

20020409

厚生労働科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

新規腸管増殖・再生因子のクローニングに関する研究
—腸管臓器再生薬の実用化—

H14-ゲノム-002

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岩倉 洋一郎

平成15(2003)年3月

新規腸管増殖・再生因子のクローニングに関する研究

目次

I. 総括研究報告		
新規腸管増殖・再生因子のクローニングに関する研究	-----	1
岩倉洋一郎		
II. 分担研究報告		
1. 腸管臓器再生に於けるIL-1の役割	-----	23
岩倉洋一郎		
2. 腸管増殖・再生因子としてのグレリンの発現調節	-----	31
寒川賢治		
3. VMH破壊ラットにおける腹部臓器増殖・再生の機能的形態的研究	-----	39
井上修二		
4. VMH破壊による胃のグレリン産生・分泌への影響と形態観察に関する研究	-----	43
塩田清二		
5. 腸管増殖・再生因子の生化学的・薬理的解析、転写因子の探索	-----	49
中里雅光		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	55
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	69

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

新規腸管増殖・再生因子のクローニングに関する研究
—腸管臓器再生薬の実用化—

主任研究者 岩倉洋一郎 東京大学医科学研究所ヒト疾患モデルセンター

研究要旨

班員の井上らは、視床下部腹内側核（VMH）破壊動物では迷走神経活動の上昇により腹部臓器の細胞増殖やインスリン分泌が亢進し、これが肝、膵の再生能亢進と胃粘膜の抗潰瘍作用増強につながることを見出した。本研究ではこの細胞増殖のメカニズムを解明し、再生医療に応用することを目的とする。本年度は、VMH 破壊後の腹部臓器の組織学的機能的検討を行うと共に、遺伝子発現の変化を解析した。その結果、VMH 破壊後に胃に於けるグレリン産生が亢進していることが分かり、グレリンが関与している可能性について検討した。この中で、グレリンの中枢への情報伝達システム、摂食亢進機序、ならびに担癌体カヘキシアモデルに対する治療効果について解析し、グレリンによる新たなエネルギー代謝調節機構を明らかにした。また、ラットの胎児期・新生児期におけるグレリン産生能と、グレリンの発育・発達および性発達に対する作用について解析した。これらの研究から、グレリンが VMH 破壊による組織細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。一方、IL-1 レセプターアンタゴニスト（Ra）欠損マウスを用いた解析から、このマウスではインスリン分泌が低下しており、視床下部破壊に伴うインスリン分泌の亢進が起こらないことを見つけた。このことから、中枢神経系によるインスリン分泌制御には IL-1 が関与していることが示唆された。

分担研究者

寒川賢治（国立循環器病センター生化学部）、井上修二（共立女子大学家政学部栄養生理学研究室）、塩田清二（昭和大学医学部第1解剖学教室）、中里雅光（宮崎医科大学医学部）

の細胞増殖が引き起こされ、また、部分切除肝の再生が促進されることが分かっている。興味深いことに、膵では外分泌細胞の増殖と再生、及び内分泌細胞（ラ氏島）のβ細胞の選択的増殖と再生が促進されることが報告されている。本研究では、VMH 破壊に伴う、腹部臓器細胞増殖、再生促進現象に着目し、これらの活性を有する増殖・再生因子を同定し、

A. 研究目的

腹内側核（VMH）破壊ラットでは腹部臓器（胃、小腸、大腸、肝、膵）

その機能を解明するとともに、この新規増殖・再生因子あるいは、そのアゴニストを利用した消化性潰瘍薬、肝・腸・膵再生薬（膵内分泌細胞再生では糖尿病薬）の開発を第1の目的とする。最近、臓器再生に受精卵由来の胚性幹細胞や骨髄由来の多能性幹細胞の活用が注目されているが、胃粘膜・小腸・大腸・肝・膵組織細胞の再生をターゲットとする薬の開発はいまだ未開拓の分野である。当グループの研究者らは、VMH破壊によって腹部臓器組織細胞増殖能が亢進し、組織細胞再生能亢進につながることを生理学、形態学的に確認した。この腸管増殖・再生因子の同定、機能解析は、他国に先駆けて是非わが国で進めたい研究である。本因子を胚性幹細胞あるいは多能性幹細胞と共に、あるいは単独で使用するにより、劇症肝炎、肝炎、肝硬変、切除肝、胃・十二指腸潰瘍、切除膵、慢性膵炎、糖尿病（ β 細胞再生）、短腸症候群、クローン病などの再生治療をより効果的に進めることが期待でき、極めて必要性の高い研究である。本研究組織は、未知タンパク・ペプチドの探索技術、遺伝子改変技術、解剖学、生理学、栄養学、内分泌学的研究技術の各分野でのエキスパートで構成されている。各構成メンバーが緊密に連携して共同研究を行うことにより、腸管増殖・再生因子の同定・構造決定とその機能の解明が進み、その機能に基づいた腹部臓器細胞再生薬開発への具体的方策

を見出すことが出来る可能性が高い。

B. 研究方法

① SD系雌ラットを用い、VMH破壊群とSham群を作成した。VMH破壊ラットを使って、1)破壊3日、7日後の胃組織のHE染色、PCNA、Ki-67（細胞増殖マーカー）による核染色、グレリン抗体染色を施行し、VMH破壊ラットの胃組織の増殖像、グレリン産生能を検討した。2)破壊3日後の小腸組織を使用し既知の成長因子の遺伝子発現の測定を行い、胃組織の増殖との関係を検討した。3)肝の60%部分切除を施行し肝の再生能を検討した。4)膵の20%部分切除を施行し、膵の再生能、再生膵の内分泌機能、および組織像を検討した。

② ラットを用いて迷走神経切除ラットおよび求心性作用を遮断したカプサイシン処置ラットを作製し、グレリンを静脈内投与し、摂餌量、血中成長ホルモン濃度、神経活性化の指標であるFos蛋白発現ニューロンの解析を行った。迷走神経節細胞におけるグレリン受容体発現とその移行性および、迷走神経の求心性の電気活動を測定した。視床下部外側野のオレキシンニューロンとグレリンの関係を組織化学的に解析した。グレリンのオレキシン系およびNPY系を介した摂食亢進作用を特異的抗体と拮抗剤を用いて測定した。6週齢ヌードマウスの背部皮下にヒトメラノーマ細胞株であるSEKI細胞またはG361細胞を注入し、グレリン腹

腔内投与による体重、摂餌量および癌重量の変化を測定した。

③ Wistar 系ラットを用いて、新生児ラットから成熟ラットまで1週齢毎の胃グレリン含量をわれわれが開発したラジオイムノアッセイ (RIA) 法で測定した。ラットの妊娠 18、20、22 日目の胎児と1週齢、5週齢ラットの胃を抗グレリン血清によって免疫染色を行った。8時間のミルク制限をした1週齢ラットの胃と血漿のグレリンの測定を行った。母体にグレリンを継続投与し、新生ラットの体重を測定した。1および3週齢のラットにグレリン(1 nmol) を投与し、成長ホルモン分泌反応を解析した。グレリンの性成熟作用をみるために、低容量と高容量のグレリンを投与して、膈開放が生じるまでの日数を計測した。

④ IL-1 α / β 及び IL-1Ra 遺伝子欠損マウスを用いた。離乳後、個飼いしたそれぞれのマウスの体重、摂餌量を測定した。20週齢時に解剖し、白色・褐色脂肪組織重量及びその他の末梢組織重量を測定した。制限食餌による体重維持、等カロリー高脂肪食、通常食の体重、脂肪重量、血中中性脂肪量に対する影響を検討した。自由食下、あるいは絶食48時間、絶食48時間後の再食4時間での食餌量、これらの条件下での血中グルコース、インスリン、レプチン及び中性脂肪量の測定を行った。視床下部神経における神経ペプチド、脂肪組織における脱共役タンパク質、およびアディポサイトカインの mRNA 発現をノーザンブロット解析

にて検討した。

⑤ マウスに糖負荷及びインスリン負荷を行い、0、15、30、60分後の血中グルコース、インスリン及び遊離脂肪酸濃度を測定した。マウスのヘパリン静注(100mU/体重g)5分後の血漿を回収し、総リパーゼ、肝性リパーゼ活性それぞれを測定した。グルタミン酸—ナトリウム(MSG)を腹腔内に投与し、離乳後の成長曲線(体重変化)及び20週齢時の脂肪重量、血中インスリン濃度に対する影響を検討した。

⑥ IL-1 のノックアウトマウス(KO)にデキストラン硫酸塩(DSS)を用いて腸管上皮細胞を破壊して大腸炎を誘導し、大腸組織の破壊再生を検討すると共に、IL-1 欠損の免疫学的、組織学的影響について解析した。

C. 研究結果

① VMH 破壊3日後の個体では、胃粘膜全層の細胞配列は対照群と比較して密集してみられるようになり、7日後では対照群と同じような上皮細胞の分布密度を示した。また、VMH 破壊3日後の個体では、胃底腺の頸部から底部にかけてみられる内分泌細胞にグレリン免疫陽性反応が顕著に増加してみられたが、7日後ではその数と染色性は減少した。さらにVMH 破壊3日後の個体では、胃底腺の頸部の粘膜上皮細胞に Ki-67 の発現が著明に増加してみられたが、VMH 破壊7日後ではその発現細胞数が減少する傾向がみられた。また、胃壁のグレリン mRNA

の遺伝子発現は、VMH 破壊3日後では対照群に比べて有意に増加したが、7日後では正常の個体と同様になった。(井上・中里)

② VMH 破壊ラットの小腸組織の粘膜は偽 VMH 破壊の2倍に増高し、デオキシプロモクリプチンの取り込みは細胞増殖部のクリプトに限局していることを認めた。約30の既知の成長因子の遺伝子発現の検討では小腸組織における cyclooxygenase の遺伝子発現の増加を認めた。(井上)

③ VMH 破壊ラットの20%部分切除肝は偽 VMH 破壊ラットの20%部分切除肝と比較して PCNA 染色陽性細胞の増加とインスリン抗体染色細胞の増加及びインスリン分泌の上昇を認めた。(井上)

④ グレリンによる摂食亢進と成長ホルモン分泌作用は、迷走神経切除もしくはカプサイシン処置により抑制された。迷走神経求心性遮断により、グレリンによる NPY と成長ホルモン放出刺激ホルモン産生ニューロンの活性化が消去された。グレリン受容体は迷走神経節細胞内で合成され、グレリン末梢投与は迷走神経の電気活動を減少させた。グレリンの神経線維は、視床下部外側野のオレキシンニューロンに直接投射し、グレリンの脳室内投与によりオレキシン系を介した摂食亢進が認められた。グレリン投与は、癌による摂食量減少や体重減少を抑制した。(中里・塩田)

⑤ Wistar 系ラットを用いて、新生児

ラットから成熟ラットまで1週齢毎の胃グレリン含量を測定したところ、胃のグレリン含量は生後1週齢から5週齢まで漸増し、その後定常状態になった。グレリン産生細胞は妊娠18、20、22日目の胎児では粘膜上皮にわずかに認められただけであったが、生後1週間では壁細胞腺体部に、生後5週間では胃底部の腺底部から腺頸部にかけて広く認められた。1週齢ラットの8時間絶食は、胃グレリン含量を有意に低下させ、血漿グレリン濃度を有意に上昇させた。母体へのグレリンの投与は、新生ラットの誕生時の体重を性差なく有意に増大させた。1週齢と3週齢ラットへのグレリン皮下投与は成長ホルモン分泌を促進した。新生雌ラットへのグレリンの投与は、投与容量依存的に膣開放までの期間を短縮した。(寒川)

⑥ IL-1Ra 遺伝子欠損マウスのオスでは離乳後6週齢時より顕著な体重成長の停滞が認められることがわかった。また、IL-1Ra 遺伝子欠損マウスで、体内各部の白色脂肪組織の萎縮、低インスリン、低レプチン、低中性脂肪血症を示し、インスリン代謝異常、脂質代謝異常を示すことがわかった。制限食餌負荷を行ったところ、IL-1Ra 遺伝子欠損マウスは野生型よりも低い体重のままであったことから、IL-1Ra 遺伝子欠損マウスにおいては、体重維持機構の低下が起こっていることが示唆された。IL-1Ra 遺伝子欠損マウスのマウスでのインスリン産生、感受性を糖負荷・

インスリン負荷試験により検討したところ、IL-1Ra 遺伝子欠損マウスでは、糖刺激に対するインスリン産生の低下、組織への糖取込みに対する感受性の亢進が認められたが、脂肪酸放出抑制作用に対する感受性には差が認められなかった。(岩倉)

⑦ MSG の新生仔期の投与は、視床下部・弓状核神経、自律神経系の特異的な除去(神経細胞死)を起こし、成長後肥満が誘導される。この時、血中インスリンレベルの亢進も認められる。これに対し、IL-1Ra 遺伝子欠損マウスでは、MSG による肥満誘導が起こらず、血中インスリンレベルの上昇も起こらなかった。野生型マウスでは脂肪組織の顕著な増加も認められるが、IL-1Ra 遺伝子欠損マウスでは、わずかな増殖を示したのみであった。(岩倉)

⑧ DSS を投与して大腸炎を誘導したところ、IL-1 α 欠損マウス、I 型 IL-1 レセプター(IL-1RI)欠損マウスにおいて野生型と比較して顕著な体重減少、生存率の低下がみられた。また、IL-1 α 欠損マウスや IL-1RI 欠損マウスでは粘膜組織傷害がみられた。これらの結果から、IL-1 が腸管組織の恒常性の維持に関与していることを示唆された。(岩倉)

D. 考察

① VMH 破壊によって生じる胃粘膜上皮細胞の増殖に一致して胃粘膜のグレリン合成・分泌がおきることから、グレリンは胃粘膜上皮細胞の増殖に重

要な役割を果たしていることが示唆される。今後、VMH 破壊後の腸管上皮細胞の増殖にグレリンが直接作用しているのか、あるいは間接的に作用しているのかを明らかにする必要がある。さらに、他の未知の腸管粘膜上皮細胞増殖・再生因子の存在についてもひきつづき探索する必要がある。

② VMH 破壊ラットの小腸粘膜は増殖に伴ってプロスタグランジン産生酵素の発現増加が起こり、プロスタグランジン(特に PE₂)の産生増加が小腸粘膜の増殖に関与していることが示唆された。

③ VMH 破壊により、膵組織細胞の再生能が亢進していることが認められた。内分泌機能については β 細胞のインスリン分泌能は回復したが、 α 細胞のグルカゴン分泌能、D 細胞のソマトスタチン分泌能には影響がないことが明らかになった。外分泌機能については現在、検討中である。

④ グレリンの摂食亢進と成長ホルモン分泌促進作用は迷走神経節で合成されるグレリン受容体と神経末端で胃から内分泌もしくは傍分泌されるグレリンとが結合することにより生じている。また、視床下部でのグレリンの摂食亢進作用はオレキシン系を遮断することにより抑制されることから、従来から知られている NPY 系とは独立してオレキシン系を介している。

⑤ グレリンの末梢投与は、癌移植マウスのカヘキシアモデルにおいて、摂食低下の改善や体重減少抑制作用

をもつことが明らかになった。

⑥ 胎児期ラットの胃においてグレリン産生が認められた。母体へのグレリン投与は直接的もしくは成長ホルモンを介して間接的に胎児の体重を増加させること、新生児期のラットにおいてグレリンの投与により成長ホルモン分泌が促進することから、グレリンは成長ホルモン分泌、末梢グレリン受容体を介した同化作用に関与し、胎児期、新生児期における発育・発達に作用していると考えられる。また、グレリンの継続投与は雌ラットの膈開放を早めることから、性成熟にも関与していることを明らかにした。

⑦ IL-1Ra 遺伝子欠損マウスでみられる体重成長の停滞は、食欲の抑制によらず、体重維持機構の欠損であると考えられた。このマウスでは、血中中性脂肪量の低下、脂肪組織の顕著な萎縮を示し、インスリンの糖取込み作用に対する感受性が亢進している一方、脂質代謝への感受性が変わっていないことから、インスリンレベル低下による、脂肪取込みが障害されていると考えられる。

⑧ MSG 投与による神経除去性肥満、代謝異常は、視床下部・弓状核神経支配の下流のインスリン産生制御機構に IL-1 が作用することを明らかにした。腹内側核破壊ラットにおける肥満、高インスリン血症モデルにおいては、脳幹部をとる迷走神経系の活性化による異常が、同研究グループ、分担研究者井上らにより報告

されている。この MSG モデルにおいても、そうした副交感神経活性化が考えられ、IL-1Ra 遺伝子欠損マウスでは、過剰な IL-1 シグナルにより迷走神経活性の抑制が考えられる。今後、さらに肥満や糖尿病における IL-1 の果たす役割について、解析を進める予定である。

E. 結論

本年度の研究結果から、VMH 破壊により、胃粘膜、小腸粘膜の増殖が起こることを組織学的に確認した。2)VMH 破壊による肝、膵の増殖能の亢進は部分肝切除、部分膵切除の再生を促進することが明らかになった。3)VMH 破壊による腸管増殖・再生因子として、胃組織ではグレリン、小腸では cyclooxygenase によって産生されるプロスタグランジン E₂ が候補因子である可能性が示唆された。さらに、グレリンは、末梢投与で有効な同化作用を持つ内在性物質であることが判明し、末梢から中枢への新たな情報伝達システムの存在を明らかにした。グレリンは、胃上皮細胞再生に関与している可能性が示唆されており、肝細胞増殖作用も認められている。グレリンの受容体は全身臓器に発現していることから、グレリンのエネルギー同化促進作用は、本研究で示唆された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に加え、消化管再生の新たな治療薬としての可能性を示した。また、胎児期の未分化細胞の増殖作用や臓器形成にグレリンが作用している可能性を示唆

する結果が得られた。また、グレリン受容体は生殖器にも遺伝子の発現が認められていることから、生殖器の細胞発達、性成熟にも関与している可能性が考えられる。

IL-1 がエネルギー蓄積に重要な脂肪組織の増殖、およびインスリン代謝調節に作用していることが明らかになった。さらに IL-1Ra 欠損マウスが MSG 処理に完全に耐性を示したことから、中枢神経を介する脂質代謝制御、インスリン分泌制御に IL-1 が関与していることを示唆するとともに、アノレキシアやカヘキシア等の摂食低下症、糖尿病、脂質代謝異常症に対する新たな治療薬の標的として、IL-1 の制御因子や IL-1 の下流分子などが考えられることを示した。本研究の結果から、IL-1/IL-1Ra によって制御される代謝機構解明により肥満、脂質代謝、糖尿病治療の治療薬開発につながる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

岩倉洋一郎

1 Nakae, S., Komiyama, K., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M. and Iwakura, Y. Interleukin-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the

development of airway hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, (2003) in press.

2 Ohtaki, H., Funahashi, H., Dohi, K., Oguro, T., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Yin, L., Matsunaga, M., Goto, N., and Shioda, S. Suppression of oxidative neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion in mice lacking interleukin-1. *Neuroscience Res.*, (2003) in press.

3 Sashinami, H., Nakane, A., Iwakura, Y., and Sasaki, M. Effective induction of acquired resistance to *Listeria monocytogenes* by immunizing mice with *in vivo*-infected dendritic cells. *Infect. Immun.*, (2003) 71, 117-125

4 Li, H., Takeda, Y., Niki, H., Ogawa, J., Kobayashi, S., Kai, N., Akasaka, K., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y., and Watanabe K. Aberrant responses to acoustic stimuli in mice deficient for neural recognition molecule NB-2. Aberrant responses to acoustic stimuli in mice deficient for neural recognition molecule NB-2. *Eur. J. Neurosci.*, (2003)in press.

- 5 Tanaka, J., Ishida, T., Choi, B.-I., Watanabe, T., Yasuda, J., and Iwakura, Y. Latent HIV-1 reactivation in transgenic mice requires cell cycle-dependent demethylation of CREB/ATF sites in the LTR. *AIDS*, (2003) in press.
- 6 Nakae, S., Horai, R., Komiyama, Y., Nambu, A., Asano, M., Nakane, A., and Iwakura, Y. The role of IL-1 in the immune system. In “*Cytokine Knockouts*”, (ed. G. Fantuzzi), Humana Press, Totowa, NJ, (2003) in press.
- 7 Iwakura, Y. Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I tax gene. *Gann Monograph*, (2003) in press.
- 8 Nakae, S., Komiyama, Y., Narumi, S., Sudo, K., Horai, R., Tagawa, Y., Sekikawa, K., Matsushima, K., Asano, M., and Iwakura, Y. IL-1-induced TNF α elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- γ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response. *Int. Immunol.*, (2003) **15**, in press.
- 1 Ikegaya, Y., Delcroix, I., Iwakura, Y., Matsuki, N., and Nishiyama, N. Interleukin-1 β abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. *Synapse*, (2003) **47**, 54-57
- 10 Kurisaki, T., Masuda, A., Sudo, K., Sakagami, J., Higashiyama, S., Matsuda, Y., Nagabukuro, A., Tsuji, A., Nabeshima, Y., Asano, M., Iwakura, Y., and Sehara-Fujisawa, A. Phenotypic analysis of Meltrin a (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin a in adipogenesis and myogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, (2003) **23**, 55-61
- 11 Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., and Apte, R. N. Interleukin 1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2645-2650 (2003).
- 12 Kyuwa, S., Kawamura, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Urano, T., and Yoshikawa, Y. Differences between BALB/c and C57BL/6 mice in mouse hepatitis virus replication in primary hepatocyte culture. *Exp. Anim.*, **52**, 81-84 (2003).
- 13 Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y.,

- Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., and Seshima, M. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, in press.
- 14 Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- 15 Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H., and Iwakura, Y. Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J. Gen. Virol.*, (2002) **83**, 141-150
- 16 Yano, A., Mun, H.S., Chin, M., Norose, K., Hata, K., Kobayashi, M., Aosai, F., and Iwakura, Y. Roles of IFN- γ on stage conversion of an obligate intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*. *Int. Rev. Immunol.*, (2002) **21**, 405-421
- 17 Desaki, M., Sugawara, I., Iwakura, Y., Yamamoto, K., and Takizawa, H. Role of interferon- γ in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (2002) **185**, 1-7
- 18 Yoshida, M., Shirai, Y., Watanabe, T., Yamori, M., Iwakura, Y., Chiba T., Kita, T., and Wakatsuki, Y. Differential localization of colitogenic Th1 and Th2 cells monospecific to a microflora-associated antigen in mice. *Gastroenterology*. (2002) **123**, 1949-1961
- 19 Oguri, S., Motegi, K., Iwakura, Y., and Endo, Y. Primary role of interleukin-1 α and Interleukin-1 β in lipopolysaccharide-induced hypoglycemia in mice. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, (2002) **9**, 1307-1312
- 20 Kakuta, S., Shibata, S., and Iwakura, Y. Genomic structure of the mouse 2', 5'-oligoadenylate synthetase gene family. *J. Interferon Cytokine Res.*, (2002) **22**, 981-993
- 21 Sakamaki, K., Inoue, T., Asano, M., Sudo, K., Kazama, H., Sakagami, J., Sakata, S., Ozaki, M.,

- Nakamura, S., Toyokuni, S., Osumi, N., Iwakura, Y. and Yonehara, S. *Ex vivo* whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart. *Cell Death and Differentiation*, (2002) in press.
- 22 Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., and Iwakura, Y. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, resulting in the suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity*, (2002) **17**, 375-387
- 23 Yan, X., Kita, M., Minami, M., Yamamoto, T., Kuriyama, H., Ohno, T., Iwakura, Y., and Imanishi, J. Antibacterial effect of Kampo herbal formulation Hochu-ekki-to (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang) on *Helicobacter pylori* infection in mice. *Microbiol. Immunol.*, (2002) **46**, 475-482
- 24 Iwakura, Y. Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: Consideration from mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev.*, (2002) **13**, 341-355
- 25 Mizuki, M., Nakane, A., Sekikawa, K., Tagawa, Y.-I., Iwakura, Y. Comparison of host resistance to primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections in mice by intranasal and intravenous routes. *Infect. Immun.*, (2002) **70**, 4805-4811
- 26 Shiraishi, K., Hanada, K., Iwakura, Y., and Ikeda, H. Roles of RecJ, RecO, and RecR in RecET-mediated illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, (2002) **184**, 4715-4721
- 27 Minami, M., Kita, M., Yan, X.-Q., Yamamoto, T., Iida, T., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Imanishi, J. Role of IFN- γ and tumor necrosis factor- α in herpes simplex virus type I infection. *J. Interferon Cytokine Res.*, (2002) **22**, 671-676
- 28 Ishida, Y., Kondo, T., Ohshima, T., Fujiwara, H., Iwakura, Y., and Mukaida, N. A pivotal involvement of IFN- γ in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J.*, (2002) **16**, 1227-1236

- 29 Konishi, H., Tsutsui, H., Murakami, T., Yumikura-Futatsugi, S., Yamanaka, K., Tanaka, M., Iwakura, Y., Suzuki, N., Fuchs, E. V., Takeda, K., Akira, S., Nakanishi, K., and Mizutani, H. IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2002) **99**, 11340-11345
- 30 Sasaki, S., Omoe, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Sekikawa, K., Shinagawa, K., and Nakane, A. Roles of gamma interferon and tumor necrosis factor-alpha in shiga toxin lethality. *Microb. Pathog.*, (2002) **33**, 43-47
- 31 Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.*, (2002) **3**, 667-672
- 32 Yamamoto, S., Oka, S., Inoue, M., Shimuta, M., Manabe, T., Takahashi, H., Miyamoto, M., Asano, M., Sakagami, J., Sudo, K., Iwakura, Y., and Kawasaki, T. Mice deficient in nervous system-specific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J. Biol. Chem.*, (2002) **277**, 27227-27231
- 33 Mizushima, H., Cheng, J-Z., Dohi, K., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Hirabayashi, T., Arata, S., Nakajo, S., Takaki, A., Ohtaki, H., and Shioda, S. Reduced postischemic apoptosis in the hippocampus of mice deficient in interleukin-1. *J. comparative Neurol.*, (2002) **448**, 203-216
- 34 Asada, H., Kishida, T., Hirai, H., Satoh, E., Ohashi, S., Takeuchi, M., Kubo, T., Kita, M., Iwakura, Y., Imanishi, J., and Mazda, O. Significant antitumor effects obtained by autologous tumor cell vaccine engineered to secrete interleukin (IL)-12 and IL-18 by means of the EBV/lipoplex. *Molec. Therapy*, (2002) **5**, 609-616,
- 35 Oguro, T., Takahashi, Y., Ashino, T., Takaki, A., Shioda, S., Horai, R., Asano, M., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Yoshida, T. Involvement of tumor necrosis factor α , rather than interleukin-1 or nitric oxides in the HEME

- Oxygenase-1 gene expression by lipopolysaccharide in the mouse liver. *FEBS Letters*, (2002) **516**, 63-66
- 36 Battsetseg, B., Mamiro, K., Inoue, N., Makala, L., Nagasanw, H., Iwakura, Y., Toyoda, Y., Mikami, T., Fujisaki, K. Immune responses of interferon gamma (IFN- γ) knock out mice to repeated *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) nymph infestations. *J. Med. Entomol.*, (2002) **39**, 173-176
- 37 Asahi, Y., Yoshikawa, T., Watanabe, I., Iwasaki, T., Hasegawa, H., Sato, Y., Shimada, S., Nanno, M., Matsuoka, Y., Ohwaki, M., Iwakura, Y., Suzuki, Y., Aizawa, C., Sata, T., Kurata, T. and Tamura, S. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines. *J. Immunol.*, (2002) **168**, 2930-2938
- 38 Furuzawa, M., Kuwahara, M., Ishii, K., Iwakura, Y., and Tsubone, H. Diurnal variation of heart rate, locomotor activity, and body temperature in interleukin-1 α/β doubly deficient mice. *Exp. Anim.*, (2002) **51**, 49-56
- 39 Shinozawa, Y., Matsumoto, T., Uchida, K., Tsujimoto, S., Iwakura, Y., and Yamaguchi, K. Role of interferon-gamma in inflammatory responses in murine respiratory infection with *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.*, (2002) **51**, 225-230
- 40 Kyuwa, S., Shibata, S., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Machii, K., and Urano, T. Acute hepatic failure in IFN- γ -deficient BALB/c mice after murine coronavirus infection. *Virus Research*, (2002) **83**, 169-177
- 41 Nagai, Y., Shimazu, R., Ogata, H., Akashi, S., Sudo, K., Yamasaki, H., Hayashi, S., Iwakura, Y., Kimoto, M., and Miyake, K. Requirement for MD-1 in cell surface expression of RP105/CD180 and B-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood*. (2002) **99**, 1699-1705
- 42 Brough, D., LeFeuvre, R. A., Iwakura, Y., and Rothwell, N. J. Purinergic (P2X7) receptor activation of microglia induces cell death via an interleukin-1-independent mechanism. *Mol. Cell Neurosci.*, (2002) **19**, 272-280

43 Kakuta, S., Tagawa, Y., Shibata, S., Nanno, M., and Iwakura, Y. Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon- γ through direct inhibition of cell proliferation and activation of anti-tumor host mechanisms. *Immunology*, (2002) **105**, 92-100

44 Saijo, S., Asano, M., Horai, R., Yamamoto, H., and Iwakura, Y. Suppression of autoimmune arthritis in IL-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40L and OX40 expression on T cells. *Arth. Rheum.*, (2002) **46**, 533-544

寒川賢治

1 Hayashida, 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).

2 Okumura, H., Nagaya, N., Enomoto, M., Nakagawa, E., Oya, H., Kangawa, K. Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39, 779-783 (2002).

3 Yoshihara, 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).

4 Sugino, T., Hasegawa, Y., Kikkawa, Y., Yamaura, J., Yamagishi, M., Kurose, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Terashima, Y. A transient ghrelin surge occurs just before feeding in a scheduled meal-fed sheep. *Biochem Biophys Res Commun*, 295, 255-260 (2002).

5 Murakami, 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 secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol*, 174, 283-288 (2002).

6 Nakagawa, E., Nagaya, N., Okumura, H., Enomoto, M., Oya, H., Ono, F., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K. Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci (Lond)*, 103, 325-328 (2002).

- 7 Ariyasu, H., Takaya, K., Hosoda, H., Iwakura, H., Ebihara, K., Mori, K., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology*, 143, 3341-3350 (2002).
- 8 Kaiya, H., Van Der Geyten, S., Kojima, M., Hosoda, H., Kitajima, Y., Matsumoto, M., Geelissen, S., Darras, V. M., Kangawa, K. Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology*, 143, 3454-3463 (2002).
- 9 Date, 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 in rats. *Gastroenterology*, 123, 1120-1128 (2002).
- 10 Yoshimoto, A., Mori, K., Sugawara, A., Mukoyama, M., Yahata, K., Suganami, T., Takaya, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Nakao, K. Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 13, 2748-2752 (2002).
- 11 Iwakura, H., Hosoda, K., Doi, R., Komoto, I., Nishimura, H., Son, C., Fujikura, J., Tomita, T., Takaya, K., Ogawa, Y., Hayashi, T., Inoue, G., Akamizu, T., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Imamura, M., Nakao, K. Ghrelin expression in islet cell tumors: augmented expression of ghrelin in a case of glucagonoma with multiple endocrine neoplasm type I. *J Clin Endocrinol Metab*, 87, 4885-4888 (2002).
- 12 Sugino, T., Yamaura, J., Yamagishi, M., Ogura, A., Hayashi, R., Kurose, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Hasegawa, Y., Terashima, Y. A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochem Biophys Res Commun*, 298, 785-788 (2002).
- 13 Ikezaki, A., Hosoda, H., Ito, K., Iwama, S., Miura, N., Matsuoka, H., Kondo, C., Kojima, M., Kangawa, K., Sugihara, S. Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance

and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes*, 51, 3408-3411 (2002).

14 Kojima, M., Kangawa, K. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol*, 2, 665-668 (2002).

15 Hosoda, H., Kojima, M., Mizushima, T., Shimizu, S., Kangawa, K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*, 278, 64-70 (2003).

16 Hanada, T., Toshinai, K., Kajimura, N., Nara-Ashizawa, N., Tsukada, T., Hayashi, Y., Osuye, K., Kangawa, K., Matsukura, S., Nakazato, M. Anti-cachectic effect of ghrelin in nude mice bearing human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 301, 275-279 (2003).

17 Shimizu, Y., Nagaya, N., Isobe, T., Imazu, M., Okumura, H., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Kohno, N. Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res*, 9, 774-778 (2003).

18 Chu, C., Jin, Q., Kunitake, T., Kato, K., Nabekura, T., Nakazato, M., Kangawa, K., Kannan, H. Cardiovascular actions of central neuromedin U in conscious rats. *Regul Pept*, 105, 29-34 (2002).

井上修二

1 Suzuki, E., Kageyama, H., Nakaki, T., Kanba, S., Inoue, S., Miyaoka, H., Nitric oxide induced heat shock protein 70 mRNA in rat hypothalamus during acute restraint stress under sucrose diet. *Cell Mol Neurobiol*, in press, 2003

2 Kageyama, H., Kageyama, A., Endo, Y., Osaka, T., Nemoto, K., Hirano, T., Namba, S., Shioda, S., Inoue, S., Ventromedial hypothalamus lesions induce jejunal epithelial cell hyperplasia through an increase in gene expression of cyclooxygenase. *Int J Obes*, accepted, 2003

3 Wang, J., Osaka, T., Inoue, S., Orexin - A -sensitive site for energy expenditure localized in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.*, in press, 2003

4 Kanazawa, M., Xue, C, Y., Kageyama, H., Suzuki, E., Ito, R.,

- Namba, Y., Osaka, T., Kimura, S., Inoue, S., Effects of a high-sucrose diet on body weight and stress tolerance. *Nutr Rev*, in press, 2003
- 5 Ishikawa-Takate, K., Ohta, T., Moritaki, K., Gotou, T., Inoue, S., Obesity, weight change, and risks for hypertension, diabetes and hypercholesterolemia in Japanese men. *Eur J Clin Nutr*, in press, 2003
- 6 Kashiba, M., Oka, j., Ichikawa, R., Kasahara, E., Inayama, T., Kageyama, A., Kageyama, H., Osaka, T., Umegaki, K., Matsumoto, A., Ishikawa, T., Nishikimi, M., Inoue, S., Impaired ascorbic acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Free Rad Biol Med*, 33, 1221-1230, 2002
- 7 Kanazawa, M., Yoshiike, N., Osaka, T., Numba, Y., Zimmet, P., Inoue, S., Criteria and classification of obesity in Japan and Asia-Oceania. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 11, S732-S737, 2002
- 8 Kageyama, A., Hirano, T., Kageyama, H., Osaka, T., Namba, Y., Tsuji, M., Adachi, M., Inoue, S., Distinct role of adiposity and insulin resistance in glucose intolerance: Studies in VMH-lesioned obese rats. *Metab*, 51, 716-723, 2002
- 9 Osaka, T., Kobayashi, A., Inoue, S., Vagosympathoadrenal reflex in thermogenesis induced by osmotic stimulation of the rat intestines. *J Physiol*, 540, 665-671, 2002
- 10 井上修二、馬場茂明：肥満症治療の新しい考え方ー生活習慣病の治療との関連ー、*Medicament News*、1753,1-4,2003
- 11 井上修二：肥満の疫学、成人病と生活習慣病、32,1267-1272,2002
- 12 井上修二：治療効果を高めるための生活指導、循環 plus、3,2-5,2002
- 13 木下伊規子、田村明、加藤達雄、井上修二：若年女性における尿中 3-methylhistidine 排泄量に及ぼす食事因子と運動負荷の影響、日本臨床生理学学会雑誌、32,165-174,2002
- 14 伊藤禄郎、金澤真雄、井上修二：腓再生現象における視床下部腹内側核破壊の関与、東京医科大学雑誌、60,200-208,2002
- 15 井上修二：わが国における肥満の傾向、日本臨床、60(増刊 8)、119-127,2002

- 16 井上修二：標準体重とその考え方、日本臨床、60(増刊10)、773-778,2002
- 17 井上修二：肥満の臨床—最近の進歩、日本医事新報社、4094,1-11,2002
- 18 井上修二、金井幸子、鳥飼陽子：肥満の成因と生活習慣病の予防、Food style21,6,46-52,2002
- 19 井上修二：エネルギー代謝、食事指導のABC、日本医事新報社、東京、20-25, 2002
- 20 井上修二：脂質、食事指導のABC、日本医事新報社、東京、30-34, 2002
- 21 井上修二：たんぱく質、食事指導のABC、日本医事新報社、東京、35-39, 2002
- 22 井上修二：コレステロール、食事指導のABC、日本医事新報社、東京、75-79, 2002
- 23 井上修二：肥満症、やせ、食事指導のABC、日本医事新報社、東京、213-223, 2002
- 塩田清二**
- 1 Nonaka, N., Banks, WA., Mizushima, H., Shioda, S., Morley, JE. Regional differences in PACAP transport across the blood-brain barrier in mice: a possible influence of strain, amyloid β protein, and age. Peptides, 23(12) 2197-2202 (2002).
- 2 Takenoya, F., Finahashi, H., Matsumoto, H., Ohtaki, T., Katoh, S., Kageyama, H., Suzuki, R., Takeuchi, M., Shioda, S. Galanin-like peptide (GALP) is co-localized with α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) but not with neuropeptide Y (NPY) in the rat brain. Neurosci Letters, 331, 119-121(2002).
- 3 Dohi, K., Mizushima, H., Nakajo, S., Matsunaga, M., Shioda, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevents hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting Jun N-terminal kinase (JNK)/stress activated protein kinase (SAPK) and p38 signal transduction pathway. Regul Pept, 109, 83-88 (2002).
- 4 Guan, JL., Suzuki, R., Funahashi, H., Lu, S., Wang, QP., Yamada, S., Tsurugano, S., Shioda, S. Ultrastructural localization of orexin-1 receptor in pre- and post-synaptic neurons in the rat arcuate nucleus. Neuroscience Letters, 329, 209-212 (2002).
- 5 Zhou, CJ., Shioda, S.,