

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570081

研究課題名(和文) 成長に伴うグレリンの受容体発現及び生理的役割の変化：ニワトリを用いての解析

研究課題名(英文) Age-related changes in ghrelin function, ghrelin concentration and ghrelin related molecules expression in the growing chickens.

研究代表者

北澤 多喜雄 (KITAZAWA, Takio)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50146338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ成長過程で腺胃のグレリン収縮性が孵化後日齢に依存して減弱し、その低下は内在性グレリン増加によるグレリン受容体遺伝子の発現低下が関与することを示した。グレリンの増加はグレリン脂肪酸添加酵素遺伝子の発現にも影響を与えたが、グレリン遺伝子発現には影響しなかった。脳においてもグレリン関連遺伝子は部位と孵化後日齢に依存して変化した。本実験の結果は成長期にグレリン関連遺伝子の発現が内在性グレリンにより制御されることを示した。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin contracted a chicken gastrointestinal tract. The ghrelin-induced contraction and expression of growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) mRNA in the proventriculus decreased depending on age. Ghrelin concentrations in the proventriculus and plasma increased after hatching and reached plateau at 30 days. Expression of ghrelin and ghrelin-O-acetyltransferase (GOAT) mRNAs also tended to decrease depending on age. Expression of ghrelin mRNA did not show any correlation with plasma ghrelin. Inverse relationships between ghrelin concentration and GHS-R1a and GOAT mRNAs expression are indicative for a ghrelin-induced downregulation of the ghrelin receptor and synthetic enzyme. The expression pattern of ghrelin, GOAT and GHS-R1a mRNAs in the brain distinctly change in region-dependent manner on growing stage. The present results indicated that physiological role of ghrelin system changes in the brain and gastrointestinal tract of growing chickens.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：グレリン モチリン 受容体 グレリン合成酵素 ニワトリ消化管 遺伝子発現調整機構 収縮機能

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、胃粘膜で合成分泌され、成長ホルモン(GH)放出促進作用、体重増加、脂肪利用能の低下、内・外分泌の調節、消化管運動の調節などに関与する。このことは、これまで消化器官と考えられていた胃がグレリンを産生放出し成長を制御する内分泌器官であることを示した。また、種々の代謝性の病態(肥満、糖尿病、過食・拒食症、消化器運動疾患)とグレリンとの関係も指摘されており注目度の高い消化管ホルモンである。

申請者はグレリンが魚類から哺乳動物まで多くの脊椎動物で保存され、消化管に局在することから、特に消化管運動に与える影響に注目し、哺乳類、鳥類および魚類を用いグレリンの機能を比較生理学的な見地から検討している。この検討からグレリンが非刺激のニワトリ消化管標本を濃度依存性に収縮することを明らかにした。グレリン感受性には消化管部位差があり、そ嚢、結腸で高く十二指腸、回腸では弱かった。この部位依存的な反応性の差はグレリン受容体 mRNA 発現量の差と一致していた。消化管の部位に依存したグレリン受容体発現、収縮反応の差はこれまで他の動物種では報告がなく、ニワトリで観察されたのが初めてであった。これらの成績はニワトリがグレリンの消化管機能に与える影響を研究する上で極めて興味深い動物であることを示している。

グレリンは GH 放出を刺激し食欲を調節し動物の成長に関する物質と考えられるが、成長に伴いグレリンの反応(役割)が変化するか否かは一部ラットの報告があるのみで、不明な点が少なくなかった。申請者はニワトリが成長発生過程での薬物反応性の変化の解析に汎用される動物種であることに着目し、ニワトリ消化管のグレリン誘発性収縮を種々の孵化後日齢で検討し、そ嚢

のグレリン収縮は変化しないが、腺胃での収縮反応は生後5日目までに急激に減弱しその後100日まで緩やかに減少、消失することを示した。このことは、成長によりグレリン反応性が消化管部位特異的に変化することを示しているが、変化の詳細、他のグレリン関連分子との関係、減少するメカニズムの解明が今後の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究ではニワトリ消化管で日齢によりグレリンの反応性が低下するという学術的背景を踏まえ、孵化後0-100日齢のニワトリ(雄)を用いて以下の点について明らかにする。

(1) グレリン、グレリン脂肪酸添加酵素(GOAT)及びグレリン受容体(GHS-R1a)遺伝子発現量の成長による変化。

消化管各部位における各遺伝子の発現を定量的 PCR で解析し成長による変化を明らかにする。明らかにした変化が末梢組織(消化管)に特異的なものなのかどうかを知るために、ニワトリ脳の種類々の部位においても日齢による3種類のグレリン関連遺伝子の変化を検討する。

(2) 腺胃および血中グレリン濃度の成長による変化。

グレリン含有細胞の成長過程での変化を推測するために腺胃および血液中のグレリンの濃度を測定し日齢変化と遺伝子発現の変化の関連を明らかにする。

(3) 消化管の活性物質誘発性収縮の成長による変化の有無(in vitroでの検討)。

各日齢の消化管(そ嚢、腺胃、回腸)での種々の活性物質(グレリン、モチリン、カルバコール、セロトニン、サブスタンスP)の反応から日齢による変化を明らかにする。

以上の検討からニワトリの末梢及び中枢組織におけるグレリン、GHS-R1a、GOAT 遺伝子の発現およびグレリン誘発性反応が

成長に伴いどのように変化・推移するのかを解明し成長過程におけるグレリンの生理学的意義とその役割の変化について理解を深めことを目的とする。

3. 研究の方法

分子生物学的解析：本研究では、雄のニワトリを孵化後1日齢から100日齢まで飼育し、経時的に脳各部位（大脳半球、視床、視床下部、下垂体、中脳、嗅球、小脳、延髄）、消化管各部位（そ嚢、腺胃、回腸、結腸）を採取し分子生物学的解析によりグレリン、GOAT および GHS-R1a の発現量変化を定量的 RT-PCR で明らかにした。生化学的解析：グレリンの蛋白質レベルでの変化は血中、腺胃のグレリン濃度をラジオイムノアッセイで測定し明らかにした。なお、グレリンが濃度を調節していると考えられているグルコースについても測定をおこなった。生理的機能の解析：各日齢のニワトリから消化管標本を作製し（そ嚢、腺胃、回腸）、浴槽中に懸垂してその収縮活性を等尺性に記録した。グレリンおよび各種の生理活性物質を浴槽中に滴下して収縮活性を検討し反応性の日齢による変化を明らかにした。なお、グレリン類似ペプチドのモチリンについては各消化管部位におけるモチリン受容体 mRNA の発現も分子生物学的に解析した。

4. 研究成果

本研究では、ニワトリの消化管と脳において孵化後のグレリン、GHS-R1a、GOAT mRNA発現とその機能の関係を総合的に解析し、それぞれの相互関係から成長過程におけるグレリン系の変化とそのメカニズムを検討したものである。結果の要点は以下の通りである。

①日齢による消化管グレリン反応性の変化：ニワトリでは消化管部位に依存しグレリン反応性に部位差があった（そ嚢＝結腸>

腺胃>>回腸）。この部位差はGHS-R1a mRNA発現の部位差と一致していた。そ嚢と腺胃を比較すると収縮作用の機序が異なっていた（腺胃は神経性と筋原生反応、そ嚢は筋原性反応）。そ嚢のグレリン収縮は、孵化後100日まで、ほとんど変化しなかったが、腺胃での収縮は有意に減少した。回腸はどの日齢でもグレリンに感受性を示さなかった。結腸の反応性も日齢で低下する傾向があった。日齢による腺胃収縮反応の低下はモチリン（神経性と筋原生反応）でも認められたが、カルバコール、セロトニンおよびサブスタンスP（いずれも筋原性反応）では収縮性の低下は認められなかった。アトロピン処置をした腺胃ではモチリン誘発性収縮の日齢依存性低下が消失した。これらのことから、腺胃での収縮性の低下は作用機序に神経性の成分が含まれる活性物質（グレリンおよびモチリン）で特異的に起こることが示唆された。すなわち、腺胃での日齢による収縮性の低下は神経性の収縮成分の低下に起因することが判った。

②GHS-R1aおよびモチリン受容体mRNA発現の日齢による変化：腺胃における

GHS-R1a mRNA 発現は日齢により著明に減少した。一方、そ嚢、回腸、結腸では日齢によっても変化が認められなかった。モチリン受容体mRNAの発現は、回腸が最も高く、そ嚢、腺胃、結腸での発現はほぼ同程度であった。日齢により腺胃でのモチリン受容体の発現も有意に低下した。このことから腺胃においてグレリン、モチリン収縮が低下する原因としてGHS-R1aおよびモチリン受容体の発現低下が関与する可能性が示唆された。

③腺胃におけるグレリン関連遺伝子発現と内因性グレリン濃度との関連：内因性グレリン濃度（血中、腺胃）は日齢に依存して増加し、この増加はGHS-R1aの発現低下と有意な負の相関を示した。一方、グレリン濃度とグレリンmRNAとの間に相関は認められなかった。腺胃のGOAT mRNA発現も日齢により有意に低下しグレリン濃度と負の相関を示した。グレリンmRNA発現とGHS-R1a mRNA発現、GOAT mRNA発現とGHS-R1a mRNA発現の間に相関は認められ

なかった。以上のことから腺胃で GHS-R1a mRNA 発現は、内因性グレリン濃度の増加により負のフィードバックを受け制御される可能性が示唆された。内因性グレリン濃度の増加は同時に GOAT 発現を抑制的に調節している可能性も提示された。

④脳におけるグレリン関連遺伝子発現の変化：ニワトリ脳（小脳、視床、視床下部、下垂体、中脳、嗅球、延髄、大脳半球）でグレリン mRNA は部位依存性に発現していたが、日齢では変化しなかった。GHS-R1a も部位依存性に不均一な発現を示し、日齢に依存した低下は小脳のみで観察された。グレリンの機能に関連して視床下部での発現が高かった。GOAT mRNA は、脳では殆どの部位で孵化後、日齢依存性に増加した。脳と消化管では日齢に依存したグレリン関連遺伝子の発現変化に差が認められた。このことは、グレリンによる生理機能が孵化後、部位依存性に变化する可能性を示唆した。

⑤血液中グルコース濃度の変化：孵化後の血中グルコース濃度は 200–300mg/dl とほぼ一定であり、グレリン濃度の変化とは無関係であった。すなわち、ニワトリの成長過程ではグレリンとグルコース濃度との間には著明な相関は認められず、成長過程でのグレリンによるグルコース濃度の調節機構は明らかにできなかった。

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 9 件）

1. Kitazawa T, Nakamura T, Saeki A, Teraoka H, Hiraga T, Kaiya H. Molecular identification of ghrelin receptor (GHS-R1a) and its functional role in the gastrointestinal tract of the guinea-pig. *Peptides*. 2011, 32, 1876-1886. 査読有、Doi:10.1016/j.Peptides.2011.07.026.
2. 北澤多喜雄、石田祥士、岩賢、山形友哉、越智建太、内田英二、平賀武夫、海谷啓之 2012 イヌの growth

hormone secretagogue receptor (GHS-R)1a と血中グレリン動態に関する基礎的研究. *酪農学園大学紀要* 36(2) 295-310, 2012. 査読無

3. Kitazawa T, Itoh K, Yaosaka N, Maruyama K, Matsuda K, Teraoka H, Kaiya H. Ghrelin does not affect gastrointestinal motility in rainbow trout and goldfish in vitro. *General and Comparative Endocrinology*. 178: 539-545. 2012. 査読有、doi: 10.1016/j.ygcen.2012.06.025
4. Harada N, Ochi K, Yaosaka N, Teraoka H, Hiraga T, Iwanaga T, Unno T, Komori S, Yamada M, Kitazawa T. Immunohistochemical and functional studies for M3 muscarinic receptors and cyclooxygenase-2 expressed in the mouse atrium. *Autonomic Autacoid Pharmacology*. 2012, 32(3 Pt 4):41-52. 査読有、Doi: 10.1111/j.1474-8673.2012.00472.x
5. Miura Y, Shiraishi J, Shiomi A, Kitazawa T, Hiraga T, Matsumoto F, Teraoka H, Masatomi H. Origin of three Red-crowned cranes *Grus japonensis* found in northeast Honshu and west Hokkaido, Japan, from 2008 to 2012. *J. Veterinary Medical Science*. 2013 75(9): 1241-1244 査読有、
6. Matsuyama H, Tanahashi Y, Kitazawa T, Yamada M, Komori S, Unno T. Evidence for M2 and M3 muscarinic receptor involvement in cholinergic excitatory junction potentials through synergistic activation of cation channels in the longitudinal muscle of mouse ileum. *J. Pharmacol Sci.*, 2013. 121:227-236. 査読有
7. Tanahashi Y, Waki N, Unno T, Matsuyama H, Iino S, Kitazawa T, Yamada M, Komori S. Roles of M₂ and M₃ muscarinic receptors in the generation of rhythmic motor activity in mouse small intestine. *Neurogastroenterol*

Motil. 2013. 25(10), 687-697. 査読有

Doi: 10.1111/nmo.12194.

8. Kitazawa T, Yoshida A, Tamano T, Teraoka H, Kaiya H. Age-dependent reduction of ghrelin- and motilin-induced contractile activity in the chicken gastrointestinal tract. Peptides 2013. 43:88-95. 査読有、Doi: 10.1016/j.peptides.2013.02.012
9. Ochi K, Teraoka H, Unno T, Komori S, Yamada, Kitazawa T. 2013. A ganglionic stimulant, 1,1-dimethyl-4-phenylpiperazinium, caused both cholinergic and adrenergic responses in the isolated mouse atrium. Eur. J. Pharmacol. 2013. 704:7-14. 査読有、Doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.019.

[学会発表] (計 4 件)

1. Kitazawa T, Teraoka H, Kaiya H. Gastrointestinal region-related change in motilin receptor mRNA expression and motilin response in the growing chicken. 第 10 回国際鳥類内分泌学シンポジウム (ISAE2012), 2012 年 6 月 6 日、長良川国際会議場
2. 北澤多喜雄、寺岡宏樹、海谷啓之、成長過程における消化管のグレリンおよびモチリン反応性の変化 —ニワトリを用いての検討—、第 9 回日本消化管学会総会学術集会 2013 年 1 月 25 日、新宿京王プラザホテル
3. 吉田安希子、玉野琢也、北澤多喜雄、海谷啓之、ニワトリ腺胃のグレリンおよびモチリン誘発性収縮は成長に伴い減少する。第 27 回北海道薬物作用談話会、2013 年 7 月 20 日、江別市、酪農学園大学
4. 北澤多喜雄、寺岡宏樹、海谷啓之、グレリンの胃腸管運動亢進作用における鳥類の特異性

—種々の脊椎動物の摘出平滑筋標本を用いての検討—、第 37 回鳥類比較内分泌研究会、2013 年 11 月 23 日、熊本、阿蘇シエート

[図書] (計 0 件)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

北澤 多喜雄 (KITAZAWA, Takio)

酪農学園大学・獣医学群・

獣医保健看護学類 教授

研究者番号 : 50146338

(2)研究分担者

海谷 啓之 (KAIYA, Hiroyuki)

独立法人国立循環器病研究センター・
研究所・室長
研究者番号：40300975

(3)連携研究者

坂井 貴文 (SAKAI, Takafumi)
埼玉大学・理工学研究科・教授
研究者番号：40235114