

- 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).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

研究協力者

細田洋司 (京都大学医学部)

村上 昇 (宮崎大学農学部)

厚生労働科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
分担研究報告書

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

分担研究者 井上 修二 共立女子大学家政学部教授

研究要旨

本研究の目的は視床下部腹内側核 (VMH) 破壊によって発生する腹部臓器 (胃、小腸、大腸、肝、膵) の 1)増殖組織細胞の組織学的機能的検討を行い、2)その増殖機能亢進が臓器の再生機能亢進に結びつくのか、さらに3)増殖・再生機能亢進に寄与する増殖・再生因子を探索して、再生医療に役立てることである。

今年度は 1)VMH 破壊により胃、小腸粘膜の増殖が惹起されていることを組織学的に明らかにした、2)VMH 破壊による増殖能の亢進は部分切除肝、部分切除膵の再生を促進していることを明らかにした、3)VMH 破壊による増殖・再生因子の候補因子に胃組織においてはグレリン、腸管組織においては cyclooxygenase によって誘導されるプロスタグランジン E<sub>2</sub> が考えられることを示唆する結果をえた。

A. 研究目的

視床下部腹腔内側核 (VMH) 破壊ラットは VMH 破壊後の迷走神経活動上昇に起因して、迷走神経の密に分布する腹部臓器 (胃、小腸、大腸、肝、膵) 組織細胞の増殖を示す。本研究の目的は 1)増殖組織細胞を組織学的機能的に検討し、2)その増殖機能亢進が臓器の再生機能亢進に結びつくのか、さらに、3)増殖・再生機能亢進に寄与する増殖・再生因子を探索して、再生医療に役立てることである。

B. 研究方法

本年は 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 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。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては動物愛護の立場から、動物に対して必要最小限の苦痛を与えるにとどめるよう細心の注意のもとに実施した。

### C. 研究結果

1)VMH 破壊ラットの胃粘膜は HE 染色で粘膜層の増高、細胞核染色で破壊後 3 日を peak とする狭部細胞増殖帯における核染色陽性の増加及び破壊後 3 日を peak とする粘膜層下部におけるグレリン染色陽性の増加を認めた。

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局限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。

3)VMH 破壊ラットの 60%部分切除肝の重量、DNA 量の回復は偽 VMH 破壊ラットの 60%部分切除肝よりも約 2 倍促進された。

4) 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。

### D. 考察

1)VMH 破壊により胃粘膜組織細胞は増殖していることが確認できた。又 VMH 破壊によりグレリン産

生も亢進していることを見出した。胃で産生されるグレリンには成長ホルモン分泌促進、摂食促進作用の他に肝細胞の増殖作用があることが報告されているので、VMH 破壊ラットの胃粘膜細胞増殖にグレリンが関与していることが示唆された。

2)VMH 破壊ラットの小腸粘膜は増殖していることを確認できた。cyclogenase はプロスタグランジン産生酵素であるが、この酵素の mRNA の増加はこの酵素活性上昇を介したプロスタグランジン(特に  $PE_2$ )産生増加がその増殖に関与していることが示唆された (Int.J.Obes.accepted)。

3)VMH 破壊により肝の再生能が亢進していることが示唆された。この再生肝の生理組織的機能についてさらに検討する予定である。

4)VMH 破壊により、膵組織細胞の再生能が亢進していることを確認できた。内分泌機能については  $\beta$  細胞のインスリン分泌能は回復したが、 $\alpha$  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(東京医大雑誌, in preparation for English paper)。外分泌機能については現在、検討中である。

### E. 結論

1)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・再生因子に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 E<sub>2</sub> が候補因子である可能性が示唆された。

## F. 研究発表

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., Namba, 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、日本臨床生理学会雑誌、32,165-174,2002
- 14 伊藤禄郎、金澤真雄、井上修二：睥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：肥満の臨床ー最近の進歩、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 style*21,6,46-52,2002
- 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

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究研究事業）  
（分担）研究報告書

## 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

分担研究者 塩田 清二 昭和大学医学部 教授

### 研究要旨

グレリンが胃・腸管上皮細胞の増殖・再生に関与している可能性が本実験によって明らかになった。

#### A. 研究目的

グレリンは、1999 年、成長ホルモン（GH）分泌刺激物質受容体（GHS-R）の内因性リガンドとしてラット胃から発見された新規のペプチドである。また、グレリンは胃腺の頸部から底部にかけて散在的に分布して存在する A-like 細胞で産生され、血中に分泌されるホルモンである。また、絶食したラットにおいては胃におけるグレリンの発現量が増加したことから、摂食促進作用をもつと考えられている。一方、脳内の満腹中枢である視床下部の腹内側核（VMH）破壊により胃壁、腸管壁ならびに膵臓の内分泌部の増殖がおきる。しかもグレリンは脳内の食欲中枢にも存在している。そこで、VMH 破壊に伴う摂食亢進過程におけるグレリンの機能をしらべるために、VMH 破壊後の胃体部の壁の形態変化の詳細とグレリン産生能との関係を形態学的にしらべた。

#### B. 研究方法

SD 系雌ラットを用い、VMH 破壊

群と Sham 群を作成した。VMH を破壊してから 3 日後および 7 日後に 4% パラホルムアルデヒドを含む固定液で左室より灌流固定し、パラフィン切片および凍結切片を作製した。グレリンの発現分布については抗グレリン抗体を用いて免疫組織化学を行い、ABC 法、DAB 発色反応により可視化した。胃壁における粘膜上皮細胞の増殖能については、Ki-67（細胞増殖マーカー）の発現分布をしらべた。動物個体から採取した胃壁のパラフィン切片に熱処理を施した後、抗 Ki-67 抗体を用いて免疫染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

#### C. 研究結果

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。

#### D. 考察

以上の実験・観察結果から、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可能性が示唆される。また VMH 破壊後の腸管上皮細胞の増殖にグレリンが直接あるいは間接的に作用しているか否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の増殖・再生に関与する因子の存在についてもひきつづき検索する必要がある。

#### E. 結論

グレリンが胃・腸管上皮細胞の増殖・再生に関与している可能性が本実験によって明らかになった。さらに未知の腸管増殖・再生因子についても検索していく必要があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

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  $\beta$  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  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -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., 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）

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）  
1.

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

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

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

分担研究者 中里雅光 宮崎医科大学第三内科

**研究要旨** グレリンは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、細胞の増殖、分化、成熟に関係している可能性がある。今回、胃で産生される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た。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。

**A. 研究目的**

オーファン受容体であった成長ホルモン分泌促進因子受容体の内因性リガンドとして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り、胃で2番目に多い内分泌細胞である。グレリンはまた、脳視床下部でも産生される。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おり、これらの臓器の細胞の増殖、分化、成熟に関係している可能性がある。本研究では、主にグレリンのエネルギー代謝調節作用に関する基礎・臨床的研究を行い、グレリンの生理作用の機序を解析した。

グレリンの摂食亢進作用は、アノレキシア-カヘキシア症候群へ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 または G361 細胞株）をヌードマウスに移植すると、カヘキシアが起

こ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カヘキシアモデルマウス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**

Wistar 系雄ラット（300—350 g）を用いて、迷走神経の求心性と遠心性作用の両方を切断した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た。両者にグレリン（1.5 nmol）を静脈内投与し、2時間摂餌量の測定と投与後 5、10、15、20、30、60 分の血中成長ホルモン濃度の RIA 法による定量を行った。迷走神経切除ラットとカプサイシン処置ラットにグレリン（1.5 nmol）を静脈内投与し、神経活性化の指標である Fos 蛋白と視床下部のニューロペプチド Y（NPY）および成長ホルモン放出刺激ホルモン（GHRH）ニューロンとの二重免疫染色を行った。迷走神経節のグレリン受容体 mRNA 発現を RT-PCR 法と *in situ* ハイブ

リダイゼーション法で解析した。迷走神経を迷走神経節よりも末梢側 20 mm で結紮し、16 時間後に採取し、オートラジオグラフィ法によってグレリン受容体の末梢への移行性を解析した。グレリン (1.5 nmol) およびコレシストキニン (1.5 nmol) を静脈内投与し、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神経線維を二重免疫法で蛍光顕微鏡もしくは電子顕微鏡を用いて観察した。グレリン (500 pmol) を脳室内に投与し、Fos 蛋白とオレキシンおよびメラニン凝集ホルモン (MCH) 産生ニューロンとの二重免疫染色を行った。抗オレキシン抗体および抗 MCH 抗体を前投与した後にグレリン (200 pmol) を投与し、2 時間の摂餌量を測定した。NPY Y1 受容体の拮抗剤と抗オレキシン抗体を共投与後グレリンを投与し、2 時間の摂餌量を測定した。グレリン (200 pmol) をオレキシン欠損マウスの脳室内に投与し、2 時間の摂餌量を測定した。6 週齢 BALB/c-nu/nu mice の背部皮下に SEKI または G361 細胞あるいはメEDIUMを注入し、体重、摂餌量および癌重量を毎日計測した。SEKI または G361 移植群の体重が減少した直後から合成ヒトグレリン (3 nmol/マウス) あるいは生食を 1 日 2 回腹腔内投与し、計 6 群を解析した。投与 7 日目に組織を採取し、胃グレリンペプチド量を RIA 法で、mRNA 発現をノーザンプロット解析にて検討した。

(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

迷走神経を切断したラットおよび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では、グレリンによる摂食促進作用は起こらなかった。一方、脳室内に投与したグレリンは迷走神経切断やカプサイシン前投与にも拘わらず、摂食亢進作用を示したラットへのグレリンの静脈内投与は、視床下部の NPY ニューロンや GHRH ニューロンを活性化したが、迷走神経遮断ラットへのグレリン投与では、これらの神経細胞を活性化しなかった。グレリン受容体は迷走神経求心性ニューロンで産生され、求心線維末端へ輸送される。またグレリンの静脈内投与は、迷走神経胃枝求心線維の電気活動を抑制する。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。

グレリンの神経線維は視床下部弓状核より視床下部外側野に投射しており、オレキシンニューロンとシナプスを形成していた。グレリンの脳室内投与によりオレキシンニューロンの  $23 \pm 8\%$  に Fos 蛋白が発現したが、MCH ニューロンには発現しなかった。グレリンの摂食亢進作用は抗オレキシン抗体を前投与することによって抑制され、NPY Y1 受容体の拮抗剤を共投与することにより消去された。グレリンの摂食亢進作用はオレキシン欠損マウスにおいて野生型マウスと比べて有意に低かった。

SEKI 移植後約 2 週間で、また G361 で

は移植後 4 日間で体重は減少に転じ、対照群（メディウム移植群）と比べて体重、摂餌量ともに全経過を通じ、低かった。対照群へのグレリン投与により体重、摂食量ともに生食投与群よりも高値を示した。SEKI または G361 移植群においても、グレリン投与により摂食量の低下と体重減少が有意に抑制された。癌重量は両群で差を認めなかった。カヘキシアの原因とされる白血病抑制因子（LIF）の血漿中濃度は SEKI 移植群で高値（ $4.6 \pm 0.4$  ng/ml）を示し、グレリン投与による変化は認めなかった。内臓脂肪量、血漿中遊離脂肪酸濃度および血漿中レプチン濃度は SEKI および G361 移植群において対照群よりも低値を示し、グレリン投与によって増加する傾向が認められた。

#### D. 考察

胃で産生されるグレリンは成長ホルモン分泌を亢進するばかりでなく、これまで明らかになった摂食亢進作用を持つ神経ペプチドの中で唯一、末梢投与によって摂食を亢進させる。グレリンの摂食亢進作用は、迷走神経の求心路を遮断することにより消去され、成長ホルモン分泌作用は抑制される。さらに、グレリンの末梢投与により迷走神経求心路の電気活動は減少する。このことからグレリンの情報は、迷走神経の求心路を介して中枢に伝達されていると考えられる。グレリン受容体は迷走神経節によって合成され、迷走神経の神経線維内を末梢に輸送されていることを明らかにした。グレリンは胃から内分泌もしくは傍分泌することにより、迷走神経を介して成長ホルモン分泌や摂食亢進に作用している。

グレリン神経線維は、視床下部外側野にあるオレキシン産生ニューロンに投射しており、グレリンの中枢投与はオレキシンニューロンを活性化させることを明らかにした。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、部分的に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ことが示唆された。

グレリンの成長ホルモン分泌や摂食亢進などの同化に関与する作用は、癌移植マウスのカヘキシアモデルにおいて、摂食低下の改善および体重減少抑制作用を示した。

#### E. 結論

グレリンはヒト、ラット胃より単離・同定された新規の成長ホルモン分泌促進ペプチドで下垂体からの成長ホルモン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。グレリンの発見により、胃が成長ホルモン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、全身臓器に発現しており、グレリンは骨形成や強心作用、糖代謝などにも機能していることが明らかにされつつある。グレリンの摂食亢進と成長ホルモン分泌作用に注目し、胃で産生されるグレリンがどのように中枢性の作用を惹起させるのかについて解析を行った。グレリンの作用機序を明らかにすることは、より有効な投薬法の確立に貢献できるものと考えられる。末梢から中枢への新たな情報伝達システムの存在が明らかとなり、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ばかりでなく消化管再生の新たな治療薬としての可能性を示した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

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  $\alpha$ -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)

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

26 Nakazato M.: Feeding regulation by  
ghrelin. Regulatory Peptides 2002  
(2002)

## 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

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (岩倉洋一郎)

## 書籍

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	In press		2003
Iwakura, Y.	Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-1 tax gene.	Gann Monograph	In press		2003

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Asada, H., Kishida, T., Hirai, H., Iwakura, Y., Imanishi, J., and Mazda, O.	Anti-melanoma immune responses induced by autologous tumor cell vaccine engineered to express interleukin (IL)-12 and IL-18 by means of the EBV/lipoplex.	6th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Washington DC	6	4-8	2003
Voronov, E., Shouval, D. S., Krelm, 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	In press		2003
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.	In press		2003
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.	In press		2003

Sashinami, H., Nakane, A., Iwakura, Y., and Sasaki, M.	Effective induction of acquired resistance to <i>Listeria monocytogenes</i> by immunizing mice with <i>in vivo</i> -infected dendritic cells.	<i>Infect. Immun.</i>	71	117-125	2003
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.	<i>Eur. J. Neurosci.</i>	In press		2003
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.	<i>AIDS</i>	17	167-175	2003
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 $\alpha$ elicits inflammatory cell infiltration in the skin by inducing interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in the elicitation phase of contact hypersensitivity response.	<i>Int. Immunol.</i>	15	251-260	2003
Ikegaya, Y., Delcroix, I., Iwakura, Y., Matsuki, N., and Nishiyama, N.	Interleukin-1 $\beta$ abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission.	<i>Synapse</i>	47	54-57	2003
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 $\alpha$ (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin $\alpha$ in adipogenesis and myogenesis.	<i>Mol. Cell. Biol.</i>	23	54-57	2003
Yano, A., Mun, H.S., Chin, M., Norose, K., Hata, K., Kobayashi, M., Aosai, F., and Iwakura, Y.	Roles of IFN- $\gamma$ on stage conversion of an obligate intracellular protozoan parasite, <i>Toxoplasma gondii</i> .	<i>Int. Rev. Immunol.</i>	21	405-421	2002
Desaki, M., Sugawara, I., Iwakura, Y., Yamamoto, K., and Takizawa, H.	Role of interferon- $\gamma$ in the development of murine bronchus-associated lymphoid tissues induced by silica <i>in vivo</i> .	<i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i>	185	1-7	2002

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.	<i>Gastroenterology</i>	123	1949-1961	2002
Oguri, S., Motegi, K., Iwakura, Y., and Endo, Y.	Primary role of interleukin-1 $\alpha$ and Interleukin-1 $\beta$ in lipopolysaccharide-induced hypoglycemia in mice.	<i>Clin. Diagn. Lab. Immunol.</i>	9	1307-1312	2002
Kakuta, S., Shibata, S., and Iwakura, Y.	Genomic structure of the mouse 2', 5'-oligoadenylate synthetase gene family.	<i>J. Interferon Cytokine Res.</i>	22	981-993	2002
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.	<i>Ex vivo</i> whole-embryo culture of caspase-8-deficient embryos normalize their aberrant phenotypes in the developing neural tube and heart.	<i>Cell Death and Differentiation</i>	9	1196-1206	2002
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.	<i>Immunity</i>	17	375-387	2002
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 <i>Helicobacter pylori</i> infection in mice.	<i>Microbiol. Immunol.</i>	46	475-482	2002
Iwakura, Y.	Roles of IL-1 in the development of rheumatoid arthritis: Consideration from mouse models.	<i>Cytokine Growth Factor Rev.</i>	13	341-355	2002
Mizuki, M., Nakane, A., Sekikawa, K., Tagawa, Y.-I., Iwakura, Y.	Comparison of host resistance to primary and secondary <i>Listeria monocytogenes</i> infections in mice by intranasal and intravenous routes.	<i>Infect. Immun.</i>	70	4805-4811	2002
Shiraishi, K., Hanada, K., Iwakura, Y., and Ikeda, H.	Roles of RecJ, RecO, and RecR in RecET-mediated illegitimate recombination in <i>Escherichia coli</i> .	<i>J. Bacteriol.</i>	184	4715-4721	2002
Minami, M., Kita, M., Yan, X.-Q., Yamamoto, T., Iida, T., Sekikawa, K., Iwakura, Y., and Imanishi, J.	Role of IFN- $\gamma$ and tumor necrosis factor- $\alpha$ in herpes simplex virus type I infection.	<i>J. Interferon Cytokine Res.</i>	22	671-676	2002