

助成番号 0730

食塩感受性高血圧の発症におけるグレリン作用の解明

佐藤 貴弘, 児島 将康

久留米大学分子生命科学研究部遺伝情報研究部門

概要 グレリンは胃から分泌されるホルモンで、成長ホルモン放出、摂食亢進、脂肪蓄積などの生理作用を持つホルモンである。成長ホルモン分泌促進因子の内因性リガンドとして同定されたグレリンは、成長ホルモン分泌促進因子を用いた研究から生理機能が一部予測されていたこともあって、発見からわずか数年で多くの研究論文が報告された。その結果、メタボリックシンドロームのさまざまな病態においてグレリンの分泌動態は変化することが明らかとなっている。また最近では、グレリンのエネルギー代謝調節作用だけではなく、グレリンが直接的にあるいは成長ホルモン分泌を介して間接的に循環器系を調節していることが次第に明らかとなって来っており、臨床応用の観点から循環器系に対するグレリンの生理作用に注目が集まっている。そこで本研究では、食塩感受性高血圧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た。本研究では、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、また、血圧調節に対するグレリンの作用を明確にするためにグレリン遺伝子欠損マウスを作成して検討した。食塩感受性高血圧ラットに 8% 高食塩食を 5 週間給餌すると、血漿中グレリン濃度が増加し、かつ、胃組織におけるグレリン遺伝子含量が非感受性群よりも高くなった。このことから、食塩感受性高血圧の進展に伴って、グレリンが合成・放出されるものと考えられる。そこで、グレリン遺伝子欠損マウスを作成し、tail-cuff 法にて血圧を測定したが、野生型マウスとの間に有意な差は認められなかった。しかしながら、野生型マウスに比べてグレリン遺伝子欠損マウスの血圧や心拍は、測定データ間の偏差が大きかったことから、血圧や心拍を安定する機構、すなわち自律神経の調節機構に異常があるのではないかと考えた。そこで、テレメリー自動計測システムによって血圧・心拍と、代表的な自律神経機能である体温を測定した結果、血圧・心拍と体温とも、野生型マウスでは規則正しい日内リズムを示すのに対し、グレリン遺伝子欠損マウスでは日内リズムに著しい乱れが観察された。以上から、食塩感受性高血圧の病態ではグレリン分泌が亢進することが明らかとなった。また、食塩感受性高血圧の発症過程には自律神経活動のリズム異常が生じる可能性も考えられた。

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]。強力な成長ホルモン (growth hormone; GH) の分泌促進活性と摂食亢進や脂肪蓄積などの生理作用をもつこのホルモンは、胃という予想外の産生部位とその特徴的な構造のため発見に至るまで多くの研究者たちが長年にわたって凌ぎを削ってきた。

いまから約 30 年前、モルヒネ受容体の内因性リガンドとしてエンケファリンの構造が解明され、それをもとに沈痛作用が強く耽溺作用のない鎮痛薬の開発を目指して様々なオピオイドペプチド誘導体が合成された。米国チューレン大学の Bowers 博士らによってこのうちのあるものが弱い成長ホルモン分泌促進活性を示すことが見いだされると^[2]、その後、GHRP-6 やヘキサレリンのようにより強力な成長ホルモン放出活性を示すペプチドが合成された^[3]。このような、成長ホルモンの分泌促進活性を持つ天然には存在しない合成化合物は成長ホルモン分泌促進因子 (growth

hormone secretagogue; GHS)と呼ばれる。

成長ホルモン分泌促進因子の開発とともに、成長ホルモン分泌促進因子が成長ホルモンを放出する作用機構についても研究が進められた。成長ホルモン放出を刺激する因子としてよく知られていた成長ホルモン放出ホルモン (growth hormone releasing hormone; GHRH)はその受容体を介して細胞内 cAMP 濃度を上昇させる。これに対し成長ホルモン分泌促進因子は成長ホルモン放出ホルモン受容体とは異なる受容体を活性化し、細胞内イノシトール三リン酸 (inositol 1,4,5-triphosphate; IP3) 系を介して細胞内 Ca²⁺イオン濃度を上昇させ成長ホルモンを放出する (Figure 1)。

このことは、成長ホルモン分泌促進因子に対する未知の受容体の存在を示していたが、実際、後にメルク社の研究グループによって成長ホルモン分泌促進因子受容体の構造が解明された^[4]。その結果、成長ホルモン分泌促進因子受容体が細胞膜7回貫通型のG蛋白質共役型受容体であることや、主として視床下部や下垂体に局在していることなどが明らかとなった。こうして成長ホルモン分泌促進因子受容体の構造や局在が明らかになると、世界中で成長ホルモン分泌促進因子受容体の局在をもとに視床下部や下垂体でのリガンド探索が進められた。このような中、国立循環器病センターの児島(現 久留米大学)らはラットの胃抽出物に強力な活性を見いだした。このペプチドは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、かつこの修飾基が活性発現のために必須であるという極めて特徴的な構造を持つ

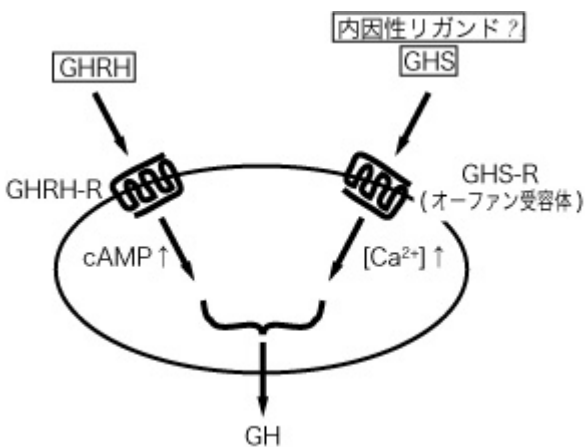


Figure 1. 下垂体からの GH 分泌刺激経路の模式図

(Figure 2)。この新規内因性リガンドは「グレリン (ghrelin [略記: ghrl])」と名付けられた。その由来は、英語の "grow" がインド・ヨーロッパ基語 "ghre" であり、また成長ホルモン (GH) を放出する (release) ペプチドであることも意味している。

このようにグレリンの発見は長い歴史的な背景の上に行っているが、成長ホルモン分泌促進因子の内因性リガンドとして同定されたグレリンは、成長ホルモン分泌促進因子を用いた研究から生理機能が一部予測されていたこともあって、発見からわずか数年で多くの研究論文が報告された。その結果、メタボリックシンドロームのさまざまな病態において、グレリンの分泌動態は変化することが明らかとなっている。また最近では、グレリンのエネルギー代謝調節作用だけではなく、グレリンが直接的にあるいは成長ホルモン分泌を介して間接的に循環器系を調節していることが次第に明らかとなって来ており、臨床応用の観点から循環器系に対するグレリンの生理作用に注目が集まっている。

そこで本研究では、食塩感受性高血圧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た。本研究では、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 (Dahl-S) 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を検討した。次に、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病態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。これらの研究から、グレリンの新たな生理作用について以下で考察していきたい。

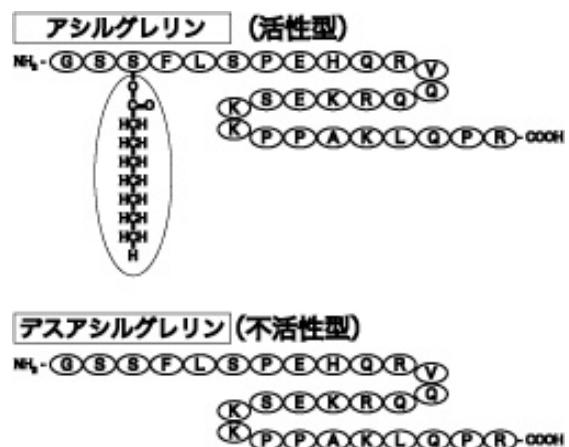


Figure 2. グレリンの構造

2. 研究方法

以下のすべての実験は、久留米大学生命に関する倫理委員会の規定に基づいて行なった。動物は、通常、12時間の明暗周期(明期;7:00-19:00, 暗期;19:00-7:00)で、室温 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ の環境下で飼育した。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。

2.1 食塩感受性高血圧ラットにおけるグレリン分泌の検討

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)ラットは、日本エス・エル・シー(Shizuoka)より、4週齢の雄を購入した。ラットは、すべての実験において各群6匹ずつ用いた。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6~11週齢までの5週間飼育し、体重、摂餌量、血圧、心拍を週1回測定した。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。血圧・心拍は、無加温型非観血式血圧計(#MK-2000ST, Muromachi, Tokyo)を用い、tail-cuff法にて計測した。

次に、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1N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。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 Regent(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。

2.2 グレリン遺伝子欠損マウスの解析

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世代重ねたものを使用した。グレリン欠損は、常法にしたがってサザンハイブリダイゼーション法により確認した。また、グレリン遺伝子の確認は全項と同様にcDNA合成までを行い、RT-PCR法によって検討した。組織学的解析についても常法にしたがってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色と免疫組織化学染色に供した。免疫組織化学的染色はavidin-biotinylated complex(ABC)法にしたがい、Vectastain ABC-PO kit(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)を用いて行なった。生化学的解析を行うためにグレリン遺伝子欠損マウスから血清を採取し、全血マルチローター(T.Chatani & Co.Ltd., Osaka)とVetScan(T.Chatani & Co.Ltd., Osaka)により測定した。血糖値の測定はグルテストセンサー(Sanwa, Aichi)を用いて行ない、全血をグルテストEII(Sanwa, Aichi)によって解析した。

血圧・心拍と体温を持続的に測定するために、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。グレリン遺伝子欠損マウスを麻酔後、血圧・心拍測定用の送信器(#TA11PA-C10, DSI, St.Paul, MN)を大動脈に、体温測定用の送信器(#TA10TA-F20, DSI, St.Paul, MN)を腹腔内に、それぞれ埋込み手術を行った。測定は、手術10日後から行った。またマウスの行動リズムは、ケージ設置型運動量測定装置(Melquest, Toyama)を用いて行った。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、マウスの行動リズムを測定した。

3. 研究結果

3.1 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、6~11週齢までの5週間、8%高食塩食を給餌下で飼育した。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(Figure 3a)。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(Figure 3b)。このことは、食塩感受性高血圧の進展に伴って、グレリンが合成・放出されていることを意味すると考えられる。

グレリンは、成長ホルモン分泌を促し、また摂餌を亢進するホルモンである。したがって、グレリンの分泌量が上昇すれば、成長や摂餌量が亢進してくると考えられるが、食塩感受性高血圧ラットにおいては、グレリン分泌が上昇したにもかかわらず、体重や摂餌量が減少した。しかしながら、摂餌量を体重比として求めると、高血圧の進展に伴う食塩非感受性ラット群との差は認められなかった。このことから、食塩感受性高血圧の進展に伴うグレリン分泌量の増加は、高血圧に対する積極的な作用である可能性が高いと考えられた。

以上の研究から、食塩感受性高血圧の病態ではグレリンの合成・放出が増加することが明らかとなった。

3.2 グレリン遺伝子欠損マウスの解析

血圧調節に対するグレリンの作用を明らかにするために、グレリン遺伝子欠損マウスを作出した。本研究では、マウスグレリン遺伝子のすべてのエクソンを Neo カセットで置き換えた。グレリン遺伝子の欠損は、サザンハイブリダイゼーション法によって確認した(Figure 4a)。また、グレリン遺伝子欠損マウスの RT-PCR 法による解析から、調べたいいずれの組織においてもグレリン遺伝子は検出されないことが示された(Figure 4b)。抗グレリン抗体による免疫組織化学的染色からも、胃組織でグレリン陽性を示す細胞は認められ

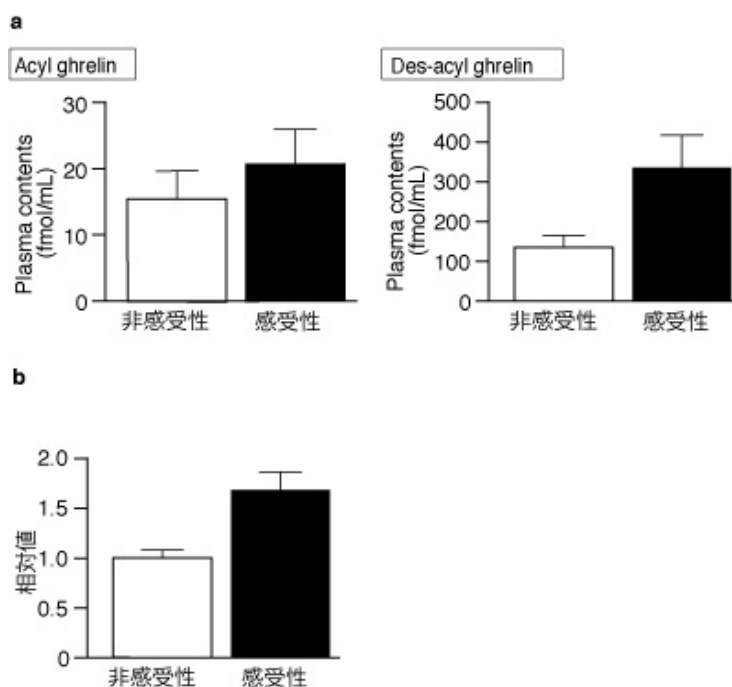


Figure 3. Dahl ラットにおけるグレリン分泌動態
a. 血漿中グレリン含量, b. 胃のグレリン遺伝子発現量

なかった(Figure 4c)。血中および胃組織において、グレリンに特異的な ELISA を行なったが、グレリンは検出されなかった(Figure 4d)。以上から、我々の作出したマウスでは確かにグレリン遺伝子が欠損し、グレリンの分泌もないことを確認した。作出したグレリン遺伝子欠損マウスの外貌は、野生型マウスと比べ大きな違いは観察されなかった。次に、組織学的所見を観察したが、ヘマトキシリン・エオジン染色での観察からは、脳、肺、心臓、肝臓、胃、膵臓、副腎、腎臓、精巣、卵巣など、検討したすべての組織で異常所

見は得られなかった。産まれてきた仔の、体重、摂餌量、血中生化学検査値などを検討した。産まれた仔マウスはいずれも正常に成育し、体重や摂餌量、成長ホルモン細胞数にも変化は認められなかった。生化学的検査を行ったが、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アミラーゼ、アルブミン、カルシウム、クレアチニン、グルコース、グロブリン、トリグリセリド、ナトリウム、総蛋白、総ビリルビン、尿素窒素などの値に、差は認められなかった。

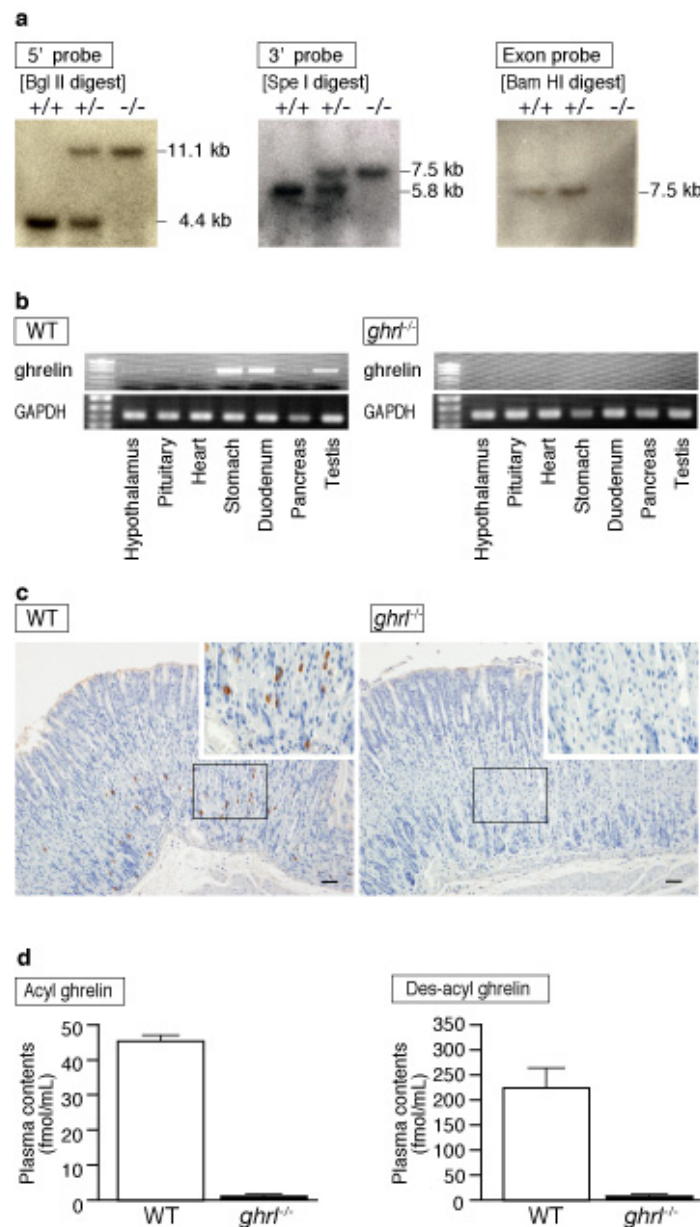


Figure 4. グレリン遺伝子欠損マウスの作出

- a. サザンハイブリダイゼーション, b. 組織におけるグレリン遺伝子発現,
c. 胃におけるグレリン陽性細胞, d. 血漿中グレリン含量

グレリンは、成長ホルモン放出、摂餌亢進、脂肪蓄積などの作用をもつことが知られているが、成長に伴う体重と積算摂餌量はグレリン遺伝子欠損マウスも野生型マウスも同じように推移し、差は認められなかった。これは、既知の摂食調節ペプチドによる代償機構のためである可能性も考えられたことから、代表的な摂食亢進ペプチドであるニューロペプチドYと摂食抑制ペプチドのPOMCの遺伝子発現量をリアルタイムPCR法によって調べたが、これら遺伝子発現量に差は認められなかった。摂餌調節は多くの摂食調節物質によって巧妙に行なわれていることから、今後さらなる解析が必要であると考えられる。

次に、グレリン遺伝子欠損マウスの耐糖能や脂質代謝能を検討した。グルコース寛容試験(1g グルコース/kg 体重)を正常時および絶食時のグレリン遺伝子欠損マウスで行なった結果、いずれの場合も耐糖能に野生型マウスとの差は認められなかった。また、グレリンは肝臓において脂質合成やグルコースの生成に関与すると報告されていることから、肝ミトコンドリアの糖脂質代謝関連酵素遺伝子の発現を検討した。本研究におけるリアルタイムPCR法での解析からは、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(carnitine palmitoyltransferase; CPT-I)、アセチル CoA カルボキシラーゼ(acetyl-CoA carboxylase; ACC)、脂肪酸

合成酵素(fatty acid synthase; FAS)、グルコース-6-ホスファターゼ(glucose-6-phosphatase; G-6-Pase)のいずれの遺伝子発現にも差は認められなかった。

グレリンが血圧調節に及ぼす効果を検討するためグレリン遺伝子欠損マウスの血圧を tail-cuff 法にて測定したが、グレリン遺伝子欠損マウスと野生型マウスとの間に血圧・心拍ともに有意な差は認められなかった。しかしながら、個々のデータを観察すると、野生型マウスに比べてグレリン遺伝子欠損マウスの血圧や心拍は、測定データ間での偏差の大きいことが明らかとなった。したがって、血圧や心拍を安定する機構、すなわち自律神経の調節機構に異常があるのではないかと考え、テレメリー自動計測システムを用いて血圧・心拍と、代表的な自律神経機能である体温を測定した。その結果、血圧・心拍と体温とも、野生型マウスでは規則正しい日内リズムを示すのに対し、グレリン遺伝子欠損マウスでは、日内リズムの著しい乱れが観察された(Figure 5)。そこでこれらの異常が、行動リズムの異常に起因するのかどうかを行動測定装置にて計測した。その結果、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、また周期解析からも行動リズムの異常は観察されなかったことから、中枢レベルで時計遺伝子群は正常に作用していると考えられた(Figure 6)。

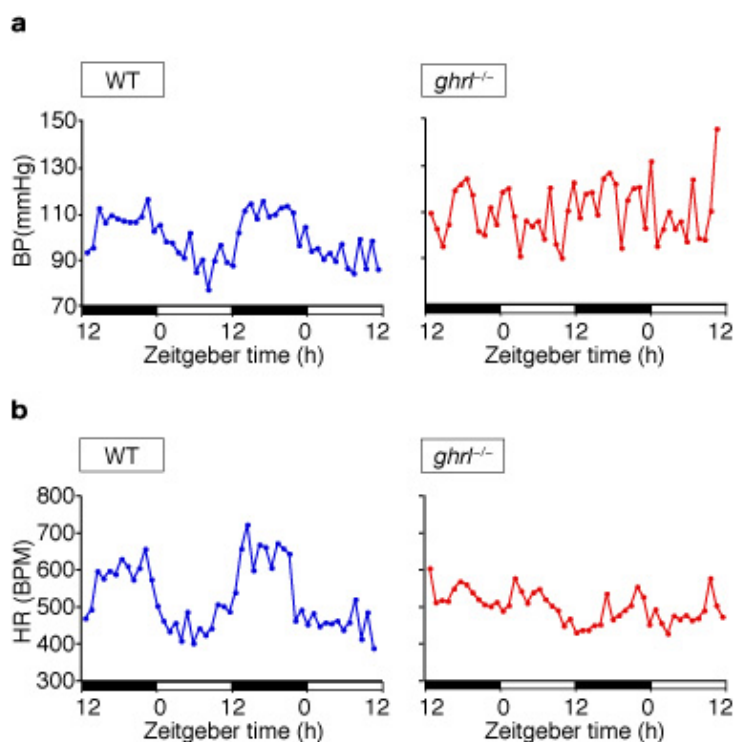


Figure 5. グレリン遺伝子欠損マウスの血圧 (a) と心拍 (b)

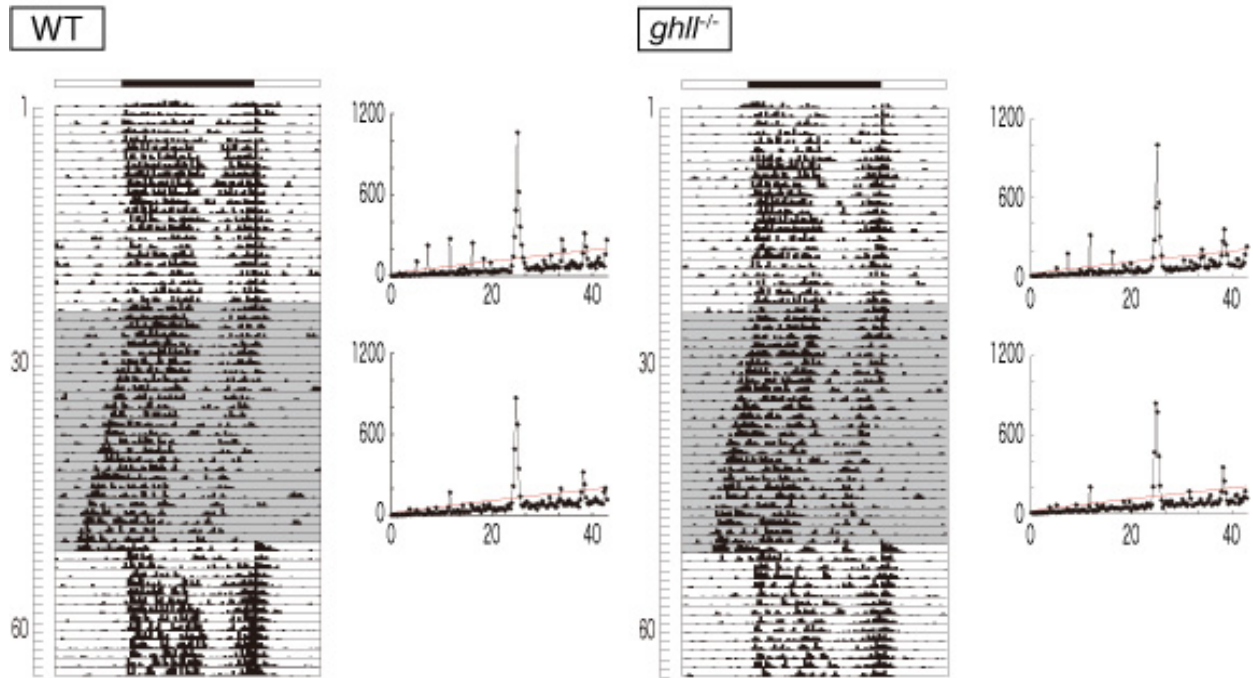


Figure 6. グレリン遺伝子欠損マウスの行動リズム

4. 考察

本研究において、食塩感受性高血圧ラットでは、高血圧の進展に伴って体重や摂餌量が減少しているにもかかわらずグレリン分泌量が亢進していた。これは、体重や摂餌量の減少に伴う反応とも考えられるが、体重あたりの摂餌量に食塩非感受性群との差はなくバランスが保たれていることから、食塩感受性高血圧に対するグレリン分泌量の亢進は循環調節系への積極的な反応だろうと考えられる。今後、グレリンやグレリン受容体アゴニストを食塩感受性高血圧の発症前に持続的に投与し、さらに検討していきたい。

また、グレリン遺伝子欠損マウスでは、成長や摂餌量、脂肪蓄積量などが正常であった。一方で、テレメトリー自動計測システムによって血圧・心拍や体温を持続的に計測すると、これらの日内変動に著しい乱れが観察された。しかしながら、グレリン遺伝子欠損マウスの行動リズムは正常であったため、中枢レベルでの時計遺伝子群の機能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の調節系に何らかの異常があると考えられる。食塩感受性ラットとグレリン遺伝子欠損マウスでは、食塩感受性という点において単純に比較すること

はできないが、食塩感受性高血圧の発症と自律神経系の関わりはこれまでも予想されており、今後、グレリン遺伝子欠損マウスを詳細に解析することで食塩感受性高血圧の発症メカニズムあるいは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の成果

が報告されているため、さらなる研究の進展が期待される分野であろう。また、本研究結果から、グレリンの自律神経調節作用が提唱された。今後様々な自律神経機能をグレリン遺伝子欠損マウスにおいて検討し、食塩感受性高血圧の発症やその病態におけるグレリンの生理的な意義と、生体の恒常性維持機構との関わりを明らかにしていきたいと考えている。

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.

[2] Bowers CY, Momany F, Reynolds GA, *et al.*: Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 1980; 106: 663-667.

[3] Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, *et al.*: On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* 1984; 114: 1537-1545.

[4] Howard AD, Feighner SD, Cully DF, *et al.*: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974-977.

No. 0730

Analysis of Ghrelin Functions on 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. Previous studies demonstrated that ghrelin stimulates growth hormone release, food intake, and fat deposition. In addition, although some reports indicated that ghrelin directly or indirectly regulates blood pressure, the detailed mechanism is unknown. Then, to investigate ghrelin roles on vasoregulation, we generated ghrelin-deficient (*ghrl*^{-/-}) mice. Unexpectedly, *ghrl*^{-/-} mice exhibited normal growth, cumulative food intake, reproduction, histological characters, and serum parameters. There were no differences in feeding patterns between wild-type (WT) mice and *ghrl*^{-/-} mice. However, we found that ghrelin deficiency might cause autonomic nervous dysfunctions due to the impaired circadian autonomic nervous rhythmicity. *Ghrl*^{-/-} mice lacked both a clear circadian rhythm and a stable baseline in blood pressure and heart rate. Since thermoregulation also regulates by autonomic nervous activity, we investigated body temperature in *ghrl*^{-/-} mice. *Ghrl*^{-/-} mice lacked a clear circadian rhythm and a stable baseline in body temperature. Thus, ghrelin is secreted in high pressure induced by salt and might be required to maintain autonomic nervous system homeostasis.