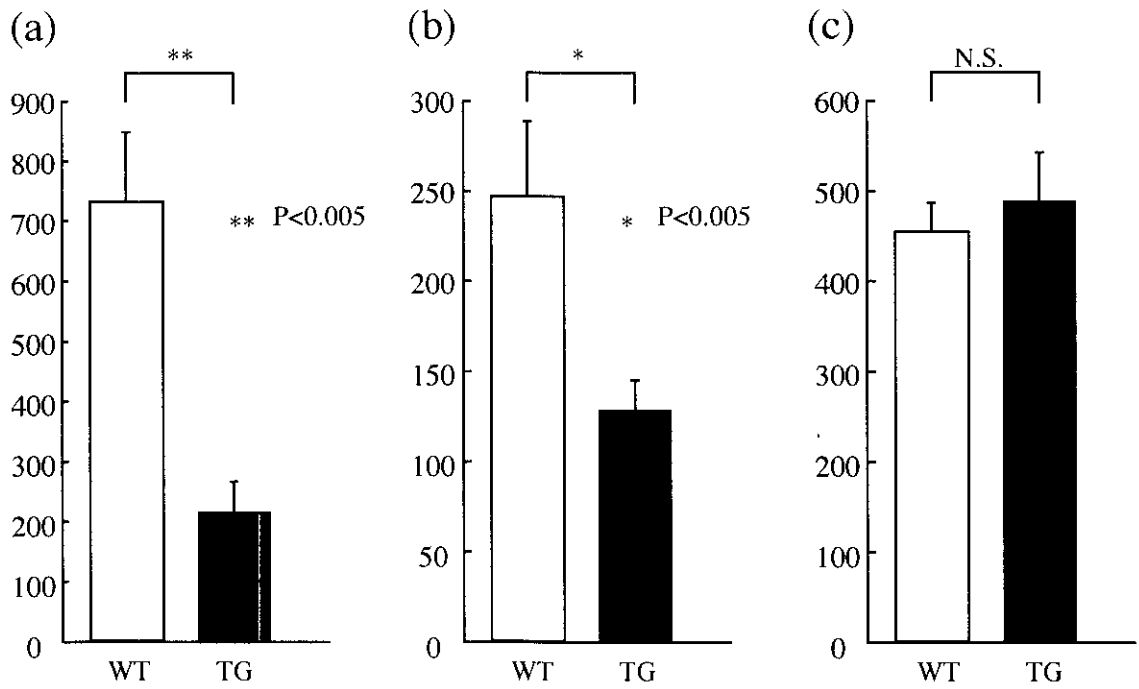


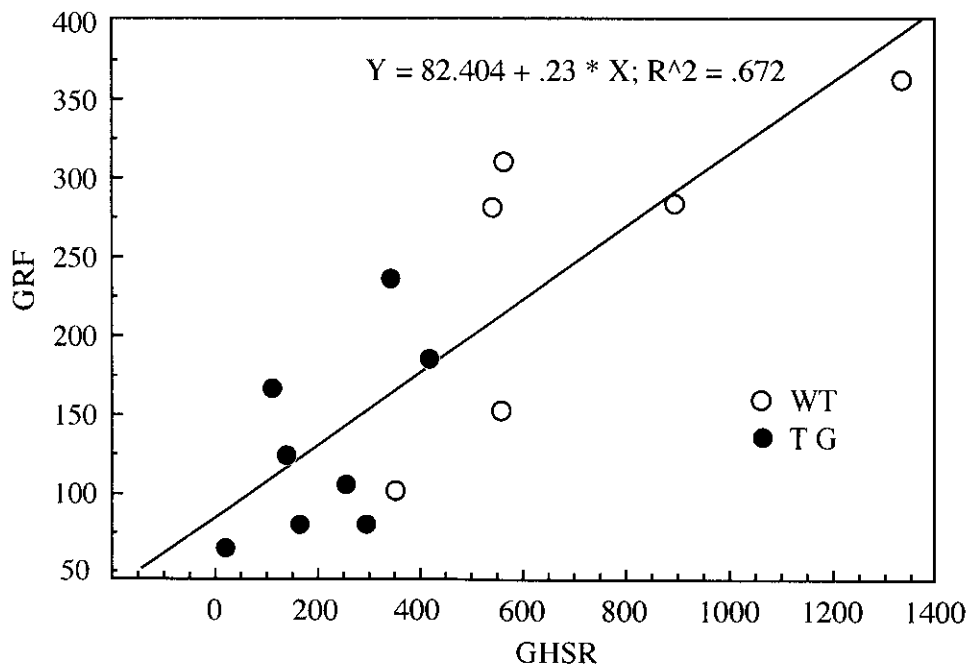
- Induction of *c-fos* messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology*, 138: 771-777, 1997.
11. Thomas G B, Fairhall K M, Robinson I C A F. Activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by the growth hormone (GH) secretagogue, GH-releasing peptide-6, in rats. *Endocrinology*, 138: 1585-1591, 1997.
12. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402: 656-660, 1999.
13. Korbonits M, Kaltsas G, Perry L A, Putignano P, Grossman A B, Besser G M, Trainer P J. The growth hormone secretagogue hexarelin stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis via arginine vasopressin. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 2489-2495. 1999.
14. Wren A M, Small C J, L, W H, Murphy K G, Dakin C L, Taheri S, Kennedy A R, Roberts G H, Morgan D G, Ghatei M A et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141: 4325-4328, 2000.
15. Shuto Y, Shibasaki T, Wada K, Parhar I, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R): evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life Sci*, 68: 991-996, 2001.
16. Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest*, 109: 1429-1436, 2002.
- G. 研究発表
1. 論文発表
- ① Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest*, 109: 1429-1436, 2002.
2. 学会発表
- ① 小田切あすか、周東祐仁、杉原仁、芝崎保。Growth hormone secretagogue (GHS) 受容体アンチセンス発現トランスジェニックラットにおける GHS-R、NPY、GRF の発現について。第 75 回日本内分泌学会学術総会、6. 28-30, 2002.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
- 研究協力者
小田切あすか（日本医科大学
第二生理・助手）

図1



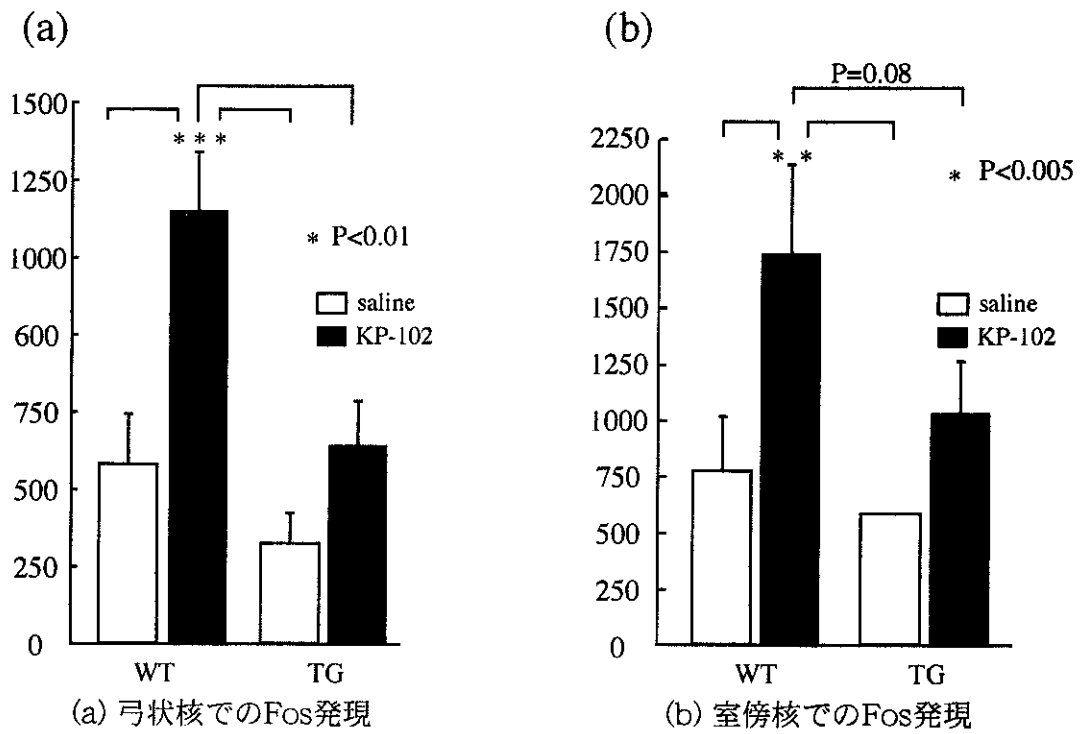
TG ラット、WTラットにおけるGHS-R (a)、GRF (b)、NPY (c)陽性細胞数

図2



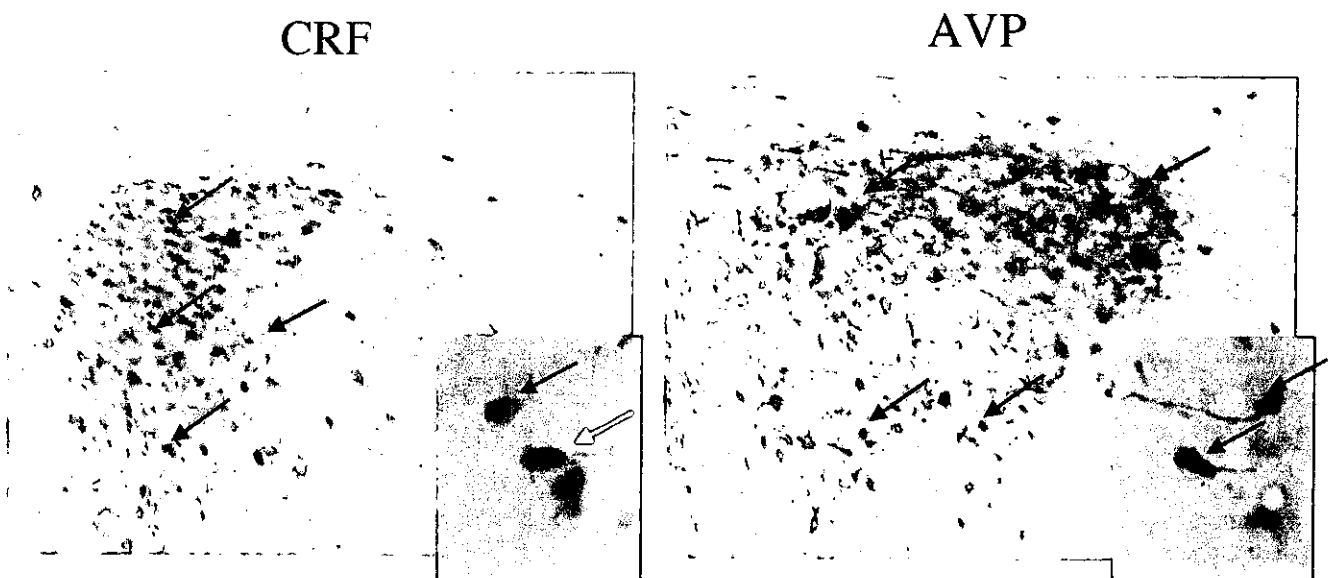
GHS-R陽性細胞数とGRF陽性細胞数の関連関係

図3



TG ラット、WTラットにおけるKP-102投与による視床下部でのFos発現

図4



KP-102投与によるFos発現陽性細胞のCRF、AVPとの二重免疫染色

卵巣機能におけるグレリンの意義に関する研究

分担研究者 宮本 薫（福井医科大学第二生理学 教授）

卵巣機能は、GHやIGF-Iなどによっても大きな影響を受けていることは良く知られている。本研究では卵巣機能におけるグレリンの役割を、ラット卵巣顆粒膜細胞を用いた初代培養系で明らかにする。初年度では、基礎研究として、ラット卵巣顆粒膜細胞を用いてサブトラクシオンクローニングを行い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。また卵巣顆粒膜細胞にグレリン受容体が発現していることを明らかにしている。昨年度は、卵巣顆粒膜細胞におけるグレリンの直接あるいは間接作用を、DNAマイクロアレイを用いて解析した。本年度は、卵巣顆粒膜細胞におけるグレリンの直接あるいは間接作用を、卵胞発育に重要な遺伝子群を中心に real-time PCR を用いて解析した。

A. 研究目的

卵巣の機能は、基本的には脳下垂体からのゴナドトロピン分泌により調節を受けている。しかし、このゴナドトロピンの卵巣に対する作用は、様々な因子により修飾され微妙にコントロールされている。グレリンは脳下垂体からのGH分泌を促進する生理活性ペプチドホルモンとして同定されたが、末梢においては様々な直接作用を行っている可能性が示されている。一つにはグレリンの受容体が下垂体前葉ばかりでなく、様々な組織に発現していることがあげられる。私どもは卵巣顆粒膜細胞にグレリン受容体の遺伝子発現がみられることを明らかにしている。また、卵巣顆粒膜細胞の分化増殖に、IGF-Iが重要な役割を果たすことが知られている。私どもはIGF-Iが、ゴナドトロピン特にFSHと共同で卵巣顆粒膜細胞の分化を著しく促進する事を明らかにした。卵巣顆粒膜細胞の分化の指標ともなっているLH受容体の発現はIGF-I単独では促進されないもののFSHとの同時投与によ

り、受容体発現が著しく促進される。またFSH受容体に関しても、IGF-IはFSHと共同でその発現を大きく増大させる。またグレリンは神経細胞では、NGFI-Aの遺伝子発現を惹起すると報告されているが、卵巣においてもNGFI-Aをはじめとする増殖分化に関連する転写因子群がグレリンによって誘導されるかどうか興味ある点である。

本年度の研究では、サブトラクシオンクローニングにより卵胞発育に重要な遺伝子群を多数クローニングしていることから、それらの遺伝子群の発現をreal-time PCRを用いて定量化することで、グレリンによって誘導もしくは抑制される卵巣性の遺伝子群を同定した。

B. 研究方法

卵巣顆粒膜細胞に対するグレリンの作用を検討するため、以下の実験を行った。

- 1) グレリンによって卵巣顆粒膜細胞でどのような遺伝子発現の変化が生じるかを明らかにする

ため、DNA マイクロアレイの作成を行った。ラット卵巣顆粒膜細胞初代培養系を用いゴナドトロピン投与によって誘導もしくは抑制される遺伝子群をサブトラクションクローニングにより、6,000 クローン以上単離した。これらのクローンをスライドガラス上にスポットし、ラット卵巣顆粒膜細胞でゴナドトロピンにより誘導もしくは抑制される cDNA をもとにした DNA マイクロアレイを作成した。このマイクロアレイをスクリーニングすることでゴナドトロピン投与によって誘導もしくは抑制される遺伝子群を同定している。本年度は、このようにして同定したゴナドトロピン投与によって誘導もしくは抑制される遺伝子群が、グレリン処理によりどのように発現変化するかを real time PCR を用いて解析した。

2) 卵巣顆粒膜細胞をグレリンにより刺激した後、コントロールとして用いた無処理の卵巣顆粒膜細胞とともにそれぞれ、mRNA を抽出した。抽出した mRNA をそれぞれ、逆転写酵素により cDNA に変換したのちサイバーグリーンを用いた real time PCR で解析を行った。卵巣顆粒膜細胞は、卵胞の発育に伴って増殖分化する細胞系である。原始卵胞では顆粒膜細胞上には FSH 受容体のみが発現しているが、ゴナドトロピン刺激により顆粒膜細胞上に LH 受容体が発現してくる。In vitro の様々な条件下で卵巣顆粒膜細胞に発現する FSH 受容体、および LH 受容体を Northern ブロットにより定量した。特に IGF-I の投与による FSH 受容体、および LH 受容体の発現変化を Northern ブロット、核ランオンアッセイ、mRNA degradation assay 等を用いて詳細に検討した。

(倫理面への配慮)

ラット卵巣顆粒膜細胞の初代培養をおこなうため、幼若雌ラットを用いたが、ラットの取り

扱い、屠殺は NIH のガイドンスに基づき動物愛護の精神に反しないように取り行った。

C. 研究結果

グレリンの卵巣に対する直接作用を解析するため、ラット卵巣顆粒膜細胞に発現する遺伝子から構成される DNA マイクロアレイの作成を行った。卵巣顆粒膜細胞の増殖分化に関連する遺伝子群をピックアップするため、サブトラクションクローニングを行った。卵巣顆粒膜細胞をゴナドトロピンにより刺激した後、コントロールとして用いた無処理の卵巣顆粒膜細胞とともにそれぞれ、mRNA を抽出し逆転写酵素により cDNA を合成した。ハイブリダイゼーションにより、ゴナドトロピン処理を行った細胞からの cDNA からコントロールの細胞からの cDNA を差し引くことで、ゴナドトロピン誘導性の遺伝子群のサブトラクションクローニングを行った。一方、同様な手法でコントロールの細胞の cDNA からゴナドトロピン処理を行った細胞の cDNA を差し引くことで、ゴナドトロピン抑制性の遺伝子群のサブトラクションクローニングを行った。それぞれ T-ベクターに組み込んだプラスミドライブラリーを作成し、約 3000 クローンを単離した。それぞれのクローンを PCR によりインサートだけを増幅したのち、マイクロアレイヤーを用いてスライドガラスに1枚あたり 6000 ドットの割合でスポットティングし DNA マイクロアレイを作成した。この DNA マイクロアレイをスクリーニングし、卵巣顆粒膜細胞の分化増殖に関連したゴナドトロピン誘導性、および抑制性遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群のなかから P450scc, StAR, 3- β HSD, P450arom, Inhibin-a, PACAP のグレリン投与による遺伝子発現変化を real time PCR で解析した。その結果、P450scc, StAR 遺伝子の発現はグレリンにより相乗的に促進される一方、P450arom は、グレリン処理によりその発現は抑制された。ま

た、PACAP 遺伝子発現は相乗的に促進されることが判明した。これらのことは、グレリンが PKC 経路を介して卵巣においても作用を発揮していることを示している。この結果は、グレリン直接には卵巣機能を抑制する方向で作用していることを示唆している。

一方グレリンの卵巣に対する作用は IGF-I を介して行われる可能性も大きい。グレリンの卵巣に対する作用を解析する上 IGF-I の卵巣における役割の解析も重要である。

昨年度に引き続き、本研究では、LH 受容体および FSH 受容体遺伝子発現に対する IGF-I 影響を検討した。ラット卵巣顆粒膜細胞初代培養系に対し、IGF-I は単独ではこれらの受容体を誘導する事はできない。しかし FSH あるいは 8Br-cAMP と同時投与すると、IGF-I はこれらの受容体遺伝子の発現を著しく増大させることが Northern プロットにより明らかとなった。核ランオンアッセイによる検討では、IGF-I はこれらの受容体 mRNA を転写レベルで増加させていないことが判明した。一方、これらの受容体 mRNA の安定性をその半減期を利用して調べたところ、IGF-I はこれらの受容体遺伝子の mRNA の安定性を増大することでその発現を著しく増大させている事が明らかとなった。またこの受容体遺伝子の発現は、極めて低濃度のダイオキシンによっても著しく抑制されることから、様々な情報伝達系を介して厳密に調節されていることが明らかとなった。グレリンは神経細胞では、NGFI-A の遺伝子発現を惹起すると報告されているが、卵巣においても NGFI-A は卵巣顆粒膜細胞の増殖分化に伴って急激に誘導される。本研究では卵巣における NGFI-A の発現調節を分子生物学的手法に基づいて解析した。ルシフェラーゼアッセイを用いた解析で、マウス Leydig 細胞由来細胞株 MA10 及びゴナドトロピン処理により分化した卵巣顆粒膜細胞では NGFI-A は LH 受容体の発現を特異的に誘

導した。この LH 受容体に対する NGFI-A の作用は、LH 受容体遺伝子上流に存在する 2 カ所の NGFI-A 結合サイトによることが、site directed mutagenesis により確認された。一方 NGFI-A 自身の発現は、マウス Leydig 細胞由来細胞株 MA10 及びゴナドトロピン処理により分化した卵巣顆粒膜細胞では cAMP を介した刺激により 15 分以内に急激に誘導されるが、一方未分化の卵巣顆粒膜細胞では cAMP の刺激によっても全く誘導されない。未分化の卵巣顆粒膜細胞では LH 受容体は発現しておらず、NGFI-A が LH 受容体の発現に重要であることと良い相関を示した。

D. 考察

グレリンの主たる産生部位は胃であることから、その作用が卵巣に及ぶかどうかは議論のあるところである。私どもの検討でも、卵巣顆粒膜細胞におけるグレリンの産生は、極めて低いものであった。一方、本研究ではグレリン受容体の遺伝子発現がラット卵巣顆粒膜細胞で確認されたことから、卵巣顆粒膜細胞にグレリンが作用するとすれば、周辺細胞からのパラクリン作用、もしくは血流を介したホルモン作用によるものと推測された。グレリンは脳下垂体からの GH 分泌を促進する生理活性ペプチドホルモンとして同定されたが、末梢においては様々な直接作用を行っている可能性が示されている。グレリン受容体は 7 回膜貫通型の G 蛋白質結合受容体であり、その細胞内情報伝達は 2 次メッセンジャーを介する細胞刺激作用と思われる。卵巣機能は、基本的には脳下垂体からの卵胞刺激ホルモンおよび黄体刺激ホルモンによる、cAMP を介した刺激作用に依存している。グレリン受容体もこの情報伝達系に深く関与することからも、グレリンの卵巣機能に対する修飾作用が示唆される。神経系では細胞刺激により早期に誘導される転写因子である NGFI-A や Myc

遺伝子がグレリンによって誘導されることが報告されている。卵巣においても NGFI-A は卵巣顆粒膜細胞の増殖と分化に深く関わっている。本研究ではグレリンの卵巣直接作用を検証するため、NGFI-A を始めとするさまざまなゴナドトロピン誘導性遺伝子群のグレリンによる発現変化を検討し、グレリンの直接作用としては卵巣機能を抑制的に調節していることが示唆された。また NGFI-A の発現は直接 LH 受容体の発現に結びついており、グレリンが NGFI-A を介して卵巣の LH 受容体の発現に関与することが示唆された。またグレリンの間接作用として、GH 及び IGF-I を介して卵巣機能に影響を与える可能性が考えられることから、卵巣に対する IGF-I の作用を解析した。IGF-I は卵巣顆粒膜細胞でのゴナドトロピン受容体の遺伝子発現を、それらの mRNA の安定性を増加させることで高めることが明らかとなった。これはグレリンが間接的に卵巣機能分化を促進していることを示唆している。

E. 結論

卵巣での卵胞成熟、分化はゴナドトロピンとともに、IGF-I が深く関与している。卵巣におけるグレリンの作用は、直接作用および IGF-I-GH 系を介した間接的な作用とが想定される。本研究では、卵巣におけるグレリンの役割について、基礎的な検討を行った。直接作用に関しては、グレリン受容体は卵巣顆粒膜細胞に発現していることを初めて明らかにし、その可能性を示唆した。一方グレリン自身の遺伝子発現は卵巣顆粒膜細胞には見られず、卵巣に対する直接作用はパラクリンあるいはホルモン作用であることが予想された。グレリンの間接作用として、卵巣機能における IGF-I の役割を明らかにし、IGF-I-GH 系の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

①Yoshino M, Mizutani T, Yamada K, Tsuchiya M, Minegishi T, Yazawa T, Kawata H, Sekiguchi T, Kajitani T, Miyamoto K.

Early growth response gene-1 (Egr-1) regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene.

Biol Reprod, 66: 1813-1819, 2002.

②Sekiguchi T, Mizutani T, Yamada K, Yazawa T, Kawata H, Yoshino M, Kajitani T, Kameda T, Minegishi T, Miyamoto K.

Transcriptional regulation of Epiregulin gene in the rat ovary.

Endocrinology, 143: 4718-4729, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

グレリンの下垂体および甲状腺機能調節における意義

分担研究者 山下俊一（長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設 教授）

胃癌の診断や手術の進歩に伴い、胃切除術を受けられた多くの患者の方々に、長期間生存が得られるようになった、しかし一方で、胃切除にともなう様々な機能障害が患者の QOL にとって重要な問題となってきている。そこで胃切除後の機能障害にグレリンの欠乏が関与するかどうかを検討することを本分担研究の第一の目的とした。

また消化性潰瘍の治療に当たって H. pylori の除菌療法が保険適応となり、胃癌の予防になる可能性が示唆され、一般臨床の現場でも盛んに施行されるようになってきた。しかしながら、除菌に纏わる幾つかの問題点も指摘されている。除菌後の肥満（体重増加）もその1つであり、生活習慣病の観点から非常に重要な点である。このことは、除菌治療は潰瘍の再発や胃癌の発生の抑制という点ではメリットがあるが、肥満の抑制という点ではデメリットとなる可能性も考えられ、その病態解明は重要な課題である。そこで、ヘリコバクター感染に伴う慢性胃炎などにより、グレリンの産生に影響が出るかどうか検討することを第2の目的とした。

A. 研究目的

1) 胃切除術後症状の病態解明とグレリン臨床研究の展望

胃切除術後の患者で一般に認められる体重減少や食欲低下といった様々な症状が、切除に伴う消化吸収障害によるものだけではなく、グレリン欠乏による特異的な胃内分泌機能低下症にもとづく症状である可能性が考えられる。今回は、胃切除後のグレリンの血中動態を明らかにすると同時に、IGF-1、GH、レプチンといったホルモンを同時に測定することによって、胃切除後症例の病態におけるこれらホルモンの関与を明らかにし、グレリンによる治療への応用が可能かどうか検討した。

2) 慢性胃炎の胃内分泌細胞グレリン産生におよぼす影響

胃切除術を施行する胃癌患者さんの中で術前よりグレリンレベルが低い方がおられ、しかもそれらの方々は胃粘膜の萎縮が著明であった。また消化性潰瘍の治療に当たって H. pylori の除菌療法が保険適応となり、一般臨床の現場でも盛んに施行されるようになってきた。しかしながら、除菌治療後の食欲亢進と体重増加をきたす人がおり、生活習慣病の観点から注目を集めている。グレリンは摂食をレプチンと対抗してポジティブに調節作用があることが報告されていることより、我々は、H.pylori 感染及び胃粘膜状態と胃で産生される各種ホルモンの関連性について検討した。

B. 研究方法

- 1) 対象は胃全摘、亜全摘、および膵頭十二指腸切除などの53症例(男性33例、女性20例)で、年齢は38-89歳、平均67歳である。このうち15例に関しては術前、術後2週と1月後の経過を検討した。研究方法は長崎大学倫理委員会の承認後、インフォームドコンセントの得られた治癒切除可能な胃切除予定症例、および術後6ヶ月以上経過し再発の認められない上記症例に関し、血漿、血清を採取し、グレリン(N-terminal & C-terminal)、IGF-1、GH、レプチンの測定を行った。また身長・体重よりBMIを求めた。切除標本は、グレリンの免疫染色によりその発現を検討した。
- 2) 対象は長崎大学医学部附属病院光学診療部で胃内視鏡検査を受けた患者112名を対象に、方法は胃切除術のグレリンの検討に準ずる。グレリンの測定は宮崎医科大学にて行った。(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、当施設で定められた臨床研究の規定に従って行った。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養及び保管に関する基準、当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行った。

C. 研究結果

- 1) 胃摘術後長期にわたりグレリンの低下を認める症例と一過性の低下のみで血中グレリンレベルが基のレベルに回復する例があった。グレリンの欠乏状態が持続する例は胃全摘術例が多く、回復する例は幽門側胃切除例であった。すなわち胃切除範囲と手術が1ヶ月以降の関連があった。一方、膵頭十二指腸切除術では体重減少はあるもののグレリンの低下は認めなかった(表1)。胃摘術後の体重減少とグレリン低下は相関してい

た($r=0.734, p<0.001$) (図1)。レプチンのレベルはBMIと相関が認められたが、グレリンとの関連は認めなかった。また術後のグレリンの変動にもレプチンやGHとの連動性はなかったが、IGF-1はグレリンと同様な経時的変動が見られた。グレリンの活性化ドメインであるN-terminalと安定なC-terminalドメインを認識する2種類の抗体による(表1)アッセイを行ったが、両者はよく相関した($r=0.855, p<0.001$) (図2)。

- 2) H. pylori感染・非感染患者に分けて、胃で産生される消化管ホルモン(グレリン、レプチン、ガストリン)の測定を行った。血漿グレリン値はペプシノーゲン1/2比でみた胃粘膜萎縮度と有意な負の相関性がみられた(表2、図3)。またH. pylori陽性者では、加齢との関連性も認められた。レプチンとH. pylori感染に関しては、血漿レベルではBMIで補正した場合有意差はなかったが胃粘膜局所では陽性患者で高値を呈した。血漿ガストリン値は、H. pylori陽性者で上昇傾向にありレプチンとの相関性がみられた。

D. 考察及びE. 結論

- 1) 胃全摘出術後に認められる体重減少、食欲不振、ダンピング症候群、貧血、骨粗鬆症、消化管運動障害などの様々な機能障害の一部もしくはかなりの病態メカニズムにグレリン欠乏が関与している可能性が示唆された。今後、胃切除術を受けられた患者さんに対して臨床研究を行い、グレリン治療による胃切除術後の病態改善が可能かどうかさらに検討を行ってゆきたいと考えている。
- 2) 長期的なH. pylori感染が局所或いは循環血レベルで各種消化管ホルモンに影響を及ぼしている可能性が示唆された。今後は胃液レ

ベルでの検討や除菌前後の変動などを観察する必要があると考えられた。将来的には除菌療法の適応にもグレリンレベルを考慮すべき可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Ishigaki K, Namba H, Nakashima M, Nakayama T, Mitsutake N, Hayashi T, Maeda S, Ichinose M, Kanematsu T, Yamashita S.

Aberrant localization of beta- Catenin correlates with overexpression of its target gene in human papillary thyroid cancer.

J Clin Endocrinol Metab, 87: 3433-3440, 2002.

- ②Akiyama-Uchida Y, Ashizawa N, Ohtsuru A, Seto S, Tsukazaki T, Kikuchi H, Yamashita S., Yano K.

Norepinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts.

Hypertension, 40: 148-154, 2002.

- ③Imanishi R, Ohtsuru A, Iwamatsu M, Iioka T, Namba H, Seto S, Yano K, Yamashita S.

A Histone Deacetylase Inhibitor Enhances Killing of Undifferentiated Thyroid Carcinoma Cells by p53 Gene Therapy.

J Clin Endocrinol Metab, 87: 4821-4824, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究協力者

大津留 晶（長崎大学大学院医歯薬

総合研究科）

濱田 亜衣子（長崎大学大学院医歯薬

総合研究科）

高村 昇（長崎大学大学院公衆衛生学）

古市 哲（長崎大学大学院

医移植消化器外科学）

永田 康浩（長崎大学大学院

医移植消化器外科学）

円城寺 昭人（長崎大学大学院

医移植消化器外科学）

兼松 隆之（長崎大学大学院

医移植消化器外科学）

磯本 一（長崎大学光学診療部）

表 1

Operation	BMI	Ghrelin (C-term.)	Ghrelin (N-term.)
Pre-operation (n=14)	22.9	141.0 +/- 68.3	9.4 +/- 6.2
Distal Gastrectomy (n=16)	22.4	120.3 +/- 41.2	7.3 +/- 4.2
Total Gastrectomy (n=18)	19.9	57.5 +/- 16.7	3.0 +/- 1.6
Pancreaticoduodenectomy(n=10)	18.6	132. +/- 30.9	8.9 +/- 2.3

Relationship between plasma ghrelin level, type of operation, and BMI.
 BMI is the average value, and the ghrelin levels are averages +/- 2SD (fmol/ml).

图 1

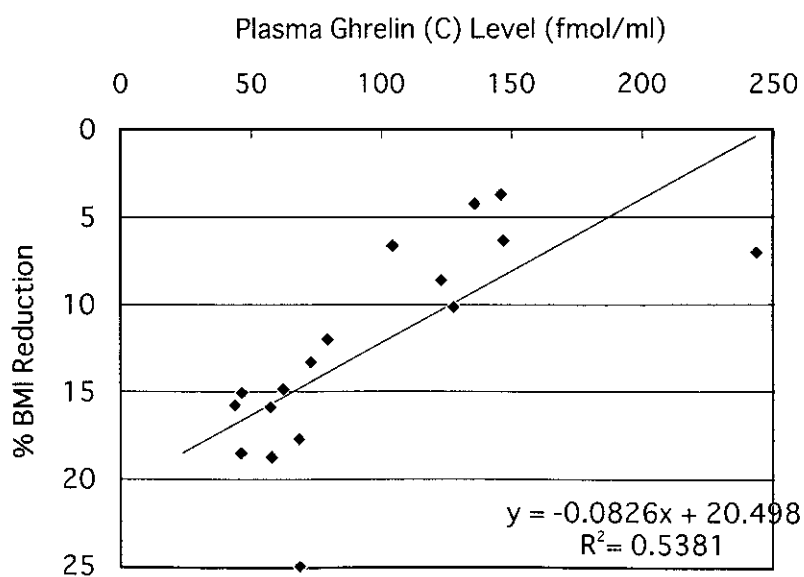


図 2

アッセイ系による比較 (全サンプル)

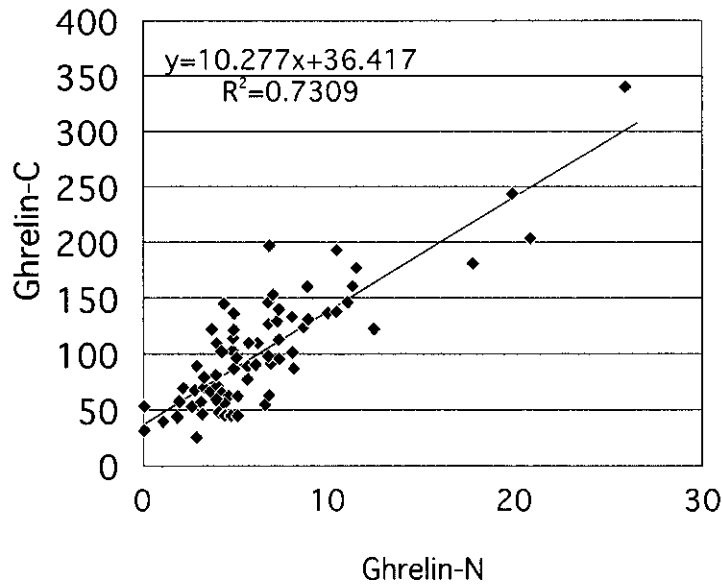


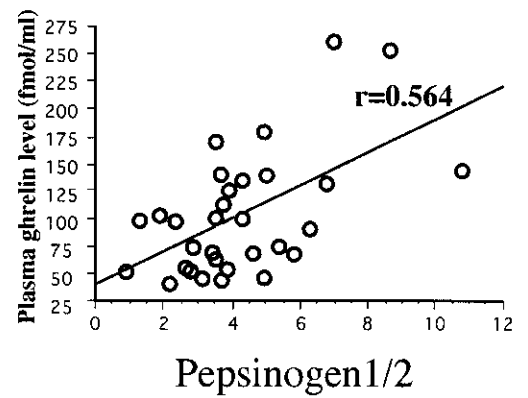
表 2

H. Pylori 陰性 (n=25)	175.4 +/- 118.6
H. Pylori 陽性 (n=43)	99.1 +/- 44.4

正 常 (n=34)	168.3 +/- 73.5
軽 度 (n=12)	92.9 +/- 21.1
中等度 (n=17)	77.9 +/- 15.6
高 度 (n=5)	59.2 +/- 11.6

(fmol/ml)

図3



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

分担研究者 島津 章（国立京都病院臨床研究部 部長）

加齢における機能的成長ホルモン分泌不全状態と器質的成長ホルモン分泌不全症を鑑別することは容易でない。成長ホルモン分泌刺激剤やグレリンの成人成長ホルモン分泌不全症の診断における臨床的意義を解明するため、器質性完全型成長ホルモン分泌不全症患者5例を対象に、成長ホルモン分泌刺激剤 KP-102D を投与し、血中成長ホルモン反応と血中副腎皮質刺激ホルモンおよびコルチゾール反応をインスリン低血糖試験と比較検討した。KP-102D による成長ホルモン分泌増加は軽度ながら全例で観察され、インスリン低血糖による成長ホルモン頂値より有意に高かった。同様に副腎皮質刺激ホルモン増加反応も全例でみられ、インスリン低血糖より大きい反応であった。肥満者や高齢者でも KP-102D による成長ホルモン増加反応は減弱しないことを考え併せると、成長ホルモン分泌刺激剤は視床下部・下垂体系の機能評価が可能でインスリン低血糖にとってかわる有用な薬剤である。

A. 研究目的

高齢により、運動精神機能は低下し、機能低下が進むほど、看護・ケアが必要となり、運動精神機能の喪失は疾病の増加に関連し、体構成の変化は有病率の増加につながる。下垂体前葉から分泌される成長ホルモンの分泌は、思春期中期にピークがあり、以後加齢とともに進行性に低下し、60歳代では思春期の分泌量の4分の1か5分の1と大幅に減少する。これはソマトポーズと呼ばれ、機能的な成長ホルモンの分泌不全状態である。高齢者における成長ホルモン分泌は、器質的病変を有する成人成長ホルモン欠損症と同様に除脂肪体重の減少と体脂肪量、特に内臓脂肪の増加を引き起こす。加齢に伴う機能的な成長ホルモン分泌不全状態は器質的成長ホルモン分泌不全症と鑑別する必要があるが、実際に容易ではない。

寒川、児島らにより胃から単離された新規成

長ホルモン分泌促進ペプチド・グレリンは、強力な成長ホルモン分泌促進作用を有し、新しい成長ホルモン分泌調節機構を担っている。

本年度は、成長ホルモン分泌促進剤やグレリンの成人成長ホルモン分泌不全症の診断における臨床的意義を解明するため、器質性完全型成長ホルモン分泌不全症患者を対象として、成長ホルモン分泌刺激剤 KP-102D を投与し、血中成長ホルモン反応と血中副腎皮質刺激ホルモンおよびコルチゾール反応をインスリン低血糖試験と比較検討した。

B. 研究方法

器質性成人完全型成長ホルモン分泌不全症5例（年齢27-43歳、男性1例、女性4例、頭蓋咽頭腫3例、胚芽腫1例、下垂体柄断裂1例）を対象とした。

1) 早朝空腹時、肘静脈血管に静脈カニューレを

挿入し、ストレスをかけない状態で安静臥床を保たせた。30分経過後、前採血の後に速効性インスリン（ヒューマリンR）を体重1kg当たり0.05-0.1単位、静脈内注射し15分おきに2時間まで採血した。血糖、成長ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）およびコルチゾールをそれぞれ、グルコースオキシダーゼ法、IRMA法で測定した。

- 2) 1ないし2週間後、同様の状態で成長ホルモン刺激剤KP-102D（科研製薬株式会社）を体重1kg当たり2 μ g、50kg以上の体重では100 μ g、静脈内注射した。成長ホルモン、ACTHおよびコルチゾールをIRMA法で測定した。本試験は治験等臨床試験に関する倫理審査委員会第Ⅲ相試験として倫理性、科学性に関し承認を得ている。

（倫理面への配慮）

実験動物に対する動物愛護上の配慮は、京都大学実験動物取扱細則に準拠した。

C. 研究結果

1) インスリン低血糖および成長ホルモン刺激剤

KP-102Dに対する成長ホルモン増加反応

成人成長ホルモン分泌不全症患者におけるインスリン低血糖に対する成長ホルモン反応を図1に示した。全例重症型であり、頂値は3ng/ml以下であった。はっきりした増加反応が認められなかった例が2例にみられた。インスリン低血糖試験において、全例で空腹感、冷汗、動悸などの低血糖症状がみられた。

同一対象におけるKP-102Dに対する成長ホルモン反応を図2に示した。インスリン低血糖と異なり、全例において増加反応を認めた。インスリン低血糖で成長ホルモン反応が認められなかった例においても軽度ながら反応がみられた。反応頂値は、インスリン低血糖時と比較し明らかに高値であった。KP-

102Dを負荷した際には、軽度の腹鳴と紅潮がみられた程度であり、重篤な副作用はみられなかった。

2) インスリン低血糖および成長ホルモン刺激剤

KP-102Dに対するACTHおよびコルチゾール増加反応

成人成長ホルモン分泌不全症患者におけるインスリン低血糖に対するACTH反応を図3に示した。はっきりした増加反応は2例のみであった。

同一対象におけるKP-102Dに対するACTH反応を図4に示した。インスリン低血糖と異なり、全例において増加反応を認めた。インスリン低血糖でACTH反応が認められなかった例においても軽度ながら反応がみられた。反応頂値は、インスリン低血糖時と比較し明らかに高値であった。一方、血中コルチゾールは、分泌低下のなかった1例を除いて全例においてインスリン低血糖およびKP-102Dに対する増加反応はみられなかった。

D. 考察

今回、グレリンや成長ホルモン刺激剤の成人成長ホルモン分泌不全症の診断における意義を明らかにするため、インスリン低血糖および成長ホルモン刺激剤による成長ホルモンとACTH反応について比較検討した。その結果、インスリン低血糖刺激よりも強力な成長ホルモンおよびACTH刺激活性がみられる事が明らかにされた。KP-102Dの作用部位は、視床下部と下垂体の両方が考えられているが、主体は視床下部と考えられている。インスリン低血糖と比較し、有害事象としての症状は軽微であり、視床下部・下垂体系の機能を十分に評価しうる。

健常成人においてKP-102D投与時の成長ホルモン増加反応は頂値の平均が60-100ng/mlにも達する強力な作用である。今回、成人成長

ホルモン分泌不全症患者では、最大 3ng/ml 程度であった。さらに多数例の検討では、成長ホルモン頂値が 15ng/ml のカットオフ値で、健常人と重症型成長ホルモン分泌不全症が完全に分離されることが報告されており、診断的意義はさらに高い。

高齢者において、成長ホルモン反応は一般に低下していると考えられる。KP-102D に対する成長ホルモン分泌増加は加齢の影響を受けにくく、さらに性差や肥満の影響も少ない（データ示さず）ことから、幅広い年齢層において成長ホルモン分泌最大予備能の検索に有用であると考えられる。

今回、成長ホルモン刺激剤による ACTH 増加反応がインスリン低血糖試験より強力であることが示された。グレリンや成長ホルモン刺激剤による ACTH 分泌刺激作用はげっ歯類において主に視床下部 CRH 神経細胞を介すると考えられていた。またインスリン低血糖刺激による ACTH 分泌刺激は抗利尿ホルモンと視床下部カテコラミン、および CRH が関与することが想定されている。今回の成績から成長ホルモン刺激剤による ACTH 増加反応は CRH のみでなくほかの未知の経路を介する可能性も示唆される。

E. 結論

グレリンをはじめとする成長ホルモン分泌刺激剤を使用することにより視床下部・下垂体系の機能評価が可能である。成長ホルモン分泌刺激試験および視床下部・下垂体・副腎皮質軸の刺激試験として、副作用が問題となるインスリン低血糖試験にとってかわる有用な検査となりうる。加齢における成長ホルモン分泌の最大予備能の検査として広い臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

①島津章.

成長ホルモンの代謝作用. 糖、脂質、蛋白、電解質、内分泌・糖尿病科.

「成長ホルモンのすべて」, 15: 129-137, 2002.

②島津章、葛谷英嗣.

治療薬としての IGF-1 内分泌・糖尿病科.

「成長ホルモンのすべて」, 15: 297-301, 2002.

③Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T,

Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A,

Kuzuya H, Nakao K.

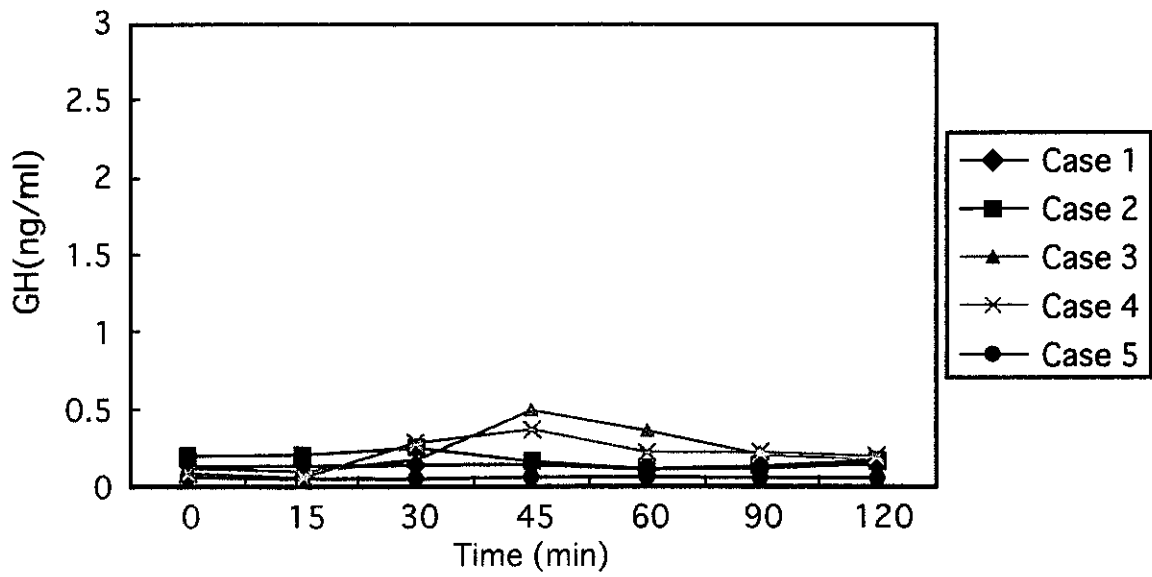
Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist.

J Clin Endocrinol Metab, 87: 5185-5190, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

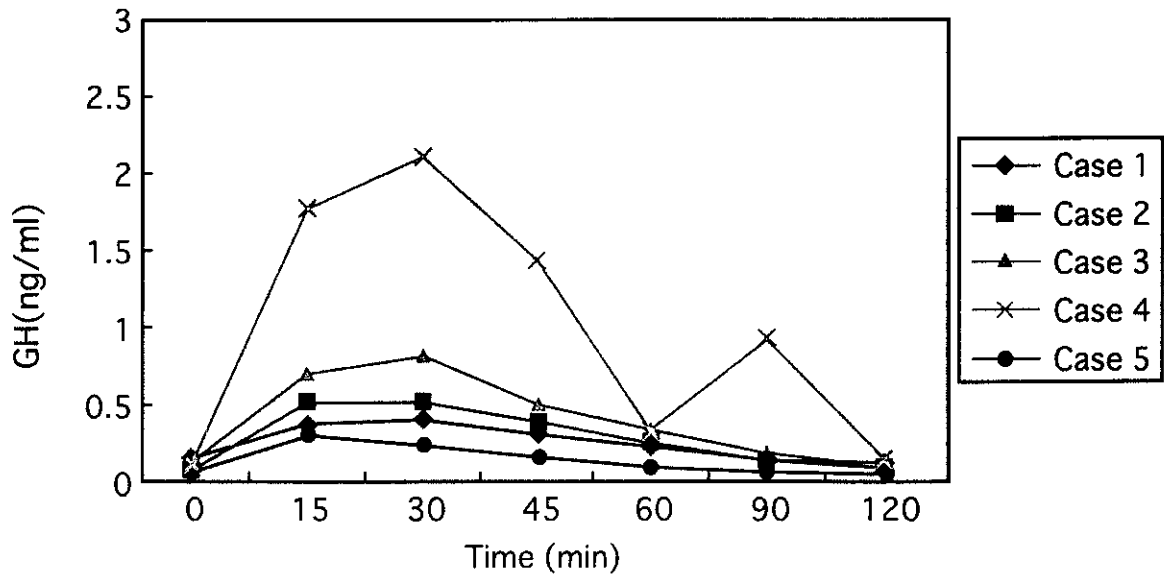
なし

図1



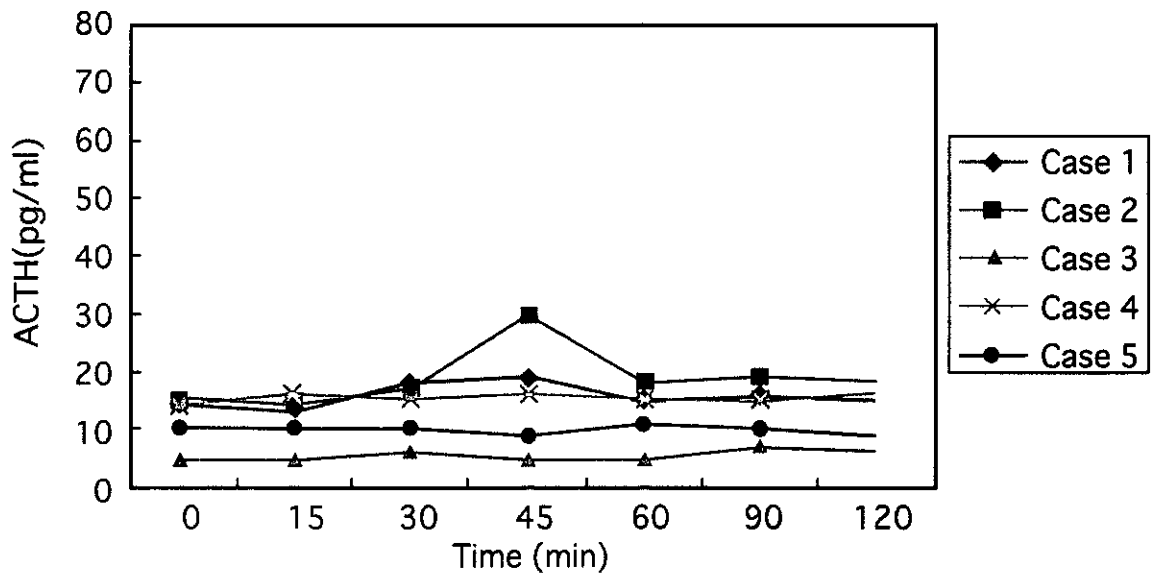
成人成長ホルモン分泌不全症患者における
インスリン低血糖に対する成長ホルモン分泌反応

図2



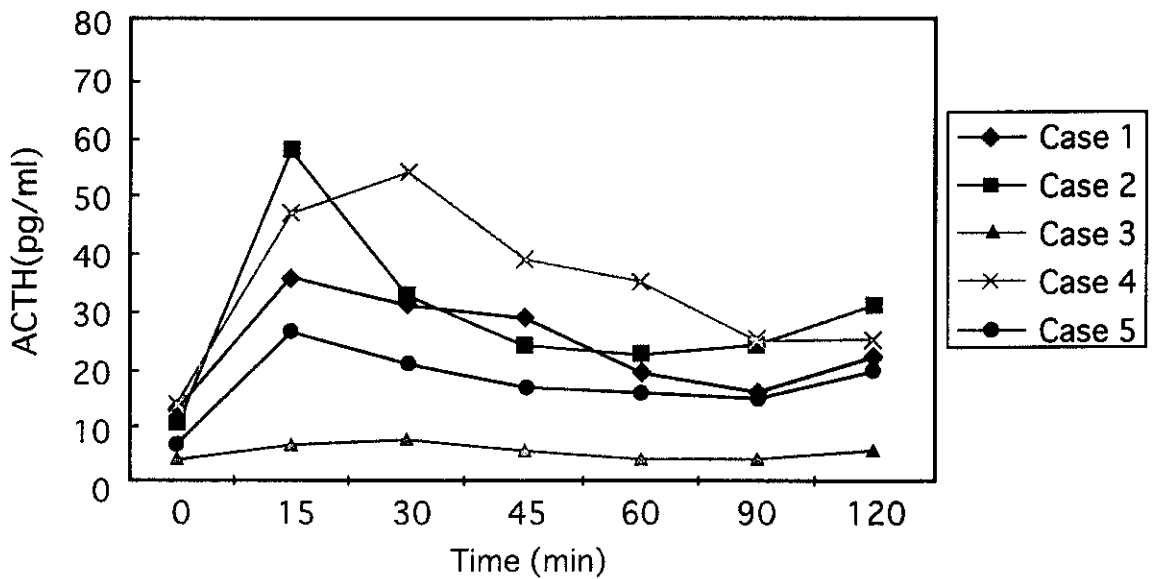
成人成長ホルモン分泌不全症患者における
成長ホルモン刺激剤KP-102Dに対する成長ホルモン分泌反応

図3



成人成長ホルモン分泌不全症患者における
インスリン低血糖に対するACTH分泌反応

図4



成人成長ホルモン分泌不全症患者における
成長ホルモン刺激剤KP-102Dに対するACTH分泌反応

加齢におけるソマトポーズと摂食低下に対するグレリンの効果に関する研究

分担研究者 中里雅光（宮崎医科大学第三内科 講師）

グレリンは、消化管と視床下部で産生され、末梢と中枢投与で成長ホルモン（GH）分泌と摂食を促進するペプチドである。今回、老齢ラットのソマトポーズと摂食低下に対するグレリンの効果ならびに胃から脳へのグレリンの情報伝達システムについて解析し、加齢におけるグレリンの病態生理学的意義を研究した。グレリンは迷走神経求心路を介して、GH分泌および摂食に関する情報を脳に伝達することも示した。

A. 研究目的

ヒトとラットの胃から発見されたグレリンは、強力な成長ホルモン分泌活性に加え、摂食亢進や体重増加、消化管機能調節などエネルギー代謝調節に重要な作用を持つ。グレリン細胞は、既知の消化管ホルモン産生細胞とは異なる内分泌細胞で、胃で2番目に多い内分泌細胞で主として産生される。グレリン受容体は心臓、下垂体、消化管を初め、全身臓器で発現している。胃からのグレリン分泌はネガティブエネルギー・バランス下で促進され、ポジティブエネルギー・バランス下で抑制されることから、グレリンは末梢で産生される空腹シグナルとして、中枢に作用すると考えられる。グレリンはまた、脳視床下部でも産生される。

ヒトやラットを含めて哺乳類の成長ホルモン（GH）分泌は、思春期をピークとして以後減退し、高齢者ではGH分泌不全状態にあり、これが生活の質（QOL）の悪化の原因の1つとなっている。成長ホルモン分泌低下はソマトポーズとも呼ばれ、筋肉と骨量の低下および内臓脂肪蓄積型肥満をもたらす。加齢に伴うソマトポーズは老化を促進する因子となっている。

本年度の研究では、主にグレリンのソマトポ

ーズにおける病態生理学的意義に関する基礎・臨床的研究を行った。また胃から分泌され、GH分泌と摂食亢進に作動するグレリン情報が、どのようなシステムにより脳へ伝達されるかについて研究した。

グレリンの摂食亢進作用は、老齢者における摂食低下の治療薬としての適応が期待されている。われわれはすでに、ヒトメラノーマ細胞（SEKI細胞株）をヌードマウスに移植して作成したカヘキシアモデルで、グレリンが摂食を亢進させ、カヘキシアを改善することを確認している。グレリンのエネルギー同化作用が、老齢ラットにおける摂食低下と体重減少に対しても有効であるかについても検討した。

B. 研究方法

18ヶ月齢の老齢雄性ラットと3ヶ月齢の若齢雄性ラットにおける胃グレリン含量をラジオイムノアッセイ（RIA）で、胃グレリンmRNA量をノーザンブロット解析を用い、空腹時血漿中のグレリンとGH濃度をRIAで定量した。老齢者20名（68-84歳、 74.6 ± 4.2 ）と若年者（18-34歳、 27.2 ± 2.1 ）の早朝空腹時における血漿グレリン濃度を定量し、比較した。

老齢ラット（18ヶ月齢）と若齢ラット（3ヶ月齢）にグレリン（1 μ g/ラット, n=10/group）を午前9時に静脈内投与し、GH分泌と摂食亢進作用を比較した。浸透圧ポンプを用いてヒトグレリン5 μ g/日を10日間、高齢ラットと若齢ラットに皮下投与し、摂餌量と自動運動量を測定した。胃グレリンの作用機構における迷走神経求心路の役割を明らかにするために、迷走神経切断および迷走神経求心路の遮断ラットを用いてグレリンのGH分泌および摂食促進作用を検討した。横隔膜下迷走神経切断、迷走神経胃枝切断または迷走神経求心線維を特異的に遮断するカプサイシンを投与したラットにグレリン（5 μ g/ラット）を静脈内投与し、2時間の摂餌量とGH分泌を測定した。迷走神経遮断およびコントロールラットにグレリン5 μ gを静脈内投与することにより活性化される神経細胞群を、Fosタンパクの免疫染色を用い比較検討した。グレリン受容体の迷走神経求心性ニューロンでの発現と末梢への輸送を、RT-PCR法、*in situ* hybridization法および¹²⁵Iグレリンを用いた結合実験により解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、日本生理学会ならびに宮崎医科大学動物実験施設の定める動物実験に関するガイドラインに基づいて行い、倫理的問題はない。

C. 研究結果

正常者の空腹時の血漿グレリン濃度は、C端抗体を用いたラジオイムノアッセイでは、148 \pm 28 fmol/mlで、脂肪酸化された生物活性のあるグレリン分子だけを測定できるN端抗体を用いたRIAでは5.4 \pm 1.4 fmol/mlであった。BMIが同等の老齢者では空腹時血漿グレリン濃度は有意に低下した（ $P < 0.01$ ）。また血漿GH濃度も若年正常者より有意に低かった（ $P < 0.01$ ）。血漿グレリン濃度は、食前に増加して食後に減少し、午前2時に頂値を示したが、老齢

者では夜間のグレリンとGH分泌のサージが消失していた。

グレリンのラット静脈内投与による摂食促進作用は、1.5 nmolから濃度依存性に増加した。この摂食促進作用は、迷走神経遮断により完全にキャンセルされた。グレリンによる成長ホルモン分泌促進作用も、迷走神経遮断ラットではコントロールに比べ1/3以下に減衰した。Fosタンパクの免疫染色の結果、グレリンの静脈内投与により、視床下部弓状核の摂食促進ペプチドニューロペプチドY（NPY）産生ニューロンの約40%ならびに成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）産生ニューロンの約15%が活性化されることが明らかになった。迷走神経遮断ラットではグレリンによる弓状核の神経細胞の活性化は誘導されなかった。グレリン受容体は迷走神経求心性ニューロンに発現しており、求心線維末端へ輸送されていた。さらに迷走神経胃枝求心線維の電気活動はグレリンにより抑制された。胃から分泌されるグレリンは、迷走神経末端に存在する受容体に直接作用して迷走神経求心路の電気活動を抑制することにより、成長ホルモン分泌や空腹に関する情報を脳内へ伝達している。

D. 考察

迷走神経は、消化管からの種々の情報を脳幹を経て、間脳や新皮質に伝達する脳神経である。消化管の物理・化学的刺激や消化・吸収に伴って消化器から分泌される物質の一部は、迷走神経求心路を介して延髄弧束核へ情報を伝達する。この感覚神経線維の細胞体は、頸静脈孔を出たところにある迷走神経節に存在する。迷走神経は運動と感覚の両方の線維からなる。横隔膜下迷走神経線維の約90%は髄鞘のない求心線維（感覚線維）で、カプサイシンに感受性をもつ。グレリンは迷走神経求心路を介して中枢に作用する新たなGH分泌および摂食亢進ペプチドで

ある。

E. 結論

グレリンの発見により、胃がGHの分泌調節やエネルギー代謝調節にも機能していることが明らかになった。グレリンは、摂食亢進に作用することが初めて証明された消化管ペプチドであり、レプチンに拮抗して作動している。グレリンは脳と消化管で産生され、かつ両者を機能的に連係してエネルギー代謝を調節している。胃から分泌されるグレリンは、迷走神経を介して速やかに末梢空腹情報を中枢に伝達し、摂食促進に機能する。グレリンの自律神経系を介する摂食調節機構の解明は、肥満や摂食障害などの病因の究明に意義深い。カヘキシアに対する治療薬としてのグレリンの臨床研究もすでに始まっており、グレリンの薬剤としての臨床応用研究が急速に進展しつつある。高齢者における成長ホルモン分泌低下（ソマトポーズ）は、筋肉や骨量の低下、内臓脂肪蓄積型肥満、脂肪肝などをもたらす。高齢者の生活の質を低下させる。高齢ラットへのグレリン投与はGH分泌、摂食亢進や活動性の増加効果を示した。今後グレリンのエネルギー同化促進作用は、ソマトポーズやカヘキシアに対する新たな治療の可能性を示唆している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal M S, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo M, Yada T, Matsukura M. Ghrelin is present in pancreatic α -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, 51: 124-129, 2002.
- ②Shiia T, Nakazato M, Yamaguchi H, Mizuta M, Date Y, Mondal M S, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 240-244, 2002.
- ③Lu S, Guan J L, Wand Q P, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Shioda S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuro sci Lett*, 321: 157-160, 2002.
- ④Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion. *Gastroenterology*, 123: 1120-1128, 2002.
- ⑤Yoshihara F, Kojima M, Hosoda H, Nakazato M, Kangawa K. Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5: 391-395, 2002.
- ⑥Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiia T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S. Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 146: R1-R3, 2002.
- ⑦Hayashida T, Nakahara K, Mondal M S, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Murakami N. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. *J Endocrinol*, 173: 239-245, 2002.
- ⑧Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, Mondal M S, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K. Role for central ghrelin in food intake and