

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790941

研究課題名(和文) 中枢及び末梢制御によるグレリン分泌調節の解明

研究課題名(英文) The study of regulatory mechanisms on ghrelin secretion

研究代表者

坂田 一郎 (SAKATA, Ichiro)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80610831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グレリンの分泌制御機構について検討を行った。グレリン産生細胞に長鎖脂肪酸の受容体であるGPR120が発現していることを見出した。グレリン産生細胞株及びマウス胃粘膜初代培養細胞を用いてGPR120のアゴニスト処理によってグレリン分泌が抑制されることを明らかにした。また、GPR120 アゴニストは extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を介してグレリン分泌を抑制することを示した。さらに、グレリン分泌を制御する脳内神経核の同定を目的に、交感神経起始核の電気破壊実験を行い、視床下部傍室核がグレリン分泌を制御する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In this study, it has found that these cells express high levels of mRNA encoding G-protein coupled receptor 120 (GPR120). Addition of GW9508 (a GPR120 chemical agonist) and α -linolenic acid (a natural ligand for GPR120) inhibited the secretion of ghrelin. However, the expression levels of preproghrelin and ghrelin O-acyltransferase (GOAT) mRNAs were not influenced by GW9508. Pretreatment with GW-9508 blocked the effect of the norepinephrine (NE)-induced ghrelin elevation in ghrelin cell lines, and GW-9508 inhibited ghrelin secretion via extracellular signal-regulated kinase activity in ghrelin cell lines. These results indicate that the decrease of ghrelin secretion after feeding is induced partially by long-chain fatty acids.

研究分野：内分泌学

キーワード：グレリン

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、グレリンアシル化転移酵素によりオクタン酸で修飾されているという構造上の特徴を持ち、成長ホルモン分泌刺激、消化管運動刺激作用等を有し、末梢から分泌される唯一の摂食促進因子としても注目されているペプチドホルモンであり、胃で最も多く産生されている。1999年のグレリン発見以後、その生理作用の解明及び解析、また臨床応用にむけた研究が積極的に行われており、近年ではグレリンアシル化酵素の発見や、抗鬱作用など新しいグレリンの生理作用も報告され、多くの点で注目を集めている。血中グレリン濃度は、定時に行う食事前に顕著な上昇が見られ、また食後は急速に減少することから、グレリン分泌は脳を含む神経性の調節によることが考えられるが、その詳細は不明である。また、グレリン産生細胞は胃の粘膜層に散在性に存在していることから、胃グレリン産生細胞のみを用いた解析が困難であった。そこで申請者は、グレリン産生細胞株を樹立し、マイクロアレイを行うことで、グレリン産生細胞株に発現する遺伝子の網羅的解析を行い、グレリン分泌を制御する候補因子を同定していた。

2. 研究の目的

グレリンは、胃で産生されるペプチドホルモンであり、末梢から分泌される唯一の摂食促進因子である。血中グレリン濃度は、絶食やストレスで増加し、肥満や糖尿病患者においては低値を示すことが知られている。申請者はこれまでに、絶食誘導性グレリン放出がノルアドレナリンの刺激により制御されていることを明らかにした。しかしながら、生体内におけるノルアドレナリン神経の投射経路及びその他の調節因子に関する知見は少ない。本研究は、グレリン分泌のノルアドレナリン刺激グレリン分泌

の神経ネットワーク解明とその他の調節因子(分泌刺激因子、分泌抑制因子、転写因子)を同定し、グレリン制御機構の全貌を明らかにする。

3. 研究の方法

(1). GPR120 シグナリングによるグレリン分泌調節

SG-1細胞とマウス胃から total RNA を抽出し、逆転写後に GPR120 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った。

次に、SG-1細胞を用いて、GPR120 のアゴニストである GW9508 及び α -linolenic acid を培養液中に添加し、6時間の培養後に培養液を回収した。回収した培養液中のグレリン濃度は、rat acylated ghrelin enzyme immunoassay kit (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France)を用いて測定した。さらに、マウス胃粘膜初代培養細胞を用いて同様の実験を行った。

次に、SG-1細胞を用いて siRNA による GPR120 ノックダウン実験を行った。GPR120 siRNA もしくはコントロール siRNA をトランスフェクションした後に、GW9508 で刺激を行い、培養液中へのグレリン分泌量を測定した。

In vivo における GPR120 アゴニストの影響を検討するために、マウスに GW9508 (2.1 ug/g body weight) を投与し、24時間の絶食を行った。絶食後、採血し、血中グレリン濃度を測定した。

さらに、グレリン分泌における GPR120 のシグナル経路を同定するために、SG-1細胞を PKA インヒビターである H-89、ERK インヒビターの U-0126 や PD-98059 を用いて検討を行った。

(2). グレリン分泌における交感神経系遮断実験と脳内交感神経起始核の電気破壊実験

自由摂食条件下もしくは 24 時間絶食条件下のマウスに対し、ヘキサメトニウム 30 mg/kg、アテノロール 10 mg/kg もしくはその溶媒である生理食塩水を腹腔内投与した。

また、交感神経の起点となる脳神経核を同定するために、視床下部外側野 (Lateral hypothalamic area ; LHA)、視床下部室傍核 (Paraventricular nucleus ; PVN)、視床下部腹内側核 (Ventromedial hypothalamus ; VMH)、青斑核 (Locus coeruleus ; LC) 及び視床下部弓状核 (Arcuate nucleus ; ARC) の神経核破壊を行い、絶食誘導性グレリン分泌に対する効果を検討した。

4 . 研究成果

- (1). GPR120 によるグレリン分泌抑制機構
グレリン産生細胞株である SG-1 細胞とマウス胃において GPR120 mRNA が高発現していた。GPR120 のアゴニストである GW9508 及び α -linolenic acid で SG-1 細胞とマウス胃粘膜単離細胞を処理すると、濃度依存的なグレリン分泌の抑制が観察された。さらに、siRNA を用いて GPR120 mRNA をノックダウンした結果、GPR120 アゴニストによるグレリン分泌抑制効果が消失した。一方、GPR120 アゴニストの処理でグレリン遺伝子発現量は変化しなかった。さらに、ノルエピネフリン誘導性グレリン分泌の増加は、GW9508 の前処理で有意に抑制された。GPR120 シグナル経路を検討した結果、GPR120 アゴニストによるグレリン分泌抑制は ERK を介した作用であることを明らかにした。マウス個体への GW9508 の投与は、絶食誘導性グレリン分泌の増加を有意に抑制した。
- (2). 交感神経系によるグレリン分泌調節と交感神経起始核の同定
 β 1 アドレナリン受容体選択的阻害薬であるアテノロール及びヘキサメトニウムの

腹腔内投与は 24 時間絶食に誘導される血漿グレリン濃度の上昇を阻害した。無処置群では絶食により血漿グレリン濃度は有意に増加したが、PVN 破壊群では血漿グレリン濃度の有意な増加は見られなかった。LHA、VMH、LC の破壊は、絶食誘導性血漿グレリン濃度の上昇を阻害しなかった。一方、絶食時の血漿グレリン濃度をコントロール群と比較すると、LHA 破壊群では有意に増加しており、VMH、LC 破壊群では増加する傾向が見られた。ARC の破壊は絶食誘導性グレリン分泌を阻害しなかった。PVN が絶食誘導性グレリン分泌に関する交感神経の起始核である可能性が高いと考えられる。今後は、絶食誘導性グレリン分泌に対する PVN の両側破壊の効果を検討する必要がある。

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 20 件)

Engelstoft MS, Park WM, Sakata I, Kristensen LV, Husted AS, Osborne-Lawrence S, Piper PK, Walker AK, Pedersen MH, Nøhr MK, Pan J, Sinz CJ, Carrington PE, Akiyama TE, Jones RM, Tang C, Ahmed K, Offermanns S, Egerod KL, Zigman JM, Schwartz TW. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Mol Metab*. 2013 Sep 4;2(4):376-92. doi: 10.1016/j.molmet.2013.08.006.

Gong Z, Yoshimura M, Aizawa S, Kurotani R, Zigman JM, Sakai T, Sakata I. G protein-coupled receptor 120 signaling regulates ghrelin secretion in vivo and in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Jan 1;306(1):E28-35. doi: 10.1152/ajpendo.00306.2013.

Mani BK, Chuang JC, Kjalarsdottir L, Sakata I, Walker AK, Kuperman A, Osborne-Lawrence S, Repa JJ, Zigman JM. Role of calcium and EPAC in norepinephrine-induced ghrelin secretion. *Endocrinology*. 2014 Jan;155(1):98-107. doi: 10.1210/en.2013-1691.

Walker AK, Gong Z, Park WM, Zigman JM, Sakata I. Expression of Serum Retinol Binding Protein and Transthyretin within Mouse

Gastric Ghrelin Cells. PLoS One. 2013 Jun 19;8(6):e64882.

Aizawa S, Sakata I, Nagasaka M, Higaki Y, Sakai T. Negative regulation of neuromedin U mRNA expression in the rat pars tuberalis by melatonin. PLoS One. 2013 Jul 2;8(7):e67118. doi: 10.1371/journal.pone.0067118. Print 2013.

Miyano Y, Sakata I, Kuroda K, Aizawa S, Tanaka T, Jogahara T, Kurotani R, Sakai T. The role of the vagus nerve in the migrating motor complex and ghrelin- and motilin-induced gastric contraction in suncus. PLoS One. 2013 May 28;8(5):e64777. doi: 10.1371/journal.pone.0064777. Print 2013.

Mondal A, Aizawa S, Sakata I, Goswami C, Oda S, Sakai T. Mechanism of ghrelin-induced gastric contractions in *Suncus murinus* (house musk shrew): involvement of intrinsic primary afferent neurons. PLoS One. 2013;8(4):e60365. doi: 10.1371/journal.pone.0060365.

Walker AK, Park WM, Chuang JC, Perello M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Zigman JM. Characterization of gastric and neuronal histaminergic populations using a transgenic mouse model. PLoS One. 2013;8(3):e60276. doi: 10.1371/journal.pone.0060276.

Inoue M, Aizawa S, Higaki Y, Kawashima A, Koike K, Takagi H, Sakai T, Sakata I. Detailed morphogenetic analysis of the embryonic chicken pars tuberalis as glycoprotein alpha subunit positive region. J Mol Histol. 2013 Aug;44(4):401-9. doi: 10.1007/s10735-012-9479-y.

Egerod KL, Engelstoft MS, Grunddal KV, Nøhr MK, Secher A, Sakata I, Pedersen J, Windeløv JA, Füchtbauer EM, Olsen J, Sundler F, Christensen JP, Wierup N, Olsen JV, Holst JJ, Zigman JM, Poulsen SS, Schwartz TW. A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin. Endocrinology. 2012 Dec;153(12):5782-95. doi: 10.1210/en.2012-1595. 11:

Scott MM, Perello M, Chuang JC, Sakata I, Gautron L, Lee CE, Lauzon D, Elmquist JK, Zigman JM. Hindbrain ghrelin receptor signaling is sufficient to maintain fasting glucose. PLoS One. 2012;7(8):e44089. doi: 10.1371/journal.pone.0044089.

Yamazaki M, Aizawa S, Tanaka T, Sakai T, Sakata I. Ghrelin increases intracellular Ca²⁺ concentration in the various hormone-producing cell types of the rat pituitary gland. Neurosci Lett. 2012 Sep 20;526(1):29-32. doi: 10.1016/j.neulet.2012.07.063.

Ueno S, Yoshida S, Mondal A, Nishina K, Koyama M, Sakata I, Miura K, Hayashi Y, Nemoto N, Nishigaki K, Sakai T. In vitro

selection of a peptide antagonist of growth hormone secretagogue receptor using cDNA display. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 10;109(28):11121-6. doi: 10.1073/pnas.1203561109.

Suzuki A, Ishida Y, Aizawa S, Sakata I, Tsutsui C, Mondal A, Kanako K, Sakai T. Molecular identification of GHS-R and GPR38 in *Suncus murinus*. Peptides. 2012 Jul;36(1):29-38. doi:10.1016/j.peptides.2012.04.019.

Yanovsky Y, Zigman JM, Kernder A, Bein A, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Haas HL, Sergeeva OA. Proton- and ammonium-sensing by histaminergic neurons controlling wakefulness. Front Syst Neurosci. 2012 Apr 13;6:23. doi:10.3389/fnsys.2012.00023.

Sakata I, Park WM, Walker AK, Piper PK, Chuang JC, Osborne-Lawrence S, Zigman JM. Glucose-mediated control of ghrelin release from primary cultures of gastric mucosal cells. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2012 May 1;302(10):E1300-10. doi:10.1152/ajpendo.00041.2012

Mondal A, Xie Z, Miyano Y, Tsutsui C, Sakata I, Kawamoto Y, Aizawa S, Tanaka T, Oda S, Sakai T. Coordination of motilin and ghrelin regulates the migrating motor complex of gastrointestinal motility in *Suncus murinus*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012 May 15;302(10):G1207-15. doi:10.1152/ajpgi.00379.2011. 18:

Ikemoto K, Sakata I, Sakai T. Collision of millimetre droplets induces DNA and protein transfection into cells. Sci Rep. 2012;2:289. doi: 10.1038/srep00289.

Aizawa S, Sakai T, Sakata I. Glutamine and glutamic acid enhancethyroid-stimulating hormone β subunit mRNA expression in the rat pars tuberalis. J Endocrinol. 2012 Mar;212(3):383-94. doi: 10.1530/JOE-11-0388.

Inoue M, Shiina T, Aizawa S, Sakata I, Takagi H, Sakai T. Detailed analysis of the δ -crystallin mRNA-expressing region in early development of the chick pituitary gland. J Mol Histol. 2012 Jun;43(3):273-80. doi:10.1007/s10735-012-9407-1.

〔学会発表〕(計 29 件)

平成 26 年度

【国際学会】(2 件)

T. MIKAMI, A. MONDAL, K. KURODA, K. ITO, T. SAKAI and **I. SAKATA**
Simultaneous measurement of gastric and duodenal motility in *Suncus murinus*
FNM2014、中国・広州、2014年9月5日～7日
K. ITO, A. MONDAL, T. MIKAMI, K. KURODA, T. SAKAI and **I. SAKATA**
Motilin and ghrelin regulate postprandial giant contractions in *Suncus murinus*
FNM2014、中国・広州、2014年9月5日～7

日

【国内学会】(6件)

三上 堯、黒田 香百合、伊藤 一真、アヌポン モンダル、坂井 貴文、**坂田 一郎**
スunks上部消化管の収縮運動同時測定と十二指腸起源消化管運動

第56回日本平滑筋学会総会、新横浜、2014年8月7日-8日

GOSWAMI CHAYON, 島田佳明, Anupom Mondal, **坂田一郎**, 坂井貴文

Motilin stimulates gastric acid secretion in coord.
第85回日本動物学会、仙台、2014年9月11日~13日

Taichi Horita, Kayuri Kuroda, Kazuma Ito, Takashi Mikami, Huang Heqing, Anupom Mondal, **Ichiro Sakata**, Takafumi Sakai

Ghrelin is important for motilin-induced gastric motility

2014 第39回日本比較内分分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会 合同大会、愛知県岡崎市、2014年11月8日

Kohei Ueda, Gong Zhi, Takafumi Sakai, **Ichiro Sakata**

Ghrelin secretion is stimulated via the sympathetic nervous system.

2014 第39回日本比較内分分泌学会大会・第8回国際両生類爬虫類神経内分泌学会 合同大会、愛知県岡崎市、2014年11月8日

三上堯、伊藤一真、**坂田一郎**、坂井貴文
スunksを用いた食後期収縮制御機構の検討
第23回群馬消化管運動研究会、群馬、2015年3月14日

Rakhi Chacrabati, Gong Zhi, Daisuke Kondo, Chika Ikenoya, Takafumi Sakai, **Ichiro Sakata**
G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B (GPRC5B) regulation mechanisms on ghrelin signaling.

日本動物学会第67回関東支部大会、東京、2015年3月14日

平成25年度

【国際学会】(1件)

Ichiro Sakata, Yoshiaki Shimada, Toru Tanaka, Kanako Koike, Sayaka Aizawa, Takafumi Sakai
Motilin and ghrelin additively stimulate gastric acid secretion in *Suncus murinus* Digestive Disease Week (DDW) 2013, May 18-21, Orlando, Florida,

【国内学会】(3件)

坂井貴文、伊藤一真、黒田香百合、**坂田一郎**
「スunksを用いた食後期強収縮制御機構の検討」、第22回群馬消化管運動研究会、群馬、2014年3月8日

中村友亮、笹井麻帆、**坂田一郎**、坂井貴文
スunksにおけるモチリンとグレリンによる摂食亢進作用
第84回日本動物学会、岡山、2013年9月26日-28日

坂田一郎、宮野祐樹、黒田香百合、小池加奈子、坂井貴文

「迷走神経による消化管収縮運動制御機構—スunksを用いた in vivo 実験—」

第55回日本平滑筋学会総会、旭川、2013年8月6日~8日

平成24年度

【国際学会】(3件)

Ichiro Sakata: Regulatory mechanisms of ghrelin secretion. 10th Korean PWS Symposium, Korean, 2012年9月18日

Sayaka Aizawa, Ryohei Kobayashi, Mai Nagasaka, Anupom Mondal, **Ichiro Sakata**, Takafumi Sakai: Identification of the major site of action for motilin-induced contraction within the suncus stomach. NGM2012、ポロニーヤ、2012年9月6日-8日

Ichiro Sakata, Sayaka Aizawa, Mai Nagasaka, Takafumi Sakai: Stimulatory regulation of thyroid-stimulating hormone β subunit mRNA expression and TSH production by Glutamine and glutamic acid in the rat pars tuberalis. ENDO2012, HOUSTON、2012年6月23日-25日

【国内学会】(5件)

黒田香百合、吉田翔真、相澤清香、**坂田一郎**、坂井貴文、食虫目スunksを用いたモチリンとグレリンによる空腹期胃収縮制御機構の検討、群馬消化管運動研究会、群馬、2013年3月16日

島田佳明、**坂田一郎**、田中 享、坂井貴文、スunksを用いたモチリンとグレリンによる胃酸分泌刺激作用の検討、日本比較内分分泌学会、福井、2012年11月29日 12月1日

Zhi Gong, Kazuya Nishina, Sayaka Aizawa, Takafumi Sakai, **Ichiro Sakata**: Long-chain fatty acids regulate ghrelin secretion via G-protein coupled receptor 120. 日本比較内分分泌学会、福井、2012年11月29日 12月1日

Anupom Mondal, Yoshiaki Shimada, Kanako Koike, **Ichiro Sakata**, Takafumi Sakai: Motilin and ghrelin regulate gastric contraction via the myenteric plexus in *Suncus murinus* (house musk shrew), 日本平滑筋学会、東京、2012年8月2日-3日、東京慈恵医科大学

坂田一郎、坂井貴文、スunksにおけるモチリンとグレリンによる胃酸分泌調節作用の検討、内分分泌代謝セミナー、2012年7月12日-14日

平成23年度

【国際学会】(3件)

- 21 Mondal, A., Xie, Z., Miyano, Y., Tsutsui, C., Kawamoto, Y., Aizawa, S., Tanaka, T., Oda, S., **Sakata, I.**, Sakai, T.: Motilin and ghrelin synergistically regulates migrating motor complex (MMC) of the gastrointestinal (GI) motility in the *suncus murinus* (house musk shrew)., The 5th meeting of the Society of Gastrointestinal Intervention, Seoul, Korea.

201110

- 22 Miyano, Y., Xie, Z., Mondal, A., Nishina, K., Oda, S., Tanaka, T., **Sakata, I.**, Sakai, T.: Role of the vagus nerve in fasted and postprandial gastric motor patterns in the house musk shrew (*suncus murinus*), a small laboratory animal. Digestive Disease Week 2011, "Digestive Disease Week, Chicago, USA. 201105
- 23 Nishina, K., Xie, Z., Mondal, A., Miyano, Y., Kodaira, Y., **Sakata, I.**, Sakai, T.: Effects of endogenous ghrelin and motilin on the phase II and phase III of migrating motor complex in the free-moving house musk shrew (*suncus murinus*). Digestive Disease Week 2011, "Digestive Disease Week, Chicago, USA. 201105
- 【国内学会】(6件)
- 24 仁科和也、吉成貴史、榎本衣里、田中亨、**坂田一郎**、坂井貴文、糖尿病スunks (*suncus murinus*)におけるモチリン誘発性胃収縮運動の検討、日本比較内分泌学会大会、第36回日本比較内分泌学会大会 2011年11月
- 25 Mondal, A., Shimada, Y., Kobayashi, R., **Sakata, I.**, Sakai, T.: Myenteric neural pathway of motilin action in the *Suncus murinus* (House Musk Shrew) stomach. 日本比較内分泌学会大会、第36回日本比較内分泌学会大会 2011年11月
- 26 宮野佑樹、黒田香百合、**坂田一郎**、坂井貴文、意識下スunksの胃収縮運動に対する迷走神経切除の影響、日本比較内分泌学会大会、第36回日本比較内分泌学会大会 2011年11月
- 27 Mondal, A., Kurosawa, A., Koike, K., **Sakata, I.**, Sakai, T.: Motilin and ghrelin stimulate gastric contraction in a specific physiological condition in vivo in the *Suncus murinus* (house musk shrew), a motilin- and ghrelin-producing laboratory animal. 第19回日本消化器関連学会、第19回日本消化器関連学会週間 (Japan Digestive Disease Week 2011) 2011年10月
- 28 **坂田一郎**、坂井貴文、消化管運動研究モデル動物としてのスunks (*suncus murinus*)の有用性、日本獣医学会、第152回日本獣医学会学術集会 2011年9月
- 29 **坂田一郎**、Tong-Jin Zhao, Guosheng Liang, Michael S. Brown, Joseph L. Goldstein, Jeffrey Zigman, 坂井貴文、グレリン分泌はβ1アドレナリン受容体を介して刺激される、日本肥満学会、第32回日本肥満学会 2011年9月

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称：食後期の胃運動亢進剤

発明者：坂井貴文、坂田一郎、黒田香百合、吉村真

権利者：ゼリア新薬工業株式会社

種類：

番号：PCT/JP2014/053060

出願年月日：2014年2月10日

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

埼玉大学理学部生体制御学科ホームページ

http://seitai.saitama-u.ac.jp/seminar_list.html

埼玉大学理学部生体制御学科細胞制御学研究室ホームページ

<http://cell.seitai.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂田一郎 (SAKATA, Ichiro)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80610831