

令和元年5月28日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09807

研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた消化管ホルモンと糖代謝に対するグレリンの作用の解明

研究課題名(英文) Investigation of ghrelin effects on gut hormones and glucose metabolism using transgenic mice

研究代表者

赤水 尚史 (AKAMIZU, TAKASHI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20231813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスへのグレリンの皮下注射では、GLP-1分泌に影響はなく、マウス小腸上皮細胞へのグレリン、デスアシルグレリン添加実験では、GIP、preproglucagon、PYY、CCK発現に影響はなく、SAP-ghrelinトランスジェニックマウスの解析においても、デスアシルグレリン過剰発現で耐糖能は改善するものの、インクレチン分泌や消化管ホルモンmRNA発現に変化は認めず、グレリンあるいはデスアシルグレリンが消化管ホルモンの分泌や発現に影響を与えるという結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討により、グレリンあるいはデスアシルグレリンのGIP、GLP-1、CCK、PYYといった消化管ホルモンに与える影響は、存在したとしても大きくないことが判明した。一方で、デスアシルグレリンの慢性過剰状態はやはり耐糖能を改善することが確認された。以上の結果は、グレリンあるいはデスアシルグレリンの臨床応用を考える際の、消化管ホルモンを介した耐糖能への影響を確認したという意味で、学術的また社会的にも意義のある結果であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Subcutaneous injection of ghrelin resulted in no significant changes in plasma GLP1 levels in wild type mice. Addition of ghrelin or desacyl ghrelin on primary cultured epithelial cells of mouse small intestine showed no significant effects on GIP, preproglucagon, PYY, and CCK mRNA levels. There were no significant changes in plasma GIP and GLP-1 levels and intestinal GIP, preproglucagon, PYY, and CCK mRNA levels in SAP-ghrelin transgenic mice. In conclusion, we could not find any evidence that ghrelin or desacyl ghrelin has effects on the expression or secretion of gastrointestinal hormones.

研究分野：内分泌

キーワード：グレリン トランスジェニックマウス 糖代謝 消化管ホルモン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

グレリンは成長ホルモン促進物質として胃から発見されたペプチドホルモンである。その後、グレリンの作用は、強力な成長ホルモン分泌促進作用以外に、摂食促進、脂肪蓄積、胃酸分泌亢進、胃の蠕動運動亢進、心機能改善など多彩な生理、薬理作用を有していることが判明していた。さらに、グレリンと糖代謝との関係についても、グレリンやその受容体が膵臓に発現していること、グレリン投与により、血糖上昇、血中インスリン濃度の低下が生じること、デスアシルグレリン投与によって血糖が低下すること、グルコースやインスリン投与で血中グレリン濃度が低下すること、胎生期には膵臓でグレリンが高発現していること、膵島にグレリン分泌細胞が存在することなど多くの知見が報告されていた。我々自身も、糖尿病、肥満モデル動物におけるグレリン投与の影響、膵臓特異的グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの作成と解析など、グレリンと糖代謝の関係についての研究を行っていた。その結果、グレリン投与や、膵臓特異的グレリン過剰発現により、膵再生モデルにおいて、細胞増殖が刺激されること、グレリン過剰により耐糖能が悪化する一方で、デスアシルグレリン過剰では耐糖能が改善することなど興味深い知見を得ていた。さらに、当時、グレリンのグルカゴン分泌促進作用や、GLP-1 分泌促進作用などが報告されており、グレリンと他の消化管ホルモンとの相互作用や、糖尿病治療への関与が注目されていた。

### 2. 研究の目的

遺伝子改変動物等のモデル動物を用いることで、グレリンと種々の消化管ホルモンとの相互作用を明らかにし、糖尿病の病態理解とその治療におけるグレリンの意義を探索し、将来の臨床応用を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

野生型マウスへの投与：8週齢雄性 C57BL6 マウスを購入。一晩絶食後、グレリンを生理食塩水中に溶解し 100 µg/kg を皮下注射し、投与 30 分後の血中 GLP-1 濃度を ELISA 法によって測定した。

マウス小腸上皮初代培養：マウスの上部および下部小腸を切除し、タイプ 1 コラゲナーゼおよびディスパーゼによって 37 °C で 90 分間消化し、小腸上皮細胞を剥離し一晩培養。グレリン 100nM を添加し 2 時間培養、上部小腸では、CCK および GIP mRNA を下部小腸では preproglucagon および PYY mRNA を検討。

SAP-ghrelin トランスジェニックマウス：Serum amyloid P promoter の下流にグレリン cDNA を結合したコンストラクトを用い、C57/BL6 を背景としてトランスジェニックマウスを作成。

### 4. 研究成果

グレリンとデスアシルグレリンの消化管ホルモンへの影響を明らかにするため、最初に、野生型マウスを用いた *in vivo* での検討、マウス小腸上皮細胞初代培養系を用いた *in vitro* での検討、グレリン過剰発現遺伝子改変動物の準備を行った。

*In vivo* の系においては、まず、マウスへグレリンを 100 µg/kg で皮下注射し、GLP-1 分泌への影響の検討を行った。負荷後の GLP1 濃度は、生食群 vs グレリン群で、 $1.06 \pm 0.13$  vs.  $1.10 \pm 0.12$  pmol/L であり、有意な差は認めず (図 1)。既報でのグレリン分泌による GLP-1 分泌刺激作用は確認できなかった。

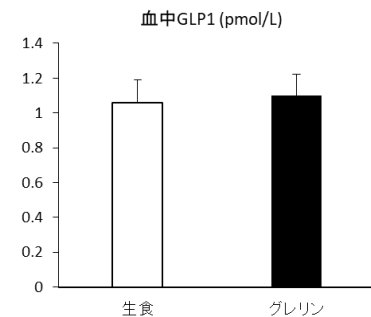


図 1

*In vitro* の系においては、マウス小腸上皮培養系を用いて、グレリンおよびデスアシルグレリン 100nM 添加の影響を検討した。グレリン添加 2 時間で、Preproglucagon、PYY、GIP、CCK mRNA 発現を検討したが、有意な差は認められなかった (図 2)。

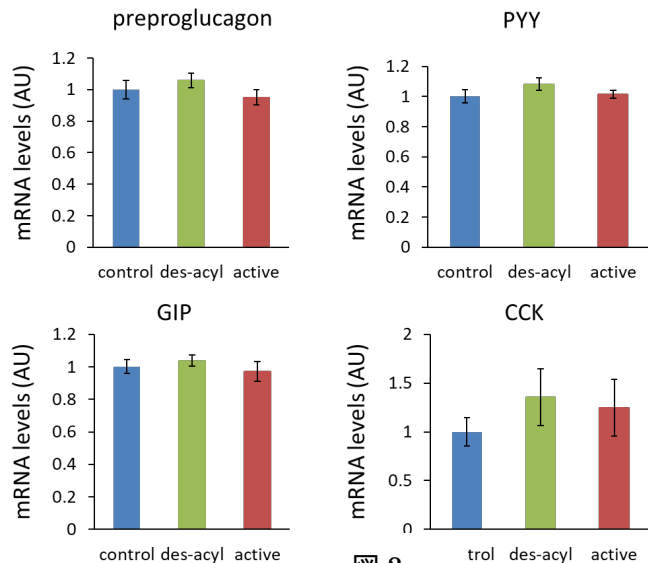


図 2

さらに、デアシルグレリンの消化管ホルモンへの慢性作用を検討するため、SAP-ghrelin トランスジェニックマウスの解析を行った。SAP-ghrelin トランスジェニックマウスは、Serum amyloid-P promoter でグレリン cDNA を肝臓で過剰発現

するトランスジェニックマウスであり、血中グレリン濃度は、活性型グレリンには差はないものの、デアシルグレリン濃度が対照の約 5.7 倍に上昇していた(図 3)。体重、摂食量に明らかな差は認められなかった。

経口糖負荷試験においては、各ポイントでは有意な差は認めなかったものの、血糖曲線の AUC は有意に SAP-ghrelin トランスジェニックマウスにおいて低く、デアシルグレリンの耐糖能改善作用を確認する結果であった(図 4)。糖負荷試験時に、負荷後 30 分で、血中インスリン濃度、血中 GLP-1 濃度、血中 GIP 濃度を測定したが、有意な差は認めず、耐糖能の改善は、少なくともインクレチン分泌刺激を介したものではないことが示唆された。消化管における GIP、preproglucagon、CCK、PPY mRNA 発現の検討も行ったが、有意な差は認めず、デアシルグレリンの慢性上昇は、消化管ホルモン発現に影響しないことが示唆された。(図 5)

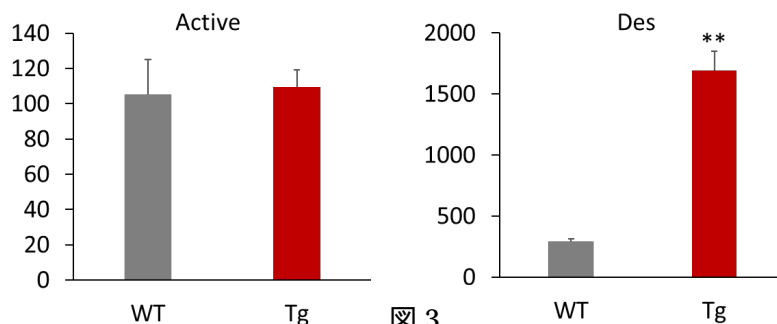


図 3

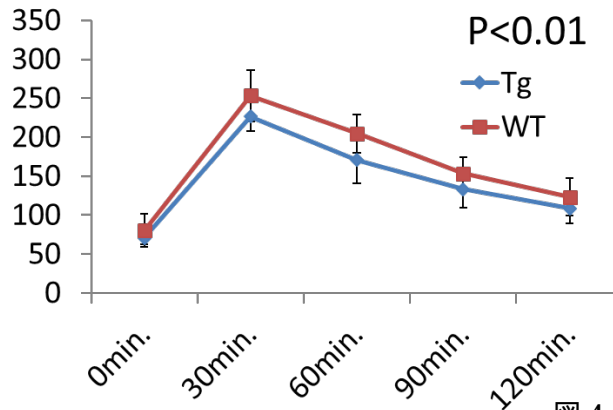
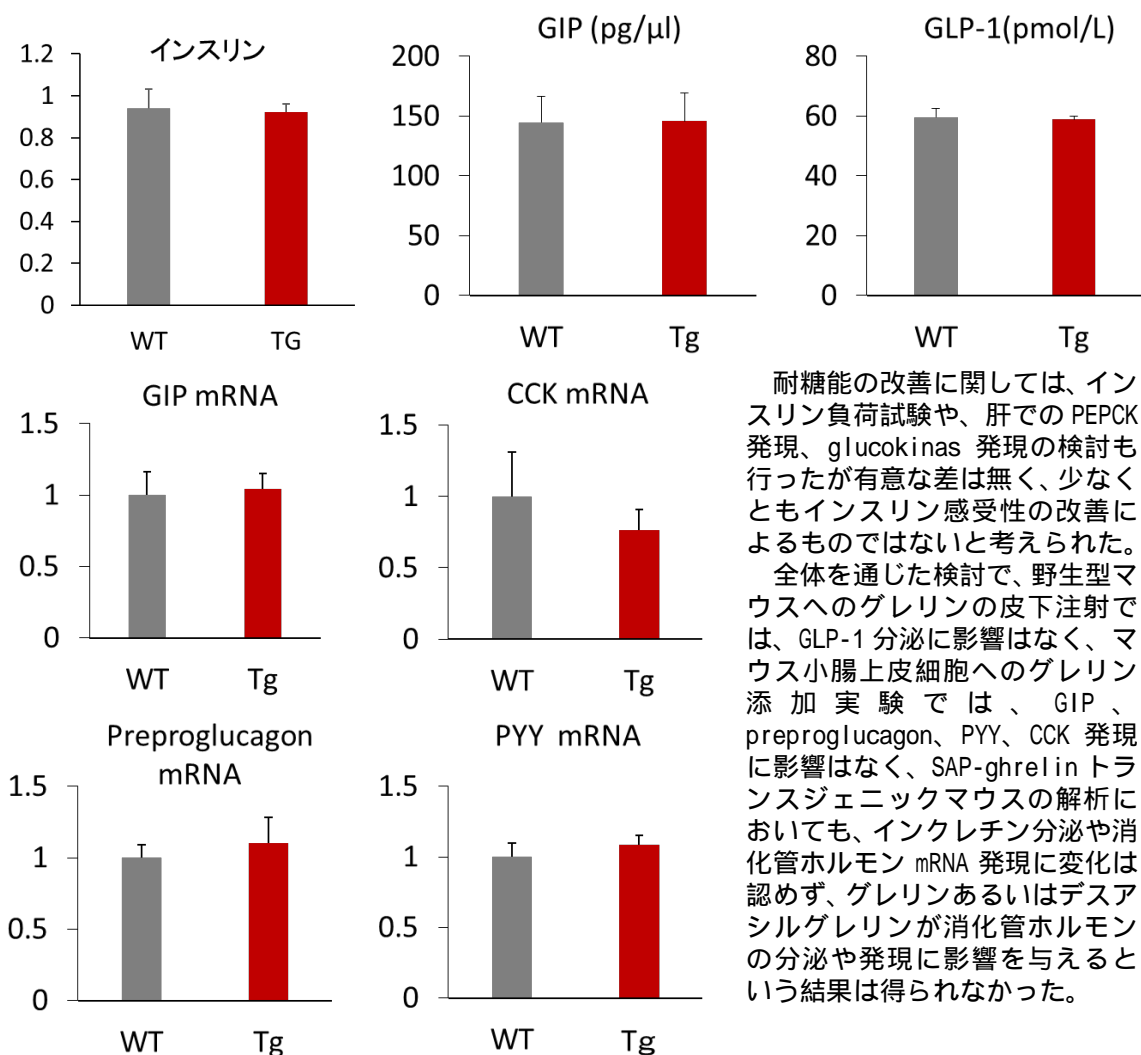


図 4



耐糖能の改善に関しては、インスリン負荷試験や、肝での PEPCK 発現、glucokinase 発現の検討も行ったが有意な差は無く、少なくともインスリン感受性の改善によるものではないと考えられた。

全体を通じた検討で、野生型マウスへのグレリンの皮下注射では、GLP-1 分泌に影響はなく、マウス小腸上皮細胞へのグレリン添加実験では、GIP、preproglucagon、PYY、CCK 発現に影響はなく、SAP-ghrelin トランスジェニックマウスの解析においても、インクレチン分泌や消化管ホルモン mRNA 発現に変化は認めず、グレリンあるいはデアシルグレリンが消化管ホルモンの分泌や発現に影響を与えないという結果は得られなかった。

図 5

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 27 件)

1. Matsuno S, Furuta H, Kosaka K, Doi A, Yorifuji T, Fukuda T, Senmaru T, Uraki S, Matsutani N, Furuta M, Mishima H, Iwakura H, Nishi M, Yoshiura K, Fukui M, Akamizu T Identification of a variant associated with early-onset diabetes in the intron of the insulin gene with exome sequencing. *J Diabetes Investig.* 2018 Nov 10. 査読有 doi: 10.1111/jdi.12974.
2. Wakabayashi M, Futagami S, Yamawaki H, Tatsuguchi A, Kaneko K, Agawa S, Higuchi K, Sakasegawa N, Murakami M, Akimoto T, Kodaka Y, Ueki N, Gudis K, Kawamoto C, Akamizu T, Sakamoto C, Iwakiri K. Comparison of clinical symptoms, gastric motility and fat intake in the early chronic pancreatitis patients with anti-acid therapy-resistant functional dyspepsia patients. *PLoS One.* 2018 Nov 7;13(11):e0205165. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0205165. eCollection 2018.
3. Ariyasu H, Inaba H, Ota T, Yamaoka H, Furukawa Y, Iwakura H, Doi N, Yamamoto Y, Akamizu T. Thyrotoxicosis and Adrenocortical Hormone Deficiency During Immune-checkpoint Inhibitor Treatment for Malignant Melanoma. *In Vivo.* 2018 Mar-Apr;32(2):345-351.1 査読有 DOI : なし
4. Kawai S, Ariyasu H, Uraki S, Takeshima K, Morita S, Inaba H, Iwakura H, Doi A, Ohashi T, Kawago M, Matsuoka N, Okamura S, Tsujii S, Akamizu T. Imbalanced Expression of IGF2 and PCSK4 Is Associated With Overproduction of Big IGF2 in SFT With NICTH: A Pilot Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018 ;103(7):2728-2734. 査読有 doi: 10.1210/jc.2018-00593.
5. Ueda Y, Iwakura H, Bando M, Doi A, Ariyasu H, Inaba H, Morita S, Akamizu T. Differential role of GPR142 in tryptophan-mediated enhancement of insulin secretion in obese and lean mice. *PLoS One.* 2018 ;13(6):e0198762. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0198762. eCollection 2018.
6. Hadjidaniel MD, Muthugounder S, Hung LT, Sheard MA, Shirinbak S, Chan RY, Nakata R, Borriello L, Malvar J, Kennedy RJ, Iwakura H, Akamizu T, Sposto R, Shimada H, DeClerck YA, Asgharzadeh S. Tumor-associated macrophages promote neuroblastoma via STAT3 phosphorylation and up-regulation of c-MYC. *Oncotarget.* 2017 ;8(53):91516-91529. 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.21066. eCollection 2017 Oct 31.
7. Hashimoto S, Futagami S, Yamawaki H, Kaneko K, Kodaka Y, Wakabayashi M, Sakasegawa N, Agawa S, Higuchi K, Akimoto T, Ueki N, Kawagoe T, Sato H, Nakatsuka K, Gudis K, Kawamoto C, Akamizu T, Sakamoto C, Iwakiri K. Epigastric pain syndrome accompanying pancreatic enzyme abnormalities was overlapped with early chronic pancreatitis using endosonography. *J Clin Biochem Nutr.* 2017;61(2):140-145. 査読有 doi: 10.3164/jcfn.17-41.
8. Iwakura H, Bando M, Ueda Y, Akamizu T. The effects of inflammatory cytokines on the expression of ghrelin. *Endocr J.* 2017;64(Suppl.):S25-S26. 査読有 doi: 10.1507/endocrj.64.S25.

9. Ueda Y, Uraki S, Inaba H, Nakashima S, Ariyasu H, Iwakura H, Ota T, Furuta H, Nishi M, Akamizu T. Graves' Disease in Pediatric and Elderly Patients with 22q11.2 Deletion Syndrome. *Intern Med.* 2017;56(10):1169-1173. 査読有 doi: 10.2169/internalmedicine.56.7927.
10. Bando M, Iwakura H, Ueda Y, Ariyasu H, Inaba H, Furukawa Y, Furuta H, Nishi M, Akamizu T. IL-1 $\beta$  directly suppress ghrelin mRNA expression in ghrelin-producing cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;447:45-51. 査読有 doi: 10.1016/j.mce.2017.02.032.
11. Inaba H, Funahashi T, Ariyasu H, Iwakura H, Furuta H, Nishi M, Akamizu T. Diabetic ketoacidosis in a patient with acromegaly and central diabetes insipidus treated with octreotide long-acting release. *Diabetol Int.* 2016 ;8(2):237-242. 査読有 doi: 10.1007/s13340-016-0301-z. eCollection 2017 Jun.
12. Wakasaki H, Matsumoto M, Tamaki S, Miyata K, Yamamoto S, Minaga T, Hayashi Y, Komukai K, Imanishi T, Yamaoka H, Matsuno S, Nishi M, Akamizu T. Resistance to Thyroid Hormone Complicated with Type 2 Diabetes and Cardiomyopathy in a Patient with a TR $\beta$  Mutation. *Intern Med.* 2016;55(22):3295-3299. 査読有 doi:なし
13. Bando M, Iwakura H, Koyama H, Hosoda H, Shigematsu Y, Ariyasu H, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K. High incorporation of long-chain fatty acids contributes to the efficient production of acylated ghrelin in ghrelin-producing cells. *FEBS Lett.* 2016;590(7):992-1001. 査読有 doi: 10.1002/1873-3468.12132.
14. Yamawaki H, Futagami S, Kawagoe T, Maruki Y, Hashimoto S, Nagoya H, Sato H, Kodaka Y, Gudis K, Akamizu T, Sakamoto C, Iwakiri K. Improvement of meal-related symptoms and epigastric pain in patients with functional dyspepsia treated with acotiamide was associated with acylated ghrelin levels in Japan. *Neurogastroenterol Motil.* 2016 ;28(7):1037-47. 査読有 doi: 10.1111/nmo.12805.
15. Comprehensive Profiling of GPCR Expression in Ghrelin-Producing Cells. Koyama H, Iwakura H, Dote K, Bando M, Hosoda H, Ariyasu H, Kusakabe T, Son C, Hosoda K, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K. *Endocrinology.* 2016 ;157(2):692-704. 査読有 doi: 10.1210/en.2015-1784.

〔学会発表〕(計 32 件)

1. Akamizu T, Thinking Like Pancreas, 16<sup>th</sup> Asia-Oceania Congress of Endocrinology, 2018
2. Ishibashi T, Morita S, Doi A, Iwakura H, Ariyasu H, Nishi M, Furuta H, Akamizu T, Signaling on Terminal-Unfolded Protein Response under Endoplasmic Reticulum Stress in INS1 Cells. ADA 78th Scientific Sessions, 2018
3. 上田陽子、岩倉浩、坂東美佳、土井麻子、有安宏之、稲葉秀文、森田修平、古田浩人、西理宏、赤水尚史、マウスでのグルコース刺激インスリン分泌における芳香族アミノ酸受容体 GPR142 と CaSR シグナルの果たす役割の検討、第 91 回日本内分泌学会学術総会、2018

4. 上田陽子、岩倉浩、坂東美佳、土井麻子、有安宏之、稲葉秀文、森田修平、古田浩人、西理宏、赤水尚史、トリプトファンによるグルコース刺激性インスリン分泌における芳香族アミノ酸受容体 GPR142 と CaSR シグナルの役割についての検討、第 61 回日本糖尿病学会年次学術、2018
5. 上田陽子、岩倉浩、坂東美佳、土井麻子、有安宏之、稲葉秀文、森田修平、古田浩人、西理宏、赤水尚史、グルコース刺激インスリン分泌における芳香族アミノ酸受容体 GPR142 と CaSR を介すシグナルの役割の検討、第 39 回日本肥満学会、2018
6. 古田浩人、島田健、土井麻子、有安宏之、川嶋弘道、若崎久生、西理宏、赤水尚史、非アシル化グレリンの細胞保護作用とサーチュイン 1 経路との関係、第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017
7. 坂東美佳、岩倉浩、上田陽子、赤水尚史、グレリン発現調節への炎症性サイトカインの影習の検討、第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017
8. 上田陽子、岩倉浩、坂東美佳、土井麻子、稲葉秀文、有安宏之、西理宏、古田浩人、赤水尚史、芳香族アミノ酸受容体 GPR142 の発現分布と発現調節機構の検討、第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017
9. 坂東 美佳、岩倉 浩、上田 陽子、赤水 尚史、炎症性サイトカインのグレリン遺伝子発現への影響の検討、第 37 回日本肥満学会、2016
10. 岩倉 浩、坂東美佳、小山博之、細田洋司、有安宏之、寒川賢治、中尾一和、赤水尚史、細胞系樹立によるグレリン生合成、分泌調節機構の検討、第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：有安宏之

ローマ字氏名：Hiroyuki Ariyasu

所属研究機関名：和歌山県立医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 50378650

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：岩倉浩

ローマ字氏名：Hiroshi Iwakura