

- Kikuyama, S., Yada, T., Inagakai, N. Pleasure SJ. Pleiotropic effects of PACAP and multiple signaling pathways under its receptors in nervous system. *Curr Protein & Peptide Sci*, 3, 423-439 (2002).
- 6 Shioda, S., Waschek, JA. VIP & PACAP Receptors. In: *Structure and Function of GPCRs in the Nervous System*. Oxford University Press, Chapter 26 pp. 530-550 (2002).
- 7 Guan, JL., Uehara, K., Lu, SL., Wang, QP., Funahashi, H., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Shioda, S. Reciprocal synaptic relationship between orexin- and melanin-concentrating hormone-containing neurons in the rat lateral hypothalamus: a novel circuit implicated in feeding regulation. *Int J Obesity*, 26, 1523-1532 (2002).
- 8 Shioda, S., Zhou, CJ., Ohtaki, H., Yada, T. PACAP Receptor Signaling. In: *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*. Kluwer Academic Publications (Massachusetts, USA) , Chapter 5 pp.95-124 (2002).
- 9 Satoh, K., Ikeda, Y., Shioda, S, Tobe T, Yoshikawa T. Edarabone scavenges nitric oxide. *Redox Report*, 7, 219-222 (2002).
- 10 Zhou, CJ., Pleasure, SJ., Inagaki, N., Zhao, LX., Kikuyama, S., Shioda, S. ATP-binding cassette transporter ABCA2(ABC2) expression in the developing spinal cord and PNS during myelination. A comparative study with other glial markers. *J Comp Neurol*, 451, 334-351 (2002).
- 11 Wang, QP., Zadina, J., Guan, JL., Kastin, AB., Funahashi, H., Shioda, S. Endomorphin-2 immunoreactivity in the central dorsal horn of the rat spinal cord at the electron microscopic level. *Neuroscience*, 113, 593-605 (2002).
- 12 Wang, QP., Zadina, J., Guan, JL., Shioda, S. Morphological studies of the endomorphinergic neurons in the central nervous system. *Jap J Pharmacol*, 89, 209-215 (2002).
- 13 Mizushima, H., Zhou, CJ., Dohi, K., Matsumoto, H., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Hirabayashi, T., Arata, S., Nakajo, S., Yada, T., Takaki, A., Shioda, S. Reduced postischemic hippocampal apoptosis in mice deficient interleukin-1. *J Comp Neurol*, 448, 203-216 (2002).

- 14 Suzuki, R., Shimojima, H., Funahashi, H., Nakajo, S., Yamada, S., Guan, J.L., Tsurugano, S., Uehara, K., Takeyama, Y., Kikuyama, S., Shioda, S. Orexin-1 receptor immunoreactivity in chemically identified target neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, 324, 5-8 (2002).
- 15 Lu, S.L., Guan, J.L., Wang, Q.P., Uehara, K., Yamada, S., Date, Y., Nakazato, M., Kojima, M., Kangawa, K., Shioda, S. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett*, 321, 157-160 (2002).
- 16 Yamanaka, A., Tsujino, N., Funahashi, H., Honda, K., Guan, J.L., Wang, Q.P., Tominaga, M., Goto, K., Shioda, S., Sakurai, T. Orexins activate histaminergic neurons in the tuberomammillary nucleus via the OX2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 1237-1247 (2002).
- 17 Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Guan, J.L., Wang, Q.P., Funahashi, H., Sakurai, T., Shioda, S., Matsukura, S., Kangawa, K., Nakazato, M. Ghrelin-induced food intake is mediated via orexin pathway. *Endocrinology* (2003) (in press)
- 18 Tanaka Y, Yamada K, Zhou CJ, Zhao LX, Shioda S, Inagaki N. Temporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain. *J Comp Neurol*, 455, 353-367, (2002)
- 学会発表
19 櫻井純子、井上修二、中里雅光、伊達 紫、寒川賢治、舟橋久幸、塩田清二：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・解剖学雑誌 77(Suppl)・63・第 107 回日本解剖学会総会・全国学術集会（浜松、2002、3）
- 20 Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Shioda, S. The ultrastructure and synaptic relationships of the orexin receptor-1-like immunoreactive neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *解剖学雑誌* 77(Suppl)・70・第 107 回日本解剖学会総会・全国学術集会（浜松、2002、3）
- 21 Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Shioda, S. The ultrastructure and synaptic relationships of the orexin receptor-1-like immunoreactive neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *解剖学雑誌*

77(Suppl)・45・第3回アジア太平洋
国際解剖学会議 (浜松、2002、3)

22 Lu, S. Guan, J.-L., Wang, Q.-P.,
Shioda, S. Immunocytochemical
observation of ghrelin-containing
neurons in the rat arcuate nucleus.
解剖学雑誌 77(Suppl)・45・第3回ア
ジア太平洋国際解剖学会議 (浜松、
2002、3)

23 Katoh, S., Funahashi, H.,
Shimojima H., Shioda S.
Morphological evidence for neural
interactions between orexin and
the other feeding regulatory
factors in the hypothalamus. 解剖
学雑誌 77(Suppl)・52・第3回アジア
太平洋国際解剖学会議 (浜松、2002、
3)

24 舟橋久幸、加藤佐知、管 建蓮、
河野大輔、矢田俊彦、櫻井純子、井上
修二、伊達 紫、中里雅光、寒川賢治、
塩田清二：脳・視床下部におけるグレ
リン含有ニューロンと NPY ニューロ
ンとの神経相関・プログラム抄録・
26・GPCR リガンドの探求と機能解
析-ポストゲノム時代に向けて- (東
京・2002・5)

25 櫻井純子、井上修二、中里雅光、
伊達 紫、寒川賢治、松本寛和、舟橋
久幸、加藤佐知、影山晴秋、影山麻子、
塩田清二：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・

プログラム抄録・27・GPCR リガン
ドの探求と機能解析-ポストゲノム時
代に向けて- (東京・2002・5)

26 竹ノ谷文子、舟橋久幸、松本寛和、
大瀧徹也、加藤佐知、影山晴秋、鈴木
隆介、竹内正雄、塩田清二：視床下部
弓状核における Glanin-Like
Peptide(GALP)含有ニューロンの形
態学的研究・プログラム抄録・28・
GPCR リガンドの探求と機能解析-ポ
ストゲノム時代に向けて- (東京・
2002・5)

27 中町智哉、内山 実、松田恒平、
桜井 武、舟橋久幸、塩田清二：キン
ギョにおけるオレキシンの機能解析・
プログラム抄録・GPCR リガンドの探
求と機能解析-ポストゲノム時代に向
けて- (東京・2002・5)

28 中町智哉、内山 実、松田恒平、
桜井 武、舟橋久幸、塩田清二：キン
ギョにおけるオレキシンの機能解析・
プログラム抄録・第4回オレキシン研
究会 (東京・2002・5)

29 王 慶平、管 建蓮、桜井 武、
塩田清二：ラット背側縫線核における
オレキシン免疫陽性ニューロンの電顕
観察・プログラム抄録・第4回オレキ
シン研究会 (東京・2002・5)

30 鈴木隆介、舟橋久幸、矢田俊彦、
桜井 武、塩田清二：オレキシンリセ
プターの脳内分布とオレキシンニュー

ロンと摂食調節ニューロンの神経相
関・プログラム抄録・第4回オレキシ
ン研究会（東京・2002・5）

31 管 建蓮、王 慶平、伊達 紫、
中里雅光、案川賢治、桜井 武、舟橋
久幸、塩田清二：ラット弓状核におけ
るグレリンニューロンとオレキシ
ンニューロンの神経相関・プログラム抄
録・第4回オレキシ
ン研究会（東京・
2002・5）

32 塩田清二：摂食調節のニューロン
ネットワークとその意義・抄録集・
23・第5回日本アロマセラピー学会
総会（東京・2002・10）

33 竹ノ谷文子、舟橋久幸、加藤佐知、
影山晴秋、鈴木隆介、竹内正雄、塩田
清二：視床下部弓状核における
Galanin-like peptide(GALP)含有ニ
ューロンの形態学的研究・抄録集・
125・第23回日本肥満学会（京都・
2002・10）

34 舟橋久幸、矢田俊彦、塩田清二：
レプチンおよびオレキシ
ンによる弓状
核 NPY ニューロンの制御機構・抄録
集・125・第23回日本肥満学会（京
都・2002・10）

35 影山晴秋、影山麻子、遠藤泰久、
大坂寿雅、平野 勉、塩田 清二、井
上修二：ラット視床下部腹内側核破壊
は消化管の cyclooxygenase-1
mRNA を増加させる・抄録集・163・

第23回日本肥満学会（京都・2002・
10）

中里雅光
論文発表

1 Date Y, Nakazato M, Hashiguchi
S, Dezaki K, Mondal MS, 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.

2 Shiiya T, Nakazato M,
Yamaguchi H, Mizuta M, Date Y,
Mondal MS, 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.

3 Lu S, Guan JL, Wand QP,
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. *Neurosci
Lett*, 321: 157-160, 2002.

4 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. *Gastroenterology*, 123: 1120-1128, 2002.
- 5 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.
- 6 Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S.: Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 146: R1-R3, 2002.
- 7 Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS, 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.
- 8 Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, Nakahara K, Ida T, Mondal MS, 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.
- 9 Tanaka M, Naruo T, Nagai N, Kuroki N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S.: Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J Psychiatr Res*, 37: 17-22, 2003.
- 10 Hanada T, Toshinai K, Kajimura N, Nara-Ahizawa N, Tsukada T, Hayashi Y, 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.
- 11 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.
- 12 Ozaki Y, Onaka T, Nakazato M, Saito J, Kanemoto K, Matsumoto T, Ueta Y.: Centrally administered neuromedin U activates neurosecretion and induction of c-fos messenger ribonucleic acid in the paraventricular and supraoptic nuclei of rat. *Endocrinology*, 143: 4320-4329, 2002.

- 13 Nakazato M, Date Y, Mondal MS, Murakami N, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Matsuo H, Matsukura S.: Ghrelin: a novel peptide hormone involved in the regulation of growth hormone secretion and energy balance. *Endocrine J*, in press
- 14 Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Guan J, Wang Q, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M.: Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*, 144: 1506-1512, 2003
- 15 Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tarebe Y, Nagai N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S.: Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology*, in press
- 16 Shimada M, Date Y, Mondal MS, Toshinai K, Shimbara T, Fukunaga K, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Yoshimatsu H, Matsuo H, Nakazato M.: Somatostatin suppresses ghrelin secretion from the rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun*, in press
- 17 Mondal MS, Date Y, Murakami N, Toshinai K, Shimbara T, Kangawa K, Nakazato M.: Neuromedin U acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via corticotropin-releasing hormone system. *Am J Physiol*, in press
- 18 中里雅光：グレリン
日本内科学会雑誌 印刷中
- 学会発表
- 19 中里雅光、伊達 紫、寒川賢治、松倉 茂：視床下部グレリンニューロンと摂食関連ニューロンとの神経相関 第 77 回日本内分泌学会総会シンポジウム(2002)
- 20 中里雅光：胃グレリンの神経系を介する摂食調節情報の伝達に関する研究
- 21 第 23 回日本肥満学会 シンポジウム(2002)
- 22 中里雅光、伊達 紫、十枝内厚次、松倉 茂、矢田俊彦、塩田清二、寒川賢治：グレリンの摂食亢進機序および病態との関連
- 23 GPCR シンポジウム (2002)
- 24 Date Y, Nakazato M.: Ghrelin: a novel gastric peptide regulating feeding. *American*

Gastroenterological Association 2002 (2002)
(2002)

25 Nakazato M.: Hypothalamic
network of feeding by ghrelin. 9th
International Congress on Obesity
(2002)

Nakazato M.: Feeding regulation
by ghrelin. Regulatory Peptides

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

腸管臓器再生に於ける IL-1 の役割

分担研究者 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

IL-1 レセプターアンタゴニスト (Ra) 欠損マウスを作製したところ、痩せ形質を示すことを見いだした。このマウスではインスリン分泌が低下しており、このため脂肪蓄積が抑制されていることが分かった。また、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から、中枢神経系によるインスリン分泌制御に IL-1 が関与していることが示唆された。また、dextran sodium sulfate(DSS)誘導炎症性腸疾患モデルを用いて、腸管における IL-1 の機能を検討したところ、IL-1 を欠損することで大腸炎が悪化することがわかり、IL-1 が組織傷害時の炎症の惹起だけでなく、腸管組織の恒常性の維持に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

インターロイキン-1 (IL-1)は、免疫系のみならず神経、内分泌系においても生体のホメオスタシス維持にはたらく生理的メディエーターである。IL-1 は様々な臓器に作用し、細胞の増殖・分化や維持、またその機能発揮にはたらいていることが考えられる。IL-1 がさまざまな臓器の組織細胞の増殖、再生に関与している可能性を検討するため、我々が以前作製した IL-1 及びそのシグナルを阻害する IL-1 receptor antagonist (Ra)遺伝子欠損マウスを用いて、生体内での IL-1/IL-1Ra system の代謝制御、腸管組織の恒常性維持における役割を解析した。

B. 研究方法

① IL-1 α/β 及び IL-1Ra 遺伝子欠損マウス及び野生型 C57BL/6 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。

② 自由食、絶食48時間、絶食48時間後の再食4時間での食餌量変化、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。

③ 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。

④ 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。

⑤ 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 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。

② 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。

③ DSSを投与して大腸炎を誘導したところ、IL-1 α β 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 β 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寄与していることが示唆された。

D. 考察

① 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り、脂肪取込みが障害されていると考えられる。

② 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、脳幹部をとおる迷走神経系の活性化によってこれらの異常が引き起こされることが、当研究グループの分担研究者である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、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、脂質代謝異常、糖尿病など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

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.
- 9 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-

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

腸管増殖・再生因子としてのグレリンの発現調節

分担研究者 寒川 賢治 国立循環器病センター研究所 生化学部長

グレリンは胃の内分泌細胞から産生され、下垂体での成長ホルモン分泌刺激作用と視床下部での摂食亢進作用をもつペプチドホルモンである。グレリン受容体は全身臓器に発現しており、グレリンの同化作用は胎児および新生児期の発育に重要な役割を持つ可能性がある。今回、グレリンの胎児の発育への影響、新生児期にあるラットのグレリン産生能とグレリンに対する反応性、さらに性成熟におよぼすグレリンの影響について解析した。その結果、グレリンの胎児期、新生児期の発育・発達、および性成熟への作用を明らかにした。

A. 研究目的

我々は、1999年に、オーファン受容体であった成長ホルモン（GH）分泌促進因子受容体の内因性リガンドとして、グレリンと名付けた新規ペプチドをラットおよびヒトの胃から発見した。グレリンは、強力なGH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。グレリンは、既知の消化管ホルモン産生細胞とは異なり、胃における主要な内分泌細胞であるがこれまで分泌顆粒の内容物が不明であったX/A様細胞から産生される。また、グレリンは脳視床下部の弓状核とその周囲でも産生される。

一方、我々はすでに、グレリンが静脈内もしくは脳室内投与により、摂食行動の活性化、体重増加、エネルギー代謝の低下、体脂肪量の増加などの同化作用を示すことを明らかにしている。さらに、グレリンの

ヒト静脈内投与は、心拍出量の増大や血圧を低下させるなどの循環系にも作用することを明らかにした。

本研究では、グレリンの腸管増殖・再生因子としての意義を明らかにするため、ラットの胃におけるグレリン産生能を検討するとともに、成熟期において認められたグレリンの同化作用が、胎児期・新生児期の発育・発達、および性発達にも作用するかどうかについて解析した。

B. 研究方法

実験動物

本研究には Wistar 系雄ラット（約 400 g）と雌ラット（約 250 g）を用いた。

2) グレリン濃度の測定

組織中および血中グレリン濃度は、われわれが開発したグレリンに特異的な高感度ラジオイムノアッセイ（RIA）法で測定した。血漿中グレリンは Sep-Pak 抽出後、

測定した。

3) 発育過程におけるグレリン産生能の検討

(i) 新生児ラットから成熟ラットまで 1 週齢毎 (1~9 週齢) に胃を採取し、グレリンの測定を行った。

(ii) ラットの妊娠 18、20、22 日目の雌ラットから胎児を採取した。また、1 週齢、5 週齢ラットからも胃を採取し、抗グレリン血清によって免疫染色を行った。

(iii) 1 週齢ラットに 8 時間のミルク制限をした後、採血および胃を採取し、グレリンの測定を行った。

4) 胎児期・新生児期の発育におけるグレリンの作用

妊娠ラットに妊娠 15 日目から 22 日目までグレリン (3 nmol) を毎日 3 回 (8:00、13:00、17:00) 皮下投与し、新生ラットの体重を測定した。1 週齢と 3 週齢のラットの皮下にグレリン (1 nmol) を投与し、20 分後に断頭採血し、血漿 GH 濃度を RIA 法で測定した。

5) 性発達におけるグレリンの作用

グレリンの性成熟作用をみるために、低用量群はグレリンを誕生から生後 15 日目まで 0.5 nmol、生後 16 日目から 30 日目まで 1 nmol、生後 31 日目から膣開放まで 1.5 nmol、高用量群は誕生から生後 15 日目まで 1.0 nmol、生後 16 日目から膣開放まで 1.5 nmol を毎日皮下に投与した。

(倫理面への配慮)

本研究の実験動物を用いた研究においては、実験動物飼養および保管に関する基準、当該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。胃グレリンの免疫染色の結果、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。

2) 1 週齢ラットの 8 時間ミルク制限は、胃グレリン含量を有意に低下させ ($P < 0.05$)、血漿グレリン濃度を有意に上昇させた ($P < 0.05$)。

3) 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 ($P < 0.05$)。また、1 週齢と 3 週齢ラットへのグレリン皮下投与は GH 分泌を促進した。

4) 新生ラットへのグレリンの投与は、雌ラットの膣開放までの期間を容量依存的に短縮させた。

D. 考察

GH 分泌促進因子受容体 (グレリン受容体) の内因性リガンドとして発見されたグレリンは、末梢投与によって唯一摂食を亢進させるペプチドである。グレリンの GH 分泌と摂食調節における情報は、胃から内分泌もしくは傍分泌することにより迷走神経の求心路を介して中枢に伝達される。グレリンは骨形成や細胞増殖への関与も指摘されており、全身臓器に発現しているグレリン受容体を介して様々な同化作用を示している。胎児期ラットの胃においてグレリン産生が認められた。胎児期においてグレリンの摂食亢進作用は意味をなさず、また

新生児期においてもグレリン投与による余剰のミルク摂取は生じない。新生児期のラットにおいてグレリンの投与により GH 分泌が促進すること、母体へのグレリン投与が直接的もしくは GH を介して間接的に胎児の体重を増加させることから、グレリンが GH 分泌や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、新生ラットへのグレリンの継続投与は雌ラットの膣開放を早めることから、性成熟にも関与していることが明らかとなった。

E. 結論

グレリンは新規の GH 分泌促進ペプチドであり、下垂体からの GH 分泌促進だけでなく、循環器への作用、エネルギー代謝調節、骨粗鬆症の抑制などの生理作用を持つ。グレリンがヒトとラットの胃から発見されたことにより、胃が GH 分泌や摂食調節に重要な役割を担っていることが判明した。グレリン受容体は、全身臓器に発現し、グレリンが骨形成や細胞増殖に寄与している可能性が明らかになりつつある。本研究の結果は、胎児期の未分化の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ものである。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、生殖器の発達、性成熟にも関与していると考えられる。グレリンは未分化細胞の分化促進や細胞増殖作用を持つ可能性があり、腸管増殖・再生に関わる新たな因子として、再生治療薬の開発に繋がることが期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 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).