**ヒトの加齢のマウスモデルにおいてグレリン信号伝達の増加はサーチュイン1の活性を介して生存を延長させる**

カロリー制限(CR)は加齢を遅らせ、機能の低下やほとんどの臓器における発病を遅延させることが知られている。グレリンはCRに反応して胃から分泌され、エネルギー代謝を制御する。我々は、CR状態でグレリンが加齢に伴う病気の予防において何らかの役割を果たすと仮定した。我々は、ヒトの正常な加齢と促進された老化の動物モデルとして、遺伝的また生化学的な背景の異なる3系統のマウスにおける加齢過程中のグレリンシステムの基盤にある生理学的機序を調査した。クロト―欠失マウスと老化促進モデルマウス(senescence-accelerated prone/8 mouse, SAMP8)の両系統で血漿グレリン濃度の上昇が観察された。クロト―欠失マウスではグレリン処理による食欲の刺激や生存の延長は認められず、加齢過程におけるグレリン耐性の存在が示唆された。しかし、クロト―欠失Rマウス、SAMP8 RマウスおよびICRマウス系統ではグレリン拮抗剤により死期が早められ、グレリン信号伝達の増強剤である六君子湯とアトラクチロジンにより脳内のミクログリア活性化の低下を伴う複数の老化関連病態が改善され、生存が延長された。in vitro実験においては、グレリン受容体1a発現細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞をグレリンまたグレリン増強剤で処理後に、cAMP–CREBを介したサーチュイン1 (SIRT1)の活性とタンパク質発現の亢進が認められた。更に、加齢マウスモデル3系統全てにおいて視床下部のSIRT1活性と心臓のSIRT1タンパク質発現が六君子湯によって上昇した。六君子湯による治療によって心膜炎、心筋石灰化、心筋線維と筋繊維の萎縮が改善された。グレリン信号伝達はCRによって活性化される機序の一つであり、グレリン信号伝達の増強は健康と寿命の増進に役立つ可能性がある。

**緒言**

世界の人口における寿命の延びは現代医学の成功を表すものであるが、老化に伴い多くの疾患の発症リスクも指数関数的に増加する1。痴呆、がん、糖尿病、骨粗鬆症や血管障害などの加齢に伴う病気を遅延あるいは予防する薬物療法が強く望まれる。カロリー制限(CR)は加齢を遅らせ、機能の低下やほとんどの臓器における発病を遅延させることが知られている2。CRの効用はサーチュイン(SIRT)、インスリン様成長因子1(IGF-1)／インスリン、アデノシン一リン酸活性化プロテインキナーゼ(AMPK)、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)などの複数の信号伝達経路によって媒介されると考えられている。視床下部の SIRT1はCRの正常な反応に必要とされ3、エネルギー収支を制御しており、加齢／長寿への関与も示唆されている4,5。しかし、CRによって活性化される主要な制御ホルモンやこれに関与する機序の詳細については不明なままである。

グレリンはCRや絶食に反応して主に胃から分泌されるアシル化されたホルモンである6。グレリン受容体(成長ホルモン分泌促進物質受容体1a型；GHS-R1a)は脳や心臓を含む複数の臓器で発現される7。グレリンは食欲増進物質としてはるかに広範な生理学的機能を有し、成長ホルモン(GH)の分泌刺激8、消化管運動刺激9、心収縮刺激10、エネルギー代謝の阻害6、インスリン分泌の阻害11,12、炎症の阻害13およびアポトーシスなどに関与する。グレリンの食欲増進作用は、視床下部の弓状核における神経ペプチドYニューロン内で活性化されたAMPKに媒介される14–16。AMPKは細胞のニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド(NAD+)レベルを上昇させてSIRT1活性を亢進させ、エネルギー消費を制御する17。従って我々は、CR状態でグレリンが老化関連疾患の予防においてSIRT1を介して何らかの役割を果たすと仮定した。

日本の伝統的な漢方薬である六君子湯は、セロトニン2b/2c受容体の拮抗作用を介したグレリン分泌の刺激およびGHS反応性の亢進によってグレリン信号伝達を増強できる18–22。六君子湯に含まれる43の主要な化合物のうち、アトラクチロジンはGHS-R発現細胞においてアロステリック機構を介して、グレリン/GHS-R結合活性とグレリン誘導細胞質カルシウムイオン(Ca2+)濃度の大幅な上昇を示す。アトラクチロジンは、六君子湯を投与された正常被験者において検出された主要な成分である23。

本研究では、遺伝的また生化学的な背景の異なる3系統のマウスの生存に及ぼすグレリン信号伝達の影響を調査した。これらの動物モデルはヒトの促進された老化または正常な加齢を模倣する。これらのモデルは、多くの加齢関連疾患を制御する共通の防御機構の研究に役立つ。本研究では、ホモ接合性のクロト―突然変異マウス(kl/kl; クロト―欠失)と老化促進モデルマウスSAMP8において、血漿アシル化グレリン濃度の上昇が観察された。クロト―欠失マウスでは、グレリン拮抗物質(D-Lys3)-GHRP-6によって死期が早められた一方、グレリンではなくグレリン信号伝達の増強剤である六君子湯とアトラクチロジンによって生存が延長された。もう一つの病理モデルであるSAMP8と正常な加齢のモデルである高齢ICRマウスにおいて、六君子湯は生存を延長した。これらの結果は、ヒトの老化の動物モデルの寿命の延長において、内在性グレリン信号伝達の増強またはグレリン耐性の減弱が重要である事を示唆する。全てのげっ歯類モデルにおいて複数の老化に伴う疾患の改善が認められ、クロト―欠失マウスとSAMP8マウスでは心臓障害が改善し、高齢ICRマウスでは学習が改善した。生存に対する効果は、食欲増進作用やインスリンとIGF-1信号伝達の相互作用とは大体において独立していた。加齢過程に対する防御機構としては、グレリン信号伝達はSIRT1活性の上昇と脳内のミクログリア活性の低下に関連すると考えられている。

**材料および方法**

老化モデルとしてクロト―欠失マウス、SAMP8マウスとICRマウス、およびGHS-Rノックアウトマウスを用いた。全ての実験手順は、それぞれの実験動物委員会の承認を得た「実験動物の管理と使用に関するガイドライン」に従って実施された。材料および方法の詳細な記述は補足情報を参照されたい。

**結果**

**クロト―欠失マウスにおける加齢過程におけるグレリンの役割**

マウスにおけるクロト―遺伝子発現の喪失は、全身性の年齢依存的な退行変性と寿命の短縮に繋がる。4週齢で複数の退行変性が生じ、約2月齢で早死が起こる24。クロト―欠失マウスにおけるグレリン信号伝達の潜在的役割を調査した。5週齢のクロト―欠失マウスでは、減食または絶食条件下でアシル化グレリン、デスアシル型グレリン、GHとコルチコステロンの増加が示された一方、悪質液状態を示唆するアシル化グレリン/デスアシル型グレリン(A/D)比、IGF-1、インスリンとグルコースの低下が観察された(補足図S1a)。絶食状態のクロト―欠失マウスでは、視床下部の神経ペプチドYとアグーチ関連ペプチドの遺伝子発現が上昇し、プロオピオメラノコルチンの発現が低下した(補足図S1b)。このようなホルモンの変化は悪液質で観察されるものと一致していた18,25。

クロト―欠失マウスと同週齢の野生型マウスの両方で、グレリン投与(100μg/kg、腹腔内投与)の直後に血漿GH濃度が上昇したが IGF-1 は上昇しなかった。(補足図S2a)。クロト―欠失マウスでは野生型マウスと比較して摂食量の減少と体重の低下を示し、野生型マウスと比較してグレリンに誘導された摂食量と体重の増加は観察されなかった(補足図S2b)。このような発見は、クロト―欠失マウスがグレリンの食欲増進効果に対して強い耐性を有することを示唆する。クロト―欠失マウスにおいて、グレリンの連日投与(30または100μg/kg、1日2回腹腔内投与)は生存を延長しなかったが、グレリン拮抗物質(D-Lys3)-GHRP-6の投与(100μmol /kg、腹腔内投与)は体重を変化させることなく生存期間の中央値を低下させた(図1aとbおよび補足図S2c)。これらの発見は、内在性グレリン信号伝達が早死の予防に重要であること、しかしがん悪液質と同様にグレリンの効果はグレリン耐性によって無効化される事を示す18,25。

クロト―欠失マウスにおいて、六君子湯 (1000mg/kg, p.o.)とアトラクチロジン(1mg/kg, p.o.)の連日投与は体重と加齢スコアを変化させることなく生存期間中央値を有意に増加させた(図1eおよび補足図S3aとb)。六君子湯処理マウスでは心筋石灰化の顕著な減少が観察された(図1fおよび補足 Table S1)。クロト―欠失マウスにおいて、六君子湯(1000 mg/kg, p.o.)は24時間の摂食量を変化させず(図1g)、4日目のグレリン分泌も刺激しなかった(図1h)。六君子湯処理によってインスリンを除く他のホルモンに関するパラメターは変化しなかった (補足図S3d)。しかし、六君子湯はクロト―欠失マウスの視床下部におけるSIRT1活性を上昇させた。心臓のSIRT1活性は極めて低く測定が難しいが、クロト―欠失マウスで六君子湯 による心臓SIRT1活性の有意な上昇が観察された(図1i)。

クロト―欠失マウスでは視床下部のインターロイキン6と腫瘍壊死因子αの遺伝子発現の上昇が示されたが、これらは六君子湯とアトラクチロジンの投与による影響を受けなかった(補足図S4a)。クロト―欠失マウスの視床下部の遺伝子発現のマイクロアレイ解析により、六君子湯とアトラクチロジンが、プロオピオメラノコルチン、IGF-1とアルギニン・バソプレシンの発現に穏やかな変化をもたらしながら、炎症、アポトーシス、DNA修復や遊走に影響を与える加齢関連遺伝子の発現を大幅に改善する事が示された(補足図S4bとc)。クロト―欠失マウスは虚弱であるため、行動解析は実施できなかった。

**SAMP8マウスにおけるグレリン信号伝達増強剤六君子湯の抗加齢効果**

老化促進モデルマウスは、加齢関連病理学的表現型に基づいて選択的に同系交配されてきた。SAMP8マウスは老化に伴う障害と短い寿命を示す26。SAMP8マウスの生存期間中央値は正常老化モデルマウスSAMR1より短いが、六君子湯 (1%)の連日投与によって加齢スコアの変化を伴うことなく(補足図S5a)大幅に上昇した(図2a)。加齢過程ではSAMP8とSAMR1の両系統で摂食量と体重の減少が観察された(図2b)。SAMR1マウスと比べてSAMP8マウスでは、摂食量、体重の減少、そして5週間ごとの変化で示される餌効率が低下していた。摂食量は六君子湯によって改善された(図2cおよび補足図S5b)。SAMP8マウスでは自発運動が特に夜間に低下していたが、六君子湯の投与後に回復した(図2d)。六君子湯処理後に、野外試験での不安様行動とステップスルー型受動的回避試験における記憶障害に違いは認められなかった(補足図S5cとd)。心膜炎、心筋繊維と筋繊維の萎縮(サルコペニア)(図2eとf)、白血病の発症(補足表S2)の様な複数の病理学的変化が六君子湯処理によって有意に阻害された。

同週齢のSAMR1マウスと比較して、42週齢のSAMP8マウスではアシル化グレリン、デサシル型グレリンとGHの血漿濃度が顕著に上昇していた(図2gおよび補足図S6a)。インターロイキン1β、腫瘍壊死因子αとミクログリアのマーカーであるイオン化カルシウム結合アダプター分子1(Iba-1)の遺伝子発現が、SAMP8マウスの視床下部で上昇していた(補足図S6b)。六君子湯処理(1%を19週間)により血漿IGF-1濃度が上昇したが。サイトカインとIba-1の発現には影響しなかった(補足図S6)。

SAMP8マウスで胃粘膜萎縮が観察された。胃小窩厚とグレリン陽性細胞数の低下と活性化マクロファージの増加は、六君子湯によって回復された(補足図S7)。SAMP8マウスにおいて、六君子湯処理は視床下部のSIRT 1活性を上昇させたが、心臓におけるSIRT1のタンパク質発現には影響を与えなかった(図2h)。

**ICRマウスとGHS-Rノックアウトマウスにおける六君子湯の抗加齢効果**

正常な加齢のモデルとして16～18月齢のICRマウスを用いた。入手可能な動物の年齢が異なるため成長曲線を反映する加齢スコアと体重を用いてマウスの評価とグループ分けを行った。ICRマウスにおいて、六君子湯 (0.5%と1%)は 摂食量、体重と加齢スコアに影響することなく(図3bおよび補足図S8a)、生存期間中央値を延長させた(図3a),。この動物モデルは心臓の石灰化や心膜炎は起こさずに心筋繊維の限局性萎縮を呈したが、これは六君子湯 (1%) 処理により阻害された(図3cおよび補足表S3)。六君子湯で2か月間処理した後に、ICRマウスにおいて受動的回避学習の記憶の固定が促進された(図3d)。野外での不安様行動と高架式十字迷路法には差は見られなかった(補足図S8bとc)。

4月齢の若齢ICRマウスと比較して26月齢の高齢ICRマウスで観察されたアシル化グレリンの血漿濃度に有意な差は認められなかった。高齢ICRマウスにおいて8か月間の六君子湯処理により、アシル化グレリンの血漿濃度と心臓のSIRT1 タンパク質発現に影響は見られなかったが、視床下部のSIRT 1活性は上昇した(図3eとf)。12週齢のGHS-Rノックアウト、ヘテロ接合型および野生型のC57BL/6マウスに六君子湯 (1%)を含有する餌、または対照餌を4週間給餌した。六君子湯処理したGHS-Rノックアウトマウスでは視床下部の SIRT1活性が低下した(図3i)。

**グレリン信号伝達によるSIRT1経路の活性化**

GHS-R1aを発現するヒト胎児腎臓細胞(HEK)293(293-GHS-R)細胞のSIRT1活性に及ぼすグレリン 信号伝達の効果を調査した。293-GHS-R細胞のSIRT1 活性はグレリンと六君子湯によって上昇し(図4aとb)、その効果はグレリンおよび六君子湯の両方の処理により亢進した(図4c)。

GHS-Rは、複数の細胞内信号伝達カスケードにおいてGタンパク質共役受容体(GPCR)として発見された27。GPCRs に共役したGPCRsはホスホリパーゼCを活性化して、小胞体のイノシトール三リン酸開口型Ca2+チャンネルを開き、ジアシルグリセロールの産生を介してプロテインキナーゼCを活性化させる。他方、Gαに共役したGPCRsはアデニリル・シクラーゼを活性化して、環状アデノシン一リン酸(cAMP)を産生し、プロテインキナーゼA(PKA)と他の下流のエフェクターを活性化させる。本研究では、293-GHS-R細胞においてグレリンは細胞内のCa2+濃度を上昇させた(図4f)。293-GHS-R細胞と模擬形質転換させた293 (293-Mock) 細胞において、六君子湯は細胞内のCa2+濃度に影響を及ぼさなかった。しかし、六君子湯とアトラクチロジンによりCOS細胞と視床下部のニューロン18,19において既に報告されているように、六君子湯は293-GHS-R細胞におけるグレリン誘導性のCa2+流動を増強した(図4f)。インピーダンスに基づく細胞試験では、六君子湯 は293-GHS-R細胞において、媒体(vehicle)ではなくグレリンに誘導される細胞内信号伝達を増強させることが示された(補足図S9a)。グレリンまたは六君子湯で処理されたラットでは、胃の求心性迷走神経活性が低下した。Cang Zhu(atractylodes lancea rhizome)、マツホド(poria sclerotium)および温州ミカンの皮の構成物質の投与に続いて同様の効果が観察された(補足図S10a)。

グレリンは293-GHS-R 細胞において細胞内cAMPを上昇させ、これは六君子湯処理によっても上昇した (図4gとh)。CRに誘導される脳内のcAMP応答エレメント結合(CREB)は、SIRT1遺伝子の転写を上方制御して脳の老化に対抗する神経保護を誘導することが報告されている28。本研究では、グレリンは293-GHS-R 細胞におけるcAMP応答エレメント(CRE)受容体の活性とリン酸化CREBを上昇させ、この効果は六君子湯によって増大された(図5aおよび補足図S11)。これらの結果は、グレリンが誘導するSIRT1活性がcAMP–CREB経路に媒介されることを示唆する。

グレリン処理していない293-GHS-R 細胞において、六君子湯はCRE受容体活性(図5a)とSIRT1活性(図4d)を上昇させた。これらの効果はGHS-Rの逆作動薬 (D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7,9,Leu11)-サブスタンスP(SP-A)による処理によって阻害され、リガンド独立的構成的信号伝達を示すGHS-Rの介在が示唆された29。六君子湯誘導CRE受容体活性はPKA阻害剤のH89によっては抑制されるが、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼのキナーゼ阻害剤U0126によっては抑制されず、ホスホジエステラーゼ阻害剤3-イソブチル-1-メチルキサンチンによって亢進される(図5cとe)。更に、六君子湯のこれらの効果は293-Mock細胞とヒト骨肉腫(U2OS)細胞でも観察され(図 4eおよび5b, d, f とg)、GHS-Rとは独立のcAMP/PKA経路に関連した信号伝達の部分的な関与が示唆される。

次に、グレリンとGHS-R1aの両方を発現するヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を用いて、SIRT1に及ぼすグレリンの効果を調査した30。SIRT1(参考資料31)とAMPK32は老化に伴う血管内皮の機能不全を防ぐ。我々は、グレリンとアトラクチロジンで見られたように、HUVECsにおいて六君子湯がSIRT1活性とタンパク発現を上昇させることを発見した(補足図S12aとb)。このような六君子湯とアトラクチロジンの効果は、(D-Lys3)-GHRP-6またはSP-Aによる処理によって阻害された(補足図S12aとc).

カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ・キナーゼβ(CamKKβ)は、哺乳動物細胞においてAMPKの上流で作用する33。AMPKは細胞NAD+レベルを上昇させてSIRT1活性を亢進させ、下流のSIRT1標的の脱アセチル化と活性調節を行う17。cAMPに直接活性化される交換タンパク質(Epac1)はcAMPのエフェクタータンパク質であり、活性化されると細胞のCa2+レベルを上昇させてCamKKβ–AMPK経路を活性化させる34。六君子湯はリン酸化AMPKレベルを上昇させ、これは(D-Lys3)-GHRP-6処理によって阻害される(補足 図S12d)ことから、GHS-R信号伝達の関与が示唆される。更に、HUVECsでのSIRT1タンパク質発現レベルはAMPK活性化物質の5-amino-4-imidazolecarboxamide-1-beta-D-ribofuranosideによって上昇し、AMPK阻害物質のコンパウンドCによって低下することから(補足図S12e)、AMPKがSIRT1のタンパク質発現を誘導することが示唆される。

グレリンは六君子湯との組み合わせにより、酸化細胞死のモデルである293-GHS-R細胞の過酸化水素誘導アポトーシスを阻害する(補足図S9b)。

**ミクログリア介在炎症に及ぼすSIRT1経路活性化の阻害効果**

先行研究では、核因子κBの受容体活性化因子に対する阻害効果を介して、SIRT1経路活性化がミクログリア介在炎症を改善させる事が示された35。ミクログリアによる炎症の改善にSIRT1が関与する可能性を検討するため、早期老化症の動物モデルであるクロト―欠失マウスに六君子湯を経口投与し、脳の切片におけるミクログリアの病的活性化を形態学的に解析した。六君子湯はアメーバ様の形態を示す病的に活性化されたミクログリアの数を有意に減少させ、これらは無処理のクロト―欠失マウスの脳で数多く観察された(図1jとk)。六君子湯処理されたマウスの脳では、ミクログリアの形態は微細突起と少ない細胞質を特徴とする分枝状静止ミクログリアの形態に回復された。SAMP8マウス(図2iとj)と高齢ICRマウスの(図3gとh)の両方においても、六君子湯により脳内のアメーバ様ミクログリアの数が減少した。

**考察**

我々は、ヒトの促進されたあるいは正常な老化のマウスモデル3系統において、

グレリンの拮抗物質(D-Lys3)-GHRP-6が死期を早める一方、グレリン信号伝達の増強剤である六君子湯とアトラクチロジンが複数の老化に伴う疾患を改善し生存を延長させることを示した。これらの知見により、加齢に伴う早死の予防において内在性グレリン信号伝達の亢進が重要な役割を果たすことが示唆される。

クロト―欠失マウスとSAMP8マウスの両方で、アシル化グレリンの血漿濃度が上昇していた。ヒトを含む動物において体重の減少はグレリン分泌の強力な刺激因子であるので、これはおそらく拒食症と体重の減少によるものと思われる36,37。がんや他の疾患に関連した悪液質で見られる状況18,25と同様に、これらのマウスで観察された視床下部での炎症性サイトカインの上昇が、グレリンの食欲増進効果に対する耐性の原因であろう。SAMP8マウスでのみ六君子湯は適応的な採餌と体重の反応を部分的に改善し、生存に対する効果が食欲増進作用とはほぼ独立的であることが示唆された。

高齢の動物及びヒトでは、グレリン、GHSと六君子湯によりGH–IGF-1軸が改善することが報告されている38–41。病理学的な加齢に関するこの研究では、クロト―欠失マウスではグレリンがIGF-1ではなくGHを上昇させ、SAMP8マウスではGH–IGF-1軸は下方制御されていないようであった。健全な加齢のための適切なレベルの循環性GHとIGF-1の重要性を指摘する研究は多いが、加齢表現型の起源と長寿化におけるこの様なタンパク同化ホルモンの役割については大いに物議を醸している42。

どのような老化に伴う疾患においても神経変性障害が最も強力な危険因子である。

CRは脳の老化を遅らせ、神経変性を予防する28,43,44。特に、免疫と神経内分泌の統合を介した全身の加齢の発症において、視床下部はプログラムに関わる役割を果たす45。クロト―欠失マウスの視床下部において、炎症、アポトーシス、DNA修復と遊走に関与するニューロン遺伝子のレベルがグレリン信号伝達の亢進によって改善された。これらの知見は、老化に伴う視床下部の遺伝子の変化に及ぼすCRの有益な効果46、およびグレリンの神経保護作用47が観察された先行報告と一致する。がんと痴呆は加齢に伴う最も深刻な消耗性の状態である。高齢ICRマウスにおいて、六君子湯は受動的回避学習の記憶の固定を促進した。CRと同様に、グレリ信号伝達の向上は、脳や心臓の病変を含む複数の老化関連神経変性に対して保護的に作用するようである。

高齢化社会においては、循環器疾患は死亡と身体障害の原因の第1位である。ヒトのクロト―遺伝子多型は冠動脈疾患のリスクの変動に関連している48。クロト―は細胞のアポトーシスと血管細胞の老化を減弱させる49。高齢F344ラットの大動脈において、CRは酸化ストレスを減弱させ、内皮機能を向上させる50。最近、グレリンが直接的また間接的な作用の組み合わせを介して心臓血管系に有益な効果を与えることが示された10。遺伝性拡張型心筋症のマウスモデルを用いた心不全において、グレリンは心臓機能と生存とを改善させる51。グレリンは交感神経系の活性を阻害しGH分泌を刺激するので、循環器疾患と心臓悪液質の治療に役立つかもしれない10,52。本研究における組織学的解析により、SAMP8マウスと高齢ICRマウスで発症した心膜炎および心筋の石灰化と限局性委縮は、六君子湯処理により改善する事が示された。クロト―欠失マウスにおける石灰化も六君子湯により有意に減弱され、良好な予後の原因を示唆した。ニコチンとビタミンD3によってそれぞれ心筋のオステオポンチン発現の上昇とエンドセリン1発現の低下を介して誘導される心筋石灰化が、グレリンによって減弱されることが報告されている53。SAMP8マウスの主な死因である白血病が六君子湯処理によって阻害される機序は、グレリンに関してはいまだ解明されていない。

加齢に伴う筋肉量の変化は寿命と健康寿命に影響を及ぼす。本研究では、六君子湯処理により心筋繊維と筋繊維の萎縮が改善されたことを示した。これらの知見から、グレリン信号伝達が加齢に伴うサルコペニア(筋肉減弱症)を改善させ、マウスモデルでの生存の延長に貢献した可能性が示唆された。SAMP8マウスで低下した自発運動が六君子湯の投与により回復した。この結果もまた筋萎縮の改善によって媒介されている可能性がある。グレリンと六君子湯は、褐色脂肪組織に対する交感神経活動を低下させた。この知見は基礎エネルギー消費量の低下を示唆する。

293-GHS-R細胞とHUVECsにおいて、グレリンと六君子湯はtheGHS-R–cAMP–CREB経路を介してSIRT1の活性とタンパク質発現を上昇させた。GHS-Rは視床下部と心臓を含む複数の臓器で発現される。老化のマウスモデル3系統の全てで、六君子湯は視床下部のSIRT1活性と心臓でのSIRT1タンパク質発現を上昇させた。しかし、六君子湯処理したGHS-Rノックアウトマウスでは視床下部のSIRT1活性が有意に低下した。これらの結果から、高齢マウスにおけるSIRT1活性がグレリン信号伝達に媒介されることが示唆される。

SAMP8マウス、クロト―欠失マウスおよび生理的に老化したマウスへの六君子湯の投与がミクログリアの病的活性化の改善に繋がるという本研究での知見は、SIRT1がミクログリア内の核因子κBの活性とアミロイドβの毒性を低減させる事を示した先行報告35と一致する。最近の報告では、腸と胃が脳のミクログリアの挙動に影響を及ぼし、硬化症の様な神経障害の予後を決定する事が示されたが、その病態生理学は十分に理解されていない45,54。本研究の知見はグレリン信号伝達がSIRT1を活性化する事を示し、グレリン耐性の治療によってSIRT1経路を介した加齢過程における脳や他の臓器／組織に対する保護効果が発揮される可能性がある。この様な転帰はグレリンの食欲増進活性とは独立したものであろう(補足図S13) 3,55。

複数の種でCRが寿命を延ばし、健康を向上させることが確立されている。赤毛猿の長期的なCRの研究により、CRが老化に伴う死亡率を低下させ、糖尿病、がん、循環器疾患、脳萎縮の様な加齢に伴う病態の発症を遅らせることが示されたが56,57、これらの結果は幾分か議論の余地を残している。加齢過程の根幹にある主要な機構と考えられている酸化ストレスをCRが低下させることは多くの研究で示されている58。この様なCRの効果は、SIRT、IGF-1/インスリン、AMPKとmTORを含む複数の信号伝達経路に媒介される。これらの経路は相互に作用し、反応の異なる側面を媒介する重要な役割を果たしているかもしれない59。ラパマイシンは平均寿命と最長寿命の両方を伸ばすことが示され、この類似体に基づく新しくより安全な抗加齢両方の開発が期待される60。

**結論**

本研究は、CRによって活性化される主要な制御ホルモンと機構はグレリン–GHS-R信号伝達経路を含むに違いないことを示す。グレリン信号伝達の増強は、現代の高齢化社会において健康寿命と寿命を共に改善する新たな戦略となるかもしれない。

**利益相反**

AIはTumuraより助成金を受けている。他の著者には開示すべき利益相反は無い。

**謝辞**

Y Kobayashi氏、K Kubota氏、S Iizuka氏、C Sadakane氏、M Nahata氏、K Ohbuchi氏、T Yamaguchi氏、H Takei氏およびT Hattori氏には技術的支援と有益な議論に対して謝意を表する。本研究は部分的に文部科学省の学術研究助成基金助成金／科学研究費補助金(プロジェクト番号24390182と22590676)の助成を受けた。

**著者の貢献**

AIは研究を監督し、実験計画を立てた。NF, AA, AM, MA, HTとGKは実験を遂行しデータの解析を行った。Y Sawada、Y SudoとKNはYUとHTの支援を受けて細胞の解析を行った。ISとTSはマイクロアレイの解析を行った。ESとTUはミクログリアの免疫組織学的解析を行った。NF, AAとAIは本稿を執筆した。MAはプロジェクトを指揮した。著者は全員が結果と原稿を全体として批判的に議論した。