

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金） 研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：37104
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659405
 研究課題名（和文）消化管幹細胞に作用する新しいペプチド・ホルモンの探索と腸管粘膜再生への応用
 研究課題名（英文）Search for novel peptide hormones, which act on gastrointestinal stem cells, and its role on the regeneration of gastrointestinal epithelium
 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（和文）：

LGR5 受容体は消化管幹細胞のマーカーであるが、その内因性リガンドはまだみつかっていない。本研究では LGR5 発現細胞のアッセイ系を確立し、脳や腸管組織のペプチド抽出サンプルを系統的にアッセイし、リガンドを探索した。脳組織で検出した陽性シグナルを単一のペプチドまで精製し、アミノ酸配列を解析したところ、このペプチドは CGRP（カルシトニン遺伝子関連ペプチド）であった。おそらく CHO 細胞に内因性に発現している CGRP 受容体に反応したものであると考えられた。LGR5、およびそのファミリー受容体の LGR4, 6 の内因性リガンドはまだ不明である。

研究成果の概要（英文）：

An orphan GPCR LGR5 receptor is a marker for gastrointestinal stem cells. However, the endogenous ligand for LGR5 has not been discovered. We established a cell line, which stably expressed LGR5, and used it for a systematic assay on brain and gastrointestinal tissue peptide extracts to search for the ligands. We detected a positive signal in the brain samples and purified it to a single peptide. By amino acid sequence analysis, we found that the purified peptide is CGRP, a neuropeptide. We thought that CGRP should have reacted to endogenous CGRP receptors on CHO cells. The real endogenous ligands for LGR5 and its relative receptors, LGR4 and LGR6, are still controversial.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：下部消化管学（小腸、大腸）、消化管幹細胞

1. 研究開始当初の背景

LGR (Leucine-rich-repeat containing G-protein coupled Receptor)ファミリーはロイシンリッチな繰り返し配列を細胞外ドメイ

ンに有するGPCR (G蛋白質共役型受容体)で、LGR1からLGR8までの8種類の受容体からなるファミリーである。LGR1~3はそれぞれ順番にLH (黄体化ホルモン), FSH (卵胞刺激ホルモ

ン)、TSH(甲状腺刺激ホルモン)の受容体で、LGR7と8は子宮筋弛緩作用をもつホルモンのリラキシン受容体であることが知られている。しかし、残りのLGR4, 5, 6の3種類については、相互にアミノ酸配列のホモロジーが高い受容体ファミリーを形成しているが、その内因性のリガンドについては全く不明である。

近年、LGR5は消化管や毛包の幹細胞のマーカーであり、さらにLGR5のノックアウト・マウスは、舌癒着症や腸管拡張などの発生・分化異常を示して新生児致死に至ることが報告された(Baker et al. Nature 449 (2007) & Gastroenterology 138 (2010)など参照)。このことは、LGR5とその内因性リガンドの系が、動物の消化管系の発生・分化に必要で、また腸管細胞の機能維持に重要な役割をもっていることを示唆している。

2. 研究の目的

本研究の期間内に、オーファン受容体LGR5の内因性リガンドを発見し、その構造、組織分布、分泌調節、生理作用などを解明する。LGR5が強く発現している胃や小腸の消化管および毛包の幹細胞について、発見した内因性リガンドの投与によって幹細胞の増殖・分化がどのように変化するかを調べる。

申請者はこれまでグレリンやニューロメジンU、ニューロメジンSなど、多くの微量生理活性ペプチドを組織から単離・精製してきた豊富な経験を持ち、アッセイ方法の構築や精製・構造決定法などに習熟している(Kojima et al. Nature 402 (1999), BBRC 276 (2000)など)。

生体内には内因性リガンドの不明なオーファン受容体がまだ数多く存在しており、リガンドと受容体の組み合わせが明らかでないため、その生理作用の研究はほとんど進んでいない。最近、この研究計画でリガンド探索のターゲットにするLGR5受容体が、消化管や毛包の幹細胞マーカーであることが明らかになったことから、その内因性リガンドは幹細胞に作用するユニークなペプチド・ホルモンであると考えられる。新しいホルモンの発見が大きな研究分野に発展することは、申請者らの発見した摂食亢進ホルモンの「グレリン」研究が一つの例となっている。

本研究によって消化管幹細胞に作用する新しいホルモンが発見されれば、消化管細胞の増殖・分化・再生研究だけでなく、消化管

の再生医療への応用などに新しい展開をもたらすものと期待される。

3. 研究の方法

この研究計画では、幹細胞マーカーとして消化管幹細胞に発現するオーファン受容体LGR5の内因性リガンドを探索し、このリガンドの幹細胞の分化・増殖作用への効果を調べる。

1. オーファン受容体 LGR5の安定発現細胞系の構築

リガンド探索のアッセイに用いるために、オーファン受容体 LGR5の安定発現細胞系を構築する。

PCRにて増幅したオーファン受容体 LGR5のcDNAを、発現ベクターに組み込み、培養細胞にトランスフェクトし、受容体の安定発現細胞株を得る。受容体の発現はノーザンブロットで確認する。発現効率のよいオーファン受容体安定発現株を選択することで、特異性の極めて高い、高感度なアッセイ系が得られる。この発現細胞株に組織抽出のペプチド・サンプルを添加し、セカンド・メッセンジャーの変化を測定するアッセイ系を構築する。LGR受容体ファミリーはGsとカップリングして、細胞内のcAMP濃度を増加させることが知られている。LGR5の発現細胞株を使って、細胞内あるいは培養液中のcAMP濃度をRIAあるいはELISAによって濃度変化を測定することでアッセイを行う。

2. オーファン受容体LGR5の内因性リガンドの探索(平成23~24年度に継続)

オーファン受容体LGR5の内因性リガンドが見つからない理由として、次のことが考えられる。

- ① リガンドの組織中の含量が極めて少ない。
- ② リガンドが存在する組織・臓器の検討が十分でない。
- ③ アッセイ系のシステムが最適なものでない。

①に関して申請者はこれまでグレリンやニューロメジン類などの微量生理活性ペプチドを探索してきた経験を有している。その経験から探索のための問題点をあげると、大量の組織からのペプチド画分の処理が難しいことと、精製時にペプチドの分解をいかに防止するか、ということが重要である。

この計画ではkg単位の大量の腸管組織を処理してアッセイサンプルを作成することを考えている。LGR5は消化管幹細胞のマーカであるので、その内因性リガンドも腸管に存在すると考えられる。そこで、まず腸管組織からリガンドを探索するkg単位のラット腸管組織を、酸・有機溶媒で抽出することで、ペプチド分解を防ぐことができ、さらに高分子量のタンパク質を除いてペプチド画分を効率的に得ることができる。初期の抽出画分は液量が多いので、イオン交換クロマトを使って、まずいくつかのフラクションに分画する。

それぞれのフラクションを上記で作成したアッセイ系でLGR5の刺激活性を測定して、次のステップに進む。特にHPLC（高速液体クロマトグラフィー、現有設備）は再現性よくサンプルを分画できるため、汎用する。

②に関して、LGR5受容体が存在する組織だけでなく、他の組織にも内因性リガンドが存在しないか検討する必要がある。申請者らが行ったグレリンの探索では、受容体が主として脳神経系に存在するにもかかわらず、思いがけないことにリガンドは胃から見つかった。このように受容体の分布組織に限らず、いくつかの組織からリガンド探索を進める必要がある。消化管組織以外に、脳、下垂体、膵臓、副腎などの組織からペプチド画分を抽出して、活性を検討する。

③に関して、構築したLGR5受容体発現細胞システムのチェックを十分する必要がある。LGR5受容体が細胞表面に十分発現しているかどうかを、細胞外ドメイン抗体で定期的にチェックする。またLGR5は受容体ファミリーの類似性から、セカンドメッセンジャーがcAMPであると推定されるが、必ずしもその保障はないので、他のセカンドメッセンジャー（例えば細胞内カルシウム濃度）や、GPCRに対するarrestin結合活性なども検討する。

以上の研究計画から、リガンド探索の問題点を克服でき、新規のペプチド・ホルモンの発見が可能であると考えられる。

3, LGR5受容体の内因性リガンドの構造解析と機能解明（平成24年度以降）

LGR5受容体の内因性リガンドを発見できれば、その構造解析と機能の解明を行う。遺伝子構造を明らかにして、新規のホルモンの発現調節について調べる。

LGR5受容体が消化管の幹細胞マーカであることや、受容体欠損マウスの解析から、この内因性リガンドは新規のペプチド・ホルモンとして消化管細胞の増殖・分化に関与していると考えられる。化学合成あるいは大腸菌や培養細胞で作らせた新規のペプチド・ホルモンの用いて、実験動物や培養幹細胞に投与する。実験動物においては腸管の細胞増殖の速度、腸管細胞の分化などについて調べる。培養幹細胞においては、投与するホルモン量に応じて細胞増殖・分化がどのように変化するか検討する。

4. 研究成果

生体内には、内因性リガンドが不明ないわゆるオーファン受容体が数多く存在する。この研究計画では、幹細胞マーカとして消化管幹細胞に発現するオーファン受容体LGR5の内因性リガンドを探索し、この内因性リガンドの腸管粘膜再生への効果を調べる。

H23年度にはLGR5受容体の安定発現細胞株を樹立し、最適なアッセイ条件の検討を行った。市販のヒト脳cDNAをテンプレートとして、LGR5受容体をPCRで増幅、プラスミドに組み込んで発現ベクターを構築した。CHO細胞にこのベクターをトランスフェクションし、G418耐性の安定発現株を得た。mRNAの発現レベルが最も多い細胞株を選んで、これをアッセイに用いた。アッセイ方法は細胞内cAMP濃度の上昇活性を指標とした。細胞内cAMP濃度は α スクリーン法を用いた。この方法は短時間で細胞内cAMP濃度の測定が可能で、感度も高かった。アッセイ条件を検討した結果、反応時間を4~5時間と長くすることで、バックグラウンドと陽性シグナルとの差がもっとも大きく、高感度でアッセイ可能なことを確かめた。

以上のアッセイ条件の検討に昨年度、時間を費やしたが、引き続き動物組織のペプチドサンプルを使ったアッセイを行った。まずLGR5の発現が消化管とともに多い脳組織のサンプルを保有していたので、脳のペプチド画分のスクリーニングを行った。その結果、

分子量約 3000 前後の部分に活性が認められ、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC の順に展開し、最終精製を行った。アミノ酸シーケンスの解析の結果、このペプチドは既知の CGRP (カルシトニン遺伝子関連ペプチド) であることが判明した。おそらく CHO 細胞株に内因性に発現している受容体に作用したものと考えられる。

平成24年度には構築したLGR5安定発現細胞株を用いたアッセイを継続した。これまでラットの脳ペプチド抽出画分からはCGRP (カルシトニン遺伝子関連ペプチド) しか陽性シグナルはなく、これはCHO細胞株に内因性に発現している受容体に作用したものと考えられた。今年度は脳以外の、消化管や下垂体組織のアッセイを行うとともに、LGR5にホモロジーの高いLGR4とLGR6の2つのオーファン受容体も同時にアッセイした。アッセイの指標としては、LGR4~6すべて細胞内cAMP濃度を測定することで行った。

その結果、組織のゲル濾過サンプルではいくつかの陽性シグナルらしきものが数フラクションに見られたが、これらは活性の強度や、そのあとのHPLCクロマトサンプルでのアッセイから、真の陽性シグナルではないと考えられた。LGR4とLGR6とのアッセイにおいても同じ結果で、明瞭な陽性シグナルは認められなかった。

そこでゲノムデータベースを用いたLGR5リガンド検索も行った。ショウジョウバエのLGR5ホモログの内因性リガンドが、バーシコンというヘテロダイマーのタンパク質であるが、このバーシコンにアミノ酸配列のホモロジーが高い、いくつかのほ乳類バーシコン類似タンパクをピックアップした。データベース検索で、ショウジョウバエのpatner of burs (pburs)のホモロジーの高い、Norrin, mucin部分ペプチド、vWF(フォンヴィーランド因子) ペプチドを見つけた。

今後、gremlinをはじめとする7種類のbursicon類似タンパクと、pburs類似タンパクとを、培養細胞あるいは大腸菌で発現させ、ダイマーを形成するか、あるいはLGR4~6を活性化するかを調べる計画である。

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5件)

1, Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Sano H, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Shiotani H, Terajima S, Nakamura Y, Mori K, Yoshida M, Kato J, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Kojima M. Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:177. doi: 10.3389/fendo.2012.00177. (査読有)

2, Mori M, Mori K, Ida T, Sato T, Kojima M, Miyazato M, Kangawa K. Different distribution of neuromedin S and its mRNA in the rat brain: NMS peptide is present not only in the hypothalamus as the mRNA, but also in the brainstem. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:152. doi: 10.3389/fendo.2012.00152. (査読有)

3, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Purification of rat and human ghrelin. *Methods Enzymol*. 2012;514:45-61. doi: 10.1016/B978-0-12-381272-8.00003-9.

4, Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Kume K, Yoshizawa-Kumagaye K, Nishio H, Kato J, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Kojima M. Identification of the endogenous cysteine-rich peptide trissin, a ligand for an orphan G protein-coupled receptor in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Oct 14;414(1):44-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.018. (査読有)

5, Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Maeda T, Shiotani H, Terajima S, Sano H, Mori K, Yoshida M, Miyazato M, Kato J, Murakami N, Kangawa K, Kojima M. Identification of the novel bioactive peptides dRYamide-1 and dRYamide-2, ligands for a neuropeptide Y-like receptor in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 15;410(4):872-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.081. (査読有)

(総件数) 20件

[学会発表] (計7件)

1, 児島将康、特別講演「Ghrelin: drom discovery of its physiological functions」、The annual meeting of Korean Society of the Study of Obesity (KSSO) 韓国肥満学会年会、2013年4月20日、韓国ソウル市

2, 児島将康、特別講演「食欲亢進ホルモン“グレリン”の生理作用と疾患との関連：自律神経の恒常性維持への役割」、第133回東京練馬区医師会学術部消化器懇話会、2013年4月15日、東京

3, 児島将康、「消化管ホルモン“グレリン”の生合成・分泌と自律神経の恒常性維持への役割」、第43回日本小児消化管機能研究会、2013年2月9日、久留米大学

4, 児島将康、特別講演「摂食亢進ペプチド“グレリン”の比較内分泌学ならびに生理作用」、第37回日本比較内分泌学会大会、2012年11月30日、福井大学

5, 児島将康、「グレリンの生合成・分泌と自律神経の恒常性維持への役割」、生体機能と創薬シンポジウム2012、2012年8月31日、神戸学院大学

6, 児島将康、「消化管ホルモン“グレリン”の生合成・分泌と自律神経の恒常性維持への役割」、第39回日本小児栄養消化器肝臓学会、2012年7月15日、大阪市・梅田スカイタワー会議室

7, 児島将康、「グレリンの生合成・分泌と体温調節への役割」、第30回内分泌代謝学サマーセミナー、2012年7月13日、群馬県・伊香保温泉

〔図書〕(計1件)

Methods in Enzymology Vol. 514 Ghrelin, Academic Press, 2012年発行(編集者：児島将康、寒川賢治)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：ショウジョウバエ由来生理活性ペプチド dRYamide

発明者：児島将康、他

権利者：久留米大学、宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2011-085684、特願 2012-070356

出願年月日：平成 23 年 4 月 7 日、平成 24 年 3 月 26 日

国内外の別：国内

○取得状況(計1件)

名称：グレリンの生理学的機能の調節剤

発明者：児島将康、他

権利者：久留米大学、サントリー、他

種類：特許

番号：第 5144929 号

取得年月日：平成 24 年 11 月 30 日

国内外の別：国内、オーストラリア

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

