

脊髄を介するグレリンの大腸運動促進作用

The colokinetic effect of ghrelin via the spinal cord

平山 晴子¹・縦木 勝巳¹・椎名 貴彦²・志水 泰武²

Haruko Hirayama¹, Katsumi Mominoki¹, Takahiko Shiina², Yasutake Shimizu²

¹岡山大学 自然生命科学研究支援センター 動物資源部門

Department of Animal Resources, Advanced Science Research Center, Okayama University

²岐阜大学 大学院 連合獣医学研究科 獣医生理学研究室

Department of Basic Veterinary Science, Laboratory of Physiology, The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University

Abstract

Since the gastrointestinal motility is well controlled under the enteric nervous system, the isolated intestine can move by itself. However, it is clear that the gastrointestinal motility is also under the control of the central nervous system. To investigate the central regulation mechanism of gastrointestinal motility, it is needed to use *in vivo* experimental setup. We have examined the role of ghrelin in regulation of the colorectal motility in the spinal cord by *in vivo* experiments of rats. Ghrelin is a 28-amino-acid peptide hormone and predominantly released from stomach. Ghrelin has various actions such as stimulation of growth hormone release and appetite. The 3rd residue of ghrelin is acylated, and this acylation is essential to bind ghrelin receptor. There is another form of ghrelin that lacks acylation, called des-acyl ghrelin. The intrathecal administration (L6-S1) of ghrelin enhanced the colorectal motility. This effect was abolished when the pelvic nerves were severed before the administration of ghrelin. Although solely administration of des-acyl ghrelin did not change the basal colorectal motility, des-acyl ghrelin transiently suppressed the ghrelin-induced colorectal motility. We suspect that ghrelin and des-acyl ghrelin have a role to regulate the colorectal motility via the spinal cord.

はじめに

消化管の蠕動運動とは、消化管の内容物を口から肛門側へと送り出す、方向性をもった消化管の運動である。消化管は、体外へ摘出した後も動く様子が観察される。そして摘出した消化管であってもその動きは、口から肛門へという方向性を持った蠕動運動であることから、非常によく制御されたメカニズムが消化管内に備わっていることが推察される。消化管運動は、「第2の脳」とも呼ばれる非常によく発達したその内在神経系によって制御されている。消化管内在神経系は、知覚神経、介在神経、および運動神経を備えているため、情報の受容、情報の統合と処理、および平滑筋への指令、という、情報の入力からそれに対する応答を、内在神経系のみによって対処することが可能である。

*In vivo*の実験系による消化管運動の解析

前述のように、消化管には内在神経系が発達しているため、内在神経系による消化管運動制御についての解析は、摘出標本を用いて行うことが可能である。しかし生体において消化管運動は、中枢神経系からも影響を受けていることは無視できない。便意を感じて排便をする、また、ストレスによって下痢や便秘といった症状がみられる、などが、中枢神経系からの指令が消化管運動へ影響を及ぼしている具

体例として挙げられるであろう。内在神経系だけではなく中枢神経系も含めた消化管運動の制御を実験的に評価するためには、中枢神経系も含めた実験系、すなわち、*in vivo*の実験系が必要となる。

本研究では、主に *in vivo* の実験系を用いて実験を行った。この実験系は、麻酔下のラットの消化管にカニューレを接続し、消化管の内腔圧、および、蠕動に伴い送り出される液量を測定しようというものである(図1)。大腸の運動性を測定する場合を例とし、この実験系の概要を以下に説明する。ラットは、ケタミンおよび α -クロラロースで安定した麻酔状態に置く。ラットを開腹し、遠位結腸を切開、結腸内の糞塊を摘出した後、結腸の切開部からカニューレ

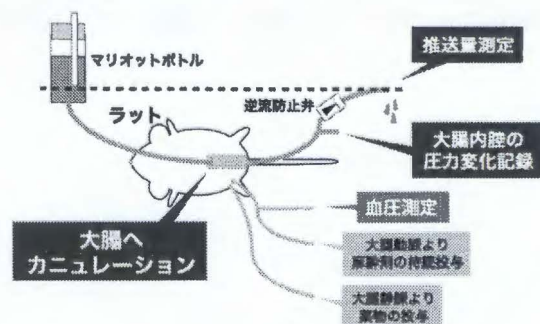


図1: *in vivo*実験系のセッティング

レを挿入する。肛門にもカニューレを挿入し固定する。結腸および肛門に挿入したカニューレは、生理食塩水を満たしたチューブと接続する。口側のチューブには、マリョットボトルを接続することにより、大腸の内腔圧を一定に保つ。肛門側のチューブには、圧トランスデューサーを接続することにより、内腔圧の経時的変化を記録する。また、チューブ断端で、大腸の運動に伴い推送される大腸内腔液量を測定する。記録された大腸内腔圧および内腔液の推送量を指標とし、大腸の運動性評価を行う。また、この消化管運動測定実験系では、カニューレの接続部位を変えることにより、消化管内各部位の運動性測定が可能となることも大きなメリットである。筆者は、この *in vivo* の実験系を用いてラットにおける大腸運動とグレリンの関係について研究を行っており(1)、本稿ではその一部を紹介させていただく。

グレリンとは

グレリンは、28個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで、主に胃から分泌される。長らく内因性リガンドが不明な受容体であった成長ホルモン分泌促進因子受容体（現在はグレリン受容体と呼ばれる）の内因性リガンドとして、1999年に発見された(2)。成長ホルモンの分泌促進や、摂食亢進、循環器系への作用など、多様な臓器をターゲットとした種々の作用がこれまでに報告されている(3,4)。

また、グレリンは3番目のセリン残基に脂肪酸修飾を受けているという特徴を持つ。この脂肪酸修飾が、グレリン受容体を介した作用発現には必須であるとされている。脂肪酸修飾を持たない型はデスアシルグレリンと呼ばれ、生体内で分泌され存在するものの、グレリン受容体に対しては活性を持たない(2,5)。しかし近年、デスアシルグレリンは単独でも、グレリン受容体を介さない経路で生理的活性を持つという報告がされてきている(6-8)。未だデスアシルグレリンの受容体は発見されていないが、作用メカニズム、そしてグレリンとの相互作用についても詳細解明が待たれるところである。

グレリンと消化管運動

グレリンは主に胃から分泌されるが、消化管内に内分泌細胞を配置するメリットとはどのようなことであろうか。そのひとつとして、消化管の内容物を内分泌細胞が直接モニターでき、状況に応じた分泌をタイムラグなくできることが考えられる。実際に、グレリンの消化管に対する作用はこれまでに、胃の内容物排出促進や、小腸の蠕動運動亢進といったものが報告されている(9,10)。大腸に関してはあまり報告がされていなかったが、Shimizuらにより、非ペプチド性グレリン受容体アゴニストは脊髄腰仙髄部の排便中枢を介し、大腸蠕動運動を亢進させることが

明らかとなった(11)。

この Shimizu らの先行研究では、中枢へ容易に移行する非ペプチド性グレリン受容体アゴニストである CP464709 を主に用い、その作用点を明らかにした。CP464709 の静脈内および脊髄腔内投与により大腸蠕動運動の亢進が観察されたが、その作用は脊髄馬尾切断後の投与によってはみられず、このアゴニストの作用点が脊髄にあることが示唆された。また、覚醒下のラットに CP464709 を皮下投与したところ、一定時間に排泄される糞塊の量が有意に増加した。この研究により、CP464709 は大腸の蠕動運動を亢進させ糞便の排泄を促進することが明らかとなった。

この先行研究をふまえ、筆者は、脊髄排便中枢におけるペプチド性グレリンの作用とその経路を、ラットを用いた実験により検討した。また、グレリンの脂肪酸修飾にも着目し、この修飾が脊髄におけるグレリンの大腸運動亢進作用に及ぼす影響を検討した。

脊髄排便中枢におけるグレリンの作用とその経路

前述の先行研究では、末梢投与でも容易に中枢に移行することができる非ペプチド性グレリン受容体アゴニストを主に使用していた。よって、末梢投与および脊髄腔内投与のいずれによっても、アゴニストは脊髄に到達でき、作用を及ぼしたと考えられる。本研究では、ペプチド性グレリンを用い、内在性のグレリンが脊髄でどのように作用するのかを検討した。

グレリンの静脈内投与によって大腸運動は変化しなかった。投与した量は、他の報告で述べられている、摂食量を亢進させるには十分な量である(12,13)。このことから、胃から放出され末梢血中に存在するグレリンが、血流によって脊髄排便中枢に到達し作用しているのではないことが示唆された。一方で、グレリンの脊髄腔内投与によって大腸運動は亢進したことから、グレリンは脊髄において産生され作用している可能性が示唆された。実際に、RT-PCR法を用い、グレリンの mRNA 発現を脊髄排便中枢に確認した。また、作用点である脊髄排便中枢に実際に受容体が存在するのかを RT-PCR により調べたところ、脊髄腰仙髄部 (L6-S1) において、グレリン受容体の mRNA 発現が確認された。この結果は Ferens らの *in situ hybridization* による脊髄におけるグレリン受容体分布の報告とも一致しており(14)、グレリン受容体が脊髄排便中枢に存在することが示唆された。これらの結果より、グレリンは、脊髄において産生され作用する、いわば神経伝達物質様の作用を持つ可能性が示唆された。

上記の結果より、脊髄におけるグレリンの作用が明らかとなったが、脊髄からどのような経路により大腸運動を亢進するのかを次に検討した。脊髄と大

腸の連絡路である骨盤神経を切断した個体では、グレリンの脊髓腔内投与によって大腸蠕動運動は亢進しなかった。この結果から、脊髓に作用したグレリンは、骨盤神経を経由することにより、大腸運動促進作用を及ぼしていることが示された。

グレリンの脂肪酸修飾と大腸運動促進作用

グレリンは3番目のセリン残基に脂肪酸修飾を受けており、この修飾が受容体を介した作用発現には必須である。脊髓におけるグレリンの作用発現においても、この脂肪酸修飾が必須であるか否かを検討した。グレリンの脂肪酸修飾を欠く型であるデスアシルグレリンの脊髓腔内投与と前後において、大腸運動に変化は認められなかった。このことから、脊髓におけるグレリンの大腸運動促進作用においても脂肪酸修飾は必須であることが明らかとなった。

しかし一方で、デスアシルグレリンは、グレリン受容体を介さない経路により作用を発現するという報告や(6-8)、グレリンの作用をデスアシルグレリンが抑制するという報告もされている(15,16)。デスアシルグレリンの受容体は未だ同定されていないが、脊髓においても両者が相互に影響を及ぼしあっている可能性は否定できない。よって、本研究においても、両者の相互作用を検討した。あらかじめグレリンで大腸蠕動運動を亢進させておいた状態で、デスアシルグレリンを投与すると、蠕動運動の一過性の抑制が観察された。よって、デスアシルグレリンは、単独では効果を持たないものの、グレリンの作用に対しては抑制作用をもつことが示された。

まとめ

グレリンは、脊髓排便中枢に作用し、骨盤神経を経由して大腸蠕動運動を亢進する。グレリンの脂肪酸修飾を持たない型であるデスアシルグレリンは、単独では大腸運動に変化を及ぼさないものの、グレリンによって誘発された蠕動亢進は抑制する作用を持つことが明らかとなった(図2)。このことから、脊髓におけるグレリンとデスアシルグレリンのバランスが変化することにより、大腸運動にアクセラレーションやブレーキをかけるメカニズムが脊髓に存在する可能性が示唆された。

この、脊髓におけるグレリン作動性メカニズムの生体における役割については非常に興味深く、筆者は現在もこの課題に関する研究を続けている。グレリンメカニズムが生理的にどのような役割を持つのか、どのような状況下でメカニズムが活性化されるのか、作用経路の詳細は、また、病態との関与についてなど、追究したい項目は山積みである。特に病態との関連においては、近年罹患率の高さから社会的な問題にもなっている過敏性腸症候群といった、中枢神経系の関与する疾患との関連について検討し

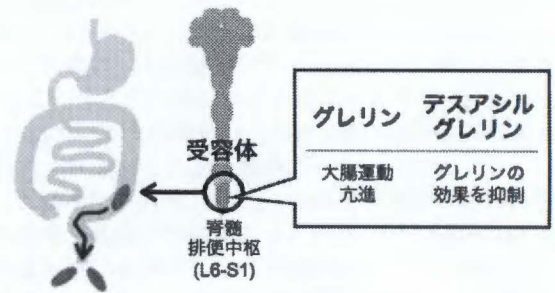


図2：まとめ

たいと考えている。脊髓を介した大腸運動調節機構としてのグレリンメカニズムを検討すること通じ、中枢と消化管との関係に、新知見を投げられたらと思う。

参考文献

- 1) Hirayama, H., Shiina, T., Shima, T., Kuramoto, H., Takewaki, T., Furness J. B., and Shimizu, Y. Contrasting effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on the lumbo-sacral defecation center and regulation of colorectal motility in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 22, 1124-31, 2010.
- 2) Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 402, 656-60, 1999.
- 3) Kojima, M. and Kangawa, K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 85, 495-522, 2005.
- 4) Soares, J. B. and Leite-Moreira, A. F. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides.* 29, 1255-70, 2008.
- 5) Bednarek, M. A., Feighner, S. D., Pong, S. S., McKee, K. K., Hreniuk, D. L., Silva, M. V., Warren, V. A., Howard, A. D., Van Der Ploeg, L. H. and Heck, J. V. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem.* 43, 4370-6, 2000.
- 6) Baldanzi, G., Filigheddu, N., Cutrupi, S., Catapano, F., Bonisconi, S., Fubini, A., Malan, D., Baj, G., Granata, R., Broglio, F., Papotti, M., Surico, N., Bussolino, F., Isgaard, J., Deghenghi, R., Sinigaglia, F., Prat, M., Muccioli, G., Ghigo, E. and Graziani, A. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol.* 159, 1029-37, 2002.
- 7) Gauna, C., Delhanty, P. J., van Aken, M. O., Janssen,

- J. A., Themmen, A. P., Hofland, L. J., Culler, M., Broglio, F., Ghigo, E. and van der Lely, A. J. Unacylated ghrelin is active on the INS-1E rat insulinoma cell line independently of the growth hormone secretagogue receptor type 1a and the corticotropin releasing factor 2 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 251, 103-11, 2006.
- 8) Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R. G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal, M. S., Shimbara, T., Kawagoe, T., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K. and Nakazato, M. Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology.* 147, 2306-14, 2006.
- 9) Masuda, Y., Tanaka, T., Inomata, N., Ohnuma, N., Tanaka, S., Itoh, Z., Hosoda, H., Kojima, M. and Kangawa, K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 276, 905-8, 2000.
- 10) Fujino, K., Inui, A., Asakawa, A., Kihara, N., Fujimura, M. and Fujimiya, M. Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats. *J Physiol.* 550, 227-40, 2003.
- 11) Shimizu, Y., Chang, E. C., Shafton, A. D., Ferens, D. M., Sanger, G. J., Witherington, J. and Furness, J. B. Evidence that stimulation of ghrelin receptors in the spinal cord initiates propulsive activity in the colon of the rat. *J Physiol.* 576, 329-38, 2006.
- 12) Date, Y., Toshinai, K., Koda, S., Miyazato, M., Shimbara, T., Tsuruta, T., Nijima, A., Kangawa, K. and Nakazato, M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology.* 146, 3518-25, 2005.
- 13) Kobelt, P., Tebbe, J. J., Tjandra, I., Stengel, A., Bae, H. G., Andresen, V., van der Voort, I. R., Veh, R. W., Werner, C. R., Klapp, B. F., Wiedenmann, B., Wang, L., Tache, Y. and Monnikes, H. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288, R751-8, 2005.
- 14) Ferens, D. M., Yin, L., Bron, R., Hunne, B., Ohashi-Doi, K., Kitchener, P. D., Sanger, G. J., Witherington, J., Shimizu, Y. and Furness, J. B. Functional and *in situ* hybridization evidence that preganglionic sympathetic vasoconstrictor neurons express ghrelin receptors. *Neuroscience.* 166, 671-9, 2010.
- 15) Matsuda, K., Miura, T., Kaiya, H., Maruyama, K., Shimakura, S., Uchiyama, M., Kangawa, K. and Shioda, S. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides.* 27, 2321-5, 2006.
- 16) Inhoff, T., Monnikes, H., Noetzel, S., Stengel, A., Goebel, M., Dinh, Q. T., Riedl, A., Bannert, N., Wissner, A. S., Wiedenmann, B., Klapp, B. F., Tache, Y. and Kobelt, P. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides.* 29, 2159-68, 2008.