

20010229

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

新規ホルモン；グレリンの生理的意義と老化における役割の解明

平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14（2002）年3月

主任研究者 寒川賢治
国立循環器病センター研究所
生化学部 部長

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

新規ホルモン；グレリンの生理的意義と老化における役割の解明

平成13年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 総括研究報告

- 新規ホルモン；グレリンの生理的意義と老化における役割の解明に関する研究----- 1
寒川賢治（国立循環器病センター研究所生化学部 部長）

II. 分担研究報告

1. 心不全モデルラットにおけるグレリンの病態生理的意義----- 5
寒川賢治（国立循環器病センター研究所生化学部 部長）
2. 生活習慣病および老化におけるグレリンの臨床的意義と診断治療への応用----- 9
中尾一和（京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学第二内科 教授）
3. 無麻酔無拘束ラットの脈動的成長ホルモン分泌形成における
末梢血中グレリンの意義に関する研究----- 14
千原和夫（神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科学教室教授）
4. Growth hormone secretagogue 受容体(GHS-R)発現抑制
トランスジェニックラットの解析 ----- 18
芝崎 保(日本医科大学第二生理 教授)
5. 卵巣機能におけるグレリンの意義に関する研究----- 25
宮本 薫(福井医科大学生化学第二講座 教授)
6. グレリンの下垂体および甲状腺機能調節における意義----- 29
山下俊一（長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設分子医療部門 教授）
7. 加齢モデル動物およびヒトにおけるグレリンの生理的意義----- 32
島津 章（国立京都病院臨床研究部 部長）
8. グレリンのエネルギー代謝調節機序に関する研究----- 35
中里雅光（宮崎医科大学第三内科 講師）

新規ホルモン；グレリンの生理的意義と老化における役割の解明に関する研究

主任研究者 寒川賢治(国立循環器病センター研究所 部長)

新規成長ホルモン分泌促進ペプチド；グレリンについて、新たな生体機能調節機序および老化における役割を検討した。グレリンは GH 分泌に関し、GHRH と相乗的に作用すること、血漿グレリンは主として胃に由来し、cachexia で増加、BMI と逆相関しエネルギー蓄積状態の指標となりうると考えられた。また、グレリン投与は、心不全や癌移植 cachexia モデルマウスの摂食低下の改善と体重減少抑制作用を示した。グレリンは、GH 分泌促進、摂食促進作用以外にもエネルギー同化促進作用を有することから、cachexia や高齢者のソマトポーズに対する新たな治療の可能性を示した。

[研究組織]

○寒川賢治 (国立循環器病センター研究所
生化学部長)

中尾一和 (京都大学大学院医学研究科
臨床病態医科学第二内科教授)

千原和夫 (神戸大学大学院医学系研究科
応用分子医学講座)

芝崎 保 (日本医科大学第二生理学教授)

宮本 薫 (福井医科大学
生化学第二講座教授)

山下俊一 (長崎大学医学部原爆後障害医療
研究施設分子医療部門教授)

島津 章 (国立京都病院臨床研究部部長)

中里雅光 (宮崎医科大学第三内科講師)

泌調節に関与する内在性因子の存在は約 20 年前より示唆されていたが、その実態はこれまで不明であった。

最近、代表研究者らはラット胃組織から、新規成長ホルモン分泌促進ペプチド；グレリン (ghrelin) を発見・構造決定した。グレリンは 28 個のアミノ酸よりなり、3 番目のセリンが脂肪酸で修飾されており、この修飾が活性発現に必須であるという特異な構造を有する。グレリンは強力な GH 分泌促進活性をもつ新規ペプチドホルモンであるが、GH 分泌のほかに全身の栄養、代謝や循環器系に対して GH を介さない直接作用も有する。このように、グレリンの発見により、新しい生体調節機序や老化を解明する上で大きな手がかりを得たと言える。

本研究では、グレリンの生体機能調節および老化における役割を、基礎および臨床研究の両面より解明すると共に、最終目標として臨床応用をも目指したい。

A. 研究目的

成長ホルモン(GH)は下垂体から分泌され、成長や代謝調節、また老化の進展などに深く関与するホルモンである。GH 分泌は思春期をピークとして、以後老化の過程で減退する。この GH 分泌低下はヒトにおいて、筋肉、骨量の低下、内臓脂肪蓄積型肥満、脂肪肝などをもたらし、高齢者の生活の質(QOL)を悪化させる。GH の分

B. 研究方法

本年度は、グレリンの新しい生体調節機序や老化制御の解明に向けて、以下のように広範な

検討を行った。

- 1) グレリンの臨床的意義と診断治療への応用、
- 2) グレリンの心血管系における意義、
- 3) グレリンのエネルギー代謝調節機序、
- 4) GHS-R 発現抑制トランスジェニックラットの解析、
- 5) 脈動的成長ホルモン分泌における末梢血中グレリンの意義、
- 6) 卵巣機能におけるグレリンの役割、
- 7) 加齢モデル動物およびヒトにおけるグレリンの生理的意義、
- 8) グレリンの下垂体および甲状腺機能調節における意義

(倫理面への配慮)

本研究においてヒトを対象とした研究を行うに際しては、各研究施設で定められた臨床研究の規定に従って実施した。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養および保管に関する基準、各研究施設における実験動物委員会の指針に基づき、実験動物愛護を配慮して実施した。

C. 研究結果、および D. 考察

1) グレリンの臨床的意義と診断治療への応用の検討

グレリンの分泌調節を検索する目的で、中尾は、種々の摂食状況における血漿グレリン濃度の検討を行い、また、様々な組織や培養細胞株におけるグレリンの発現を検索した。その結果、ヒトにおいてグレリンは胃において最も多く発現しており、血漿グレリンは主として胃に由来することを示した。血漿グレリン濃度は 12 時間の絶食で 30%増加し、摂食によって 20%の低下を示し、神経性食欲不振症患者において約 2 倍に増加していた。また、ヒトにおいてグレリンは GH 分泌に関し、GHRH と相乗的に作用することが示された。さらに、グレリンは甲状腺髄様癌組織および培養細胞株において発現および分泌が認められた。これらのことより、グレリンは急性および慢性の摂食状況を反映して分泌されることおよび、甲状腺におけるグレリンの

オートクリン・パラクリン作用が示唆された。

2) グレリンの心血管系における病態生理的意義の検討

グレリンは GH 分泌促進以外にも摂食、代謝、循環器系などにおいて多様な生体機能の調節に関与することが示唆されている。寒川は、グレリンの新しい生理作用について、主に循環器系における新しい機能および病態生理的意義についての検討をおこなった。その結果、グレリンの慢性皮下投与は、心不全ラットの左心不全を改善し、左室リモデリングの進行を減弱した。さらに、重度の心不全により生じる著明な羸瘦、いわゆる cachexia(悪液質)の進行を減弱した。これらのことから、グレリンの慢性投与が、重症の心不全に対する新しい治療的アプローチとなり得ると考えられた。

3) グレリンのエネルギー代謝調節機序の解析

中里は、グレリンの分泌動態、ヒトの肥満と痩せにおける血漿濃度の変動、膵臓における局在とインスリン分泌への影響ならびに担癌体 cachexia モデルに対する治療効果について解析した。非糖尿病と糖尿病のいずれでも血漿グレリン濃度は BMI と逆相関し、血漿グレリン濃度はエネルギー蓄積状態の指標となりうると考えられた。グレリンは生理的濃度でグルコース依存性にインスリン分泌を促進した。グレリン投与は、癌移植 cachexia モデルマウスの摂食低下の改善と体重減少抑制作用を示した。グレリンのエネルギー同化促進作用は、cachexia や高齢者のソマトポーズに対する新たな治療の可能性を示唆している。

4) GHS-R 発現抑制トランスジェニックラットの解析

芝崎はグレリンの作用機構を明らかにするため、growth hormone secretagogue 受容体(GHS-R)に対するアンチセンスを発現するトランスジェニック(Tg)ラットを用いて実験を行い、以下のような結果を得た。Tg ラットでは、対照ラット

と比較して視床下部弓状核の GHS-R 様免疫活性が減少していた。Tg ラットでは、GHS-R 陽性の GHRH 細胞が減少していたが、GHS-R 陽性の NPY 細胞の数には変化がなかった。GHS 投与後の GH 反応は Tg ラットで有意に減弱していた。前年度に報告した結果と併せると、弓状核の GHS-R は GH 分泌調節、摂食行動などにおいて重要な役割を果たすことが示唆された。

5) 脈動的成長ホルモン分泌における末梢血中グレリンの意義の検索

千原は、末梢血中グレリンの脈動的 GH 分泌に果たす役割を明らかにするため、無麻酔無拘束ラットの右心房に留置したカニューレから採血し、グレリン、GH 値を測定した。その結果、ラットでは、グレリン値には経時的変動は認められなかった。GH 高値(100 ng / ml 以上)の時点と低値(10 ng / ml 以下)の時点において、血漿グレリン値には差が認められなかった。グレリン作用を抑制する GH secretagogue (GHS) 拮抗薬 [D-Lys-3]-GHRP-6 を投与しても、GH の脈動的分泌は保たれていた。しかし、GH 頂値に有意差は認められないものの低下傾向を示した。以上の成績から、末梢血中グレリンが GH の脈動的分泌に大きな役割を果たしているとは考えがたい。しかし、GHRH の GH 分泌リズム形成作用に対し、グレリンはその作用を増強する方向で働いている可能性は現在のところ完全には否定できない。

6) 卵巣機能におけるグレリンの役割の検討

宮本は、卵巣機能におけるグレリンの役割を明らかにするための基礎研究として、ラット卵巣顆粒膜細胞を用いた初代培養系で、サブトクシオンクローニングを行なっている。本年度は、卵胞発育に重要な遺伝子群を多数クローニングし、DNA マイクロアレイを作成した。卵巣顆粒膜細胞にグレリンを投与し、上記 DNA マイクロアレイを用いて、グレリン誘導性、および抑制性遺伝子群の検索を行った。

7) 加齢モデル動物およびヒトにおけるグレリンの生理的意義の検索

加齢における機能的 GH 分泌不全状態に対して、GH および GH 分泌刺激剤やグレリンによる治療の可能性が考えられる。島津らは、欧米における抗加齢療法の現況を調査し、その理論的背景を検討した。GH が加齢により分泌低下すること、正常の老化過程と成人 GH 欠損症の症状に類似性があること、加齢による身体・精神機能低下に GH 欠乏が一部関与するとの仮定から、加齢に対する GH 療法が位置付けられる。米国では形成外科を中心に浸透している。健康な高齢者に対する GH 療法は副作用が強く明確な効果は期待できないが、身体機能低下から自立できない虚弱な高齢者に対し GH 療法は効果が期待しうる。フィードバック機構により過剰作用を避けうる点から GH そのものより GH 分泌刺激剤の方が有用と考えられる。

8) グレリンの活性発現におけるカロリー制限、成長ホルモン抑制の影響の検討

山下は、(a)各種内分泌疾患、特に内分泌腫瘍におけるグレリンの変動及び、(b)胃切除手術・術後症状におけるグレリン関連ホルモンの動態についての調査を行っている。いずれもまだ研究の途上であり、解析の積み重ねが必要であると考えている。また、(c)グレリンの活性発現におけるカロリー制限、成長ホルモン抑制の影響についても調査を行い、カロリー制限により、グレリンの血中濃度および n-オクタノイル化が変化することが示し、グレリンはエネルギー代謝の変化の関連因子である可能性を示した。今後、カロリー制限モデルを用いた検討を行っていく予定である。

E. 結論

グレリンの分泌調節の検討により、ヒトにおいて血漿グレリンは主として胃に由来すること、グレリンは急性および慢性の摂食状況を反映し

て分泌されるホルモンであることが明らかになった。また、ヒトの肥満と痩せにおける検討により、血漿グレリン濃度は BMI と逆相関し、血漿グレリン濃度はエネルギー蓄積状態の指標となりうることを示された。

一方、ヒト GH 分泌に関し、グレリンと GHRH は相乗的に作用することが示された。しかし、無麻酔無拘束ラットにおいて、末梢血中グレリンが GH の脈動的分泌に大きく寄与することは否定的であるが、GHRH の GH 分泌リズム形成作用に対し、グレリンはその作用を増強する方向で働いている可能性が考えられた。

GH secretagogue 受容体(GHS-R)に対するアンチセンスを発現するトランスジェニック(Tg)ラットでの検討により、弓状核の GHS-R は GH 分泌調節、摂食行動などにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになった。

グレリンの生理作用及び治療応用をに向けての検討では、心不全ラットへのグレリンの慢性皮下投与は、左心不全を改善し、左室リモデリングの進行を減弱し、さらに重度の心不全により生じる cardiac cachxia の進行を減弱した。また、癌移植 cachxia モデルマウスへのグレリン投与は、摂食低下の改善と体重減少抑制作用を示すことから、グレリンのエネルギー同化促進作用は、cachxia や高齢者のソマトポーズに対する新たな治療の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

心不全モデルラットにおけるグレリンの病態生理的意義

主任研究者 寒川賢治 (国立循環器病センター研究所 部長)

グレリンは GH 分泌促進以外にも摂食、代謝、循環器系などにおいて多様な生体機能の調節に関与することが示唆されている。本研究では、グレリンの新しい生理作用について、主に循環器系における新しい機能および病態生理的意義についての検討をおこなった。その結果、グレリンの慢性皮下投与は、心不全ラットの左心不全を改善し、左室リモデリングの進行を減弱した。さらに、重度の心不全により生じる著明な羸瘦、いわゆる心悪液質の進行を減弱した。これらのことから、グレリンの慢性投与が、重症の心不全に対する新しい治療的アプローチとなり得ると考えられた。

A. 研究目的

成長ホルモン(GH)は下垂体から分泌され、成長や代謝調節、また老化の進展などに深く関与するホルモンである。GH 分泌低下はヒトにおいて、筋肉・骨量の低下、内臓脂肪蓄積型肥満、脂肪肝などをもたらし、高齢者の QOL を悪化させる。グレリンは申請者らが発見した新規 GH 分泌促進ペプチドであり、GH 分泌以外にも摂食、代謝、循環器系などにおいて多様な生体機能の調節に関与することが示唆されている。本研究では、グレリンの発現、分泌調節機序及び生理作用を明らかにすることにより、主に循環器系における新しい機能および病態生理的意義の解明を図り、臨床応用へ繋げたい。

本年度は、慢性心不全モデルラットに対する、グレリン投与の効果について主に Cardiac cachexia(心悪液質の病態、異化亢進状態)、左心不全に対する効果について検討した。心不全に由来する cachexia においては、GH 分泌は保たれているがインスリン様成長因子 I (IGF-I)が低値を示す、いわゆる GH/IGF-I 不均衡が認められるという報告があり、グレリンが cachexia の患

者に血行動態的に有効に働くだけでなく、GH/IGF-I を介し anabolic に働き、cachexia を改善させることが推測される。

B. 研究方法

1) 心不全モデルラットの作製

心筋梗塞後の心不全モデルを使用した。雄性 Wistar ラット(200-240 g)の左冠動脈を麻酔下に結紮することで心筋梗塞を誘発し、梗塞発症後 4 週間生存し得たもののみを、心不全モデルとした。また、sham 手術を行ったラットを対象群として用いることにより、以下の実験を行った。

2) グレリン投与方法

心不全モデル(CHF)群および Sham 手術(Sham)群を、無作為にグレリン (CHF-グレリン群 : n=16、Sham-グレリン群 : n=15) または Placebo 群 (CHF-Placebo 群 : n=13、Sham-Placebo 群 : n=13) に分け、それぞれ 3 週間皮下投与した。その投与量に関しては、グレリン 100 μ g/kg を 1 日 2 回とし、placebo は同量の生理食塩水を用いた。

3) 評価項目

3 週間の薬剤投与後、各群について心エコー、

血行動態、組織学的検討、内分泌学的評価を施行し、慢性心不全ラットに対するグレリン慢性投与の効果を評価した。

C. 研究結果

1) グレリンの成長ホルモンと体重に関する効果

グレリン投与群(CHF-グレリン群と Sham-グレリン群)において、Placebo 投与群(CHF-Placebo 群と Sham-Placebo 群)と比較して有意に GH 及び IGF-I が上昇していた。体重に関しては、全体的に Placebo 投与群よりもグレリン投与群で、体重の増加が有意多く、特に CHF-Placebo 群では 3 週間の体重増加率が 3%と障害されているのに対して、CHF-グレリン群では 10% であり、Sham-Placebo 群の 11% と同等まで改善した。CHF-Placebo 群では muscle/bone 比が著しく低かったが(cachexia を示唆する所見)、CHF-グレリン群では、muscle/bone 比が保たれていた。

2) 血行動態および左室形態に関するグレリンの効果

CHF-グレリン群では CHF-Placebo 群に比し、心拍出量 (315 ± 49 vs 216 ± 31 mL \cdot min⁻¹ \cdot kg⁻¹)、一回駆出量、左室 dP/dt_{max} (5738 ± 908 vs 4363 ± 973 mmHg/s) が有意に増加し、さらに左室拡張末期圧、左室 dP/dt_{min} は有意に低値であった。CHF-グレリン群で、非梗塞部にあたる左室後壁の拡張期の厚さは、CHF-Placebo 群に比し有意に増加しており、左室拡張末期径は有意な減少を示し、リモデリングを抑制した。左室後壁の肥厚と左室拡張末期径の縮小に伴い、左室への拡張期、収縮期の wall stress は共に著明に減少した。単離心筋細胞に対するグレリンの直接作用の検討では、心筋収縮作用は見られなかった。

D. 考察

本研究によって、慢性心不全ラットに対するグレリンの慢性投与が、心不全に伴う cachexia を改善して、体重の増加率をほぼ正常に回復さ

せる事が証明された。一般的に心不全患者においては、体液貯留に伴う体重増加を認めるが、今回グレリン投与による心不全ラットの体重増加が、体液量増加よりむしろ筋重量を増加による事が明らかとなった。グレリンが cardiac cachexia の病態 (異化亢進状態) を改善させた機序としては、第 1 に cardiac cachexia では、GH/IGF-I の不均衡により同化が阻害され異化亢進状態となっているため、グレリン投与により GH/IGF-I の均衡を保つことで、心悪液質が改善される可能性がある。第 2 に、血行動態の改善が心悪液質の基盤にあるサイトカインの増加を減少させ、cachexia を是正する可能性が考えられる。第 3 に、グレリンのこれまでの摂食やエネルギーに関する知見より、直接的に cachexia の異化亢進状態を改善する可能性が考えられた。

グレリンの慢性心不全の血行動態改善作用については、大きく GH に依存する作用と依存しないグレリン単独の作用が考えられる。GH の心不全に対する作用については、主に IGF-I を介する作用であるとする報告が多く、本研究においてもグレリン投与群で GH の上昇と共に IGF-I が増加していることが確認されている。IGF-I は一酸化窒素(NO)の合成を介して血管拡張作用を示すとされ、一方 GH は筋小胞体の Ca²⁺-ATP を調節し、心筋の収縮力を増強する。さらに、GH 投与にて拡張型心筋症や梗塞後心不全患者の心筋の重量、壁厚が増すことが知られているため、血管拡張作用の一部や左室形態の変化、心拍出量の増大については、GH/IGF-I 介する作用と考えられる。一方、グレリンのレセプターである GH secretagogue receptor (GHS-R) は心臓や血管にも存在し、その GHS-R を刺激することで下垂体摘出ラットの心筋の再灌流障害を減弱する報告から、グレリンが心血管系に直接働いている可能性がある。実際、今回 GH 欠損ラットにグレリンを投与したところ、野生型ラットと同様に血管拡張作用が認められた。

さらに、健常人に対して、グレリンの経静脈投与は、IGF-Iの上昇を伴わない血管拡張作用を認めている。以上をまとめると、グレリンがGH/IGF-Iと独立した直接作用も有すると考えられた。

E. 結論

グレリンの慢性皮下投与は、心不全ラットの左心不全を改善し、左室リモデリングの進行を減弱した。さらに、重度の心不全により生じる著明な羸瘦、いわゆる cachexia の進行を減弱した。グレリンは強力な GH 分泌作用を介して、またグレリン独自の心血管作用、摂食作用、エネルギー代謝改善作用を介して、心不全の心機能改善、およびそれに伴う低栄養状態の是正に重要な役割を担っている可能性が示唆された。グレリンは従来から存在する心不全治療薬とは全く異なった作用を有することから、重症慢性心不全の新たな治療薬として期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① N. Nagaya, M. Uematsu, M. Kojima, Y. Ikeda, F. Yoshihara, W. Shimizu, H. Hosoda, Y. Hirota, H. Ishida, H. Mori, K. Kangawa. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation*, 104:1430-1435,2001
- ② N. Nagaya, M. Uematsu, M. Kojima, Y. Date, M. Nakazato, H. Okumura, H. Hosoda, W. Shimizu, M. Yamagishi, H. Oya, H. Koh, C. Yutani, K. Kangawa. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation*, 104: 2034-2038, 2001
- ③ N. Nagaya, K. Miyatake, M. Uematsu, H. Oya, W. Shimizu, H. Hosoda, M. Kojima, N. Nakanishi, H. Mori, K. Kangawa. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 5854-5859, 2001
- ④ H. Kaiya, M. Kojima, H. Hosoda, A. Koda, K. Yamamoto, Y. Kitajima, M. Matsumoto, Y. Minamitake, S. Kikuyama, K. Kangawa. Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J. Biol. Chem.*, 276: 40441-40448, 2001
- ⑤ M. Matsumoto, H. Hosoda, Y. Kitajima, N. Morozumi, Y. Minamitake, S. Tanaka, H. Matsuo, M. Kojima, Y. Hayashi, K. Kangawa. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287: 142-146, 2001
- ⑥ H. Ariyasu, K. Takaya, T. Tagami, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Suda, T. Koh, K. Natsui, S. Toyooka, G. Shirakami, T. Usui, A. Shimatsu, K. Doi, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 4753-4758, 2001
- ⑦ M. Matsumoto, Y. Kitajima, T. Iwanami, Y. Hayashi, S. Tanaka, Y. Minamitake, H. Hosoda, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa. Structural similarity of ghrelin derivatives to peptidyl growth hormone secretagogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284: 655-659, 2001
- ⑧ Y. Hataya, T. Akamizu, K. Takaya, N. Kanamoto, H. Ariyasu, M. Saijo, K. Moriyama, A. Shimatsu,

M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 4552, 2001

- ⑨ S. Lu, J. L. Guan, Q. P. Wang, K. Uehara, S. Yamada, N. Goto, Y. Date, M. Nakazato, M. Kojima, K. Kangawa, S. Shioda. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci. Lett.*, 321: 157-160, 2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

生活習慣病および老化におけるグレリンの臨床的意義と診断治療への応用

分担研究者 中尾一和(京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科 教授)

ヒトにおけるグレリンの分泌調節をエネルギー調節の観点より検索し、種々の組織におけるグレリンの発現を検討した。ヒトにおいてグレリンは胃において最も多く発現しており、血漿グレリンは主として胃に由来することが明らかになった。血漿グレリン濃度は 12 時間絶食で 30%増加し、摂食によって 20%の低下を示した。神経性食欲不振症患者において血漿グレリン濃度は約 2 倍に増加しており、body mass index (BMI)と負の相関を示し、グレリンは急性および慢性の摂食状況を反映して分泌されることが明らかになった。また、ヒトにおいてグレリンは GH 分泌に関し、GHRH と相乗的に作用することが示された。さらに、グレリンは甲状腺髄様癌組織において発現が認められ、甲状腺におけるグレリンのオートクリン・パラクリン作用が示唆された。

A. 研究目的

生活習慣病は高齢者の quality of life(QOL)を損なう最大の要因の一つであり、その克服は、高齢化社会を目前にした我が国の医療における緊急の課題である。高血圧、糖尿病、高脂血症および、動脈硬化を基盤とする心疾患や脳卒中などの疾患の発症と進展には、肥満やインスリン抵抗性といった共通の基盤が関与し、狭義の生活習慣病の一群を形成するが、従来、これらの疾患と成人成長ホルモン(GH)欠損症の症候との類似性が指摘されてきた。実際、GH は小児の成長のみならず、成人においても脂質代謝や体組成に関与することが近年明らかとなっており、生活習慣病の成因や治療における GH の臨床的意義が議論されている。グレリンは GH secretagogue(GHS)受容体の内因性リガンドであり、その作用の少なくとも一部は GH の作用を介すると考えられ、GH と同様に種々の疾患に対する臨床応用が期待される。また、申請者らはすでにグレリンが GH 分泌刺激とは独立して、

摂食行動に関与することも報告しており、その他、グレリンが心血管系に対する直接作用や脂肪蓄積作用を有することより、グレリン固有の臨床的意義も注目される。これらのことをふまえ、本研究では生活習慣病および老化におけるグレリンの臨床的意義の解明と臨床への応用を目指す。今年度は、ヒトにおけるグレリンの分泌調節を特にエネルギー代謝の観点より検討するとともに、種々の組織におけるグレリンの発現および分泌を検索し、グレリンの生理学的・病態生理学的意義を検討した。本研究ではこれらのことを通じて、老化や生活習慣病におけるグレリンの臨床応用を検討し、来るべき高齢化社会における国民の健康と QOL の改善に寄与することを目指すとともに、種々の疾患に対する診断および治療への、グレリンのさらに広い応用の可能性を探る。

B. 研究方法

ヒトにおけるグレリンの分泌調節

血漿グレリンの由来する組織を検索するため、ノーザンブロット法によってヒト各組織におけるグレリンの発現を検討し、13名の胃切除患者の血漿グレリン濃度を測定した。また、グレリンの分泌調節におけるエネルギー代謝の関与を検索する目的で、種々の摂食状況における血漿グレリン濃度を測定した。10名の健常ボランティアにおいて、12時間の絶食前後、朝食および昼食前後の血漿グレリン濃度を検討したほか、長期摂食制限のモデルとして、31名の神経性食欲不振症患者の血漿グレリン濃度を測定し、年齢および性をマッチした対照群と比較した。血漿グレリン濃度の測定はラジオイムノアッセイ(RIA)法によって行った。さらに、グレリンのGH分泌刺激作用におけるGHRH(GH分泌刺激ホルモン)の関与を検索するため、健常ボランティア4名において、グレリンおよびGHRHを静脈内に同時投与し、経時的に採血をしてそのGH濃度を測定し、グレリン単独またはGHRH単独による効果と比較した。

種々の組織におけるグレリンの発現

種々の組織および培養細胞株におけるグレリンの発現を、RT-PCR法、ノーザンブロット法、RIA法などで検討した。また、特に甲状腺におけるグレリンの生理学的・病態生理学的意義を検討するため、甲状腺濾胞腺癌および髄様癌組織におけるグレリン濃度を検討した。また、髄様癌患者における血漿グレリン濃度を検索し、ヒト髄様癌細胞株(TT細胞)でのグレリンの発現をmRNAおよびペプチドのレベルで検索した。さらにTT細胞の培養液中への活性型(アシル化)グレリンの分泌を検討した。

グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの作成および解析

種々のプロモーターの下流にマウスグレリンcDNAを結合したコンストラクトを作成し、マウス受精卵前核にマイクロインジェクションしてグレリン過剰発現トランスジェニックマウス

の作成を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトを対象とした研究では、ヘルシンキ宣言を遵守し、常に安全性とプライバシーの保護を確認しつつ施行した。また、動物を扱う際にはその愛護に留意し、手術や屠殺の際に苦痛を最小限にとどめるなどの配慮を行った。

C. 研究結果

ヒトにおけるグレリンの分泌調節

ヒト各組織のRNAを用いたノーザンブロット解析では、グレリンは胃に最も多く発現しており、十二指腸、空腸などにも少量の発現が認められた。胃切除患者において血漿グレリン濃度は対照群に比べ、約35%に低下していた。

12時間絶食によって血漿グレリン濃度は約30%増加し、朝食や昼食の摂取によって約20%の低下を示した。神経性食欲不振症患者において血漿グレリン濃度は約2倍に増加しており、その値は、body mass index (BMI)と負の相関を示していた($r = -0.57$)。最も低いBMIを示す症例では、血漿グレリン濃度は対照群の約7倍にも及んでいた。また、それらの値は栄養治療によって急速に低下することが明らかになった。血漿グレリン濃度の低下は、BMIの改善が軽微な段階で認められた。一方、健常人において、グレリン $0.08 \mu\text{g/kg}$ およびGHRH $1.0 \mu\text{g/kg}$ の単独投与によるGHの頂値はそれぞれ、 5.5 ng/ml および 19.2 ng/ml であったが、これらの同時投与によるそれは、 62.0 ng/ml であり、グレリンおよびGHRH単独によるGHの頂値の和の2.5倍に達していた。

種々の組織におけるグレリンの発現

RT-PCR解析によってヒト甲状腺組織においてグレリンmRNAを検出した。また、甲状腺濾胞癌組織においてグレリンは検出されなかったが、甲状腺髄様癌組織中において、グレリンは約 10 fmol/ml の濃度で検出された。髄様癌患者の血漿グレリン濃度は対照群と比較して変化を示さな

かった。ヒト髄様癌細胞株(TT cell)の培養液中にも高濃度で活性型(アシル化)グレリンが検出されることおよび、その濃度は経時的に増加することが示された。

グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの作成および解析

グレリン遺伝子過剰発現トランスジェニックマウスを得た。現在種々の組織におけるグレリンの発現を検索するとともに、その表現型を検討している。

D. 考察

ヒトにおけるグレリンの分泌調節

ヒトにおいて血漿グレリンは主として胃に由来するものであることが示された。また、血漿グレリンは絶食によって増加し、摂食によって低下することおよび、神経性食欲不振患者がきわめて高い血漿グレリン濃度を示していることより、グレリンは、慢性および急性の摂食状況を反映して分泌されると考えられる。前年度に申請者らがラットにおいて証明したように、グレリンが強力な摂食亢進作用を有することとあわせて考えると、これらのことは、グレリンがエネルギー代謝に関与することを示唆するものである。神経性食欲不振患者において認められた BMI と血漿グレリン濃度の逆相関はこれを支持する。また、神経性食欲不振患者における血漿グレリン濃度の増加は、従来その機序が不明であった、この疾患における血清 GH の増加を説明するものである可能性がある。さらに、申請者らは、ヒトにおいてグレリンが GH 分泌刺激において GHRH と相乗的に作用することを示し、人工化合物である growth hormone secretagogue (GHS)でのみ報告されていたことを内因性のホルモンであるグレリンで明確に証明した。グレリンの GH 分泌刺激作用は培養下垂体細胞においてより、*in vivo* において強力であり、GHRH 受容体欠損症の患者においては GHS

による GH 分泌亢進作用が認められないことなどを考えると、生体内においてグレリンは GHRH と synergic に作用して GH の分泌を亢進していることおよび、その作用部位の 1 つが視床下部であることが考えられる。また、申請者らは、甲状腺髄様癌組織および、髄様癌培養細胞株(TT 細胞)においてグレリンの発現を認めた。TT 細胞においては培養液中に活性型(アシル化)グレリンの分泌を確認した。しかしながら髄様癌患者の血漿にグレリンの高値は認められなかった。これらのことは、髄様癌の発生母体である甲状腺 C 細胞においてもグレリンが発現・分泌していることおよび、甲状腺におけるオートクリン・パラクリン作用を示唆するものである。

E. 結論

ヒトにおいて血漿グレリンが主として胃に由来するものであること、血漿グレリン濃度が急性および慢性の摂食状態を反映するものであることを明らかにした。さらに、グレリンが GH 分泌に関して GHRH と相乗的に作用することおよび、甲状腺髄様癌においてグレリンが産生、分泌されていることを明らかにした。また、グレリン過剰発現トランスジェニックマウスを作出した。

F. 健康危険情報

ヒトを対象にした研究では、被験者に特記すべき健康上の問題は全く発生していない。また、種々の動物実験および *in vitro* 実験を施行するにあたって、実験者における健康障害または事故は皆無であった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Ariyasu H., Takaya K., Tagami T., Ogawa Y., Hosoda K., Akamizu T., Suda M., Koh T., Natsui K., Toyooka S., Shirakami G., Usui T.,

- Shimatsu A., Doi K., Hosoda H., Kojima K., Kangawa K., Nakao K.
Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans.
J Clin Endocrinol Metab, 86:4753-8.2001
- ②Hataya Y., Akamizu T., Takaya K., Kanamoto N., Ariyasu H., Saijo M., Moriyama K., Shimatsu A., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.
A Low Dose of Ghrelin Stimulates Growth Hormone (GH) Release Synergistically with GH-Releasing Hormone in Humans.
J Clin Endocrinol Metab, 86:4552-4555.2001
- ③Kanamoto N., Akamizu T., Hosoda H., Hataya Y., Ariyasu H., Takaya K., Hosoda K., Saijo M., Moriyama K., Shimatsu A., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.
Substantial Production of Ghrelin by a Human Medullary Thyroid Carcinoma Cell Line.
J Clin Endocrinol Metab, 86:4984-4990, 2001
2. 学会発表
- ①Ariyasu H., Takaya K., Tagami T., Mori K., Komatsu Y., Ogawa Y., Hosoda K., Akamizu T., Usui T., Shimatsu A., Doi K., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.
Plasma ghrelin levels are influenced by acute and chronic feeding states in humans.
The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting, Denver, June 20-23, 2001.
- ②Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., Takaya K., Hosoda K., Hayashi T., Inoue G., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.
Ghrelin, a novel orexigenic peptide, antagonizes leptin action: Involvement of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway.
The Endocrine Society's 83rd Annual Meeting, Denver, June 20-23, 2001.
- ③Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., Takaya K., Hosoda K., Hayashi T., Inoue G., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.
Ghrelin is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 pathway. The American Diabetes Association 61th Scientific Sessions
- ④Kanamoto N., Akamizu T., Hosoda H., Hataya Y., Ariyasu H., Takaya K., Hosoda K., Saijo M., Moriyama K., Shimatsu A., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.
Production of a novel peptide ghrelin by a human medullary thyroid carcinoma cell Line. 73rd Annual Meeting of the American Thyroid Association, Washington DC, September 13-16, 2001
- ⑤高屋和彦, 有安宏之, 小川佳宏, 細田公則, 赤水尚史, 臼井健, 島津章, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.
ヒトにおけるグレリンの作用. 第 74 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 6.29-7.1, 2001
- ⑥有安宏之, 高屋和彦, 臼井健, 田上哲也, 白神豪太郎, 金本巨哲, 旗谷雄二, 赤水尚史, 島津章, 細田洋司, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.
グレリンのヒトにおける遺伝子発現分布と種々の病態におけるグレリンの血中濃度の検討. 第 74 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 6.29-7.1, 2001
- ⑦新谷光世, 小川佳宏, 海老原健, 阿部恵, 宮永史子, 高屋和彦, 細田公則, 林達也, 井上元, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.
グレリンの中枢性摂食調節作用の分子機構. 第 74 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 6.29-7.1, 2001
- ⑧吉本明宏, 森潔, 菅原照, 向山政志, 八幡兼成,

菅波孝祥, 榎野久士, 永江徹也, 高屋和彦, 細田洋司, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.

ヒト及びマウスの血液中、腎組織中の ghrelin 濃度と腎疾患における病態生理学的意義に関する検討第 74 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 6.29-7.1, 2001

- ⑨旗谷雄二, 赤水尚史, 高屋和彦, 金本巨哲, 有安宏之, 西條美佐, 服部喜之, 森山賢治, 細田公則, 島津章, 細田洋司, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.

健常人におけるグレリンと成長ホルモン刺激ホルモン(GHRH)との併用投与. 第 74 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 6.29-7.1, 2001

- ⑩金本巨哲, 赤水尚史, 旗谷雄二, 有安宏之, 西條美佐, 服部喜之, 森山賢治, 高屋和彦, 細田公則, 島津章, 細田洋司, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.

甲状腺髄様癌由来細胞におけるグレリン発現に関する検討, 第 74 回日本内分泌学会学術総会. 横浜, 6.29-7.1, 2001

- ⑪有安宏之, 高屋和彦, 田上哲也, 白神豪太郎, 金本巨哲, 旗谷雄二, 赤水尚史, 臼井健, 島津章, 細田洋司, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.

ヒトにおける血漿グレリンの由来組織と種々の摂食状態におけるグレリン血中濃度の検討. 第 28 回日本神経内分泌学会, 東京, 10.26-27, 2001.

- ⑫新谷光世, 小川佳宏, 海老原健, 高屋和彦, 細田公則, 林達也, 井上元, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.

摂食調節におけるグレリンの影響. 第 44 回日本糖尿病学会年次学術集会, 京都, 4.16-18, 2001

- ⑬旗谷雄二, 赤水尚史, 高屋和彦, 金本巨哲, 有安宏之, 西條美佐, 森山賢治, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.

グレリンは GHRH と相乗的に成長ホルモン分泌を刺激する. 第 38 回日本臨床分子医学会, 札幌, 8.2-3, 2001

- ⑭金本巨哲, 赤水尚史, 旗谷雄二, 西條美佐,

森山賢治, 島津章, 宮内昭, 細田洋司, 児島将康, 寒川賢治, 中尾一和.

甲状腺髄様癌におけるグレリン発現, 産生に関する検討. 第 44 回日本甲状腺学会, 沖縄, 11.8-10, 2001.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

無麻酔無拘束ラットの脈動的成長ホルモン分泌形成における 末梢血中グレリンの意義に関する研究

分担研究者 千原和夫 (神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科学教室 教授)

下垂体から成長ホルモン(GH)は脈動的に分泌される。末梢血中グレリンの脈動的 GH 分泌に果たす役割を明らかにするため、以下の検討を行なった。無麻酔無拘束ラットの右心房に留置したカニューレから採血し、血漿グレリン値を測定したところ、採血時刻に関わらず、血漿グレリン値に変動は認められなかった。同一ラットにおいて、血漿 GH 値とグレリン値を測定したとき、血漿 GH 高値(100 ng / ml 以上)の時点と、低値(10 ng / ml 以下)の時点における血漿グレリン値は、N 端グレリン測定系でも C 端グレリン測定系でも差が認められなかった。これらの成績は、末梢血中グレリンは GH の脈動的分泌パターンを規定する主たる因子ではないことを示唆している。一方、グレリン作用を抑制する GH secretagogue (GHS) 拮抗薬 [D-Lys-3]-GHRP-6 を投与しても、GH の脈動的分泌は保たれていた。しかし、GH 頂値は有意差は認められないものの低下傾向を示した。以上の成績から、胃で産生され循環血液を介して下垂体に到達するグレリンが GH の脈動的分泌に大きな役割を果たしているとは考えがたい。しかし、GHRH の GH 分泌リズム形成作用に対し、グレリンはその作用を増強する方向で働いている可能性は現在のところ完全には否定できない。

A. 研究目的

下垂体からの成長ホルモン(GH)分泌は、睡眠、ストレス、運動などの要因、ブドウ糖、脂肪酸、アミノ酸などの栄養的因子、さらに神経伝達物質、神経ペプチドなどによって影響を受ける。これらの因子は、最終的には GH 放出ホルモン(GHRH)と GH 分泌抑制性のソマトスタチン(SRIF)の2つの視床下部ホルモンの分泌を変動させることによって、GH 分泌に影響を与えたと考えられてきた。

生理的状況下では GH は下垂体から脈動的に分泌される。この現象はヒトにおいても観察されるが、雄性ラットにおいて著明であり、この GH の脈動的分泌は、GHRH、SRIF の分泌とそれらを制御する GH のフィードバック機構によ

って制御されていることがこれまでの実験成績から明らかになっている。

胃を主な産生部位とするグレリンは、外因性に投与した場合、成長ホルモン分泌を促進するが、末梢血中に存在するグレリンが脈動的 GH 分泌に影響を及ぼしているか否かはこれまでのところ明らかではない。そこで、今回、無麻酔無拘束ラットの脈動的 GH 分泌にグレリンが関与するか否か検討した。

B. 研究方法

無麻酔無拘束ラットの作製

9 週齢のウィスター系雄性ラットの腹腔内にペントバルビタール(50mg/kg)を投与し、麻酔下で右心房内に採血・薬物投与用カニューレを埋

め込み留置した。術後1週間目に以下の実験を行なった。

無麻酔無拘束ラットにおけるグレリン分泌の測定

11:00、13:30、16:00に、無麻酔無拘束ラットの右心房に留置したカニューレから、グレリン測定用として1ml採血し、直ちにEDTA・アプロチニンと混和した後、血漿を分離し、グレリン抽出まで-70℃で保存した。グレリンの抽出はAriyasu, Hosodaらの方法(Ariyasu, H. et al, J Clin Endocrinol Metab 86:4753-4758, 2001)でおこない、実際の測定は細田博士(国立循環器病センター)に依頼した。

無麻酔無拘束ラットにおける脈動的 GH 分泌と末梢血中グレリン値の相関

10:30より30分おきに、無麻酔無拘束ラットの右心房に留置したカニューレから0.3ml血液を採取し、直ちに血漿を分離し-70℃で保存した。ラットGHスタンダードとしてNIAMDD-RP2を使用した点を除いて、既報のRIA法(Sato et al. Neuroendocrinology 50:139-151,1989)に従って、後日GHを一括測定した。同一のラットより、グレリン測定用として、11:00、13:30、15:30に1ml採血し、直ちにEDTA・アプロチニンと混和した後、血漿を分離し、グレリン抽出まで-70℃で保存した。

GHS拮抗薬[D-Lys-3]-GHRP-6の血漿GH値に及ぼす効果

9:00より30分おきに、無麻酔無拘束ラットから血液を採取しGH分泌リズムを観察した。GHS拮抗薬処置群には、13:00からは30分おきにGH測定用採血終了後にGHS拮抗薬[D-Lys-3]-GHRP-6を750ngずつ投与した。対照群には、生理的食塩水を同量投与した。血液採取後、血漿を分離しGHを測定、[D-Lys-3]-GHRP-6のGH分泌に及ぼす効果について検討した。

検定法

2群間の比較にはMann-WhitneyのU検定を使

用した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、実験動物に対する本学倫理規定を遵守し、実験動物の苦痛を軽減するため麻酔等の処置を施し、動物愛護に努めた。

C. 研究結果

無麻酔無拘束ラットにおける末梢血中グレリン値

生物活性を有するグレリンを認識するN端測定系では、 23.7 ± 1.87 pM(平均値 \pm 標準誤差、 $n=22$)であり、総グレリンを認識するC端測定系では 219.8 ± 11.4 pMであった。血漿グレリンは明確な変動を示さなかった。

無麻酔無拘束ラットにおける脈動的 GH 分泌と末梢血中グレリン値の相関

無麻酔無拘束ラットでは脈動的GH分泌が認められ、そのGH頂値は 154.1 ± 46.9 ng/ml、底値は 3.8 ± 0.95 ng/mlであった($n=5$)。ラット血漿GH値が100ng/ml以上であったときの血漿グレリン値($n=5$)と、10ng/ml以下のときのそれ($n=6$)を比較すると、N端測定系ではそれぞれ 21.6 ± 8.5 、 16.5 ± 4.5 pM(平均 \pm 標準誤差)であり、両群に有意差は認められなかった。C端測定法を使用したときも、それぞれ 315.5 ± 67.5 、 342.1 ± 29.8 pMであり、両群間に差を認めなかった。

GHS拮抗薬[D-Lys-3]-GHRP-6の血漿GH値に及ぼす効果

同一ラットを用いて検討したところ、GHS拮抗薬[D-Lys-3]-GHRP-6投与前に認められたGHの脈動的分泌は、[D-Lys-3]-GHRP-6投与後も観察された。[D-Lys-3]-GHRP-6投与群と対照群のGH頂値を比較する際、ラットによりGH頂値をとる時刻は異なるので、[D-Lys-3]-GHRP-6投与後に観察された最高値を頂値として、対照群のそれと比較した。その値は[D-Lys-3]-GHRP-6投与群では 332.2 ± 194.4 ng/ml、対照群では

224.1 ± 87.0 ng/ml であり、[D-Lys-3]-GHRP-6 により低下する傾向はみられるものの有意差は認められなかった。

D. 考察

無麻酔無拘束ラットにおいて、約 3 時間周期の脈動的 GH 分泌が観察される。この脈動的 GH 分泌に血中グレリンが同期するか否かはグレリンの GH 分泌における役割を理解する上で重要である。当初、GH のリズムを検討する時と同様に、30 分間隔でグレリン測定用血液を採取しようとしたが、グレリン測定用に 1ml の血液をラットから採取すると、血漿を分離した後、血球浮遊液をラット静脈内に返しても、しだいに GH の脈動的分泌は抑制されることが予備実験で観察された。そこで、採血量を減らすため、通常 GH 分泌の頂値、底値およびその中間値を示すことが多い 3 時点において、無麻酔無拘束ラットから採血しグレリン値を測定した。いずれに時点でも、血漿グレリン値に大差はなく、全測定結果を合算しても、血漿グレリンの標準誤差は平均値の 10% 以内であり、GH と異なり変動に乏しいことが明らかとなった。

ついで、無麻酔無拘束ラットで血漿 GH の脈動的分泌の検討を行なう一方、グレリン測定用採血を同一ラットにおいて 3 時点で併せて行ない、GH 値の高低とグレリン値が関連するかを検討した。血漿 GH 値 100 ng/ml 以上の時点と、10 ng / ml 以下の時点におけるグレリン値を比較したが、N 端グレリン測定系でも C 端グレリン測定系でも両者の間に差は認められなかった。これらの成績は、末梢血中グレリンは GH の脈動的分泌を形成する主な因子ではないことを示唆している。

さらに、末梢血中グレリンの GH 分泌における意義を明らかにするため、GHS 拮抗薬[D-Lys-3]-GHRP-6 を使用した。13 : 00 に[D-Lys-3]-GHRP-6 を投与し、個々のラットにおいて、そ

の前後で脈動的な GH 分泌に影響がみられるか検討したが、いずれのラットにおいても、脈動的 GH 分泌は保たれていた。しかし、[D-Lys-3]-GHRP-6 投与により、GH 頂値は有意差は認められないものの低下傾向を示した。[D-Lys-3]-GHRP-6 使用量は下垂体細胞初代培養系におけるグレリンの活性を抑制する[D-Lys-3]-GHRP-6 量を基に算出したが、培養系と *in vivo* では条件が異なり単純に比較することは困難である。そこで、実験終了時に個々のラットにグレリンを投与し、その GH 分泌促進効果を検討したが、自然の GH 分泌リズムが存在するため評価が困難であった。

私どもは、これまで下垂体からの GH 分泌について検討を行ってきた。GHRH の抗血清をラットに投与すると、GH の脈動的分泌はまったく認められなくなることから、GHRH がこれを規定する因子であることを報告した。末梢血中グレリン値は血漿 GH 値の高低に関連しないことから、胃で産生され循環血液を介して下垂体に到達するグレリンが GH の脈動的分泌に大きな役割を果たしているとは考えがたい。一方、[D-Lys-3]-GHRP-6 はグレリン抑制活性が弱く、グレリン活性の抑制が不十分である可能性があるにもかかわらず、[D-Lys-3]-GHRP-6 を投与した際、GH 頂値が低下傾向を示した点には留意する必要がある。グレリン活性の抑制効果の強い拮抗薬、抗血清を使用した実験では、GH の脈動的分泌は消失しないまでも、その頂値が低下する可能性もあるかもしれない。すなわち、GH 分泌に対して、GHRH の GH 分泌リズム形成作用に対し、末梢血中グレリンはその作用を増強する方向で働いている可能性は現在のところ完全には否定できないと考えられる。

E. 結論

GH の脈動的分泌とは異なり、血漿グレリン値に経時的変動は認められなかった。しかし、

GHS 拮抗薬[D-Lys-3]-GHRP-6 を投与したとき、GH の脈動的分泌は保たれていたが、GH 頂値は、有意差は認められないものの低下傾向を示した。以上の成績から、胃で産生され循環血液を介して下垂体に到達するグレリンが GH の脈動的分泌に大きな役割を果たしているとは考えがたい。一方、GHRH の GH 分泌リズム形成作用に対し、グレリンはその作用を増強する方向で働いている可能性を現在のところ完全には否定できない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Murata M., Okimura Y., Iida K., Matsumoto M., Sowa H., Kaji H., Kojima M., Kangawa K., Chihara K.
Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells.
J Biol Chem, 277:5667-5674, 2002
- ②Kaji H., Kishimoto M., Kirimura T., Iguchi G., Murata M., Yoshioka S., Iida K., Okimura Y., Yoshimoto Y., Chihara K.
Hormonal regulation of the human ghrelin receptor gene transcription. Biochem Biophys Res Commun, 284:660-666,2001

2. 学会発表

- ①村田雅弘、置村康彦、飯田啓二、加治秀介、寒川賢治、千原和夫.
ghrelin はヒト肝癌細胞 HepG2 においてインスリンシグナルを調節する。
第 74 回日本内分泌学会学術総会,2001

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし