

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590676

研究課題名（和文）グレリン活性を増加させる漢方成分の探索

研究課題名（英文）The mechanism by which rikkunshito increases acylated ghrelin

研究代表者

武田 宏司（TAKEDA HIROSHI）

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：60261294

研究成果の概要（和文）：

本研究は六君子湯が血漿アシルグレリン／デスアシルグレリン比を上昇させる機序を明らかにすることを目的とした。六君子湯の投与は、シスプラチン投与による血漿アシルグレリンの低下を抑制し、血漿アシルグレリン／デスアシルグレリン比を上昇させた。六君子湯の成分である 10-gingerol に、比較的強い carboxylesterase 阻害活性（ $K_i = 5.2 \mu M$ ）が見いだされた。さらに、アシルグレリン産生系への六君子湯の作用を明らかにするために、グレリン、GOAT の安定発現細胞の作成を試み、その樹立に成功した。

研究成果の概要（英文）：

This study was conducted to uncover the mechanism by which rikkunshito increases plasma acylated to desacyl-ghrelin ratio in cisplatin-treated rats. Several components of rikkunshito including 10-gingerol demonstrated inhibitory activity against ghrelin deacylating enzyme, carboxylesterase. Furthermore, stably transfected GOAT/ preproghrelin HEK 293 cells were successfully established to explore the effects of rikkunshito on ghrelin producing machinery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：グレリン・漢方

1. 研究開始当初の背景

大腸癌をはじめとして、消化器癌化学療法
の進歩は目覚ましいものがある。支持療法に
関しても、化学療法にともなう悪心・嘔吐に
関しては、セロトニン 5-HT₃ 受容体拮抗薬や
遷延性嘔吐に対して最近開発された NK-1 受

容体拮抗薬により、ほぼ解決されたと言える。
しかしながら、化学療法にともなう食欲不振
に関しては、その原因も明らかでなく、また
有効な手だてが無いのが現状である。

六君子湯は、機能性ディスペプシアに対し
て広く使用されている代表的な漢方方剤で

あり、その主な機序は胃排出の亢進であるとされている。近年、進行性乳癌患者に対する代表的な化学療法を施行された患者において、六君子湯とグラニセトロンをはじめとする制吐剤との併用治療が、抗癌剤の副作用である食欲不振に対して有用性を示したことが報告されている。

食欲増進ホルモンであるグレリンは、主に胃より分泌される 28 個のアミノ酸よりなる growth-hormone secretagogue receptor の内因性リガンドであり、成長ホルモン分泌促進作用の他に、強力な食欲増進作用を有することが知られている。グレリンならびにその受容体は胃の他に、視床下部弓状核のニューロンでも発現ならびに産生されており、げっ歯類へのグレリンの末梢ならびに脳室内投与は、それぞれ消化管運動の亢進と摂餌量の増加を引き起こす。

最近申請者らは、シスプラチン投与時に、消化管粘膜の EC 細胞から放出されたセロトニンが胃粘膜セロトニン 5-HT_{2B} 受容体を活性化して、グレリン分泌を強力に抑制することを見いだした。また、機能性ディスペプシアに対して広く用いられている漢方薬である六君子湯およびその成分のフラボノイドが、5-HT_{2B} 受容体および 5-HT_{2C} 受容体に拮抗することにより血漿アシルグレリン/デスアシルグレリン比を上昇させ、シスプラチン投与時の食欲不振に対して著効することも示した。一般に、漢方薬は多成分から構成されており、その作用機序を明らかにすることは容易ではない。しかしながら幸いな事に、申請者らは、漢方薬の成分から、セロトニン 5-HT_{2B} および 5-HT_{2C} 受容体に強力な結合活性をもつ成分を同定することに成功した。(Takeda H, et al: Gastroenterology 2008)

一方、漢方薬が多成分から構成されていることは、その作用点が複数存在する可能性を示唆する。ごく最近、申請者らは六君子湯に含まれる数種類のフラボノイドおよびクマリンが、グレリンの摂食亢進作用を視床下部レベルにおいて負に制御している phosphodiesterase III を抑制することにより、グレリンの作用を増強する事を見いだした (Takeda H., et al: Endocrinology 2010)。さらに、六君子湯はストレス負荷時にみとめられる食欲低下を改善するが、この時血漿アシルグレリン/デスアシルグレリン比が上昇することを見いだしている。このことは、六君子湯の作用点が、5-HT_{2B}、5-HT_{2C} 受容体、phosphodiesterase III 以外、すなわちグレリン産生時のアシル基転移もしくは末梢での脱アシル化の過程にも存在する可能性を示唆している。

ごく最近、2つのグループからグレリンにアシル基を転移する酵素の遺伝子が同定さ

れ ghrelin O-acyltransferase (GOAT) として報告された。GOAT は小胞体の膜に結合した酵素で、脂質などにアシル基を転移する酵素群である MBOAT (membrane-bound O-acyltransferase) ファミリーに属し、MBOAT 4 とも呼ばれている。本研究は、六君子湯に含まれる生薬成分が、グレリンの分泌過程のみならず、グレリンの転写もしくは翻訳後修飾、あるいは代謝・排泄の過程にも影響することにより、血漿アシルグレリンを増加させている可能性を検証するために計画された。

2. 研究の目的

六君子湯が血漿アシルグレリン/デスアシルグレリン比を上昇させる機序を明らかにし、新しい薬剤の開発を先導することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *In vivo* における検討

24 時間絶食した 7 週齢の Sprague-Dawley ラットにシスプラチン (2 mg/kg) を腹腔内投与した後 2 時間後に採血を行い、血漿アシルグレリン、デスアシルグレリンを特異的 ELISA 法 (三菱メディエンス) にて測定した。六君子湯 (1,000 mg/kg) は、シスプラチン投与直後に経口投与した。

(2) Carboxylesterase 阻害作用の検討

ラットにおいてアシルグレリンに対する脱アシル化活性を有する carboxylesterase に対して、六君子湯の成分 (48 種類) がその阻害作用を有するか否かを、*a*-naphthyl acetate を基質とし、リコンビナント carboxylesterase を用いた *in vitro* アッセイにて検討した。

(3) グレリン、GOAT 一過性発現細胞の構築

シスプラチンおよびセロトニン投与がグレリン産生系に与える影響を検討するために、グレリンを産生する細胞株の作製を試みた。ヒト cDNA ライブラリーより、特異的プライマーを用いた PCR 法にて、ヒト preproghrelin および GOAT 遺伝子をクローニングした。次に、単離したグレリンおよび GOAT の cDNA を、IRES (internal ribosomal entry site) 有する哺乳動物用発現ベクター pIRES (Clontec 社) に挿入し、pIRES-Ghr/GOAT を構築した。次に、ヒト胎児腎臓 293 細胞にリポフェクション法によりトランスフェクションした。さらに、培養液に *n*-オクタン酸 (0.01%) を入れた条件と入れない条件で、preproghrelin および GOAT の mRNA レベルへ与える影響をリアルタイム RT-PCR 法により、また細胞内および上清のアシルグレリン、デスアシルグレリンを特異的 ELISA 法により、

それぞれ定量した。

(4) グレリン、GOAT 安定発現細胞の構築

最後に、preproghrelin および GOAT を安定に発現する細胞 (293-Ghr/GOAT 細胞) の樹立を試みた。293 細胞に、pIRES-Ghr/GOAT をトランスフェクションした後、培地中に抗生物質 G418 を添加して選択を行った。

4. 研究成果

(1) *In vivo* における検討

Sprague-Dawley ラットにシスプラチン投与すると、2 時間後に血漿アシルグレリン、デスアシルグレリンは有意に低下したが、血漿アシルグレリン/デスアシルグレリン比には変化がなかった。六君子湯 (1,000 mg/kg) の経口投与により血漿アシルグレリンの低下が抑制されたが、デスアシルグレリンには変化がなく、血漿アシルグレリン/デスアシルグレリン比は上昇した。

(2) Carboxylesterase 阻害作用の検討

Carboxylesterase に対する、六君子湯の成分の阻害活性を測定したところ、10-gingerol に比較的強い carboxylesterase 阻害活性 ($K_i = 5.2 \mu\text{M}$) が見いだされた。

(3) グレリン、GOAT 発現細胞の構築

リポフェクション法により pIRES-Ghr/GOAT を導入した HEK293 細胞において、preproghrelin および GOAT の mRNA 発現が特異的に検出された。また、培地中に n-オクタン酸を 0.01% 添加したところ、デスアシルグレリンとともにアシル化グレリンが産生されていることが確認された。さらに、培地中に添加する n-オクタン酸濃度を 0.000625~0.01% の範囲で変化させて同様に解析した結果、n-オクタン酸の濃度依存的にアシル化グレリンの産生量の増加が観察された。

(4) グレリン、GOAT 安定発現細胞の構築

G418 による選択の結果、複数のクローンが単離された。ELISA による検討から、これらがアシル化グレリンを産生していることが示され、preproghrelin/GOAT 安定発現細胞のクローニングに成功したことが確認された。

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 12 件)

1. Nahata M, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Iizuka S, Hattori T, Asaka M, Takeda H. (2013) Serotonin 2C receptor antagonism ameliorates novelty-

induced hypophagia in aged mice. Psychoneuroendocrinology. in press. 査読あり

- Nahata M, Saegusa Y, Harada Y, Tsuchiya N, Hattori T, Takeda H. (2013) Changes in ghrelin-related factors in gastroesophageal reflux disease in rats. Gastroenterology Research and Practice. in press 査読あり
- Hattori T, Yakabi K, Takeda H. (2013) Cisplatin-induced anorexia and ghrelin. Vitam Horm, 92: 301-317. 査読あり
- Hata T, Kato M, Kudo T, Nishida M, Nishida U, Imai A, Yoshida T, Hirota J, Kamada G, Ono S, Nakagawa M, Nakagawa S, Shimizu Y, Takeda H. Asaka M. (2013) Comparison of Gastric Relaxation and Sensory Functions between Functional Dyspepsia and Healthy Subjects Using Novel Drinking-Ultrasonography Test. Digestion. 87:34-39. 査読あり
- Takeda H. Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Asaka M. (2012) Rikkunshito and ghrelin secretion. Curr Pharm Des. 18: 4827-4838. 査読あり
- Takeda H. Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. (2012) Rikkunshito as a ghrelin enhancer. Methods Enzymol. 514:333-351. 査読なし
- Nahata M, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M, Takeda H. (2012) Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 303: G42-53. 査読あり
- Imai A, Kato M, Ono S, Shimizu Y, Takeda H. Asaka M. (2012) Efficacy of carbon dioxide-insufflating colonoscopy in patients with irritable bowel syndrome (IBS): a randomized double-blind study. J Gastroenterol Hepatol. 27:1623-1628. 査読あり
- Sadakane C, Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M, Takeda H. (2011) 10-Gingerol, a component of rikkunshito, improves cisplatin-induced anorexia by inhibiting acylated ghrelin degradation. Biochem Biophys Res Commun. 412: 506-511. 査読あり
- Saegusa Y, Takeda H. Muto S, Nakagawa K, Ohnishi S, Sadakane C, Nahata M, Hattori T, Asaka M. (2011) Decreased plasma ghrelin contributes to anorexia following novelty stress. Am J Physiol Endocrinol Metab. 301: E685-696. 査読あり

11. Saegusa Y, Takeda H, Muto S, Oridate N, Nakagawa K, Sadakane C, Nahata M, Harada Y, Iizuka M, Hattori T, Asaka M. (2011) Decreased motility of the lower esophageal sphincter in a rat model of gastroesophageal reflux disease may be mediated by reductions of serotonin and acetylcholine signaling. *Biol Pharm Bull.* 34: 704 - 711. 査読あり
 12. Takeda H, Muto S, Hattori T, Sadakane C, Tsuchiya K, Katsurada T, Ohkawara T, Oridate N, Asaka M. (2010) Rikkunshito ameliorates the aging-associated decrease in ghrelin receptor reactivity via phosphodiesterase III inhibition. *Endocrinology.* 151: 244-252. 査読あり
- [学会発表] (計 25 件)
1. 武田宏司 機能性消化管障害の病態生理と治療戦略 第 9 回日本消化管学会総会(ランチョンセミナー) 2013 年 01 月 26 日 京王プラザホテル (東京)
 2. 武田宏司、武藤修一、大西俊介 グレリンシグナルの低下が GERD における胃排出低下に関与する JDDW2012 (シンポジウム) 2012 年 10 月 12 日神戸国際会議場他 (兵庫県神戸市)
 3. 武田宏司 セロトニン、グレリンシグナルと食欲の異常 第 16 回活性アミンに関するワークショップ(招待講演) 2012 年 08 月 24 日 北海道医療大学 (北海道札幌市)
 4. 武田宏司 癌患者における食欲不振のメカニズム第 53 回日本心身医学会総会(招待講演) 2012 年 05 月 25 日 かがしま県民交流センター (鹿児島県鹿児島市)
 5. Ohnishi S, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Nahata M, Saegusa Y, Hattori T, Asaka M. A Study on Gender Differences in Feeding Behavior and Plasma Acyl Ghrelin Levels in Aged Mice Following Exposure to a Novel Environmental Stress. DDW2012. 2012 年 5 月 20 日、San Diego Convention Center (米国カリフォルニア州サンディエゴ市)
 6. Takeda H, Muto S, Ohnishi S, Nakagawa K, Nahata M, Saegusa Y, Sadakane C, Hattori T, Asaka M. The Ghrelin Enhancer Rikkunshito Improves Gastric Dysmotility in Restraint Stress Mice. DDW2012. 2012 年 5 月 19 日、San Diego Convention Center (米国カリフォルニア州サンディエゴ市)
 7. Muto S, Takeda H, Ohnishi S, Nakagawa K, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Asaka M. Potential New Treatment to Alleviate Stress-Induced Anorexia. DDW2012. 2012 年 5 月 19 日、San Diego Convention Center (米国カリフォルニア州サンディエゴ市)
 8. 武田宏司、武藤修一、大西俊介 社会的ストレスと消化器症状第 78 回消化器心身医学研究会 (シンポジウム) 2012 年 04 月 20 日 パークハイアット東京 (東京)
 9. 大西俊介、武藤修一、武田宏司 性差が末梢グレリン分泌に与える影響 98 回日本消化器病学会 (ワークショップ) 2012 年 04 月 19 日 京王プラザホテル (東京)
 10. 武藤修一、大西俊介、武田宏司 新奇環境ストレスによる食欲不振は血中グレリン低下が原因である 第 8 回日本消化管学会 2012 年 02 月 10 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)
 11. 武田宏司、武藤修一、大西俊介 六君子湯の食欲改善作用のメカニズム 第 13 回日本神経消化器病学会総会 (シンポジウム) 2011 年 11 月 5 日 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市)
 12. 武田宏司、武藤修一、大西俊介 六君子湯は社会的隔離による食欲不振を改善する 第 97 回日本消化器病学会総会 (ワークショップ) 2011 年 5 月 14 日 京王プラザホテル (東京)
 13. Muto S, Takeda H, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Novelty Stress-Induced Anorexia is Due to the Decrease in the Plasma Ghrelin Level via 5-HT1b/2C-Melanocortin4 System Activation. DDW2011 2011 年 5 月 10 日、McCormick Place (米国イリノイ州シカゴ市)
 14. Ohnishi S, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Potential New Treatment to Alleviate Chemotherapy Anorexia. DDW2011 2011 年 5 月 10 日、McCormick Place (米国イリノイ州シカゴ市)
 15. Takeda H, Muto S, Oridate N, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Sadakane C, Hattori T, Asaka M. Impaired Gastric Emptying in Gastroesophageal Reflux Disease Rat Models is Caused by a Reduced Response to Ghrelin. DDW2011 2011 年 5 月 8 日、McCormick Place (米国イリノイ州シカゴ市)
 16. Muto S, Takeda H, Ohnishi S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Stress-Related Differences in Appetite-Related Genes Between Advanced-Age Male and Female Mice. DDW2011 2012 年 5 月 7 日、McCormick Place (米国イリノイ州シカゴ市)
 17. Ohnishi S, Takeda H, Muto S, Nakagawa K, Sadakane C, Saegusa Y, Nahata M, Hattori T, Asaka M. Influence of Gender on Peripheral Ghrelin Secretion-Examination in the Aging Mice-. DDW2011 2011 年 5 月 7 日、McCormick Place (米国イリノイ州シカゴ市)
 18. 武田宏司、加藤寛士、浅香正博 腹部膨満の病

態と大建中湯の役割 第 7 回日本消化管学会
総会 2011 年 02 月 19 日 国立京都国際会館
(京都府京都市)

19. 武藤修一、平山剛、武田宏司 加齢による食欲不振のメカニズムとその対策 JDDW2010 (シンポジウム) 2010 年 10 月 14 日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
20. 武田宏司 消化器疾患と六君子湯・大建中湯 第 12 回日本神経消化器病学会 (市民講座) 2010 年 10 月 2 日 鹿児島大学稲盛会館 (鹿児島県鹿児島市)
21. 武田宏司、武藤修一、大西俊介、浅香正博 食欲不振に対する六君子湯の効果 第 12 回日本神経消化器病学会総会 (シンポジウム) 2010 年 10 月 1 日城山観光ホテル (鹿児島県鹿児島市)
22. Sadakane C, Takeda H, Saegusa Y, Hattori T, Nakagawa K, Muto S, Asaka M. Social Isolation After Anorexia is Mediated by Abnormalities in Serotonin 2C Receptor Reactivity. DDW2010. 2010 年 5 月 5 日、The Ernest N. Morial Convention Center (米国ルイジアナ州ニューオーリンズ市)
23. Saegusa Y, Takeda H, Sadakane C, Hattori T, Katsurada T, Muto S, Asaka M. Ghrelin Alleviates Social Isolation-Associated Anorexia in Mice. DDW2010. 2010 年 5 月 3 日、The Ernest N. Morial Convention Center (米国ルイジアナ州ニューオーリンズ市)
24. 武藤修一、武田宏司、浅香正博 消化器癌化学療法にともなう食欲不振のメカニズムとその対策第 96 回日本消化器病学会総会 (シンポジウム) 2010 年 4 月 23 日 (金) 新潟市朱鷺メッセ (新潟県新潟市)
25. 武田宏司 食欲の科学 第 96 回日本消化器病学会総会 (ランチョンセミナー) 2010 年 4 月 23 日 (金) 新潟市朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

[その他]

ホームページ

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/byoutai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 宏司 (TAKEDA HIROSHI)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：60261294

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無