

## 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24年5月29日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790889

研究課題名（和文） 自律神経機能のリズム制御におけるグレリン作用の解明

研究課題名（英文） The analysis of ghrelin action in rhythm control of an autonomic-nerves function

研究代表者

佐藤 貴弘 (SATO TAKAHIRO)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：50368883

研究成果の概要（和文）：本研究では、食欲の増進や脂肪の蓄積に機能するホルモン、グレリンが、自律神経機能のリズムを調節する機構の一端を明らかにした。このホルモンがない実験動物のマウスでは、体温や血圧の日内リズムが崩れる。このことから、肥満症のようにグレリン分泌能が低下する病態では、体温や血圧といった自律神経機能にリズム異常が生じ、高血圧症の発症や様々な自律神経機能の異常を誘導しやすくなる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Ghrelin secreted from stomach increases appetite and accumulates fat. From analysis from the ghrelin-deficient mice, it was revealed that these mice displayed the abnormal circadian rhythm of body temperature or blood pressure. Therefore, it was shown that ghrelin regulates the rhythm of autonomic-nerves functions, to maintain the normal homeostasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、時間生物学の発展により生体リズムを刻む分子メカニズムが明らかになってきた。生体リズムの中核は視床下部の視交叉上

核であり、この神経核に存在する時計遺伝子群が生体リズムの主要な調節因子である。

ところが、申請者の作出したグレリン遺伝子欠損(GKO)マウスでは、視交叉上核における時計遺伝子 (*per1*, *per2*, *clock*, *cry1*,

cry2) 群の発現リズムや行動の自発性リズムは正常であるのにも関わらず、血圧・心拍や体温の日内リズムが消失し、基礎値が短い周期で変則的に変化するという、極めて特徴的な自律神経機能のリズム異常を示した。この結果から、生体リズムの維持機構に中枢の時計遺伝子群だけではなくグレリンが重要な役割を担っていると考えられる。

グレリンは、胃から分泌されて脂肪蓄積や摂食亢進などの生理作用を持つエネルギー代謝調節ホルモンであるため、グレリンの分泌異常は生活習慣病の発症に直結する。逆に、肥満症の病態では異常なグレリン低値を示しており、このような病態においてグレリン分泌能が低下すると、中枢の時計遺伝子群の機能が正常であっても、血圧・心拍や体温といった自律神経機能にリズム異常が生じ、高血圧症の発症や様々な自律神経機能の異常を誘導するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、自律神経機能のリズム制御におけるグレリンの役割を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

研究目的を達成するために、グレリン受容体の分布や、これまでの申請者の研究から関与が予想される、中枢、交感神経末端、末梢（心臓・褐色脂肪）を中心に研究を進める。

(1) 低エネルギー条件下における自律神経機能のリズム制御に対するグレリンの役割  
：グレリン分泌が亢進する低エネルギー条件下で、血圧・心拍や体温のリズムがどのように変動するのかをグレリン遺伝子欠損マウスとの比較から解析する。

(2) 自律神経機能のリズム制御における中枢でのグレリンの役割  
：グレリンがどのような神経回路を経て、またどのような脳内物質を介して自律神経機能のリズムを調節しているのかを明らかにする。

(3) 交感・副交感神経の活動リズムに対するグレリンの役割  
：交感神経末端のカテコールアミン生合成に対するグレリンの役割を明らかにすることで、交感・副交感神経の活動リズムに及ぼすグレリンの役割を検討する。

(4) 自律神経機能のリズム制御における末梢（心臓・褐色脂肪）でのグレリンの役割  
：血圧・心拍や体温の出力器官である心臓や褐色脂肪に対するグレリンの直接作用を検

討し、自律神経機能のリズム調節に対する末梢の役割を示す。

## 3. 研究の方法

我々が作出したグレリン遺伝子欠損マウスでは血圧・心拍や体温の日内リズムに異常が見られる。そこで本研究では、以下の実験からグレリンが自律神経機能のリズムをどのように調節しているのかを分子レベルで明らかにする。

(1) 低エネルギー条件下における自律神経機能のリズム制御に対するグレリンの役割：

グレリン遺伝子欠損マウスの血圧・心拍と体温に見られるリズム異常が、本来、グレリン分泌の亢進する低エネルギー状態でどのように変動するのかを明らかにする目的で、絶食実験や時間制限給餌（restricted feeding; RF）実験、糖欠乏実験などを行う。あわせて、レプチン、インスリン、アディポネクチンなど、自律神経活動により分泌調節を受ける代謝ホルモンについて検討し、血圧・心拍と体温のリズム調節におけるこれらホルモンの作用も検討する。一方、各臓器に発現する時計遺伝子群も生体リズムの調節の一端を担うことが最近報告されているので、グレリン遺伝子欠損マウスでこれら遺伝子の発現動態を明らかにする。本実験から得た生理学的条件下において、以後の実験を進める。

(2) 自律神経機能のリズム制御における中枢でのグレリンの役割：

これまでの我々の研究から、胃から分泌されたグレリンは胃の迷走神経を介して中枢の延髄孤束核へシグナルを伝えることがわかっている。そこで、グレリンが血圧・心拍や体温を調節するまでに、どのような神経回路を経て、またどのような脳内物質を介して自律神経機能のリズム制御を行うのかを明らかにする目的で、脳の神経核破壊実験や神経回路遮断実験を行なう。破壊や遮断する神経核は、実験（1）の検討結果から、血圧・心拍や体温に野生型マウスとグレリン遺伝子欠損マウスとの差が認められる条件下で、神経活動のマーカーである cFos 蛋白質の発現を脳で比較検討して決定する。

(3) 交感・副交感神経の活動リズムに対するグレリンの役割：

予備検討からグレリンが交感神経活動を抑制的に調節する可能性が示唆されている。そこで、テレメトリー自動計測システムを利用した心拍変動のパワースペクトル解析を

行い、交感・副交感神経活動を検討する。また、血圧・心拍の調節を行う心臓や、体温調節を行う褐色脂肪では、交感神経末端に存在するカテコールアミンの合成系酵素および分解系酵素の発現量の変動が交感神経のシグナル強度を調節することから、これら酵素群の遺伝子発現量を検討する。以上より、グレリンがどのような機序で自律神経活動のバランスあるいはリズムを調節しているのかを明らかにできる。

(4) 自律神経機能のリズム制御における末梢(心臓・褐色脂肪)でのグレリンの役割:

マイクロアレイ解析による予備検討から、核内オーファン受容体の NR4A (nuclear receptor subfamily 4, group A) 遺伝子群や脂肪酸結合タンパク質群が、本研究におけるメカニズム解明の重要な候補遺伝子として同定された。これらの遺伝子群は、血圧・心拍の調節を行う心臓と、体温調節を行う褐色脂肪の双方に発現する。そこで本実験ではこれら遺伝子の発現量を(1)の条件下で定量後、過剰発現細胞を中心とした実験系を用い、末梢レベルではグレリンのシグナルがどのような細胞内の経路によって血圧・心拍や体温のリズム調節に作用するのかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

本研究では、グレリンが自律神経機能のリズムを調節する機構の一端を明らかにした。

低エネルギー条件下における自律神経機能のリズム制御にグレリンがどのような役割をもつのかを明らかにするため、絶食実験を行った。野生型(WT)マウスにくらべ、GKOマウスの体温は絶食にともなう体温低下が小さいことを再確認した。一方で、血圧や心拍では有意な差が認められなかった。そこで次に、繰り返し生じる負のエネルギー状態で生じる体温変動に対して、グレリンがどのような役割をもつのかを検討するため、1日4時間のRF実験を10日間行った。RF実験開始直後は、絶食時と同様、GKOマウスの体温が高い傾向を示した。しかしながら、RF実験後半では、逆にGKOマウスの体温が低い結果となった。呼吸商などの詳細な検討は必要であるが、RF実験開始直後にGKOマウスでは体温低下を十分に誘導できなかったため、エネルギーを浪費し、RF実験後半での体温低下に繋がったものと推察される。実際、RF実験期間中の摂餌量には両群とも差がなく、摂取エネルギーは同じであったと考えられる。また、RF実験開始直後

の3日間グレリンを腹腔内投与すると、RF実験後半に見られるGKOマウスの体温低下が観察されなかった。これらのことから、繰り返し生じる負のエネルギー条件下で、グレリンはRF初期に体温を低下させてエネルギー保持にあたっている可能性が示唆された。一方で、褐色脂肪組織などの末梢臓器に発現する時計遺伝子は、WTマウスとGKOマウスで同様の発現パターンを示しており、リズム異常の視点からはさらなる解析が必要であると考えられる。

次に、中枢におけるグレリンの作用機序について検討した。これまで、末梢のグレリンが延髄孤束核を刺激して体温調節を行っていることを明らかにしてきた。本研究では、末梢へのグレリン投与によって、延髄孤束核から延髄縫線核へそのシグナルが伝わることを、さらに、延髄縫線核を介して褐色脂肪組織に入力する交感神経活動がグレリンによって抑制されることを示した。このように、本実験からは主として末梢のグレリンによる中枢を介した体温の調節系を明らかにすることができた。

一方で、血圧や心拍に対するグレリンの作用については、中枢レベルでの解析から十分な理解へつなげることは出来なかった。そこで、血圧や心拍の調節を行う心臓に入力する交感神経に着目した。この交感神経末端には、カテコールアミン合成酵素および分解酵素が含まれており、これらの変動が交感神経のシグナル強度を調節すると考えられる。定量PCRによる解析から、GKOマウスでは、絶食時にカテコールアミン合成酵素の発現が高くなっており、交感神経活動が亢進しやすい状態であることが示された。したがって、グレリンが血圧や心拍に対しても抑制的に作用することが示唆された。

最後に、末梢でのグレリン作用について検討した。マイクロアレイ解析から抽出されたNR4A遺伝子の発現量は、確かにGKOマウスの絶食時において高い発現量を示した。しかしながら、NR4A遺伝子は急性期的に発現する遺伝子であることから、その生理的な意義について探るためには、この遺伝子を欠損したマウスを用いた解析などにより確認することが必要である。

以上、本研究からは、主としてグレリンによる体温調節系について成果を得ることができた。また、グレリンによる血圧や心拍の調節は、交感神経末端のカテコールアミン合成酵素の発現により制御されている可能性も示唆された。今後は、中枢と末梢の機能連関について明らかにし、グレリンによる自律神経機能のリズム制御の全貌を解析する必要がある。

## 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4件)

- ① Takahiro Sato, Yuki Nakamura, Yuki Shiimura, Hideko Ohgusu, Kenji Kangawa, Masayasu Kojima, Structure, regulation and function of ghrelin, J. Biochem.、査読有、121 巻、2012、119-128、DOI: 10.1093/jb/mvr134
- ② Takahiro Sato, Yoshiaki Nakashima, Yuki Nakamura, Takanori Ida, Masayasu Kojima, Continuous Antagonism of the Ghrelin Receptor Results in Early Induction of Salt-Sensitive Hypertension, J. Mol. Neurosci.、査読有、43 巻、2011、193-199、DOI: 10.1007/s12031-010-9414-1
- ③ Yoshiaki Nakashima, Takanori Ida, Takahiro Sato, Yuki Nakamura, Tomoko Takahashi, Kenji Mori, Mikiya Miyazato, Kenji Kangawa, Jingo Kusakawa, Masayasu Kojima, Neuromedin U is necessary for normal gastrointestinal motility and is regulated by serotonin, Ann. NY. Acad. Sci.、査読有、1200 巻、2010、104-111、DOI:10.1111/j.1749-6632.2010.05504.x
- ④ Takanori Ida, Mikiya Miyazato, Xing-Zi Lin, Hiroyuki Kaiya, Takahiro Sato, Keiko Nakahara, Noboru Murakami, Kenji Kangawa, Masayasu Kojima, Purification and characterization of caprine ghrelin and its effect on growth hormone release, J. Mol. Neurosci.、査読有、42 巻、2010、99-105、DOI: 10.1007/s12031-010-9379-0

[学会発表] (計6件)

- ① 佐藤貴弘、中村祐樹、椎村祐樹、児島将康、低エネルギー条件下におけるグレリン遺伝子欠損マウスの体温変動、第32回日本肥満学会、2011年9月23日、淡路夢舞台国際会議場
- ② 佐藤貴弘、中村祐樹、椎村祐樹、児島将康、制限給餌条件下におけるグレリン遺伝子

欠損マウスの体温変動、第29回内分泌代謝学サマーセミナー、2011年7月8日、東北大学医学部良陵会館

- ③ 中村祐樹、佐藤貴弘、椎村祐樹、児島将康、白色脂肪細胞におけるFABP3の役割の解明、第29回内分泌代謝学サマーセミナー、2011年7月8日、東北大学医学部良陵会館
- ④ 佐藤貴弘、中村祐樹、御船弘治、井田隆徳、寒川賢治、児島将康、グレリンの体温低下作用とそのメカニズムの解析、第28回内分泌代謝学サマーセミナー、2010年7月10日、ハウステンボス・ユトレヒト会議室
- ⑤ 佐藤貴弘、中村祐樹、井田隆徳、御船弘治、寒川賢治、児島将康、シンポジウム:エネルギー代謝研究の進歩「グレリン研究の進歩」、第28回内分泌代謝学サマーセミナー、2010年7月10日、ハウステンボス・ユトレヒト会議室
- ⑥ 佐藤貴弘、体温調節におけるグレリンの役割～メカニズムの解明を目指して、第16回成人病の病因・病態の解明に関する研究会、2010年7月4日、軽井沢プリンスホテル

[図書] (計1件)

- ① 佐藤貴弘、大楠英子、三浦芳樹、児島将康、最新医学社、病因・病態解明のためのグレリンの基礎知識、2011、1380-1390

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号: