

グレリン系に関与する遺伝子を改変した動物の解析を通じた、グレリンの生理的役割の検討

有安宏之¹⁾、岩倉 浩²⁾、赤水尚史³⁾

1) 和歌山県立医科大学 内科学第一講座 講師

2) 京都大学大学院医学研究科 メディカルイノベーションセンター 准教授

3) 和歌山県立医科大学 内科学第一講座 教授

はじめに

グレリンは、成長ホルモン分泌促進物質 (Growth Hormone Secretagogue; GHS) 受容体の内因性リガンドとして、1999年に国立循環器病センターの児島、寒川らによりラット胃から単離・同定された¹⁾。28個のアミノ酸からなり、3番目のセリン残基がオクタン酸によってアシル化修飾されているといったユニークな構造を有しており、そのアシル化修飾は、membrane-bound ghrelin O-acyltransferase (GOAT) によって触媒されている²⁾。グレリン受容体は、視床下部のみならず消化管・膵臓・心臓・甲状腺・血管などの多臓器にわたって発現していることから、グレリンは多彩な生理作用を有していることが推察されていた。

実際、グレリンを外来性に投与すると、GH分泌促進作用、摂食促進作用、胃酸分泌促進作用、消化管運動促進作用、インスリン分泌抑制作用など様々な薬理学的効果を発揮する。我々は、これらの作用を利用し、グレリンの医療応用を目指した臨床研究を行ってきた^{3,4)}。また、それと並行して、科学的裏付けを得るために、グレリンもしくはグレリンアナログを過剰分泌するマウス^{5,6)} やグレリン分泌低下マウス⁷⁾ などを作成し、グレリンの生理学的意義の検討も行ってきた。

本稿では、グレリンの生理学的意義について自験結果を踏まえつつ述べる。

1. 成長ホルモン分泌、成長に対するグレリンの役割

外来性に投与されたグレリンが、成長ホルモン (GH) 分泌を促進させることはグレリンの発見当初からよく知られていたが、内因性のグレリンが GH/IGF-I 軸や成長に果たす役割は、長らく不明のままであった。海外から報告された、グレリンノックアウトマウス、グレリン受容体ノックアウトマウスを用いた解析結果は、グレリンの薬理学特性から予想されていた結果とは違い、意外なものであった (Table1)。グレリンシグナルが先天的に欠失

したマウスの外観、成長のスピード、体組成などは、野生型マウスと比較して差異はなく、GH/IGF-I軸も大きな変化を認めなかった^{8,9)}。先天性なグレリンシステムの欠失による適応現象を回避するために、我々と McFarlaneらのグループは、それぞれ独立して、後天的にグレリン分泌が低下するマウスの作成を試みた^{9,10)}。グレリンプロモーターの下流にジフテリアトキシン受容体を挿入し、グレリン分泌細胞にジフテリアトキシン受容体を強制発現させたモデルマウスは、ジフテリアトキシンの注射によって、任意の週齢でグレリン分泌細胞が破壊され、後天的にグレリンが欠失した状態となった(図1)。

	血清IGF-I濃度	摂食		インスリン分泌	参考文献
		Homeostatic	Hedonic		
グレリン欠損マウス	→or↓ (成長障害なし)	→(標準食) →or↓(高脂肪食)	不明	↑	8), 18)
グレリン受容体欠損マウス	→or↓ (成長障害なし)	→(標準食) →or↓(高脂肪食)	↓	↑	9), 13)
GOAT 欠損マウス	→(自由摂食) ↓(カロリー制限)	→(標準食) →or↓(高脂肪食) ↓(中鎖脂肪酸含有食)	↓	↑	13)
後天的グレリン分泌低下マウス	→	→	不明	→	7), 10)

Table 1 グレリン系に関与する遺伝子の改変動物 (Loss-of-function)

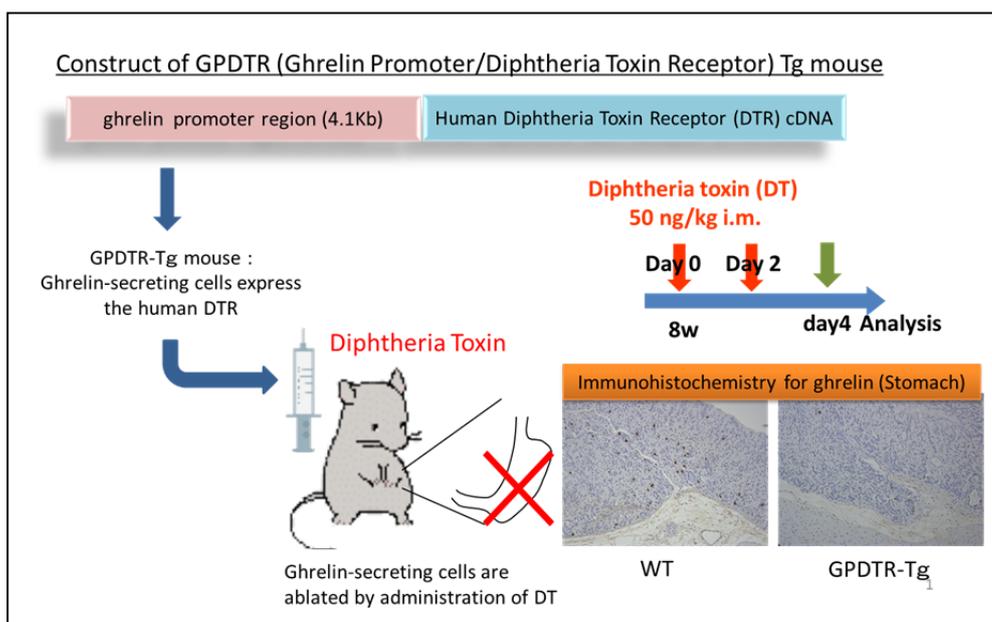


図1 後天的グレリン分泌低下マウス (グレリンプロモーターを利用したジフテリアトキシン受容体強制発現マウス)

この後天的グレリン欠損マウスにおいても、グレリンノックアウトマウスと同様に、血清 IGF-I 濃度の変化や成長の遅延を認めることはなかった。これらの結果は、グレリン発見当初の置村らの、グレリン受容体アンタゴニストをラットに投与しても GH の分泌パターンや分泌量に変化は生じないという報告を支持するものであり、循環血中のグレリンは生理的には GH 分泌に大きくは関与していないことを示唆している。

	血清IGF-I濃度	摂食	体重	インスリン分泌	参考文献
グレリン過剰発現マウス Bacterial artificial Chromosome (BAC) Neuron Specific Enolase (NSE)	→ 不明	↑ →	↑ ↓	↓ →	12) 20)
グレリン/GOAT ダブルトランスジェニックマウス	不明	→ (中鎖脂肪酸含有食)	↑ (中鎖脂肪酸含有食)	不明	13)
グレリノーママウス(SV40-T-antigen)	↑	→	↓ (腫瘍による通過障害)	↓	5)
グレリン誘導体過剰発現マウス	→	→	→	↓	6)
グレリン産生細胞移植マウス	不明	↑	不明	不明	11)

Table 2 グレリン系に関与する遺伝子の改変動物 (Gain-of-function)

一方、循環血中のグレリンが上昇するタイプのモデルマウスを用いた、GH/IGF-I 軸の検討においては、一定の見解に定まっていない(Table 2)。岩倉らは、グレリンプロモーターの下流に SV40-antigen を挿入したコンストラクトを用いて、グレリン産生細胞を腫瘍化させる方法で、循環血中のグレリン濃度が上昇したマウスを作成した¹¹⁾。このマウスの血中グレリン濃度は、絶食によって上昇し、摂餌によって低下するといった生理的な分泌パターンを維持しており、このマウスの血清 IGF-I 濃度は、胃腫瘍の為に食事通過が物理的に妨げられ、摂取カロリーが減少し栄養状況が不良であるにもかかわらず、野生型と比較して高値を示した。しかしながら、bacterial artificial chromosome 法を用いて作成された、グレリン過剰発現マウス¹²⁾やグレリンアナログを過剰発現するマウス⁶⁾においては、成長や血清 IGF-I 濃度に変化が見られなかったと報告されている。これらの差異は、グレリン血中濃度やグレリンの分泌パターンの違いによって生まれたものかもしれないが、いずれにせよ、循環血中のグレリンは GH 分泌や成長に関して必須の因子でないようである。

2. 摂食に対するグレリンの役割

A) ホメオスタティックな摂食行動

循環血中のグレリン濃度は、空腹時に上昇し、食後に低下する。また、外来性のグレリン投与は摂食を促進させ、その作用の一部は、視床下部に存在するグレリン受容体を介する NPY/AgRP ニューロンの活性化によるものとされている。これらの事実から、内因性のグレリンは食事開始のイニシエーターとして働いている可能性が示唆されていた。しかしながら、グレリンノックアウトマウス、グレリン受容体ノックアウトマウスを用いた解析結果は、グレリンの薬理学特性から予想されていた結果とは違い、GH に関する解析結果と同様に意外なものであった^{8,9)}。グレリンシグナルが先天的に欠失したマウスの摂餌量、摂餌パターン、絶食後の摂餌量などは、野生型マウスと比較して差異を認めなかった。この結果は、グレリンのアシル化酵素である GOAT を欠失させ、アシル化グレリンが合成できずデスアシルグレリンのみを作り出す遺伝子改変動物においても同様であった¹³⁾。摂食という生命維持に重要な行動は、先天的にホルモンを欠損させた場合、代償機構が働いている可能性があるため、我々が作成した後天的グレリン分泌低下マウスを用いて、一日摂餌量、明期暗期の摂餌パターン、絶食後の摂餌量、制限給餌に対する摂食行動の変化などの検討を行ったが、やはり結果は同じく摂食行動に一切の変化を認めなかった⁷⁾。これらの結果は、循環血中のグレリン濃度の低下や受容体異常によるグレリンシグナルの低下は、ホメオスタティックな摂食行動に何ら影響を与えない可能性を示唆している。

一方、血中グレリン濃度が上昇するタイプの遺伝子改変動物は、現在のところ、6 系統のモデルマウスの報告がある (Table 2)。そのうちの 2 報で摂餌量が上昇すると報告されているが、残りの 4 報では摂餌量に変化はきたさないと報告がされている。これらの差異は、摂餌量の増加を認めたとするモデルマウスは、胃においてグレリンを過剰発現させていたのに対し、残りのモデルマウスは、胃以外でグレリンを過剰発現させているものや胃で過剰発現しているものの腫瘍の発生の為、物理的に食物摂取が困難であったことなどが、その理由かもしれない。我々は、グレリン産生細胞の細胞株を有しており、それをヌードマウスの皮下に移植することによって血中グレリン濃度が上昇するマウスを作成し摂餌量を検討してみたところ、グレリン産生細胞を移植されたマウスの摂餌量は、細胞を移植していないものと比較して有意に増加していた¹¹⁾。この細胞株は、糖・インスリンの添加によってグレリン産生・分泌が低下するといった、生理的なグレリン分泌調節をある程度維持しており、この細胞を移植されたヌードマウスの血中グレリン濃度は、生理的なグレリン分泌パターンをある程度残しつつ上昇していたものと思われ、そのような状況下では摂食が促進される可能性があり興味深い結果であった。

B) 報酬系に関連する摂食行動

エネルギー調節は、ホメオスタティックな調節系と報酬系に関連する調節系の両者によってコントロールされている。ホメオスタティックな調節系が主に視床下部によってコントロールされているのに対して、報酬系に関連する調節系は視床下部、大脳辺縁系、扁桃体などによってコントロールされている。特に腹側被蓋野と側坐核が重要な部位であるが、グレリン受容体は、腹側被蓋野のドパミンニューロン上にも発現している¹⁴⁾。実際、グレリン投与によって腹側被蓋野のドパミンニューロンの発火が高まり、側坐核におけるドパミン放出が増加することが明らかになっており、この現象はグレリン受容体欠失マウスでは認められない¹⁵⁾。野生型マウスにおいては、グレリン投与によってアルコール消費や、嗜好性の高い餌の消費が増し、その一方で、GOAT 欠損マウスでは報酬系に関連する摂食行動が抑制されることが示されている。これらには、グレリンが、報酬系に関連する摂食行動、特に腹側被蓋野のドパミンニューロンを介する摂食行動を促進させる可能性が示唆されている。

3. インスリン分泌抑制作用

グレリンを外来性に投与するとインスリン分泌の低下を伴った血糖の上昇を認める。グレリン系に関与する遺伝子を改変させたマウスにおいても、概ねこれに一致した結果が得られている。グレリンを欠損させたマウスは、グルコース刺激によるインスリン分泌が野生型マウスに比べて亢進しており、反対にグレリンを過剰発現するマウスはインスリン分泌が抑制されている。グレリンがインスリン分泌を抑制するメカニズムも考察されており、急性期においては、グレリンは GTP 結合蛋白の $G\alpha_{i2}$ を刺激することによってインスリン分泌を抑制する¹⁶⁾。慢性期においては、グレリンは IA-2 β もしくは AMPK-UCP2 経路を亢進させる¹⁷⁾。Sun らは、グレリン欠損マウスの膵臓において UCP-2 の遺伝子発現が低下しており、その結果グルコースに対するインスリン分泌が亢進していたことを報告している¹⁸⁾。

グレリンは、胃のみならず膵ラ氏島においても発現しており、我々は膵ラ氏島内のグレリンの役割を検討するために、ラット insulin-II プロモーターを用いて、ラ氏島内でグレリンと GOAT を過剰発現する遺伝子改変動物を作成した¹⁹⁾。中鎖脂肪酸を多く含有した餌を与えた状況下において、このマウスの循環血中や門脈血中のグレリン濃度は野生型マウスと同等であったが、膵内のグレリン濃度は約 16 倍に上昇していた。しかしながら、耐糖能、インスリン分泌能などは、野生型マウスと差異を認めなかった。

これらの結果からは、インスリン分泌には、膵内のグレリンよりも、循環血中のグレリンが重要な役割を果たしている可能性が推察された。

おわりに

グレリンは、胃酸分泌、消化管運動、体温調節や心機能などにも関与している可能性が示唆されている。遺伝子改変動物の解析を通じて、これらの作用に関する、グレリンの生理的役割も今後明らかになっていくものと思われる。グレリンの臨床応用は、しっかりとした基礎的検討の上に成り立つものであり、より広く、より深く研究がなされていくことが望まれている。

【参考文献】

- 1) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, et al. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
- 2) Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132: 387-396.
- 3) Ariyasu H, Iwakura H, Yukawa N, Murayama T, Yokode M, et al. (2014) Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Endocr J* 61:735-742.
- 4) Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Murayama T, Sumi E, et al. (2008) Effects of ghrelin treatment on patients undergoing total hip replacement for osteoarthritis: different outcomes from studies in patients with cardiac and pulmonary cachexia. *J Am Geriatr Soc* 56:2363-2365.
- 5) Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, et al. (2009) A mouse model of ghrelinoma exhibited activated growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E802-811.
- 6) Yamada G, Ariyasu H, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, et al. (2010) Generation of transgenic mice overexpressing a ghrelin analog. *Endocrinology* 151:5935-5940.
- 7) Ariyasu H, Yamada G, Iwakura H, Matsumura S, Inoue K, et al. (2014) Reduction in circulating ghrelin concentration after maturation does not affect food intake. *Endocr J* 61:1041-1052.
- 8) Sun Y, Ahmed S, Smith RG (2003) Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol* 23: 7973-7981.
- 9) Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG (2004) Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4679-4684.
- 10) McFarlane MR, Brown MS, Goldstein JL, Zhao TJ (2014) Induced ablation of ghrelin cells in adult mice does not decrease food intake, body weight, or response to high-fat diet. *Cell Metab* 20: 54-60.

- 11) Iwakura H, Li Y, Ariyasu H, Hosoda H, Kanamoto N, et al. (2010) Establishment of a novel ghrelin-producing cell line. *Endocrinology* 151: 2940-2945.
- 12) Bewick GA, Kent A, Campbell D, Patterson M, Ghatei MA, et al. (2009) Mice with hyperghrelinemia are hyperphagic and glucose intolerant and have reduced leptin sensitivity. *Diabetes* 58:840-846.
- 13) Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, et al. (2009) GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 15: 741-745.
- 14) Perelló M, Zigman JM (2012) The role of ghrelin in reward-based eating. *Biol Psychiatry* 72: 347-353.
- 15) Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, et al. (2006) Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 116:3229-3239.
- 16) Dezaki K, Kakei M, Yada T (2007) Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes* 56:2319-2327.
- 17) Wang Y, Nishi M, Doi A, Shono T, Furukawa Y, et al. (2010) Ghrelin inhibits insulin secretion through the AMPK-UCP2 pathway in beta cells. *FEBS Lett* 584:1503-1508.
- 18) Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG (2006) Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab* 3: 379-386.
- 19) Bando M, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, et al. (2012) Transgenic overexpression of intraislet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E403-408.
- 20) Reed JA, Benoit SC, Pfluger PT, Tschöp MH, D'Alessio DA, et al. (2008) Mice with chronically increased circulating ghrelin develop age-related glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E752-760.