

平成 21 年 5 月 28日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008年  
 課題番号：19790647  
 研究課題名(和文)薬剤誘導性グレリン細胞腫瘍化マウスの作製－慢性薬理作用の解明と細胞株樹立－  
 研究課題名(英文)Development of a drug-inducible ghrelinoma model mouse to elucidate the chronic effects of ghrelin and to establish a ghrelinoma cell line.  
 研究代表者  
 岩倉 浩 (Iwakura, Hiroshi)  
 京都大学大学院・医学研究科・助教  
 研究者番号：20378615

## 研究成果の概要：

今回、作製を試みた薬剤誘導性のグレリン細胞腫瘍化マウスは、十分な発現レベルを得られず、グレリン細胞の腫瘍化を確認できなかった。しかし、従来から作製を試みてきた薬剤誘導性ではない、グレリン細胞腫瘍化マウスの作製に成功した。このマウスでは、最大で対照マウスの10倍程度の血中グレリン濃度の上昇を認めた。それに伴い、血清IGF-I値の上昇が認められ、血中グレリンの慢性的な上昇によりGH-IGF-I軸が刺激されたことが示唆された。今後、さらに細胞株の樹立を目指す。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,390,000	300,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,390,000	300,000	3,690,000

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、トランスジェニックマウス、腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

グレリンは、その活性にアシル基修飾を必要とするが、その機序は解明されていなかった。グレリンの慢性薬理作用の解明には、トランスジェニックマウスが有用だが、通常の方法ではアシル基修飾が起らず、活性型のグレリンが産生されない。一方で、グレリン細胞株が存在しないため、グレリンの生合成、分泌調節機構の解明が進んでいない。

## 2. 研究の目的

グレリン細胞が増殖し腫瘍化するトランスジェニックマウスを作成することで、グレリンの慢性薬理作用の解明を目指し、さらには、細胞株を樹立することで、*in vitro*でのグレリンの生合成、分泌調節機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

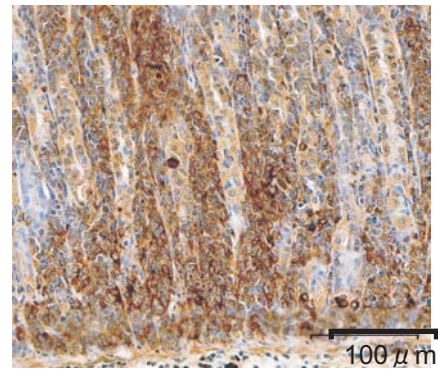
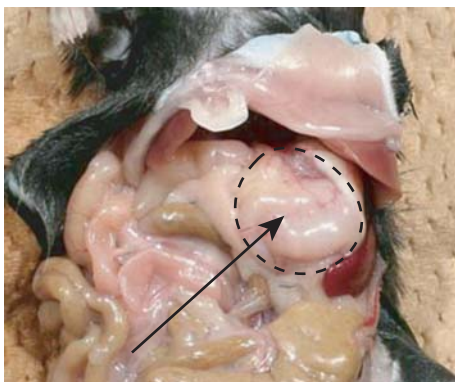
ヒトグレリンプロモーターの下流に、

reverse テトラサイクリン制御性トランス活性化因子(rtTA) を結合させたトランスジェニックマウスおよび、テトラサイクリン応答性因子 (TRE) -CMV プロモーターの下流に SV40T 抗原 (Tag) を結合させたトランスジェニックの2種類のトランスジェニックマウスを作成し、これらを交配させ、ダブルトランスジェニックマウスとすることで、薬剤誘導性にグレリン細胞を増殖させ、血中濃度を上昇させるマウスの作製を行った。並行して、以前から行っていた、ヒトグレリンプロモーターの下流に、直接 SV40T 抗原 (Tag) を結合させたトランスジェニックマウスの作製も行った。

#### 4. 研究成果

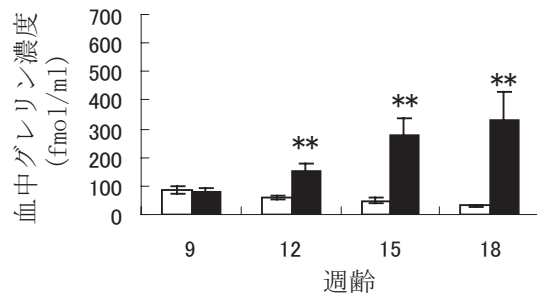
完成した rtTa-Tg マウス 2 ライン、TRE-Tag-Tg マウス 4 ラインを用いて、計 8 通りの組合せで、交配を行い、ダブルトランスジェニックマウスにドキシサイクリン負荷を行った。しかし、全ての組合せにおいて、胃グレリン細胞の増殖、血中グレリン濃度の上昇は認められなかった。ドキシサイクリン負荷により誘導された SV40 T 抗原の発現レベルが、細胞増殖を引き起こす域値に達していないことが示唆された。

新たにダブルトランスジェニックマウスを作成し直すことは、費用、時間的問題から、困難であると判断し、薬剤誘導性はないものの、従来行ってきたグレリンプロモーター下流に SV40T 抗原を結合させたコンストラクトを用いたトランスジェニックマウスの作製を再び試みた。その結果、グレリン細胞の増殖は認められるが、腫瘍の進展が緩徐で、継代維持が可能である適度な SV40T 抗原の発現レベルを持つラインの確立に成功した。このマウスでは、胃壁の肥厚、グレリン細胞の増殖が認められた。

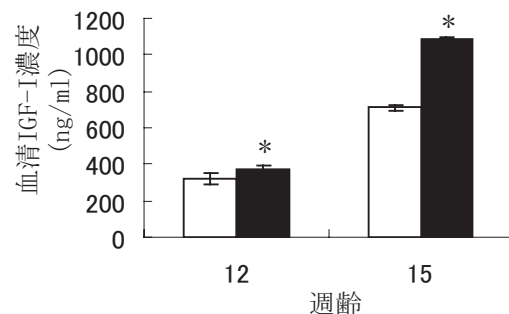


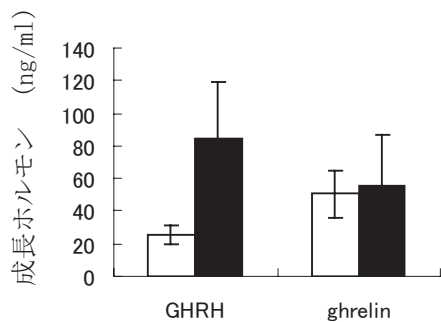
抗グレリン抗体による免疫染色

成長に伴って血中グレリン濃度が上昇し、最大で対照マウスの10倍程度の上昇を認めた。その際、血中グレリン濃度の摂食、体重、性別などによる調節は維持されており、グレリン分泌調節機構が維持されていることが示唆された。



血中グレリン濃度の上昇に伴い、血清 IGF-I 値の上昇が認められた。この際、GHRH 負荷による GH 分泌反応は高い傾向を示し、血中グレリン濃度上昇による GH-IGF-I 軸の刺激が示唆された。





今回の検討により、我々は、初めて、グレリン血中濃度が、数倍～10倍程度、しかも分泌調節機構を維持したまま上昇するトランスジェニックマウスの作製に成功した。

このマウスを用いた検討で、グレリンの慢性上昇が、GH-IGF-I軸を刺激することが明らかとなった。これまでに、グレリンの薬理量の急性投与が、成長ホルモンを上昇させることは明らかであったが、今回の検討で、正常対照の数倍から10倍程度という生理的範囲のグレリン濃度の上昇が、GH-IGF-I軸を刺激しうることが初めて、示された。グレリン濃度の慢性上昇にも関わらず、グレリン負荷に対する成長ホルモン反応は維持されており、視床下部、下垂体でのグレリン受容体(GHS-R)のmRNAの低下も認めなかった。これらの知見は、今後、グレリンの成長ホルモン作用を介した臨床応用を目指す際に、有益な情報となることが期待される。

このマウスでは、グレリン細胞は増殖を続けやがて、腫瘍塊を形成することを確認している。このグレリン腫瘍を採取培養し、グレリン分泌細胞を確立することを目指している。グレリン分泌細胞株を研究ツールとして、今後、グレリンの生合成、分泌調節機構を明らかにしていくことを予定している。さらには、グレリン分泌抑制薬や刺激薬もしくは、グレリンアシル化酵素

(GOAT)阻害薬の開発へとつながることを期待している。

なお、今回の研究目的と直接の関連はないが、TRE-Tag-Tgマウスの中に、副腎に腫瘍が発生する1ラインを認め、小児癌の一種として知られる神経芽細胞腫に極めて類似した腫瘍であることを見いだしたため、論文報告している。

## 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7件)

①Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Murayama T, Sumi E, Teramukai S, Goto K, Ohnishi E, Akiyama H, Kawanabe K, Nankaku M, Ichihashi N, Tsuboyama T, Tamai K, Kataoka M, Nakamura T, Kangawa K, for the OA-THR Clinical Study Team. Effects of ghrelin treatment in patients undergoing total hip replacement for osteoarthritis: Different outcomes from studies in patients with cardiac and pulmonary cachexia. *J Am Geriatr Soc*;56(12):2363-5. 2008. 査読有り

②Iwakura H, Ariyasu H, Kanamoto N, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Establishment of a novel neuroblastoma mouse model. *Int J Oncol*;33(6):1195-9. 2008 査読有り

③Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Efficacy of Ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiologic changes. *Endocrinology*. 2008 Mar 27 Jul; 149(7):3722-8. 2008. 査読有り

④Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Murayama T, Yokode M, Teramukai S, Seno H, Chiba T, Noma S, Nakai Y, Fukunaga M, Nakai Y, Kangawa K, FD Clinical Study Team. Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on food intake and appetite. *Eur J Endocrinol*. Apr;158(4):491-8. 2008 査読有り

⑤Fujikura J, Hosoda K, Kawaguchi Y, Noguchi M, Iwakura H, Odori S, Mori E, Tomita T, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Fukuda A, Furuyama K, Tanigaki K, Yabe D, Nakao K. Rbp-j regulates expansion of pancreatic epithelial cells and their differentiation into exocrine cells during mouse development. *Dev Dyn*. Oct;236(10):2779-91. 2007. 査読有り

⑥Noguchi M, Hosoda K, Fujikura J, Fujimoto M, Iwakura H, Tomita T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Ebihara K, Masuzaki H, Itoh H, Narumiya S, Nakao K. Genetic and pharmacological inhibition of Rho-associated kinase II enhances adipogenesis. *J Biol Chem*. Oct 5;282(40):29574-83. 2007. 査読有り

⑦Iwakura H, Akamizu T, Ariyasu H, Irako T, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K. Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Sep;293(3):E819-25. 2007. 査読有り

[学会発表] (計4件)

- ①Iwakura H, Effects of ghrelin administration on glucose metabolism and beta cell mass in rats with partial pancreatectomy.  
The endocrine society's 90th annual meeting. 2008年7月17日、サンフランシスコ
- ②岩倉浩、ラット膵部分切除モデルに対するグレリン投与による効果の検討  
第51回糖尿病学会総会、2008年5月23日、東京
- ③岩倉 浩、NODマウスへのグレリン長期投与の検討、第81回日本内分泌学会学術総会、2008年5月16日、青森
- ④岩倉 浩、肥満モデル、糖尿病モデルマウスでのグレリン作用の検討、  
第80回日本内分泌学会学術総会、  
2007年6月14日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩倉 浩 (Iwakura, Hiroshi)

研究者番号 : 20378615