

機関番号：32666
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591103
 研究課題名(和文) グレリン受容体発現抑制遺伝子改変ラットを用いたグレリンのエネルギー蓄積機構の解明
 研究課題名(英文) Study on energy storage mechanism of ghrelin using transgenic rats whose ghrelin receptor is suppressed
 研究代表者
 芝崎 保 (SHIBASAKI TAMOTSU)
 日本医科大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：00147399

研究成果の概要(和文)：グレリン受容体発現抑制遺伝子改変ラットの表現型からグレリンの体脂肪蓄積作用を明らかにしたが、加齢に伴う体脂肪蓄積機序へのグレリンの関与は不明である。4、8、20週齢のラットへのグレリン受容体拮抗薬の投与実験から、非ふるえ性エネルギー燃焼機能を担っている褐色脂肪組織への内因性グレリンの抑制が加齢に伴い強まること、グレリンのその抑制作用に視床下部背内側核ニューロンが関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Transgenic rats expressing an antisense against ghrelin receptor mRNA show reduced adipose tissue. However, it was not clear whether ghrelin is involved in an increase in body fat during aging. This study showed that the inhibitory action of ghrelin on brown adipose tissue increases with aging and that the dorsal medial hypothalamus is involved in its action in rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、グレリン受容体、体脂肪、エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

胃抽出物から発見されたグレリンの投与は成長ホルモン分泌促進因子受容体(GHS-R)を介して成長ホルモン分泌、摂食、体脂肪蓄積を促進することが知られている。グレリンは胃のみならず視床下部での産生も報告さ

れているが、それらの生理学的役割に関しては不明であった。我々はグレリン/GHS-Rの働きを明らかにする目的でグレリン受容体発現抑制遺伝子改変ラットを作成し、同ラットが低体脂肪、褐色脂肪組織の重量の増加傾向とUCP1発現亢進を呈したことから、グレリ

ンは褐色脂肪細胞に抑制的に作用し、エネルギー燃焼を抑制することによりエネルギー蓄積作用を示すと考えてきた。さらに、正常ラットで認められたグレリンによる褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌抑制作用は、グレリン受容体発現抑制遺伝子改変ラットでは認められなかった。ヒトにおける加齢に伴う体脂肪蓄積機序には、脂肪分解作用のある成長ホルモンの分泌低下の関与が考えられている。しかしながら、この機序へのグレリンの関与に関しては不明である。非ふるえ性熱産生機構で重要な働きをしている褐色脂肪細胞は交感神経系により促進的調節を受けている。しかしながら、褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌へのグレリンの抑制作用が加齢に伴いどのように変化するのか、あるいは加齢に伴う変化が無いのか、全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴う体脂肪蓄積機序へのグレリンの関与の有無、特に褐色脂肪組織での交感神経終末からのノルアドレナリン分泌へのグレリンの抑制作用の変化の有無を明らかにすることを目的とした。この目的に沿い 3 年間で、(1)褐色脂肪組織内の交感神経活動へのグレリンの脳室内あるいは末梢投与効果の加齢に伴う変化を明らかにする。(2)グレリン受容体拮抗薬である D-Lys³-GHRP6 を脳室内投与した時の褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌の変化への加齢による影響の有無を明らかにする。(3) D-Lys³-GHRP6 の脳室内投与による視床下部の Fos 発現を免疫組織化学的に明らかにし、さらにそれらの変化への加齢による影響も検討する。(4) D-Lys³-GHRP6 を脳室内投与し酸素消費量や摂食行動の変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) 体脂肪の少ない 4 週齢 (100-130 g)、体脂肪増加の始まる 8 週齢 (230-250 g)、体脂肪が蓄積した 20 週齢 (480-500 g) のウイスター系雄ラットを用いた。エーテル麻酔下で褐色脂肪組織内に透析プローブを刺入後、リンゲル液にて灌流し、無麻酔無拘束下灌流液中のノルアドレナリン分泌を経時的に測定した。基礎分泌が安定した後、グレリンを 2 nmol/kg 体重の濃度で脳室内へ、または 120 nmol/kg 体重の濃度で静脈内へ投与し、グレリンによる褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌への影響を各週齢ラットにて比較した。

(2) 10 μg の D-Lys³-GHRP6 を各週齢ラットの脳室内に投与し、褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌の変化を(1)と同様の方法で測定した。

(3) 10 μg の D-Lys³-GHRP6 を各週齢ラットの脳室内に投与し、視床下部の Fos 免疫活性の変化を免疫組織化学的に解析した。

(4) さらに、10 μg の D-Lys³-GHRP6 を脳室内投与し、酸素消費量と摂食行動の変化をそれぞれ、180 分間、90 分間にわたり解析した。

4. 研究成果

(1) 4 週齢ラットにおいてグレリン脳室内投与により投与直後から 40 分後まで褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌は抑制された。8 週齢ラットでは 4 週齢ラットと同様にグレリンの脳室内投与により投与直後から 40 分後までノルアドレナリン分泌の抑制が認められた。しかしながら 20 週齢ラットにおいてはグレリンの脳室内投与によるノルアドレナリン分泌抑制作用は認められなかった。

4 週齢ラットにおいてグレリン静脈内投与により生理食塩水投与群と比較し投与後 20

分から 60 分後まで褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌の抑制が、8 週齢ラットではグレリン投与後 20 分から 40 分後までノルアドレナリン分泌の抑制が認められた。20 週齢ラットにおいてもグレリン投与により投与後 20 分から 40 分後までノルアドレナリン分泌の抑制が認められたが、抑制の程度は軽かった。

これらの結果から加齢に伴い褐色脂肪組織支配の交感神経の外因性グレリンに対する感受性は低下することが示された。また 20 週齢ラットの褐色脂肪組織重量は 8 週齢ラットのそれと比べ低下し、褐色脂肪細胞中に脂肪滴の蓄積が認められ、UCP1 mRNA 発現は有意に減少していた。したがって加齢に伴い褐色脂肪組織の機能低下、即ちエネルギー燃焼低下が生じ、これも体脂肪蓄積の一因になると考えられる。

(2) グレリン受容体拮抗薬の脳室内投与は 4 週齢ラットではノルアドレナリン分泌に影響を与えず、8 週齢では投与直後から 20 分間、20 週齢では投与直後から 40 分間のノルアドレナリン分泌を有意に増加させた。それぞれのノルアドレナリン頂値は 8 週齢で基礎値の 1.4 倍、20 週齢では 1.6 倍であった。さらに 20 週齢は 8 週齢に比較し、低用量の拮抗薬にも反応してノルアドレナリン分泌の上昇が認められた。以上の結果から、8 週齢以上では内因性グレリンの褐色脂肪組織でのノルアドレナリン分泌抑制作用が存在し、さらに 8 週齢よりも 20 週齢ラットでグレリンに対しより敏感に反応してノルアドレナリン分泌抑制が生じている可能性が示された。褐色脂肪組織はエネルギー燃焼の重要な組織であること、20 週齢の血中グレリンは他の群と比較して有意に高く、加齢に伴いラット血中グレリン濃度が上昇することからも、加齢に伴いグレリ

ンによる褐色脂肪組織の機能抑制作用が強まり、その結果、エネルギー燃焼が弱まり脂肪が蓄積し易くなっている可能性が示された。

(1) で認められた 20 週齢ラットでグレリン投与に対する褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌抑制反応が加齢に伴い減少していたのは、(2) の実験結果から 20 週齢ラットでは内因性グレリンの分泌量が増し、褐色脂肪細胞の機能を既に十分に抑制しているためであると考えられる。

(3) 8、20 週齢ラットへの D-Lys³-GHRP6 の脳室内投与は視床下部背内側核における Fos 発現量を対照群と比較して有意に増したが、4 週齢ラットでは視床下部背内側核における Fos 発現量は影響を受けなかった。同グレリン拮抗薬のラット脳室内投与は視床下部室傍核における Fos 発現に影響を与えなかった。視床下部背内側核は前視索野や室傍核、腹内側核等の体温調節や熱産生調節を担っている神経核から投射を受け、延髄縫線核ニューロンを介して褐色脂肪組織へ興奮性入力を送っていることが明らかになっている。また視床下部背内側核のニューロン活性化が褐色脂肪組織の熱産生を促進するという報告もあることから、グレリンによるエネルギー代謝抑制に、グレリンによる視床下部背内側核ニューロン機能抑制が関与している可能性が示唆された。4 週齢ラットではグレリン受容体拮抗薬である D-Lys³-GHRP6 投与後に視床下部背内側核の Fos 発現の変化が認められなかったことは、体脂肪蓄積の増加する前の 4 週齢ラットでは視床下部背内側核へのグレリンの抑制作用は未だ生じていないと考えられる。この結果は(2)の褐色脂肪組織内のノルアドレナリン分泌へのグレリン受容体拮抗薬の効果が 4 週齢ラットでは認められず、8 週齢と 20 週齢ラットで認められたという結果と一致し、グレリンの視床下部背内側核を介する褐色脂

肪細胞の機能抑制は少なくとも4週齢では始まっていないことを示唆するものと考えられる。

グレリン脳室内投与により視床下部背内側核のニューロペプチド Y ニューロンに Fos が発現し、このニューロンの活性化がグレリンの摂食促進作用に関与しているとの報告がある。グレリンは弓状核のニューロペプチド Y ニューロンに対しては興奮性に、プロオピオメラノコルチンニューロンに対しては抑制的に作用することも知られている。本研究結果から視床下部背内側核にもグレリンにより活性化するニューロンに加え、グレリンが抑制的に作用するニューロンが存在する可能性が示唆され、D-Lys³-GHRP6 投与により Fos が発現したニューロンにはグレリンによる抑制が解除されたために活性化した可能性が考えられた。

(4) 明期における8週齢雄ラットへの D-Lys³-GHRP6 の脳室内投与は、投与から90分間の摂食量には変化を与えなかったが、投与から10分後の酸素消費量を投与前と比較し増加させた。以上の結果から明期において内因性グレリンはエネルギー消費を抑制することでエネルギー蓄積に促進的に作用している可能性が示された。グレリン受容体拮抗薬の摂食行動への影響が認められなかったことは、内因性グレリンが摂食調節機構に関与していないことを示唆するのか、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

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2件)

- ① Mano-Otagiri A, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Ohata H, Shibasaki T. (9 番

目). Genetic suppression of ghrelin receptors activates brown adipocyte function and decreases fat storage in rats. Regulat Pept 審査有り 160(2010)81-90.

- ② Mano-Otagiri A, Ohata H, Iwasaki-Sekino A, Shibasaki T. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. J Endocrinol 査読有り 201(2009) 341-349

[学会発表] (計3件)

- ① 眞野あすか 加齢に伴う体脂肪蓄積機序におけるグレリンの役割について 第37回日本神経内分泌学会学術集会 平成22年10月22日 京都市
- ② 眞野あすか グレリンによるエネルギー蓄積作用の加齢に伴う変化についての解析 第82回日本内分泌学会学術総会 平成21年4月24日 前橋市
- ③ 眞野あすか グレリンの褐色脂肪組織におけるノルアドレナリン分泌抑制作用への加齢の影響 第81回日本内分泌学会学術総会 平成20年5月18日 青森市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芝崎 保 (SHIBASAKI TAMOTSU)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00147399

(2) 研究分担者

眞野 あすか (MANO ASUKA)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50343588

根本 崇宏 (NEMOTO TAKAHIRO)

日本医科大学 医学部 講師

研究者番号：40366654

大島 久幸 (OHATA HISAYUKI)

日本医科大学 医学部 助教

研究者番号：80256924