

20030170

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者のソマトポーズとエネルギー代謝に及ぼす
新規ホルモン グレリンの役割と臨床応用

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成16（2004）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

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者のソマトポーズとエネルギー代謝に及ぼす
新規ホルモン グレリンの役割と臨床応用

平成15年度 総括・分担研究報告書

高齢者のソマトポーズとエネルギー代謝に及ぼす新規ホルモン グレリンの役割と臨床応用

主任研究者 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

新規ホルモン；グレリンの生体機能調節や高齢者におけるソマトポーズとの関連を明らかにするために、基礎と臨床の両面から検討を行い、次のような成果を得た。グレリンのアシル化基質として食餌中の脂肪酸が使用されることを、脂肪酸修飾部位に特異的なラジオイムノアッセイとグレリン C 末端に特異的なラジオイムノアッセイを用いて証明した。グレリンの同化促進作用がグレリン受容体(GHS-R)発現抑制トランスジェニックラットの機能解析からも明らかになった。また、グレリンやCCKによる空腹または満腹シグナルの伝達が、迷走神経求心線維末端の受容体レベルで制御されている可能性が示唆された。加齢マウスにおいて低用量のグレリン投与による体重増加が認められ、高齢者においてもグレリンの摂食亢進・体重増加作用の発現が十分に期待できるものと考えられた。ヒトグレリン遺伝子のプロモーター解析により、グレリン遺伝子発現調節機構の詳細な検討が可能となった。さらに胃切除術後症例でのグレリン動態や臨床第Ⅰ相試験の結果から、グレリン投与がソマトポーズやエネルギー代謝異常にだけでなく、カヘキシアや神経性食思不振の治療にも応用できる可能性が示された。

〔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教授）
- 芝崎 保（日本医科大学第二生理学教授）
- 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）
- 児島将康（久留米大学分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門教授）
- 赤水尚史（京都大学医学部附属病院探索医療センター探索医療開発部長）
- 中里雅光（宮崎大学医学部第三内科教授）

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、老化の抑制などに深く関与するホルモンである。ヒトやラットなどの哺乳類のGH分泌は思春期をピークとして以後減退する。脂肪分解、細胞増殖、筋・骨形成などの作用を有するGHの分泌低下は、ソマトポーズとよばれ、筋肉と骨量の低下および内臓脂肪蓄積型肥満などをもち、生活の質(QOL)の低下を引き起こす。代表研究者らが発見・構造決定した新規成長ホルモン分泌促進ペプチド；グレリンは、下垂体からの成長ホルモン分泌促進作用に加え、摂食亢進作用やエネルギー代謝調節ならびに循環器系の調節にも作用する。グレリンは、主に胃で産生・分泌され、迷走神経求心路の電気活動を抑制することにより、GH分泌や空腹に関する情報を視床下部に伝達する。胃におけるグ

レリンの発見は、これまで主に脳の視床下部により調節されていると考えられていた GH 分泌が、消化管で産生されるホルモンによっても調整されているという新たな概念を打ち立てるとともに、治療薬としてのさまざまな可能性を期待させるものである。本研究では、基礎と臨床の研究者が共同で、グレリンの生体機能調節や高齢者におけるソマトポーズとの関連を明らかにし、超高齢化社会における高齢者の QOL の向上に向けた臨床応用を目指したい。

B. 研究方法

本年度は、グレリンによる老化制御の可能性に焦点をあてて、以下のような広範な検討を行った。

- 1) 脂肪酸摂取によるグレリンのアシル効果とソマトポーズ治療への応用
- 2) グレリン受容体発現とソマトポーズとの関連
- 3) 高齢者の生活習慣病におけるグレリンの作用機構
- 4) 加齢マウスにおけるグレリン血漿濃度と摂食および体重増加作用
- 5) 加齢に伴う胃グレリン発現の変動およびその発現機構
- 6) ヒトグレリン遺伝子の発現調節機構に関する検討
- 7) 胃切除術後症状の病態解明とグレリン臨床研究の展望
- 8) グレリンの臨床第 I 相試験の結果

(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際には、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) 脂肪酸摂取によるグレリンのアシル化効果とソマトポーズ治療への応用

グレリンは 28 個のアミノ酸よりなり、3 番目のセリンがオクタン酸で修飾されている。この

脂肪酸による修飾がグレリンの生物活性発現に必須であるが、その修飾機序は不明である。児島は、マウスにトリアシルグリセリドを混ぜた餌を摂取させ、胃のグレリン含量とその分子型を検討した。その結果、炭素数 6 個から 10 個の脂肪酸からなるトリアシルグリセリドをマウスに摂取させると、総グレリン含量とグレリン遺伝子発現には変化がないが、摂取した脂肪酸の炭素数で修飾されたグレリンが増加することが明らかになった。これらの結果は、食餌中の脂肪酸が直接グレリンの脂肪酸修飾基として利用されることを示しており、脂肪酸の摂取は活性型グレリンを増加させ、GH 分泌低下によって起こるソマトポーズの治療に応用できる可能性を示している。

2) グレリン受容体(GHS-R)発現とソマトポーズとの関連

芝崎は、グレリンの視床下部におけるエネルギー代謝調節作用を解明するために、視床下部のグレリン受容体(GHS-R)発現を抑制したトランスジェニック(Tg)ラットのエネルギー代謝について解析した。高脂肪食を与えた Tg ラットでは、対照群に比べ白色脂肪重量は有意に減少し、褐色脂肪重量が有意に増加していた。さらに Tg ラットでは、褐色脂肪組織の UCP1 遺伝子発現が増加し、酸素消費量、二酸化炭素産生量、直腸温も有意に高値であった。これらの知見は、グレリンのエネルギー蓄積作用を受容体側から証明したもので、グレリンのソマトポーズ治療への新たな方向性を示すものとして有用である。

3) 高齢者の生活習慣病におけるグレリンの作用機構

グレリンおよび CCK は、迷走神経求心線維を介して、空腹情報や満腹情報を中枢に伝達する消化管ペプチドである。中里は、末梢で産生されるホルモンの情報伝達やそれらの分泌制御に対する自律神経機構の重要性に着目し、グレリンおよび CCK の短期摂食調節における相互作用を 2 型糖尿病モデルである CCK-A 受容体欠損ラット(OLETF ラット)を用いて検討した。グレリンあるいは CCK を先行投与すると、各々引き続き投与した CCK やグレリンの中枢への

情報伝達が遮断された。グレリン受容体と CCK-A 受容体は、大多数が迷走神経節の同一ニューロンで産生されており、迷走神経求心線維はグレリンや CCK の情報を末梢の受容体レベルで制御している可能性がある。高齢者糖尿病の合併症の一つである自律神経機能障害や加齢に伴う自律神経系のトーンスの変化などは、グレリンおよび CCK の情報伝達に影響を及ぼす可能性があり、高齢者の摂食障害やソマトポーズの要因となることが示唆された。

4) 加齢マウスにおけるグレリンの血漿濃度と摂食および体重増加作用

寒川は、高齢者のソマトポーズにおけるグレリンの関与、およびその臨床応用の可能性を検討する目的で、若年および加齢マウスにおけるグレリンの血中濃度を検索し、さらに、それらにおけるグレリンの摂食亢進・体重増加作用を比較検討した。血漿総グレリン濃度は加齢とともに増加し、加齢マウスでは若年マウスの約 2 倍に達していた。また、グレリンは加齢マウスにおいても体重増加をもたらす、特に、低用量グレリンに対しては加齢マウスにのみそれが認められた。これらのことは、ソマトポーズの成因に血漿グレリン濃度が関与しない可能性、および、加齢マウスにおいてもグレリンが十分な摂食亢進・体重増加作用を有していることを示す。以上のことは、高齢者におけるグレリンの臨床応用を考える上で重要な知見であると考えられる。

5) 加齢に伴う胃グレリン発現の変動およびその発現機構

千原は、グレリン発現と加齢に伴う成長ホルモン (GH) 分泌低下の関連を明らかにするために、ラット胃グレリン mRNA 量の加齢による変動を RT-PCR で検討した。また、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行った。高齢ラットでは若年ラットに比べ胃グレリン mRNA 量は低下していた。グレリン遺伝子プロモーターは、検索し得た細胞株のなかでは胃カルチノイドに由来する ECC10 細胞においてのみ強い活性を示し、-447 から-402、および-301 から-268 の遺伝子領域が、その特異的発現に重要であることが明らかとなった。

グレリン発現低下が加齢に伴う GH 分泌低下に関与する可能性も考慮する必要があり、その解析のための系が確立できた。

6) ヒトグレリン遺伝子の発現調節機構に関する検討

中尾は、高齢者ソマトポーズに対する分子標的薬・ゲノム創薬による治療薬の開発に向けて、ヒトグレリン遺伝子 5' 上流領域の構造およびプロモーター活性の解析を行った。TT 細胞を用いたルシフェラーゼ解析によって、翻訳開始点より-193 から-349 および-1010 から-1409 にプロモーター活性の上昇を認めた。これらの領域に存在する種々のコンセンサス配列のうち、bHLH 型転写因子の結合する E-box に変異を導入し、活性の低下を確認した。ゲルシフトアッセイにて bHLH-LZ 型転写因子である USF (Upstream stimulatory factor) との特異的な結合が認められ、USF がヒトグレリン遺伝子発現に関与していることが示唆された。今後の検討によりグレリン遺伝子の発現調節機構の詳細なネットワークや相互作用を明らかにし、ソマトポーズに対する治療薬の開発に応用したいと考えている。

7) 胃切除術後症状の病態解明とグレリン臨床研究の展望

山下は、胃切除術後の患者 QOL の低下とグレリンとの関連を明らかにするために、胃全摘、亜全摘、および膵頭十二指腸切除などの 53 症例を対象とし、グレリンの血中動態とその意義を検討した。長崎大学倫理委員会の承認後、インフォームドコンセントの得られた治療切除可能な胃切除予定症例、および術後 6 ヶ月以上経過し再発の認められない症例に関し、グレリンの測定を行った。胃摘術後の食欲低下や体重減少とグレリンの低下は相関する結果が得られた。胃全摘出術後に認められる様々な機能障害の病態メカニズムにグレリン欠乏が関与している可能性が示唆された。

8) グレリンの臨床第 I 相試験の結果

赤水は、グレリンの多彩な生理作用を利用した臨床応用の第一段階として、臨床第 I 相試験を施行した。18 人の健常人ボランティアに対してグレリンまたはプラセボを投与するランダム

化二重盲検試験を施行し、グレリンの GH 分泌や空腹度への影響を検討した。グレリン投与によって、血清 GH と空腹度への影響に関する検討では、有意ではないが用量依存的な上昇傾向が観察された。安全性に関しても、少数例において軽度のほてり感、軽度の腹部症状、発汗を自覚したのみで、その他に特記すべきものは認められなかった。以上より、臨床第 I 相試験によってグレリンの臨床効果と安全性が確認された。今後、高齢者患者などへの投与を行う臨床第 II 相試験の準備を進めていく予定である。

E. 結論

本年度は、グレリンのアシル化機構や加齢動物におけるグレリン動態の検討により、グレリンの老化制御の可能性およびソマトポーズの治療応用に向けての基盤となる多くの知見を得ることができた。

脂肪酸摂取によりアシル化（活性型）グレリンが増加することは、脂肪酸摂取がソマトポーズの治療に応用できる可能性を示すだけでなく、これまで不明であったグレリンのアシル化機構の解明に繋がる重要な知見である。

低用量グレリンの加齢マウスへの投与は、体重増加をもたらし、この効果は若年マウスでは見られなかった。この結果は、グレリンが高齢者においても摂食亢進や体重増加に作用することを示唆しており、グレリンのソマトポーズ治療薬への応用が期待される。

短期摂食調節に関与するグレリンあるいは CCK に対する受容体の大部分は、迷走神経節の同一ニューロンで産生され、神経末端に軸索輸送される。これらのことは、摂食や肥満に関連する末梢パラメーターの伝達が、迷走神経末端の受容体レベルで効率よく制御されていることを示している。以上の結果から、糖尿病の神経障害や高齢者の自律神経障害に基づく空腹および満腹情報の伝達異常が、肥満や摂食障害の要因となる可能性であることが示唆された。

ヒトグレリン遺伝子 5' 上流配列の構造およびプロモーター解析を行い、転写レベルでの遺伝子発現調節を検討できる系が確立された。加齢に伴うグレリン遺伝子の発現調節機構や、グレ

リン遺伝子発現に関与する種々の転写因子の解析が可能になり、ソマトポーズに対するゲノム創薬の重要なツールになると考えられる。

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た機能解析では、グレリンがエネルギー蓄積機序に促進的に作用することが受容体側からも明らかになった。今後の課題である加齢に伴うグレリン受容体発現の検討は、老化のメカニズムの解明やグレリンのソマトポーズへの臨床応用に繋がるものと考えられる。

胃摘出術後症例のグレリン動態の検討により、グレリン欠乏が実際に術後の食欲低下や体重減少に関与している可能性が示された。臨床第 I 相試験ではグレリン投与により空腹度の上昇傾向が見られ、カヘキシアや摂食障害患者への臨床応用の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

加齢マウスにおけるグレリンの血漿濃度と摂食および体重増加作用

主任研究者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 部長

ソマトポーズにおけるグレリンの関与、およびその臨床応用の可能性を検討する目的で、若年および加齢マウスにおけるグレリンの血中濃度を検索し、さらに、それらにおけるグレリンの摂食亢進・体重増加作用を比較検討した。血漿総グレリン濃度は加齢とともに増加し、加齢マウスでは若年マウスの約 2 倍に達していた。また、グレリンは加齢マウスにおいても体重増加をもたらす、特に、低用量グレリンに対しては加齢マウスにのみそれが認められた。これらのことは、ソマトポーズの成因に血漿グレリン濃度が関与しない可能性、および、加齢マウスにおいてもグレリンが十分な摂食亢進・体重増加作用を有していることを示す。以上のことは、高齢者におけるグレリンの臨床応用を考える上で重要な結果であると考えられる。

A. 研究目的

近年、成長ホルモン(GH)が脂質代謝や精神活動などに重要な役割を有しており、成人においても不可欠なものであることが明らかになりつつある。また、GHの分泌は思春期以降、加齢とともに低下するため、脂質代謝異常やQOLの低下など、加齢に伴って高頻度に認められる種々の病態が、GH分泌の低下に起因するという、いわゆるソマトポーズ仮説が提唱されてきた。しかしながら、いまだこの仮説については不明なところが多く、GHの分泌低下の機序についても明確ではない。

一方、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(GHS-R)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。グレリンは主に胃から分泌されるが、その産生細胞は既知の消化管ホルモンとは異なり、胃における主要な内分泌細胞であるにもかかわらずそれまで役割が不明であったX/A様細胞であることを明らかにした。また、グレリンは小腸や膵臓でも胃に比べると低レベルながら産生され、さらに脳内では脳視床下部の弓状核とその周囲でも産生される。グレリン

は、強力なGH分泌促進作用を有し、また、エネルギー代謝調節にも重要な作用をもつ新規ホルモンである。このため、その発見以来、グレリンとソマトポーズとの関連が示唆されてきた。一方で、グレリンは動物やヒトにおいて摂食を亢進し、体重増加をもたらすため、その同化作用を利用した臨床応用が期待されている。しかしながら、従来、グレリンの作用は主として若年動物や比較的若年のヒトにおいて研究がなされており、加齢動物や高齢者における作用は不明であった。

これらのことをふまえ、本年度では加齢動物の血漿グレリン濃度を検討することによってグレリンのソマトポーズへの関与を検索するとともに、加齢動物にグレリンを投与することによってその摂食亢進・体重増加作用を検討した。

B. 研究方法

1) 血漿グレリン濃度の測定

6、12、および、65週齢の雄性C57BL/6Jマウスを用いた。マウスは12時間明暗サイクルの室温・湿度一定の条件下で飼育した。12時間の絶食の後、エーテル麻酔下で下大静脈より採血を行った。血液サンプルは血漿分離し、グレリン

ン C 末端認識抗体を用いた RIA 法に供し、総グレリン濃度の測定を行った。

2) 若年マウス、加齢マウスにおけるグレリンの摂食亢進・体重増加作用

6、12、および、65 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを用いた。マウスは 12 時間明暗サイクルの室温・湿度一定の条件下で個別のケージにて飼育し、自由摂餌・摂水とした。ラット・グレリンは 40 pmol/g と 200 pmol/g の 2 つの用量を用い、生食にて溶解した後、午前 8 時と午後 5 時の 2 回、マウスの皮下に投与した。体重は毎日、午前 8 時に測定した。また、実験開始日と 5 日目に餌量を測定し、累積摂餌量とした。各群は 7 匹ずつ使用した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際してはその愛護に留意し、投与実験や屠殺の際に苦痛を最小限にとどめるように十分に配慮した。

C. 研究結果

1) 血漿グレリン濃度

6、12、および 65 週齢マウスの血漿総グレリン濃度はそれぞれ 675.6 ± 52.9 、 1026.3 ± 73.9 、および 1362.4 ± 49.4 fmol/ml であった。6 および 12 週齢マウス、6 および 65 週齢マウス、12 および 65 週齢マウスの差は統計的に有意であった。

2) 若年マウスにおけるグレリンの体重増加作用

実験開始時の生食、低用量グレリン、および高用量グレリン投与群の体重に有意差はなかった。生食投与群では 5 日後の体重は 22.8 ± 0.3 g であった。低用量、高用量グレリン投与群の 5 日後の体重はそれぞれ 22.9 ± 0.4 および 23.7 ± 0.3 g であった。また、このときの体重増加量は生食、低用量グレリン、高用量グレリン投与群でそれぞれ 0.6 ± 0.2 、 0.7 ± 0.1 、および 1.6 ± 0.1 g であった。生食投与群での体重増加は、マウスの自然な成長に対応していると考えられる。生食と高用量グレリン投与群、および低用量グレリンと高用量グレリン投与群の間の差はそれぞれ有意であったが、生食と低用量グレリン投与群の間の差は、有意ではなかった。

3) 加齢マウスにおけるグレリンの体重増加作用

実験開始時の生食、低用量グレリン、および高用量グレリン投与群の体重に有意差はなかった。生食投与群では 5 日後の体重は 34.1 ± 0.4 g であり、開始時のそれと有意な差を認めなかった。低用量グレリンおよび高用量グレリン投与群では 5 日後の体重は 34.9 ± 0.3 および 35.5 ± 0.6 g であった。生食と低用量グレリン投与群、および、生食と高用量グレリン投与群の間の差は、それぞれ有意であった。

4) グレリンの投与による摂餌量の増加

6 週齢マウスにおける 5 日間の累積摂餌量は、生食、低用量グレリン、高用量グレリン投与群で、それぞれ 13.5 ± 0.3 、 15.0 ± 0.4 、および、 16.6 ± 0.4 g であった。生食と低用量グレリン投与群、および、生食と高用量グレリン投与群の間の差は、それぞれ有意であった。65 週齢マウスにおける 5 日間の累積摂餌量は、生食、低用量グレリン、高用量グレリン投与群で、それぞれ 14.5 ± 0.7 、 16.4 ± 0.4 、および 18.3 ± 0.7 g であった。生食と低用量グレリン投与群、および、生食と高用量グレリン投与群の間の差は、それぞれ有意であった。

D. 考察

血漿グレリン濃度は若年マウスに比べ、加齢マウスでは高値であった。本研究では、マウスの血漿総グレリン濃度は加齢とともに増加し、12 および 65 週齢のマウスでは 6 週齢のマウスのそれぞれ 1.5 および 2.0 倍に達していた。加齢動物や高齢者における血漿グレリン濃度については、これまでさまざまな研究結果が提出されてきたが、いまだ結論をつけるまでに至っていなかった。グレリンは摂食をはじめとする種々の因子によってその分泌が調節されているため、報告によって採血の条件が一定せず、結果が異なっていた可能性がある。前述のごとく従来、ソマトポーズの成因に、加齢によるグレリンの分泌低下の関与が示唆されてきたが、本研究は、少なくともマウスにおいては、グレリンの基礎分泌が加齢に伴って低下するものではないことを示した。血漿グレリン濃度は、加齢に伴う GH の分泌低下およびソマトポーズの成因に直接関

与しないことが示唆される。今後、ヒトでのさらに詳細な検討が期待される。

グレリンの分泌調節については未だ不明なところがある。分担研究者らが示したように、血漿グレリン濃度は急性および慢性の摂食状態によって変化し、インスリン抵抗性の程度によっても分泌が変化する。しかしながら、本研究で認められた加齢動物における血漿グレリン濃度の増加は、これらの要因によるものではなさそうである。一般に、加齢動物では若年動物に比べ、体脂肪率は高く、インスリン抵抗性を認め、血糖はより高値だからである。加齢動物におけるグレリンの分泌調節については今後さらに詳しい検討が必要である。

本研究ではグレリンの末梢投与による摂食亢進・体重増加作用を確認した。若年マウスにおいて、高用量グレリンによる5日間の体重増加は、生食投与群の約2.3倍に達したが、低用量グレリンは、生食と比較して、有意な体重増加をもたらさなかった。若年マウスでは自然な状態でも成長による体重増加が認められ、低用量のグレリンはその体重増加を凌駕し得ないと考えられる。しかしながら、低用量グレリン投与群においても累積摂餌量は生食群に比べ、有意に多かった。このことは低用量グレリンが若年マウスに摂食亢進作用をもたらすものの、エネルギー消費の増大などにより相殺され、体重の増加に至らなかったと考えられる。

一般に、摂食とエネルギー代謝の調節機構は加齢による変化を受ける。既報によると、肥満とともに脂肪細胞より分泌される摂食抑制ホルモン・レプチンの血中濃度は加齢とともに増加する一方、レプチンに対する反応性は加齢動物において障害されているという。本研究においては加齢マウスにおけるグレリンの反応を検索したが、加齢マウスはグレリンに対して良好な反応を示し、摂食の亢進と体重増加が観察された。高用量グレリンによる5日間の体重増加量は、生食投与群の16倍に達した。また、加齢マウスにおいては、生食投与群における体重増加が若年マウスに比べ、きわめて緩やかで、5日間ではほとんど体重の増加を認めなかった。加齢マウスにおいては若年マウスに比べ、摂食に関

する抑制性の生体内シグナルが強いのかも知れない。興味深いことに、これらのマウスにおいても、低用量のグレリンは有意な体重増加をもたらした。その増加量は生食投与群の9倍に達した。このことは、レプチンと異なり、摂食亢進作用に関する限り、加齢動物においてもグレリンに対する反応性が保たれていること、または、状況によれば、その反応性が強く表れる場合があることを示す。

グレリンの連続投与による累積摂餌量の増加は、若年マウス、加齢マウス両者において、グレリンの用量に依存した。低用量グレリンは若年、加齢マウスにおいてそれぞれ11%および16%の摂餌量の増加をもたらした。また、高用量グレリンはそれぞれ、23%および30%の増加をもたらした。すなわち、摂食量をパラメータとした場合も、加齢マウスにおいてグレリンの反応性が保たれていることが確認された。上述のごとく、若年マウスにおいては摂餌量の増加にもかかわらず、有意な体重増加を認めなかったが、摂餌の増加に伴うエネルギー消費の増大がその原因かもしれない。

E. 結論

本研究では、加齢マウスにおいて血漿総グレリン濃度は若年マウスよりも高いことを示した。また、加齢マウスにおいて外来性のグレリンに対する摂食亢進・体重増加作用に対する反応性は保たれていることを示した。

これらの結果は、ソマトポーズにおけるグレリンの役割、および、ヒトに対するグレリンの臨床応用の実際を考える上で重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kitamura S, Yokota I, Hosoda H, Kotani Y, Matsuda J, Naito E, Ito M, **Kangawa K**, Kuroda Y. Ghrelin concentration in cord and neonatal blood: relation to fetal growth and energy balance. J Clin

- Endocrinol Metab, 88: 5473- 5477, 2003.
- ②Nakahara K, Hayashida T, Nakazato M, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Effect of chronic treatments with ghrelin on milk secretion in lactating rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 303: 751- 755, 2003.
- ③Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Moriyama S, Takahashi A, Kawauchi H, Kangawa K. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*, 144: 5215- 5226, 2003.
- ④Hataya Y, Akamizu T, Hosoda H, Kanamoto N, Moriyama K, Kangawa K, Takaya K, Nakao K. Alterations of plasma ghrelin levels in rats with lipopolysaccharide-induced wasting syndrome and effects of ghrelin treatment on the syndrome. *Endocrinology*, 144: 5365- 5371, 2003.
- ⑤Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley L G, Hirano T, Grau E G, Kangawa K. Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 135: 421- 429, 2003.
- ⑥Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K. Plasma levels of active form of ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 149: R1- 3, 2003.
- ⑦Enomoto M, Nagaya N, Uematsu M, Okumura H, Nakagawa E, Ono F, Hosoda H, Oya H, Kojima M, Kanmatsuse K, Kangawa K. Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. *Clin Sci (Lond)*, 105: 431- 435, 2003.
- ⑧Sakata I, Yamazaki M, Inoue K, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett*, 342: 183- 186, 2003.
- ⑨Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang D F, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K, Toyoda N. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 88: 2335- 2340, 2003.
- ⑩Sugino T, Yamaura J, Yamagishi M, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y. Involvement of cholinergic neurons in the regulation of the ghrelin secretory response to feeding in sheep. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 308- 312, 2003.
- ⑪Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nagata H, Kangawa K, Ishii H. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett*, 541: 64- 68, 2003.
- ⑫Okimura 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 male rats. *Life Sci*, 72: 2517- 2524, 2003.
- ⑬Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal M S, Shimbara T, Guan J L, Wang Q P, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*, 144: 1506- 1512, 2003.
- ⑭Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley L G, Hirano T, Grau E G, Kangawa K. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol*, 176: 415- 423, 2003.
- ⑮Shimada M, Date Y, Mondal M S, Toshinai K, Shimbara T, Fukunaga K, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Yoshimatsu H, Matsuo H, Nakazato M. Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun*, 302: 520- 525, 2003.
- ⑯Choi K, Roh S G, Hong Y H, Shrestha Y B, Hishikawa D, Chen C, Kojima M, Kangawa K, Sasaki S. The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, 144: 754- 759, 2003.
- ⑰Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K,

Kohno N. Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. Clin Cancer Res, 9: 774- 778, 2003.

⑱ Hanada T, Toshinai K, Kajimura N, Nara-Ashizawa N, Tsukada T, Hayashi Y, Osuye K, Kangawa K, Matsukura S, Nakazato M. Anti-cachectic effect of ghrelin in nude mice bearing human melanoma cells. Biochem Biophys Res Commun, 301: 275- 279, 2003.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

高屋和彦（京都大学医学部）

細田洋司（京都大学医学部）

赤水尚史（京都大学医学部）

ヒトグレリン遺伝子の発現調節機構に関する検討
—高齢者ソマトポーズに対する分子標的薬開発に向けて—

分担研究者 中尾一和
京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科 教授

我々は高齢者ソマトポーズに対する分子標的薬・ゲノム創薬による治療薬の開発に向けて、ヒトグレリン遺伝子5'上流領域の構造およびプロモーター活性の解析を行った。TT細胞を用いたルシフェラーゼ解析によって、翻訳開始点より-193bp/-349bp間および-1010bp/-1409bp間にプロモーター活性の上昇を認めた。これらの領域に存在する種々のコンセンサス配列のうち、bHLH型転写因子の結合するE-boxに変異を導入し、活性の低下を確認した。ゲルシフトアッセイにてbHLH-LZ型転写因子であるUSF (Upstream stimulatory factor) との特異的な結合が認められ、USFがヒトグレリン遺伝子発現に関与していることが示唆された。今後の検討によりグレリン遺伝子の発現調節機構の詳細なネットワークや相互作用を明らかにし、ソマトポーズに対する治療薬の開発に応用したいと考えている。

A. 研究目的

成長ホルモン (GH) secretagogue 受容体の内因性リガンドとして同定されたグレリンは GH 分泌促進、摂食亢進、胃酸分泌促進、胃の蠕動運動亢進などの多彩な作用を有するが、その発現・分泌調節機構は明らかになっていない。一方、我々はヒト甲状腺髄様癌由来細胞株 (TT 細胞) が Northern blotting でグレリン mRNA の発現を認めたこと、細胞抽出物の RP-HPLC による検討でグレリン分画に一致するピークを認め培養上清中グレリン濃度が経時的に上昇したこと、さらにグレリン抗血清を用いた免疫染色で染色されたことから、有意な量のグレリンを産生・分泌することを報告した。(Kanamoto et al., J Clin Endocrinol Metab 86:4984, 2001)。

転写因子や転写共役因子は生体の様々な調節に関与し、その異常は多くの疾患の直接的、もしくは間接的な原因に関与している。近年、分子生物学やゲノム構造解明のめざましい進歩により転写因子病、転写共役因子病という概念も形成されつつある。転写因子や転写共役因子の

ネットワークや相互作用の解明は特定の臓器や作用を標的とする薬剤やまた種々の臓器や共通に作用する薬剤などの開発に役立つものと思われる。グレリン遺伝子の発現・分泌調節に関与する因子の解明は分子標的薬・ゲノム創薬による高齢者のソマトポーズに対する画期的な治療薬の開発につながることを期待される。我々はグレリンの発現・分泌調節機構を検討するにあたり、現在のところ細胞株の中で唯一内因性にグレリンを産生・分泌することが確認されている TT 細胞を用いることが適当であると考え、TT 細胞を用いた実験系を構築してヒトグレリン遺伝子 5'上流領域の構造およびプロモーター領域の解析を行うことによりその転写制御メカニズムを解明し、グレリンの発現・分泌調節機構を解明することを試みた。

B. 研究方法

- (1) まず、TT 細胞より poly A⁺RNA を抽出し、5'-RACE 法にてその転写開始点を検討した。
- (2) 次に、種々の欠失および変異を有するヒ

トグレリン遺伝子 5'上流領域を、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして持つベクター (pGL3-Basic vector) にライゲーションしコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを TT 細胞にトランスフェクションし一過性に発現させた後、ルシフェラーゼ活性を測定した。Internal control にはウミシイタケルシフェラーゼを発現するベクター (pRL-TK vector) を用い、一緒にトランスフェクションを行った。

(3) TT 細胞核タンパク抽出物を用いてゲルシフトアッセイを行った。

C. 研究結果

TT 細胞 poly A⁺RNA を用いた 5'-RACE 法によりその転写開始点の検討を行ったところ、ヒトグレリン遺伝子の転写開始点は翻訳開始点から-80bp のところに存在すると考えられた。ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子とし、種々の欠失を有するヒトグレリン遺伝子 5'上流領域を組み込んで作製したコンストラクトを TT 細胞に導入して一過性に発現させプロモーター活性の検討を行ったところ、翻訳開始点より-193bp から-349bp の間(領域 A)および-1010bp から-1409bp の間(領域 B)でプロモーター活性の上昇を認めた。上記のプロモーター活性の上昇を認めた領域 A、B には塩基配列上、bHLH 型転写因子が結合する E-box、AP-2、NF-kB、SP-1、GATA などのいくつかのコンセンサス配列が存在した。まず、我々は普遍的に発現し内分泌系の遺伝子転写制御に関与すると報告のある AP-2 に着目した。これらの領域には AP-2 コンセンサス配列はおおの 1ヶ所および 3ヶ所存在し、それらに変異を導入したコンストラクトを作製し同じ実験系を用いプロモーター活性を検討したところ、領域 B の AP-2 コンセンサス配列への変異導入で最大 30%の活性低下を認めた。しかし、同部位をプローブとし TT 細胞核タンパク抽出物を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ特異的な結合は認められず、AP-2 がヒトグレリン遺伝子の転写制御に関与するという結果は得られなかった。

次に、bHLH 型転写因子が消化管内分泌細胞の発生・分化に重要な因子であることから、我々

は E-box に着目した。領域 A、B にはそれぞれ E-box が 1ヶ所および 2ヶ所存在し、AP-2 の場合と同様に変異を導入したコンストラクトを作製しプロモーター活性の検討を行った。領域 A に存在する E-box に変異を導入したコンストラクトではプロモーター活性が約 60%低下した。また領域 B に存在する E-box への変異導入ではプロモーター活性は相加的に低下し、2ヶ所同時に変異を導入した場合では活性が約 50%低下した。これらの E-box 部位をプローブとし TT 細胞核タンパク抽出物を用いて行ったゲルシフトアッセイでは bHLH-LZ 型転写因子である USF (Upstream stimulatory factor) との特異的な結合が認められ、USF がヒトグレリン遺伝子発現に関与していることが示唆された。

D. 考察

グレリンは主として胃体部に存在する X/A 細胞で産生されている。しかし、グレリンは消化管以外にも視床下部、下垂体、腎臓、膵臓、精巣、胎盤など全身的に発現を認めることが報告されている。血漿グレリン値は絶食状態で上昇し、摂食後に低下することがよく知られているが、血漿中のグレリンはおおよそ 2/3 は胃、1/3 は小腸由来とされている。しかし、上述のようにグレリンはその他にも全身の種々の組織での発現が確認されており、末梢における組織特異的な制御機構も有している可能性が考えられる。

胃では絶食によりグレリン遺伝子発現の増加が認められ、血漿グレリン値に反映しているものと考えられる。またインスリンによる低血糖刺激で遺伝子発現の増加を認めるという報告がある。一方、レプチン投与では遺伝子発現が増加するという報告もあれば減少するという報告もあり議論が分かれている。ヒト悪性黒色腫細胞株を移植したヌードマウスのモデルでは、血漿インターロイキン (IL) -1 β の著しい上昇とともに胃でのグレリン遺伝子発現が増加し血漿グレリン値の上昇を認めている。これは癌性悪液質のため長期にわたりエネルギーバランスが負に傾くことにより遺伝子発現が増加し分泌が刺激されているためと考えられている。

下垂体グレリン遺伝子発現はラットにおいて、

甲状腺ホルモン、グルココルチコイド、GH、GHRH (GH releasing hormone) により調節されるが、絶食状態では発現の変化は認められず、グレリン遺伝子発現制御は組織特異的であることが示唆されている。

精巣のグレリン遺伝子発現は下垂体切除ラットでは著しく減少するが、黄体化ホルモン (LH) の superagonist であるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を投与すると一部回復する。また、正常ラットに hCG を投与すると一過性に精巣のグレリン遺伝子発現が増加するが卵胞刺激ホルモンではこの現象は認められなかった。成長ホルモン、甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモンでは遺伝子発現に変化を認めなかったことから、精巣におけるグレリン遺伝子発現は一部 LH 依存性に調節されていることが示唆されている。

三重大学の田中らのグループはマウスグレリン遺伝子の構造およびそのプロモーター領域を解析し、マウスグレリン遺伝子には 5 つのエクソンと 4 つのイントロンが存在し、非翻訳領域に短い第 1 エクソンが存在すること、またこの第 1 エクソンと転写開始点上流に存在する TATA ボックス様配列を含む領域がヒトグレリン遺伝子と高い相同性を有していることから、グレリン遺伝子の転写制御は哺乳類で共通の要素を有している可能性を示唆した。一方、神戸大学の岸本らのグループはヒトグレリン遺伝子プロモーター領域を解析した中でヒトグレリン遺伝子の転写開始点は翻訳開始点より -32 bp のところに存在し、マウスに存在するような非翻訳領域のエクソンは存在しないと報告した。彼らはさらにヒト胃カルチノイド由来細胞株を用いた実験で -302 bp から -605 bp の間に最も強いプロモーター活性を認め、そのプロモーター活性はグルカゴンにより上昇したと報告した。

今回我々が TT 細胞を用いた実験系で行った検討ではヒトグレリン遺伝子の転写開始点は上記既報のいずれの報告とも異なっていた。また、プロモーター活性の検討においても異なる結果を得た。この原因として種差、使用した細胞や実験方法の相違などが考えられ、この点に関してはさらなる検討が必要と考えられた。

USF は bHLH-LZ 型転写因子の一種である。

それぞれ別の遺伝子にコードされている USF1、USF2 の 2 種類のサブタイプが存在し、通常、二量体 (homodimer もしくは heterodimer) を形成し E-box に結合する。発現は普遍的に認められているが、組織により USF1、2 がそれぞれ異なった割合で homodimer もしくは heterodimer を形成している。詳細な役割、機能は現在のところ不明であるが、カルシトニン/カルシトニン遺伝子関連ペプチド、TGF (Transforming growth factor) β 2、Pdx-1 などの遺伝子発現の制御に関与しているとされている。今回我々は USF1/USF2 がヒトグレリン遺伝子 5' 上流領域の E-box に特異的に結合し、その転写活性の調節に関与していることを見いだした。

E. 結論

本研究において我々はヒトグレリン遺伝子 5' 上流領域の構造およびプロモーター領域の解析を行い、USF がヒトグレリン遺伝子発現に関与していることを見いだした。今後、さらに詳細な検討を行うことによりヒトグレリン遺伝子の発現・分泌調節機構について詳細なネットワークや相互作用が明らかにされ、高齢者のソマトポーズに対する分子標的薬・ゲノム創薬による治療薬の開発に結びつくことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Hataya Y, Akamizu T, Hosoda H, Kanamoto N, Moriyama K, Kangawa K, Takaya K, Nakao K. Alterations of Plasma Ghrelin Levels in Rats with Lipopolysaccharide-induced Wasting Syndrome and Effects of Ghrelin Treatment on the Syndrome. *Endocrinology*, 144: 5365- 5371, 2003.

2. 学会発表

- ① Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Ariyasu H, Li Y, Moriyama K, Arai H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Genomic

Structure and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Ghrelin Gene. The 85th Annual Meeting of the Endocrine Society (Philadelphia, U.S.A.), 2003.

- ②金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、旗谷雄二、有安宏之、李玉殊、森山賢治、荒井宏司、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和：ヒトグレリン遺伝子5'上流領域の構造とその機能解析 第76回 日本内分泌学会学術総会、2003年
- ③有安宏之、高屋和彦、細田洋司、旗谷雄二、金本巨哲、五十子大雅、荒井宏司、赤水尚史、寒川賢治、中尾一和：グレリンの分泌調節の解明とグレリン過剰発現トランスジェニック(Tg)マウスの作製 第76回 日本内分泌学会学術総会、2003年

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

加齢に伴う胃グレリン発現の変動、およびその発現調節機構

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

加齢に伴い成長ホルモン(GH)分泌は低下するが、その機構は明確ではない。グレリンの発現低下が、これに関与するか明らかにする目的で、ラット胃におけるグレリン mRNA 量の加齢による変動を検討した。高齢ラットでは若年ラットに比べ胃グレリン mRNA 量は低下しており、グレリン産生低下が GH 分泌低下に関与する可能性も想定された。この胃におけるグレリンの産生調節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行なった。Gene Walking 法、およ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、その塩基配列を決定した。様々な細胞におけるヒトグレリン遺伝子プロモーター活性を一過性発現系にて検討したところ、胃カルチノイドに由来する 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、この配列を変異、あるいは削っても、レポーター活性には影響を与えず、この配列は機能していないものと考えられた。ヒトグレリン遺伝子の ECC10 細胞特異的発現に重要な領域を特定するため、5'末端を順次切断し、5'末端の異なった種々のヒトグレリンレポーター遺伝子を作製、検討した結果、-447 から-402、および-301 から-268 の領域が、ECC10 細胞におけるヒトグレリン遺伝子発現に重要であることが明らかとなった。しかし、Mobility Shift Assay では、この2つの領域に結合する ECC10 細胞特異的タンパクは検出できなかった。グレリン産生不全という状態が実際に高齢者で存在し、GH 分泌に影響を及ぼしているのかヒトにおいて明確にすることが、今後重要である。

A. 研究目的

成人 GH 分泌不全症では、血中脂質・内臓脂肪の増加や、骨塩量・筋力の低下が出現すること、さらにこれらの所見は GH 投与によって改善することが明らかとなり、最近では、小児の GH 分泌不全症と同様に、成人の GH 分泌不全症も治療すべきであると考えられている。一方、これまで器質的障害に起因する成人 GH 分泌不全症が注目されてきたが、GH 分泌は加齢とともに低下するので、明らかな視床下部下垂体の器質的疾

患が無いにもかかわらず GH 分泌不全症に陥っている方々が一般高齢者の中に潜在する可能性がある。私たちは、62 歳以上の健常高齢者、および軽症高血圧、糖尿病等で治療をうけているが他に大きな異常所見のない患者（軽症疾患罹患高齢者）に対して GH 分泌刺激試験を行ない、GH 反応を検討したところ、16 %の方々が GH 分泌不全と判断し得るという成績を報告した。

この高齢者における GH 分泌低下の原因は明確ではないが、これまで、視床下部 GHRH の分

泌不全、ソマトスタチンの分泌亢進などの可能性が示唆されている。一方、グレリン分泌不全が影響している可能性も想定されるので、今回、高齢者におけるグレリン分泌不全の可能性を検証した。外因性に投与されたグレリンは GH 分泌、摂食量を亢進させ、高齢者に投与した際にも有用性が期待されているが、内因性グレリンの産生、分泌を何らかの手段によって亢進させることが可能であれば、外因性グレリン投与と同様の効果を発揮させることが可能となろう。そこで、内因性グレリン発現を調節することの第一歩として、ヒトグレリン遺伝子をクローニングし、その遺伝子発現機構の解析をも試みた。

B. 研究方法

1) 加齢による胃グレリン mRNA 発現の変化を検討するために、8 週齢、26 週齢の SD 系雄ラットを一晩絶食後、断頭屠殺し、胃、肝、下垂体を摘出した。胃粘膜、肝、下垂体より総 RNA をトリゾールで抽出した。この総 RNA をテンプレートに、RT-PCR を行ない、グレリン mRNA 量を比較した。PCR で使用したプライマーは次のとおりである。ラットグレリンセンスプライマー：5'-TTGAGCCCAGAGCACCCAGAAA-3'、ラットグレリンアンチセンスプライマー：5'-AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'。なお、 β アクチン mRNA 量をコントロールとして測定した。

2) 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、ヒトグレリン遺伝子の翻訳開始点から-2000bp までをクローニングし、その塩基配列を決定した。

3) 5'RACE 法により、転写開始点の検討を行った。

4) 翻訳開始点から数えて、-605bp まで、および-301bp 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製し、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の、ルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。

5) 種々の長さのヒトグレリン遺伝子 5' 上流配列を含むレポーター遺伝子を各種作製し、ECC10 細胞にトランスフェクトしたのち、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、ECC10 細胞におけるグレリン遺伝子の発現に重要な遺伝子領域を特定した。

6) 5) で特定された 5' 上流領域に結合する特異的タンパクの存在を検討するため、ECC10 細胞、COS 7 細胞 (コントロール) から核タンパクを抽出し、Mobility Shift Assay を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験動物に関する学内倫理規定を遵守し、動物愛護に努め、実験を行なった。

C. 研究結果

1) 8 週齢、および 26 週齢のラットの胃では明らかにグレリン mRNA が検出できた。しかし、コントロールとして使用した β アクチン mRNA 量は両方で差が認められなかったのに対し、26 週齢ラットのグレリン mRNA 量は、8 週齢ラットのそれに比べ減少していた。いずれの週齢のラットにおいても、肝、下垂体ではグレリン mRNA は検出し得なかった。

2, 3) 翻訳開始点から数えて、-32bp のところに主要な転写開始点の存在する可能性が示唆された。転写開始点と想定した箇所の上流には典型的な TATA box を認めなかったが、-585bp から-579bp にかけて、TATATAA という TATA box 様の配列が認められた。しかし、この部分に変異を加え、その機能を検討したところ、レポーター活性に変化は認められなかった。一方、AP-2 コンセンサスサイト、bHLH コンセンサスサイト、half ERE, half GRE サイトなどさまざまな転写因子の結合配列様エレメントが存在することが明らかとなった。

4) 翻訳開始点から数えて、-605bp まで、および-301bp 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は、いずれも胃カルチノイドに由来する ECC10 細胞においてのみプロモーター活性を示した。

5) 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

ーター活性を認めた。このレポーター遺伝子の5'末端にさらにデリーションを加え検討したところ、-605 から-510 の領域、および、-301 以下の領域が、ECC10 細胞特異的な発現に必要であることが示唆された。さらに詳細に5'末端の異なるレポーター遺伝子を作製、同様の検討を行なったところ、-447 から-402、および-301 から-268 の領域が重要であることが明らかとなった。

6) -447 から-402 の2本鎖DNAを作製し、ジギキゲンで標識した。これをプローブとして用いてECC10細胞核抽出物と混合、Mobility Shift Assayをおこなったところ、2本のバンドが検出された。いずれのバンド強度も、過剰量の非標識プローブを加えることにより減弱したが、-447 から-402 と類似性に欠ける配列の非標識オリゴを加えたときも、バンド強度は減弱した。さらに、同様のバンドはCOS7細胞核抽出物を使用したときにも認められ、2つの非標識オリゴDNAに対しても同様の結果が得られた。-301 から-268 のオリゴDNAを使用してMobility Shift Assayを行なったときも、同様の成績であった。

D. 考察

ヒトでは加齢とともに、GH分泌が低下する。この現象を引き起こす仕組みは不明であるが、グレリンが関与する可能性も想像される。そこで今回、ラット胃におけるグレリン mRNA 量を調べたところ、若年ラットに比べ、高齢ラットでは胃グレリン mRNA 量が低下していた。この成績から、加齢とともに生じる GH 分泌不全にグレリン発現低下が関与している可能性も考えられた。

このグレリン発現がどのような機構で調節されているか明らかにする目的で、ヒトグレリン遺伝子をクローニングし、その機能解析を行なった。ヒトグレリン遺伝子の翻訳開始点から2000bpにわたる領域をクローニングし、その塩基配列を決定した。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可能性を示唆する報告がある。しかし、私たちの検討では、ヒトグレ

リンプロモーターにおいても確かにTATATAA配列は存在するが、TATA boxとして機能するという成績は得られなかった。

各種臓器に由来する細胞株にヒトグレリンレポーター遺伝子をトランスフェクトしたところ、グレリンレポーター遺伝子は、胃癌由来で内分泌細胞の性格を有さないMKN1、MKN45細胞では活性化されなかったが、胃ECC10細胞では活性化され、グレリンプロモーターは強い細胞特異性を示すことが明らかとなった。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いう報告があるので、ECC10細胞をモデルとしてグレリンの発現調節機構の解析をすすめた。

ヒトグレリン遺伝子のECC10細胞特異的発現に重要な領域を特定するため、5'末端を順次切断し、5'末端の異なる種々のヒトグレリンレポーター遺伝子を作製し、検討した結果、-447 から-402、および-301 から-268 の領域が、ECC10細胞におけるヒトグレリン遺伝子発現に重要であることが明らかとなった。この成績から、この領域にECC10細胞特異的な核タンパクが結合し、グレリン遺伝子発現を調節しているのではないかと想定した。Mobility Shift Assayを行なったところ、ECC10細胞から調製した核タンパク分画にこの2つの領域に結合するタンパクが存在することを見出したが、非標識オリゴDNAを使用した実験から、このタンパクは非特異的な結合タンパクであり、ヒトグレリン遺伝子のECC10細胞特異性発現を説明するものではないと考えられた。

高齢ラットの胃グレリン mRNA 発現は若年ラットのそれに比べ低下していたことから、グレリン発現は加齢に伴って低下する可能性があるが、ECC10細胞における細胞特異的発現に重要であった-447 から-402、および-301 から-268 の領域が、加齢によるグレリン発現変動にも関与しているのかどうか興味深い。この点を明らかにするため、高齢、および若年ラットの胃から調製した核タンパクの-447 から-402、および-301 から-268 の領域に対する結合性の比較検

討を予定している。また、グレリン産生不全という状態が実際に高齢者で存在し、GH 分泌に影響を及ぼしているのかヒトにおいて明確にすることは重要である。すでに GH 分泌刺激試験により GH 分泌予備能を評価した健常高齢者の血漿サンプルを多数保存しているのので、今後、その検体を使用し血漿グレリン値を測定し、GH 分泌能と対比検討する予定である。

E. 結論

1) 26 週齢ラットの胃グレリン mRNA 量は、8 週齢のそれに比べ減少しており、胃グレリン mRNA 量は加齢に伴い変動する可能性が示唆された。

2) ヒトグレリン遺伝子 5'上流配列の機能解析を行なったところ、このプロモーターは強い細胞特異性を示すことが明らかとなった。

3) ヒトグレリン遺伝子には TATA box 様配列が存在するが、ヒトグレリン遺伝子発現には関与していない可能性が示唆された。

4) ヒトグレリン遺伝子 5'上流配列の-447 から-402、および-301 から-268 の領域が ECC10 細胞におけるヒトグレリン遺伝子発現に重要であった。

5) しかし、-447 から-402、および-301 から-268 の領域に対する ECC10 細胞特異的結合タンパクは検出されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Yoshioka S, Okimura Y, Takahashi Y, Iida K, Kaji H, Matsuo M, Chihara K. Up-regulation of mitochondrial transcription factor 1 mRNA levels by GH in VSMC. *Life Sci*, 74: 2097-2109, 2004.
- ②Kishimoto M, Okimura Y, Iguchi G, kudo T, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 305: 186-192, 2003.
- ③Murata M, Kaji H, Mizuno I, Sakurai T, Iida K,

Okimura Y, Chihara K. A study of carotid intima-media thickness in GH-deficient Japanese adults during onset among adults and children. *Euro J Endocrinol*, 148: 333-338, 2003.

- ④Okimura 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 Sci*, 72: 2517-24, 2003.

2. 学会発表

- ①藤澤弘子、岸本正彦、井口元三、高橋裕、加治秀介、千原和夫、置村康彦：ECC10 細胞におけるヒトグレリン遺伝子発現調節機構 第 30 回 日本神経内分泌学会, 2003 年
- ②竹野亮子、置村康彦、岸本正彦、大野伯和、生田肇、細田洋司、工藤 工、高橋健太郎、井口元三、高橋裕、加治秀介、寒川賢治、黒田嘉和、千原和夫：胃切除後の患者におけるグレリンの成長ホルモン分泌促進作用 第 76 回日本内分泌学会学術総会, 2003 年
- ③吉岡嗣朗、置村康彦、加治秀介、竹野亮子、工藤 工、高橋健太郎、岸本正彦、井口元三、高橋裕、千原和夫：成長ホルモン投与による成長ホルモン欠損ラット心筋での遺伝子発現の変化 -マイクロアレイを用いた検討 第 76 回日本内分泌学会学術総会, 2003 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

グレリン受容体発現抑制トランスジェニックラットにおける エネルギー代謝調節機構について

分担研究者 芝崎 保 日本医科大学第二生理教授

グレリンは成長ホルモン分泌促進や摂食促進作用を有し、エネルギー蓄積作用があることが知られているが、内因性グレリンの作用機構の詳細は明らかではない。グレリンの視床下部におけるエネルギー調節作用を明らかにするため、視床下部でのグレリン受容体（GHS-R）発現抑制トランスジェニック（Tg）ラットを作製し、Tg ラットにおけるエネルギー代謝について解析した。Tg ラットおよび対照（WT）ラットに高脂肪食あるいは普通食を 14 日間摂取させると、体重、総摂取カロリーは Tg、WT ラットともに HF 摂取群で高値を示した。WAT 重量は HF 摂取の WT ラットで有意に多かったが、BAT 重量は HF 摂取の Tg ラットで多かった。血漿レプチン濃度は HF 摂取の WT ラットで著明に高く、Tg ラットの HF 群は、WT ラットの NF 群と同レベルであった。褐色脂肪細胞数は HF 摂取の WT ラットにおいて有意に減少したが、この細胞数の減少が Tg ラットでは認められず、Tg ラットでは脂肪蓄積が抑制されたと推測された。HF 摂取の Tg ラットにおいて UCP1 の mRNA とタンパク質の発現量は高値を示し、Tg ラットで酸素消費量、二酸化炭素産生量、直腸温は有意に高値であったことから、Tg ラットでは BAT での熱産生が増し、基礎代謝が亢進していると考えられた。本研究から視床下部グレリン受容体の発現量が低下している Tg ラットではエネルギー消費の促進により痩せを呈しており、内因性グレリンはエネルギー蓄積機序に促進的に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

Growth hormone secretagogue (GHS) は GHS 受容体 (GHS-R) を介して強力な成長ホルモン (GH) 分泌促進作用と摂食促進作用を有する (1, 2)。近年、GHS-R の内因性のリガンドとして、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が胃の抽出物より単離された (3)。その後の研究により、GHS/グレリンが摂食行動や GH 分泌を促進する以外に、エネルギー蓄積作用を有していることが明らかになった (4)。しかし、内因性グレリンの作用機構の詳細については未だ明らかではない。我々は GHS/グレリン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 (5)。ウェスタンブロット法にて本 Tg ラットでは、弓状核の GHS-R 発現が低下していることを確認している。Tg ラットは同週齢の対照 (WT) ラットに比較して低体重、一日摂食量の減少、低体脂肪、GHS による摂食促進作用の欠如や GH の分泌反応の抑制を呈する。

今回我々は視床下部における GHS-R のエネルギー代謝調節機構における役割を明らかにするために、GHS-R 発現抑制 Tg ラットに高脂肪