

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hotta M, Ohwada R, Katakami H, <u>Shibasaki T</u> , Hizuka N, Takano K.	Plasma levels of intact and degraded ghrelin and their responses to glucose infusion in anorexia nervosa.	Curr Med Chem	89	5707- 5712	2004
Kanazawa Y, Isomoto H, Wen CY, Wang AP, Saenko VA, Ohtsuru A, Takeshima F, Omagari K, Mizuta Y, Murata I, <u>Yamashita S</u> , Kohno S.	Impact of endoscopically minimal involvement on IL-8 mRNA expression in esophageal mucosa of patients with non-erosive reflux disease.	World J Gastroenterol	9	2801-2804	2003
Daian T, Ohtsuru A, Rogounovitch T, Ishihara H, Hirano A, Akiyama -Uchida Y, Saenko V, Fujii T, <u>Yamashita S</u> .	IGF-I enhances TGF-beta-induced extracellular matrix protein production through the p38/ATF-2 signaling pathway in keloid fibroblasts.	Mol Cell Endocrinol	120	956-962	
Isomoto H, Nakazato M, Ueno H, Date Y, Nishi Y, Mukae H, Mizuta Y, <u>Ohtsuru A</u> , Yamashita S, Kohno S.	Low plasma ghrelin levels in patients with helicobacter pylori-associated gastritis.	Am J Medicine	117	429- 432	2004
Imanishi R, Ashizawa N, <u>Ohtsuru A</u> , Akiyama-Uchida Y, Kawano H, Kuroda H, Nakashima M, Saenko VA, Yamashita S, Yano K.	GH suppresses TGF- β -mediated fibrosis and retains cardiac diastolic function.	Mol Cell Endocrinol	218	137- 146	2004
Hosoda H, <u>Kojima M</u> , Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K.	Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing.	J Biol Chem	278	64-70	2003
Kaiya H, <u>Kojima M</u> , Hosoda H, Moriyama S, Takahashi A, Kawauchi H, Kangawa K.	Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout.	J Endocrinol,	144	5215-5226	2003

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Kangawa K.	Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity.	J Endocrinol	176	415-423	2003
Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K, Gomita Y.	Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus.	Peptides	25	279-287	2004
Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M.	Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl-modification of ghrelin.	Endocrinology, in press			
Nakai 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	R001-3	2003
Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K, Kangawa K.	Pharmacokinetics, safety, endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects.	Eur J Endocrinol	9	447-455	2004
Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K.	Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene.	Endocrinology	145	4144-4153	2004
Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y, Kangawa K.	Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay.	J Clin Endocrinol Metab	90	6-9	2005
Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K.	Short-term secretory regulation of active form of ghrelin and total ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa.	Eur J Endocrinol	150	913-914	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Hanada T, Toshinai K, Kajimura N, Nara-Ahizawa N, Tsukada T, Hayashi Y, 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
Tanaka M, Naruo T, Nagai N, Kuroki N, Shiyya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S.	Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders.	J Psychiatr Res	37	17-22	2003
Shimada M, Date Y, Mondal MS, 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
Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tarebe Y, Nagai N, Shiyya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S.	Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa.	Psychoneuroendocrinology	28	829-835	2003
Yamaguchi H, Nakazato M, Kangawa K.	Ghrelin A gastric peptide to regulate hypothalamic control of feeding.	Curr Med Chem	3	177-188	2003
Tanaka M, Tatebe Y, Nakahara T, Yasuhara D, Sagiyama K, Muranaga T, Ueno H, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T.	Eating pattern and the effect of oral glucose on ghrelin and insulin secretion in patients with anorexia nervosa.	Clin Endocrinol	59	574-579	2003
Hanada T, Toshinai K, Date Y, Kajimura N, Tsukada T, Hayashi Y, Kangawa K, Nakazato M.	Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells.	Metabolism	53	84-88	2004

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Kojima S, Nakahara T, Nagai N, Muranaga T, Tanaka M, Yasuhara D, Masuda A, Date Y, Ueno H, <u>Nakazato M</u> , Naruo T.	Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa.	Clin Endocrinol	62	74- 78	2005
Kageyama H, Funahashi H, Hirayama M, Takenoya F, Kita T, Kato S, Sakurai J, Lee EY, Inoue S, Date Y, <u>Nakazato M</u> , Kangawa K, Shioda S.	Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas.	Regul Pept	126	67- 71	2005
Mondal, MS, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Kangawa K, <u>Nakazato M</u> .	Identification of ghrelin neurons and its receptor, GHS-R, in rat brain.	Regul Pept	126	55- 59	2005
Ueno H, Yamaguchi H, <u>Nakazato M</u> .	Ghrelin: A gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis.	Regul Pept	126	11- 19	2005
Osawa H, <u>Nakazato M</u> , Date Y, Kita H, Ohnishi H, Ueno H, Shiiya T, Sato K, Ishino Y, Sugano K.	Impaired production of gastric ghrelin combined with decreased plasma ghrelin in chronic gastritis associated with <i>helicobacter pylori</i> .	J Clin Endocrinol Metab	90	10- 16	2005

CHAPTER 169

Novel mechanism of feeding regulation by ghrelin

Masamitsu Nakazato

*Third Department of Medicine, Miyazaki Medical College, Miyazaki 889-1692, Japan
[e-mail: nakazato@post.miyazaki-med.ac.jp]*

Introduction

The molecular mechanisms to regulate energy balance are coming to light by the recent robust progresses in the molecular biology and neuroscience. Ghrelin is a novel anabolic peptide that we discovered from the stomach in humans and rats two years ago^{1,2}. We describe the molecular mechanism of ghrelin in the regulation of feeding.

Discovery of ghrelin

Growth hormone (GH) secretion from the pituitary has been known to be stimulated by two different pathways: one is the GHRH (growth hormone releasing hormone)/cAMP pathway and the other is the GHS (growth hormone secretagogues)/IP₃-calcium pathway. In 1996, the GHS receptor, a G-protein coupled transmembrane receptor and now called the ghrelin receptor, was cloned, but its natural ligand had been unknown until we purified its endogenous ligand peptide, ghrelin. We isolated ghrelin from the human and rat stomach by monitoring an increase in intracellular calcium level in CHO cells that had been designed to express the ghrelin receptor¹. Ghrelin consists of 28 amino acids in which the Ser-3 is post-translationally modified by the addition of middle-chain fatty acid, octanoyl acid. This acyl modification is indispensable for ghrelin's biological activity. At present, ghrelin is found in the fish, amphibians, birds, and many mammals. In naming the peptide, we associated it with a growth hormone release by naming it a variation of the Proto-Indo-European root, 'ghre'.

Hypothalamic ghrelin

Ghrelin-producing neurons are located in the lateral part of the arcuate nucleus and their nerve fibres are widely distributed in the hypothalamic regions of primary importance in the regulation of feeding^{1,3}. Intracerebroventricular (ICV) administration of ghrelin above a minimally active dose of 10 pmol to free-feeding rats during the light phase increased food intake in a dose-dependent manner². Ghrelin-27 that is an alternative splicing product and devoid of a glutamine at position 14, has a same orexigenic potency as ghrelin 28. Ghrelin did not produce unusual behaviour. When we compared doses less than 500 pmol, ghrelin was more potent than neuropeptide Y (NPY) the most powerful orexigenic peptide identified so far. Ghrelin also increased food intake in feeding conditions, such as dark-phase feeding and starvation-induced feeding. A chronic ICV infusion of ghrelin, as few as 250 pmol/day, for 12 days using an osmotic minipump increased food intake and body weight gain over the infusion period. The ghrelin infusion did not affect general activity. At the end of experiment, the plasma concentrations of glucose, insulin, triglycerides, and total cholesterol in the ghrelin-infused group did not differ from those in the control group.

To determine whether an endogenous tone of ghrelin signalling is present in the hypothalamus, we investigated the effect of an antibody against ghrelin on feeding behaviour². Compared with the preimmune serum IgG, anti-ghrelin IgG remarkably suppressed starvation-induced feeding in a dose-dependent manner. Anti-ghrelin IgG also suppressed dark-phase food intake by 36 per cent in free-feeding rats. These findings indicate that ghrelin is a powerful, endogenous orexigenic peptide.

Growth hormone is known to stimulate feeding. To investigate whether ghrelin's orexigenic activity depends on the GH system, we studied the effect of ICV-injected ghrelin in spontaneous growth hormone deficient rats². Ghrelin also stimulated food intake in them. Ghrelin stimulates feeding by the GH-independent mechanism.

Feeding is finely and redundantly regulated by the complicated interaction of many orexigenic and anorectic signals produced in the brain and peripheral tissues. We studied the downstream signalling of the ghrelin system². Ghrelin axon terminals directly contact NPY-containing neurons in double immunohistochemistry. Ghrelin axons make direct synaptic contacts with NPY neurons in electron microscopic immunohistochemistry. To establish the activation of NPY neurons by ghrelin, *c-fos* expression which is a marker of neuronal activation was mapped following an ICV administration of ghrelin. Ghrelin administration induced Fos in 39 per cent of NPY neurons in the arcuate nucleus by double immunohistochemistry. The hypothalamic NPY mRNA level in quantitative *in situ* hybridization increased following ghrelin administration. Ghrelin anatomically lies upstream NPY. To investigate the functional relationship between ghrelin and NPY, the consequence of blocking NPY in ghrelin-induced feeding was observed. ICV administration of anti-NPY IgG 4 h before ghrelin administration abolished ghrelin-induced feeding. An NPY receptor antagonist also abolished ghrelin-induced feeding. NPY neurons are shown to express the ghrelin receptor. These findings indicate that ghrelin lies upstream NPY at both anatomical and functional levels to stimulate food intake.

AgRP (agouti related protein) is another orexigenic peptide produced in the arcuate nucleus. AgRP and NPY co-localize in neurons; however, they exert their activities via different pathways. NPY inhibits an anorectic peptide, corticotropin-releasing hormone (CRH), and AgRP competes with another anorectic peptide, α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). We studied the functional relationship between ghrelin and AgRP in feeding regulation². Ghrelin-induced feeding was suppressed upon treatment with α -MSH, and blocking of AgRP, with anti-AgRP IgG. These findings indicate that inhibition of endogenous NPY and AgRP can modulate ghrelin-induced feeding. Ghrelin is thought to interact anatomically and functionally with the pathways of these two orexigenic peptides produced in the arcuate nucleus.

The ghrelin receptor is also expressed in the lateral hypothalamus that has been known to be a feeding centre and was recently found to produce two orexigenic neuropeptides, orexin and melanin-concentrating hormone (MCH). Ghrelin may interact with these peptides. Ghrelin fibres are appositioned to orexin neurons. Orexin-producing neurons and their dendritic processes often receive synapses from ghrelin axon terminals⁴. Icv administration of ghrelin induced Fos expression in 23 per cent of orexin-producing neurons. The electrical activity of orexin neurons was activated by ghrelin administration. Orexin is a down stream signal of ghrelin. We further studied the functional relationship between ghrelin and orexin. Pretreatment with anti-orexin IgG reduced ghrelin-induced food intake to one half of the level seen in rats given control IgG + ghrelin. Ghrelin-induced food intake in orexin knockout mice was significantly reduced in comparison with wild-type littermates. Ghrelin-induced feeding is therefore concluded to be mediated in part by the orexin pathway⁴. Ghrelin injection did not induce Fos in any MCH neurons. Pretreatment with anti-MCH IgG did not affect ghrelin-induced feeding, indicating no interaction between ghrelin and MCH⁴.

In summary, central ghrelin is verified to act on NPY/AgRP neurons and orexin neurons to stimulate feeding. These neurons are also found to have the leptin receptor. There is a competitive interaction between ghrelin and leptin in these neurons in feeding regulation. Ghrelin nerve fibres project to the median eminence to stimulate GH secretion from the pituitary⁵.

Gastric ghrelin

Ghrelin cells are abundant in the oxyntic gland of the stomach in humans and rats in *in situ* hybridization⁶. In immunoelectron microscopy, ghrelin staining is localized on round, compact, electron-dense granules. Until now, three types of endocrine cells: histamine and uroguanylin-producing enterochromaffin-like cells, somatostatin-producing D cells, and serotonin-producing enterochromaffin cells have been identified. Ghrelin cells are a new member of endocrine cells in the gastric body. They make up about 20 per cent of the endocrine cell population in the gastric body of both rats and humans. Ghrelin cells are positioned close to the capillary, and immunoreactive ghrelin is circulating in human plasma at as much as 150 fmol/ml. Ghrelin mRNA expression in the gastric fundus increased after fast, and returned to the control level after refeeding⁷. Ghrelin plasma concentration in the gastric vein increased after fast. The ghrelin mRNA level in the stomach also increased after administration of leptin and insulin. Biosynthesis and secretion of ghrelin is up-regulated under conditions of negative energy

balance, which appear to be consistent with ghrelin's anabolic role in the regulation of energy homeostasis⁷.

Intravenous administration of ghrelin increased dose-dependently food intake in free-feeding rats. In contrast, intravenous administration of anti-ghrelin IgG reduced feeding in fasted rats. Many anorectic peptides are produced in the gut; however, ghrelin is the first orexigenic peptide present in the periphery⁸. The ghrelin's appetite-stimulating effect was also shown in humans by a double-blind cross-over study⁹. Intravenous infusion of ghrelin significantly increased energy intake from a free-choice buffet lunch compared with saline infusion.

To investigate a possible involvement of ghrelin in the pathogenesis of human obesity, we measured plasma ghrelin concentration in lean and obese non-diabetic individuals¹⁰. Obese subjects have lower plasma ghrelin concentration than lean subjects. The fasting plasma ghrelin concentration was negatively correlated with body mass index. Ghrelin is downregulated in human obesity, which may represent a physiological adaptation to the positive energy balance. On the other hand, ghrelin is upregulated in anorectic patients, which also is a physiological adaptation to the negative energy balance. Plasma ghrelin concentration of normal subjects decreased after 75 g oral glucose and 10 g intravenous glucose loads¹⁰. Also in diabetic patients, plasma ghrelin decreased after meal. Plasma ghrelin decreased after insulin injection. Hyperinsulinaemia in glucose load and insulin administration may reduce ghrelin secretion.

The circulating plasma ghrelin level showed a diurnal pattern with preprandial increases and postprandial decreases during the daytime and a maximum peak at 2 a.m.. Ghrelin may be a potent starvation signal and the stomach may apprise the brain of hunger information through the ghrelin system.

Vagus-mediated signalling by ghrelin

How does the stomach-derived ghrelin exert its stimulative action on feeding? We expected two possibilities; one is via the vagus nerve, and the other is via the bloodstream. Some meal-related metabolites, monoamines and peptides as well as mechanical and chemical stimuli transmit their satiety signals to the hindbrain via the vagus nerve. The vagus nerve is a cranial nerve that contains both efferent and afferent fibres. It conveys information to and from viscera as well as to and from the brain. Afferent information from the alimentary tract is conveyed to the nucleus of the solitary tract, NTS. Efferent fibres originate from the dorsal motor nucleus, DMN. These two nuclei are located close in the medulla. Approximately 90 per cent of vagus nerve fibres are afferent and composed of unmyelinated, thin, capsaicin-sensitive fibres. There are some afferent endings within the gastrointestinal mucosa and submucosa that are more optimally positioned to monitor bioactive substances released from enteroendocrine cells. Vagal afferent neurons are present within the nodose ganglion located near the jugular foramen. These neurons produce a variety of receptor proteins, and transport them to the vagal afferent terminals in the gastrointestinal tract, for example the receptor protein for cholecystokinin (CCK), an anorectic gut peptide.

Ghrelin's orexigenic activity may depend upon the vagus nerve. Furthermore, it has not been known whether the vagus nerve is involved in the regulation of GH secretion. In order to investigate these possibilities, we examined the effect of ghrelin on feeding using rats with vagotomy or perivagal application of a specific afferent neurotoxin, capsaicin. IV ghrelin (1.5 nmol) stimulated food intake in sham-operated rats⁸. IV ghrelin administered to rats with vagotomy did not induce feeding. And in rats with capsaicin application, ghrelin did not induce feeding. In contrast, feeding induced by ICV ghrelin is not affected by neither vagotomy nor capsaicin treatment⁸. Central ghrelin directly acts on the neuronal circuits in the hypothalamus to increase food intake, and this mechanism is distinct from that of gastric ghrelin.

We next studied whether the GH-releasing activity of peripheral ghrelin is also mediated by vagal sensory function. The GH response to ghrelin was profoundly attenuated by both capsaicin treatment and gastric branch vagotomy, but the GH response to GHRH was not affected by these two procedures. The GH-releasing activity of ghrelin is mostly mediated by the vagal afferent nerve, and in part by direct entry into the pituitary via the blood circulation.

Ghrelin IV administered to sham-operated rats induced Fos expression in the arcuate nucleus. In double immunohistochemistry, ghrelin induced Fos expression in 43 per cent of NPY neurons and 15 per cent of GHRH neurons. Neither in capsaicin-treated nor in vagotomized rats, ghrelin did not induce Fos in any neurons of the arcuate nucleus. Stomach-derived ghrelin stimulates NPY and GHRH neurons via the vagal afferent⁸. In order to investigate whether or not the ghrelin receptor is actually synthesized in the vagal afferent neurons, we examined the expression of the ghrelin receptor mRNA⁸. A ghrelin

mRNA was found by RT-PCR. Rat nodose ganglion has about 6,000 neuronal cell bodies. *In situ* hybridization showed that the ghrelin receptor mRNA signals were found in 40 per cent of neurons in the nodose ganglion.

We examined the effect of vagal ligation on the accumulation of binding sites detected using ^{125}I -ghrelin in order to study the transport of the ghrelin receptor in the vagus nerve. Binding sites of ^{125}I -ghrelin accumulated in the segments proximal to the ligature. Taken together, stomach-derived ghrelin binds to its receptors synthesized in the vagal afferent neurons then is transported to the vagal afferent terminals. We conclude that ghrelin's starvation signals transmit to the brain through the vagal afferent⁸. To study the influence of ghrelin on vagal afferent, we recorded gastric vagal afferent activity using the electrophysiological method. IV administered ghrelin significantly decreased gastric vagal afferent activity. Des-acyl ghrelin, which lacks the n-octanoylation essential for ghrelin's binding activity to the receptor, did not affect the afferent activity. In contrast, CCK increased vagal afferent activity. The gastric vagal afferent is the major pathway conveying ghrelin's signal for starvation and CCK's signal for satiation.

The ghrelin receptor is expressed in various tissues, and ghrelin has multifaceted roles in systemic organs. For example, ghrelin-immunoreactive cells were colocalized exclusively with glucagon in α -cells of pancreatic islets in both humans and rats¹¹. The ghrelin receptor is present in pancreatic islets. Ghrelin increased the cytosolic free Ca^{2+} concentration in β -cells and stimulated insulin secretion when it was added to isolated rat pancreatic islets. These findings indicate that ghrelin may regulate islet function in an endocrine and/or paracrine fashion¹¹. The next few years will bring answers to questions on the clinical potential for ghrelin, a novel anabolic peptide.

References

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a novel growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656–60.
2. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194–8.
3. Lu S, Guan JL, Wand QP, Uehara K, Yamada S, Goto N *et al.* Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002; 321: 157–60.
4. Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Guan JL, Wang QP *et al.* Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 2003; 144: 1506–12.
5. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K *et al.* Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 477–80.
6. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T *et al.* 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* 2000; 141: 4255–61.
7. Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M *et al.* Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1220–5.
8. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H *et al.* The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120–8.
9. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG *et al.* Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992–5.
10. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M *et al.* Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 240–4.
11. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H *et al.* Ghrelin is present in pancreatic α -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51: 124–9.

第5章 胃ペプチドグレリンと食行動

中里 雅光*

1. はじめに

肥満とは身体に脂肪が正常以上に蓄積した状態を意味している。肥満には原発性肥満と二次性肥満の2種類があり、90%を占めるのは原発性肥満である。原発性肥満の原因として、1) 過食、2) 摂食パターンの異常、3) 遺伝、4) 運動不足、5) 熱産生機能障害の5つが提唱されている。原発性肥満では、これらの因子が複合的に働いて肥満の原因を構成しているものと考えられる。これらの原因論の中で、摂食パターンの異常を含めた過食と運動不足が二大原因である。1950年代からエネルギー代謝調節として、①糖定常説および中枢でのグルコース受容ニューロンとグルコース応答ニューロンの発見、②脂肪定常説および脂肪細胞から分泌される摂食抑制ホルモン レプチンの発見、③消化管や肝臓からのエネルギー代謝情報は迷走神経や交感神経を介して延髄に伝達されるという神経性調節機構、の3つの概念とそれらを裏付ける多くの物質レベルでの証明がなされてきた¹⁻⁴⁾。近年の分子生物学やペプチド化学の急速な進歩により、多くの神経ペプチドが単離・同定され、それらが脳内でエネルギー代謝調節に作動していることが明らかになってきている(表5-1)。

グレリンは下垂体からの成長ホルモン(GH)分泌を促進するペプチドホルモンとして胃から発見されたが、その後、胃から脳へ空腹情報を伝達する物質であることが証明された。しかも迷走神経を介して、この情報が伝達されるという今まで未知の胃から脳への摂食調節機構が明らかになってきた。本章では、

* 宮崎医科大学医学部

表5-1 脳内で摂食調節に作用するペプチドとアミン

摂食亢進	摂食抑制
1. AgRP, Agouti protein	1. Acidic FGF
2. Galanin	2. Amylin
3. Ghrelin	3. Bombesin
4. GHRH	4. CCK
5. MCH	5. CGRP
6. Norepinephrine	6. CRH
7. NPY	7. Dopamine
8. Opioids	8. GLP-1, GLP-2
9. OrexinA, B	9. Histamine
	10. Insulin
	11. Leptin
	12. α -MSH
	13. Neuromedin U
	14. Neuotensin
	15. Serotonin
	16. Somatostatin
	17. TRH
	18. Urocortin, Urocotin II, III

発見から機能解析まで我が国で先端的に研究が進められてきたグレリンに関し、内分泌・代謝作用ならびに病態との関連について概説する。

2. グレリンの発見

ゲノム解析の情報によると、ヒト遺伝子にはGタンパク共役型受容体(G-protein-coupled receptor:GPCR)のうちリガンドが不明な、いわゆるオーファン受容体が約600種類存在すると予想されている。GPCRは細胞間のシグナル伝達や細胞増殖・分化など生命現象に幅広く関与し、イオンからタンパク質まで種々のリガンドに対する受容体となっている。現在使用されている薬剤のうち、生理活性物質の受容体をターゲットとするものが約70%を占めており、

オーファン受容体は新薬開発の最も魅力的な標的であり、オーファン受容体に対する内因性リガンドの同定を基に、スーパーアゴニストやアンタゴニストを開発することは、新しい薬剤や治療法に直接結びつく重要な研究テーマとなっている。また内因性リガンドの探索は、生命現象解析の新たな糸口になることが期待されている。グレリンは、オーファン GPCR に対する内因性リガンドとして発見された生理活性ペプチドである¹⁾。

1970年代からオピオイドペプチド誘導体の中に弱い GH 分泌活性を示すものが発見されていた⁵⁾。このオピオイドペプチドの構造を基に GH 分泌促進活性を示す一群のペプチド性および非ペプチド性の化合物が合成され、GHS (growth hormone secretagogue: 成長ホルモン分泌促進因子)と呼ばれていた⁶⁻⁹⁾。GHS は従来から知られている GH 放出ホルモン (GHRH) とは異なる受容体 (GHS-R, 今日では後述するグレリン受容体そのものであることが証明されている) に結合する。GHRH はセカンドメッセンジャーがサイクリック AMP であるのに対し、GHS-R ではカルシウムである。GHS を用いた発現クローニングの手法により、1996年にヒト、ラット、ブタの視床下部と下垂体における GHS-R の存在と一次構造が明らかになった^{10, 11)}。この発見により、それまで存在が疑問視されていた内因性リガンドの探索が、製薬企業やベンチャーを中心に国内外で競って行われた。

1999年、国立循環器病センターの児島、寒川らは GHS-R を強制発現した細胞系を用い、ラット全身組織の検索により、胃抽出物中に GHS-R に対するカルシウム上昇活性分画を見出した。単離したペプチドは 28 アミノ酸残基よりなる新規ペプチドで、分子量はヒトグレリンが 3370.9, ラットグレリンが 3314.8 であった。興味深いことに 3 番目のセリン残基の側鎖は、炭素原子数 8 個の脂肪酸、オクタン酸 (分子量 144) によってエステル化されていた (図 5-1)。これまで脂肪酸による修飾は、G タンパクなどでミリスチン酸 (炭素原子数 14) やパルミチン酸 (炭素原子数 16) など炭素数が 12 以上の修飾しか知られておらず、また脂肪酸修飾を受けている生理活性ペプチドの同定は皆無であった。炭素数 10 個のドデカン酸による修飾を受けているグレリン分子もわずかながら

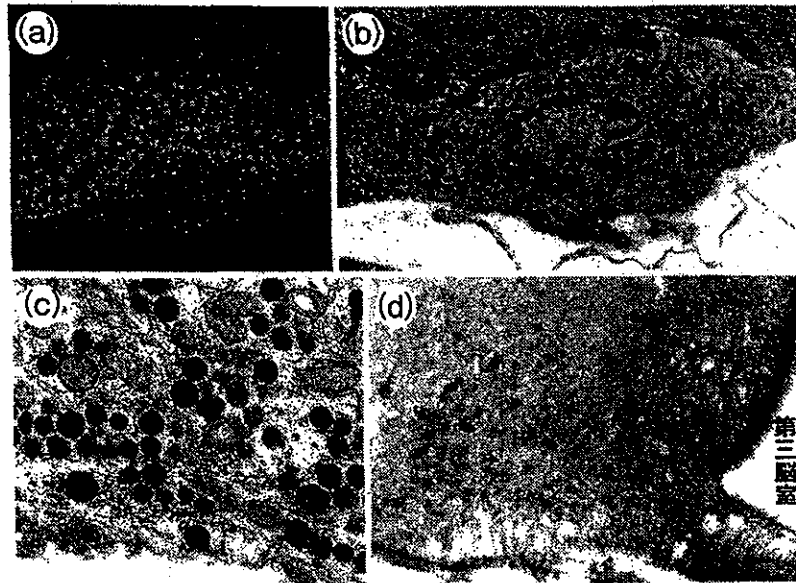


図5-2 ラットの胃と脳におけるグレリン産生細胞の存在

(a) *in situ* hybridization により、基底部から粘膜層下半分にグレリン産生細胞を認める。(b) 胃グレリン細胞の免疫電顕像。グレリンの免疫活性は、電子濃度が高くて丸い平均 120 nm の顆粒中に存在する。(c) (b)のグレリン貯蔵顆粒の拡大。グレリンの免疫活性を貯蔵顆粒上に認める。(d) 視床下部弓状核外側におけるグレリンニューロン。

管腔とは接していない閉鎖型内分泌細胞である¹⁶⁾。グレリン産生細胞は分泌顆粒を多く含み、膵臓でグルカゴンを産生する A 細胞に類似していることから A-like 細胞 (または X 細胞) と呼ばれていた細胞そのものであることが、グレリン抗体を用いた免疫電顕により判明した (図5-2)¹⁶⁾。この細胞は 1960 年代から存在が知られていたが、顆粒の内容物は不明であった。グレリンは、直径 120 nm でほぼ均一なサイズの電子密度の高い分泌顆粒に貯蔵されている。グレリン細胞は、胃体部の内分泌細胞の 20 ~ 25% を占め、ヒスタミンを産生する enterochromaffin-like (ECL) 細胞に次いで 2 番目に多い内分泌細胞である。ラット胎仔期の胃では 18 日目からグレリン産生細胞が出現し、出生後徐々にその数が増加し、思春期前に最高値となり、その後徐々に低下していく¹⁷⁾。グレリン遺伝子発現量には性差があり、雌のほうが発現量が多い。グレリン産生ニューロンは視床下部の弓状核外側部に存在し (図5-2)、その神経線維は正中隆起や視床下部の他の核に及ぶ^{1, 18)}。グレリン受容体は脳内では視床下部、大脳皮質、海馬、黒質や脳幹部に発現している。

ヒトのグレリン受容体は 3q26.2 に位置する¹⁹⁾。366 アミノ酸からなる 7 回

膜貫通型で、全長6キロ塩基対よりなり、3つのエクソンから構成されている。グレリン受容体は、消化管運動亢進作用を持つペプチドであるモチリンの受容体と約40%のアミノ酸相同性を有する。グレリン受容体は活性化後、三量体Gqタンパクに結合し、ホスホリパーゼの活性化とイノシトール3リン酸の産生を介して、小胞体からのCa²⁺放出を促進する。このCa²⁺経路がグレリンの細胞内情報伝達系である。胃のグレリンと下垂体のグレリン受容体は、GHにより負の調節を受けている。GH遺伝子過剰発現ラットではグレリンとその受容体の遺伝子発現は著明に抑制され、GH遺伝子欠損dwarfラットでは逆に亢進している。グレリン受容体遺伝子の転写は、甲状腺ホルモンとエストロゲンにより活性化され、グルココルチコイドにより抑制される^{20, 21)}。

4. グレリンの摂食亢進作用

グレリンは、ラットやマウスに中枢および末梢投与すると、摂食亢進と体重増加作用を示す^{22, 23)}。グレリン投与による摂食亢進は、遺伝的に成長ホルモンを欠損しているspontaneous dwarf ratでも見られることから、成長ホルモンを介した作用でない。ヒトでもグレリンの摂食亢進作用が報告されている。英国のグループは、正常被検者9人にグレリンまたは生理食塩液を投与し、1週間以上の間隔をあけて前回投与しなかったほうを投与するクロスオーバー実験を行った²⁴⁾。前夜からの絶食後、ヒトグレリンを5 pmol/kg/分で持続投与し、2時間後に370kcalの軽めの朝食を摂取して、さらに2時間後にビュッフェ形式で食べ放題のチキンカレー、ライス、フルーツサラダ、チョコレート、菓子からなる昼食を30分間摂取し、その後グレリン投与を中止した。自由摂取したカロリーは、グレリン投与によりクロスオーバー実験の全員で増加し、平均値は生理食塩液投与群の1,130kcalからグレリン投与群では1,440kcalへ増加した。持続静脈内投与中のグレリン血漿濃度は、基礎値の2.4～2.6倍の増加で、生理的範囲であった。

視床下部に存在し、摂食促進に作用するニューロペプチドY (NPY)^{25, 26)},

agouti 関連タンパク質 (agouti-related protein, AgRP)²⁷⁾, オレキシン (orexin)²⁸⁾, メラニン凝集ホルモン (melanin-concentrating hormone, MCH)²⁹⁾, オピオイドペプチド, ガラニン (galanin)などは, 脳室内投与によって摂食促進作用を示すが, 末梢投与では効果を示さない³⁰⁾。グレリンの摂食促進効果は脳室内投与のほか, 静脈内や腹腔内投与でも認められ, 今まで知られている中でグレリンが唯一の末梢性空腹信号として摂食促進に作用している。

摂食は, 中枢と末梢で産生される摂食亢進物質と抑制物質の複雑な相互作用により, 巧妙に調節されている。視床下部には, 摂食調節に関与する重要な中枢核が存在し, 多くの情報が統合され, エネルギー代謝が制御されている。視床下部諸核の破壊実験や刺激実験の成績から, 腹内側核は摂食抑制に, 視床下部外側野や背内側核は摂食促進に機能することが示されている。視床下部弓状核は, 脂肪組織で産生され摂食抑制と体重減少をもたらすホルモンであるレプチン^{31, 32)}の主たる作用部位であり, 摂食亢進作用を示す NPY と AgRP が存在する。両ペプチドは同一のニューロン (NPY/AgRP ニューロン) で産生され³³⁾, レプチン受容体を有してレプチンから抑制性の制御を受けている。NPY/AgRP ニューロンにはグレリン受容体が発現している³⁴⁾。グレリンの中枢投与により, 弓状核内側部にある NPY/AgRP ニューロンの 39% が Fos タンパク質 (神経細胞の活動性を示すタンパク質で, 転写調節因子 *c-fos* の翻訳産物)³⁵⁾ を発現し, NPY mRNA 量も増加した²²⁾。さらに, NPY と AgRP の拮抗物質や抗 IgG を脳室内に前投与すると, グレリンの摂食作用が阻止されたことから, グレリンは NPY/AgRP ニューロンを活性化して, 両ペプチドの産生と分泌を促進し, 摂食作用を発現すると考えられる。免疫染色により, グレリンニューロンの神経線維が, 直接 NPY/AgRP ニューロンに投射していることも示されている。レプチンが NPY と AgRP の抑制因子であることから, グレリンはこのレプチン作用に拮抗している²²⁾。さらに, 経静脈的に投与されたグレリンも NPY/AgRP ニューロンを活性化することから, 末梢グレリンの摂食促進作用も両ペプチドを介することが予想される。

弓状核の外側部には, 摂食抑制に作用するプロオピオメラノコルチン

(POMC)³⁶⁾と cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART)³⁷⁾の両者を産生する POMC/CART ニューロンが存在する³⁸⁾。POMC 前駆体がプロセッシングと修飾を受け、メラノサイト刺激ホルモン(α -MSH)が産生される。 α -MSH はメラノコルチン (MC)-4 受容体を活性化し、摂食抑制作用と異化亢進作用を示す³⁹⁾。AgRP は内因性の MC-4 受容体アンタゴニストであり、 α -MSH と拮抗的に作用して摂食亢進を起こす。

オレキシンは、摂食亢進や睡眠・覚醒レベルの調節に機能しているペプチドである^{28, 40, 41)}。オレキシンにはオレキシン A と B があり、両者は単一遺伝子よりコードされ、46% のアミノ酸相同性を持つ。オレキシン A は 33 アミノ酸残基よりなり、分子内に 2 か所のジスルフィド (S-S) 結合を持つペプチドで、オレキシン B は 28 アミノ酸残基よりなる直鎖ペプチドである。いずれも C 末端がアミド化されている。電子顕微鏡を用いた二重免疫染色により、グレリンの神経終末の一部が視床下部外側野にあるオレキシンニューロンとシナプスを形成していることが明らかとなった⁴²⁾。さらにグレリンの脳室内投与によりオレキシンニューロンの 23% に Fos の発現を認めた。抗オレキシン A と抗オレキシン B に対する IgG (各 0.25 μ g) を脳室内に前投与すると、グレリンの脳室内投与 (200 pmol) による 2 時間の摂餌量亢進は低下した (対照 IgG 3.78 \pm 0.34 g 対抗オレキシン IgG 2.33 \pm 0.20 g)。またオレキシン遺伝子欠損マウスでは、対照マウスと比べてグレリンの脳室内投与 (200 pmol) による 2 時間の摂餌量が有意に少なかった (対照マウス 0.22 \pm 0.02 g 対オレキシン欠損マウス 0.15 \pm 0.03 g)。これらのことから、グレリンの神経線維にはオレキシンニューロンに直接投射する系があり、グレリンの摂食亢進作用の一部はオレキシン系を介していると考えられる。オレキシンニューロンには NPY 神経終末からの情報入力も存在することが、解剖学的に知られている⁴³⁾。グレリンは NPY/AgRP ニューロンを刺激することから、オレキシンへの情報伝達は NPY/AgRP ニューロンを介している可能性もあるが、これは抗 NPY IgG や Y1 受容体アンタゴニストの投与実験により、否定的である。NPY とオレキシンは、グレリンの下流で別々に摂食調節に作用している。図 5-3 に現在までに判明しているグレリ

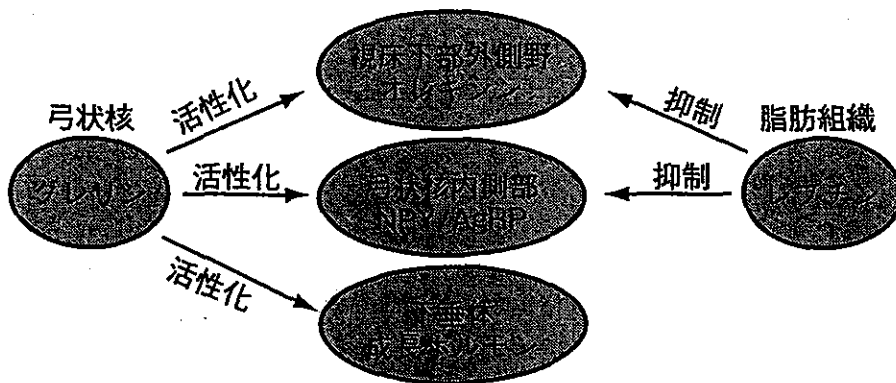


図5-3 グレリンの中樞作用

グレリンニューロンは弓状核腹側に存在し、約 $20 \mu\text{m}$ の中型ニューロンである。平均 110 nm のグレリン貯蔵顆粒を有している。神経線維は弓状核内側にある NPY/AgRP ニューロンや視床下部外側野にあるオレキシンニューロンへ直接投射し、これらのニューロンを活性化して摂食亢進に機能する。NPY/AgRP ニューロンとオレキシンニューロンはレプチン受容体を発現し、これらのニューロン上でグレリンとレプチンは拮抗的に作用している。グレリン神経線維は正中隆起へも投射し、下垂体前葉からの GH 分泌を促進する。

の神経線維を介した脳内の直接作用を示している。

(1) グレリンのエネルギー代謝調節に関する作用

浸透圧ポンプを用いてグレリンを 250 pmol/日 、12日間ラット脳室内に投与すると、摂食量の増加と著明な体重増加を認めた。グレリンの連続皮下投与においては、摂食量やエネルギー消費は変化しなかったが、体重は増加した²²⁾。この体重増加は脂肪組織の増大によるもので、除脂肪組織には変化を認めなかった。さらにグレリン皮下投与では呼吸商 (RQ) の増加が認められ、グレリンが脂肪組織の増大と体脂肪利用の抑制に作用することが示唆された²³⁾。RQ とは、ある反応によって消費された酸素量に対する二酸化炭素の生成量の割合で、代謝過程を反映している。グルコースの燃焼による RQ は 1.00、脂質は 0.71、タンパク質は 0.81 であり、RQ の増加は脂質の燃焼の減少を意味している。

ラット妊娠母体に 1日3回各 3 nmol のグレリンを皮下投与すると、新生仔体重は雄、雌ともに生理食塩液投与群に比べて有意に重くなった¹⁷⁾。また、出産後から雌の新生仔にグレリンを皮下投与すると、開膈が対象群の 30.7日と比べ 2.8日早まった。ガンを移植して悪液質 (カヘキシア) を来したヌードマウスへのグレリン投与でも、摂食亢進と体重増加作用が見られた。

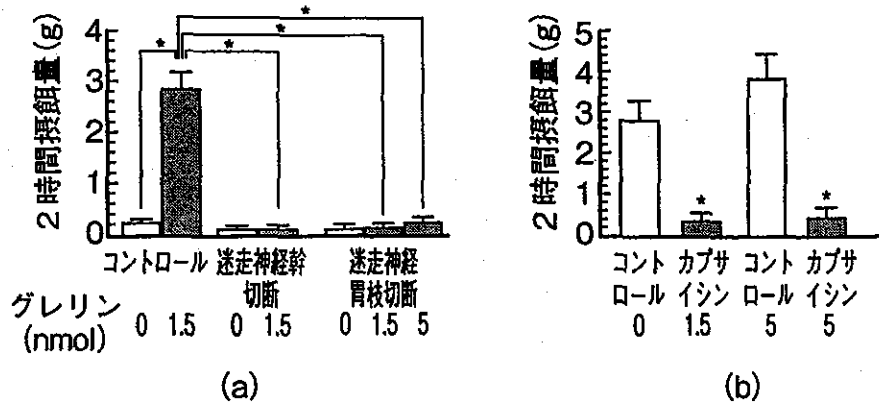


図5-4 迷走神経遮断ラットにおける静脈内投与グレリンの摂食促進作用

(a) 迷走神経切断ラットでのグレリン(1.5 nmol または 5 nmol, 黒カラム)静脈内投与後の2時間摂餌量。*: $p < 0.0001$ (コントロールとの比較)。(b) カプサイシン投与ラットでのグレリン(1.5 nmol または 5 nmol, 黒カラム)静脈内投与後の2時間摂餌量。*: $p < 0.001$ (コントロールとの比較)

最近の研究により、胃から分泌されるグレリンの中枢への作用経路が解明された⁴⁴⁾。迷走神経は、消化管からの種々の情報を脳幹を経て、間脳や新皮質に伝達する脳神経である。消化管の物理・化学的刺激や消化・吸収に伴って消化器から分泌される物質の一部は、迷走神経求心路を介して延髄孤束核へ情報を伝達する。この感覚神経線維の細胞体は、頸静脈孔を出たところにある迷走神経節に存在する。迷走神経は運動と感覚の両方の線維からなる。横隔膜下迷走神経線維の約90%は髄鞘のない求心線維(感覚線維)で、カプサイシンに感受性を持つ。迷走神経を切断したラットおよび迷走神経求心線維を特異的に遮断するカプサイシンを投与したラットでは、グレリンによる摂食促進作用は起こらなかった(図5-4)⁴⁴⁾。一方、脳室内に投与したグレリンは迷走神経切断やカプサイシン前投与にもかかわらず、摂食亢進作用を示した(図5-5)。ラットへのグレリンの静脈内投与は、視床下部のニューロペプチドYニューロンやGHRHニューロンを活性化したが、迷走神経遮断ラットへのグレリン投与では、これらの神経細胞を活性化しなかった⁴⁴⁾。グレリン受容体は迷走神経求心性ニューロンで産生され、求心線維末端へ輸送される。またグレリンの静脈内投与は、迷走神経胃枝求心線維の電気活動を抑制する。胃から分泌されるグレリンは、迷走神経末端に存在する受容体に直接作用して迷走神経求心路の電気活動を抑制することにより、成長ホルモン分泌や空腹に関する情報を脳内

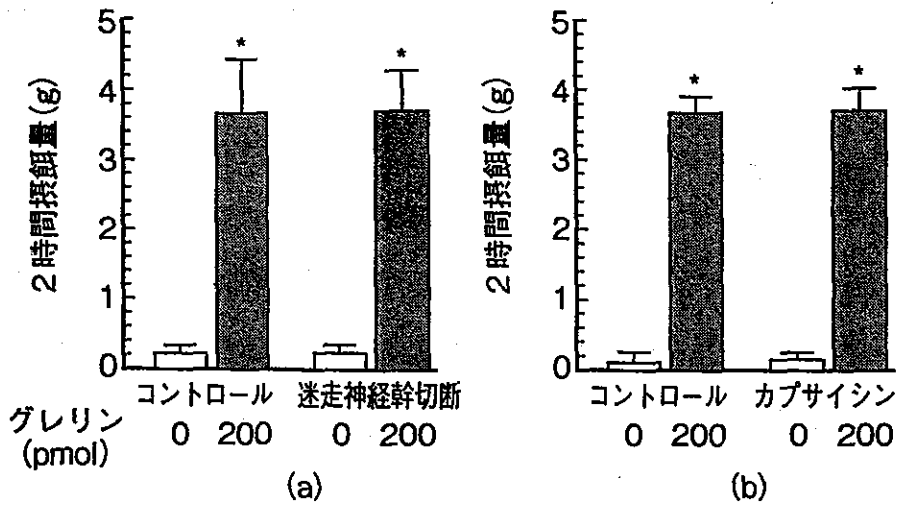


図5-5 迷走神経遮断ラットにおける脳室内投与グレリンの摂食促進作用

(a) 迷走神経切断ラットでのグレリン(200 pmol, 黒カラム)側脳室内投与後の2時間摂餌量。*: $p < 0.0001$ (グレリン非投与群との比較)。 (b) カプサイシン投与ラットでのグレリン(200 pmol, 黒カラム)側脳室内投与後の2時間摂餌量。*: $p < 0.0001$ (グレリン非投与群との比較)

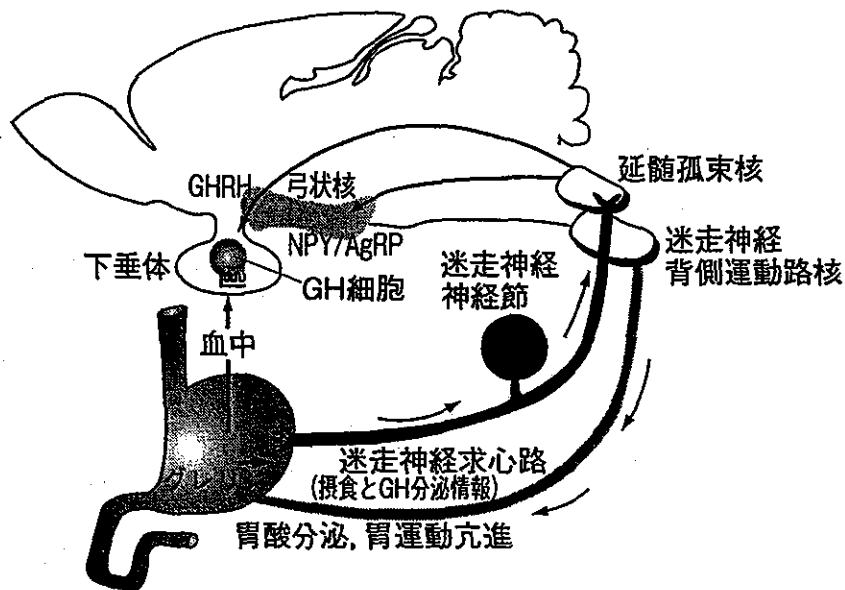


図5-6 胃から分泌されたグレリンの脳と下垂体における作用経路

グレリンは迷走神経求心路末端に存在する7回膜貫通型受容体に結合し、摂食とGH分泌に関する情報は延髄孤束核に伝達される。これらの情報は、シナプスをかえて視床下部のNPY/AgRPニューロンとGHRHニューロンに伝達される。血中を介して、直接下垂体に入りGHを分泌する経路もある。グレリン情報の一部は、迷走神経遠心路を介して胃酸分泌と胃運動亢進に機能する。

へ伝達している (図5-6)。

上部小腸で産生されるコレシストキニン (CCK) は、胆のう収縮、膵外分泌促進などの作用とともに摂食抑制ペプチドとしても機能している。CCKは、迷走神経節で産生され迷走神経求心路末端まで輸送されるCCK受容体に結合

して、グレリンとは逆にその電気活動を亢進し、延髄孤束核に摂食抑制情報を伝達する⁴⁵⁾。

(2) 分泌調節

空腹時のヒト血漿グレリン濃度は、C端抗体を用いた測定では 148 ± 28 fmol/mlで、脂肪酸化された生物活性のあるグレリン分子だけを測定できるN端抗体を用いた測定では 5.4 ± 1.4 fmol/mlである。グレリンの定量では活性型グレリンの測定が望ましいが、脂肪酸修飾のエステル結合は血中や血漿中で不安定であり、採血後の血漿分離やその保存法、Sep-pakによる抽出処理方法などでその値はかなり変動する。そのため、活性型グレリンの増減を反映し、かつ物質的に安定なC端抗体を用いた総グレリン免疫活性の測定で、ほぼ代用できる。

血漿グレリン濃度は、体格指数 (BMI : body mass index, 身長 \div 体重 \div 体重) と逆相関を示し、肥満者で低く、神経性食思不振症では高い^{46, 47)}。神経性食思不振症、重症心不全や肺がんで悪液質の強い症例も、血漿グレリン濃度は高値を示した。ヒト血漿グレリン濃度の日内変動は、各食前に高値を示し、摂食後に低下した^{46, 48)}。午前2時から3時に頂値を示し、これは血漿GH濃度の頂値と一致していた。

ヒトやラットでグレリンの分泌は空腹により刺激され、摂食やブドウ糖負荷で抑制された⁴⁷⁻⁵⁰⁾。胃のグレリン産生は、絶食やインスリン投与ならびに摂食抑制作用を持つ脂肪組織由来ホルモン レプチンの投与により増加した⁴⁹⁾。このような異化亢進状態では、同化作用を持つグレリンの産生が代償的に亢進するためと考えられる。遺伝性レプチン欠損マウスなど過食と肥満を呈するモデル動物では、胃におけるグレリン産生は代償的に低下していた。胃のグレリン細胞がどのような受容体、トランスポーターあるいはチャネルを発現して、産生や分泌を調節しているかはまだ十分に明らかでないが、ソマトスタチンにより分泌が抑制されることが示されている⁵¹⁾。