

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791052

研究課題名（和文）新規に樹立したグレリン細胞株によるグレリン生合成、分泌機構の解明

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

研究代表者

岩倉 浩 (IWAKURA HIROSHI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20378615

研究成果の概要（和文）：独自に樹立したグレリン分泌細胞株 MGN3-1 細胞を用いて、栄養素がグレリン分泌に与える影響について検討を行った。グルコース濃度はグレリン分泌に大きな影響が無く、脂肪酸では、オクタン酸添加時に活性型グレリンの分泌が上昇、長鎖脂肪酸添加時にグレリン分泌は低下した。また、いくつかのアミノ酸がグレリン分泌を刺激することを見いだした。今回の検討で、栄養素がグレリン分泌調節に関わることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）In this study, we examined the effects of nutrients on ghrelin secretion by original ghrelin secreting cell line, MGN3-1. Glucose showed no apparent effect on ghrelin secretion. Octanoic acid increased active-ghrelin secretion, while long-chain fatty acids suppressed it. Certain amino acids stimulated ghrelin secretion. These results indicate that nutrients have certain roles in regulation of ghrelin secretion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：グレリン、細胞株、分泌調節

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、1999年に児島、寒川らによって発見された胃より分泌されるホルモンで、3番目のセリン残基がアシル化修飾を受け、受容体への結合にこの修飾が必須であるというこれまでにない特徴を持つ。グレリンは、成長ホルモン刺激作用、摂食刺激作用をはじめ、多彩な生理作用を持つ。グレリンの血中濃度は、絶食により上昇し、再摂食により低下する。また、肥満患者では低値を示し、やせ患者では高値を示すという、短期、長期のエネルギーバランスによる分泌調節を受けることが報告されてきた。

グレリンは、主に胃に存在する X/A-like 細胞と呼ばれる内分泌細胞から分泌される

が、グレリン分泌細胞だけを胃から単離することは困難であることから、グレリンの生合成機構、分泌調節機構に関しては不明な点が多かった。

我々は、グレリンプロモーター支配下に SV40T 抗原を発現するトランスジェニックマウスを作成することで、グレリン細胞を不活化することに成功した。(岩倉ら、Am J Physiol 2009)。さらに、このマウスの胃に生じたグレリン産生腫瘍を採取、消化、培養することで、グレリン分泌細胞株 MGN3-1 細胞を樹立することに世界で始めて成功した(岩倉ら、Endocrinology 2010)。

我々の樹立した MGN3-1 細胞では、それまでグレリン産生が報告されていたヒト甲状腺

腺髄様癌細胞株 TT 細胞と比較して、約 5,000 倍という高濃度のグレリン産生を認め、産生されたグレリンは、生理的なプロセッシングおよびアシル化修飾を受けていた。さらに、*in vivo* でグレリン濃度を抑制することが報告されているインスリンや、ソマトスタチンにより、グレリン分泌は有意に抑制され、少なくとも生理的グレリン分泌調節の一部が、この細胞において維持されていると考えられた。以上から、MGN3-1 細胞は、グレリンの生合成、分泌調節機構を解明するための有用なツールとなると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、種々の生理活性物質等による情報入力が、グレリン細胞でどのように処理され、再び、グレリン分泌という出力で生体へフィードバックされているかを明らかにすることで、グレリンの生理学的意義のさらなる解明を目指す。

将来的には、グレリン分泌刺激薬、グレリン分泌抑制薬、グレリンアシル基転移酵素 (GOAT) 活性調節薬などの開発につなげることも視野にいれつつ、研究を行う。

具体的には、我々が独自に世界で初めて樹立したグレリン細胞株 MGN3-1 を利用し、細胞レベルでのグレリン生合成、分泌の分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

MGN3-1 細胞は 10%FBS 入り DMEM によって 37°C 10%CO₂ の条件下で培養した。分泌実験では、MGN3-1 細胞を前日に 12 well プレートへ播種しておき、0.5% BSA 入り DMEM あるいは KRB buffer 中に添加物を加え、37°C で 4 時間インキュベートした。培地を回収、C18 カラムで処理後、凍結乾燥させ、RIA によって培地中のグレリン濃度を測定した。あるいは RNA を抽出し、定量 RT-PCR によって定量した。

4. 研究成果

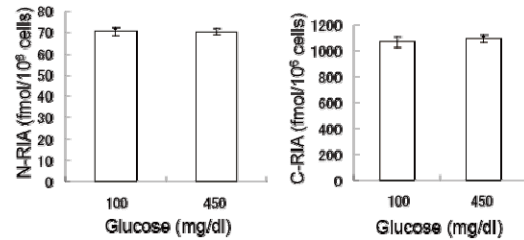
これまでの検討で、ペプチドホルモンのうち、オキシトシンがグレリン分泌を刺激し、一方で、ソマトスタチンが SSTR2 受容体を介して、インスリンがインスリン受容体を介して、グレリン分泌を抑制することを見いだした。また神経伝達物質のうち、アドレナリンが β1 受容体を介して、また、ドーパミンが D1 受容体を介してグレリン分泌を刺激することを報告してきた (岩倉ら、Endocrinology 2011)。

グレリン細胞は主に胃や十二指腸といった消化管に存在することから、グレリンは、ペプチドホルモンや神経伝達物質による調節以外にも、栄養素によって調節を受ける可能性が考えられる。よって、今年度は特に、栄養素のグレリン分泌に与える影響につい

て検討を行った。

グレリン血中濃度は、絶食により上昇し、再摂食によって低下することから、グルコースによってグレリン分泌が調節される可能性を考え、DMEM 中のグルコース濃度を、通常の 450mg/dl から、100mg/dl へと低下させたが、明かなグレリン分泌への影響は観察できなかった (図 1)。

(図 1) グルコース濃度のグレリン分泌への影響



N-RIA: (アシル化) グレリン

C-RIA: 総グレリン

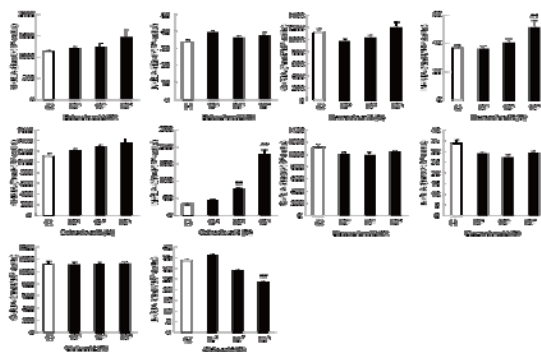
インスリン分泌が、生理的なグルコース濃度に応じて分泌調節を受けるためには、Glut2 および glucokinase の発現が重要であるとされるが、MGN3-1 細胞においては、いずれの発現も認められず (図 2)、少なくとも膵 β 細胞と同様の機構では、グルコースを感知する能力を持たないと考えられた。これまでの我々の検討では、インスリンは、直接グレリン細胞に働いてグレリン分泌および、グレリンの発現を抑制する。グルコースクランプの結果や、1 型糖尿病患者でのグレリン濃度の検討の報告からは、食後にグレリン値が低下する機序では、グルコースではなくインスリンの役割が大きいと考えられ、今回の結果は、これらの報告を支持する結果であった。

(図 2)



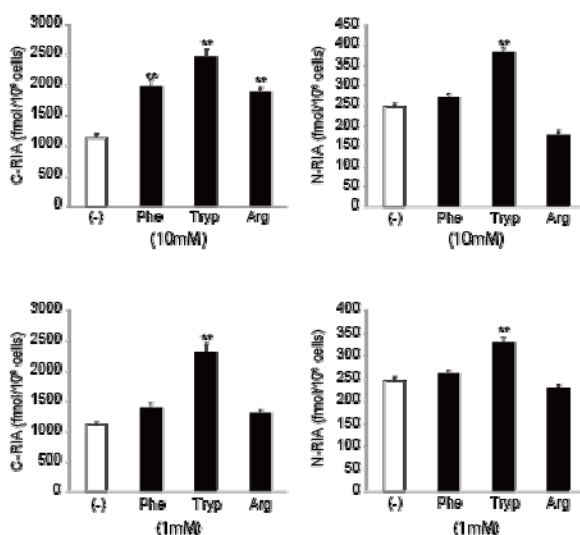
次に、脂肪酸のグレリン分泌へ与える影響を検討するために、KRB 培地中に、短鎖から中鎖脂肪酸を添加したところ (図 3)、特にオクタン酸添加時に、N-RIA で測定される活性型のグレリン分泌が上昇した。一方で、長鎖脂肪酸であるオレイン酸添加では、活性型のグレリン分泌はむしろ低下した。グレリン濃度は肥満者では低下しており、一方で遊離脂肪酸の濃度は上昇していることから、肥満者でのグレリン濃度が低下する機序の一つに脂肪酸による影響が考えられた。

(図 3) 脂肪酸のグレリン分泌への影響



アミノ酸については、これまで、インスリン分泌を刺激することが報告されているアルギニンおよび、CCK 等の分泌刺激が報告されているトリプトファン、フェニルアラニンについて検討を行ったところ、少なくとも、トリプトファンと、フェニルアラニンが、グレリン分泌を有意に上昇させることを見いだした (図 4)。

(図 4) アミノ酸のグレリン分泌への影響



今回の検討により、グルコースはグレリン分泌に大きな影響を持たないこと、脂肪酸に関しては、中鎖脂肪酸 (オクタン酸) は活性型グレリンの産生を介してグレリン分泌を増加させ、一方で長鎖脂肪酸はグレリン分泌を抑制すること、アミノ酸の一部 (少なくともトリプトファン) はグレリン分泌を刺激することが明らかとなった。栄養素はグレリンの産生、分泌調節に重要な役割を果たしており、今回の知見をさらに発展させることが、グレリンの生理学的意義のさらなる理解につながることを考えられた。

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. Kawano K, Hattori Y, Iwakura H, Akamizu T, Maitani Y, Adrenal tumor volume in a genetically engineered mouse model of neuroblastoma determined by magnetic resonance imaging. *Exp Ther Med*. 査読有り、2012 Jul;4(1):61-64. DOI: 10.3892/etm.2012.564
2. Ariyasu H, Yamada G, Iwakura H, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing ghrelin or ghrelin analog. *Methods Enzymol*. 査読無し 2012;514:371-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-381272-8.00023-4.
3. Janssen S, Laermans J, Iwakura H, Tack J, Depoortere I. Sensing of fatty acids for octanoylation of ghrelin involves a gustatory G-protein. *PLoS One*. 査読有り 2012;7(6):e40168. DOI: 10.1371/journal.pone.0040168.
4. Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Transgenic overexpression of intra-islet ghrelin

does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 査読有り
2012 Feb;302(4):E403-8. DOI:
10.1152/ajpendo.00341.2011

5. Akamizu T, Sakura N, Shigematsu Y, Tajima G, Ohtake A, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K. Analysis of plasma ghrelin in patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and glutaric aciduria type II. *Eur J Endocrinol.* 査読有り、
2012 Feb;166(2):235-40. DOI:
10.1530/EJE-11-0785
6. Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 in vitro. *Endocrinology.* 査読有り、
2011 Jul;152(7):2619-25. DOI:
10.1210/en.2010-1455
<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/158372>
7. 岩倉 浩、加齢と肥満、最新医学、査読無し、2011、66巻、828-832、DOI:無し

[学会発表] (計6件)

1. 岩倉 浩、グレリン産生細胞株樹立によるグレリン生合成、分泌機構の解明、第86回日本内分泌学会学術総会、2013年4月26日、仙台国際センター
2. 小山博之、岩倉 浩、細田洋司、坂東美佳、細田公則、寒川賢治、中尾一和、アミノ酸による in vitro でのグレリン分泌調節機構の解明、2013年4月25日、仙台国際センター
3. 坂東美佳、岩倉 浩、有安宏之、細田公則、足立壯一、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史、膵島内グレリン過剰発現がストレプトゾトシン誘導β細胞障害に与える影響の検討、第33回日本肥満学会、2012年10月11日、ホテルグランピア京都

4. 坂東美佳、岩倉 浩、有安宏之、細田洋司、山田豪、細田公則、足立壯一、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史、ストレプトゾトシンによるβ細胞障害に対する膵島内グレリン過剰発現の影響の検討、第55回日本糖尿病学会年次学術集会、2012年5月19日、パシフィコ横浜
5. 岩倉 浩、有安宏之、細田洋司、細田公則、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史、グレリン分泌細胞の樹立と in vitro でのグレリン分泌調節の検討、第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年5月19日(木)、札幌プリンスホテル(北海道)
6. 坂東美佳、岩倉 浩、有安宏之、細田公則、足立壯一、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史、膵島内グレリン、GOAT 過剰発現トランスジェニックマウスの解析、第32回日本肥満学会、2011年9月23日、淡路夢舞台国際会議場

[図書] (計4件)

1. 岩倉 浩、他、最新内分泌学 p528-530, p792-794、2013年、診断と治療社
2. 岩倉 浩、他、レプチンのトランスレショナルサイエンス-メタボリックシンドロームの治療戦略、p43-45, p49-52、2012年、診断と治療社
3. 岩倉 浩、他、症候群ハンドブック、P375、中山書店
4. Hiroshi Iwakura, 他. Neuroblastoma mouse model, Neuroblastoma (Pediatric Cancer) P.3, 2011. Springer

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・准教授

研究者番号：20378615