

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

新規ホルモン；グレリンの生理的意義と老化における役割の解明

平成12年度 総括・分担研究報告書

平成13（2001）年3月

主任研究者 寒川賢治
国立循環器病センター研究所
生化学部 部長

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

新規ホルモン；グレリンの生理的意義と老化における役割の解明

平成12年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告

- 新規ホルモン；グレリンの生理的意義と老化における役割の解明に関する研究----- 1
寒川賢治（国立循環器病センター研究所生化学部 部長）

II. 分担研究報告

1. グレリンの遺伝子解析、分泌調節解析と心血管系における意義----- 5
寒川賢治（国立循環器病センター研究所生化学部 部長）
2. 生活習慣病および老化におけるグレリンの臨床的意義と診断治療への応用----- 9
中尾一和（京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学第二内科 教授）
3. 肝細胞株、HepG2、およびH4-II-E 細胞におけるグレリンのインスリン様作用、
および抗インスリン様作用に関する研究----- 14
千原和夫（神戸大学医学部第3内科 教授）
4. 視床下部 growth hormone secretagogue(GHS)受容体の機能に関する研究；GHS 受容体の
発現を抑制したトランスジェニックラットを用いて----- 20
芝崎 保（日本医科大学第二生理 教授）
5. 卵巣機能におけるグレリンの意義に関する研究----- 25
宮本 薫（福井医科大学生化学第2講座 教授）
6. グレリンの下垂体および甲状腺機能調節における意義----- 29
山下俊一（長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設分子医療部門 教授）
7. 加齢モデル動物およびヒトにおけるグレリンの生理的意義----- 32
島津 章（国立京都病院臨床研究部 部長）
8. グレリンの中樞作用と摂食調節機序の解析に関する研究----- 34
中里雅光（宮崎医科大学第三内科 講師）

新規ホルモン；グレリンの生理的意義と老化における役割の解明に関する研究

主任研究者 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

新規成長ホルモン分泌促進ペプチド；グレリンについて、新たな生体機能調節機序および老化における役割を検討した。グレリンは活性型および不活性型の 2 種類の内在性分子型で存在すること、強力な GH 分泌促進作用以外にも循環調節、糖質代謝、脂質代謝などに深く関与すること、中枢性の強力な摂食促進作用を有しエネルギー代謝に重要な役割を担っていることが明らかになった。また、老化モデル動物を用いて、老化における役割や GH 分泌との関連などについて検討した。

【研究組織】

- 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 生化学部長）
- 中尾一和（京都大学大学院医学研究科 臨床病態医科学第二内科教授）
- 千原和夫（神戸大学医学部第三内科教授）
- 芝崎 保（日本医科大学第二生理学教授）
- 宮本 薫（福井医科大学 生化学第二講座教授）
- 山下俊一（長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設分子医療部門教授）
- 島津 章（国立京都病院臨床研究部部長）
- 中里雅光（宮崎医科大学第三内科講師）

A. 研究目的

成長ホルモン（GH）は下垂体から分泌され、成長や代謝調節、また老化の進展などに深く関与するホルモンである。GH 分泌は思春期をピークとして、以後老化の過程で減退する。この GH 分泌低下はヒトにおいて、筋肉、骨量の低下、内臓脂肪蓄積型肥満、脂肪肝などをもたらし、高齢者の生活の質（QOL）を悪化させる。GH の分泌調節に関与する内在性因子の存在は約 20 年前より示唆されていたが、その実態は

これまで不明であった。

最近、代表研究者らはラット胃組織から、新規成長ホルモン分泌促進ペプチド；グレリン（ghrelin）を発見・構造決定した。グレリンは 28 個のアミノ酸よりなり、3 番目のセリンが脂肪酸で修飾されており、この修飾が活性発現に必須であるという特異な構造を有する。グレリンは強力な GH 分泌促進活性をもつ新規ペプチドホルモンであるが、GH 分泌のほかに全身の栄養、代謝や循環器系に対して GH を介さない直接作用も有する。このように、グレリンの発見により、新しい生体調節機序や老化を解明する上で大きな手がかりを得たと言える。

本研究では、グレリンの生体機能調節および老化における役割を、基礎および臨床研究の両面より解明すると共に、最終目標として臨床応用をも目指したい。

B. 研究方法

本年度は、グレリンの新しい生体調節機序や老化制御の解明に向けて、以下のように広範な検討を行った。

- 1) グレリンの高感度測定系の開発と内在性分子型、
- 2) ヒト下垂体機能低下症における血中グ

レリン濃度、3) 老化におけるグレリンと GH 分泌障害機序の関係、4) グレリン受容体 (GHS-R) の生理的役割、5) グレリンの肝細胞株におけるインスリン作用に及ぼす影響、6) 卵巣機能におけるグレリンの役割、7) グレリンの神経内分泌作用およびエネルギー代謝作用の検索、8) 中枢性グレリンの摂食とエネルギー代謝調節機序の解析

(倫理面への配慮)

本研究においてヒトを対象とした研究を行うに際しては、各研究施設で定められた臨床研究の規定に従って実施した。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養および保管に関する基準、各研究施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して実施した。

C. 研究結果、および D. 考察

1) グレリンの高感度測定系の開発と生理的意義の検討

グレリンの生理的意義を明らかにするためには、その生体内分布、産生・分泌調節、血中濃度の測定などが必須である。寒川はグレリンに特異的な 2 種類の抗体を作製し、C-RIA (C 末端抗体: 全グレリン分子を認識)、および N-RIA (N 末端抗体: アシル化された活性型のグレリンのみを認識) の高感度ラジオイムノアッセイ (RIA) 系を確立した。ラットの生体内分布を検討した結果、グレリンは胃に最も高濃度で存在するが、十二指腸、空腸、回腸などの腸管にも低濃度ではあるが存在した。脳内は極めて低濃度であった。さらに内在性分子型を検討した結果、グレリンはアシル化された活性型およびアシル化されていない不活性型の 2 種類の分子型で存在することが明らかになった。

グレリンは胃から分泌されて下垂体に働き GH 分泌調節に働くことが、ラットにおいて明らかになっていたが、ヒトにおける作用は明らか

でなかった。共同研究者の永谷は健常人ボランティア 6 人を対象に、グレリン (10 μ g/kg) を経静脈的に投与し、血行動態、各種ホルモンを経時的に測定した。血清 GH 濃度は投与後 20 分で前値の 15 倍まで上昇し、1 時間以上有意な増加を認めた。プロラクチン、ACTH、コルチゾールは有意に増加したが、IGF-1、FSH、LH、TSH の増加は認められなかった。一方、グレリンは循環器系にも作用し、心拍数を変えずに平均動脈圧を有意に低下 (-12 mmHg)、心拍出量、一回駆出量の有意な増加、末梢血管抵抗の有意な低下が認められた。以上の結果からグレリンは健常人に対して、強力で持続する GH 分泌作用を有しているのみでなく、心後負荷の軽減、心拍出量の増大作用を介して、心血行動態に有利に働く可能性が示唆された。

2) ヒト下垂体機能低下症および老化モデル動物における血中グレリン濃度の検討

山下は、ヒト下垂体機能低下症 (GH 単独欠損、複合型) における血中グレリン濃度の検討を行った。その結果、C-RIA では半数の症例でグレリンの上昇が見られ、グレリンのネガティブ・フィードバックが起こったものと考えられた。今後、症例の臨床的特徴や遺伝子学的特徴とグレリン濃度の関連を調べる必要があると考えられる。さらに、老化研究モデル動物において血漿グレリン濃度の変化を検討した。その結果、グレリン血漿濃度は加齢によって変化しなかったのに対して、GH 抑制によって増加した。食餌制限によってもグレリン濃度は増加したが、GH 抑制が強いモデル動物において顕著であった。

3) 老化におけるグレリンと GH 分泌障害機序についての検討

老化は機能的な GH 分泌不全状態であると考えられる。島津は、グレリンと GH 分泌障害機序の関係を明らかにするため、12 週齢と 48 週齢の Wister 系雄性ラットを用いて、無麻酔無拘

東下で GHRH、グレリン、合成 GH 分泌刺激ペプチド (KP-102) を頸静脈内に投与し、その GH 分泌促進作用を比較検討した。若齢ラットではいずれのペプチドも用量依存的な GH 分泌促進作用を示し、その力価はグレリン=KP-102>GHRH の順であった。一方、高齢ラットにおいて GHRH の GH 分泌促進作用には個体差がみられ反応量も減弱したが、グレリンおよび KP-102 に対する GH 分泌促進作用は比較的よく保たれた。グレリンによる GH 分泌促進作用は、GHRH とは異なり老化にともなう影響を受けにくいと考えられた。

4) グレリン受容体 (GHS-R) の生理的役割の検討

芝崎はグレリン受容体である Growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) の生理的役割を明かにするために、tyrosine hydroxylase 遺伝子のプロモーターの下流に GHS-R 遺伝子のアンチセンスを挿入した遺伝子を導入してトランスジェニックラットを作成した。このラットでは視床下部弓状核での GHS-R 遺伝子のアンチセンス mRNA が認められ、GHS-R 量は有意に減少し、対照ラットと比べ生下時より低体重、低脂肪組織量、摂食量の減少、雌での GH 分泌の抑制が認められた。これらの結果より GHS-R は GH 分泌、摂食行動、脂肪組織量の調節機序において重要な役割を担っていると考えられる。

5) グレリンの肝細胞株におけるインスリン作用に及ぼす影響の検討

グレリンは胃で大量に産生されるので、GH 分泌促進作用以外に消化器系で種々の作用を有する可能性がある。今回、千原は肝細胞株におけるグレリンのインスリン作用に及ぼす影響について、RT-PCR、免疫沈降、ウェスタンブロット、ノザンブロット法で検討した。ヒト、およびラット肝癌由来の HepG2 細胞、H4-II-E 細胞に GHS 受容体 mRNA が存在した。グレリン

は、HepG2、および H4-II-E 細胞において、IRS-1-GRB2-MAPK 系を活性化し細胞増殖をひき起こすインスリン様作用と、Akt 活性の低下、PEPCK mRNA 量の増加をひき起こす抗インスリン様作用を示した。グレリンは糖質代謝に影響する可能性が示唆された。

6) 卵巣機能におけるグレリンの役割の検討

宮本は、卵巣機能におけるグレリンの役割を明らかにするための基礎研究として、ラット卵巣顆粒膜細胞を用いた初代培養系で、サブトラクショナルクロニングを行なった。その結果、卵胞発育に重要な遺伝子群を多数クローニングし、DNA マイクロアレイを作成した。また、卵巣顆粒膜細胞にグレリン受容体が発現していることを明らかにするとともに、卵巣顆粒膜細胞におけるグレリンの直接あるいは間接作用を、NGFI-A および IGF-I などに焦点をあわせ解析した。

7) 神経内分泌作用およびエネルギー代謝作用の検索

生活習慣病や老化におけるグレリンの臨床的意義および臨床応用を探る目的で、中尾はグレリンの神経内分泌作用およびエネルギー代謝作用を検索し、さらに、グレリンの体内分布を広く検索した。グレリンはヒトにおいて強力な成長ホルモン分泌作用を有していたが、軽微な ACTH およびプロラクチン(PRL)分泌刺激作用も有していた。また、グレリンはラットにおいて摂食亢進作用を有し、その作用はニューロペプチド Y/Y1 受容体の経路を介しており、レプチンの作用と拮抗した。さらに、グレリンの発現はげっ歯類の腎においても認められ、受容体と共存していることが明らかとなった。以上のことは、グレリンがきわめてユニークで重要な臨床的意義を有することを示唆するものである。

8) 中枢性グレリンの摂食とエネルギー代謝調節作用の解析

中里は、中枢性グレリンの摂食作用とエネルギー

ギー代謝調節作用について検討した。グレリンをラット脳室内へ単回と慢性投与し、摂食を解析した。一方、グレリン受容体のアンタゴニスト、中和抗体やレプチンを併用投与し、グレリンの作用機構を解析するとともに、グレリンを脳内投与し、NPYの生合成を *in situ hybridization* で定量した。これらの検討の結果、グレリンは 10 pmol から容量依存性に摂食量を増加させ、強力な摂食促進ペプチドであること、また、グレリンの摂食亢進作用は GHS-R 拮抗物質と抗グレリン IgG により抑制され、内在性グレリンも摂食調節に関与することが明らかになった。グレリンは、慢性脳室内投与によっても摂食量と体重を有意に増加させた。一方、GH 欠損ラットへのグレリン投与でも摂食量の増加が認められたことから、グレリンの摂食亢進作用は、GH 分泌を介さないことが明らかになった。また、グレリンは NPY の mRNA 発現と NPY ニューロンの *c-fos* 遺伝子発現を増加させたことから、NPY 系を介して摂食を亢進させることが明らかになった。さらに、グレリンとの併用投与によりレプチン作用は抑制されることから、両者が NPY 系の調節において拮抗関係にあることを示した。以上のように、グレリンによる新たな中枢性摂食調節機構とその分子機序が明らかになった。

E. 結論

グレリンは内在性分子型として、アシル化された活性型およびアシル化されていない不活性型の 2 種類の分子型で存在すること、ヒトにおいても、強力な GH 分泌作用を有することが明らかになった。また、グレリンは循環調節、糖質代謝、摂食調節に関与することが明らかになり、特に中枢性摂食調節については、その分子機序が明らかになった。

病態との関連については、ヒト下垂体機能低下症 (GH 単独欠損、複合型) において、血中

グレリン濃度の上昇が認められた。

老化との関連では、血中グレリン濃度は加齢によって変化しないが、GH 抑制や食餌制限によって増加し、GH 抑制が強いモデル動物において顕著であることが明らかになり、また、グレリンによる GH 分泌促進作用は GHRH とは異なり、老化にともなう影響を受けにくいと考えられた。

グレリン受容体である GHS-R は GH 分泌、摂食行動、脂肪組織量の調節機序において重要な役割を担っていると考えられた。

グレリンは中枢において GH 分泌に関与するのみならず、強力な摂食亢進作用を有し、その作用はニューロペプチド Y/Y1 受容体の経路を介しており、レプチンの作用と拮抗することが示され、グレリンによる新たな中枢性摂食調節機構とその分子機序が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

グレリンの遺伝子解析、分泌調節解析と心血管系における意義

主任研究者 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

グレリンの高感度 RIA 系を開発し、ラット組織濃度を検討した結果、グレリンは胃に最も高濃度で存在したが、視床下部は極めて低濃度であった。また、グレリンは組織中でアシル化された活性型及びアシル化されていない不活性型の 2 種類の分子型で存在することが明らかになった。グレリンは健常人に対して、強力で持続する GH 分泌作用を有しているのみでなく、心拍数を変化させず持続性の血圧低下作用を有し、心拍出量の増大作用を介して、心行動態に有利に働く可能性が示唆された。

A. 研究目的

成長ホルモン（GH）は下垂体から分泌され、成長や代謝調節、また老化の進展などに深く関与するホルモンである。GH 分泌低下はヒトにおいて、筋肉・骨量の低下、内臓脂肪蓄積型肥満、脂肪肝などをもたらし、高齢者の QOL を悪化させる。グレリンは申請者らが発見した新規 GH 分泌促進ペプチドであり、GH 分泌以外にも摂食、代謝、循環器系などにおいて多様な生体機能の調節に関与することが示唆されている。本研究では、グレリンの発現、分泌調節機序及び生理作用を明らかにすることにより、主に循環器系における新しい機能および病態生理的意義の解明を図り、臨床応用へ繋げたい。

本年度は、グレリンに特異的な RIA 系を開発し、これを用いてラットの各組織及び血中のグレリン濃度と分子型の検討を行った。また、グレリンの生理作用に関してはラットにおいて既に検討を行っているが、ヒトへの作用は明らかでない。そこで、健常人を対象に経静脈的グレリン投与の下垂体ホルモンの分泌と共に、心行動態へ与える影響を検討した。

B. 研究方法

1) グレリンの高感度ラジオイムノアッセイ(RIA)系の確立と内在性分子型の検討

[Cys12]-ラット・グレリン[1-11]及び[Cys0]-ラット・グレリン[13-28]をそれぞれヘモシアニン(mcKLH)と conjugate し、ウサギに免疫して特異的なポリクローナル抗体を作製した。上記抗体を用いて、アドレノメデュリンの場合と同様な方法で、高感度のラジオイムノアッセイ (RIA) 系を確立した。ラットの各組織を抽出後、直ちに煮沸 (100℃、7 分間)、1M 酢酸で抽出したのち凍結乾燥した。ラット胃及び十二指腸抽出物を逆相 HPLC (C18 カラム) で分離後、グレリンの 2 種類の RIA を用いて免疫活性を測定した。また、グレリン受容体 (GHS-R) を安定発現させた CHO 細胞を用いて、各フラクションの細胞内 Ca イオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の増加活性を測定した。

2) グレリンの健常人における生理作用の検討

成人男子の健常人ボランティア 6 人 (年齢: 30 ± 1 歳、体重: 68 ± 5 kg) を対象とした。全例とも明らかな心肺腎疾患、内分泌代謝疾患の既往はなく、治療薬の投与は受けていなかった。

なお本研究は国立循環器病センター倫理委員会で承認されており、被検者からは文書による承諾を得た。血行動態評価は、肺動脈内に 7.5 Fr の S-G カテーテルを留置し、肺動脈圧、肺動脈楔入圧、心拍出量を測定した。また動脈圧の測定、採血のために 22G の末梢動脈カニュラを留置した。安静 60 分後にグレリン (10 μ g/kg) またはプラセボ (0.9 生理食塩水) 5ml を経静脈的にボラス投与し、血行動態、各種ホルモンを経時的に測定した。

(倫理面への配慮)

本研究においてヒトを対象とした研究を行うに際しては、当施設で定められた臨床研究の規定に従って行った。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して行った。

C. 研究結果

1) グレリンの高感度ラジオイムノアッセイ(RIA)

系の確立と内在性分子型の検討

グレリンは 28 個のアミノ酸からなるペプチドであり、3 番目の Ser 残基が脂肪酸 (n-オクタン酸) でアシル化修飾されており、この修飾が活性発現に必須であるという極めてユニークな構造を有する。グレリンの生理的意義を明らかにするためには、その生体内分布、産生・分泌調節、血中濃度の測定などが必須である。そこで本年度は、グレリンの部分ペプチドを抗原として、グレリンに特異的な 2 種類の抗体 (C 末端抗体: 全グレリン分子を認識 (C-RIA)、N 末端抗体: アシル化された活性型のグレリンのみを認識 (N-RIA)) を作製し、高感度 RIA 系を確立した。なお本 RIA は、ヒトグレリンについても 100% 認識する。今回、ラットの生体内分布を C-RIA で検討した結果、グレリンは胃 (1779.8 fmol/mg 湿重量) に最も高濃度で存在するが、十二指腸 (106.7 fmol/mg 湿重量)、

空腸 (60.2 fmol/mg 湿重量)、回腸 (20.5 fmol/mg 湿重量) などの腸管にも低濃度ではあるが存在した。脳内の視床下部は極めて低濃度であった (1.8 fmol/mg 湿重量)。さらに、逆相 HPHC と RIA 及び $[Ca^{2+}]_i$ 増加活性を組み合わせ分析により、胃及び十二指腸について組織中の内在性分子型を検討した。その結果、グレリンはアシル化された活性型及びアシル化されていない不活性型の 2 種類の分子型で存在し、その比は約 1:2~1:3 程度であることが明らかになった。また、正常ラット (SD ラット、オス、6 週令) 血漿中のグレリン濃度を C-RIA で測定した結果、219.6 fmol/ml と血漿中のペプチドホルモンとしてはかなり高値であることが明らかになった。

2) グレリンの健常人における生理作用の検討

グレリン投与中に 4 人が全身の温感と眠気を訴えたが、明らかな副作用は認めなかった。経静脈的グレリン投与 1 分で血漿グレリン濃度は前値の 61 倍まで上昇し、半減期 10 分で減衰した。血清 GH 濃度は投与後 20 分で最高値 (前値の 15 倍) まで上昇し、1 時間以上有意な増加を認めた。その他、グレリン投与によってプロラクチン (PRL)、ACTH、コルチゾールは有意に増加したが、IGF-1、FSH、LH、TSH の有意な増加は認められなかった。グレリンにより血漿 cAMP 濃度は増加したが、血漿 cGMP 濃度に変化は見られなかった。また、アドレナリンは有意に増加したが、ノルアドレナリンは変化しなかった。グレリンは心拍数を変化させずに平均動脈圧を有意に低下させた (-12 mmHg)。この降圧効果は 100 分程度持続した。心拍出量、1 回駆出量はそれぞれ 16%、24% の有意な増加を示した。末梢血管抵抗は 24% 低下した。これらの変化は、プラセボ投与時には認められなかった。

D. 考察

グレリンの病態生理的意義を明らかにするためには、その生体内分布、産生・分泌調節、血中濃度の測定などが必須である。そこで今回、C-RIA 及び N-RIA の 2 種類の高感度 RIA 系を確立した。本 RIA はヒトとラットのグレリンについて共に 100% 認識し、血中濃度の測定も可能なものであった。ラットの生体内分布を C-RIA で検討した結果、胃に最も高濃度で存在し十二指腸、空腸、回腸などの腸管にも低濃度ではあるが存在したが、視床下部は極めて低濃度であったことから、血中のグレリンの分泌源は主に胃に由来するものと考えられた。また、グレリンは組織中でアシル化及び脱アシルの 2 種類の分子型で存在し、その比は約 1:2~1:3 程度であることが明らかになった。グレリンの活性発現には、脂肪酸 (n-オクタン酸) によるアシル化修飾が必須であることから、グレリンの生合成・分泌調節を解明する上でアシル化のメカニズムを明らかにすることは極めて重要であると考えられる。また、脱アシル化グレリンが生理的意義を有するかどうかについても、興味ある点である。今後、今回開発した RIA 系を用いて、ヒトの種々の生理状態や疾患、病態モデル動物などにおける遺伝子発現や分泌、血中濃度の検討を行うことにより、グレリンの新しい機能や病態生理的意義が明らかになるものと思われる。

一方、ヒトにおける生理作用の検討により、グレリンは GH 分泌を促すのみでなく、心血管作用も有していることが示唆された。グレリンの急性投与は GH 濃度を上昇させたが、NO を介して血管拡張に働く IGF-1 濃度には変化が認められなかった。また血管にはグレリンの特異的受容体である GSH-R が多数存在していることを考慮すると、グレリンは独自の血管拡張作用を有している可能性がある。明らかな血圧低下にもかかわらず、心拍数はむしろ低下傾向を示し、ノルアドレナリンも増加しなかった。こ

れらの結果はグレリンの交感神経抑制効果を示唆している。心拍出量、1 回駆出量はそれぞれ有意な増加を示したが、末梢血管拡張による心後負荷の軽減、GH を介した強心作用が関与している可能性がある。これらの心血管作用の作用機序に関して、今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

グレリンの高感度 RIA 系を開発し、ラット組織濃度を検討した結果、胃に最も高濃度で存在したが、視床下部は極めて低濃度であった。また、グレリンは組織中でアシル化された活性型及びアシル化されていない不活性型の 2 種類の分子型で存在することが明らかになった。

グレリンは健常人に対して、強力で持続する GH 分泌作用を有しているのみでなく、心拍数を変化させず心後負荷の軽減、心拍出量の増大作用を介して、心行動態に有利に働く可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① H. Hosoda, M. Kojima, H. Matsuo and K. Kangawa. Ghrelin and Des-acyl Ghrelin: Two Major Forms of Rat Ghrelin Peptide in Gastrointestinal Tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279: 909-913, 2000
- ② K. Takaya, H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao. Ghrelin Strongly Stimulates Growth Hormone Release in Humans. *J. Clin.*

- Endocrinol. Metab. 85: 4908-4911, 2000
- ③ R. Peino, R. Baldelli, J. Rodriguez-Garcia, S. Rodriguez-Segade, M. Kojima, K. Kangawa, E. Arvat, E. Ghigo, C. Dieguez and F. F. Casanueva. Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. Eur. J. Endocrinol. 143: R011-R014, 2000
- ④ K. Mori, A. Yoshimoto, K. Takaya, K. Hosoda, H. Ariyasu, K. Yahata, M. Mukoyama, A. Sugawara, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. FEBS Lett. 486: 213-216, 2000
- ⑤ Y. Date, M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa and M. Nakazato. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology 141: 4255-4261, 2000
- ⑥ Y. Masuda, T. Tanaka, N. Inomata, N. Ohnuma, S. Tanaka, Z. Itoh, H. Hosoda, M. Kojima and K. Kangawa. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276: 905-908, 2000
- ⑦ Y. Date, N. Murakami, M. Kojima, T. Kuroiwa, S. Matsukura, K. Kangawa and M. Nakazato. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 275: 477-480, 2000
- ⑧ H. Hosoda, M. Kojima, H. Matsuo and K. Kangawa. Purification and

characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. J. Biol. Chem. 275: 21995-22000, 2000

- ⑨ M. Nakazato, N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa and S. Matsukura. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature 409: 194-198, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

生活習慣病および老化におけるグレリンの臨床的意義と診断治療への応用

分担研究者 中尾一和（京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学第二内科 教授）

生活習慣病や老化におけるグレリンの臨床的意義および臨床応用を探る目的で、グレリンの神経内分泌作用およびエネルギー代謝作用を検索し、さらに、グレリンの体内分布を広く検索した。グレリンはヒトにおいて強力な成長ホルモン分泌作用を有していたが、軽微な ACTH およびプロラクチン分泌刺激作用も有していた。また、グレリンはラットにおいて摂食亢進作用を有し、その作用はニューロペプチド Y/Y1 受容体の経路を介しており、レプチンの作用と拮抗した。さらに、グレリンの発現はげっ歯類の腎においても認められ、受容体と共在していることが明らかとなった。

A. 研究目的

生活習慣病は高齢者の quality of life (QOL) を損なう最大の要因の一つであり、その克服は、高齢化社会を目前にした我が国の医療における緊急の課題である。高血圧、糖尿病、高脂血症および、動脈硬化を基盤とする心疾患や脳卒中などの疾患の発症と進展には、肥満やインスリン抵抗性といった共通の基盤が関与し、狭義の生活習慣病の一群を形成するが、従来、これらの疾患と成人成長ホルモン(GH)欠損症の症候との類似性が指摘されてきた。実際、GH は小児の成長のみならず、成人においても脂質代謝や body composition に関与することが近年明らかとなっており、生活習慣病の成因や治療における GH の臨床的意義が議論されている。グレリンは GH secretagogue(GHS)受容体の内因性リガンドであり、その作用の少なくとも一部は GH の作用を介すると考えられ、GH と同様に、種々の疾患に対する臨床応用が期待される。また、GHS は GH 分泌刺激とは独立して、摂食行動に関与することも示されており、グレリンのエネルギー代謝における臨床的意義も注目さ

れる。これらのことをふまえ、本研究ではヒトにおけるグレリンの神経内分泌作用を検索し、その GH 分泌刺激作用を詳細に検討するとともに、動物を用いてエネルギー代謝におけるグレリンの作用を検索する。さらに、末梢組織におけるグレリンの遺伝子およびペプチドレベルでの発現を検討することによって、生体内におけるグレリンの作用をさらに広く検索する。本研究ではこれらのことを通じて、老化や生活習慣病におけるグレリンの臨床応用を検討し、来るべき高齢化社会における高齢者の QOL 改善に寄与することを目指すとともに、診断および治療への、さらに広い応用の可能性を探る。

B. 研究方法

1) ヒトにおけるグレリンの神経内分泌作用

文書による同意を得た健常ボランティア男性 6 名(28-37 歳)に 0.2、1.0、5.0 μ g/kg いずれかの用量の合成グレリンを静脈内にボラス投与した後、15、30、45、60、90、120、150 および 180 分後に採血を行い、血清 GH、コルチゾル、FSH、LH、プロラクチン(PRL)、TSH およ

び血漿 ACTH の濃度を測定し、その神経内分泌作用を検索した。

2) グレリンのエネルギー代謝調節作用

グレリンの摂食調節作用を明らかにするため、8 週齢雄性 SD ラットに 5 から 5,000ng の合成グレリンを側脳室内投与し、4 時間の累積摂食量と体重変化を測定した。また、グレリンの摂食調節作用における GH の関与を明らかにするため、GH 欠損モデルである SDR(spontaneous dwarf rat)を用いて、グレリンの側脳室内投与の効果を検討した。また、グレリン投与後の視床下部ニューロペプチド Y(NPY) mRNA 発現の変化をノーザンブロット法によって検討するとともに、NPY 受容体拮抗薬を用いてグレリンの摂食調節作用における NPY の関与を検討した。さらに、レプチン側脳室内投与(2 μ g/rat)によって得られる摂食抑制作用および NPY mRNA の発現減少に対するグレリン同時投与(5-500ng/rat)の効果を検討した。

3) 末梢組織におけるグレリンの発現

ノーザンブロット法、reverse transcription (RT)-PCR 法、グレリン特異的ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫組織化学法などの手法を用いて、種々の末梢組織および培養細胞におけるグレリンの発現分布を mRNA およびペプチドのレベルで広く検索した。RIA および免疫組織化学法においてはグレリンの N 端側および C 端側それぞれを認識する抗体を用い、アシル化および非アシル化グレリンを区別した。

(倫理面への配慮)

グレリンを健常人に投与する際にはヘルシンキ宣言を遵守し、充分な説明を行い、同意文書を得たうえで行った。投与前後の血液および尿を採取して可能な限り副作用の有無を生化学的に検索し、常に安全性を確認しつつ施行した。また、動物を扱う際にはその愛護に留意し、手術や屠殺の際に苦痛を最小限にとどめるなどの配慮を行った。

C. 研究結果

1) ヒトにおけるグレリンの神経内分泌作用

グレリン投与により、GH は用量依存的に増加し、30 分後に頂値をとった。0.2、1.0 および 5.0 μ g/kg のグレリン投与による頂値はそれぞれ 43.3 \pm 6.0 ng/ml、81.5 \pm 12.7 および 107.0 \pm 10.7 ng/ml で、基礎値のそれぞれ 87 倍、100 倍および 190 倍に達した。ACTH、コルチゾルおよび PRL もグレリン投与により増加し、5.0 μ g/kg 投与でそれらの頂値は、それぞれ 46.3 \pm 4.3 pg/mL、17.5 \pm 0.5 μ g/dL および 13.5 \pm 4.3 ng/mL となったが、0.2 μ g/kg 投与による頂値は、それぞれ 22.8 \pm 3.0 pg/mL、9.4 \pm 1.9 μ g/dL および 4.6 \pm 0.6 ng/mL であり、基礎値との有意差は認められなかった。また、グレリン投与後の LH、FSH および TSH の値には、基礎値と比べて有意な変化は認められなかった。

2) グレリンのエネルギー代謝調節作用

グレリンは用量依存性的に SD ラットの摂食量および体重を増加させ、500 ng 側脳室内投与にて最大効果が認められた(摂食量: 5.12 \pm 0.38 g vs. 1.25 \pm 0.32 g, $P < 0.01$ 、体重変化: 1.39 \pm 0.84 g vs. -4.87 \pm 0.96 g, $P < 0.01$)。摂食亢進作用は、投与後 4 時間まで認められたが、6 時間以降では対照群との間に明らかな差は認められなかった。グレリンは、SDR においても同様に摂食および体重増加作用を示した(摂食量: 1.66 \pm 0.88 vs. 0.70 \pm 0.19 g, $P < 0.001$ 、体重変化: -0.17 \pm 0.48 vs. -2.00 \pm 0.55 g, $P < 0.05$)。また、グレリンの摂食亢進作用は、NPY/Y1 受容体拮抗薬の投与によって用量依存的に減弱した。さらに、レプチンの側脳室内投与(2 μ g/rat)は、視床下部 NPY mRNA 発現を 35%減弱したが、この効果は 500 ng/rat のグレリン同時投与によって消失した。またこのとき、グレリンは用量依存的にレプチンの摂

食抑制作用に拮抗した。

3) 末梢組織におけるグレリンの発現

逆相 HPLC によって分離したマウス腎抽出物より、C 端抗体および N 端抗体で認識される分画を検出した。マウス腎組織においてグレリン総量は 6.79 ± 0.48 fmol/mg wet tissue であり、アシル化グレリンは 0.282 ± 0.074 fmol/mg wet tissue であった。RT-PCR 法にては、マウスの腎、糸球体、podocyte および、ラットのメサンギウム細胞および線維芽細胞様の NRK-49F 細胞にグレリンの発現が認められ、一方、上皮細胞様の NRK-52E 細胞には認められなかった。さらに、ラット腎において RT-PCR 法にて GHS 受容体 mRNA が検出された。

D. 考察

1) ヒトにおけるグレリンの神経内分泌作用

ヒトにおけるグレリンによる GH 分泌亢進作用は GH 分泌刺激ホルモン(GHRH)の作用より強力であり、0.2、1.0 および 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のいずれの用量にても、GH の頂値は GHRH による最大反応を凌駕しており、等モルで比較した場合、GHS の一つである GHRP-2 の作用よりも強力であった。ACTH 分泌刺激作用は種々の GHS においても報告されており、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)やパゾプレッシンの関与が示唆されている。また、PRL 分泌刺激作用は GHS によっても認められるが、ヒトにおいてのみであり、グレリンおよび GHS は直接 mammosomatotroph に作用して PRL 分泌をもたらすと考えられる。これらの作用は、GH 分泌刺激作用と比べてきわめて軽微であるが、生体においてグレリンが GH 以外の下垂体前葉ホルモン分泌調節にも関与している可能性があることを示唆する。

2) グレリンのエネルギー代謝調節作用

グレリンによる摂食亢進作用が示された。グレリンによる摂食亢進作用は GH 欠損ラットに

においても観察された。GHS による摂食亢進作用が GHRH 拮抗薬によって拮抗されないことが報告されており、GH および GHRH を介さずに摂食行動に影響を及ぼすと考えられる。グレリンによる摂食亢進作用は Y1 受容体拮抗薬によって減弱することより、グレリンは少なくとも一部は、視床下部 NPY/Y1 受容体経路の活性化を介して摂食亢進作用をもたらすと考えられる。これらの観察および、レプチンによる摂食抑制作用および視床下部における NPY mRNA 発現の減少がグレリン同時投与によって減弱するという結果より、グレリンが視床下部 NPY/Y1 受容体の経路を活性化することによってレプチンの作用に拮抗することが示された。これらのことはグレリンがエネルギー代謝においても重要な役割を有することを示唆する。

3) 末梢組織におけるグレリンの発現

グレリンの遺伝子発現は視床下部弓状核および胃において認められているが、本研究で初めて消化管以外の末梢組織においてもグレリンが発現していることが示された。ラット腎には GHS 受容体も発現しており、腎においてグレリンが autocrine もしくは paracrine 的に作用する可能性が示唆される。

E. 結論

1. ヒトにおいてグレリンが強力な GH 分泌刺激作用を有することを示した。また、グレリンは ACTH および PRL の分泌刺激作用を有していたが、低用量ではこれらの作用は軽微であることが明らかとなった。2. グレリンは摂食亢進作用を有し、この作用は NPY/Y1 受容体の経路を介することおよび、レプチンの摂食抑制作用に対する拮抗作用を有しているが、この際にも NPY/Y1 受容体の経路の活性化を介することが明らかとなった。3. グレリンがげっ歯類の腎において、その受容体とともに発現していることを示した。

F. 健康危機情報

健康人へのグレリン投与に際しては、大量投与時に軽微な血圧降下を示し、腹鳴および熱感を自覚したが、重篤な副作用は認められなかった。投与後の血液および尿検査によっても異常は検出されなかった。また、種々の実験を施行するにあたって、特記すべき健康障害または事故は皆無であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① K. Takaya, H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. Ghrelin strongly stimulates growth hormone (GH) release in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 4908-4911, 2000
- ② M. Shintani, Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Takaya, T. Hayashi, G. Inoue, K. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes.* 50: 227-232, 2001
- ③ K. Mori, A. Yoshimoto, K. Takaya, K. Hosoda, H. Ariyasu, K. Yahata, M. Mukoyama, A. Sugawara, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Lett.* 486: 213-216, 2000

2. 学会発表

- ① 高屋和彦、有安宏之、森 潔、小松弥郷、小川佳宏、細田公則、赤水尚史、白井 健、島津 章、児島将康、寒川賢治、中尾一和。グレリンの下垂体前葉ホルモン分泌調節作用 - グレリンはヒトにおいて強力に成長ホルモン(GH)分泌を刺激する
第27回神経内分泌学会 10.13-14, 2000.
- ② 新谷光世、小川佳宏、海老原健、阿部 恵、宮永史子、高屋和彦、細田公則、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和。
グレリンの摂食亢進作用に関する検討
第27回神経内分泌学会 10.13-14, 2000.
- ③ 吉本明弘、森 潔、菅原 照、向山政志、菅波孝祥、横井秀基、澤井一智、吉岡徹朗、永江徹也、藤永有理子、横野久士、八幡兼成、田中一成、児島将康、細田洋司、寒川賢治、細田公則、中尾一和。
腎由来培養細胞における ghrelin 遺伝子の発現. 第73回日本内分泌学会学術総会. 6.16-18, 2000
- ④ 吉本明弘、森 潔、細田公則、菅原 照、向山政志、八幡兼成、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和。
腎臓における ghrelin 遺伝子発現の意義
第4回日本心血管内分泌代謝学会。
2000.11.24
- ⑤ K. Takaya, H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. Ghrelin strongly stimulates Growth Hormone (GH) Release in Humans. 11th International Congress of Endocrinology Oct. 29 - Nov. 02, 2000
- ⑥ K. Hosoda, M. Kojima, H. Hosoda, H. Iwakura, C. Son, J. Matsuda, M Harada, K. Mori, K. Takaya, Y. Ogawa, H. Itoh,

T. Akamizu, K. Nakao. cDNA cloning of mouse ghrelin and its tissue distribution. 11th International Congress of Endocrinology. Oct. 29 – Nov. 02, 2000

- ⑦ Y. Fukunaga, H. Itoh, K. Hosoda, K. Doi, J. Yamashita, M. Inoue, K. Masatsugu, N. Sawada, T. Saito, S. Sakaguchi, M. Sone, K. Yamahara, T. Yurugi, H. Arai, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. Occurrence of ghrelin and its receptor in blood vessels – possible existence of vascular ghrelin system. 11th International Congress of Endocrinology. Oct. 29 – Nov. 02, 2000
- ⑧ A. Yoshimoto, K. Mori, K. Hosoda, A. Sugawara, M. Mukoyama, K. Yahata, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. Ghrelin gene expression in kidney, glomerulus and renal cells. 11th International Congress of Endocrinology. Oct. 29 – Nov. 02, 2000
- ⑨ A. Yoshimoto, K. Mori, K. Hosoda, A. Sugawara, M. Mukoyama, M. Kasahara, K. Yahata, T. Suganami, H. Makino, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. Renal Expression of Ghrelin: A Novel Molecule Which Stimulates Growth Hormone Secretion. 33rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Dec. 10 – Dec. 16, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

肝細胞株、HepG2、およびH4-II-E細胞におけるグレリンのインスリン様作用、 および抗インスリン様作用に関する研究

分担研究者 千原和夫（神戸大学医学部第3内科 教授）

グレリンは胃で大量に産生されるので、GH 分泌促進作用以外に消化器系で種々の作用を有する可能性がある。今回、肝細胞株におけるグレリンのインスリン作用に及ぼす影響について、RT-PCR、免疫沈降、ウェスタンブロット、ノザンブロット法で検討した。ヒト、およびラット肝癌由来の HepG2 細胞、H4-II-E 細胞に GHS 受容体 mRNA が存在した。グレリンは、HepG2、および H4-II-E 細胞において、IRS-1-GRB2-MAPK 系を活性化し細胞増殖をひき起こすインスリン様作用と、Akt 活性の低下、PEPCK mRNA 量の増加をひき起こす抗インスリン様作用を示した。グレリンは糖質代謝に影響する可能性が示唆された。

A. 研究目的

Bowers らによって作成された成長ホルモン放出ペプチド(GHRP)は、GH secretagogue(GHS)受容体を介して作用し、下垂体からの(GH)放出を促進する。一方、1999年、寒川らによって、GHS受容体の内因性リガンドであるグレリンが発見された。グレリンは視床下部にも存在するが、その含量は少なく、胃が主要な産生臓器であり、末梢における作用が注目される。私どもは、胃をはじめとする消化器にグレリン含量が多いこと、その結果、末梢血に比べ肝門脈血中でその濃度が高値であろうことに着目し、肝に対して何らかの作用を示す可能性を考えた。また、GHSが摂食行動を亢進させることがすでに報告されているので、肝においても摂食に関連する現象にグレリンが関与するのではないかと考えた。そこでまず、肝におけるエネルギー代謝、なかでも糖質代謝に影響を及ぼす可能性を考え、インスリン作用に対する影響を検討した。

B. 研究方法

1) 肝細胞におけるGHS受容体のmRNA発現

まず、肝細胞に GHS 受容体が存在するか否かを検討した。ヒト肝細胞癌由来の細胞株である HepG2 細胞、ラット肝細胞癌由来の H4-II-E 細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR でグレリン mRNA の存在を検討した。また、ヒト肝 cDNA ライブラリーをテンプレートにして PCR を行ないグレリン mRNA の存在を検討した。

2) インスリンシグナルに対するグレリンの影響

a) HepG2 細胞は 10% 牛胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)で培養維持した。実験の12時間前に、0.1% 牛血清アルブミン(BSA)を含む無血清 DMEM に置換し、各種刺激実験を行なった。HepG2 細胞メディウムに 100nM グレリンを添加したのち、経時的にハーベストし、細胞内蛋白質を抗 IRS-I 抗体で免疫沈降、これを抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットで解析し、グレリンの IRS-I リン酸化に及ぼす効果を検討した。

b) a)と同様の方法で、IRS-I リン酸化に及ぼすグレリン作用の用量反応性を検討した。

c) HepG2 細胞メディウムに 100nM グレリンを添加し 20 分刺激したのち、100nM インスリンを加え 1 分間刺激し、IRS-I リン酸化に及ぼすグレリンとインスリン併用効果を検討した。

d) a)と同様の方法で、抗インスリン受容体 β 鎖抗体を用いて細胞内蛋白を免疫沈降し、これを抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットで解析し、グレリンのインスリン受容体リン酸化に及ぼす効果をインスリンのそれと比較検討した。

e) グレリンの刺激により IRS-1 の下流のシグナルが変化するか確かめるため、IRS-1 と GRB 2 の結合を検討した。HepG2 細胞を 100 nM グレリンで 20 分刺激、その後 100nM インスリンで 3 分刺激した。細胞内蛋白を抗 GRB 2 抗体で免疫沈降したのち、これを抗 IRS-1 抗体を用いたウェスタンブロットで解析し、IRS-1 と GRB2 の結合が増加しているか調べた。

f) HepG2 細胞を 100 nM グレリンで 20 分刺激、その後 100 nM インスリンで 3 分刺激した。細胞内蛋白を抗 PI3K 抗体で免疫沈降したのち、これを抗 IRS-1 抗体を用いたウェスタンブロットで解析し、IRS-1 と PI3K の結合量について検討した。

g) e) と同一の条件で HepG2 細胞を刺激した後、細胞内蛋白を抗リン酸化 MAPK 抗体で免疫沈降した。これに MAPK の基質として Elk-1 と ATP を加え、Elk-1 のリン酸化を抗リン酸化 Elk-1 抗体を用いたウェスタンブロットで調べた。

h) f) と同一の条件で刺激した後、細胞内蛋白を抗 Akt 抗体で免疫沈降した。これに Akt の基質として GSK-3 と ATP を加え、GSK-3 のリン酸化を抗リン酸化 GSK-3 抗体を用いたウェスタンブロットで調べた。

i) 100 nM グレリン、あるいは 0.5 mM 8-CPT-cAMP の phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) mRNA 量に及ぼす効果を調べるため、これらの処置 3 時間後に細胞

から total RNA を抽出し、Northern blot で解析した。HepG2 細胞では PEPCK mRNA 発現が少ないため、H4-II-E 細胞を使用した。また、インスリンは 8-CPT-cAMP により増加した PEPCK mRNA を減少させるが、この減少作用に対するグレリンの影響をみるため、インスリン添加前に 100nM グレリンを添加し PEPCK mRNA の量を測定した。

j) グレリンが細胞増殖に影響するかどうか調べる目的で、96 穴ウェルで HepG2 細胞を培養し、70%コンフルエントの段階で 100 nM のグレリン、インスリン、あるいはその両者を含む無血清 DMEM に置換し、細胞増殖に及ぼすこれらの作用を MTS アッセイで検討した。また、この作用に MAPK が関与するかどうか明らかにするため、MAPK kinase 1 の特異的ブロッカーである PD98059 を終濃度 50mM となるようにメデイウムに加え、その効果を検討した。

(倫理面への配慮)

なお、以上の研究は in vitro 研究であり、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

1) 各種細胞株における GHS 受容体 mRNA 発現

HepG2 細胞、H4-II-E 細胞から抽出した mRNA を用いて RT-PCR をおこなったところ、いずれのサンプルからも期待通りのサイズの一本の DNA バンドが得られた。これの塩基配列を決定したところ、GHS 受容体の塩基配列に一致した。同様に、ヒト肝 cDNA ライブラリーにもグレリン cDNA が存在することを確認した。

2) インスリンシグナルに対するグレリンの影響

IRS-1 リン酸化に及ぼすグレリンの効果

[a), b), c); アルファベットは研究方法の項に対応する]

100 nM グレリンで刺激後、3、10、20 分で

HepG2 細胞をハーベストし、グレリンの IRS-1 リン酸化に及ぼす効果を検討したところ、10、20 分で有意な IRS-1 リン酸化の増強が認められた。また、種々の量のグレリンを添加後 10 分でハーベストしたとき、グレリンは用量反応的に IRS-1 リン酸化を促進した (10、100 nM で有意な促進効果)。100 nM インスリンの IRS-1 リン酸化作用に比べ、100 nM グレリンの作用は弱いものの有意であり、両者添加時の効果は相加的であった。

インスリン受容体のリン酸化に及ぼすグレリンの効果 [d]

100nM グレリンで刺激後 10 分で HepG2 細胞をハーベストし、インスリン受容体 β 鎖リン酸化に及ぼすグレリンの効果を検討した。100nM のインスリンでは明らかなインスリン受容体 β 鎖のリン酸化が認められたが、グレリンでは認められなかった。

IRS-1 と GRB および PI3K の結合に対するグレリンの効果 [e], f]

100 nM グレリンは IRS-1 と GRB の結合を増加させた。また、IRS-1 と PI3K との結合を増加させた。その効果は 100 nM インスリンの効果とほぼ同等であった。インスリンとグレリンの両者添加で IRS-1 と GRB の結合は相加的な増加がみられたが、IRS-1 と PI3K との結合に対してこのような効果は認められなかった。

グレリンの MAPK 活性の及ぼす効果 [g]

100 nM グレリンは 100 nM インスリンに比べ弱いものの、MAPK 活性を増加させた。両者添加したとき、相加的に MAPK 活性は増加した。

グレリンの Akt 活性に及ぼす効果 [h]

100 nM グレリンは Akt 活性を抑制した。一方、100 nM インスリンは、すでに報告されているように Akt 活性を増強させた。両者をメディアムに加えたときも、Akt 活性は抑制された。

グレリンの PEPCK mRNA 量に及ぼす効果 [i]

100 nM グレリン、0.5 mM 8-CPT-cAMP は

H4-II-E 細胞の PEPCK mRNA 量を増加させた。インスリンは 8-CPT-cAMP により増加した PEPCK mRNA を減少させたが、インスリン添加前に 100 nM グレリンで前処置をおこなったとき、インスリンの PEPCK mRNA 減少効果はグレリン作用時間に依存して減弱した。

グレリンの細胞増殖促進効果 [j]

100 nM グレリンは 100 nM インスリンと同程度の HepG2 細胞増殖促進効果を示した。この効果は PD98059 により完全に解除された。

D. 考察

GHS 受容体蛋白の存在は不明であるが、GHS 受容体 mRNA は HepG2 細胞、H4-II-E 細胞、ヒト肝細胞に存在し、グレリンが肝に作用する可能性が示された。そこで、HepG2 細胞を用いて、インスリンシグナルへの影響を観察したところ、グレリンは HepG2 細胞において用量反応性に IRS-1 リン酸化を促進した。グレリンはインスリン受容体のリン酸化を起こさないこと、およびグレリンと同様に GHS 受容体に作用する合成 GH 分泌ペプチドである KP-102 も同様の作用を示したことから、インスリン受容体でなく、GHS 受容体を介する作用であると考えられた。

インスリン刺激は IRS-1 のリン酸化を引き起こし、そこに種々の SH2 蛋白が結合した結果種々のシグナルが伝達される。グレリンは IRS-1 と GRB2 の結合量を増加させ、また、IRS-1 と PI3K との結合量をも増加させた。一般に GRB2 の結合量が増加すると MAPK 系が活性化される。インスリンの細胞増殖因子としての作用は、この系を介していると考えられているが、グレリンも MAPK 活性を増強し、細胞増殖効果を示した。また、この細胞増殖効果は MAPK kinase 1 の特異的ブロッカーである PD98059 によって完全に抑制されたことから、グレリンが IRS-1-GRB2-MAPK 系を活性化し細胞増殖

をひき起こすインスリン様作用を有していることは確実と考えられた。

一方、インスリンの代謝に関する作用は PI3K によって制御されていることが報告されている。PI3K は IRS-1 と結合することにより活性化されるが、グレリンは PI3K と IRS-1 の結合を増加させたが、PI3K の下流に位置する Akt 活性を逆に低下させた。このくいちがいが生じた原因は不明であるが、グレリン刺激によって IRS-1 と結合した PI3K が実際に活性化された PI3K であったという確証は本実験成績からは得られていない。

インスリンは PI3K を介して PEPCK 遺伝子発現を抑制する。グレリンは PEPCK mRNA 量を増加させ、インスリンの PEPCK mRNA の低下効果に対し拮抗的に作用した。PEPCK は肝における糖新生の律速酵素であり、血糖を上昇させる方向に作用する。Akt は筋において糖取込みの促進に関与することが報告されており、Akt 活性の低下は PEPCK 発現の亢進と生理的には同じ方向性を持つ作用であると考えられる。PI3K と IRS-1 の結合は増加したものの、Akt 活性の低下、PEPCK mRNA 量の増加が本実験で観察されたことから考えると、グレリンは血糖を上昇させる方向に作用し、糖質代謝に関しては抗インスリン作用を有している可能性が示唆された。

E. 結論

GHS 受容体 mRNA は、HepG2 細胞（ヒト肝細胞癌由来）、H4-II-E 細胞（ラット肝細胞癌由来）、および正常ヒト肝細胞に検出された。グレリンは、HepG2、および H4-II-E 細胞において、IRS-1-GRB2-MAPK 系を活性化し細胞増殖をひき起こすインスリン様作用と、Akt 活性の低下、PEPCK mRNA 量の増加をひき起こす抗インスリン様作用を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① M. Murata, H. Kaji, Y. Takahashi, K. Iida, I. Mizuno, Y. Okimura, H. Abe, K. Chihara. Stimulation by eicosapentaenoic acids of leptin mRNA expression and its secretion in mouse 3T3-L1 adipocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 343-348, 2000
- ② M. Kanatani, T. Sugimoto, K. Nishiyama, K. Chihara. Stimulatory effect of insulin-like growth factor binding protein-5 on mouse osteoclast formation and osteoclastic bone-resorbing activity. *J Bone Mineral Res* 15: 902-910, 2000
- ③ T. Tsushima, Y. Katoh, Y. Miyachi, K. Chihara, A. Teramoto, M. Irie, Y. Hashimoto. Serum concentrations of 20K human growth hormone in normal adults and patients with various endocrine disorders. *Endocrine J* 47 Suppl. S: S17-S21, 2000
- ④ M. Kishimoto, Y. Okimura, K. Kimura, I. Mizuno, G. Iguchi, M. Fumoto, Y. Takahashi, F. Kanda, H. Kaji, H. Abe, K. Hanioka, K. Chihara. Multifocal fibrosclerosis as a possible cause of panhypopituitarism with central diabetes insipidus. *Endocrine J* 47: 335-342, 2000
- ⑤ M. Kishimoto, Y. Okimura, S. Hinuma, S. Fukusumi, G. Iguchi, M. Fumoto, K. Iida, H. Kaji, K. Chihara. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human prolactin-releasing peptide