

平成21年5月25日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19390256

研究課題名（和文） グレリンの機能解明と臨床応用への分子基盤

研究課題名（英文） Physiological functions of ghrelin and its clinical application

研究代表者

児島 将康（KOJIMA MASAYASU）

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号：20202062

研究成果の概要：

これまでに目立った表現型は見つかっていないグレリン KO マウスについて、申請者らは野生型マウスと比較して詳細に検討した。その結果、グレリン KO マウスにおいて自律神経機能に異常があることを見つけ出した。グレリン KO マウスでは血圧・心拍調節、体温調節がうまくいかず、安定していない。睡眠・覚醒によって血圧・心拍や体温は変化するが、グレリン KO マウスではその変動の幅が狭く、また基礎的な値の変動が著しい。この結果はグレリンが自律神経の恒常性維持に重要なホルモンであることを示している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生化学、生理学、内分泌学

科研費の分科・細目：医歯薬学・内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：グレリン、自律神経、体温調節、血圧、心拍数、消化管運動

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは1999年に胃組織からグレリン (ghrelin) を発見し、これが成長ホルモン分泌促進作用を示すとともに、強力な摂食亢進作用を持つことを明らかにした。グレリンは胃から分泌されて血中を流れるペプチド・ホルモンであり、3番目のSer残基の側鎖が脂肪酸であるn-オクタン酸 (C8:0) によって脂肪酸修飾を受けており、さらにこの脂肪酸修飾

が活性発現に必須であるという極めてユニークな構造をしている。グレリンは、末梢投与によって摂食亢進作用を示す内因性のペプチド・ホルモンとして唯一のものであり、血中投与や皮下投与によって強力な摂食亢進作用を示す。グレリンは摂食促進や成長ホルモン分泌を調節することによって、生活習慣病や摂食障害の病態と密接な関連がある。

現在、世界中で活発に研究が行われているグレリンであるが、基礎研究にまだいくつか未解明のことが残されており、また臨床応用への展開に関しても検討することが多い。本研究はグレリンのまだ解明されていない基礎研究を完成し、グレリンを利用した新しい診断方法や治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行うことを計画した。

## 2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究はグレリンのまだ解明されていない基礎的研究を完成し、グレリンを利用した新しい診断方法や治療薬への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。具体的な研究目的を当初、次のように設定した。

(1) グレリン遺伝子の転写制御に関わる同定し、グレリンの発現調節機構を明らかにする。(2) グレリン前駆体から活性型グレリンに至るプロセッシング経路を明らかにする。グレリン前駆体を切断するプロテアーゼ、ならびにグレリンの脂肪酸修飾を行う脂肪酸転移酵素を見つけ出す。(3) グレリンK0マウスは自律神経機能の異常を示すことから、グレリンの自律神経調節作用について研究する。(4) 脂肪酸で修飾されていないデスアシル・グレリンは、グレリンとは別の受容体に作用して、グレリンとは別の生理作用を現すと報告されている。このデスアシル・グレリン特異的な受容体の探索を行う。またほとんどの生理活性ペプチドは複数のファミリーペプチドから構成されているが、グレリンに関してもサブタイプが存在するかどうか、生化学・分子生物学的な検索およびデータベースを利用したバイオインフォマティクスの検索を行う。(5) 胃癌患者などで、胃の切除範囲と血中グレリン濃度との相関を調べる。また胃摘出術後の食欲不振症と血中グレリン濃度・胃切除範囲との相関を調べる。(6) 胃切除術後の食欲不振症患者への、グレリン投与による摂食亢進効果を検討する。(7) グレリンの骨・筋肉への作用を調べる。老化

モデル動物へのグレリン投与による骨密度、筋量、筋力などへの効果を検討する。高齢者にグレリンを投与して、運動器への効果を調べる。

この2年間の研究期間において、(3)のグレリンK0マウスの自律神経機能異常の解析について研究が大きく進展したので、以下、これについて詳述する。

## 3. 研究の方法

これまでに海外の2研究グループからグレリン・ノックアウトマウスの解析が報告されているが、目立った表現型は見つっていない。申請者らはグレリンK0マウスを作製し、野生型マウスと比較して詳細に検討した。その結果、われわれはグレリンK0マウスにおいて自律神経機能に異常があることを見つけ出した。グレリンK0マウスでは血圧・心拍調節、体温調節がうまくいかず、安定していない。睡眠・覚醒によって血圧・心拍や体温は変化するが、グレリンK0マウスではその変動の幅が狭く、また基礎的な値の変動が著しい。本研究ではこのグレリン欠損による自律神経調節機構の解明を行った。

### (1) グレリン欠損マウスの作製

グレリン欠損マウスは通常で作製法によって行った。すなわち、マウスのグレリンcDNA全長部分を完全に欠損させるためのプラスミド・ベクターから欠損ES細胞をピックアップし、キメラ・マウスを得た。交配によってグレリンのホモ欠損マウスを誕生させた。遺伝的背景を整えるために、野生型のC57BJ/6Jとの交配を重ね、9世代以上バッククロスを繰り返した。

### (2) グレリン欠損マウスの自律神経機能の解析

遺伝的背景をC57BJ/6Jにしたグレリン欠損マウスを使って、血圧・心拍数・体温・消化管運動などの自律神経機能を調べた。非侵襲的な解析を行うために、埋め込み式

の血圧測定器・体温測定器を用いて、1週間以上の長期間にわたり、血圧・心拍数・体温を連続測定した。野生型マウス、グレリンKOマウスに埋め込み型テレメトリーを手術によって腹腔内および頸動脈内に設置し、連続して血圧・心拍数などをモニターすることで評価した。

また消化管機能を調べるために、色素を含んだ餌を用いて胃排出能試験を行った。

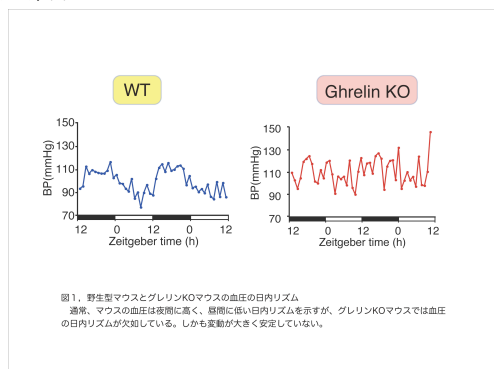
#### 4. 研究成果

##### (1) グレリンKOマウスの自律神経機能異常の解析

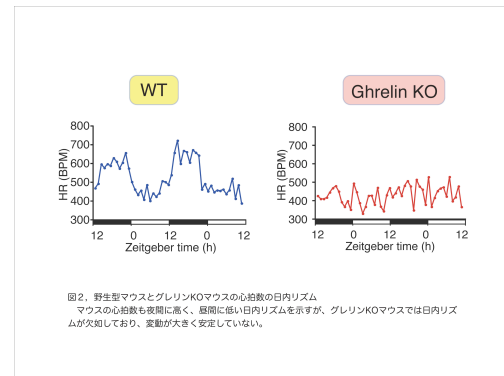
これまでに海外の2研究グループからグレリン・ノックアウトマウスの解析が報告されているが、目立った表現型は見つかっていない。申請者らはグレリンKOマウスを作製し、野生型マウスと比較して詳細に検討した。その結果、グレリンKOマウスにおいて自律神経機能に異常があることを見つけ出した。

心機能亢進、気管支拡張、肝グリコーゲン分解、脂肪分解などの、自律神経によって支配されている生体機能は多いが、グレリンKOマウスでは血圧・心拍調節、体温調節、消化管運動などに異常が見られる。睡眠・覚醒によって血圧・心拍や体温は変化するが、グレリンKOマウスではその変動の幅が狭く、また基礎的な値の変動が著しかった。

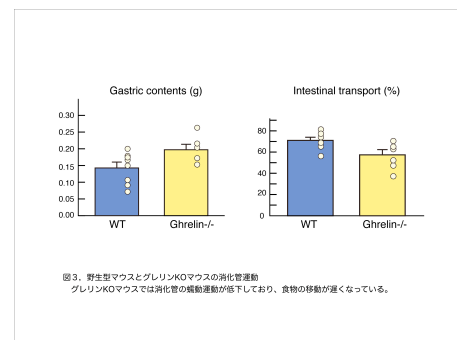
##### (2) グレリンKOマウスにおける循環器系の機能解析



グレリンKOマウスでは血圧・心拍数の日内リズムが欠如し、また血圧・心拍数が不安定で変動が大きかった。(図1, 図2)



##### (3) グレリンKOマウスにおける消化管運動の解析



グレリン投与によって胃酸分泌や胃の蠕動運動が刺激されるが、グレリンKOマウスでは消化管運動の機能低下が見られることを申請者らは見いだした。(図3)

##### (4) グレリンによる体温の恒常性維持

動物の体温は行動性および自律性調節の2つの調節を受け、代謝やエネルギー消費量を一定に保つために厳密にコントロールされている。申請者らはグレリンKOマウスでは野生型マウスに比べて逆に体温が上昇していることを見いだした。またグレリンKOマウスでは体温の日内変動リズムが消失し、体温の基礎値が大きく変動し不安定になっていた。(図4)

##### (5) グレリン投与による体温の変化

体温測定は簡便には実験動物の直腸温で計測した。それとともに、実験動物に測定によるストレスを与えないために、無線によって体温計測値を持続的に記録できるテレメーターシステムを用いて測定した。その結果、ある程度まではグレリンの投与量を増やすと、体温低下が投与量に比例して低下することがわかった。グレリンの投与量によって、マウスにおいては基礎体温から $-7^{\circ}\text{C}$ 程度の低下

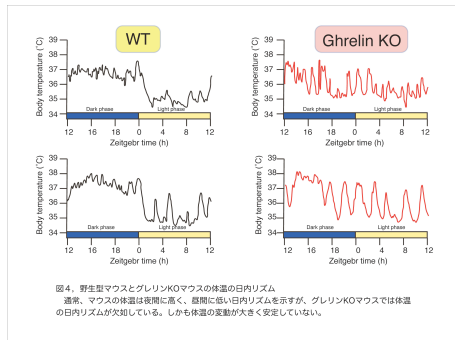


図4. 野生型マウスとグレリンKOマウスの体温の日内リズム  
通常、マウスの体温は強固に強く、強固な日内リズムを示すが、グレリンKOマウスでは体温の日内リズムが欠如している。しかも体温の変動が大きく安定していない。

まで観察した。またかなりのグレリン投与量においても、マウスには目立った有害事象は認められなかった。

以上のように、無線テレメトリーシステムを用いて非侵襲的に血圧・心拍数・体温などの自律神経機能を調べた結果、グレリン欠損マウスは血圧不安定、体温維持機構の異常、消化管運動の低下、血圧・体温の日内リズム異常など、自律神経系の異常を示すことが明らかになった。中枢性摂食異常症の患者においては単に摂食障害だけでなく、その他の様々な異常を訴える。これらは血圧・体温・消化管機能などの自律神経系の異常が多く、今回のグレリン欠損マウスの表現型との関連が興味深い。

またグレリン投与によって体温が低下することがわかった。すなわちグレリンは体温を下げることで、余分なエネルギー消費を抑えて、生体の生存に有利な栄養蓄積を行うのだと考えられた。

グレリンは主に胃を中心とする消化管で合成され血中に分泌される。このグレリンの体温低下作用に関する神経伝達経路はまだ明らかではない。体温は視床下部の視束前野・前視床下部や延髄の淡蒼縫線核 (raphe

pallidus nucleus) で調節されているが、グレリンがこれらの神経核に作用するにはどのような経路をたどるのかを調べる必要がある。一般に血中を流れるペプチド・ホルモンは血液脳関門を通過できないために、末梢から中枢へのシグナル伝達には、なんらかの間接的な経路が必要だと考えられる。

またグレリンによる自律神経機能維持が、どのような神経回路によって制御されているのか、複数の手法を用いて明らかにする必要がある。予備的な実験で、迷走神経切断マウスでは血圧・心拍や体温の日内リズム消失やベース値の不安定性が見られることから、おそらく末梢から迷走神経を介したグレリン・シグナルが自律神経機能の恒常性維持に重要だと考えられる。この末梢からのグレリンが、どこの神経核を中継して自律神経機能維持を行うのかもまだ不明である。これを明らかにするために、コレラ・トキシンやその他のトレーサー毒素、グレリン遺伝子部分を GFP マーカーで置換したノックイン・マウスなどを使った実験を計画している。

## 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10件)

- ① Takahashi H, Kurose Y, Suzuki Y, Kojima M, Yamaguchi T, Yoshida Y, Ogino M, Hodate K, Azuma Y, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Kobayashi S. Ghrelin differentially modulates the GH secretory response to GHRH between the fed and fasted states in sheep. *Domest Anim Endocrinol.* 2009 Mar 27. [Epub ahead of print] (査読有り)
- ② Okamatsu Y, Matsuda K, Hiramoto I, Tani H, Kimura K, Yada Y, Kakuma T, Higuchi S, Kojima M, Matsuishi T.

Ghrelin and leptin modulate immunity and liver function in overweight children. *Pediatr Int.* 2009 Feb;51(1):9-13. (査読有り)

③ Sato T, Kurokawa M, Nakashima Y, Ida T, Takahashi T, Fukue Y, Ikawa M, Okabe M, Kangawa K, Kojima M. Ghrelin deficiency does not influence feeding performance. *Regul Pept.* 2008 Jan 10;145(1-3):7-11. (査読有り)

④ Miyazato M, Mori K, Ida T, Kojima M, Murakami N, Kangawa K. Identification and functional analysis of a novel ligand for G protein-coupled receptor, Neuromedin S. *Regul Pept.* 2008 Jan 10;145(1-3):37-41. (査読有り)

⑤ Kojima M, Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ.* 2008;46:89-115. (査読なし)

⑥ Kojima M, Ida T, Sato T. Structure of mammalian and nonmammalian ghrelins. *Vitam Horm.* 2008;77:31-46. (査読なし)

⑦ Kojima M. The discovery of ghrelin—a personal memory. *Regul Pept.* 2008 Jan 10;145(1-3):2-6. (査読なし)

⑧ Takahashi H, Kurose Y, Sakaida M, Suzuki Y, Kobayashi S, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y. Ghrelin differentially modulates glucose-induced insulin secretion according to feeding status in sheep. *J Endocrinol.* 2007 Sep;194(3):621-625. (査読有り)

⑨ Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K, Takeda S. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nat Med.* 2007 Oct;13(10):1234-1240. (査読有り)

⑩ Otabe S, Yuan X, Fukutani T, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Hirota N, Kojima M, Yamada K. Overexpression of human

adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007 Jul;293(1):E210-218. (査読有り)

[学会発表] (計19件)

① 児島将康 2009. 3. 16 第82回日本薬理学会年会 (横浜市・パシフィコ横浜) ランチョンセミナー「食欲を刺激するホルモン“グレリン”の発見とその多彩な生理機能」

② 児島将康 2009. 2. 7 第7回せとうち消化管運動研究会 (岡山市・ホテルグランビィア岡山) 講演「食欲を亢進するホルモン“グレリン”と消化管機能」

③ 児島将康 2008. 5. 21 Keystone Symposium on GPCR (Ireland, Killarney・INEC-Ireland's National Events & Conference Centre) シンポジウム「Phenotypic analysis of ghrelin knockout mouse」

④ 児島将康 2008. 4. 3 第9回 Eastern Diabetes Conference (福岡・福岡リーセントホテル) 講演「食欲を刺激するホルモン“グレリン”の生理作用と臨床応用について」

⑤ 児島将康 2008. 3. 28 第113回日本解剖学会総会 (大分・大分大学) シンポジウム「視床下部におけるグレリンの同定とその生理機能」

⑥ 児島将康 2008. 2. 27 生理学研究所研究会「中枢・末梢臓器間連携による摂食、エネルギー代謝調節」(岡崎・自然科学研究機構 生理学研究所) 「グレリン欠損マウスの表現型について」

⑦ 児島将康 2008. 2. 16 第18回日本臨床化学会九州支部総会、第52回日本臨床検査医学会九州地方会 (福岡・九州大学医学部百年講堂) 特別講演「摂食亢進ホルモン“グレリン”の生理作用と臨床応用」

- ⑧児島将康 2007.12.7 第15回ニューロペプタイド研究会 (名古屋・名古屋国際会議場) 招待講演「生理活性ペプチド“ニューロメジンU”による炎症反応の制御」
- ⑨児島将康 2007.8.18 第12回アディポサイエンス研究会 (大阪・千里阪急ホテル) シンポジウム「脂肪酸摂取によるグレリン産生の調節機構」
- ⑩児島将康 2007.8.5 第34回日本神経内分泌学会 (群馬 (前橋)・ウェルシティ前橋) シンポジウム「Neuromedin Uと摂食・肥満・炎症」
- ⑪児島将康 2007.7.21 第5回肝臓病研究会 (東京・六本木ヒルズ) 特別講演「摂食調節ペプチド、グレリンの生理作用と臨床応用」
- ⑫児島将康 2007.6.4 第17回サントリー「食と健康」研究会 (大阪・サントリー研究所) シンポジウム「摂食調節ペプチド、グレリンの多彩な生理作用について」
- ⑬児島将康 2007.5.19 日本生化学会中国・四国支部会 (高知・高知かるポート) シンポジウム「摂食調節ペプチド、グレリンの生理作用と臨床応用」
- ⑭井田隆徳 2008.9.25 第146回日本獣医学会学術集会 (宮崎) 「制限給餌下での予知行動に対するニューロメジンUの関与について」
- ⑮井田隆徳 2008.5.17 第81回日本内分泌学会学術集会 (青森) 「ニューロメジンS遺伝子欠損マウスの機能解析」
- ⑯井田隆徳 2008.2.9 第22回日本糖尿病肥満学会 (東京) 「新規生理活性ペプチド、ニューロメジンSの摂食調節作用」
- ⑰佐藤貴弘 2008.8.29 第35回日本神経内分泌学会・第23回日本下垂体研究会合同学術集会 (東京) 「グレリン遺伝子欠損マウスからグレリンの生理機能を探る」
- ⑱佐藤貴弘 2008.5.16 第81回日本内分泌学会学術集会「グレリンによる自律神経機能の調節メカニズムの解明」
- ⑲佐藤貴弘 2008.2.9 第22回日本糖尿病肥満学会 (東京) 「グレリンノックアウトマウスの表現型」

[その他]

[日本語総説] (計4件)

- ① 児島将康、井田隆徳：ニューロメジンUと内分泌代謝および概日リズム、ホルモンと臨床、55 (2)、113-123、2007
- ② 児島将康、井田隆徳、佐藤貴弘：ニューロメジンUと生体リズム、ストレス、遺伝子医学MOOKペプチドと創薬、153-158、2007
- ③ 児島将康、寒川賢治：グレリンの構造と機能、生化学、79、853-867、2007
- ④ 児島将康：本当かな、この構造は？、実験医学、25、3042-3046、2007

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

児島 将康 (KOJIMA MASAYASU)  
久留米大学・分子生命科学研究所・教授  
研究者番号：20202062

### (2) 研究分担者

佐藤 貴弘 (SATO TAKAHIRO)  
久留米大学・分子生命科学研究所・講師  
研究者番号：50368883

井田隆徳 (IDA TAKANORI)  
久留米大学・分子生命科学研究所・助教  
研究者番号：00381088

矢野正二郎 (YANO SYOUJIROU) (平成19年4月1日より平成20年3月31日まで)

久留米大学・医学部・講師  
研究者番号：00200551

### (3) 連携研究者

なし