摂食調節ホルモン・グレリンによる血圧調節メカニズムの解明

所属機関　久留米大学分子生命科学研究所
研究者名　児島将康

《研究の概要》

本研究は、申請者らが発見した摂食亢進ホルモンのグレリンについて、その血圧調節・ナトリウム代謝のメカニズムを解明し、肥満者の高血圧症治療への応用を目指すものである。

申請者らは 1999 年に胃組織からグレリン(ghrelin)を発見し、これが成長ホルモン分泌促進作用を示すとともに、強力な摂食亢進作用を持つことを明らかにした。グレリンは摂食行動や成長ホルモン分泌を調節することによって、生活習慣病や摂食障害の病態と密接な関連がある。最近、申請者はグレリンの生理機能を解析するためにグレリン欠損マウス（以下、グレリン KO マウス）を作製した。その結果、グレリン KO マウスでは血圧日内リズムの消失、血圧の上昇、また野生型マウスに比べて食塩摂取量が少ないことなどを見出した。さらに野生型マウスでの検討では、高食塩食摂取によって誘導された高血圧状態では、摂食量が減少する一方でグレリン合成・分泌が増加すること、グレリン受容体阻害剤の連続投与によって早期に高血圧になることなどを見出した。またこれまでの研究で、グレリン投与によって血圧が下降することが知られている。したがってグレリンは血圧を下げるホルモンであり、グレリン濃度の低下は高血圧症をもたらす。興味深いことには、肥満者ではグレリンの合成・分泌が低下しており、肥満者の高血圧発症にはグレリンの関与が考えられる。

このように摂食亢進ホルモンのグレリンと血圧調節・ナトリウム代謝とは密接な関連があるが、そのメカニズムはよくわかっていない。本研究では、グレリン KO マウスの解析から、さらにグレリンのイオンチャネル、トランスポーター、WNK キナーゼなどへの作用を調べることによって、グレリンによる血圧調節機構の分子メカニズムを解明することを試みた。

岩本　隆宏　　福岡大学医学部　　薬理学教授

グレリンによるミネラル摂取変動とイオン輸送異常による心血管分子病態機序

竹島　浩　　京都大学大学院薬学研究科　　生体分子認識学分野教授

グレリンと TRIC チャネルの心血管収縮制御とその病態生理機序

平野　勝也　　香川大学医学部・医学系研究科　自律機能生理学教授

グレリンによる血管内皮、平滑筋機能異常の分子機構の解明

内田　信一　　東京医科歯科大学　　腎臓内科学教授

心血管系におけるグレリンと WNK キナーゼシグナルの役割の解明

研究報告

Ⅰ　研究目的

本研究は、研究代表者の児島らが発見した摂食亢進ホルモンのグレリンについて、その血圧調節・ナトリウム代謝のメカニズムを解明し、肥満者の高血圧症治療への応用を目指すものである。

私たちは 1999 年に胃組織からグレリン(ghrelin)を発見し(Kojima et al. Nature 1999)、これが成長ホルモン分泌促進作用を示すとともに、強力な摂食亢進作用を持つことを明らかにした(Nakazato et al. Nature 2001)。グレリンは摂食行動や成長ホルモン分泌を調節することによって、生活習慣病や摂食障害の病態と密接な関連がある。しかし摂食亢進ホルモンのグレリンと血圧調節・ナトリウム代謝とは密接な関連があるが、そのメカニズムはよくわかっていない。このように肥満症と高血圧発症には密接な関連があるが、単に動脈硬化が進展して血圧が高くなるだけでなく、私たちの予備的なデータによると摂食調節ホルモンのグレリンの関与が考えられる。つまり肥満者では血中グレリン濃度が低下して、その結果ナトリウム代謝に異常が生じ、高血圧発症をもたらす可能性がある。本研究によって、なぜ肥満症では高血圧を合併しやすいのか、その理由の解明や治療法への応用が期待される。

また、肥満と高血圧との関連が、ホルモンであるグレリンによって調節されているならば、肥満者の高血圧治療にグレリンのシグナル系に作用する因子を用いることで、新しい作用機序の降圧剤の開発につながると期待される。

Ⅱ　研究計画および材料と方法

本研究では私たちの作出したグレリン KO マウスを使って解析を進めていく。グレリン KO マウスでは収縮期血圧が高く、また野生型マウスに比べて食塩摂取量が少ないなどの異常が見られるが、その理由はわかっていない。

グレリン KO マウスの自律神経異常の解析（担当：児島）

グレリン KO マウスでは血圧の日内リズムに著しい異常が認められる。しかしながら、この変化はグレリン KO マウスの行動量に依存していないことより、グレリン KO マウスの自律神経機能に中枢レベ

ルで異常のある可能性が強く示唆される。実際、申請者はグレリン KO マウスの体温変化にも異常を確認していることなどから、本研究は、生活習慣病に伴って生じる自律神経性の異常の発症機序の解明へ発展する可能性を秘めている。

①グレリン作用部位の解明：ＫＯマウスにグレリンを、逆に野生型マウスにグレリン受容体拮抗薬を投与し、収縮期血圧の異常が末梢性・中枢性のいずれであるのかを示す。

②自律神経機能に対するグレリン作用の解析：申請者の電気生理学的な予備実験から、グレリンが自律神経活動を制御して血圧調節に関与することが予測されている。そこで、ＫＯマウスと野生型マウスにグレリンやグレリン受容体拮抗薬、交感神経遮断薬などを単一あるいは複合投与し、心拍変動のパワースペクトル解析を行なって周波数帯域の変化を検討することにより交感・副交感神経の活動を明らかにする。

③循環調節ホルモンに対するグレリン作用の解析：高血圧の発症に、ナトリウム利尿ペプチド、アドレノメジュリン、エンドセリンなどの循環調節ホルモンは重要である。グレリンがこれらホルモンの分泌を調節することも示唆されているがその機構は不明である。そこでＫＯマウスと野生型マウスにグレリンやグレリン受容体拮抗薬などを投与し、これらホルモン含量を調べ、循環調節ホルモン分泌に対するグレリンの作用を明らかにする。

④食塩感受性高血圧モデル動物におけるグレリン作用の解析：①～③でグレリンによる血圧調節機構が明らかになるので、Dhal ラットにグレリンやグレリン受容体拮抗薬を投与して高血圧の発症におけるグレリンの役割を明確にする。

グレリンによるミネラル摂取変動とイオン輸送異常による心血管分子病態機序（担当：岩本）

疫学的研究から、心血管病の発症にミネラル摂取量（ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム）が密接に関係することが多数報告されている。これまでに、我々は食塩過剰摂取による高血圧発症に Na^+/Ca^{2+}交換輸送体を介する血管平滑筋細胞への Ca^{2+}流入が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。細胞内 Ca^{2+}シグナルは心筋および血管平滑筋の収縮機能を制御しており、その調節には Ca^{2+}輸送体を始めとして様々なイオン輸送体が関与している。Ca^{2+}と同様に、Mg^{2+}は生体機能に必須の二価カチオンであるが、細胞内では生体エネルギー代謝に関わる ATP に結合することにより、また、Ca^{2+}結合部位への競合や Ca^{2+}との対向膜輸送等の特性により、心筋および血管平滑筋の収縮機能に関わっている。この調節には Mg^{2+}輸送体が関与すると考えられるが、その分子実体は Ca^{2+}輸送体に比べて未だ不明なところが多い。本研究では、Na^+駆動性の Ca^{2+},Mg^{2+}輸送体（SLC8、SLC24、SLC41 等）に焦点を当て、グレリン KO マウスにおいて Ca^{2+},Mg^{2+}輸送体を in vivo 機能解析する（ミネラル摂取との連関性の検討）。

グレリンと TRIC チャネルの心血管収縮制御とその病態生理機序（担当：竹島）

筋細胞収縮は小胞体 Ca^{2+}放出により基本的に制御されている。心筋では細胞膜の電位依存性 Ca^{2+}チャネルと小胞体 Ca^{2+}放出チャネル（リアノジン受容体)の機能共役により形成される Ca^{2+}シグナルが収縮調節する。一方、血管平滑筋においては、イノシトール三リン酸受容体による小胞体 Ca^{2+}放出はグロ

ーバルな収縮シグナルを、リアノジン受容体による局所的 Ca^{2+}放出は細胞膜上の Ca^{2+}依存性 K^{+}チャネルとの機能連関により過分極性弛緩シグナルを形成する。我々は電位依存性 Ca^{2+}チャネルやリアノジン受容体のみならず、小胞体 Ca^{2+}放出に寄与する新規分子群を分子同定している。最近では、小胞体 Ca^{2+}放出と連動するカウンターイオンの膜透過性に寄与するものと想定される TRIC チャネルを発見し、このチャネルが本態性高血圧の発症に関与することを解明した。本研究では、血管病において食事性因子（脂質、食塩、活性酸素等）の発症への寄与とその分子機序を解明するため、グレリン KO マウスにおいて心臓および血管平滑筋の TRIC チャネルに着目した解析を中心とした研究項目を実施する。グレリン KO マウスの組織における TRIC チャネルサブタイプの発現量と細胞内局在の変動を解明する。

グレリンによる血管内皮、平滑筋機能異常の分子機構の解明（担当：平野）

食事性および代謝性の諸因子（食物成分、高脂質血漿、高血糖、食塩、酸化ストレスなど）は、直接にあるいは炎症や凝固系の活性化を介して血管内皮や血管平滑筋細胞の機能異常を引き起こし、動脈硬化や高血圧などの血管病の発症に重要な役割を果たす。一方、食物成分の中には血管の生理機能の維持に有効に働くものもあり、食習慣を介した血管病の予防、治療への応用が期待される。平野は、Ca^{2+}シグナルと蛋白質リン酸化反応を中心として血管内皮および平滑筋のシグナル伝達研究を専門とし、特に、凝固系が作用するプロテアーゼ活性化型受容体の血管病態学研究に実績を上げている。本研究では、培養内皮、血管平滑筋細胞およびグレリン KO マウスを用いて病態モデル（高脂血症、高血糖、食塩負荷など）を作製し、内皮機能（バリアー機能、抗血栓機能、血管トーヌス調節機能、血管新生機能）、及び、平滑筋機能（収縮機能、増殖性）に及ぼすグレリンの影響を評価し、その仕組みを細胞内シグナル伝達の視点から明らかにする。薬理学的阻害剤、siRNA および miRNA による発現抑制、グレリン KO マウスを用いて、病態発症に重要な役割を果たすシグナル伝達因子を同定し、血管病の予防、治療への応用を検討する。

心血管系におけるグレリンと WNK キナーゼシグナルの役割の解明（担当：内田）

遺伝性高血圧症である偽性低アルドステロン症 II 型（PHAII）の原因遺伝子として同定された WNK キナーゼは、発見当時は機能未知のリン酸化酵素であったが、その後の我々の研究により WNK キナーゼがセリンスレオニンキナーゼである OSR1/SPAK キナーゼをリン酸化して活性化し、さらに OSR1/SPAK が腎臓での NaCl 再吸収に関わる膜輸送体 Na-Cl 共輸送体（NCC）や NKCC2 をリン酸化により活性化して高血圧症を引き起こす事を明らかにした。このように腎臓における塩分出納調節機構の破綻が PHAII の高血圧発症の重要な分子機構であることを明らかにしたが、WNK キナーゼは心血管系にも豊富に存在し、WNK1 のノックアウトマウスを使った研究では、腎臓での塩分再吸収よりも、WNK キナーゼが血管系での NKCC1 輸送体を制御する事で血管のトーヌスを調整し、その破綻が高血圧症を引き起こしていることが推定された。また、実際に血管平滑筋での NKCC1 のリン酸化は高塩食で低下し、低塩食で増加が認められ、この系は生理的にも重要な血管での血圧調節因子である事を最近見いだした。更に最近高インスリン血症がこの系を介して食塩感受性高血圧を引き起こしていることも判明し、肥満等の高インスリン状態における心血管病への関与が強く疑われている。よって、本研究ではグレリン KO マ

ウスにおいて WNK-OSR1/SPAK-NCC シグナル系構成分子が心血管系に置いて、とくに高血圧発症とその後の臓器障害進展にどのように関わるのかを明らかにするのを調べる。

Ⅲ　研究成果

【平成 24 年度】

（児島）無線テレメトリーでマウスの血圧・心拍数を連続モニターして、KO マウスにグレリンあるいはグレリン受容体アゴニストの GHPR6 を投与して、血圧・心拍数の変動を調べた。グレリン KO マウスにグレリンを投与すると、暗期開始直後では血圧がわずかに低下した。グレリン受容体アゴニストの GHRP6 投与では血圧の低下はあまり認められなかった。β ブロッカーのプロプラノロールの投与でグレリン KO マウスの血圧はわずかに低下した。暗期と明期のどちらでもグレリン KO マウスの方が野生型マウスよりも血圧低下の作用が強かった。このことは β アドレナリン受容体がグレリンの循環器作用に関与していることを示している。グレリン KO マウスは血圧がやや高めになるが、これは β アドレナリン受容体がグレリン KO マウスで機能亢進していることを示している。事実、グレリン KO マウスでは交感神経機能の亢進が認められた。

（竹島）MG53 の細胞外液への添加により細胞膜修復が亢進し、実験動物への静脈注射により心筋保護作用が確認されることから、MG53 は筋損傷障害を軽減する医薬品シーズとして有望であること、TRIC-B チャネルの電位依存性開口を含めた電気生理学的性質を解明した。

（平野）NCX 分子種遺伝子欠損マウス（NCX1～NCX3）による中大脳動脈閉塞モデルおよび急性腎不全モデルを用いて、脳および腎臓の虚血再灌流障害には NCX1 を介する Ca^{2+}過負荷が関与していること、また NCX 阻害薬は脳梗塞や虚血性腎不全への臨床適応の可能性があることを明らかにした。

（平野）血管収縮性の概日リズム形成に関わる内在性生物時計の仕組みを明らかにした。培養細胞を用いて、中枢時計の影響を除いた条件下で、収縮刺激が引き起こすミオシン軽鎖リン酸化反応に概日リズムがあることを見出した。ミオシン軽鎖リン酸化の制御に関わるリン酸化酵素のうち ROCK2 がこの概日リズムの形成に関わることを突き止め、さらに、時計遺伝子 RORα が ROCK2 の転写を制御し、活性の日内変動を引き起こすことを明らかにした。

（内田）WNK4 は KLHL3-Cullin3 が形成する E3 ユビキチンリガーゼの基質であり、この WNK4 のユビキチン化障害がヒト遺伝性高血圧症発症の共通の病態であることを明らかにした。

【平成 25 年度】

（児島）動脈硬化の進展に重要な脂肪組織の脂質蓄積について調べるために、まず、腰部皮下脂肪組織における熱産生蛋白質 UCP1 発現の検討を行った。その結果、寒冷刺激群、β3 アゴニスト投与ともにコントロール群と比較し、UCP1mRNA の発現が顕著に増加していた。次に褐色脂肪細胞において熱産

生へのエネルギー供給に大きく寄与していると考えられている脂肪酸酸化関連蛋白質(FABP3, ACSS1,ACSL5,CPT1b,ACADL,ACADM,ACADS,ACAA2)の mRNA 発現を検討した。結果、寒冷刺激群、β3 アゴニスト投与ともにコントロール群と比較し、これら脂肪酸酸化関連蛋白質の mRNA 発現が顕著に増加していた。FABP は脂肪細胞以外での発現も報告されている。脂肪組織は脂肪細胞以外に血管やマクロファージといった間質血管細胞群(SV)により構成されている。そこで FABP3 が成熟脂肪細胞群(adipo)と SV のどちらの細胞群に主に発現しているかどうか検討するため、adipo と SV とを分離し FABP3 発現の検討を行った。結果、成熟脂肪細胞において FABP3 が顕著に増加していることを確認した。以上の結果から、C56BL6J マウスの腰部皮下脂肪組織における脂肪細胞では、寒冷刺激、β3 アゴニスト投与により熱産生蛋白質である UCP1 や脂肪酸酸化に関連する蛋白質の遺伝子発現が顕著に増加していることが明らかとなった。

次いで、初代培養細胞における遺伝子発現変動の解析を行った。4 週齢の野生型 C56BL6J マウス腰部皮下脂肪組織から作製した初代培養細胞を用い実験を行った。まず、β3 アゴニスト(CL:CL316,243)、cAMP 増強剤(Forskolin)投与による UCP1 発現動態の検討を行った。結果、CL、Forskolin 投与群では、コントロール群と比較し、投与後 6 時間において UCP1mRNA 発現は顕著に増加していた。この結果から、今回作製した初代培養細胞は、マウスの腰部白色脂肪組織における Beige 細胞の反応を反映していると考え、次に脂肪酸酸化関連蛋白質(FABP3, ACSS1,ACSL5,CPT1b,ACADL,ACADM,ACADS,ACAA2)の mRNA 発現の検討を行った。結果、CL、Forskolin 投与群では、コントロール群と比較し、投与後 6 時間においてこれら脂肪酸酸化関連蛋白質 mRNA 発現の増加は認められなかった。

（岩本）移植直後の膵島は新生血管が構築されるまで低酸素状態に曝され、それが引き金となり、膵島細胞膜の NCX1 を介する Ca^{2+}流入が引き起こされ、その結果、膵島細胞が障害され、HMGB1 が放出されることを見出した。そこで、移植前に試験管内で移植膵島細胞に NCX 阻害薬 SEA0400 を処置した後に移植すると、膵島細胞への Ca^{2+}流入が阻止され、その結果移植膵島障害が回避され、HMGB1 は放出されず、移植後の早期拒絶反応が制御できることが明らかとなった。今回見出した拒絶反応制御法は従来の免疫抑制剤のようにレシピエントに対する治療と異なり、移植膵島を標的にした副作用のない体に優しい新規治療法であり、膵島移植による糖尿病治療に画期的進歩をもたらすことが期待される。

（竹島）作製された平滑筋特異的 TRIC-A 過剰発現マウスは、恒常的に低血圧を示した。TRIC-A 過剰発現血管平滑筋はリアノジン受容体 Ca2+放出が亢進しており、過分極シグナルが活性化することで弛緩していることが判明した。従って、血管平滑筋の TRIC-A 発現量は過分極シグナルの発生頻度を規定して、個体レベルの血圧を調節することが明らかになった。一方、TRIC チャネルの電気生理学的性質は不明な点が多く残されており、サブタイプ間での相違も未解明である。TRIC-A 欠損マウスより調製した筋小胞体を脂質二重膜再構成系に供することにより、TRIC-B チャネルの単一チャネル計測に成功した。最大コンダクタンス 190 pS を示す TRIC-B チャネルは、少なくとも４つのサブコンダクタンスを

有する部分開口状態をとることが判明した。この電流観察データから、TRIC-B チャネルの開口キネティクスを数理モデルに基づく推論も試みた。

（平野）本研究では、新しいミオシン軽鎖リン酸化の解析法を用いて、内皮バリアー障害がミオシン軽鎖の 2 リン酸化と相関することを明らかにした。さらに、トロンビン刺激早期には、ミオシン軽鎖の 2 リン酸化は細胞膜直下の領域に局在し、これに一致でしたアクチン線維束が形成されることを見出した。さらに、リン酸化部位に変異を有するミオシン軽鎖を用いて、内皮バリアー障害にはミオシン軽鎖のリン酸化は 1 リン酸化で十分であることが明らかとなった。一方、トロンビン刺激後期には、アクチン線維束はストレスファイバーを形成することを見出した。本年度の研究から、細胞膜直下のミオシン軽鎖の 2 リン酸化とアクチン線維束形成が、内皮バリアー障害における初期事象として重要な役割を果たすとする新しい知見が得られた。

（内田）血管平滑筋には KLHL3 はなく、KLHL3 と非常に相同性の高い KLHL2 が存在する事が判明したため、AngII による WNK3 量制御における KLHL2 の役割を検討した。その結果、KLHL2 の強制発現により WNK3 量は減少し、ノックダウンにより WNK3 量が増加することが示され、さらに KLHL2 量は AngII によって WNK3 と逆の変化を受けていることが明らかとなり、AngII から WNK3 までの刺激伝達には KLHL2 が介在する可能性が明らかとなった。

【平成 26 年度】

（児島）グレリンプロモーター領域において、-1600 bp 付近まで欠失させるとルシフェラーゼ活性が低下し、この領域がグレリンの転写活性に重要であることが示唆された。そこでバイオインフォマティクス解析を行い、この領域に結合する転写因子として NF-κB および Nkx2.2 を同定した。さらに NF-κB および Nkx2.2 を過剰発現させた細胞でルシフェラーゼ活性を測定することにより、グレリンの転写活性が NF-κB によって抑制、Nkx2.2 によって促進されることが示唆された。

（岩本）

特異的阻害薬や遺伝子欠損により NCX2 を機能抑制すると、Na^+利尿効果および Ca^{2+}排泄促進が引き起こされた。NCX1 の機能抑制によっても同効果が軽度に観察されたが、NCX2 の機能抑制においてより顕著であった。従って、NCX2 は尿生成および電解質排泄において NCX1 と異なる機能的役割を有するものと考えられた。また、NCX 阻害薬の Na^+利尿効果および Ca^{2+}排泄促進には一部乖離が認められたことから、両作用機序は異なることが推定された。Ca^{2+}排泄促進は NCX を介する遠位尿細管の Ca^{2+}再吸収の直接的抑制と考えられるが、Na^+利尿効果は他の Na^+再吸収機構への間接的抑制の可能性が推察される。以上の研究により、尿生成および電解質排泄における NCX2 の機能的重要性が明らかとなった。

（竹島）

MG53 欠損マウスにおいて侵襲刺激による肺胞組織損傷が顕著に増悪することが認められ、肺胞上皮細胞においても軽度に発現している MG53 が細胞膜修復に寄与することが判明した。興味深いことに組換え MG53 タンパク質の静脈投与によって MG53 欠損マウスの肺胞損傷が軽減されることから、細胞膜損傷部より細胞内に流入する MG53 が細胞膜修復に寄与することも示唆された。

MG56 欠損マウスは哺乳障害により生後 2 週間以内に栄養失調により死亡する。この変異マウスにおいては心機能の顕著な異常は観察されないものの、生後 9 日より骨格筋にて収縮低下が観察された。MG56 欠損骨格筋では小胞体が膨潤化して、典型的な ER ストレス応答も発生しており、その結果、筋細胞の発生張力向上を含む成熟化工程が障害されて、哺乳障害に至るものと考察される。

（平野）

肺高血圧モデル動物の肺動脈はトロンビンに対する昇圧反応が亢進していること、PAR1 拮抗薬を投与すると肺動脈圧の上昇、右室肥大、肺動脈肥厚病変などの肺高血圧の病態形成が抑制されることを明らかにした。PAR1 は肺高血圧治療の新たな標的分子として期待される。

また、BMP 受容体 II（BMPRII: bone morphogenetic protein receptor II）の機能喪失型遺伝子異常が遺伝性肺高血圧患者の 7 割に、特発性肺高血圧患者の 1～4 割に認められる。培養肺動脈内皮細胞を樹立し、トロンビンが引き起こす血管透過性亢進を指標に、内皮バリアー機能に対する BMPRII の影響を明らかにした。RNA 干渉法により BMPRII 発現を抑制すると内皮透過性が亢進し、BMPRII アゴニスト刺激を行うとバリアー障害が抑制されることが明らかとなった。BMPRII は内皮バリアー機能に対して保護的に作用すること、一方、この遺伝子欠損は内皮障害を引き起こし、肺高血圧の病態形成に関与することが示唆される。

（内田）

いままで種々の液性因子が WNK シグナル系を制御していることは判明していたが、その制御機構は多くが不明であった。今回、アンギオテンシン II の血管平滑筋収縮に WNK3 の関与を WNK3 ノックアウトマウスの解析で昨年度報告していたが（Hypertension Zeniya et al 2013）、そのアンギオテンシン II から WNK3 までの間に、WNK3 を分解する過程が関与し、そこでは KLHL3 と相同性の高い KLHL2 が存在し、さらにその KLHL2 がアンギオテンシン II による p62 の関与する選択的オートファジーにより分解制御を受けていることを報告した。

Ⅳ　考察

グレリン欠損マウスでは β ブロッカーに対する感受性が高まっていることが示唆された。グレリンと脂肪組織を介した動脈硬化との関連を探るなかで、白色脂肪組織での Beige 細胞出現を観察しその解析を行った。Beige 細胞における脂肪酸酸化関連蛋白質の遺伝子発現は UCP1 とは異なる機序によって制御されている可能性、培養細胞作成過程で細胞の性質が変化した可能性などが考えられた。中枢からの自律神経制御により、末梢の白色脂肪組織における熱産生、脂肪酸酸化がどのように制御され

ているのかを解明することは、脂肪組織の代謝活動を介した動脈硬化進展の病態解明、治療開発に応用されることが期待される。

またグレリン遺伝子の転写活性が NF-κB によって抑制、Nkx2.2 によって促進されることが明らかになった。これらの結果から、NF-κB や Nkx2.2 の活性を制御する因子によって、グレリンの発現も変化することが予想された。事実、細菌由来のエンドトキシンである LPS（リポポリサッカライド）投与によって血中グレリン濃度が減少することが報告されているが、そのメカニズムとして LPS によって NF-κB が活性化され、それによってグレリン転写が抑制されるのではないかと考えられる。

当初の研究ではグレリン欠損マウスを中心とした解析を行う計画であったが、グレリン欠損マウスでは期待した表現型がでなかったため、グレリンとイオンチャネル、トランスポーター、WNK キナーゼなどとの関連研究には深く踏み込めなかった。

V　研究成果の発表

【平成 24 年度】

（児島）

1, **Li E, Chung H, Kim Y, Kim DH, Ryu JH, Sato T, Kojima M, Park S**. Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory. **Endocr J**. 60(6):781-789, 2013.

2, **Ida T, Takahashi T, Tominaga H, Sato T, Sano H, Kume K, Ozaki M, Hiraguchi T, Shiotani H, Terajima S, Nakamura Y, Mori K, Yoshida M, Kato J, Murakami N,Miyazato M, Kangawa K, Kojima M**. Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from Drosophila and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 3:177, 2012.

（岩本）

3, **Morimoto N, Kita S, Shimazawa M, Namimatsu H, Tsuruma K, Hayakawa K, Mishima K, Egashira N, Iyoda T, Horie I, Gotoh Y, Iwasaki K, Fujiwara M, Matsuda T, Baba A, Komuro I, Horie K, Takeda J, Iwamoto T, Hara H**. Preferential involvement of Na^{+}/Ca^{2+} exchanger type-1 in the brain damage caused by transient focal cerebral ischemia in mice. **Biochem. Biophys Res Commun**, 429(3-4):186-190, 2012.

（竹島）

4, **Weisleder N, Takizawa N, Lin P, Wang X, Cao C, Zhang Y, Tan T, Ferrante C, Zhu H, Chen PJ, Yan R, Sterling M, Zhao X, Hwang M, Takeshima M, Cai C, Cheng H, Takeshima H, Xiao RP, Ma J**. Recombinant MG53 protein modulates therapeutic cell membrane repair in treatment of muscular dystrophy. **Sci Transl Med**. 4(139):139ra85, 2012.

5, **Venturi E, Matyjaszkiewicz A, Pitt SJ, Tsaneva-Atanasova K, Nishi M, Yamazaki D, Takeshima H, Sitsapesan R**. TRIC-B channels display labile gating: evidence from the TRIC-A knockout mouse model. **Pflugers Arch**. 465(8):1135-1148, 2013.

(平野)

6, **Saito T, Hirano M, Ide T, Ichiki T, Koibuchi N, Sunagawa K, Hirano K**. Pivotal role of Rho-associated kinase 2 in generating the intrinsic circadian rhythm of vascular contractility. **Circulation**. 127(1):104-114, 2013.

(内田)

7, **Susa K, Sohara E, Isobe K, Chiga M, Rai T, Sasaki S, Uchida S**. WNK-OSR1/SPAK-NCC signal cascade has circadian rhythm dependent on aldosterone. **Biochem Biophys Res Commun**. 427(4):743-747, 2012.

8, **Hossain Khan MZ, Sohara E, Ohta A, Chiga M, Inoue Y, Isobe K, Wakabayashi M, Oi K, Rai T, Sasaki S, Uchida S**. Phosphorylation of Na-Cl cotransporter by OSR1 and SPAK kinases regulates its ubiquitination. **Biochem Biophys Res Commun**. 425(2):456-461, 2012.

【平成 25 年度】
（児島）
9, **Nakamura Y, Sato T, Shiimura Y, Miura Y, Kojima M**. FABP3 and brown adipocyte-characteristic mitochondrial fatty acid oxidation enzymes are induced in beige cells in a different pathway from UCP1. **Biochem Biophys Res Commun**. 441(1):42-46, 2013.

10, **Hashinaga T, Wada N, Otabe S, Yuan X, Kurita Y, Kakino S, Tanaka K, Sato T, Kojima M, Ohki T, Nakayama H, Egashira T, Tajiri Y, Yamada K**. Modulation by adiponectin of circadian clock rhythmicity in model mice for metabolic syndrome. **Endocr J**. 60(4): 483-492, 2013.

11, **Nishi Y, Mifune H, Yabuki A, Tajiri Y, Hirata R, Tanaka E, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M**. Changes in Subcellular Distribution of n-Octanoyl or n-Decanoyl Ghrelin in Ghrelin-Producing Cells. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 4:84, 2013.

12, **Kojima M, Kangawa K**. Ghrelin discovery: a decade after. **Endocr Dev**. 25:1-4, 2013.

13, **Fukumori R, Mita T, Sugino T, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Taniguchi K**. Effects of intravenous ghrelin injection on plasma growth hormone, insulin and glucose concentrations in calves at weaning. **Anim Sci J**. 84(4):310-315, 2013.

（岩本）
14, **Nishizawa T, Kita S, Maturana AD, Furuya N, Hirata K, Kasuya G, Ogasawara S, Dohmae N, Iwamoto T, Ishitani R, Nureki O**. Structural basis for counter-transport mechanism of H^+/Ca^{2+} exchanger. **Science**. 341(6142): 168-172, 2013.

15, **Yamamura H, Cole WC, Kita S, Hotta S, Murata H, Suzuki Y, Ohya S, Iwamoto T, Imaizumi Y**. Overactive bladder mediated by accelerated Ca^{2+} influx mode of Na^+/Ca^{2+} exchanger in smooth muscle. **Am J Physiol Cell Physiol**. 305(3): C299-C308, 2013.

（竹島）
16, **Tao, S., Yamazaki, D., Komazaki, S., Zhao, C., Iida, T., Kakizawa, S., Imaizumi, Y. & Takeshima, H**. Facilitated hyperpolarization signaling in vascular smooth muscle overexpressing TRIC-A channels. **J. Biol. Chem**. 288, 15581-15589, 2013.

17, **Venturi, E., Matyjaszkiewicz, A., Pitt, S. J., Tsaneva-Atanasova, K., Nishi, M., Yamazaki, D., Takeshima, H. & Sitsapesan, R**. TRIC-B channels display labile gating: evidence from the TRIC-A knockout mouse model. **Pflugers Arch**. 465, 1135-1148, 2013.

（内田）
18, **Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S**. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II. **Hypertension**. 62(5):872-878, 2013.

19, **Wakabayashi M, Mori T, Isobe K, Sohara E, Susa K, Araki Y, Chiga M, Kikuchi E, Nomura N, Mori Y, Matsuo H, Murata T, Nomura S, Asano T, Kawaguchi H, Nonoyama S, Rai T, Sasaki S, Uchida S**. Impaired KLHL3-mediated ubiquitination of WNK4 causes human hypertension. **Cell Rep**. 3(3): 858-868, 2013.

【平成 26 年度】
（児島）
20, **Sato T, Ida T, Nakamura Y, Shiimura Y, Kangawa K, Kojima M**. Physiological roles of ghrelin on obesity. **Obes Res Clin Pract**. 8(5):e405-13, 2014.

21, **Shiimura Y, Ohgusu H, Sato T, and Kojima M**. Regulation of the Human Ghrelin Promoter Activity by Transcription Factors, NF-κB and Nkx2.2. **International Journal of Endocrinology**, 2015: 5809081, 2015.

22, **Kizaki J, Aoyagi K, Sato T, Kojima M, Shirouzu K**. Production of ghrelin by the stomach of patients with gastric cancer. **Kurume Med J**. 60(3-4):99-104, 2014.

23, **Miura H, Hojo N, Takahashi R, Kikuchi M, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Sakaguchi M**. The influence of feeding pattern on changes in plasma ghrelin in the Holstein cow. **J Vet Med Sci**. 76(8):1137-1139, 2014.

24, **Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Hirata R, Takahashi S, Nagamitsu SI, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T**. Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett syndrome. **Brain Dev**. 36(9):794-800, 2013.

（岩本）

25, **Gotoh Y, Kita S, Fujii M, Tagashira H, Horie I, Arai Y, Uchida S, Iwamoto T**. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX2 cause natriuresis and hypercalciuria. **Biochem Biophys Res Commun**. 456(2):670-675, 2015.

26, **Nishiyama K, Morioka A, Kita S, Nakajima H, Iwamoto T, Azuma YT, Takeuchi T**. Na^{+}/Ca^{2+} exchanger 1 transgenic mice display increased relaxation in the distal colon. **Pharmacology**. 94(5-6):230-238, 2014.

（竹島）

27, **Jia, Y., Chen, K., Lin, P., Lieber, G., Nishi, M., Yan, R., Wang, Z., Yao, Y., Li, Y., Whitson, B. A., Duann, P., Li, H., Zhou, X., Zhu, H., Takeshima, H., Hunter, J. C., McLeod, R. L., Weisleder, N., Zeng, C. & Ma, J**. Treatment of acute lung injury by targeting MG53-mediated cell membrane repair. **Nat. Commun**. 5, 4387, 2014.

28, **Kim, S. C., Kellett, T., Wang, S., Nishi, M., Nagre, N., Zhou, B., Flodby, P., Shilo, K., Ghadiali, S. N., Takeshima, H., Rolf, D. Hubmayr, R. D. & and Zhao, X**. TRIM72 is required for effective repair of alveolar epithelial cell wounding. **Am. J. Physol. Lung Cell. Mol. Physiol**. 307, L449-459, 2014.

（平野）

29, **Kunita-Takanezawa M, Abe K, Hirooka Y, Kuwabara Y, Hirano K, Oka M, Sunagawa K**. Novel dual endothelin receptor antagonist macitentan reverses severe pulmonary arterial hypertension in rats. **J Cardiovasc Pharmacol** 64(5): 473-480, 2014.

30, **Tanaka Y, Ihara E, Hirano K, Takahashi S, Hirano M, Nakamura K, Akiho H, Oda Y, Takayanagi R**. Trypsin-induced biphasic regulation of tone in the porcine lower esophageal sphincter. **Eur J Pharmacol** 752:97-105, 2015.

（内田）

31, **Zeniya M, Morimoto N, Takahashi D, Mori Y, Mori T, Ando F, Araki Y, Yoshizaki Y, Inoue Y, Isobe K, Nomura N, Oi K, Nishida H, Sasaki S, Sohara E, Rai T, Uchida S**. Kelch-Like Protein 2 Mediates Angiotensin II-With No Lysine 3 Signaling in the Regulation of Vascular Tonus. **J Am Soc Nephrol**. (in press) 2015.

32, **Takahashi D, Mori T, Nomura N, Khan MZ, Araki Y, Zeniya M, Sohara E, Rai T, Sasaki S, Uchida S**. WNK4 is the major WNK kinase positively regulating NCC in the mouse kidney. **Biosci Rep**. 34:195-205, 2014.