

20020253

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14年度 総括・分担研究報告書

平成15（2003）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14年度 総括・分担研究報告書

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）

グレリンの分泌調節が慢性のエネルギー代謝の状況によること、カロリー制限によりグレリンの血中濃度および n-オクタノイル化が変化することを示した。ヒトグレリンの遺伝子解析により、そのプロモーターは極めて組織特異的、細胞特異的であることを示した。また、グレリンが加齢における分泌能の検査として有用であること、老齢ラットのソマトポーズと摂食低下に対して、GH 分泌と摂食亢進作用を示し、これが迷走神経を介することを明らかにした。さらに、グレリンの同化作用は、胎児期、新生児期の発育・発達、および性成熟において機能することを示した。一方、グレリン受容体発現抑制ラットの解析により、グレリンの中枢での機能発現に GRF ニューロンや未知のニューロン、及び CRF が関与する可能性を示した。卵巣機能におけるグレリンの役割の検討により、グレリンが卵巣の機能に重要な遺伝子群の発現を直接調節していることが明らかとなった。

〔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（神戸大学大学院医学系研究科
応用分子医学講座）
- 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、脂肪肝などをもち、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) グレリンの臨床的意義と診断治療への応用、2) グレリンの心血管系における意義、3) グレリンのエネルギー代謝調節機序、4) GHS-R 発現抑制トランスジェニックラットの解析、5) 脈動的成長ホルモン分泌における末梢血中グレリンの意義、6) 卵巣機能におけるグレリンの役割、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、8) グレリンの下垂体および甲状腺機能調節における意義

(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) 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の検討

中尾は、生活習慣病におけるグレリンの臨床的意義を検討して以下のような結果を得た。Zucker 肥満ラットにおいて、絶食時の血中グレリン濃度の上昇が遅延し、グレリンの分泌調節が慢性のエネルギー代謝の状況で修飾されることが示された。ヒトグルカゴノーマの 1 例でグレリン遺伝子発現がノザンプロット解析で検出され、これは世界初の報告である。一方、腎疾患患者における血中グレリン

濃度は、血清クレアチニン値と正の相関を示し、末期腎不全患者で健常対照群の 2.8 倍に達していた。また、実験的両側腎摘除マウスにおいては、著明な血中グレリン濃度の上昇が認められた。以上のように、本研究によって肥満、膵島腫瘍、腎疾患におけるグレリンの病態生理的意義が明らかになった。

2) 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の検索

加齢における機能的 GH 分泌不全状態と器質的 GH 分泌不全症を鑑別することは容易でない。島津は、GH 分泌刺激剤やグレリンの成人 GH 分泌不全症の診断における臨床的意義を解明するため、器質性完全型 GH 分泌不全症患者 5 例を対象に、GH 分泌刺激剤 KP-102D を投与し、血中 GH 反応と血中 ACTH およびコルチゾール反応をインスリン低血糖試験と比較検討した。KP-102D による GH 分泌増加は軽度ながら全例で観察され、インスリン低血糖による GH 頂値より有意に高かった。同様に ACTH 増加反応も全例でみられ、インスリン低血糖より大きい反応であった。肥満者や高齢者でも KP-102D による GH 増加反応は減弱しないことを考え併せると GH 分泌刺激剤は視床下部・下垂体系の機能評価が可能でインスリン低血糖にとってかわる有用な薬剤である。

3) 加齢におけるソマトポーズと摂食低下に対するグレリンの効果に関する検討

グレリンは、消化管と視床下部で産生され、末梢と中枢投与で成長ホルモン (GH) 分泌と摂食を促進するペプチドである。今回、高齢ラットのソマトポーズと摂食低下に対するグレリンの効果ならびに胃から脳へのグレリンの情報伝達システムについて解析し、加齢におけるグレリンの病態生理学的意義を研究した。高齢ラットでもグレリンは GH 分泌と摂食亢進作用を示した。グレリンは迷走神経

求心路を介して、GH 分泌および摂食に関する情報を脳に伝達することも示した。

4) グレリンの産生調節と成長、発達における生理的意義

成長ホルモンの分泌は、老化に伴い漸次低下する。グレリン受容体は全身臓器に発現しており、グレリンの同化作用は胎児および新生児期の発育に重要な役割を持つ可能性がある。今回、グレリンの成長・老化における役割解明の一環として、胎児の発育への影響、新生児期にある、さらに性成熟におよぼすグレリンの影響ラットのグレリン産生能とグレリンに対する反応性について解析した。その結果、グレリンの胎児期、新生児期の発育・発達、および性成熟への作用が明らかになり、老化のメカニズムを知る上での基盤となる知見を得た。

5) ヒトグレリン遺伝子 5'上流領域のクローニングと機能解析

千原は、ヒトグレリン遺伝子の発現調節機構を解明するため、ヒトグレリン遺伝子 5'上流配列の翻訳開始点から-2000bp までをクローニングし、塩基配列を決定した。様々な細胞におけるプロモーター活性を一過性発現系にて検討したところ、胃の内分泌様細胞に由来する ECC10 細胞においてのみ強い活性を認めた。翻訳開始点から-589bp から-579bp にかけて TATATAA 配列を認めたが、ヒトグレリン遺伝子レポーター遺伝子を使用した解析からは、この配列は機能していないものと考えられた。グルカゴン、及びそのセカンドメッセンジャーである cAMP は、いずれもグレリン遺伝子プロモーター活性を著しく上昇させた。

6) GHS-R 発現抑制トランスジェニックラットの視床下部における摂食関連ニューロンの解析

芝崎は、グレリンの作用機構および

Growth hormone secretagogue 受容体 (GHS-R) の機能を明らかにするため、GHS-R 発現を抑制したトランスジェニック (TG) ラットの解析を行い、以下のような結果を得た。TG ラットでは、弓状核での GHS-R 陽性細胞数は対照 (WT) ラットの約 30% に減少していた。TG ラットの GH-releasing factor (GRF) 陽性細胞数は WT ラットの約 57% に有意に減少していたが、NPY 陽性細胞数には WT ラットとの間で差は認められなかった。従って TG ラットで認められる GHS に対する GH 分泌反応の低下には GRF 発現の減少が関与し、GHS による摂食促進作用の消失には NPY ニューロン以外のニューロンが関与していると推測された。GHS-R 発現量と GRF 陽性細胞数との間には正の相関が認められたことから、GRF の発現に GHS-R が関与している可能性が示唆された。KP-102 投与により室傍核において Fos が発現したニューロンは主として ACTH 放出因子 (CRF) ニューロンであったことから GHS による ACTH 分泌には主に CRF が関与していると推測される。

7) グレリンの下垂体および甲状腺機能調節における意義の検討

山下は、(a) 各種内分泌疾患、特に内分泌腫瘍におけるグレリンの変動及び、(b) 胃切除手術・術後症状におけるグレリン関連ホルモンの動態についての調査を行っている。いずれもまだ研究の途上であり、解析の積み重ねが必要であると考えている。また、(c) グレリンの活性発現におけるカロリー制限、成長ホルモン抑制の影響についても調査を行い、カロリー制限により、グレリンの血中濃度および n-オクタノイル化が変化することが示し、グレリンはエネルギー代謝の変化の関連因子である可能性を示した。今後、カロリー制限モデルを用いた検討を行っていく予定で

ある。

8) 卵巣機能におけるグレリンの意義に関する検討

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、サブトラクションクローニングを行なっている。本研究では、卵巣機能におけるグレリンの役割を、ラット卵巣顆粒膜細胞を用いた初代培養系で明らかにした。ラット卵巣顆粒膜細胞を用いてサブトラクションクローニングを行い卵胞発育に重要な遺伝子群を多数クローニングし、これらの遺伝子群を real time PCR を用いて定量化するシステムを確立した。本年度は、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、卵胞発育に重要な遺伝子群を中心に real-time PCR を用いて解析し、グレリンが卵巣の機能に重要な遺伝子群の発現を直接調節していることが明らかとなった。

E. 結論

本年度は、グレリンの新しい機能や病態生理的意義の検討により、老化におけるグレリンの生理的意義の解明や臨床応用に向けての基盤となる多くの知見を得ることが出来た。

肥満マウスの解析により、グレリンの分泌調節が慢性のエネルギー代謝の状況によって修飾を受けること、また、グレリンが胃のみならず、膵島腫瘍でも発現していることが明らかとなった。一方、血中グレリン濃度が末期腎不全患者で上昇しており、腎疾患および腎不全におけるグレリンの病態生理的意義が明らかになった。

グレリンの活性発現におけるカロリー制限の影響についての検討により、カロリー制限によりグレリンの血中濃度および n-オクタノイル化が変化することを示した。また、グレリンが加

齢における分泌の最大予備能の検査として有用であり、副作用が問題となるインスリン低血糖試験にとってかわりうる可能性が示された。

老齢ラットのソマトポーズと摂食低下に対して、グレリンは GH 分泌と摂食亢進作用を示すこと、その作用は迷走神経求心路を介して、GH 分泌および摂食に関する情報を脳に伝達することも明らかになった。

グレリンの同化作用は、胎児期、新生児期の発育・発達、および性成熟において機能することが明らかになり、老化のメカニズムを知る上での基盤となる知見を得た。

グレリン遺伝子の発現調節機構を解明するため、ヒトグレリン遺伝子 5' 上流配列の機能解析を行い、このプロモーターは極めて組織特異性、細胞特異性を示すことを明らかにした。また、絶食にともなう血中グレリン上昇のメカニズムの一つとしてグルカゴンによる転写レベルでの遺伝子発現促進が関与している可能性が示唆された。

グレリン受容体 GHS-R の発現抑制トランスジェニックラットを用いて機能解析を行い、グレリンの中樞での機能発現に GRF ニューロンや GHS-R を発現する未知のニューロン、及び CRF が関与する可能性を示した。

卵巣機能におけるグレリンの役割の検討により、グレリンが卵巣の機能に重要な遺伝子群の発現を直接調節していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

グレリンの産生調節と成長、発達における生理的意義

主任研究者 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

グレリンは胃の内分泌細胞から産生され、下垂体での成長ホルモン分泌刺激作用と視床下部での摂食亢進作用をもつペプチドホルモンである。グレリン受容体は全身臓器に発現しており、グレリンの同化作用は胎児および新生児期の発育に重要な役割を持つ可能性がある。今回、グレリンの成長・老化における役割解明の一環として、胎児の発育への影響、新生児期にあるラットのグレリン産生能とグレリンに対する反応性、さらに性成熟におよぼすグレリンの影響について解析した。その結果、グレリンの胎児期、新生児期の発育・発達、および性成熟への作用が明らかになり、老化のメカニズムを知る上での基盤となる知見を得た。

A. 研究目的

我々は、1999年に、オーファン受容体であった成長ホルモン（GH）分泌促進因子受容体の内因性リガンドとして、グレリンと名付けた新規ペプチドをラットおよびヒトの胃から発見した。グレリンは、強力なGH分泌活性に加え、摂食亢進や体重増加、消化管機能調節などエネルギー代謝調節に重要な作用を持つ。グレリンは、既知の消化管ホルモン産生細胞とは異なり、胃における主要な内分泌細胞であるがこれまで分泌顆粒の内容物が不明であったX/A様細胞から産生される。また、グレリンは脳視床下部の弓状核とその周囲でも産生される。

一方、我々はすでに、グレリンが静脈内もしくは脳室内投与により、摂食行動の活性化、体重増加、エネルギー代謝の低下、体脂肪量の増加などの同化作用を示すことを明らかにしている。さらに、グレリンのヒト静脈内投与は、心拍出量の増大や血圧を低下させるなどの循環系にも作用することを明らかにした。

本研究では、グレリンと老化の関係の解明の一環として発育・発達などにおける意義を明ら

かにするため、ラットの胃におけるグレリン産生能を検討するとともに、成熟期において認められたグレリンの同化作用が、胎児期・新生児期の発育・発達、および性発達にも作用するかどうかについて解析した。

B. 研究方法

1) 実験動物

本研究にはWistar系雄ラット（約400g）と雌ラット（約250g）を用いた。

2) グレリン濃度の測定

組織中および血中グレリン濃度は、われわれが開発したグレリンに特異的な高感度ラジオイムノアッセイ（RIA）法で測定した。血漿中グレリンはSep-Pak抽出後、測定した。

3) 発育過程におけるグレリン産生能の検討

(i) 新生児ラットから成熟ラットまで1週齢毎（1～9週齢）に胃を採取し、グレリンの測定を行った。

(ii) ラットの妊娠18、20、22日目の雌ラットから胎児を採取した。また、1週齢、5

週齢ラットからも胃を採取し、抗グレリン血清によって免疫染色を行った。

(iii) 1 週齢ラットに 8 時間のミルク制限をした後、採血および胃を採取し、グレリンの測定を行った。

4) 胎児期・新生児期の発育におけるグレリンの作用

妊娠ラットに妊娠 15 日目から 22 日目までグレリン (3 nmol) を毎日 3 回 (8:00、13:00、17:00) 皮下投与し、新生ラットの体重を測定した。1 週齢と 3 週齢のラットの皮下にグレリン (1 nmol) を投与し、20 分後に断頭採血し、血漿 GH 濃度を RIA 法で測定した。

5) 性発達におけるグレリンの作用

グレリンの性成熟作用をみるために、低用量群はグレリンを誕生から生後 15 日目まで 0.5 nmol、生後 16 日目から 30 日目まで 1 nmol、生後 31 日目から膣開放まで 1.5 nmol、高用量群は誕生から生後 15 日目まで 1.0 nmol、生後 16 日目から膣開放まで 1.5 nmol を毎日皮下に投与した。

(倫理面への配慮)

本研究の実験動物を用いた研究においては、実験動物飼養および保管に関する基準、当該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) 胃のグレリン含量は生後 1 週齢から 5 週齢まで漸増し、その後定常状態になった。胃グレリンの免疫染色の結果、グレリン産生細胞は妊娠 18、20、22 日目の胎児では粘膜上皮にわずかに認められたただけであったが、生後 1 週間では壁細胞腺体部に、生後 5 週間では胃底部の腺底部から腺頸部にかけて広く認められた。
- 2) 1 週齢ラットの 8 時間ミルク制限は、胃グレ

リン含量を有意に低下させ ($P < 0.05$)、血漿グレリン濃度を有意に上昇させた ($P < 0.05$)。

- 3) 母体へのグレリンの投与は、新生ラットの誕生時の体重を性差なく有意に増大させた ($P < 0.05$)。また、1 週齢と 3 週齢ラットへのグレリン皮下投与は GH 分泌を促進した。
- 4) 新生ラットへのグレリンの投与は、雌ラットの膣開放までの期間を容量依存的に短縮させた。

D. 考察

GH 分泌促進因子受容体 (グレリン受容体) の内因性リガンドとして発見されたグレリンは、末梢投与によって唯一摂食を亢進させるペプチドである。グレリンの GH 分泌と摂食調節における情報は、胃から内分泌もしくは傍分泌することにより迷走神経の求心路を介して中枢に伝達される。グレリンは骨形成や細胞増殖への関与も指摘されており、全身臓器に発現しているグレリン受容体を介して様々な同化作用を示している。胎児期ラットの胃においてグレリン産生が認められた。胎児期においてグレリンの摂食亢進作用は意味をなさず、また新生児期においてもグレリン投与による余剰のミルク摂取は生じない。新生児期のラットにおいてグレリンの投与により GH 分泌が促進すること、母体へのグレリン投与が直接的もしくは GH を介して間接的に胎児の体重を増加させることから、グレリンが GH 分泌や末梢グレリン受容体を介した同化作用に関与し、胎児期、新生児期における発育・発達に作用していると考えられる。また、新生ラットへのグレリンの継続投与は雌ラットの膣開放を早めることから、性成熟にも関与していることが明らかとなった。

E. 結論

グレリンは新規の GH 分泌促進ペプチドであ

り、下垂体からの GH 分泌促進だけでなく、循環器への作用、エネルギー代謝調節、骨粗鬆症の抑制などの生理作用を持つ。グレリンがヒトとラットの胃から発見されたことにより、胃が GH 分泌や摂食調節に重要な役割を担っていることが判明した。グレリン受容体は、全身臓器に発現し、グレリンが骨形成や細胞増殖に寄与している可能性が明らかになりつつある。本研究の結果は、胎児期の未分化の細胞の増殖作用や臓器形成にグレリンが作用している可能性を示唆するものである。また、グレリン受容体は生殖器にも遺伝子の発現が認められていることから、生殖器の発達、性成熟にも関与していると考えられる。グレリンは未分化細胞の分化促進や細胞増殖作用を持つ可能性があり、傷害組織や臓器の修復・再生に関わる新たな因子と考えられ、老化防止や再生治療薬の開発に繋がることが期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Hayashida T, Nakahara K, Mondal M S, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Murakami N.
Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role.
J Endocrinol, 173: 239-245, 2002.
- ②Okumura H, Nagaya N, Enomoto M, Nakagawa E, Oya H, Kangawa K.
Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach.
J Cardiovasc Pharmacol, 39: 779-783, 2002.
- ③Yoshihara F, Kojima M, Hosoda H, Nakazato M, Kangawa K.
Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation.
Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 5: 391-395, 2002.
- ④Sugino T, Hasegawa Y, Kikkawa Y, Yamaura J, Yamagishi M, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Terashima Y.
A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep.
Biochem Biophys Res Commun, 295: 255-260, 2002.
- ⑤Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, Mondal M S, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K.
Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats.
J Endocrinol, 174: 283-288, 2002.
- ⑥Nakagawa E, Nagaya N, Okumura H, Enomoto M, Oya H, Ono F, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K.
Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose.
Clin Sci(Lond), 103: 325-328, 2002.
- ⑦Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K.
Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin.
Endocrinology, 143: 3341-3350, 2002.
- ⑧Kaiya H, Van Der Geyten S, Kojima M, Hosoda H, Kitajima Y, Matsumoto M, Geelissen S, Darras V M, Kangawa K.
Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity.
Endocrinology, 143: 3454-3463, 2002.
- ⑨Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M.

The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats.

Gastroenterology, 123: 1120-1128, 2002.

- ⑩ Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M, Yahata K, Suganami T, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K.

Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure.

J Am Soc Nephrol, 13: 2748-2752, 2002.

- ⑪ Iwakura H, Hosoda K, Doi R, Komoto I, Nishimura H, Son C, Fujikura J, Tomita T, Takaya K, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Imamura M, Nakao K.

Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I.

J Clin Endocrinol Metab, 87: 4885-4888, 2002.

- ⑫ Sugino T, Yamaura J, Yamagishi M, Ogura A, Hayashi R, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y.

A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep.

Biochem Biophys Res Commun, 298: 785-788, 2002.

- ⑬ Ikezaki A, Hosoda H, Ito K, Iwama S, Miura N, Matsuoka H, Kondo C, Kojima M, Kangawa K, Sugihara S.

Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents.

Diabetes, 51: 3408-3411, 2002.

- ⑭ Kojima M, Kangawa K.

Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract.

Curr Opin Pharmacol, 2: 665-668, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究 5 協力者

細田洋司 (京都大学医学部)

村上 昇 (宮崎大学農学部)

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）

我々は生活習慣病におけるグレリンの臨床的意義を検討した。Zucker 肥満ラットで絶食時の血中グレリン濃度の上昇が遅延し、グレリンの分泌調節が慢性のエネルギー代謝の状況で修飾されることが示された。ヒトグルカゴノーマの1例でグレリン遺伝子発現がノザンプロット解析で検出され、これは世界初の報告である。腎疾患患者で血中グレリン濃度は血清クレアチニン値と正の相関を示し、末期腎不全患者で健常対照群の 2.8 倍に達していた。実験的両側腎摘除マウスで著明な血中グレリン濃度が上昇していた。本研究により、肥満、膵島腫瘍、腎疾患におけるグレリンの病態生理的意義が明らかになった。

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、生活習慣病の一群を形成するが、これらと成人成長ホルモン (GH) 欠損症の類似性が指摘され、また GH は成人においても脂質代謝や体組成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。申請者らは既にグレリンが GH 分泌刺激とは独立に、摂食行動に関与することも報告しており、その他、グレリンが心血管系に対する直接作用や脂肪蓄積作用を有することより、グレリン固有の臨床的意義も注目

される。これらのことをふまえ、本研究では生活習慣病におけるグレリンの臨床的意義の解明と臨床への応用を目指す。本年度は特に肥満動物におけるグレリンの分泌調節、膵島腫瘍組織でのグレリンの発現および、腎疾患患者におけるグレリンの分泌調節を検討した。

B. 研究方法

1) 肥満動物におけるグレリンの分泌調節

ob/ob マウス、Zucker 肥満ラットなどの遺伝性肥満動物の血中グレリン濃度を測定し、絶食による変化を検討した。また、肥満動物にインスリン低血糖を誘発することおよび、グルコースを投与することによって、血糖もしくは血清インスリン濃度とグレリン分泌の関連を検索した。

2) 膵島腫瘍におけるグレリンの発現

ノーザンプロット法および免疫組織化学法により、それぞれ 2 例のグルカゴノーマおよびインスリノーマの腫瘍組織におけるグレリンの発現を検討した。

3) 腎不全患者における血中グレリン濃度

腎不全患者 41 名の血中グレリン濃度を測定した。総グレリンおよび活性型グレリンを区別して解析を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とした研究では、ヘルシンキ宣言を遵守し、常に安全性とプライバシーの保護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) 肥満動物におけるグレリンの分泌調節：

ob/ob マウスでは対照マウスと比べ、約 2 倍の体重を呈し、絶食後の血中グレリン濃度は 0.7 倍であった。BMI 25 以上の肥満患者においても血中グレリン濃度は対照群の 57% に低下していた。グレリン分泌の詳細を Zucker 肥満ラットでさらに検索した。自由摂食下では、血中グレリン濃度は対照ラットと肥満ラットで有意差がなく、24 時間絶食後の肥満ラットにおける血中グレリン濃度は対照ラットの 58% であった。血中グレリン濃度は対照ラットでは 24 時間絶食後に前値の 187% に上昇したが、肥満ラットでは前値の 96% にとどまった。24 時間絶食後の肥満ラットに 8 単位の間中型インスリンを投与すると、血中グレリン濃度は 240 分後に前値の 228% に上昇した。また、24 時間絶食後の対照ラットに 5.0g のグルコースを腹腔内投与すると、血中グレリン濃度は前値の 78% に低下した。

2) 膵島腫瘍におけるグレリンの発現：

1 例の多発性内分泌腺腫症 I 型グルカゴノーマの症例において、グレリンの発現が total RNA を用いたノーザンプロット法および免疫組織化学法で認められ、これは世界初である。しかしながら、血中グレリン濃度に変化は認められなかった。

3) 腎不全患者における血中グレリン濃度：

血中グレリン濃度、とくに総グレリン濃度は血清クレアチニン値と正の相関 ($r=0.62$) を示し、末期腎不全患者においてその値は健常対照群の 2.8 倍に達していた。血中グレリン濃度は、血清 GH 値と正の相関があった ($r=0.49$)。また、実験的に両側腎摘除をしたマウスでは、著明な血中グレリン濃度の上昇が認められた。

D. 考察

肥満動物において絶食刺激に対して、血中グレリン濃度の上昇が遅延すること、および、その機序の少なくとも一部に血糖もしくは血中インスリン濃度が関与することが示された。グルカゴノーマにおけるグレリンの発現は、従来の報告の α 細胞における発現に合致し、膵臓でのグレリンの生理的または病態生理的意義を示唆する。腎不全患者における血中グレリン濃度の上昇は、従来観察されてきた腎不全患者での高 GH 血漿の機序の一部を説明するかもしれない。また、腎不全におけるグレリンの病態生理的意義が今後の課題である。

E. 結論

グレリンの分泌調節が慢性のエネルギー代謝の状況によって修飾を受けることが示された。グレリンが胃のみならず、膵島腫瘍でも発現していることが明らかとなった。血中グレリン濃度が腎疾患患者で血中クレアチニン濃度と正の相関を示し、末期腎不全患者で上昇しており、腎疾患および腎不全におけるグレリンの病態生理的意義が明らかになった。

F. 健康危険情報

ヒトを対象にした研究では、被験者に特記すべき健康上の問題は全く発生していない。また、種々の動物実験および *in vitro* 実験を施行するにあたって、実験者における健康障害または事

故は皆無であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H,
Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y,
Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K,
Nakao K.
Delayed Short-Term Secretory Regulation of
Ghrelin in Obese Animals.
Evidenced by a Specific RIA for the Active Form
of Ghrelin.
Endocrinology, 143: 3341-3350, 2002.
- ②Iwakura H, Hosoda K, Doi R, Komoto I,
Nishimura H, Son C, Fujikura J, Tomita T, Takaya
K, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T,
Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Imamura M,
Nakao K.
Ghrelin Expression in Islet Cell Tumors:
Augmented Expression of Ghrelin in a Case of
Glucagonoma with Multiple Endocrine Neoplasm
Type I.
J Clin Endocrinol Metab, 87: 4885-4888, 2002.
- ③Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M,
Yahata K, Suganami T, Takaya K, Hosoda H,
Kojima M, Kangawa K, Nakao K.
Increased plasma ghrelin concentrations in renal
failure.
J Am Soc Nephrol, 13: 2748-2752, 2002.

ヒトグレリン遺伝子 5' 上流領域のクローニングと機能解析

分担研究者 千原和夫（神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科学教室 教授）

グレリン遺伝子の発現調節機構を解明することは、GH 分泌動態や摂食調節機構を理解する上で重要である。しかしながら、グレリン遺伝子の発現調節機構についての情報は極めて乏しい。今回、私どもは、その機構を明らかにするため、ヒトグレリン遺伝子 5' 上流配列のクローニングと機能解析を試みた。Gene Walker Kit 及び、ゲノムプロジェクトにて公開されたドラフトシーケンスを使用し、ヒトグレリン遺伝子 5' 上流配列の翻訳開始点から-2000bp までをクローニングし、塩基配列を決定した。様々な細胞におけるプロモーター活性を一過性発現系にて検討したところ、胃の内分泌様細胞に由来する ECC10 細胞においてのみ強い活性を認めた。翻訳開始点から-589bp から-579bp にかけて TATATAA 配列を認めたため、この配列が TATA box として機能しているか否か検討した。この配列を変異させたレポーター遺伝子、あるいは削ったレポーター遺伝子を使用し検討した結果、この配列は転写活性に影響を与えず、機能していないものと考えられた。血中グレリンは絶食により上昇するが、同じく絶食によって上昇するグルカゴン及びそのセカンドメッセンジャーである cAMP によるグレリン遺伝子プロモーター活性への影響を検討した。いずれもグレリン遺伝子プロモーター活性を著しく上昇させ、絶食にともなう血中グレリン上昇に、グルカゴンによる遺伝子発現促進が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

グレリンは growth hormone secretagogue (GHS) 受容体の内因性リガンドとして胃から発見された新規ペプチドであり、GH 分泌促進作用ばかりでなく摂食亢進作用等を併せもっている。従って、グレリンの発現調節機構を解明することは、GH 分泌動態や摂食調節機構を理解する上で重要である。しかしながら、グレリン遺伝子の発現調節機構についての情報は極めて乏しい。今回、私どもは、その機構を明らかにするため、ヒトグレリン遺伝子 5' 上流配列のクローニングと機能解析を試みた。

B. 研究方法

- 1) クローンテック社の Gene Walker Kit 及び、ヒトゲノムプロジェクトにて公開されたドラフトシーケンスを使用し、翻訳開始点から-2000bp までをクローニングし、その塩基配列を決定した。
- 2) 5'RACE 法により、転写開始点の検討を行った。
- 3) 翻訳開始点から数えて、-605bp までのヒトグレリン遺伝子 5' 上流配列をルシフェラーゼ遺伝子と結合させたレポーター遺伝子を作成し、様々な細胞 (COS7, HeLa, CHO, PC3, F9, JEG3, MKN1, MKN45, ECC10) に一過性に

発現させ、グレリン遺伝子プロモーター活性を、ルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。

- 4) 種々の長さのヒトグレリン遺伝子 5' 上流配列(翻訳開始点から数えて、-1bp から-2000bp まで、-1bp から-1000bp まで、-1bp から-605bp まで、-1bp から-500bp まで、-1bp から-301bp まで、-1bp から-200bp まで、-1bp から-150bp まで)を含むレポーター遺伝子をそれぞれ作成し、ECC10 細胞にトランスフェクトしたのち、グレリン遺伝子プロモーター活性をルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。
- 5) -585bp から-579bp にかけて、TATATAA という TATA BOX 様の配列が認められたため、この部分に変異を加え、その機能を検討した。
- 6) ECC10 細胞におけるレプチン受容体、インスリン受容体、グルカゴン受容体の発現を RT-PCR にて検討した。
- 7) 血中グレリンは絶食により上昇するが、そのメカニズムは不明である。同じく絶食によって上昇するグルカゴン及びそのセカンドメッセンジャーである cyclic AMP によるグレリン遺伝子プロモーター活性への影響を、ECC10 細胞を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、実験動物を使用していないため、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

- 1)・2) 翻訳開始点から数えて、-33bp のところに主要な転写開始点の存在することが示唆された。転写開始点の上流には典型的な TATA box を認めなかったが、AP2 コンセンサスサイト、bHLH コンセンサスサイト、half ERE、half GRE サイトなど複数の転写因子の結合配列様エレメントをもつこと等が明らかとなっ

た。

- 3) 胃の内分泌細胞に由来する ECC10 細胞においてのみ、グレリンレポーター遺伝子は強いプロモーター活性を示した。
- 4) 翻訳開始点から数えて、-605bp までを含むレポーター遺伝子を使用した時に最も強いプロモーター活性を認め、この領域に転写活性化ならびに、組織特異性、細胞特異性に必要な領域が存在することが示唆された。
- 5) xTATATAA を TGTCTGA あるいは GACATGG に変異させてもレポーター活性に変化は認められなかったが、興味深いことに GCTGACA という配列に変化させた場合には、レポーター活性は増強した。さらに、TATATAA 配列の直下まで deletion を行った場合にもレポーター活性に変化はなかった。これらの結果から、この TATATAA という TATA box 様の配列は機能しておらず、一方、GCTGACA という配列に何らかの因子が作用し得る可能性が示唆された。翻訳開始点から数えて、-505bp から-499bp にかけて、この GCTGACA という配列が存在し、さらに、この部分に変異を加えることにより、グレリンプロモーターの活性は明らかに減弱した。
- 6) ECC10 細胞においてレプチン受容体、インスリン受容体の発現は RT-PCR にて検出し得なかった。一方、グルカゴン受容体の発現は RT-PCR にて確認された。
- 7) グルカゴン及びそのセカンドメッセンジャーである cyclic AMP はいずれもグレリン遺伝子のプロモーター活性を上昇させた。

D. 考察

今回、私どもは、ヒトグレリン 5'上流配列の機能解析を初めて行ったが、この結果、このプロモーターは強い細胞特異性を示した。ECC10 細胞はヒトの胃カルチノイドに由来する細胞で

あり、純粋なグレリン産生細胞に由来する細胞ではない。しかしながら、最近、胃カルチノイドにおいてグレリンの発現を認めたとの報告もあり、ECC10 細胞を使用し、グレリンの発現調節機構の解析をすすめた。他のグループより、マウスのグレリンプロモーターに TATATAA という配列が存在し、TATA box として機能しているであろうとの報告がなされたが、意外にも、私どもの検討では、ヒトグレリンプロモーターにおいて存在した TATATAA 配列は TATA box として機能していないものと考えられた。ヒトとマウスにおいて、グレリン遺伝子の転写調節機構が異なっている可能性も考えられた。

これまで、レプチン、インスリンがグレリンの産生を促進するとの報告がある一方で、レプチン、インスリンがグレリンの産生を抑制するとの報告もあり、これらの因子によるグレリン遺伝子の転写に及ぼす影響の検討を考え、ECC10 細胞におけるレプチン受容体、インスリン受容体の発現を検討したが、ECC10 細胞はこれらの受容体を発現しておらず、少なくとも ECC10 細胞においてはレプチン、インスリンがグレリン遺伝子の転写をそれらの受容体を介して直接調節していないものと考えられた。しかしながら、グレリンと同じく、絶食時に上昇するグルカゴンにも注目し、その受容体の発現を検討したところ ECC10 細胞はグルカゴン受容体を発現しており、さらにはグルカゴン及びそのセカンドメッセンジャーである cyclic AMP はいずれもグレリン遺伝子のプロモーター活性を上昇させた。生体内において、グレリン産生細胞がグルカゴン受容体を発現しているか否かについては不明であるが、最近グルカゴンと同じく、cyclic AMP をセカンドメッセンジャーとする GHRH が下垂体でのグレリンの発現を増強したとの報告もあり、生体内においても、cyclic AMP 系の活性化がグレリン遺伝子の転写を活性化している可能性が考えられる。

E. 結論

- 1) ヒトグレリン遺伝子 5'上流配列の機能解析を初めて行ったところ、このプロモーターは極めて強い組織特異性、細胞特異性を示すことが明らかとなった。
- 2) 絶食にともなう血中グレリン上昇のメカニズムの一つとしてグルカゴンによる転写レベルでの遺伝子発現促進が関与している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

- ①Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem*, 277: 5667-5674, 2002.
- ②Okimura Y, Ukai K, Hosoda H, Murata M, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K. The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely-moving rats. *Life Sciences*, in press, 2003.

2. 学会発表

- ①岸本正彦、置村康彦、竹野亮子、高橋健太郎、工藤 工、櫻井達也、吉岡嗣朗、麓万里子、井口元三、飯田啓二、加治秀介、千原和夫。ヒトグレリン遺伝子 5'上流領域のクローニングと機能解析。第 29 回日本神経内分泌学会、2002。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Growth hormone secretagogue 受容体（GHS-R）発現抑制 トランスジェニックラットの視床下部における摂食関連ニューロンの解析

分担研究者 芝崎 保（日本医科大学第二生理 教授）

Growth hormone secretagogue 受容体（GHS-R）の作用機構を明らかにするため、GHS-R 遺伝子に対するアンチセンスを発現するトランスジェニック（TG）ラットの解析を行った。TG ラットでは、弓状核での GHS-R 陽性細胞数は対照（WT）ラットの約 30%に減少していた。TG ラットの GH-releasing factor（GRF）陽性細胞数は WT ラットの約 57%に有意に減少していたが、NPY 陽性細胞数には WT ラットとの間で差は認められなかった。従って TG ラットで認められる GHS に対する GH 分泌反応の低下には GRF 発現の減少が関与し、GHS による摂食促進作用の消失には NPY ニューロン以外のニューロンが関与していると推測された。GHS-R 発現量と GRF 陽性細胞数との間には正の相関が認められたことから、GRF の発現に GHS-R が関与している可能性が示唆された。TG ラットでは GHS の一種である KP-102 の脳室内投与による弓状核での Fos の発現は有意に低下し、GHS-R の減少を反映していると考えられた。室傍核で KP-102 により Fos が発現したニューロンは主として ACTH 放出因子（CRF）ニューロンであったことから GHS による ACTH 分泌には主に CRF が関与していると推測された。

A. 研究目的

Growth hormone secretagogue（GHS）は一連のペプチドあるいは非ペプチド性の合成物質で、強力な成長ホルモン（GH）分泌作用を有する（1）。GHS は GHS 受容体（GHS-R）を介して作用するが（2）、近年、GHS-R の内因性のリガンドとして胃の抽出物よりグレリンが単離された（3）。グレリンは 28 個のアミノ酸からなり、3 番目のセリン残基が n-オクタノイル化されたペプチドである。グレリンおよび GHS は摂食行動や GH 分泌を促進する以外に、末梢では代謝系や循環器系に作用することが報告されている（4、5）。しかし、内因性グレリンの作用機構については未だ明らかではない。我々はグレリンおよび GHS の視床下部におけ

る作用を阻害するため、視床下部の弓状核に強く発現している tyrosine hydroxylase（TH）のプロモーターの下流に GHS-R のアンチセンスを挿入した導入遺伝子を用いて GHS-R 発現抑制トランスジェニック（TG）ラットを作製した（6）。ウェスタンブロット法にて本 TG ラットでは、弓状核における GHS-R 発現が低下していることを確認している。TG ラットでは同週齢の対照（wild type:WT）ラットと比較して低体重、一日摂取量の減少、低体脂肪、GHS による摂食促進作用の欠如や成長ホルモン（growth hormone: GH）の分泌反応の抑制を呈していた。

本年度の研究では、まず第一に弓状核における GHS-R と growth hormone-releasing

factor (GRF) および neuropeptide Y (NPY) ニューロンの発現との関係の有無を明らかにする目的で、TG ラットと WT ラットの弓状核における GHS-R の発現量、NPY ニューロン、GRF ニューロンの定量を行った。正常ラットへの GHS の投与により GH のみならず副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotropin: ACTH) の分泌が亢進することが報告されているが、その機序は不明である。そこで、次にこの機序を明らかにする目的で GHS の一つである KP-102 を TG ラットと WT ラットに投与し、弓状核と室傍核での Fos 発現について比較検討した。

B. 研究方法

1) GHS-R、GRF、NPYの免疫組織化学

8 週齢の WT ラットと TG ラットの脳室内に留置したカニューレを介しコルヒチン (100 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) を投与し、48 時間後に 4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、弓状核を含む 20 μm 毎の連続切片を作製した。以前報告した GHS-R の第 3 ループに対する抗体 (7)、抗 GRF 抗体 (8)、抗 NPY 抗体 (9) を用いて ABC 法により免疫染色を行った。各抗体に対する染色は同一ラットについて 60 μm 毎の切片を用いて、各陽性細胞数を定量した。

2) KP-102による視床下部でのFosの発現

8 週齢の WT ラットと TG ラットの側脳室に留置したカニューレを介して KP-102 (100 pmol / 2 μl) または生理食塩水を投与した。90 分後に灌流固定し、ABC 法にて Fos 発現を免疫組織化学的に検討した。室傍核の直前から尾側に向かって 40 μm の冠状切片を 50 枚作成し、弓状核と室傍核の Fos 陽性細胞を各切片毎に定量し、各群で比較した。

3) KP-102による視床下部でのFos発現ニューロンの同定

WT ラットを用いて Fos と corticotropin-

releasing factor (CRF) または arginine vasopressin (AVP) について二重染色を行い、視床下部の KP-102 による Fos 発現ニューロンを解析した。

C. 研究結果

1) GHS-R、GRF、NPYの免疫組織化学

TG ラットでは WT ラットと比較して弓状核での GHS-R 陽性細胞数が約 30% に減少していた (図 1-a)。既に報告しているように GHS-R のウエスタンブロットでは、視床下部腹内側核の GHS-R 量は TG と WT ラットとの間に差を認めなかったが、弓状核の GHS-R 量は TG ラットで減少していた (10)。今回の免疫組織化学的定量結果はこの結果と一致していた。

弓状核の外側部に認められる GRF ニューロンは、TG ラットで WT ラットの 57% にまで有意に減少していた (図 1-b)。WT ラット、TG ラットともに弓状核の内側部に NPY ニューロンが認められ、両ラット間でその数に有意差は無かった (図 1-c)。

TG ラットにおいて GHS-R 陽性細胞数と GRF ニューロン数が WT ラットに比べ減少していたため、両ラット群の GHS-R 陽性細胞数と GRF ニューロンの関係を検討した結果、GHS-R 陽性細胞数と GRF ニューロン数の間には正の相関が認められた (図 2)。

2) 視床下部でのKP-102によるFosの発現

KP-102 投与による弓状核での Fos の発現を定量した。WT ラットでは KP-102 の投与により生理食塩水投与群と比較し弓状核に Fos 発現の有意な増加を認めた。TG ラットでは KP-102 の投与による弓状核での有意な Fos 発現の増加は認められず、その発現量は WT ラットと比較し有意に減少していた (図 3-a)。

KP-102 投与による室傍核での Fos の発現は WT ラットでは有意に増加したが、TG ラットでは生理食塩水投与群と比較し Fos 発

現量の有意な増加を示さなかった。TG ラットでの Fos の発現量は WT ラットと比較し減少傾向を示した (図 3-b)。

3) 視床下部での KP-102 による Fos 発現ニューロンの同定

KP-102 投与により室傍核において Fos が発現したニューロンを同定するため、Fos と CRF または AVP の二重染色を行った。Fos の発現は主に室傍核の小細胞領域に認められ、Fos が発現したニューロンは主として CRF ニューロンであり、AVP ニューロンとの共存像はほとんど認められなかった (図 4)。

D. 考察

本研究で用いた GHS-R のアンチセンス遺伝子を発現する TG ラットでは弓状核の GHS-R 発現は低下しており、グレリン/GHS の中枢作用の一部が阻害されていると考えられる。グレリン/GHS は GH の分泌を促進する。GHS による GH 分泌促進作用は抗 GRF 抗体の投与により抑制され (11)、GHS の投与は GRF ニューロンに c-fos の発現をもたらす (12) ことから GHS の GH 分泌促進機序には GRF が関与していると考えられている。我々は TG ラットでは GHS の投与による GH の分泌促進作用が抑制されていることを報告しているが (10)、この機序には少なくとも GRF ニューロンの減少が関与していることが今回の免疫組織化学的検討の結果から明らかになった。GHS-R 発現が低下している TG ラットでは GRF ニューロン数が減少し、GHS-R の発現量と GRF ニューロン数に正の相関が認められたことから GHS-R が GRF ニューロンの発現調節に関与している可能性が示唆された。

GHS の中枢投与により NPY ニューロンに c-fos が発現すること (13)、NPY は摂食行動を促進することから、グレリン/GHS は

NPY/AGRP を介して摂食を促進すると考えられている。しかしながら TG ラットでは WT ラットと同様に NPY ニューロン数が保たれているにもかかわらず、GHS による摂食促進作用が欠如している (10)。この結果の説明とし、TH が視床下部弓状核において NPY ニューロンと共存しないという事実 (14) から、TG ラットでは NPY ニューロンに発現している GHS-R の数や機能は正常に保たれていると考えられるため、同ラットで KP-102 に対する摂食促進作用が消失している機序には GHS-R と TH の両者を発現する未同定のニューロンが関与していると考えられる。

GHS の一つである KP-102 を TG ラットに投与すると弓状核における Fos の発現量は減少した。これは弓状核での GHS-R が減少したことを反映した結果であると考えられる。また KP-102 による Fos の発現が WT ラットの室傍核では増加し、TG ラットでは減少傾向を示したことは、我々の抗 GHS-R 抗体を用いたウェスタンブロットおよび免疫組織化学的検討で室傍核において GHS-R 様免疫活性が認められなかったことから、弓状核の GHS-R を有するニューロンが間接的に室傍核のニューロンに Fos 発現をもたらすと推測される。

グレリン/GHS の投与によりヒト、ラットにおいて血中 ACTH が増加することが報告されている (15、16)。ヒトでは GHS と AVP の同時投与により ACTH 分泌促進作用に相加効果が認められないことから GHS の作用は AVP を介した作用であると推測されている (15)。一方ラットではヒトの成績と異なり、同様の実験結果から GHS による ACTH の分泌促進作用は CRF を介した作用であると推測されている (16)。今回の我々の結果から GHS の投与により Fos の発現が認められたニューロンは主として CRF ニューロンであったことからラットでのグレリン/GHS の投与による血中 ACTH 分泌

促進は主に CRF を介した作用と推測される。

E. 結論

GHS-R アンチセンス導入 TG ラットでは視床下部弓状核の GHS-R の発現量が減少し、NPY ニューロン数には変化が認められなかったが、GRF ニューロン数は減少していた。したがって GHS による GH 分泌が TG ラットで減弱している機序には GRF ニューロンの減少が関与していると考えられる。さらに同ラットでの GHS による摂食促進作用の消失には NPY ニューロン以外の GHS-R を有するニューロンの機能低下が関与していると推測される。GHS の投与による ACTH 分泌促進作用には CRF が主に関与していると推測される。

F. 健康危険情報

なし

参考文献

1. Everitt B J, Hökfelt T, Terenius L, Tatemoto K, Mutt V, Goldstein M.
Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat.
Neuroscience, 11: 443-462, 1984.
2. Yamauchi N, Shibasaki T, Ling N, Demura H.
In vitro release of growth hormone-releasing factor (GRF) from the hypothalamus: somatostatin inhibits GRF release.
Regul Pept, 33: 71-78, 1991.
3. Shibasaki T, Oda T, Imaki T, Ling N, Demura H.
Injection of anti-neuropeptide Y gamma-globulin into the hypothalamic paraventricular nucleus decreases food intake in rats.
Brain Res, 601: 313-316, 1993.
3. Yamauchi N, Shibasaki T, Ling N, Demura H.
In vitro release of growth hormone-releasing factor (GRF) from the hypothalamus: somatostatin inhibits GRF release.
Regul Pept, 33: 72-78, 1993.
4. Banerjee S A, Roffler-Tarlov S, Szabo M, Frohman L, Chikaraishi D M.
DNA regulatory sequences of the rat tyrosine hydroxylase gene direct correct catecholaminergic cell-type specificity of a human growth hormone reporter in the CNS of transgenic mice causing a dwarf phenotype.
Mol Brain Res, 24:89-106, 1994.
6. Okada K, Ishii S, Minami S, Sugihara H, Shibasaki T, Wakabayashi I.
Intracerebroventricular administration of the growth hormone-releasing peptide KP-102 increases food intake in free-feeding rats.
Endocrinology, 137: 5155-5158, 1996.
7. Howard A D, Feighner S D, Cully D F, Arena J P, Liberators P A, Rosenblum C I, Hamelin M, Hreniuk D L, Palyha O C, Anderson J. et al.
A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release.
Science, 273: 974-977, 1996.
8. Kamegai J, Hasegawa O, Minami S, Sugihara H, Wakabayashi I.
The growth hormone-releasing peptide KP-102 induces c-fos expression in the arcuate nucleus.
Mol Brain Res, 39: 153-159, 1996.
9. Smith R G, Van der Ploeg L H T, Howard A D, Feighner S D, Cheng K, Hickey G, Wyvratt M, Fisher M, Nargund R, Patchett A.
Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion.
Endocr Rev, 18: 621-645, 1997.
10. Dickson A L, Luckman S M.