

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461331

研究課題名(和文)肥満治療を目指したグレリン活性制御法の探索

研究課題名(英文)Finding the way to control ghrelin activity for the obesity cure

研究代表者

岩倉 浩(Hiroshi, Iwakura)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20378615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に樹立したグレリン分泌細胞株MGN3-1細胞を研究ツールとして、次世代シーケンサーを用いてグレリン細胞で高発現する分子を同定。特に、高発現GPCRに注目し、既報に加えて、プロスタグランジンE2がEP4受容体を介して、またトリプトファンがGPR142を介してグレリン分泌を刺激することを明らかにした。GPCR以外では、IL-1はNF- κ B経路を介して、グレリン発現を抑制することを明らかにした。また、グレリン細胞株では、長鎖脂肪酸の取込み能が高く、このことがグレリンの効率的なアシル化に有用であり、少なくとも、Acs11の高発現が一部重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We determined the comprehensive mRNA expression profiles in the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 cells. By examining the ligands for the highly expressed GPCR, we found that prostaglandin E2 and tryptophan stimulated ghrelin secretion via EP4 receptor and GPR142, respectively. Except for GPCR, we found that IL-1 β significantly suppressed ghrelin mRNA expression in MGN3-1 cells, at least partly through NF- κ B pathway. We found that ghrelin-producing cells highly incorporated long-chain fatty acids. The high incorporation of long-chain fatty acids to the cells, which was provided by high levels of Acs11, contributed to the efficient acylation of ghrelin.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：グレリン GPCR IL-1

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、主に胃から産生される摂食亢進ホルモンであり、肥満発症、糖代謝悪化との関連が報告されており、それまでも、肥満治療を目指したグレリン受容体拮抗薬、グレリンに対する抗体療法 (Zorrilla ら、*Proc Natl Acad Sci USA*. 2006)、グレリンアシル化酵素阻害薬等 (Barnett ら、*Science* 2011) の開発が行われてきたが、臨床応用されるには至っていなかった。

2. 研究の目的

我々が独自に樹立したグレリン分泌細胞株を研究ツールとして、グレリン合成、特にグレリンの活性化に必須の脂肪酸修飾機構の詳細、既知化合物を用いた分泌調節シグナルの解析を行うことで、グレリン活性制御のための新たな分子標的の探索を目的とする。現在、肥満に対する有効な治療薬はほとんど存在しないのが実情であり、グレリン系抑制を介した肥満治療薬は、肥満症対策への重要な手段となることが期待される。

3. 研究の方法

我々が独自に開発したグレリン分泌細胞株 MGN3-1 細胞を研究ツールとし、次世代シーケンサーを用いた RNAseq による遺伝子発現の網羅的把握による高発現 GPCR の同定、そのリガンド作用の検討、Ca、cAMP、サイトカインシグナルについて細胞内シグナルのグレリン分泌へ与える影響の検討、グレリン脂肪酸修飾機構の解析 (グレリン細胞内脂肪酸動態、脂肪酸基質の供給経路の解析) 等を行った。また、遺伝子改変マウスを用いてグレリン細胞を蛍光ラベルし、FACS によって単離することで遺伝子発現の解析をおこなった。

4. 研究成果

グレリン分泌調節シグナルに関しては、Screen を用いた細胞内 cAMP 評価系及び fura4 を用いた細胞内 Ca 濃度評価系をもちいて、MGN3-1 細胞に高発現する G 蛋白共役型受容体 (GPCR) についての評価を行った。MGN3-1 細胞に発現する GPCR 発現レベルを RNA シークエンスによって網羅的に同定し、高発現受容体のうちリガンド入手可能なものについての検討したところ、既知の受容体に加えて、プロスタグランジン E2 が EP4 受容体を介して、また、トリプトファンが GPR142 を介してグレリン分泌を有意に刺激することを新たに見いだした。

グレリン細胞単離に関しては、グレリンプロモーター CreERT2 マウスを新たに開発し、Cre レポーターマウスと交配することでグレリン細胞を蛍光ラベルし、FACS で単離することに成功した。単離したグレリン細胞で、RNA シークエンス、定量 PCR を実施し、MGN3-1 細胞で高発現していた受容体が、単離グレリン細胞にも発現していることを確認した。異常

の内容を GPCR のグレリン分泌調節に関わる役割として、論文発表した (Koyama et al. *Endocrinology* 2016)。

GPR142 を介したグレリン分泌調節については、*in vivo* での解析をおこなった。GPR142 は、既報にもあるとおり、膵臓にも高発現していたが、それ以外に、胃においても高発現が確認出来た。トリプトファン負荷後のグレリン濃度の検討を行ったが、有意な血中グレリン濃度の変化は確認出来なかった。最近の報告では、GPR142 を介してインスリン分泌が刺激されると報告されており、*in vivo* ではインスリンによるグレリン分泌抑制のため差が見いだせなかった可能性も考えられたが、条件設定の問題の可能性もあると思われる。

GPCR 以外の受容体シグナルに関しては、特にサイトカイン受容体を介したシグナルに注目し、解析をおこなった。LPS をラットへ投与すると血中グレリン濃度が抑制されることが報告されていたため、LPS およびその下流のサイトカイン、IL-1、TNF、IL-6 がグレリン mRNA 発現に与える影響を検討した。IL-1 は MGN3-1 細胞におけるグレリン mRNA 発現を有意に抑制した。また程度は軽いものの、TNF にてもグレリン mRNA が抑制されることが確認された。IL-1 を添加すると、IL-1 受容体の主要シグナルである、NF B、ERK、JNK、p38MAPK の経路が活性化された。さらに、ERK、JNK、p38MAPK の阻害剤を IL-1 と同時に添加しても、グレリン mRNA の抑制に変化はなかったが、IKKB を siRNA でノックダウンすると、IL-1 によるグレリン mRNA 抑制の程度が減弱し、IL-1 を介したグレリン mRNA 抑制の少なくとも一部は、NF B 経路を介したものと考えられた。以上、サイトカインによるグレリン発現調節について論文発表した (Bando et al. *Mol Cell Endo.* 2017)。

グレリン脂肪酸修飾機構の検討に関しては、蛍光ラベルの脂肪酸を用いて、グレリン分泌細胞株 MGN3-1 細胞への長鎖脂肪酸取込みが、MIN6 細胞と比較して高値であることを見いだしていた。DNA マイクロアレイによって、両者の細胞での遺伝子発現比較を網羅的に行うことで、脂肪酸代謝に関わる遺伝子、long-chain fatty acyl-CoA synthetase family member 1 (Acs11) が MGN3-1 細胞で高発現しており、このことが MGN3-1 細胞の高脂肪酸取込み能と、アシル化グレリンの効率的な産生に少なくとも一部関与していることを見いだした。以上、グレリン細胞においては、Acs11 が高発現することによる長鎖脂肪酸の取込み能の高さが、効率的なグレリンのアシル化修飾に関わることを論文報告した (Bando et al. *Febbs Lett.* 2016)。

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 10 件)

1. Bando M, Iwakura H, Ueda Y, Ariyasu H, Inaba H, Furukawa Y, Furuta H, Nishi M, Akamizu T. IL-1 β directly suppress ghrelin mRNA expression in ghrelin-producing cells. *Mol Cell Endocrinol*. 査読有、2017 May 15;447:45-51. doi: 10.1016/j.mce.2017.02.032.
2. Nakato J, Aoki H, Iwakura H, Suzuki H, Kanamoto R, Ohinata K. Soy-ghrelin, a novel ghrelin-releasing peptide derived from soy protein. *FEBS Lett*. 査読有 2016 Aug;590(16):2681-9. doi: 10.1002/1873-3468.12306.
3. Bando M, Iwakura H, Koyama H, Hosoda H, Shigematsu Y, Ariyasu H, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K. High Incorporation of Long-Chain Fatty Acids Contributes to the Efficient Production of Acylated Ghrelin in Ghrelin-producing Cells. *FEBS Lett*. 査読有、2016 Apr;590(7):992-1001. doi: 10.1002/1873-3468.12132.
4. Iwakura H, Dote K, Bando M, Koyama H, Hosoda K, Kangawa K, Nakao K Establishment of Leptin-Responsive Cell Lines from Adult Mouse Hypothalamus. *PLoS One*. 査読有、2016 Feb 5;11(2):e0148639. doi: 10.1371/journal.pone.0148639. eCollection 2016.
5. Koyama H, Iwakura H, Dote K, Bando M, Hosoda H, Ariyasu H, Kusakabe T, Son C, Hosoda K, Akamizu T, Kangawa K, Nakao K. Comprehensive Profiling of GPCR Expression in Ghrelin-producing Cells. *Endocrinology*. 査読有 2016 Feb;157(2):692-704. doi: 10.1210/en.2015-1784.
6. Iwakura H, Kangawa K, Nakao K. The regulation of circulating ghrelin - with recent updates from cell-based assays [Review]. *Endocr J*. 査読有、2015 Feb 27;62(2):107-22. doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0419.
7. Mohan H, Ramesh N, Mortazavi S, Le A, Iwakura H, Unniappan S. Nutrients Differentially Regulate Nucleobindin-2/Nesfatin-1 In Vitro in Cultured Stomach Ghrelinoma (MGN3-1) Cells and In Vivo in Male Mice. *PLoS One*. 査読有、2014 Dec 15;9(12):e115102. doi: 10.1371/journal.pone.0115102. eCollection 2014.
8. Ariyasu H, Yamada G, Iwakura H, Matsumura S, Inoue K, Kangawa K, Nakao K, Akamizu T. Reduction in circulating ghrelin concentration after maturation does not affect food intake. *Endocr J*. 査読有、2014;61(10):1041-52. Doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0255
9. Ariyasu H, Iwakura H, Yukawa N, Murayama T, Yokode M, Tada H, Yoshimura K, Teramukai S, Ito T, Shimizu A, Yonezawa A, Kangawa K, Mimori T, Akamizu T. Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Endocr J*. 査読有、2014;61(7):735-42. Doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0088
10. Kawano K, Hattori Y, Iwakura H, Akamizu T, Maitani Y. Combination therapy with gefitinib and doxorubicin inhibits tumor growth in transgenic mice with adrenal neuroblastoma. *Cancer Med*. 査読有 2013 Jun;2(3):286-95. doi: 10.1002/cam4.76. Doi: 10.1507/endocrj.EJ14-0255

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 岩倉 浩、坂東美佳、小山博之、細田洋司、有安宏之、寒川賢治、中尾一和、赤水尚史 細胞系樹立によるグレリン生合成、分泌調節機構の検討 第 20 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2016 年 12 月 16 日～17 日、東京コンベンションホール
2. 岩倉 浩 摂食促進因子グレリンの産生と機能の研究 第 37 回日本肥満学会総会、2016 年 10 月 8 日、東京ファッションタウン
3. 小山 博之、岩倉 浩、坂東 美佳、田中智洋、今枝 憲郎、寒川 賢治、中尾 一和 グレリン分泌細胞の網羅的 GPCR 発現解析による新規グレリン分泌調節因子の探索 第 37 回日本肥満学会総会、2016 年 10 月 8 日、東京ファッションタウン
4. 坂東 美佳、岩倉 浩、上田 陽子、赤水尚史 炎症性サイトカインのグレリン遺伝子発現への影響の検討 第 37 回日本肥満学会総会、2016 年 10 月 8 日、東京ファッションタウン
5. 小山 博之、岩倉 浩、坂東 美佳、細田洋司、細田 公則、寒川 賢治、中尾 一和 GPCR 発現プロファイル解析に基づく摂食促進ホルモン、グレリン分泌調節機構の解明 第 36 回日本肥満学会総会、2015 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場
6. 坂東 美佳、岩倉 浩、小山 博之、寒川賢治、中尾 一和 グレリン産生における LPS の直接作用の検討 第 36 回日本肥満学会総会、2015 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場
7. 坂東 美佳、岩倉 浩、小山 博之、赤水尚史、寒川 賢治、中尾 一和 グレリン細胞における脂肪酸輸送・代謝の検 第 35 回日本肥満学会総会、2014 年 10

月 24 日、シーガイアコンベンションセンター

8. Hiroshi Iwakura. Cell-line based analysis of ghrelin production and secretion. The Conference on Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014. 2014 September 10-12, Hotel Granvia Kyoto

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
岩倉 浩 (IWAKURA, Hiroshi)
和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20378615