

活性型グレリン産生抑制効果の細胞評価系の構築とその応用

大磯 茂

薬学部 薬学科

Development of a Cell-Based Assay System for Evaluating the Inhibition of

Active Ghrelin Production

Shigeru Oiso

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences

## Abstract

Ghrelin is a gastric peptide hormone with orexigenic activity, which is dependent on serine-3 acylation with octanoic acid (octanoylation). Therefore, inhibition of ghrelin octanoylation may help to decrease appetite and thus prevent obesity. The aim of this study was to establish a human gastric cell-based assay system to evaluate candidate inhibitors of octanoylated ghrelin (active ghrelin) production. In human gastric carcinoma AGS cells, messenger RNA of furin and ghrelin *O*-acyltransferase, prerequisite factors for processing proghrelin to the mature ghrelin form and for the acyl-modification of ghrelin, respectively, were well expressed, but that of ghrelin was expressed at a low level. Accordingly, we transfected a ghrelin-expressing vector into AGS cells and succeeded in isolating a stable ghrelin-expressing cell line (AGS-GHRL8), which secretes active ghrelin in an octanoic acid concentration-dependent manner. We examined whether some fatty acids might influence active ghrelin secretion from AGS-GHRL8 cells. Heptanoic acid, oleic acid, and eicosapentaenoic acid suppressed the increase of active ghrelin secretion caused by octanoic acid, whereas acetic acid and butyric acid did not. This cell-based assay system using AGS-GHRL8 cells may be valuable for the exploration of inhibitors of active ghrelin production.

Key words: AGS-GHRL8 cells, octanoylation, active ghrelin

## 【要旨】

グレリンは、摂食亢進作用を有するペプチドホルモンで、その活性発現にはN末端から3位のセリンのオクタン酸によるアシル化（オクタノイル化）が必要である。オクタノイル化グレリン（活性型グレリン）産生の抑制は、肥満防止につながる可能性があることから、活性型グレリン産生抑制物質を探索するための細胞評価系の構築を試みた。胃癌上皮細胞AGSには、グレリンの翻訳後修飾に必要な因子の発現がみられたが、グレリンの発現は非常に低かったため、グレリン発現ベクターを細胞内に導入し、グレリン高発現細胞AGS-GHRL8を作製した。AGS-GHRL8細胞には、培地中のオクタン酸濃度依存的に活性型グレリンの分泌量を増加させる特性が認められた。ヘプタン酸、オレイン酸およびエイコサペンタエン酸は、オクタン酸による活性型グレリン分泌の増加を完全に抑えたが、酢酸および酪酸は抑制しなかった。活性型グレリン産生抑制物質探索におけるAGS-GHRL8細胞の有用性が示唆された。

キーワード：AGS-GHRL8細胞、オクタノイル化、活性型グレリン

## 【背景】

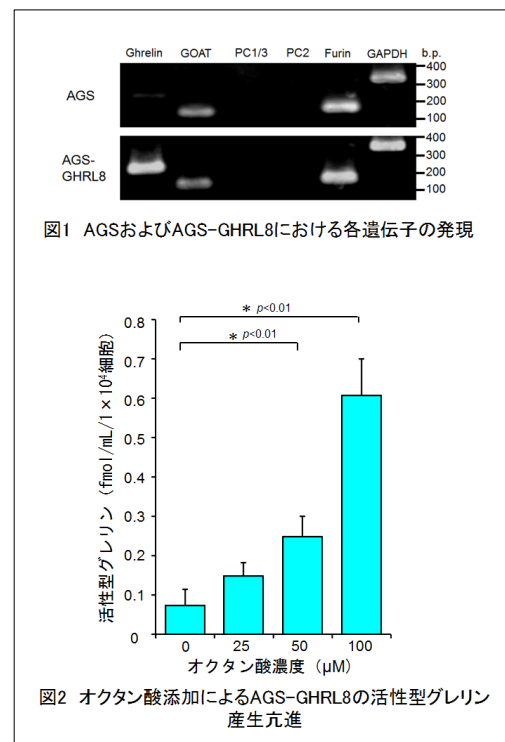
グレリンは、摂食亢進作用を有するペプチドであり、その活性の抑制は肥満防止につながることを期待される。N末端から3番目のセリンがオクタン酸でアシル化（オクタノイル化）された活性型グレリンとアシル化されていないデスアシルグレリンの主に2つの形態で生体内に存在するが、摂食亢進作用を示すのは活性型グレリンである。グレリンは、グレリン遺伝子が翻訳されプレプログレリンが生成した後、PC1/3、PC2 または furin などのプロタンパク質転換酵素によりプロセッシングを受け、28 アミノ酸の成熟体となり細胞外に分泌される。オクタノイル化は、プログレリンの段階で Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) により媒介されることから、このオクタノイル化を阻害することで、活性型グレリンの産生が抑制されると考えられる。本研究では、活性型グレリン産生抑制作用を有する物質を探索するための細胞を用いたアッセイ系を構築し、その有用性を検討した。

## 【方法】

細胞は、胃癌上皮細胞 AGS を用いた。グレリンの遺伝子導入には、グレリン遺伝子を pcDNA3 に組み込んだ発現ベクターを用いた。活性型グレリン産生に対する効果は、細胞の培地にオクタン酸および試験薬物を添加したときの活性型グレリン濃度をオクタン酸単独添加時と比較することにより評価した。活性型グレリン濃度の測定には、市販の Active Ghrelin ELISA キットを用いた。

## 【結果および考察】

AGS 細胞のグレリン生成に関与する分子の mRNA は、グレリン、GOAT および furin の発現が認められたもののグレリンの発現レベルはかなり低く（図1）、細胞からのグレリンの分泌も検出できなかった。そこで、グレリンの発現ベクターを導入することによるグレリンの安定発現株の樹立を試み、AGS-GHRL8 細胞の単離に成功した。AGS-GHRL8 細胞の培地中への活性型グレリンの分泌量は、添加したオクタン酸の濃度依存的に増加した（図2）。オクタン酸と共に種々の脂肪酸を添加したところ、ヘプタン酸、オレイン酸およびエイコサペンタエン酸は活性型グレリン産生を抑制したが、酢酸および酪酸は影響を示さなかった。我々が構築した AGS-GHRL8 細胞を用いた評価系は、活性型グレリン産生を抑制する物質のスクリーニングに有用と思われる。



## 【参考文献】

Oiso S, Nobe M, Yamaguchi Y, Umemoto S, Nakamura K and Kariyazono H. *J. Biomol. Screen.* 2013; 18: 1035-1042.