

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790648
 研究課題名 (和文) ジフテリアトキシン受容体強制発現システムを用いたグレリン分泌低下マウスの開発
 研究課題名 (英文) Generation of a transgenic mouse that expressing human diphtheria toxin receptor cDNA under the control of the transcription regulatory regions of ghrelin

研究代表者
 有安 宏之 (ARIYASU HIROYUKI)
 京都大学大学院・医学研究科・助教
 研究者番号：50378650

研究成果の概要：

ヒトグレリンプロモーターのコントロール下にヒトジフテリアトキシン受容体を発現するトランスジェニックマウスの作成に成功した。このトランスジェニックマウスは、ジフテリアトキシン受容体を胃・十二指腸で発現しており、ジフテリアトキシン投与によってグレリン分泌細胞が減少し、血中グレリン濃度が低下することが確認できた。生後の随意の時期に循環血中グレリンを低下させるマウスの開発に成功した。このマウスは、グレリンの生理作用を検討する上で重要なモデルマウスである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2000000	0	2000000
2008 年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	390000	3690000

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, ジフテリアトキシン受容体

1. 研究開始当初の背景

1999 年、国立循環器病センターの児島・寒川らによって、成長ホルモン放出促進ペプチド (GHS) 受容体の内因性リガンドとしてグレリンが発見された。それ以来、グレリンの外因性投与による薬理学的検討が数多くなされ、成長ホルモン分泌促進作用以外にも摂食促進作用や消化器系への作用、エネルギー

代謝系への作用など、グレリンが多彩な薬理作用を有することが明らかになってきた。

一方、グレリンの生理的意義は不明な点が多く残されている。グレリンの生理的意義を解明するための一つの手法として、遺伝子改変動物の開発・解析が試みられ、グレリン欠損 or グレリン受容体欠損マウスの開発・解析がこれまでに報告されてきた。しかしなが

ら、これらの動物を用いた研究では、グレリンの生理的意義の解明という課題に対して満足のいく結果が得られていない。

海外の複数のグループが、グレリン欠損マウスやグレリン受容体欠損マウスを開発し、摂食行動や体重は野生型マウスと差を認めなかったことを報告している。ところで、摂食促進ペプチドである NPY や AgRP を胎生期から欠損させた遺伝子改変動物は、摂食行動に目立った変化がないことが知られている。しかしながら、後天的に NPY や AgRP 分泌細胞を破壊すると、著しく摂食低下がおこる。これは、脳内のニューロンネットワークが構築される以前に摂食関連の神経細胞を破壊した場合、代替のネットワークが形成されてその機能を補完する可能性が考えられている。先に報告されたグレリン or グレリン受容体欠損マウスでも同様の現象が起こっている可能性がある。

従って、グレリンの生理的役割を詳細に検討するには、脳内のニューロンネットワークが構築された以降に、グレリン分泌細胞を破壊し、摂食や成長にまつわる解析を行うことが必要であると考え、グレリン分泌細胞にジフテリアトキシン受容体を強制発現するマウスの作製し、後天的なグレリン欠損 or 分泌低下マウスを作り出すという着想に至った。

2. 研究の目的

グレリン分泌細胞にジフテリアトキシン受容体を強制発現するマウスを作製し、グレリンを後天的に分泌低下させ、成長ホルモン分泌調節機構や摂食・エネルギー代謝機能などを解析することにより、グレリンの生理的役割を解明する。

3. 研究の方法

①奈良先端化学技術大学院大学の河野教授からヒトジフテリアトキシン受容体 cDNA を供与していただき、ヒトグレリンプロモーターの下流にこれを組み込んだコンストラクトを作製する。このコンストラクトをマウス受精卵にマイクロインジェクションし Tg マウスを作製する。

②得られたトランスジェニックマウスは、グレリン分泌細胞にヒトジフテリアトキシン受容体を過剰発現することが期待される。ジフテリアトキシン (5ng/kg~50ug/kg の範囲を想定) を筋肉注射によりグレリン分泌細胞を後天的に任意の週令で脱落もしくは低下させる。血中グレリン濃度や組織内グレリン含有量を ELISA で測定し、またグレリンの免疫組織化学染色を行うことにより、グレリン分泌細胞の破壊の程度を評価する。

4. 研究成果

①ヒトグレリンプロモーターの下流にヒト

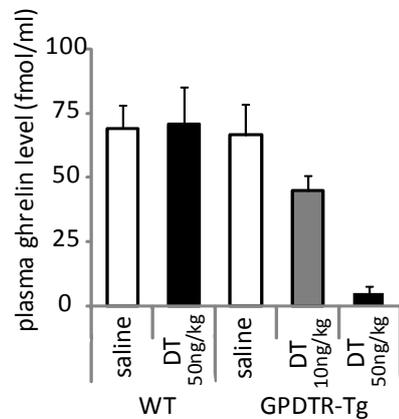
ジフテリアトキシン受容体 cDNA を組み込んだコンストラクト (図 1) は、切り出し精製後、マウス受精卵にインジェクションした。この受精卵から 4 匹の F0 マウスを得た。

(図 1)

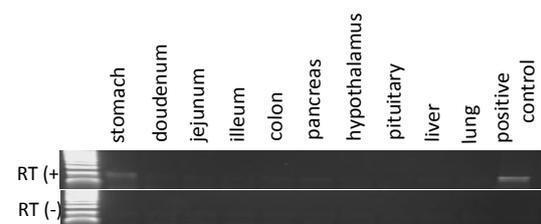


②得られたマウスにジフテリアトキシンを投与した。投与経路は既報にならない筋肉注射を選択した。至適投与量・投与回数検討も同時に開始した。具体的には、投与量は 10ng/kg、50ng/kg もしくは 500ng/kg、投与回数は単回もしくは 2 回 (day0 と day2) とした。得られていた 4 ラインのトランスジェニックマウスのうち 2 ラインにおいて、グレリン分泌細胞の減少と血中グレリン濃度の低下を確認することができた。一方のマウスが 500ng/kg の DT を要するのに対し、もう一方のマウスはその 1/10 の 50ng/kg の DT で血中グレリン濃度の低下を認めた (図 2)。後者のトランスジェニックマウスにおいて、ジフテリアトキシン受容体は胃・十二指腸で発現していることが確認できた (図 3)。

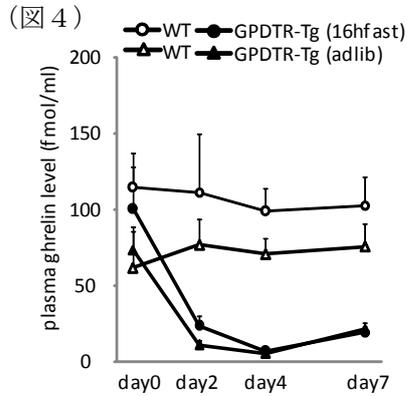
(図 2)



(図 3)

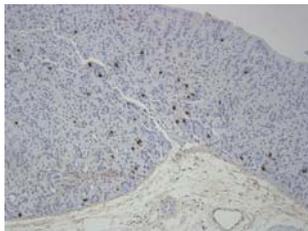


③このマウスに、50ng/kg のジフテリアトキシンを2回 (day0 と day2) 投与すると、day4 において血中グレリン濃度が、 5.3 ± 2.3 fmol/ml と、著明に低下していることがわかった (野生型マウス 60.5 ± 7.0 fmol/ml) (図4)。

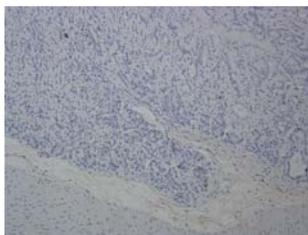


また、免疫組織染色を用いた検討でも、グレリン分泌細胞が著しく減少することが確認できた (図5)。

(図5)
野生型マウス

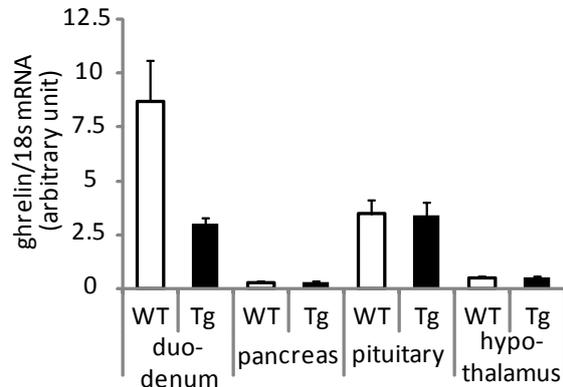


トランスジェニックマウス



定量PCR法を用いて、胃・十二指腸・下垂体・視床下部におけるグレリンmRNA遺伝子発現も併せて検討したところ、ジフテリアトキシン投与によって胃・十二指腸のグレリンmRNA低下は認められたものの、下垂体・視床下部のグレリンmRNA低下は認めなかった (図6)

(図6)



このように、生後の随意の時期に循環血中グレリンを低下させるマウスの開発に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

① Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Efficacy of ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiological changes. *Endocrinology* 2008, 149, 3722-3728, 査読有り

② Iwakura H, Ariyasu H, Kanamoto N, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Establishment of a novel neuroblastoma mouse model. *Int J Oncol.* 2008, 33, 1195-1199. 査読有り

③ Iwakura 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.* 2007, 293, E819-25. 査読有り

④ Akamizu 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, 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 2008, 56, 2363-2365, 査読有り

⑤Akamizu 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 2008, 158, 491-498, 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

①(発表者)有安宏之
(発表表題)加齢に伴うソマトポーズ及び食欲低下に対するグレリン有用性の研究
(学会名)第34回日本神経内分泌学会
(日時・場所)平成19年8月4,5日 群馬県前橋市

②(発表者)有安宏之
(発表表題)加齢に伴うソマトポーズ及び食欲低下に対するグレリン有用性の研究
(学会名)第81回日本内分泌学会学術総会
(日時・場所)平成20年5月18日 青森市文化会館

〔その他〕

ホームページ

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ghrelin/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

有安 宏之 (ARIYASU HIROYUKI)

研究者番号 : 50378650

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし