

助成番号 0834

グレリン遺伝子欠損マウスを用いた食塩感受性高血圧の発症メカニズムの解明

佐藤 貴弘, 児島 将康

久留米大学分子生命科学研究所

概要 グレリンは、リガンド不明のオーファン受容体、成長ホルモン分泌促進因子受容体の内因性リガンドとして胃から精製され、構造決定されたペプチドホルモンである。グレリンは、強力な成長ホルモンの分泌促進活性や、摂餌亢進、脂肪蓄積などの生理作用をもつことから、グレリンの分泌異常はメタボリックシンドロームの発症や進展に関与すると考えられている。また、糖尿病や肥満症などの病態では異常なグレリン値を示すことも知られている。一方で、グレリン受容体は、心臓、腎臓、脳幹など血圧調節に重要な組織に分布しているため、糖尿病や肥満症などの病態でグレリン分泌能が変化することによって、血圧調節の破綻が引き起こされる可能性が考えられる。そこで本研究では、高血圧の発症においてグレリンがどのような生理作用をもつのかについて明らかにすることを目的として研究を計画した。

グレリン遺伝子欠損マウスの血圧は、無麻酔・無拘束下において測定可能な慢性実験テレメリー自動計測システムを用いて行った。野生型マウスに比べ、グレリン遺伝子欠損マウスの血圧は明期において高い傾向を示し、また比較的短い周期で変動した。しかしながら、グレリン遺伝子欠損マウスにおける時計遺伝子の日内発現パターンや行動リズムは野生型マウスと差が認められなかったことから、生体リズムの発振機構は正常であると考えられた。そこで、グレリン遺伝子欠損マウスでは自律神経活動の調節機構に異常が生じているものと考え検討したところ、グレリン投与によって交感神経活動の一部が抑制された。次に、食塩感受性高血圧に対するグレリンの機能を明確にするため、食塩感受性高血圧ラットを用いて検討した。食塩感受性高血圧ラットでは血圧上昇に伴ってグレリン分泌が亢進していたため、グレリンが食塩感受性高血圧の発症に関与している可能性を考えグレリン受容体アゴニストを持続投与した。しかしながら、内因性グレリン分泌が低下したために生食投与群との間に血圧の差は認められなかった。一方で、グレリン受容体アンタゴニストの持続投与により、高食塩食負荷に伴う血圧上昇が短期間でおきた。しかしながら、アンタゴニストの効果がなくなると血圧上昇は抑えられたことから、グレリンは食塩感受性高血圧の発症そのものではなく血圧の上昇を抑えている可能性が考えられた。

以上から、グレリンは交感神経活動を抑制し、食塩感受性高血圧の発症に伴う血圧上昇を抑制していると推察される。

1. 研究目的

グレリン(ghrelin)は、リガンド不明のオーファン受容体、成長ホルモン分泌促進因子受容体(growth hormone secretagogue receptor; GHS-R)の内因性リガンドとして胃から精製され、構造決定されたペプチドホルモンである^[1]。

グレリン(またはアシルグレリン)は、28 アミノ酸残基からなり、N 末端から 3 番目のセリン残基の側鎖がオクタン酸で修飾されているという極めて特徴的な構造を持っている(Figure 1)。しかも、この修飾基はグレリンが生物活性を

発揮するために必須である。一方、オクタン酸の修飾がないものも存在しデスアシルグレリンと呼ばれている(Figure 1)が、デスアシルグレリンはグレリン受容体には反応しない。

グレリンは、強力な成長ホルモン(growth hormone; GH)の分泌促進活性や、摂餌亢進、脂肪蓄積などの生理作用をもつ。したがって、グレリン分泌の異常はメタボリックシンドロームの発症や進展に関与すると考えられている。また、糖尿病や肥満症などの病態では異常なグレリン値を示すことも知られている。一方で、グレリン受容体は、心臓、

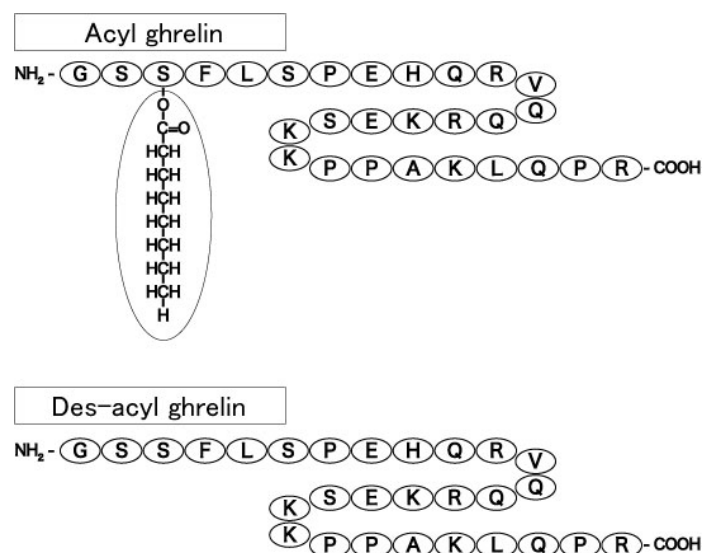


Figure 1. Molecular forms of ghrelin

腎臓、脳幹など血圧調節に重要な組織に分布している。このため、糖尿病や肥満症などの病態でグレリン分泌能が変化することによって、血圧調節の破綻を引き起こす可能性が考えられる。

そこで本研究では、高血圧の発症においてグレリンがどのような生理作用をもつのかについて明らかにすることを中心として研究を計画した。本研究では、グレリン遺伝子欠損マウスを作出し、食塩感受性高血圧の発症にグレリンがどのように関与するのかについて検討した。また、食塩感受性高血圧のモデル動物として食塩感受性高血圧ラットを使用し、食塩感受性高血圧時においてグレリンの分泌動態などを検討した。

2. 研究方法

すべての実験は、久留米大学生命に関する倫理委員会、および遺伝子組換え実験安全委員会の規定に基づいて行なった。

2.1 動物の飼育

本研究では、グレリン遺伝子欠損マウスおよび食塩感受性高血圧 (Dahl-S) ラットと対照群の食塩非感受性 (Dahl-R) ラットを使用した。

グレリン遺伝子欠損マウスは当研究所で繁殖・飼育しているものを使用した。グレリン遺伝子欠損マウスは、C57BL/6J マウスとのバッククロス交配を6世代以上重ねた雄マウスを使用した。グレリン遺伝子の欠損は、生後 7-10

日齢のマウス尾からゲノム DNA を抽出し、PCR 法によって確認した。ゲノム DNA の抽出は、Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega, WI) により行った。PCR 反応は、TaKaRa LA Taq™ (TaKaRa, shiga) を用い、2 ステップで行った (1 サイクル: 94°C, 1 分, 40 サイクル: 98°C, 10 秒, 68°C, 6 分, 1 サイクル: 72°C, 10 分)。実験には、12 週齢の雄マウスを使用した。

食塩感受性高血圧ラットと食塩非感受性ラットは、日本エス・エル・シー (Shizuoka) より、4 週齢の雄を購入後、当研究所にて飼育した。高血圧を誘導するためこれらラットには Mod Lab w/8% Sodium Chloride (TestDiet, IN) の高食塩食を給餌した。すべての実験において各群 4~6 匹ずつのラットを用いた。標準飼料下において 4 週齢から 6 週齢までの 2 週間、その後、8% 高食塩食下において飼育し、体重、摂餌量、血圧、心拍を週 1 回、9:00 a.m. ~ 13:00 p.m. の間に測定した。また血圧・心拍を正確に測定するため、4 週齢から 6 週齢までの 2 週間は、1 日 3 回、約 5 分間のハンドリングを全個体を実施した。

2.2 浸透圧ミニポンプによる持続投与

浸透圧ミニポンプはアルゼット社の #1002D を用いた。グレリン受容体アゴニストとして [D-Trp⁷, Ala⁸, D-Phe¹⁰]- α -Melanocyte Stimulating Hormone Amide fragment 6-11 (GHRP-6; Sigma, MO) を 1 mg/day/kg で、グレリン受容体アンタゴニストとして [D-Lys³]-GHRP-6 (Bachem, Bubendorf) を 6 mg/day/kg でそれぞれ 2 週間ずつ持続投

与した。浸透圧ミニポンプは、ラットの皮下に埋込んだ。

2.3 血圧・心拍の測定

血圧・心拍は、無加温型非観血式血圧計 (#MK-2000ST, Muromachi, Tokyo)を用いた tail-cuff 法と、持続的測定のための慢性実験テレメトリー自動計測システム (DSI, St. Paul, MN)を用いた方法により行った。ラットの血圧・心拍は、無加温型非観血式血圧計においてのみ測定した。

無加温型非観血式血圧計による測定は、動物をホルダーにいれ安静にしてから計測した。各個体とも連続して6回計測し、最高値と最低値を除いた4回分の測定データを平均し、その個体の血圧および心拍とした。

慢性実験テレメトリー自動計測システムを用いた持続的測定のために、グレリン遺伝子欠損マウスをケタミンにて麻酔後、血圧・心拍測定用送信器 (#TA11PA-C10, DSI, St. Paul, MN)の埋込み手術を行った。手術後の回復を早めるため、マウスの入ったケージを電気座布団の上に2日間置き、その後一般の飼育棚に移した。テレメトリー自動計測システムによる測定を開始する前にマウスを個別飼育とし、受信ボードの上に設置した。測定は、手術後10日以上経ってから行った。

2.4 行動量の測定

マウスの行動量を測定するために、ケージ設置型運動量測定装置 (Melquest, Toyama)を用いて行った。行動量の計測は15分間ごとに赤外線を横切った回数を記録した。恒常暗条件にするとマウス固有の行動リズムを観察できることから、はじめに通常の明暗条件でマウスを飼育した後、恒常暗条件とし、再度通常の明暗条件に変更して、マウスの行動量を計測後、アクトグラムを作成した。

2.5 グレリン濃度の定量

血漿中グレリン含量と胃組織グレリン遺伝子発現量を検討するために、ラットを速やかに断頭屠殺し、血漿と胃組織を採取した。前述のように、グレリンは脂肪酸修飾を受けて活性型となるが、この活性部位の構造は非常に不安定なため、採血は EDTA-2Na (1 mg/ml) とアプロチニンを添加したチューブで行い、速やかに遠心後 (4°C, 3,000 rpm, 10 分)、血漿サンプルの 1/10 量の 1 N 塩酸を加え Sep-Pak 抽出を行った。抽出サンプルは、凍結乾燥後、Active Ghrelin ELISA Kit (Sceti, Tokyo) および Desacyl-Ghrelin ELISA Kit (Sceti, Tokyo) にて測定し、血漿中グレ

リン含量を求めた。

2.6 遺伝子発現量の定量

胃組織は、採取後、速やかに PBS にて内容物を洗浄しドライアイス上で凍結した。その後、TRIzol 試薬 (Invitrogen, Tokyo)により全 RNA を抽出し、SuperScriptII (Invitrogen, Tokyo)を用いて 1st cDNA を作製した。定量は、SYBR Green PCR Core Reagent (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて行ない、PE Applied Biosystems PRISM 7000 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)により解析した

2.7 統計解析

統計解析は、統計ソフト「Mac 統計解析 Ver1.5」(Esumi, Tokyo)を用いて行なった。

3. 研究結果

3.1 グレリン遺伝子欠損マウスにおける血圧・心拍の解析

3.1.1 グレリン遺伝子欠損マウスにおける血圧・心拍の日内リズム

血圧調節に及ぼすグレリンの効果を検討するため、グレリン遺伝子欠損マウスを作成し、テレメトリー自動計測システムを用いて血圧・心拍を持続的に測定した。

血圧・心拍とも、野生型マウスでは活動期である暗期に高く、休息期である明期に低い、明確な日内リズムを示した (Figure 2)。特に、暗期から明期、あるいは明期から暗期に切り替わるときに、血圧・心拍の低下や上昇が速やかに起きた (Figure 2)。

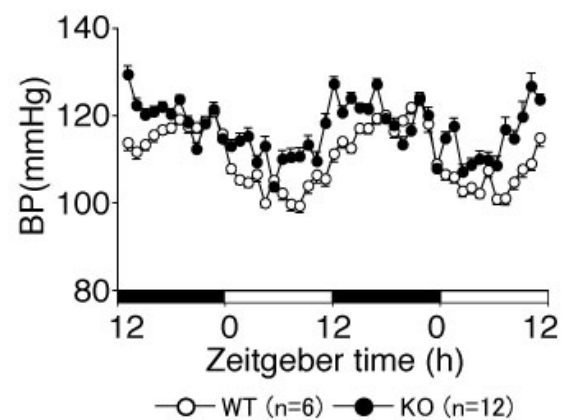


Figure 2. Circadian blood pressure rhythm of ghrelin-deficient mice

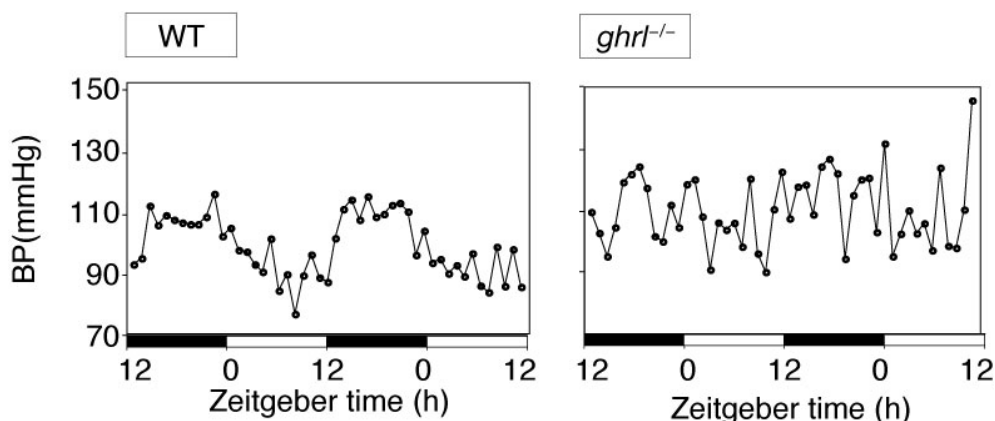


Figure 3. Individual blood pressure of wild-type and ghrelin-deficient mice

一方、グレリン遺伝子欠損マウスの血圧・心拍も、野生型と同じように暗期に高く明期に低い傾向を示したが、野生型に比べて若干血圧が高かった (Figure 2)。この傾向は、特に、明期において顕著に観察された (Figure 2)。さらに、暗期から明期、あるいは明期から暗期に切り替わるときに野生型で見られた血圧・心拍の迅速な変化は観察されず、比較的長い時間をかけて血圧・心拍の低下や上昇が起きた (Figure 2)。

血圧・心拍の日内変動を個体ごとに観察すると、野生型マウスに比べてグレリン遺伝子欠損マウスでは血圧・心拍が短い周期で変動する個体が多く観察された (Figure 3)。

3. 1. 2 グレリン遺伝子欠損マウスの時計遺伝子発現

このような観察から、グレリン遺伝子欠損マウスでは生体リズムの中核として知られている視床下部の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) において、時計遺伝子の発現に異常が生じている可能性が考えられた。そこで、代表的な時計遺伝子である *Per2* (Period homolog 2) 遺伝子発現量を経時的に測定した。その結果、野生型マウスにおいてもグレリン遺伝子欠損マウスにおいても同様な *Per2* 遺伝子発現の推移を示し、両群に差は認められなかった (Figure 4)。また、赤外線行動測定装置にてグレリン遺伝子欠損マウスの行動量を計測したが、グレリン遺伝子欠損マウスと野生型マウスの行動量に差は認められず、かつ周期解析からも行動リズムの異常は観察されなかった (Figure 5)。このことから、中枢レベルにおける時計遺伝子群は正常に作用していると考えられた。

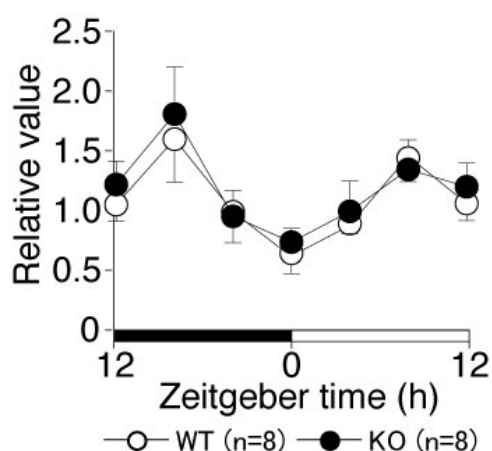


Figure 4. The time course of *Per2* gene expression

3. 1. 3 グレリン遺伝子欠損マウスにおける自律神経活動

このような観察から、グレリン遺伝子欠損マウスでは自律神経機能の一部に異常がある可能性が考えられた。そこで、代表的な自律神経機能である体温について日内変動を観察したところ、血圧と同様の傾向が観察された。電気生理学的な観察から、グレリンが血圧や体温の調節に関与する交感神経の機能を抑制している可能性が示唆されているが、現在研究中であるため、ここではその詳細を述べない。

3. 2 食塩感受性高血圧ラットにおけるグレリン分泌動態の検討

グレリンが食塩感受性高血圧の発症にどの程度関与しているのかを明らかにするために、食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl-Iwai ラットを用いて検討した。

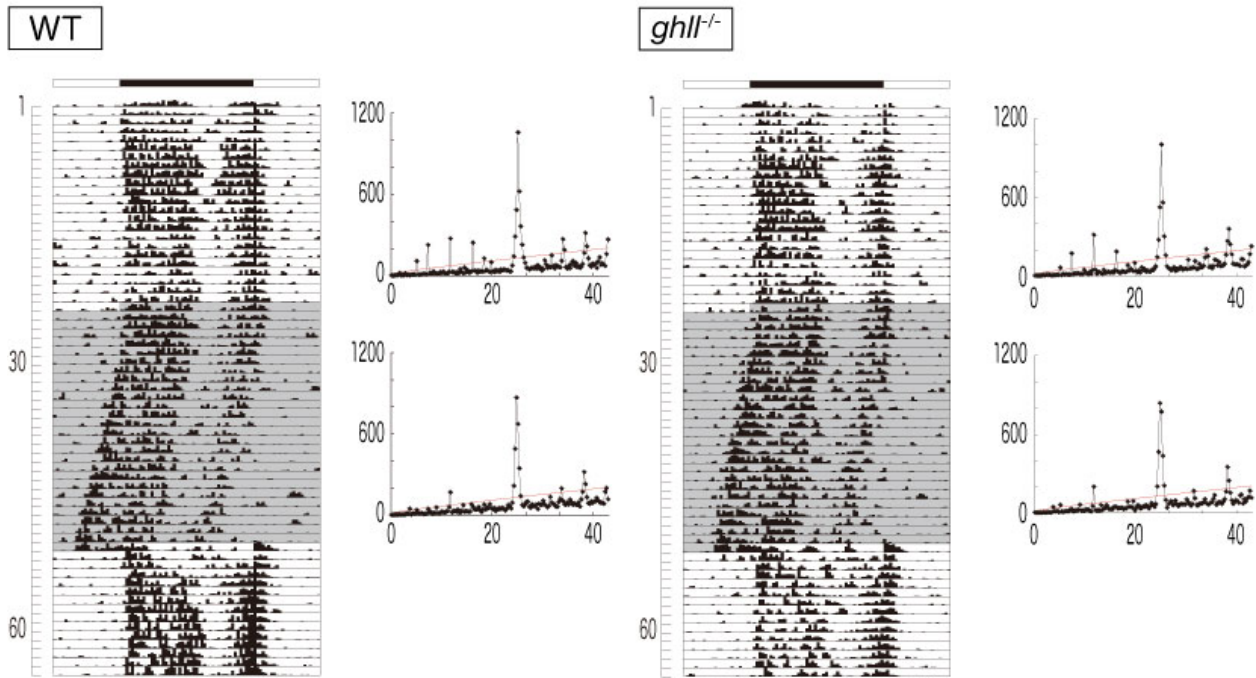


Figure 5. Behavioural rhythm of ghrelin-deficient mice

3. 2. 1 食塩感受性高血圧に伴うグレリン分泌の変化

グレリン分泌と高血圧との関与を検討するため、食塩感受性高血圧(Dahl-S)ラットと非感受性(Dahl-R)ラットを用いた。標準飼料下において、4週齢から6週齢まで、体重、摂餌量、血圧、心拍を測定したが両群間に差は認められず、また血漿中グレリン含量と胃組織のグレリン遺伝子発現量にも差は認められなかった。引き続き、6~10週齢までの4週間、8%高食塩食の給餌下で飼育した。これまでの報告と一致して、8%高食塩食を給餌後5週間で、食塩感受性高血圧ラットでは食塩非感受性ラットよりも、血圧が約50 mmHg高くなった(食塩感受性高血圧ラット; 193.7 ± 20.9 mmHg, 食塩非感受性ラット; 143.8 ± 3.3 mmHg)。また、同時に測定した心拍では、食塩感受性高血圧ラットで高い傾向は示したものの有意な差は認められなかった(食塩感受性高血圧ラット; 460.3 ± 33.0 BPM, 食塩非感受性ラット; 427.0 ± 21.6 BPM)。食塩感受性高血圧ラットでは、高血圧の進展とともに体重(食塩感受性高血圧ラット; 286.3 ± 32.1 g, 食塩非感受性ラット; 383.5 ± 11.3 g)や摂餌量(食塩感受性高血圧ラット; 118.4 ± 37.5 g/週, 食塩非感受性ラット; 209.6 ± 11.1 g/週)の減少することが知られているが、本研究においてもこれを確認した。

グレリンには、生物活性を持つアシルグレリンと生物活

性を持たないデスアシルグレリンが存在する。食塩感受性高血圧ラットにおいては、8%高食塩食を給餌後5週間で、血漿中アシルグレリンおよびデスアシルグレリン濃度ともに増加した。また、胃組織におけるグレリン遺伝子含量を検討したところ、食塩感受性高血圧ラットにおいて含量が高かった。このことは、食塩感受性高血圧の発症や進展に伴って、グレリンが合成・放出されていることを意味すると思われる。

3. 2. 2 グレリン受容体アゴニスト投与と食塩感受性高血圧

前項のようなグレリン分泌の変化が、食塩感受性高血圧の発症にどの程度関与するのかを検討するために、高食塩食の給餌と同時にグレリン受容体アゴニストであるGHRP-6を浸透圧ミニポンプで2週間投与した。対照群として生理食塩水投与群を設けた。しかしながら、投与後の血圧・心拍は生理食塩水投与群とGHRP-6投与群とも同じように推移し、群間の差は認められなかった(Figure 6)。フィードバック作用によって内因性のグレリン分泌能が低下している可能性も考えられたため、血漿中グレリン濃度を測定した。その結果、GHRP-6投与群においてグレリン含量の低下が観察された(Figure 7)。

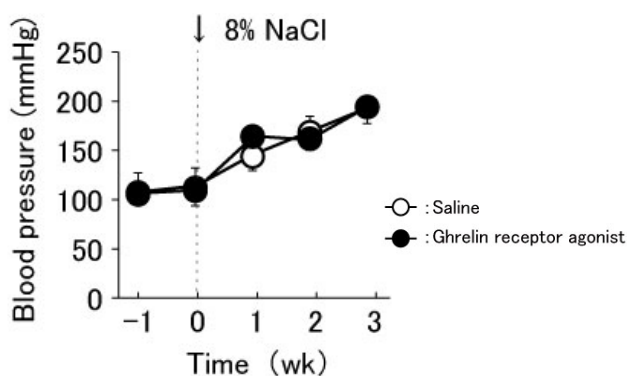


Figure 6. The blood pressure with the administration of ghrelin receptor agonist

3. 2. 3 グレリン受容体アンタゴニスト投与と食塩感受性高血圧

そこで次に、高食塩食の給餌と同時にグレリン受容体アンタゴニストである [D-Lys³]-GHRP-6 を浸透圧ミニポンプで2週間投与した。対照群として生理食塩水投与群を設けた。その結果、生理食塩水投与群に比べ、グレリン受容体アンタゴニストの投与によって血圧上昇の早まる傾向が観察された。しかしながら、浸透圧ミニポンプの効果がなくなる2週目以降、グレリン受容体アンタゴニスト群での血圧上昇はプラトーとなり、生理食塩水投与群の血圧上昇が進んで最終的には両群とも同程度の最高値を示した。

4. 考 察

本研究におけるグレリン遺伝子欠損マウスの解析から、このマウスでは血圧の日内リズムに異常が生じている可能性が示された。しかしながら、中枢の時計遺伝子の発現パターンや行動量には野生型マウスとの差が見られなかったことから、生体リズムの発振機構は正常であると考えられる。したがって、グレリン遺伝子欠損マウスでは自律神経活動に異常があるのではないかと考えられた。現在その詳細を明らかにしている段階ではあるが、グレリンが自律神経活動の一部、特に交感神経活動を抑制している可能性が示された。

一方、食塩感受性高血圧の発症との関わりを明確にするために行った Dahl-Iwai ラットを用いた解析から、食塩感受性高血圧の発症に伴ってグレリン分泌の亢進することが示された。そこで、グレリン受容体アゴニストを持続投与して食塩感受性高血圧の発症が抑えられるのかについて

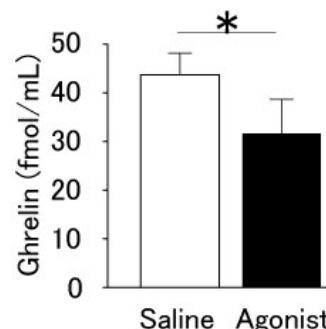


Figure 7. Plasma ghrelin contents with the administration of ghrelin receptor antagonist

検討したが、明らかな効果は認められなかった。この原因として、内因性グレリン分泌の低下が考えられた。そこで次に、食塩感受性高血圧ラットにグレリン受容体アンタゴニストを投与して検討すると、生理食塩水投与群に比べて血圧上昇の早くなる傾向が観察された。しかしながら、浸透圧ミニポンプの効果が切れるとグレリン受容体投与群の血圧上昇は抑制され、次第に生理食塩水投与群の血圧との差が認められなくなった。これらのことから、グレリンは食塩感受性高血圧の発症そのものではなく、食塩感受性高血圧の発症に伴う血圧上昇を抑えている可能性が考えられた。

本研究成果から、食塩感受性高血圧においてグレリンを持続的に投与するよりも単回投与する方が血圧の上昇を抑制する効果として現れる可能性が大きいと予想される。また、食塩感受性高血圧に対するグレリンの血圧上昇抑制効果は、グレリンによる交感神経活動の抑制によるものと推察される。今後、グレリン遺伝子欠損マウスや食塩感受性高血圧ラットにおいて、グレリンと自律神経活動の調節について詳細に解析することで、食塩感受性高血圧の病態におけるグレリンの生理的な意義に迫ることができると考えられる。

5. 今後の課題

グレリンの発見は、新たな GH 分泌刺激経路の発見という点で生物学に大きなインパクトをもたらした。一方で、グレリンは、脂肪酸で修飾された生理活性ペプチドとして哺乳類では唯一のペプチドである。このような修飾構造は遺伝子配列の情報からだけでは全く予想できず、ポストゲノ

ム研究において、実際に生物活性に機能する蛋白質やペプチドの同定が極めて重要であることを示したモデルである。また、グレリンの発見により、成長ホルモン分泌促進因子からだけでは予測できなかった新たな生理機能も数多く明らかにされた。今後はこれらの研究成果をもとにしてグレリンの臨床応用をターゲットとした研究が進み、グレリンの研究は新たな展開を迎えるものと考えられる。特に、グレリンの循環調節作用については様々な視点から研究が進められており、臨床応用に向けてさらなる研究の進展が期待される分野であろう。

本研究はグレリンが食塩感受性高血圧の発症にまで関与するのではないかとの仮説から計画したが、食塩感受性高血圧の発症そのものには関与していないようである。一方で、グレリン受容体アンタゴニストの投与実験などから、グレリンが高食塩食の給餌に伴う血圧上昇を抑制する可能性が示唆された。しかしながら、グレリン受容体アゴニストの持続投与実験では内因性グレリンの分泌能が低下するために、グレリンの血圧上昇抑制効果を明確に示すことができなかったことなどから、今後、投与法の検討など

が必要だと考えられる。

はじめにも述べたように、グレリンは肥満症や糖尿病などの病態でその分泌が大きく変化するホルモンである。一方でその受容体は、血圧調節に重要な組織にも分布していることから、肥満症や糖尿病などの病態でグレリン分泌能が変化すると、血圧調節に異常を来す可能性が考えられる。したがって、本研究成果は食塩感受性高血圧の発症予防だけではなく、メタボリックシンドロームという枠組みの中での高血圧の発症予防や発症メカニズムの解明に繋がるものと期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼を申し上げます。

文献等

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.*: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.

No. 0834

The Analysis of Physiological Roles of Ghrelin in Salt Sensitive Hypertension

Takahiro Sato, Masayasu Kojima

Institute of Life Science, Kurume University

Summary

Ghrelin is an endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor that is synthesized predominantly in the stomach. Ghrelin stimulates growth hormone release, food intake, and fat deposition and the abnormal secretion of ghrelin is a trigger of a metabolic syndrome. On the other hand, ghrelin receptor distributes in the heart, kidney and brain stem that are the important tissues for vasoregulation. Then, we investigated the physiological roles of ghrelin in salt sensitive hypertension.

We used the ghrelin-deficient mice and the salt sensitive (Dahl-Iwai) rats in this study. The circadian blood pressure rhythm of ghrelin-deficient mice was a little bit abnormal analyzed by telemetry system. In addition, the blood pressure of ghrelin-deficient mice was high in the light phase when the mice take a rest. However, there were no differences in the *Per2* gene expression of the suprachiasmatic nucleus and in the circadian behavioral rhythm, indicating that the biological clock center was normal. These results implied that ghrelin might modulate autonomic nervous activity. By ghrelin administration in wild type mice, the sympathetic nervous activities were certainly suppressed. Under the salt sensitive hypertension in Dahl rats, plasma ghrelin and ghrelin gene expression were increased. Then, we thought that ghrelin might develop the salt sensitive hypertension. However, the ghrelin receptor agonist had no effect on hypertension although we administrated the agonist by osmotic mini-pump. In this condition, the endogenous ghrelin content was low level. On the other hand, the administration of ghrelin receptor antagonist induced the early elevation of blood pressure. However, this early elevation was suppressed with the disappearance of the antagonist effect. Therefore, it might be appropriate to think that ghrelin suppressed the elevated blood pressure with salt sensitive hypertension.

Our results may indicate that the ghrelin control the salt sensitive hypertension by suppressing a part of the sympathetic nerve activity.