

20030353

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

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

H15-ゲノム-002

平成15年度 総括・分担研究報告書  
主任研究者 岩倉 洋一郎  
平成16(2004)年 4月

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

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－

H15-ゲノム-002

# 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	----- 21
岩倉洋一郎	
2. 腸管増殖・再生因子としてのグレリンの機能解析—肝再生におけるグレリンの 治療効果の検討	----- 29
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	----- 34
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	----- 38
塩田清二	
5. 新規消化管ホルモン グレリンの腸管増殖・再生因子としての機能解析	----- 48
中里雅光	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 61

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肝、膵等の腹部臓器の細胞増殖能が高まり、インスリン分泌が亢進する事を見いだした。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した。本年度は、視床下部破壊によるインスリン分泌の亢進にIL-1が関与することを明らかにするとともに、IL-1下流で膵臓で発現誘導される遺伝子をマイクロアレイを用いて解析した。また、グレリンの腸管増殖、再生因子としての可能性を検討した。

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）

A. 研究目的

視床下部腹内側核（VMH）破壊ラットでは腹部臓器（胃、小腸、大腸、肝、膵）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 $\beta$ 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、視床下部破壊に伴う、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、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）の開発を目的とした。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。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 ( $\beta$ 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る。

## B. 研究方法

グルタミン酸一ナトリウム(MSG) あるいは食塩水を新生仔期のマウス (IL-1Ra 欠損マウスを8代以上 C57BL/6 に戻し交配したホモ欠損マウス、及び野生型 C57BL/6 マウス) に7日間腹腔内に投与し(4 mg/BWg)、離乳後の体重変化、脂肪重量、血中インスリン濃度に対する影響を検討した。

MSG/saline 処理マウスに、 $\alpha$ -アドレナリン作動薬(clonidine : i.p. 5 $\mu$ g/kg)、或いは、ムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬(atropine methyl bromide : i.p. 20mg/kg)投与を行い、30分後の血中グルコース、インスリンを測定した。

MSG/saline 処理マウスに $\beta$ アドレナリン作動薬(isoproterenol : i.p. 20mg/kg/day)投与を30日間行い、脂肪蓄積量を検討した。

— 神経支配によるインスリンの分泌制御機構に關与する遺伝子を同定するため、IL-1Ra 欠損マウス、及び野生型 C57BL/6 マウスを MSG 及び生理的食塩水処理によって膵臓で発現変動する遺伝子を Affimetrix 社製の Genechip を用いて解析した。

Wistar 系雄ラット (6週齢) を用いて、大腿静脈よりグレリン (30  $\mu$ g/kg) または生理的食塩水を静脈内投与し、Western blot 法にて MAP キナーゼの活性化を解析した。

Wistar 系雄ラット (5週齢) を用いて、ジメチルニトロサミン (DMN) 溶液 (1%、1 ml/kg) を週連続3日間腹腔内投与し、薬剤性肝硬変モデルラットを作製した。また、グレリン (3、30  $\mu$ g/kg) または生理的食塩水を毎日1日1回皮下投与した。DMN およびグレリン投与を5週間行い、肝障害の程度を解析した。さらに、DMN 投与を6週間、およびグレリン投与を8週間行い、生存率に改善効果を検討した。

Wistar 系雄ラット (11週齢) を用いて、エーテル麻酔下に肝臓の70%を切除した。切除前後3日間に1日2回グレリン (30  $\mu$ g/kg) または生理的食塩水を皮下投与し、切除後4日目に残肝の再生能を評価した。

Sprague-Dawley 系雌ラットを用い、VMH 破壊群と Sham 群を作製し、VMH 破壊後3日目、7日目および10日目の胃と空腸における形態の変化、胃グレリン含量、血漿グレリン濃度、グレリン遺伝子発現および胃体部グレリン細胞を、ラジオイムノアッセイ法、ノーザンブロット法、免疫組織化学にて検討した。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。一方空腸の絨毛の増殖能については、PCNA (細胞増殖マーカー) の発現分布を検討した。

48時間絶食及び60%エタノール負荷による胃粘膜病変誘発試験を行い、胃粘膜病変とその攻撃因子及び防御因子との関係を検討した。

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、小腸組織の増殖との関係を検討した。

肝の 60%部分切除を施行し肝の再生能を検討した。

膵の 40%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。

細胞培養により、Hela 細胞の増殖に対する VMH 破壊ラットの血清添加の効果を検討した。

### C. 研究結果

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破壊（神経細胞死）を起こし、VMH 破壊と同様に成長後肥満が誘導されることが知られている。この時、やはり VMH 破壊と同じく、血中インスリンレベルの亢進（高インスリン血症）が引き起こされる。マウスで VMH を破壊することが難しいことから、MSG モデルを用いて、視床下部神経による腸管臓器細胞増殖、インスリン分泌制御機構を検討した。これまで、岩倉らは IL-1Ra 欠損マウスでは脂肪の蓄積効率が悪く、これはインスリンの分泌が少ないためであることを明らかにしていたが、興味深いことに、このマウスでは、MSG による肥満誘導が起らず、血中インスリンレベルも上昇しないことがわかった。この結果は、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を示唆する。

MSG 処理によるインスリン分泌亢

進のメカニズムを知るために、 $\alpha$ -アドレナリン作動薬（clonidine）の作用を検討したところ、MSG 処理群では顕著なインスリンレベルの低下が認められ、感受性が亢進していることが示された。この結果は、MSG 処理マウスでは $\alpha$ -アドレナリン受容体を介したシグナルが低下していることを示唆する。また、副交感神経系の伝達物質であるアセチルコリンの受容体拮抗薬であるアトロピンを投与した場合は、コントロール群では認められたインスリンレベルの低下が、MSG 処理群では認められなかった。この結果はインスリン分泌の亢進に副交感神経系は関与していないことを示唆する。また、 $\beta$ アドレナリン作動薬(isoproterenol) を慢性投与することによって MSG 処理マウスで起こる脂肪組織の増大が抑制された（岩倉）。

神経支配によるインスリンの分泌制御機構を明らかにするために、マイクロアレイにより、IL-1Ra 欠損マウス、及び野生型 C57BL/6 マウスを MSG あるいは生理的食塩水処理し、膵臓で発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。調べた 45266 遺伝子のうち、MSG 処理により 1194 遺伝子の発現に変化が認められ、その 97% の遺伝子については発現低下を示すことがわかった。一方、IL-1Ra 欠損マウスにおいては 426 遺伝子の発現に変化が認められ、このうち 74% は発現が亢進していた（岩倉）。

free fed の VMH 破壊ラットの体重および体脂肪量は、手術後 1 日目から

pair fed 群や sham 群に比べ優位に増加した (井上、塩田、中里)。

VMH 破壊ラットの小腸組織の粘膜は対照ラットの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プロスタグランジン合成酵素、cyclooxygenase の遺伝子発現の増加を認め、粘膜上皮細胞増殖へのプロスタグランジンの関与が示唆された (井上、塩田、中里)。

VMH 破壊ラットの60%部分切除肝の重量、DNA量の回復は、偽VMH破壊ラットの部分切除肝よりも約2倍促進されていた。また、VMH破壊ラットの40%部分切除脾は対照ラットの40%部分切除脾と比較して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、塩田、中里)。

細胞培養試験により、VMH破壊ラットの血清添加は対照ラットの血清添加と比べてHela細胞の増殖を促進することを認めた (井上)。

VMH破壊後10日目の空腸において、腸絨毛の丈の増高がHE染色で観察された。また陰窩部におけるPCNA免疫陽性細胞の増加も観察された (井上、塩田、中里)。

VMH破壊による腸管臓器再生能亢進にグレリンが関与している可能性を検討するため、VMH破壊後のグレリン産生を解析した。胃グレリン含量は、VMH破壊後3日目および7日目

では3群間で優位差はなく、VMH破壊後10日目のfree fed群で優位に減少していた。血漿グレリン濃度は、VMH破壊後3日目のfree fed群ではpair fed群やsham群に比べ優位に低下していたが、その後は優位な差を認めなかった。VMH破壊後3日目の個体では、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日目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破壊後3日目の個体では、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日目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破壊後7日目ではその発現細胞数が減少する傾向がみられた (井上、塩田、中里)。

グレリンをラット静脈内に投与したところ、5-10分後に肝臓におけるMAPキナーゼの活性化を認め、グレリンが肝細胞増殖に対し促進的に作用することが明らかになった (寒川)。

さらに、DMN投与による薬剤性肝硬変モデルラットを用いて、グレリンの腸管再生に及ぼす効果を検討した。このラットにおいて、肝は線維化により萎縮し、さらに門脈圧亢進症による脾腫と血小板減少が認められた。また、肝機能予備能を反映する出血・凝固因子の低下も認められた。これに対し、グレリン投与群は用量依存性に肝線維化の軽減を認めた。特にグレリン30

μg/kg 投与群では、肝萎縮や脾腫は有意に改善し、血小板減少や出血・凝固因子の低下も僅かに認めたのみであった。遺伝子発現解析の結果、PCNA と HGF の発現が有意に上昇していた。グレリン投与による肝線維化の改善は、GH 欠損ラットにおいても認められ、GH を介さない機序によるものと考えられた。DMN 投与6週間後の生存率を観察したところ、グレリン投与により有意に生存率の改善が認められた(寒川)。

ラットにおいて、肝部分切除後の肝細胞の再生は強力に促進され、肝の70%を切除しても約1週間後にはほぼ切除前の肝重量になる。今回は、切除後4日目に肝細胞の再生能を検討したところ、グレリン投与群では有意に残肝重量の増加が認められた。また、PCNA と HGF の遺伝子発現の明らかな上昇を認めた(寒川)。

#### D. 考察

MSG 投与による視床下部・弓状核神経破壊が引き起こす肥満、インスリン分泌亢進に、IL-1 が関与していることを初めて明らかにした(Matsuki et al., J. Exp. Med., 2003)。この結果は、従来炎症、免疫のメディエーターと考えられていた IL-1 が、インスリン分泌制御に関与することによって、生体の恒常性、エネルギーバランスの維持に関与することを示したもので、きわめて重要である。この結果は、肥満、糖尿病の治療に新たな手がかりを与えるものである。

VMH 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、脳幹部を通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、当研究班の分担研究者である井上らにより報告されている。しかし、この MSG モデルにおいては、交感神経系のシグナルにも感受性を示したことから、交感神経の欠落によるインスリン産生抑制の解除が、高インスリン血症の原因となっていることが示唆された。(岩倉)

マイクロアレイ解析により、IL-1 の下流で膵臓における多くの遺伝子の発現が制御されていることがわかった。過剰の IL-1 シグナルによって多くの遺伝子発現が亢進するのに対し、MSG 処理により交感神経を遮断することにより逆に多くの遺伝子の発現が抑制されることがわかった。これらの遺伝子の中には既にインスリン分泌に関与することがわかっているガラニンや islet アミロイド蛋白質などが含まれており、変動の認められた遺伝子の中に新規のインスリン分泌制御蛋白質遺伝子が含まれている可能性が高い。また、VMH 破壊によるインスリン分泌の亢進には膵β細胞の増殖が関与していることが知られており、IL-1Ra 欠損マウスにみられるインスリン分泌の亢進も膵β細胞の増殖が関与していることが考えられる。従って、これらの遺伝子の中には、膵β細胞の増殖に関与するものも含まれている可能性が高い。実際、これらの遺伝子の中には、内分泌、外分泌に直接関与すると考えられるもの



のほか、いくつかの転写因子、サイトカイン、及びそのレセプターと考えられる遺伝子が含まれており、今後 MSG 処理マウス及び IL-1Ra 欠損マウスとともに変化のみられた遺伝子について、膵β細胞増殖に及ぼす影響を検討する予定である（岩倉）。

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ことを明らかにしている。

VMH 破壊に伴う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、グレリンは胃や小腸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た。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、グレリンの肝生理機能および肝病態の制御に対する作用を検討するとともに、薬剤性肝硬変モデルラットや肝部分切除ラットに対するグレリンの治療効果についても検討した。その結果、薬剤性肝硬変モデルラットや肝部分切除ラットにおいて、グレリンが肝機能改善効果および肝細胞増殖作用を有し、薬理的にも治療効果を発揮することが明らかとなった（寒川、中里、井上、塩田）。

胃から分泌されたグレリンは、そのシグナルが迷走神経求心路、延髄弧束核を經由し中枢神経系に伝達され、GH 分泌刺激や摂食促進作用を発揮する。さらに、その信号を今度は迷走神

経遠心路を介して、胃や十二指腸、肝、膵などの消化器臓器に伝達する。この情報伝達機構は、グレリンの自律神経を介した様々な調節機構に関与しているものと思われる。一方、自律神経系を介する肝生理機能の調節系も明らかとなっている。迷走神経系の活動により肝細胞増殖は促進され、肝血流量も増加する。临床上、迷走神経の役割は重要であり、肝部分切除後に誘導・促進された肝細胞の再生機構は迷走神経切除によって抑制される。グレリンの肝再生促進作用は、GH 欠損ラットにおいても認められたことから、GH を介さない機序によるものと考えられた。また、ラット肝においてはグレリン受容体の発現はほとんど認められないことから、グレリンの作用は迷走神経系を介したものと思われる。HGF や GH などの成長因子は直接肝細胞に作用してその増殖を促進するが、グレリンのように遠心性に迷走神経系を介して肝細胞増殖を活性化するのは他にない。また、迷走神経を介した肝血流量増加作用も見出されており、このことはグレリンが自律神経系を介して肝機能調節に関与していることを示唆するものである。

自律神経系を介した肝生理機能の調節についてはすでに報告があり、肝細胞増殖作用ばかりでなく、肝線維化抑制や肝血流量増加、肝細胞保護作用など多彩な作用が認められている。また、迷走神経系の活動と肝細胞前駆細胞の発現調節との関連も報告されている。今回の結果は、グレリンを用いての肝

硬変や劇症肝炎などの疾患の新たな治療法開発の可能性を示すものである（寒川、中里）。

#### E. 結論

視床下部破壊によって膵臓で誘導される遺伝子を網羅的に解析し、インスリン分泌に直接作用するもののほか、 $\beta$ 細胞の増殖に関与すると考えられる興味深い遺伝子を見だし、現在、その機能を検討している。インスリン分泌調節は交感神経を介する経路で行われており、我々はこの経路が IL-1 によって調節されていることを初めて明らかにした。生理状態において、膵臓における多くの遺伝子の発現が IL-1 によって調節されており、IL-1 がインスリン分泌調節や膵 $\beta$ 細胞の増殖に関与していることが示唆された。これらの結果は、IL-1 活性の制御により、インスリン分泌や膵 $\beta$ 細胞の再生をコントロールできる可能性を示しており、糖尿病や肥満の治療に新たな手掛かりが得られた（岩倉）。

グレリンの腸管増殖・再生因子としての意義の検討を行った結果、薬剤性肝硬変モデルラットや肝部分切除ラットにおいて、グレリンが肝機能改善効果および肝細胞増殖作用を有し、薬理的にも治療効果を発揮することが明らかとなった。これらの結果は、グレリンの肝硬変や劇症肝炎などへの治療応用の可能性を示すものである。本研究により、グレリンが腸管や肝臓などの増殖や再生に関わる新規因子として、再生治療薬に繋がるものと考えられる（寒川）。

VMH 破壊による増殖・再生因子の新生はある器官で行われて、標的器官に到達する可能性と局所的に各臓器において新生される可能性が示唆された。局所的な腸管増殖・再生因子に、小腸では cyclooxygenase によって産生されるプロスタグランジン  $E_2$  が候補因子のひとつであることが明らかになった。今後、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予定である（井上、塩田、中里）。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

岩倉洋一郎

1. Kobari, Y., Misaki, Y., Setoguchi, K., Zhao, W., Komagata, Y., Kawahata, K., Iwakura, Y., and Yamamoto, K. T cells accumulating in the inflamed joints of a spontaneous murine model of rheumatoid arthritis become restricted to common clonotypes during disease progression. *Int. Immunol.*, **16**, 131-138 (2004).
2. Ishida, Y., Kondo, T., Takayasu, T., Iwakura, Y., and Mukaida, N. The essential involvement of cross-talk between IFN- $\gamma$  and TGF- $\beta$  in the skin wound-healing process. *J. Immunol.*, **172**, 1848-1855 (2004).
3. Kurohara, K., Komatsu, K., Kurisaki, T., Masuda, A., Irie, N., Asano, M.,

- Sudo, K., Nabeshima, Y., Iwakura, Y., and Sehara-Fujisawa, A. Essential roles of Meltrin beta (ADAM19) in heart development. *Dev. Biol.*, **267**, 14-28 (2004).
4. Ishida, Y., Maegawa, T., Kondo, T., Kimura, A., Iwakura, Y., Nakamura, S., and Mukaida, N. Essential involvement of IFN- $\gamma$  in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis. *J. Immunol.*, **172**, 3018-3025 (2004).
  5. Ishihara, K., Sawa, S. I., Ikushima, H., Hirota, S., Atsumi, T., Kamimura, D., Park, S. J., Murakami, M., Kitamura, Y., Iwakura, Y., and Hirano, T. The point mutation of tyrosine 759 of the IL-6 family cytokine receptor gp130 synergizes with HTLV-1 pX in promoting rheumatoid arthritis-like arthritis. *Int. Immunol.*, **16**, 455-465 (2004).
  6. Wu, X., Yoshida, A., Sasano, T., Iwakura, Y., and Endo, Y. Histamine production via mast cell-independent induction of histidine decarboxylase in response to lipopolysaccharide and interleukin-1. *Int. Immunopharmacology*, in press.
  7. Timoshanko, J. R., Kitching, A. R., Iwakura, Y., Holdsworth, S., R., and Tipping, P. G. Contributions of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  to crescentic glomerulonephritis in mice. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **15**, 910-918 (2004).
  8. Timoshanko, J. R., Kitching, A. R., Iwakura, Y., Holdsworth, S. R., and Tipping, P. G. Leukocyte derived IL-1 $\beta$  interacts with renal IL-1 receptor I to promote renal TNF and glomerular injury in murine crescentic glomerulonephritis. *Am. J. Physiol.*, in press.
  9. Nakaya, T. A., Kita, M., Kuriyama, H., Iwakura, Y., and Imanishi, J. Panax ginseng induces production of proinflammatory cytokines via Toll-like receptor. *J. Interferon Cytokine Res.*, **24**, 93-100 (2004).
  10. Li, Y., Ishii, K., Hisaeda, H., Hamano, S., Zhang, M., Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Hemmi, H., Takeda, K., Akira, S., Iwakura, Y., and Himeno, K. IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.*, 2004 Feb 26.
  11. Belal, U. S., Norose, K., Aosai, F., Mun, H. S., Ahmed, A. K., Chen, M., Mohamed, R. M., Piao, L. X., Iwakura, Y., and Yano, A. Evaluation of the effects of sulfamethoxazole on Toxoplasma gondii loads and stage

- conversion in IFN- $\gamma$  knockout mice using QC-PCR. *Microbiol. Immunol.*, **48**, 185-193 (2004).
12. Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Miyagi, K., Kinjo, T., Yara, S., Koguchi, Y., Miyazato, A., Shibuya, K., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A. Interferon- $\gamma$  production and host protective response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice lacking both IL-12p40 and IL-18. *Microbes Infect.* **6**, 339-349 (2004).
  13. Joosten, L. A. B., Smeets, R. L., Koenders, M. I., van den Bersselaar, L. A. M., Helsen, M. M. A., Oppers-Walgreen, B., Lubberts, E., Iwakura, Y., van de Loo, F. A. J., and van den Berg, W. B. IL-18 promotes joint inflammation and induces IL-1 driven cartilage destruction. *Am. J. Pathol.*, in press.
  14. Ikegaya, Y., Delcroix, I., Iwakura, Y., Matsuki, N. and Nishiyama, N. Interleukin-1 $\alpha$  abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. *Synapse*, **47**, 54-57 (2003).
  15. Kurisaki, T., Masuda, A., Sudo, K., Sakagami, J., Higashiyama, S., Matsuda, Y., Nagabukuro, 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. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 55-61 (2003).
  16. 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.*, **71**, 117-125 (2003).
  17. 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. *Int. Immunol.*, **15**, 251-260 (2003).
  18. 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*, **24**, 167-175 (2003).
  19. 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. *Eur. J. Neurosci.*, 17, 483-490 (2003).
20. 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. *Neuro- science Res.*, 45, 313-324 (2003).
  21. 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.*, 15, 483-490 (2003).
  22. 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).
  23. Ono, Y., Ogihara, Y., Saijo, S., Iwakura, Y., and Inoue, M. Evaluation of Kampo medicines used to treat rheumatoid arthritis in collagen-induced arthritis and pX transgenic mice. *Mod. Rheumatol.*, 13, 50-56 (2003).
  24. Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., and Seshima, M. Lack of interleukin-1 $\beta$  decreases the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 656-660 (2003).
  25. 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).
  26. Iwakura, Y. Autoimmune chronic inflammatory arthropathy in mice transgenic for the HTLV-I *tax* gene. In "Two decades of adult T-cell leukemia and HTLV-I research", (eds. K. Sugamura, R. Uchiyama, M. Matsuoka, and M. Kannagi), Gann Monograph on Cancer Research, 50, Japan Scientific Societies Press and Karger, Tokyo, pp.197-218 (2003).
  27. 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, pp. 95-109 (2003).

28. 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*, 100, 5986-5990 (2003).
29. Asano, M., Nakae, S., Kotani, N., Shirafuji, N., Nambu, A., Hashimoto, N., Kawashima, H., Hirose, M., Miyasaka, M., Takasaki, S., and Iwakura, Y. Impaired selectin ligand biosynthesis and reduced inflammatory responses in  $\alpha$ -1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Blood*, 102, 1678-1685 (2003).
30. Wheeler, R. D., Brough, D., Le Feuvre, R. A., Takeda, K., Iwakura, Y., Luheshi, G. N., and Rothwell, N. J. Interleukin-18 induces expression and release of cytokines from murine glial cells: interactions with interleukin-1. *J. Neurochem.*, 85, 1412-1420 (2003).
31. Isoda, K., Shiigai, M., Ishigami, N., Matsuki, T., Horai, R., Nishikawa, K., Kusahara, M., Nishida, Y., Iwakura, Y., and Ohsuzu, F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation*, 108, 516-518 (2003).
32. Miyake-Nishijima, R., Iwata, S., Saijo, S., Kobayashi, H., Kobayashi, S., Souta-Kuribara, A., Hosono, O., Kawasaki, H., Tanaka, H., Ikeda, E., Okada, Y., Iwakura, Y., and Morimoto, C. Role of Crk-associated substrate lymphocyte type in the pathophysiology of the rheumatoid arthritis in transgenic mice and in humans. *Arthritis Rheum.*, 48, 1890-1900 (2003).
33. Takeda, Y., Akasaka, K., Lee, S., Kobayashi, S., Kawano, H., Murayama, S., Takahashi, N., Hashimoto, K., Kano, M., Asano, M., Sudo, K., Iwakura, Y., and Watanabe, K. Impaired motor coordination in mice lacking neural recognition molecule NB-3 of the contactin/F3 subgroup. *J. Neurobiol.*, 56, 252-265 (2003).
34. Matsuki, T., Horai, R., Sudo, K., and Iwakura, Y. IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J. Exp. Med.*, 198, 877-888 (2003).
35. Mun, HS., Aosai, F., Chen, M., Piao, LX., Norose, K., Iwakura, Y., Yano, A. Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* through B-2 cell-mediated downregulation of host defense responses. *Microbiol Immunol.*, 47,

- 533-542 (2003).
36. Traka, M., Goutebroge, L., Denisenko, N., Bessa, M., Nifli, A., Havaki, S., Iwakura, Y., Fukamauchi, F., Watanabe, K., Soliven, B., Girault, J. A., and Karagogeos, D. Association of Tag-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J. Cell. Biol.*, 162, 1161-1172 (2003).
  37. Kariyone, A., Tamura, T., Kano, H., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Takatsu, K. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in T<sub>H</sub>1 development: role of IFN- $\gamma$ . *Int. Immunol.*, 15, 1183-1194 (2003).
  38. Norose, K., Mun, H.S., Aosai, F., Chen, M., Piao, L.X., Kobayashi, M., Iwakura, Y., and Yano, A. IFN- $\gamma$ -Regulated *Toxoplasma gondii* Distribution and Load in the Murine Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44, 4375-4381 (2003).
  39. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen- induced arthritis in IL-17- deficient mice. *J. Immunol.*, 171, 6173-6177 (2003).
  40. Ohtaki, H., Takaki, A., Yin, L., Dohi, K., Nakamachi, T., Matsunaga, M., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y., Shioda, S. Suppression of oxidative stress after transient faocal ischemia in interleukin-1 knockout mice. *Acta Neurochir.Suppl.*, 86, 191-194 (2003).
  41. Enomoto, H., Shiojiri, S., Hoshi, K., Furuichi, T., Fukuyama, R., Yoshida, C.A., Kanatani, N., Nakamura, R., Mizuno, A., Zanma, A., Yano, K., Yasuda, H., Takeda, K., and Komori, T. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through RANKL and OPG regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2<sup>-/-</sup> mice by RANKL transgene. *J. Biol. Chem.*, 278, 23971-23977 (2003).
- 寒川賢治
1. Kitamura, S., Yokota, I., Hosoda, H., Kotani, Y., Matsuda, J., Naito, E., Ito, M., Kangawa, K., Kuroda, Y. Ghrelin concentration in cord and neonatal blood: relation to fetal growth and energy balance. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 5473-5477 (2003).
  2. Nakahara, K., Hayashida, T., Nakazato, M., Kojima, M., Hosoda, H., Kangawa, K., Murakami, N. Effect of chronic treatments with ghrelin on milk secretion in lactating rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 303, 751-755 (2003).

3. Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Moriyama, S., Takahashi, A., Kawauchi, H., Kangawa, K. Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*, 144, 5215-5226 (2003).
4. Hataya, Y., Akamizu, T., Hosoda, H., Kanamoto, N., Moriyama, K., Kangawa, K., Takaya, K., Nakao, K. Alterations of plasma ghrelin levels in rats with lipopolysaccharide- induced wasting syndrome and effects of ghrelin treatment on the syndrome. *Endocrinology*, 144, 5365-5371 (2003).
5. Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G., Kangawa, K. Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 135, 421-429 (2003).
6. Nakai, Y., Hosoda, H., Nin, K., Ooya, C., Hayashi, H., Akamizu, T., Kangawa, K. Plasma levels of active form of ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 149, R1-3 (2003).
7. Enomoto, M., Nagaya, N., Uematsu, M., Okumura, H., Nakagawa, E., Ono, F., Hosoda, H., Oya, H., Kojima, M., Kanmatsuse, K., Kangawa, K. Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. *Clin Sci (Lond)*, 105, 431-435 (2003).
8. Sakata, I., Yamazaki, M., Inoue, K., Hayashi, Y., Kangawa, K., Sakai, T. Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neurosci Lett*, 342, 183-186 (2003).
9. Tanaka, K., Minoura, H., Isobe, T., Yonaha, H., Kawato, H., Wang, D. F., Yoshida, T., Kojima, M., Kangawa, K., Toyoda, N. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2335-2340 (2003).
10. Sugino, T., Yamaura, J., Yamagishi, M., Kurose, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Hasegawa, Y., Terashima, Y. Involvement of cholinergic neurons in the regulation of the ghrelin secretory response to feeding in sheep. *Biochem Biophys Res Commun*, 304, 308-312 (2003).
11. IMasaoka, T., Suzuki, H., Hosoda, H., Ota, T., Minegishi, Y., Nagata, H., Kangawa, K., Ishii, H. Enhanced



- plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett*, 541, 64-68 (2003).
12. Okimura, Y., Ukai, K., Hosoda, H., Murata, M., Iguchi, G., Iida, K., Kaji, H., Kojima, M., Kangawa, K., Chihara, K. The role of circulating ghrelin in growth hormone (GH) secretion in freely moving male rats. *Life Sci*, 72, 2517-2524 (2003).
  13. Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M. S., Shimbara, T., 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 the orexin pathway. *Endocrinology*, 144, 1506-1512 (2003).
  14. Kaiya, H., Kojima, M., Hosoda, H., Riley, L. G., Hirano, T., Grau, E. G., Kangawa, K. Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol*, 176, 415-423 (2003).
  15. Shimada, M., Date, Y., Mondal, M. S., 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*, 302, 520-525 (2003).
  16. Choi, K., Roh, S. G., Hong, Y. H., Shrestha, Y. B., Hishikawa, D., Chen, C., Kojima, M., Kangawa, K., Sasaki, S. The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, 144, 754-759 (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. 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).
- 井上修二
1. Kageyama, H., Hirayama, Y., Funahashi, H., Takenoya, F., Kita, T., Kato, S., Sakurai, J., Lee, E. Y., Inoue, S., Date, Y., Nakazato, M., Kangawa, K., Shioda, S.: Morphological analysis of ghrelin and its receptor in the rat pancreas. *Reg. Pept.* (in press)
  2. Kageyama, H., Kita, T., Horie, S.,

- Takenoya,F., Funahashi,H., Kato,S., Hirayama,Y., Lee,E.Y., Inoue,S., Shioda,S.:Immunohistochemistry study of cholecystokinin A receptor in the rat pancreas. *RegPept.* (in press)
3. 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*, 23, 907-915 (2003).
  4. Kageyama,H., Kageyama,A., Endo,Y., Osaka,T., Nemoto,K., Hirano,T., Namba., Shioda,S., Inoue,S., Ventromedial hypothalamus lesions induce jejunal epithelial cell hyperplasia through an increase in gene expression of cyclooxygenase. *Int J Obes*, 27, 1006-1013 (2003).
  5. Wang,J., Osaka,T., Inoue,S., Orexin-A-sensitive site for energy expenditure localized in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Brain Res*, 971, 128-134 (2003).
  6. 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*, 61, S27-33 (2003).
  7. Kageyama,H., Osaka,T., Kageyama,A., Kawada,T., Hirano,T., Oka,J., Miura,M., Namba,Y., Ricquier,D., Shioda,S., Inoue,S., Fasting increases gene expressions of uncoupling proteins and peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  in brown adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats. *Life.Sci*, 72, 3035-3046 (2003).
  8. 木下伊規子,田村明,奈良誠人,加藤達雄,井上修二,糖尿病ラットにおける運動負荷の筋蛋白質異化に及ぼす影響,日本臨床生理学会雑誌, 33, 133-139 (2003).
  9. 井上修二,肥満症治療の新しい考え方-生活習慣病の治療との関連-,*Medicament News*, 1753, 1-4 (2003).
  10. 井上修二,肥満の判定と肥満症の診断:その新しい視点,ホルモンと臨床, 51, 23-30 (2003).
  11. 井上修二,鳥飼陽子,宇都宮信子,金井幸子,健康食品(保健機能食品)の分類と使用上の注意点,日本病院薬剤師会雑誌, 39, 685-690 (2003).
  12. 井上修二,鳥飼陽子,金井幸子,肥満に関する疫学的事項 国際比較,日本臨床, 61,555-563 (2003).
  13. 横川博英,井上修二,肥満症の治療法 薬物療法(抗肥満治療薬)アドレナリン作動薬(マジンドール),日本臨床, 61, 655-660 (2003).

14. 辻正富,金澤真雄,井上修二,肥満症の治療法 薬物療法(抗肥満治療薬) セロトニン作動薬 (フェンフルラミン,デスクフェンスルラミン),日本臨床, 61,661-667 (2003).
  15. 辻正富,齊藤宣彦,井上修二,肥満症の治療法 薬物療法(抗肥満治療薬) アドレナリン・セロトニン作動薬(シブトラミン),日本臨床, 61,668-675 (2003) .
  16. 金澤真雄,宇都宮信子,井上修二,症候性肥満 中枢性肥満,日本臨床, 61, 814-819. (2003).
  17. 井上修二,糖尿病・肥満と歯周病の関係,(財)8020 推進財団, 20-24 (2003).
  18. 井上修二,肥満は増加していますか,肥満と糖尿病, 2, 13-15 (2003).
  19. 田嶋尚子,井上修二,平山愛山,女性肥満 糖尿病の現場から,肥満と糖尿病, 2, 143-158 (2003).
  20. 井上修二,砂糖と肥満 砂糖とストレス,日経メディカル, 10, 110-111 (2003).
  21. 横川博英,井上修二,遺伝子診断とは? 肥満と糖尿病, 2, 13-15 (2003).
1. Dohi, K., Satoh, K., Ikeda, Y., Ohtaki, H., Shioda, S. and Aruga, T. Neuroprotective effect from ischemia and direct free radical scavenging activity of Choto-san (kampo medicine). *Acta Neurochir (Suppl)*, 86, 123-127 (2003).
  2. Dohi, K., Ohtaki, H., Inn, R., Ikeda, Y., Shioda, S. and Aruga, T. Peroxynitrite and caspase-3 expression after ischemia/ reperfusion in mouse cardiac arrest model. *Acta Neurochir (Suppl)*, 86, 87-91 (2003).
  3. Funahashi, H., Yamada, S., Kageyama, H., Takenoya, F., Guan, J.L. and Shioda, S. Co-existence of leptin- and orexin-receptors in feeding-regulating neurons in the hypothalamic arcuate nucleus-a triple labeling study. *Peptides*, 24, 687-694 (2003).
  4. Guan, J.L., Wang, Q.P. and Shioda, S. Immunoelectron microscopic examination of orexin-like immunoreactive fibers in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res*, 987, 86-92 (2003).
  5. Guan, J.L., Wang, Q.P., Kageyama, H., Takenoya, F., Kita, T., T., M., Funahashi, H. and Shioda, S. Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides*, 24,

塩田清二

- 1921-1928 (2003).
6. Imaizumi, Y., Mizushima, H., Dohi, K., Ohtaki, H., Funahashi, H. and Shioda, S. Hippocampal heme oxygenase-1 in a murine cardiac arrest model. *Acta Neurochir (Suppl)*, 86, 101-103 (2003).
  7. Kageyama, H., Kageyama, A., Endo, Y., Osaka, T., Nemoto, K., Hirano, T., Namba, Y., Shioda, S. and Inoue, S. Ventromedial hypothalamus lesions induce jejunal epithelial cell hyperplasia through an increase in gene expression of cyclooxygenase. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27, 1006-1013 (2003).
  8. Kageyama, H., Hirano, T., Okada, K., Ebara, T., Kageyama, A., Murakami, T., Shioda, S. and Adachi, M. Lipoprotein lipase mRNA in white adipose tissue but not in skeletal muscle is increased by pioglitazone through PPAR-gamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 22-27 (2003).
  9. Kageyama, H., Osaka, T., Kageyama, A., Kawada, T., Hirano, T., Oka, J., Miura, M., Namba, Y., Ricquier, D., Shioda, S. and Inoue, S. Fasting increases gene expressions of uncoupling proteins and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in brown adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats. *Life Sci*, 72, 3035-3046 (2003).
  10. Matsunaga, M., Ohtaki, H., Takaki, A., Iwai, Y., Yin, L., Mizuguchi, H., Miyake, T., Usumi, K. and Shioda, S. Nucleoprotamine diet derived from salmon soft roe protects mouse hippocampal neurons from delayed cell death after transient forebrain ischemia. *Neurosci Res*, 47, 269-276 (2003).
  11. Mitamura, K., Ohtsuka, K., Kato, H., Enami, Y., Murai, N., Niiya, Y., Aoki, T., Shimizu, Y., Satoh K., Tobe, T., Shioda, S. and Kusano M. Detection of nitric oxide generation by electron spin resonance spectroscopy after partial hepatectomy. *Showa Univ. J Med Sci*, 15, 237-244 (2003).
  12. Narita, M., Ohnishi, O., Aoki, T., Suzuki, M., Yajima, Y., Funahashi, H., Shioda, S. and Suzuki, T. Direct evidence for the activation of phospholipase C gamma 1 by in vivo treatment with morphine in the mouse periaqueductal gray matter. *Brain Res*, 970, 140-148 (2003).
  13. Nonaka, N., Shioda, S., Niehoff, M.L. and Banks, W.A. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 948-953 (2003).
  14. Ohtaki, H., Funahashi, H., Dohi, K., Oguro, T., Horai, R., Asano, M.,