



樹立した細胞株 MGN (mouse ghrelinoma) 3-1 (図 1) は、PCR 法によって、グレリン遺伝子の発現が認められた。免疫染色法によっては、グレリン様免疫活性が認められ、また細胞内のグレリン濃度の測定では、これまでにグレリン産生が報告されていたヒト甲状腺髄様癌由来の TT 細胞株と比較して、約 5000 倍という高いグレリン産生能を示した (図 2)。

図2



グレリンは、3番目のセリン残基にオクタタン酸修飾を有し、この修飾がグレリン受容体 GHS-R を介した生理活性発揮には必須である。今回樹立した細胞株は、このオクタタン酸修飾に関わる Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) を発現しており、実際に産生されたグレリンはオクタタン酸修飾を正常に受けていた。また、グレリンのプロセッシングに関わるプロホルモンコンバーターゼ 1/3 の発現も認められ、プロセッシングに問題が無いことも確認した。nude マウスの皮下へこの細胞を移植したところ、血中グレリン濃度は上昇し、摂食量は有意に上昇し、この細胞によって産生されたグレリンが生理活性を持つことを確認した。

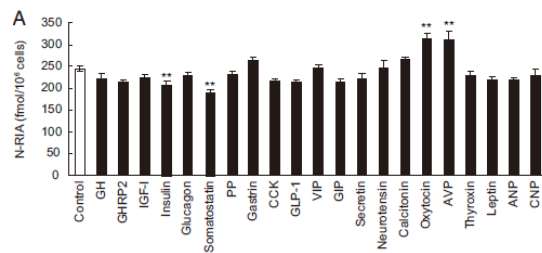
また、インスリン、ソマトスタチンをこの細胞へ添加培養したところ、グレリン分泌は有意に抑制され、*in vivo* である程度確立している、インスリンおよびソマトスタチンによるグレリン分泌抑制が、この細胞においても維持されていることを確認した。

今回樹立に成功した細胞は、世界で初めてのグレリン分泌細胞由来の細胞株であり、高いグレリン産生能、生理的なグレリンのプロセッシング、アシル化機構、少なくともインスリン、ソマトスタチンによる分泌調節機構を維持しており、グレリン産生機構、分泌調節機構の解明のための有用な *in vitro* の研究ツールとなることが期待された。

引き続き、今回樹立した細胞株を用いて、ペプチドホルモン、神経伝達物質が、グレリン分泌に与える影響について検討を行った。今回、検討を行ったペプチドホルモンのうち、オキシトシンおよびバゾプレッシンは MGN3-1 細胞よりのグレリン分泌を有意に刺

激した。(図3)

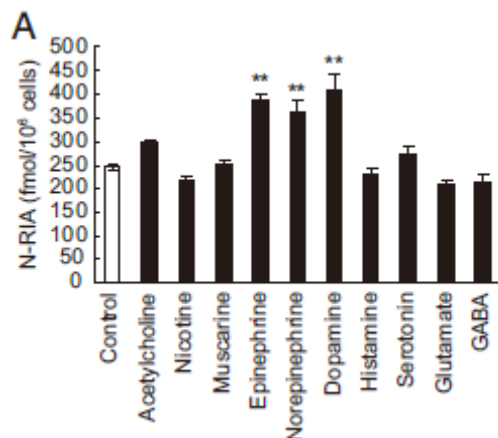
図3



MGN3-1 細胞では、バゾプレッシン受容体は発現しておらず、オキシトシン受容体のみが発現していること、また、オキシトシン受容体アンタゴニスト [d(CH₂)₅¹, Tyr(Me)², Orn⁸]-oxytocin によりバゾプレッシンのグレリン分泌刺激作用は減弱することから、バゾプレッシンの作用は、交差反応であると考えられ、オキシトシンがグレリン分泌刺激作用を持つと考えられた。

神経伝達物質では、エピネフリンおよびドーパミンがグレリン分泌を有意に刺激することを見いだした。(図4)

図4



MGN3-1 細胞は、RT-PCR 法で、アドレナリン α1a 受容体および β1 受容体を発現しており、非選択的 β アゴニスト isoproterenol、β1 アゴニスト denopamine では、グレリン分泌が有意に増加したものの、α1 アゴニスト phenylephrine、α2 アゴニスト clonidine、α1a アゴニスト A61603 ではグレリン分泌が刺激されないこと、一方で、エピネフリンによるグレリン分泌刺激作用は、β1 アンタゴニスト atenolol によって減弱することから、エピネフリンの作用は、アドレナリン β1 受容体を介することが示唆された。一方で、MGN3-1 細胞は、ドーパミン D1a 受容体、D2 受容体遺伝子を発現しており、非選択的ドーパミンアゴニスト apomorphine および D1a ア

ゴニスト fenoldopam ではグレリン分泌が刺激されるが、D2 受容体アゴニスト bromocriptine ではグレリン分泌が刺激されないこと、ドーパミンによるグレリン分泌刺激作用は、D1 受容体アンタゴニスト SKF83566 によって減弱することから、ドーパミンの作用は D1 受容体を介することが示唆された。グレリン遺伝子発現に関しては、オキシトシン、エピネフリン、ドーパミンのいずれも明かな作用は認められず、これらの因子は、グレリンの産生ではなく、分泌を主に刺激すると考えられた。

今回の検討により、グレリン分泌を直接刺激する因子3つが明らかとなり、グレリンのエネルギー代謝調節等における生理的役割を理解する上で、非常に有用な知見であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Yamada G, Ariyasu H, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Nakao K, Kangawa K. Generation of transgenic mice overexpressing a ghrelin analog. *Endocrinology*. 2010 Dec;151(12):5935-40. 査読有
- ② Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K. Ghrelin and functional dyspepsia. *Int J Pept*. 2010;2010. pii: 548457. 査読無
- ③ Hattori Y, Kanamoto N, Kawano K, Iwakura H, Sone M, Miura M, Yasoda A, Tamura N, Arai H, Akamizu T, Nakao K, Maitani Y. Molecular characterization of tumors from a transgenic mouse adrenal tumor model: comparison with human pheochromocytoma. *Int J Oncol*. 2010 Sep;37(3):695-705. 査読有
- ④ Iwakura H, Li Y, Ariyasu H, Hosoda H, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Establishment of a novel ghrelin-producing cell line. *Endocrinology*. 2010 Jun;151(6):2940-5. 査読有
- ⑤ Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Kanamoto N, Bando M, Kohno K, Sato T, Kojima M, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. A postweaning reduction in circulating ghrelin temporarily alters growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing

hormone in male mice but does not affect somatic growth. *Endocrinology*. 2010 Apr;151(4):1743-50. 査読有

- ⑥ Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda H, Hosoda K, Shimatsu A, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. A mouse model of ghrelinoma exhibited activated growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Sep;297(3):E802-11. Epub 2009 Jul 14. 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① Iwakura et al. Establishment of a ghrelin-producing cell line from a gastric tumor in ghrelin-promoter SV40 T-antigen transgenic mice. 5th International Peptide Symposium、2010/12/6, Kyoto
- ② 岩倉浩、グレリノーマモデルマウスとグレリン分泌細胞株の樹立と解析、第 15 回アディポサイエンス研究会シンポジウム、2010 年 8 月 21 日、千里新阪急ホテル
- ③ 岩倉浩、グレリノーマモデルマウスの作製と解析、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010 年 5 月 28 日、岡山国際交流センター
- ④ Iwakura H et al. Establishment of a transgenic mouse model of ghrelinoma. the 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010),2010/3/29, Kyoto
- ⑤ Iwakura H et al. Effects of Three Weeks Treatment of Ghrelin on Body Composition and Metabolic Parameters in Patients Undergoing Total Hip Replacement for Osteoarthritis. June 10-13 in Washington, DC
- ⑥ 岩倉浩、グレリン投与がヒトの糖代謝に与える影響の検討 人工股関節置換周術期患者に対するグレリン無作為二重盲検偽薬対照比較試験より、第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会、2009 年 5 月 21 日、大阪国際会議場
- ⑦ 岩倉浩、グレリン細胞腫瘍化トランスジェニックマウスの解析、第 82 回日本内分泌学会学術総会、2009 年 4 月 23 日、前橋商工会議所

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩倉 浩 (IWAKURA HIROSHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20378615