

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500794

研究課題名（和文） 活性型グレリン産生阻害を介して肥満を制御する食品素材の探索

研究課題名（英文） Investigation of food ingredients with anti-obese activity through inhibition of active ghrelin production

研究代表者

仮屋 蘭 博子 (KARIYAZONO HIROKO)

長崎国際大学・薬学部・教授

研究者番号：20437958

研究成果の概要（和文）：主に胃で産生され、摂食亢進作用を有するペプチドホルモン、グレリンの活性の阻害は、過食の防止、肥満の予防につながることを期待される。胃癌由来の AGS 細胞にグレリンの cDNA を導入することにより樹立したグレリン安定発現株 AGS-GHRL8 を用い、活性型グレリンの産生を阻害する物質を探索した。AGS-GHRL8 細胞の培地に、ヘプタン酸、オレイン酸およびエイコサペンタエン酸をそれぞれ添加したところ、活性型グレリンの産生が阻害されたが、酪酸および酢酸では阻害されなかったことから、オレイン酸およびエイコサペンタエン酸の活性型グレリン産生阻害食成分としての可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ghrelin is a gastric peptide hormone with orexigenic activity; therefore, inhibition of its production might prevent obesity. To identify candidate inhibitors of active ghrelin production, we established the AGS-GHRL8 cell line by transfection of ghrelin cDNA into AGS cells originating from human gastric carcinoma tissue. Heptanoic, oleic, and eicosapentaenoic acids inhibited active ghrelin secretion from AGS-GHRL8 cells, whereas acetic and butyric acids did not. Thus, oleic and eicosapentaenoic acids would be candidate food ingredients with anti-obese activity through inhibition of active ghrelin production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：活性型グレリン、デスアシル型グレリン、オクタン酸、グレリン安定発現株

1. 研究開始当初の背景

肥満は、経済的先進国において、糖尿病、動脈硬化症をはじめとする生活習慣病、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発症基盤と考えられ、その対策が課題となっている。体脂肪が過剰に蓄積した状態が「肥満」と定義され、肥満の脂肪組織では、腫瘍壊死因子 α やインターロ

イキン6に代表される炎症性サイトカインの産生の亢進、アディポネクチンのような抗炎症性サイトカインの産生低下が起こり、これが肥満やメタボリックシンドロームに合併する炎症性変化に関連するとされている。加えて、近年の美容志向の高まりとも相俟って、健康増進および美容保持のための肥満の改善を謳った種々のダイエット食品が氾濫している。このような社会的背景の下、成長ホルモン分泌促進因子として発見・構造決定された28アミノ酸残基からなるペプチドであるグレリンは、強力な成長ホルモン分泌作用とともに摂食亢進作用も有しており、その活性発現にはN末端から3番目のアミノ酸であるセリン残基の側鎖が脂肪酸のオクタン酸でアシル化修飾を受けていることが必須とされている。また、循環血液中には活性型のオクタン酸アシル化グレリンとともにその数十倍の濃度にのぼるデスアシル型グレリンが存在している。

グレリンにオクタン酸を転位する酵素は、グレリンのオクタン酸修飾酵素 (ghrelin O-acyl transferase: GOAT) であること、グレリンの脂肪酸修飾は、食餌として摂取した脂肪酸が直接アシル転位されておこることがマウスを用いた研究で、それぞれ報告されている。オクタン酸の細胞内への取り込みを阻害すること、またはグレリンのオクタン酸アシル転位酵素を阻害することは、活性型グレリンの産生を抑制し、摂食亢進を抑えることが想像され、肥満の予防および改善に貢献できると考え、研究に着手した。

2. 研究の目的

グレリンを産生する細胞株を用い、*in vitro* におけるオクタン酸アシル化グレリン (以下、活性型グレリンと略す) の産生を抑制する物質を探索する。

3. 研究の方法

(1) グレリン産生細胞株の作製

ヒト胃癌由来 AGS 細胞におけるグレリン、GOAT および翻訳後プロセッシングでの関与が知られているプロホルモン転換酵素 (PC) 1/3、PC2、フューリンの mRNA の発現を逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応により確認した。グレリンの cDNA を発現ベクター pcDNA3 (ネオマイシン耐性遺伝子有り) に挿入したプラスミドを AGS 細胞にトランスフェクトし、ネオマイシン添加培地で培養することによりグレリン安定発現細胞をスクリーニングした。AGS 細胞およびグレリン安定発現細胞におけるグレリンペプチドの発現はウエスタンブロット法により行った。

(2) 活性型およびデスアシル型グレリンの定量

1/10 容量の 1 mol/L 塩酸を添加して調製した細胞培地をサンプルとした。市販の ELISA キットを用い、活性型およびデスアシル型グレリンをそれぞれ定量した。活性型グレリン産生抑制候補物質は、細胞培地に試験物質を添加し、一定時間培養後の培地中の活性型グレリン濃度を測定することにより評価した。

4. 研究成果

(1) グレリン産生細胞株 AGS-GHRL8 の樹立

AGS 細胞は、その培地中にデスアシル型グレリンがわずかに検出されたものの、活性型グレリンは検出されなかった。さらに、AGS 細胞は、グレリンの mRNA の発現が低く (図 1-A)、グレリンペプチドは検出されなかった (図 1-B)。しかしながら、AGS 細胞には、GOAT およびフューリンの mRNA の発現が認められ、グレリンのプロセッシングおよびアシル化修飾に必要な因子が存在していると考えられた (図 1-A)。このため、AGS 細胞を用い、グレリンを高発現する安定発現株の作製を行うこととした。

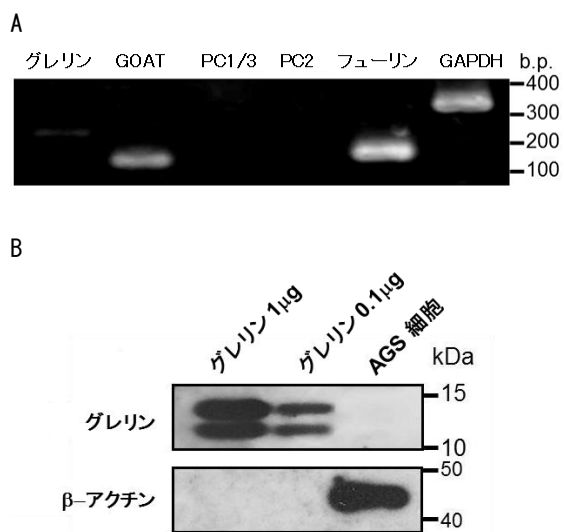


図1 AGS細胞におけるグレリン、GOAT およびプロホルモン転換酵素の mRNA 発現の逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応による確認 (A) とグレリンペプチドのウエスタンブロット法による確認 (B)

逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応で増幅した AGS 細胞のグレリン cDNA を発現ベクターに挿入したプラスミドをトランスフェクトした AGS 細胞は、グレリンを発現していることがウエスタンブロット法により確認された (図 2)。

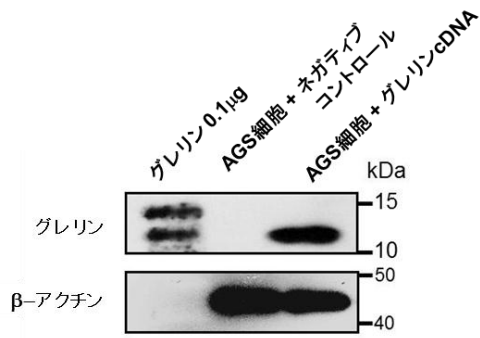


図2 グレリン遺伝子導入 AGS 細胞におけるグレリンの発現

グレリンの発現プラスミドを AGS 細胞にトランスフェクト後、ネオマイシン添加培地で培養し、コロニーを形成した 10 個の細胞のうち、7 個でグレリンが発現していることがウエスタンブロット法により確認された (図3)。このうち、発現したグレリンレベルが最も高かった 8 番目の細胞を活性型グレリン産生抑制物質探索のための細胞評価系として用いることとし、AGS-GHRL8 と命名した。

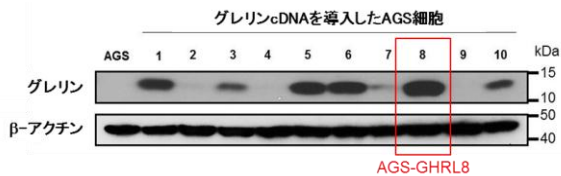


図3 グレリン安定発現 AGS 細胞のスクリーニング

AGS-GHRL8 は、GOAT およびフェーリンの mRNA を AGS 細胞と同様に発現していることが確認された (図4)。また、AGS-GHRL8 は、継体を繰り返してもグレリン mRNA およびグレリンペプチドの発現状況に変化は認められなかった。

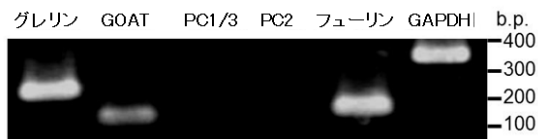


図4 AGS-GHRL8 における GOAT 及びフェーリンの発現確認

以上、グレリンを高発現する安定発現株 AGS-GHRL8 の樹立に成功した。

(2) AGS-GHRL8 細胞におけるデアシル型グレリンおよび活性型グレリンの分泌

AGS-GHRL8 細胞は、親株の AGS 細胞では少なかったデアシル型グレリンを大量に分泌することが確認され (図5-A)、わずかながら活性型グレリンの分泌も認められた (図5-B)。また、培地にオクタン酸を添加したところ、オクタン酸濃度依存的に活性型グレリン量が増加した (図5-B)。このとき、デアシル型グレリンは、活性型グレリンの数十倍多く検出された (図5-B)。

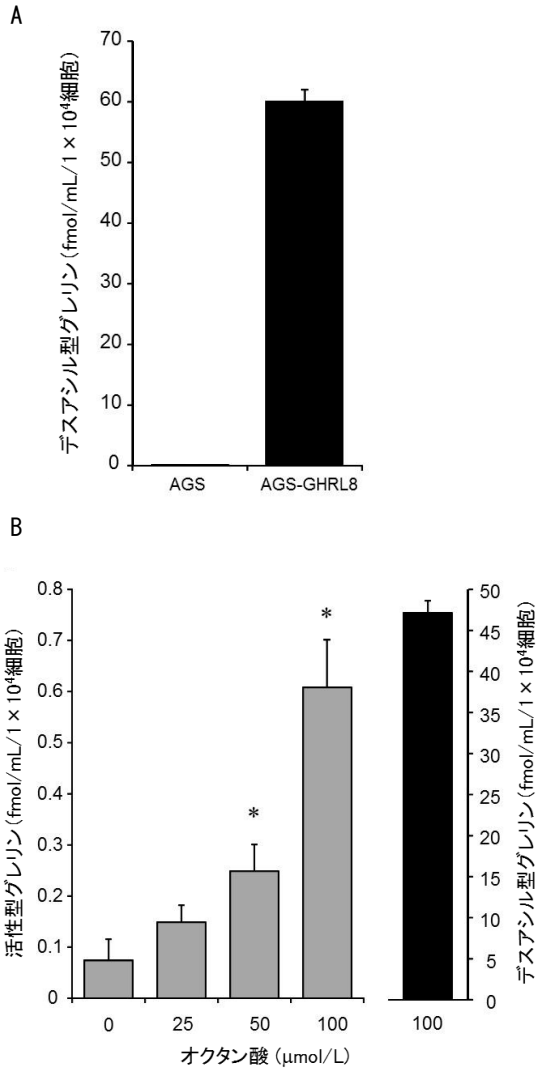


図5 AGS-GHRL8 細胞におけるデアシル型グレリン (A) および活性型グレリンの分泌 (B)
平均±標準偏差、* $p < 0.01$ vs オクタン酸 $0 \mu\text{mol/L}$

以上の結果より、AGS-GHRL8 細胞は、オクタン酸の取り込みおよび GOAT によるアシル化機構が機能していると考えられ、活性型グレリン産生の in vitro 評価系としての有用性が示唆された。

(3) 活性型グレリン産生阻害物質の探索における AGS-GHRL8 細胞の有用性

AGS-GHRL8 細胞が活性型グレリン産生阻害物質の探索に有用か否かを検討した。ヘプタン酸摂取後のマウスの胃でヘプタン酸アシル化グレリンが検出されることが報告されており、ヘプタン酸がオクタン酸と競合することによって活性型グレリンの産生を阻害することが示唆されることから、AGS-GHRL8 細胞の培地にヘプタン酸を添加し、培地中の活性型グレリン濃度を測定した。その結果、100 $\mu\text{mol/L}$ のオクタン酸との併用で上昇した活性型グレリンが 25~100 $\mu\text{mol/L}$ のヘプタン酸の濃度依存的に抑制され、100 $\mu\text{mol/L}$ のヘプタン酸では完全に抑制された (図 6)。一方、マウスへの投与後胃でそのアシル化グレリンが検出されなかったとされる酪酸は、100 $\mu\text{mol/L}$ においてオクタン酸添加により増加した活性型グレリンになんら影響を及ぼさなかった (図 6)。また、デスアシル型グレリンは、ヘプタン酸あるいは酪酸の添加によって影響されることなく、活性型グレリンの数十倍の量が分泌された。

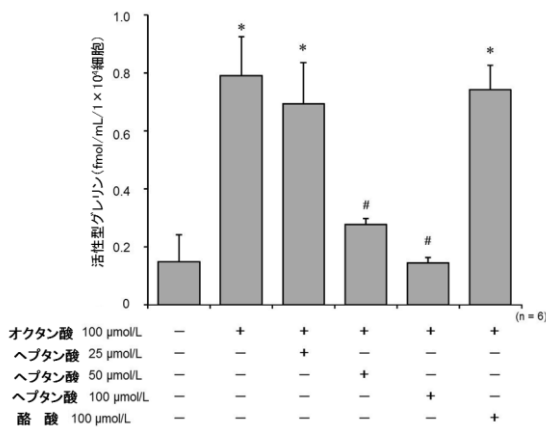


図 6 AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン産生に及ぼす脂肪酸の影響

平均±標準偏差

* $p < 0.01$ vs 未処置、# $p < 0.01$ vs オクタン酸 100 $\mu\text{mol/L}$

既報の動物実験の結果に基づいた仮説通り、AGS-GHRL8 細胞は、培地へのヘプタン酸添加により活性型グレリンの産生が阻害され、酪酸では阻害されなかったことから、活性型グレリン産生阻害物質の探索における AGS-GHRL8 細胞の有用性が明らかになった。

(4) AGS-GHRL8 細胞の活性型グレリン分泌に及ぼす脂肪酸の影響

ヘプタン酸は食物中に含まれていない脂肪酸であるが、活性型グレリン産生阻害を介

して肥満を防止する食品素材の検索のために、食物に含有されている脂肪酸としてオリーブ油に多く含まれるオレイン酸、魚油に多く含まれるエイコサペンタエン酸および種々の食品に含まれている酢酸を用い、AGS-GHRL8 細胞のグレリン産生能を検討した。100 $\mu\text{mol/L}$ の酢酸は、活性型グレリンの産生を全く抑制しなかったが、100 $\mu\text{mol/L}$ のオレイン酸およびエイコサペンタエン酸は、同濃度のヘプタン酸と同様、オクタン酸添加により増加した活性型グレリンの産生を完全に抑制した。

以上の結果より、オレイン酸およびエイコサペンタエン酸の活性型グレリン産生阻害食成分としての可能性が明らかになった。

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 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. *Journal of Biomolecular Screening* first published on May 23, 2013 as doi:10.1177/1087057113489349. 査読有
- ② Uto T, Sakamoto A, Tung HN, Fujiki T, Kishihara K, Oiso S, Kariyazono H, Morinaga O, Shoyama Y. Anti-proliferative activities and apoptosis induction by triterpenes derived from *eriobotrya japonica* in human leukemia cell lines. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 4106-4120, 2013. 査読有
- ③ Oiso S, Ikeda R, Nakamura K, Takeda Y, Akiyama S, Kariyazono H. Involvement of NF- κ B activation in the cisplatin resistance of human epidermoid carcinoma KCP-4 cells. *Oncology Reports* 28, 27-32, 2012. 査読有
- ④ Kariyazono H, Nakamura K. Pleiotropic effects of dietary fatty acids and fatty acid involvement in chronic mild inflammation-related diseases. *Journal of Health Science* 56, 473-487, 2010. 査読無
- ⑤ Nakamura K, Kariyazono H. Influence of

endocrine-disrupting chemicals on the immune system. Journal of Health Science 56, 361-373, 2010. 査読無

- ⑥ Uto T, Suangkaew N, Morinaga O, Kariyazono H, Oiso S, Shoyama Y. Eriobotryae folium extract suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression by inhibition of NF-kappaB and MAPK activation in murine macrophage. American Journal of Chinese Medicine 38, 985-994, 2010. 査読有

[学会発表] (計 18 件中 8 件掲載)

- ① 大磯茂、野邊みゆき、中村和男、仮屋蘭博子、グレリン産生・分泌細胞株を用いた活性型グレリン産生抑制物質の探索、第29回日本薬学会九州支部大会、2012年12月8日-9日、熊本
- ② 宇都拓洋、坂本綾奈、日高由貴、藤木司、岸原健二、大磯茂、仮屋蘭博子、森永紀、正山征洋、コロソール酸による癌細胞増殖抑制能とその作用機構解明、第19回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2012年11月1日-2日、大阪
- ③ Yamaguchi Y, Oiso S, Nobe M, Kariyazono H. Inhibitory effects of some fatty acids on active ghrelin production in a stable ghrelin-expressing AGS-GHRL8 cell line. World Congress on Oleo Science & 29th ISF Congress (WCOS2012), September 30-October 4, 2012, Sasebo, Japan.
- ④ Oiso S, Nobe M, Nakamura K, Kariyazono H. Establishment of a cell-based assay system for exploring inhibitors of active ghrelin production. World Congress on Oleo Science & 29th ISF Congress (WCOS2012), September 30-October 4, 2012, Sasebo, Japan.
- ⑤ Nakamura K, Iwase H, Kamata R, Sekiguchi E, Hirano S, Oiso S, Kariyazono H, Sakata R. Potential of omega-3 fatty acids-rich supplement to modulate interferon-gamma production of CD4 positive cells from patients with heart diseases. World Congress on Oleo Science & 29th ISF Congress (WCOS2012), September 30-October 4, 2012, Sasebo, Japan.

- ⑥ Nakamura K, Iwase H, Terada R, Hirano S, Oiso S, Kariyazono H. Potential use of ghrelin as a predictive marker for cerebral outcomes after cardiac surgery. The 25th Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress (FAPA 2012), September 13-16, 2012, Bali Indonesia.

- ⑦ 坂本綾奈、宇都拓洋、大磯茂、仮屋蘭博子、森永紀、正山征洋、コロソール酸によるヒト白血病細胞アポトーシス誘導機序の解明、第66回日本栄養・食糧学会大会、2012年5月18日-20日、仙台

- ⑧ 大磯茂、野邊みゆき、中村和男、仮屋蘭博子、活性型グレリン産生抑制物質探索のための細胞評価系の構築、日本薬学会第132年会、2012年3月28日-31日、札幌

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：活性型グレリン産生評価方法及び同方法で用いる活性型グレリン産生評価細胞
発明者：仮屋蘭博子、大磯茂
権利者：学校法人九州文化学園
種類：特許
番号：特許出願番号 2012-160708
出願年月日：平成 24 年 7 月 19 日
国内外の別：国内

名称：活性型グレリン産生抑制剤及び活性型グレリン産生抑制方法
発明者：仮屋蘭博子、大磯茂
権利者：学校法人九州文化学園
種類：特許
番号：特許出願番号 2012-160711
出願年月日：平成 24 年 7 月 19 日
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
長崎国際大学
<http://www.niu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仮屋蘭 博子 (KARIYAZONO HIROKO)
長崎国際大学・薬学部・教授
研究者番号：20437958

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

大磯 茂 (OISO SHIGERU)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：40513106