

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500781

研究課題名(和文) 蛋白同化を介して抗加齢に機能するグレリンの発現に及ぼす加齢と運動の影響

研究課題名(英文) Effects of aging and physical activity on regulation of ghrelin system

研究代表者

十枝内 厚次 (Toshinai, Koji)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：80381101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：グレリンは、ヒトとラットの胃から発見されたペプチドホルモンで、成長ホルモン分泌と摂食に機能する。ヒトにおいて、グレリン発現や血中グレリンレベルは、加齢に伴い減少することが知られているが、マウスでは認められなかった。グレリンレベルの減少は、成長ホルモン分泌の減少を引き起こすソマトポーズにも関連し、サルコペニアの原因となると考えられる。申請者は、グレリンレベルの減少が、高齢期の高血圧患者の動脈硬化進行と関連するとともに、心血管疾患リスクファクターとしてグレリン濃度が重要であることを見出した。適正なグレリンレベルを保つことは、生活習慣病予防や高齢期の健康体力向上に重要である。

研究成果の概要(英文)：Age-related declines of growth hormone secretion and food intake have been termed the somatopause and anorexia of aging, respectively. Ghrelin, a stomach-derived 28-amino-acid peptide, was isolated from human and rat stomachs as an endogenous ligand of growth hormone secretagogue receptor. Ghrelin stimulates growth hormone release and food intake when peripherally administered to rodents and humans. Therefore, aging process represented by catabolic-anabolic imbalance in peripheral tissues may increase ghrelin utilization to maintain cell functions, physical activity, and health. Unfortunately I could not identify the age-related decline of ghrelin synthesis in mice. Whereas I found relationship between plasma ghrelin level and incidence of cardiovascular disease. A maintenance of adequate ghrelin level seems to prevent the incidence of lifestyle related disease and to improve physical fitness for health.

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：健康スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：グレリン 加齢 消化管ペプチド 迷走神経 運動

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢に伴う蛋白異化作用(カタボリック作用)の亢進や摂取エネルギーの減少は、高齢者の生活体力を奪い、生活の質(Quality of Life: QOL)を低下させる。特に筋におけるカタボリック作用の亢進は、サルコペニアと呼ばれ、筋力低下による生活体力や健康体力の低下を来す。グレリンは、ラットおよびヒトの胃から同定されたペプチドホルモンで、成長ホルモン分泌、摂食亢進、炎症抑制、アポトーシス抑制、細胞の生存に機能する。これらグレリン作用は、加齢による様々な基質の退行性変化改善に機能する可能性を示唆する。

(2) 骨格筋ではグレリン受容体が発現しているものの、直接的な作用は知られていない。これまでのグレリン研究から考えて、グレリンのアナボリック作用は、生体全体としてカタボリックな局面への移行を抑制することで機能していると考えられる。

(3) これまでに知られているグレリン分泌に影響を与える生理的条件は、夜間睡眠と空腹であった。申請者は、運動も一過性に血漿グレリンレベルが減少させることから、グレリン分泌の一つの調節因子となることを報告した(Horm. Metab. Res. 2007)。このことは、日常のライフスタイルがグレリンの血中濃度に影響すると考えられる。

(4) グレリンレベルの維持には、その細胞数とその機能の維持が必要不可欠であり、高齢期の分泌量低下は、グレリン細胞の機能低下に起因すると考えられる。グレリン分泌に関連する因子を明らかにし、加齢によるグレリンレベルの低下の機序を解明する必要がある。また、QOLとグレリンの関係性を明らかにすることは、意義がある。

2. 研究の目的

グレリンは、摂食と成長ホルモン分泌を刺激し、エネルギー同化に機能するペプチドホルモンである。グレリンの血漿濃度は加齢に伴い減少する。このグレリンの低下は、加齢に伴う食欲不振や成長ホルモン分泌不全(ソマトポーズ)の原因の一つとして考えられ、サルコペニアの進行とも関連する。またグレリン分泌の低下は、動脈硬化の進行を促進することから生活習慣病発症とも関連している。それ故に、内因性のグレリンレベルを高く保つことは、生活体力および健康体力の維持・増進において重要である。本研究は、グレリン分泌に影響する因子を解析し、グレリンの分泌の変化と疾患の関係、グレリン補充の意義について解析する。

3. 研究の方法

(1) グレリン EGFP-トランスジェニックマウスの12週齢と8ヶ月齢時点でサンプリングを行い、EGFP陽性細胞数を測定した。またグレリン EGFP-トランスジェニックマウスのEGFP陽性細胞を蛍光観察下でマイクロダイセクションして100個の細胞を回収した。マイクロダイセクションすることで、EGFP陽性細胞以外の細胞の混入を完全に予防した。回収した細胞からmRNAを抽出し、脂質、糖、その他の消化管ペプチドに関連した受容体の発現をPCR法で解析した。

(2) グレリンの求心性シグナルを解析するため、迷走神経節神経細胞の単離技術を確立し、個別の迷走神経細胞を用いて、グレリン投与後の膜電位変化をパッチクランプ法で解析し、カルシウム指示薬 Fura-2 を用いた細胞内カルシウム変動を解析した。測定後にグレリンに応答した細胞を回収し、mRNAを抽出した後、グレリン受容体の発現を確認した。

(3) 6週齢の雄性 C57BL/6J マウスを60% kcal 脂肪含有食(高脂肪食)摂取群と普通食摂取群の2群に分け、12週間飼育した。12週後にグレリンを投与し、摂食、成長ホルモン分泌、迷走神経電気活動、迷走神経節遺伝子発現、迷走神経リン酸化シグナル変化を測定した。

(4) 雄性 C57BL/6J マウスを用いて、後肢懸垂による抗重力筋萎縮モデルを作製した。2週間の後肢懸垂中、グレリンを皮下に1日2回投与した。対照群は生理食塩水を投与した。最後のグレリン投与15分後に採血し、成長ホルモンを測定し、グレリンの作用が残存していることを確認した。被検筋は、ひらめ筋と足底筋とした。骨格筋は重量を測定した後、蛋白発現と mRNA 発現解析に用いた。

(5) 2週間の後肢懸垂後、拘束を解いた後、5日間グレリンもしくは生理食塩水を皮下に1日2回投与した。麻酔下で採血を行い、血糖、インスリン、コルチコステロン、グレリンを測定した。被検筋は、ひらめ筋と足底筋とした。骨格筋は重量を測定した後、蛋白発現と mRNA 発現解析に用いた。

(6) 高血圧高齢者596名を対象に、24時間血圧、採血(デスアシルグレリン、高分子量アディポネクチン、PAI-1、高感度CRP、血中NOx)、エコーによる内頸動脈内幕-中膜肥厚心疾患疾患既往歴を調査した。また心疾患イベントの発現を継続して追跡調査を行った。

4. 研究成果

(1) グレリン発現における加齢の影響

マウスでは、グレリンの血中濃度は加齢に伴い有意に増大した。グレリン細胞数も増加傾向にあった。ヒトにおいてグレリンは、加齢に伴い減少することが知られており、ヒトとマウスでは、加齢に対する応答性が異なっていることから、老化における生物学的な役割が異なることが推察された。申請者は、ヒトにおいて、グレリンの低下が、高齢高血圧患者の動脈硬化進行に関連することを明らかにしてきたが、新たに高齢期のグレリンの低下は、心血管系疾患全体のリスクを高めることを明らかにした。加齢に伴うグレリンの低下を予防することが、高齢期の健康維持に重要であるとともに、グレリン補充療法の重要性が明らかになった。またグレリンは3番目のセリン残基が血漿中のエステラーゼで容易に切断されてしまうため、サンプルの短時間での血漿分離と塩酸処理を必要とする。一方、デスアシルグレリンの測定では、アシル基の安定性のための塩酸処理が不要であることから、デスアシルグレリン測定は健康診断レベルの採血でも評価できる可能性が拓け、その測定意義から鑑みて、有用性が拡大していくと考えられる。

(2) マウスにおけるグレリンの発現調節

マウスにおいて、グレリンの発現は、エネルギー代謝や栄養素の影響を受けることが明らかになった。高脂肪食を12週間負荷したマウスでは、グレリン分泌は減少した。この減少は、すでに知られている体重依存性のものと考えられる。グレリン細胞は、GPR40、GPR119を発現しており、それぞれ短鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸に対する応答性を有していると考えられる。またインスリン受容体や2型糖輸送単体(Glut2)を発現していることから、糖質の情報も受け取っている。短鎖脂肪酸の受容体であるGPR41も強く発現していた。GPR41は、腸内細菌によって代謝された短鎖脂肪酸によって活性化されることが知られており、局所の炎症反応と関係する。申請者は、グレリン分泌が、食事に含まれる栄養素や炎症反応によって変化する可能性を示した。また体重の増加によってグレリンが減少する根本的な機序として、腸管の炎症が関係するかもしれない。

(3) 肥満におけるグレリンの臨床的意義

高脂肪食肥満マウスにおいて、グレリン分泌の減少が生じることは前述した。この肥満マウスでは、末梢に投与されたグレリンによる摂食亢進作用と迷走神経電気活動抑制作用が消失し、成長ホルモン分泌作用も抑制された。申請者は、末梢におけるグレリン抵抗性の存在を明らかにした。グレリンが、迷走神経節で合成されたグレリン受容体を、胃のグレリン細胞周辺で活性化し、迷走神経求心

路の電気活動を抑制することで、中枢に空腹情報を伝達することを明らかにした。グレリン受容体の活性化は、電位依存性カリウムチャンネルを活性化し、神経の過分局を大きくすることで、スパイク数を減少させると考えられる。肥満マウスでは、グレリンの迷走神経求心性電気活動の抑制作用が消失していた。その原因として、迷走神経節でのグレリン受容体発現が有意に減少していることが考えられる。迷走神経節では、高脂肪食摂取により、炎症性サイトカインの発現が増加しており、迷走神経節内の炎症反応がグレリン受容体の発現を退化させ、グレリンの情報伝達機能を破綻させると考えられる。一方で、肥満マウスであっても、投与されたグレリンは、GH分泌機能が残存していることから、摂食を増やさずGHを介して脂肪分解に機能することから、肥満の病態改善にも有効であると考えられる。

(4) サルコペニアにおけるグレリンの臨床的意義

脱負荷による筋萎縮モデルとして、後肢懸垂マウスを作出した。後肢懸垂中のグレリン皮下投与は、非投与群に比して、平目筋と足底筋の萎縮を軽減した。特に足底筋で作用が顕著であり、筋萎縮が大きい速筋に対して有効であった。また後肢懸垂の拘束から解放した後のグレリン投与は、非投与群に比して、骨格筋量の増加が有意に大きかった。グレリン投与は、骨格筋のIGF-1合成とSTAT5のリン酸化を有意に増加させた。グレリンによって分泌が亢進したGHは、骨格筋のIGF-1合成を高め、STAT5経路を活性化することで、骨格筋再生に機能することが明らかになった。心血管機能が低下した高齢者の多くは、運動機能も低下している。グレリンの低下は、高齢者の虚弱性とも関係しており、申請者は、グレリンの補充がサルコペニアの治療を介して運動機能を改善できる可能性を提示した。

(5) まとめ

グレリンの分泌は、加齢の影響よりも、食事やエネルギー代謝の影響を強く受けると考えられる。特に脂質は、グレリン分泌を調節し、長期間の高脂肪食摂取は、グレリン分泌を低下させる。高脂肪食摂取は、グレリン分泌のみならず、グレリンの迷走神経を介した情報伝達経路も遮断し、生体のグレリンシステムを破綻させる。血中を介したグレリンのGH分泌は、肥満やサルコペニアでも残存することから、グレリンの臨床的意義は高いと思われる。

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9件)

- Koshinaka, K., Toshinai, K., Mohammad, A., Noma, K., Oshikawa, M., Ueno, H., Yamaguchi, H. and Nakazato, M. (2011) Therapeutic potential of ghrelin treatment for unloading-induced muscle atrophy in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 412, 296-301. (査読有)
- Shiiba, T., Ueno, H., Toshinai, K., Kawagoe, T., Naito, S., Tobina, T., Nishida, Y., Shindo, M., Kangawa, K., Tanaka, H. and Nakazato, M. (2011) Significant lowering of plasma ghrelin but not des-acyl ghrelin in response to acute exercise in men. *Endocr J*, 58, 335-342. (査読有)
- 十枝内厚次, 中里雅光 (2012) NERP-2 とオレキシン. *Clin Neurosci*, 30, 198-199. (査読無)
- Moin, A. S., Yamaguchi, H., Rhee, M., Kim, J. W., Toshinai, K., Waise, T. M., Naznin, F., Matsuo, T., Sasaki, K., Minamino, N., Yoon, K. H. and Nakazato, M. (2012) Neuroendocrine regulatory peptide-2 stimulates glucose-induced insulin secretion in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 428, 512-517. (査読有)
- Tsuchimochi, W., Kyoraku, I., Yamaguchi, H., Toshinai, K., Shiomi, K., Kangawa, K. and Nakazato, M. (2013) Ghrelin prevents the development of experimental diabetic neuropathy in rodents. *Eur J Pharmacol*, 702, 187-193. (査読有)
- Toshinai, K. (2013) The role of gut-hypothalamus axis for feeding regulation. *J Phys Fitness Sports Med*, 2, 69-75. (査読無)
- Koshinaka, K., Kawamoto, E., Abe, N., Toshinai, K., Nakazato, M. and Kawanaka, K. (2013) Elevation of muscle temperature stimulates muscle glucose uptake in vivo and in vitro. *J Physiol Sci*, 63, 409-418. (査読有)
- Yano, Y., Nakazato, M., Toshinai, K., Inokuchi, T., Matsuda, S., Hidaka, T., Hayakawa, M., Kangawa, K., Shimada, K. and Kario, K. (2014) Circulating Des-acyl Ghrelin Improves Cardiovascular Risk Prediction in Older Hypertensive Patients. *Am J Hypertens*, 27, 727-733. (査読有)
- Toshinai, K., Saito, T., Yamaguchi, H., Sasaki, K., Tsuchimochi, W., Minamino, N., Ueta, Y. and Nakazato, M. (2014) Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2 (NERPs) inhibit the excitability of

magnocellular neurosecretory cells in the hypothalamus. *Brain Res*, 1563, 52-60. (査読有)

[学会発表](計24件)

- 十枝内厚次, 山口秀樹、影山晴秋、松尾崇、佐々木一樹、塩田清二、南野直人、中里雅光. NERP-2 の摂食およびエネルギー代謝調節作用. 神戸、第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011.4.23.
- ワイズ ティエムザベッド、モイン アブサレーエムディ、ナズニン ファーハナ、十枝内厚次、新島旭、中里雅光. Interaction between ghrelin and GLP-1 in feeding regulation. 神戸、第 84 回日本内分泌学会学術総会、2011.4.21.
- 十枝内厚次、ワイズ ザベッド、塩田清二、新島旭、中里雅光. 摂食調節における消化管ペプチドの相互連関. 下関、第 66 回日本体力医学会、2011.9.18.
- 十枝内厚次、グレリンと GLP-1 の迷走神経を介した摂食調節連関. 淡路、第 32 回日本肥満学会、2011.9.23.
- 十枝内厚次、塩田清二、新島旭、中里雅光. グレリンと GLP-1 の摂食調節連関. 淡路、第 32 回日本肥満学会、2011.9.23.
- ナズニン ファーハナ、十枝内厚次、中里雅光. Species comparison of hypothalamic neuropeptides-induced macroneutrient selection. 淡路、第 32 回日本肥満学会、2011.9.23.
- 十枝内厚次、齋藤健、山口秀樹、佐々木一樹、南野直人、上田陽一、中里雅光. NERP-1 と NERP-2 のシナプス前入力介したバソプレシン分泌調節. 東京、第 38 回日本神経内分泌学会学術集会. 2011.11.26.
- 十枝内厚次、齋藤健、山口秀樹、佐々木一樹、南野直人、上田陽一、中里雅光. NERPs によるバソプレシン分泌調節機序の解析. 名古屋、第 85 回日本内分泌学会学術総会、2012.4.19-21.
- 十枝内厚次、矢野裕一郎、中里雅光. グレリンを用いた高齢者高血圧患者の動脈硬化度予測に関する研究. 岐阜、第 67 回日本体力医学会、2012.9.14-16.
- 十枝内厚次、ペプチドによる摂食調節機序の解析. 北九州、第 39 回日本神経内分泌学会学術集会. 2012.9.28-29.
- 十枝内厚次、ワイズ ザベッド、塩田清二、新島旭、中里雅光. 消化管由来ペプチドの迷走神経を介した摂食調節連関. 北九州、第 39 回日本神経内分泌学会学術集会. 2012.9.28-29.
- Toshinai, K. and Nakazato, M. Functional interaction between ghrelin and GLP-1 for feeding and disruption of peripheral feeding regulation under obese condition. Banf (Canda), Keystone Symposia on

Molecular and Cellular Biology. 2013.3.19-22.

ナズニン ファーハナ、十枝内厚次、ワイズ ザベッド、中里雅光. グレリンの摂食調節機能の解析. 仙台、第 86 回日本内分泌学会学術総会. 2013.4.25-27.

ワイズ ザベッド、十枝内厚次、中里雅光. グレリンと GLP-1 の迷走神経を介した摂食調節連関. 仙台、第 86 回日本内分泌学会学術総会. 2013. 4.25-27.

十枝内厚次、中里雅光. 迷走神経を介した償還ペプチドによるエネルギー対象調節機序. 東京、第 10 回 GPCR 研究会. 2013.5.9-10.

Toshinai, K. and Nakazato, M. Functional interaction between ghrelin and GLP-1 for feeding and disruption of peripheral feeding regulation under obese condition. 熊本、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2013. 5.16-18.

十枝内厚次、ワイズ TM ザベッド、中里雅光. 消化管ペプチドの迷走神経を介した摂食調節連関. 東京、第 1 回 GUTS Conference. 2013.8.3.

Toshinai, K., Naznin, F. and Nakazato, M. Diet-induced obesity promotes peripheral and central ghrelin resistance in mice. 札幌、The 36th Naito Conference, Molecular Aspects of Energy Balance and Feeding Behavior. 2013. 9.10-13.

十枝内厚次、ナズニン ファーハナ、中里雅光. 高脂肪食負荷マウスにおけるグレリンの機能解析. 東京、第 68 回日本体力医学会大会. 2013.9.21-23.

十枝内厚次、中里雅光. グレリンと GLP-1 による摂食調節連関の時間制御. 東京、第 34 回日本肥満学会. 2013.10.11-12.

⑳ ナズニン ファーハナ、十枝内厚次、ワイズ ザベッド、中里雅光. 高脂肪食負荷マウスにおけるグレリン抵抗性の病態生理学的解析. 東京、第 34 回日本肥満学会. 2013.10.11-12.

㉑ 十枝内厚次、山口秀樹、佐々木一樹、影山晴秋、塩田清二、南野直人、中里雅光. NERP-2 のオレキシンを介した代謝調節. 宮崎、第 40 回日本神経内分泌学会学術集会. 2013.10.25-26.

㉒ 十枝内厚次、Waise TM Zaved、中里雅光. 迷走神経を介したグレリンと GLP-1 の摂食調節連関. 宮崎、第 40 回日本神経内分泌学会学術集会. 2013.10.25-26.

㉓ 十枝内厚次、越中敬一、中里雅光. グレリンによる骨格筋の抗萎縮作用の解析. 宮崎、第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会. 2014. 2. 14-15.

〔図書〕(計 2 件)

十枝内厚次、日本臨牀社、最新肥満症学

—基礎・臨床研究の最前線—「グレリン」、2014、186-190.

十枝内厚次、秀潤社、細胞工学 臓器代謝ネットワーク「エネルギー代謝調節と脳腸連関」、2014、519-522.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページの開設準備中

6. 研究組織

(1)研究代表者

十枝内 厚次 (TOSHINAI KOJI)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号: 8 0 3 8 1 1 0 1