

令和元年6月22日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09814

研究課題名(和文) 脳腸ホルモン「グレリン」による放射線障害への防護・修復効果の検討

研究課題名(英文) Basical study on the Ghrelin's protective effect against the Radiation Injury.

研究代表者

西 芳寛 (Nishi, Yoshihiro)

久留米大学・付置研究所・研究員

研究者番号：20352122

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)：脳腸ホルモン「グレリン」による放射線障害への保護効果について、マウス及び培養細胞を用いて検討した。グレリンは3 GyのX線を全身照射照射したマウスの白血球数減少を有意に抑制した。赤血球数の減少も有意に抑制した。培養ヒトリンパ球にグレリンを投与すると、3 GyのX線照射後24時間での血球の細胞死が有意に抑制された。グレリンによる放射線宿酔の抑制効果も推定された。3 GyのX線を全身照射照射したマウスで血中グレリン濃度の一過性の上昇が確認された。放射線照射を受けた生体内ではグレリン分泌が亢進して放射線による血球障害などを抑制する可能性が示唆された。グレリンによる放射線障害の抑制効果が推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳腸ホルモン「グレリン」の分泌が、放射線障害を受けたマウスの体内で一過性に増加して、同ホルモンが放射線障害を抑制する可能性について報告した。グレリンには、各種の生体防御作用が既に報告されているが、今回のわれわれの報告で、放射線障害に対するグレリンを用いた治療の可能性が示された。グレリンには各種の誘導体(ghrelin-mimetics)が作成されており、これらを用いた放射線障害への新たな治療戦略の可能性が、本研究を通じて示された。

研究成果の概要(英文)：In mice, exposed to 3 Gy of X-ray irradiation, iv-administration of ghrelin significantly diminished a "decline-ratio" of WBC and RBC number in peripheral blood. This finding indicated a protective effect of ghrelin against the blood cell damage by the "myelo-suppressive dose" of whole body irradiation. Administration of ghrelin significantly and dose-dependently increased the survival-ratio of cultured human PBL irradiated by 3 Gy of X-ray. This finding indicated a direct effect of ghrelin on the PBL which have been reported to possess a classical ghrelin receptor (GHSR1a). Intravenous administration of ghrelin suppressed the PICA (kaolin-ingestion behaviour correlating emetic action) of mice indicating an anti-emetic effect against radiation sickness. Production and the secretion of ghrelin increased upon 3 Gy X-ray exposure in mice. These findings indicated that the administration of ghrelin might be one of the therapeutic candidates against the radiation-injury.

研究分野：内分泌生理学

キーワード：グレリン 放射線障害 血球障害 ラジオイムノアッセイ

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

### 1. 研究開始当初の背景

グレリンは主に胃から分泌され、GH の分泌促進・食欲亢進・生体修復など多彩な生理作用を發揮する脳腸ホルモンである。本研究の開始当初、消化管障害を起こす 9-10 Gy の全身被ばくでラット胃からのグレリン分泌が低下し、グレリン投与で照射ラットの生存率が改善することが報告されていたが、より低線量である 3-5 Gy (いわゆる骨髄抑制量) の X 線照射がグレリン分泌に与える影響は検討されていなかった。また、骨髄抑制量の放射線被ばく後の血球減少に対するグレリン投与の効果や、より低線量から発症する放射線宿酔 (照射後の嘔気・食欲低下など) へのグレリン投与の影響についての検討は無かった。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨髄抑制線量 (3-5 Gy) の放射線被ばくを受けた生体内で、内因性に分泌されたグレリンが、血球保護や宿酔軽減などの生体保護作用を發揮するか否かについて知る目的で、マウスおよび培養細胞を用いて、以下、1-4 の検討を行った。1. 3.0 Gy の X 線全身照射 (Xir-3G) マウスを用いた経時的なグレリン分泌動態の検討。2. Xir-3G によるマウスの末梢血の血球減少に対するグレリン投与 (5 micro-g/body x 4 times, iv-administration) の影響。3. 3 Gy の X 線照射で誘発される培養ヒト末梢血リンパ球 (PBL) の細胞死に対するグレリン添加の影響。4. Xir-3G マウスの PIKA 行動 (異食行動: 嘔気・宿酔の指標) に対するグレリン投与の効果。

### 3. 研究の方法

(1) . Xir-3G マウスの血中・胃内グレリンの経時的变化: C57BL/6J 雄マウスに 3.0 Gy の X 線照射 (0.5 Gy/min x 6 min) を実施。3 種類の in-house RIA (Total-, C8-, C10-ghrelin RIA) を用いて、照射前・照射後 1, 3, 7, 14, 21, 30 日に採取した同マウスの血中・胃内のグレリン量を測定した。各ポイントの測定値は、非照射マウスのコントロール群と比較・検討した。

(2) . Xir-3G マウスの末梢血球減少に対するグレリン投与の効果: Xir-3G マウスの尾静脈から経時的にヘパリン管を用いて末梢血を採血し、Thoma 血球計算盤を用いて末血中の赤血球数 (RBC)・総白血球 (WBC) を測定した。さらに、May-Giemsa 染色で末血中の白血球を形態的に分類し、その比率から算出して末血中のリンパ球・顆粒球 (多核好中球) 数を経時的に測定した (照射前・照射後 6h, 1, 3, 5, 7, 14, 21, 30 日)。同様の Xir-3G を実施したマウスに、照射の前後で計 4 回のグレリン投与 (5 micro-g/body x 4 times iv-administration; pre, after 6h, 1 and 2 days) を行い、前述の方法で RBC・WBC・リンパ球・顆粒球を計測して、グレリン非投与 (生食投与の sham 処置済み) のコントロール群と比較・検討した。

(3) . 培養ヒト PBL の放射線誘発細胞死に対するグレリンの抑制効果: FicolI 密度勾配遠心法を用いてヒト末梢血中から単核球 (リンパ球比率 > 80%: PBL) を分離して、10% FCS 含有 RPMI 1640 に懸濁して 0/N で培養。翌日に 3 Gy の X 線照射 (0.5 Gy/min x 6 min) を実施。照射前 12h と照射後 30 min で  $0 \sim 1.0 \times 10^{-7}$  M の活性型グレリン (C8-Ghrelin) を添加。培養 24h 後の生細胞の比率を Trypan-blue dye exclusion 法で測定して、グレリン非添加のコントロール群 (n=5 dish x 3-times experiment) と比較・検討した。

(4) . PICA 行動を指標とした放射線宿酔に対するグレリンの症状改善効果: カルミン色素 5%・アラビアゴム 2% (w/w) を含有する高麗土で作成したペレット (以下、カオリンペレット) を作成。通常飼料 (CE-2) と並列して自由摂食させて、カオリンペレットの摂食量から異食行動 (PICA) を検討した。カオリンペレットの摂取量は、ペレット摂食後 48h で排泄されたマウスの糞便中から抽出されたカルミン色素量を比色光度計で測定して (OD 550 - 1.70 x OD 700) 既報の計算式を用いて算出した。5.0 Gy の X 線全身照射 (Xir-5G) マウスの PICA 行動を上記の方法で確認した後に、照射の前後 2 回でグレリンを投与したマウス (5 micro-g/body x 2 times iv-administration; pre & after 12h) で同様に PICA 行動を半定量化して、両群の PICA 行動を比較することで、Xir-5G で誘発された放射線宿酔に対するグレリンの抑制効果を検討した。

### 4. 研究成果

(1) . X 線照射マウスの血中・胃内グレリンの経時的变化: マウス血中の総グレリン (T-Ghr) 濃度は、照射後 1, 3 日で若干上昇し (照射前の約 1.6 倍、有意差なし)。その後は、照射後 7-30 日にかけて有意に上昇し続けた (照射前の約 2.8 倍)。血中の活性型 C8 グレリン (C8-Ghr) 濃度は、照射後 1, 3 日で若干上昇し (照射前の約 2 倍: 有意差なし)。照射後 7 日目には有意に上昇した (照射前の約 5.5 倍)。その後、照射後 14 日では照射前の半分程度まで低下して、照射後 14-30 日にかけて漸増した (照射前の濃度との有意差はなし)。血中の C10 グレリン (C10-Ghr) 濃度は、照射後 1, 3 日で漸減したが (照射前値との有意差なし)。その後は漸増した。但し、照射後の全経過で照射前の血中レベルとの有意差は確認されなかった。グレリンの主要産生部位である胃内グレリンの含量は、T-Ghr では全経過で有意な変動は確認されなかった。胃内の C8-Ghr 含量は血中の T-Ghr が上昇した照射後 14, 21 日では低下する傾向が見ら

れた（照射前の数値との有意差はなし）。一方で胃内の C10-Ghr 含量は、血中の C8-Ghr が有意に上昇した照射後 7 日目まで有意に増加していた（照射前含量の約 3 倍）。これらの結果は、既報の消化管障害量（10 Gy 前後）を全身照射したラットでの結果と異なり、骨髄抑制量の（消化管細胞死を誘導しない比較的低線量の）X 線照射マウスでは、血中の T-Ghr 濃度は照射後 7-30 日にかけて持続的に上昇し、活性型グレリンである C8-Ghr の血中濃度も照射後 7 日目では有意に上昇することが、今回の検討で明らかになった。照射後 14-21 日にかけての、胃内 C8-Ghr の含量低下は、この時期に胃で産生されたグレリンが迅速に胃から血中に分泌されている状態を反映している可能性を示唆している。胃内の C8-, C10-Ghr の含量の変化は、照射後 7 日目を典型例として異なっていることが判明したが、この事実は、生体内での C8-, C10-Ghr の分泌動態、或いは、その生理作用が放射線照射後では異なっている可能性を示唆している。これらの結果から、骨髄抑制量の X 線被ばくマウスでは、胃からのグレリン分泌が亢進し、その血中濃度が上昇した状態で、何らかの生理作用（生体防御作用ほか？）を発揮していると考えられる。また、血中の C8-Ghr 濃度は生体の摂食行動と密接に関係することから、この照射後 1-7 日目の C8-Ghr の血中濃度変化は、放射線被ばく後のマウスの摂食行動に影響している、或いは、その摂食行動を反映している可能性が考えられる。

(2) . X 線照射マウスの末梢血球減少に対するグレリン投与の効果 : Xir-3G 後の末梢血 RBC 数は、照射後から漸減して照射後 5 日目でボトム値（照射前の 50 % 強）を呈し、その後は漸増した。但し、照射後 30 日目でも照射前値の 75 % 前後までの回復に留まっていた。照射前後でグレリンを投与したマウスでも、非投与群と同様に照射後 5 日目まで RBC 数の漸減が認められたが、その数は照射前の 70% 前後を保っており、グレリン投与では X 線照射後の RBC 数の減少率が明らかに（有意に）抑制されていた。また、照射後 5 日目以降で再上昇に転じたグレリン投与群での末梢血 RBC 数は、照射後 30 日目では照射前のレベルに完全に回復していた。末梢血の全白血球数 (WBC 数) は、照射後 6h から有意に減少し、その後照射後 5 日目をボトム（照射前値の 20% 弱）として、照射後 6h, 1-14 日にかけて有意に照射前値より低下して、照射後 30 日目には前値のレベルまで回復した。グレリン投与群では、照射後 3 日目にボトム（照射前の 20% 弱）となり、照射後 5 日目からは WBC 数は上昇に転じ、照射後 21 日目には照射前と同じレベルまで回復した。末梢血リンパ球に関しても、全白血球数と同じ挙動を示し、グレリンの投与で末梢リンパ球数の早期回復が確認された。末梢血顆粒球（多角好中球）に関しては、照射後 6h で末血中の数の増加（照射前の約 300 %）に上昇し、その後照射後 1 日目から血球数が低下して 5 日目にボトム（照射前の 30%）となり、以後は漸増して照射後 21 日目に照射前の数値と同じレベルに復した。グレリン投与群では、照射後 3 日目のボトム（照射前値の 40%）のあとが上昇に転じ、照射後 3 日目以外の全経過（6h, 1, 5-30 day）でグレリン非投与群より多い数値を示した。以上、尾静脈経由でグレリン（5 micro-g/body）を計 4 回投与したマウスでは、X 線照射による末梢血の赤血球・白血球（リンパ球・好中球）数の減少が抑制され、その回復が促進されることが確認された。

(3) . 培養ヒト PBL の放射線誘発細胞死に対するグレリンの抑制効果 : Xir-3G 処置を行った培養末梢血リンパ球 (PBL) では、照射後 24h での再細胞数は非照射群の 48.7% に低下したが、グレリン  $1.0 \times 10^{-9}$  M,  $1.0 \times 10^{-8}$  M,  $1.0 \times 10^{-7}$  M の添加で、その生存率は各々 66.6%, 75.6%, 85.5% とグレリン投与量の容量依存的に有意に上昇した。また、グレリン  $1.0 \times 10^{-7}$  M を X 線の照射後に 1 回投与、照射前に 1 回投与、照射前後で 2 回投与した PBL の照射後 24h での生存率は、非照射コントロールと比較して、各々 1.4 倍、1.6 倍、1.9 倍に上昇しており、各群で非投与群より有意に生存率が上昇していたが、照射の前後で計 2 回の投与を行うと、より有効的であることが示唆された。

(4) . 放射線宿酔に対するグレリンの症状改善効果 : 糞便中のカルミン含量から算出した、照射後 48 時間でのカオリン餌の摂取量 (PICA 行動の指標) は、X 線非照射群では  $90.3 \text{ mg} \pm 123.9 \text{ mg}$ 、X 線照射・グレリン非投与群（生食投与群）では  $2342.0 \pm 662.0 \text{ mg}$ 、X 線照射・グレリン投与群では  $1012.8 \pm 404.6 \text{ mg}$  であり、X 線照射による有意な PICA 行動の誘発（カオリン餌摂取量の増加 :  $p < 0.005$ ）と、グレリン投与による有意な PICA 行動の抑制（ $p < 0.01$ ）が確認された。以上の結果から、マウスの PICA 行動を指標とした本検討で、グレリンによる放射線宿酔への抑制効果が、今回はじめて示された。尚、カルミン餌の摂取量には、照射の有無にかかわらず「マウスの個体間」での測定値のばらつきが大きかった。このため本解析では、事前の検討で、非照射・非処理（グレリン or 生食投与）の条件下でカオリン餌の摂取量が少ないマウスを予め選別して、これらを使用した。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Tajiri Y, Mifune H, Nishi Y, Voluntary exercise is motivated by ghrelin possibly related to the central reward circuit, Journal of Endocrinology, 査読有 (in press)

川上真代、佐々木 亨、西 芳寛、糖代謝・脂質代謝・耐糖能に及ぼす性差・年齢・

運動習慣の影響、久留米医学会雑誌、査読有、80 巻、8-9 号、2017、pp.264-275

Hirano M, Wada-Iiraike O, Nishi Y, Yanase T et al, The emerging role of FOXL2 in regulating the transcriptional activation function of estrogen receptor beta. Reproductive Science 査読有、24、29016、pp.1-5 DOI:10.1177/1933719116651150

Satou M, Kaiya H, Nishi Y、Mole ghrelin cDNA cloning, gene expression and diverse molecular form in Mogera Imaizumii、General and comparative Endocrinology、査読有、232、2016、pp.199-210 DOI:10.1016/j.ygen.2016.04.014

[学会発表] (計 6 件)

那須沙織、西 芳寛、御船弘治、児島将康、放射線被ばくによる骨髄抑制に対する消化管ホルモン「グレリン」の保護効果の検討 第 55 回 放射線影響懇話会 (2018 7/21 久留米)

佐藤元康、西 芳寛、杉本博之、グレリンのアシル基修飾と脂肪酸組成との関係 第 42 回 日本比較内分泌学会 (2017 11/17-11/19 奈良)

那須沙織、西 芳寛、御船弘治 ほか、骨髄障害量の X 線被ばくマウスのグレリン分泌動態およびグレリンによる血球保護効果の検討、第 60 回 日本放射線影響学会 (2017 10/25 -10/28 千葉)

川上真代、佐々木 亨、西 芳寛、糖代謝・脂質代謝・グレリン濃度に及ぼす性差・BMI・年齢・運動習慣の影響、第 54 回 日本糖尿病学会九州地方会 (2016 10/14-10/15 鹿児島)

御船弘治、原 健人、西 芳寛、グレリン欠損マウスの制限給餌下における自発運動 第 89 回 日本内分泌学会学術総会 (2016 4/21-4/23 京都)

西 芳寛、那須沙織、細田洋司、御船弘治、放射線被ばく後のグレリン産生・分泌とグレリンによる血球保護効果の検討、第 89 回 日本内分泌学会学術総会 (2016 4/21-4/23 京都)

[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：なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：佐藤 元康

ローマ字氏名：(SATOU motoyasu)

所属研究機関名：獨協医科大学・医学部

部局名：生化学講座

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：20418891

研究分担者氏名：細田 洋司

ローマ字氏名：(HOSODA hiroschi)

所属研究機関名：国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所

部局名：再生医療部

職名：室長

研究者番号（8桁）：40359807

研究分担者氏名：御船 弘治

ローマ字氏名：(MIFUNE hiroharu)

所属研究機関名：久留米大学・医学部

部局名：動物実験センター

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70174117

(2)研究協力者

研究協力者氏名：那須 沙織

ローマ字氏名：(NASU saori)

研究協力者氏名：児島 将康

ローマ字氏名：(KOJIMA masayasu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。