

- 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. *Neurosci Res*, 45, 313-324 (2003).
15. Ohtaki, H., Takaki, A., Yin, L., Dohi, K., Nakamachi, T., Matsunaga, M., Horai, R., Asano, M., Iwakura, Y. and Shioda, S. Suppression of oxidative stress after transient focal ischemia in interleukin-1 knock out mice. *Acta Neurochir (Suppl)*, 86, 191-194 (2003).
16. Ohtaki, H., Mori, S., Nakamachi, T., Dohi, K., Yin, L., Endo, S., Okada, Y. and Shioda, S. Evaluation of neuronal cell death after a new global ischemia model in infant mice. *Acta Neurochir (Suppl)*, 86, 97-100 (2003).
17. Ohtaki, H., Endo, S., Nakamachi, T., Yin, L., Dohi, K., Y., K., Iwai, Y., M., M., Goto, N. and Shioda, S. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in mouse brain following transient cerebral ischemia. *Acta Histochem Cytochem*, 36, 385-391 (2003).
18. Suzuki, R., Watanabe, J., Arata, S., Funahashi, H., Kikuyama, S. and Shioda, S. A transgenic mouse model for the detailed morphological study of astrocytes. *Neurosci Res*, 47, 451-454 (2003).
19. Suzuki, R., Arata, S., Nakajo, S., Ikenaka, K., Kikuyama, S. and Shioda, S. Expression of the receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PAC1-R) in reactive astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res*, 115, 10-20 (2003).
20. Takenoya, F., Aihara, K., Funahashi, H., Matsumoto, H., Ohtaki, T., Tsurugano, S., Yamada, S., Katoh, S., Kageyama, H., Takeuchi, M. and Shioda, S. Galanin-like peptide is target for regulation by orexin in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, 340, 209-212 (2003).
21. Tanaka, Y., Yamada, K., Zhou, C.J., Ban, N., Shioda, S. and Inagaki, N. Temporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain. *J Comp Neurol*, 455, 353-367 (2003).
22. 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. and Nakazato, M. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology*, 144, 1506-1512 (2003).
23. Wang, Q.P., Zadina, J.E., Guan, J.L.,

- Kastin, A.J. and Shioda, S. Electron microscopic examination of the endomorphin 2-like immunoreactive neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res*, 969, 126-134 (2003).
24. Wang, Q.P., Zadina, J.E., Guan, J.L. and Shioda, S. Morphological evidence of endomorphin as an agonist for the mu-opioid receptor in the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, 341, 107-110 (2003).
25. Wang, Q.P., Guan, J.L., Matsuoka, T., Hirayana, Y. and Shioda, S. Electron microscopic examination of the orexin immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus. *Peptides*, 24, 925-930 (2003).
26. Yin, L., Ohtaki, H., Nakamachi, T., Dohi, K., Iwai, Y., Funahashi, H., Makino, R. and Shioda, S. Expression of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) following transient cerebral ischemia. *Acta Neurochir (Suppl)*, 86, 93-96 (2003).
27. Chen, F. H., Samson, K. T., Miura, K., Ueno, K., Odahima, Y., Tokushige, S., Yoshitugu, Y., Shioda, S. Airway remodeling: a comparison between fatal and no-fatal asthma. *J Asthma* (in press)
28. Okayasu, H., Suzuki, F., Satoh, K., Shioda, S., Dohi, K., Ikeda, Y., Nakashima, H., Komatsu, N., Fujimaki, M., Hashimoto, K., Maki, J. and Sakagami, H. Comparison of cytotoxicity and radical scavenging activity between tea extracts and chinese medicines. *In vivo* (in press)
29. Wakabayashi, H., Hashiba, K., Yokoyama, K., Hashimoto, K., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Kurihara, T., Satoh, K., Shioda, S., Saito, S. Kusano S, Nakashima H, Motohashi N and Sakagami H. Cytotoxic activity of azulenes against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* (in press)
30. Wakabayashi, H., Yokoyama, K., Hashiba, K., Hashimoto, K., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Kurihara, T., Satoh, K., Shioda, S., Muto, S., Terakubo, S., Nakashima, H., Motohashi, N. and Sakagami, H. Cytotoxic activity of tropolones against human oral tumor cell lines. *Anticancer Res* (in press)
31. Funahashi, H., Takenoya, F., Guan, J.L., Kageyama, H., Yada, T. and Shioda, S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. *Anat Sci Int*, 78, 123-138 (2003).
32. Funahashi, H., Yada, T., Suzuki, R. and Shioda, S. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int Rev Cytol*, 224, 1-27 (2003).
33. 塩田清二、竹ノ谷文子、舟橋久幸、

摂食調節因子 メラノコルチン、日本臨牀、61 (増刊6), 94-98 (2003).

34. 杉沢貴子、諸星利男、舟橋久幸、塩田清二、原発性肺腺癌における ABCA3 発現の免疫組織化学的検討、昭和医学会誌、63, 426-436 (2003).

中里雅光

1. 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).
2. 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).
3. 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*, 302, 520-525 (2003).
4. 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).

5. 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*, 28, 829-835 (2003).
6. Yamaguchi H, Nakazato M, Kangawa K.: Ghrelin: A gastric peptide to regulate hypothalamic control of feeding. *Curr Med Chem*, 3, 177-188 (2003).
7. Tanaka M, Tatebe Y, Nakahara T, Yasuhara D, Sagiya K, Muranaga T, Ueno H, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T.: Eating pattern and the effect of oral glucose on ghrelin and insulin secretion in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol*, 59, 574-579 (2003).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「NO ラジカル消去剤」に関する発明に係る件

「神経細胞死抑制剤」(塩田 申請中)

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 ヒト疾患モデル研究センター

研究要旨

MSG の新生仔期の投与は、視床下部・弓状核神経の特異的な破壊を引き起こし、インスリンの過剰分泌による肥満が誘導されることが知られている。ところが、このインスリン分泌の亢進は IL-1 レセプターアンタゴニスト (Ra) 遺伝子欠損マウスでは全く見られず、視床下部を介するインスリン分泌調節に IL-1 が関与していることがわかった。マイクロアレイを用いた網羅的探索の結果、IL-1Ra 欠損マウスの膵臓では膵β細胞の増殖や機能に関与すると考えられる多くの遺伝子の発現に変動が見られた。現在これらの遺伝子の役割について検討している。

A. 研究目的

当研究班の井上らはラットの腹内側核 (VMH) を破壊することにより、インスリン分泌の亢進と、それに伴う肥満が引き起こされることを示した。このとき、副交感神経系の亢進がみられ、インスリン分泌の亢進とともに、膵β細胞の増殖が認められた。本研究ではこのような神経支配による、β細胞増殖因子やインスリン分泌促進因子を同定し、膵再生治療や I 型糖尿病の治療に資することを目的とした。

ところで、MSG をマウスの新生仔期に投与すると、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 を破壊することが技術的に難しいことから、本研究では 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。この中で、我々は独自に神経支配性のインスリン分泌制御に IL-1 が関与していることを見だし、その機構について解析した。

IL-1 は炎症や組織傷害に伴って生産される炎症性サイトカインの一種で、炎症性のメディエーターとして知られている。しかし最近、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としても機能していることがわかってきた。IL-1 は様々な臓器に作用し、細胞の増殖、分化、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。我々はこれまでに IL-1 及

びそのシグナルを阻害する IL-1 Ra 遺伝子欠損マウスを作製し、生体内での IL-1/IL-1Ra system の役割について解析を行ってきた(Horai et al., *J. Exp. Med.*, 1988)。その中で、IL-1 が免疫系において重要な働きをしており、IL-1 はT細胞を活性化するとともに、その過剰シグナルは自己免疫疾患を引き起こすことを明らかにした (Horai et al., *J. Exp. Med.*, 2000)。また、中枢神経系に作用して、発熱やグルココルチコイドの分泌調節にも関与していることを明らかにしている。

本研究において、我々は IL-1Ra 欠損マウスが正常マウスに比べ痩せることを見だし、そのメカニズムを解析したところ、インスリンの分泌が低下しているためであることを見いだした(Matsuki et al., *J. Exp. Med.*, 2003)。IL-1 が中枢作用を持つことが知られているため、本インスリン分泌の低下が中枢を介するものかどうかを調べるために、MSG 処理により視床下部弓状核を破壊したマウスと掛け合わせたところ、視床下部破壊によって引き起こされるインスリン分泌の促進が、IL-1Ra 欠損マウスでは認められなくなることを発見した。この結果は、IL-1 が中枢を介したインスリン分泌制御に関与していることを示唆する。また、IL-1 下流で膵臓で発現が制御される遺伝子を網羅的に探索し、多くの新規遺伝子を同定した。これらの中には、膵β細胞の増殖、再生に関与すると

思われる遺伝子も含まれていた。

B. 研究方法

IL-1 α / β (IL-1)及び 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 マウスを用いた。

グルタミン酸ナトリウム(MSG) 或いは食塩水を新生仔期に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、 α -アドレナリン作動薬(clonidine : i.p. 5 μ 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 β 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。

マイクロアレイは Affimetrix 社製の Genechip を用いた。

C. 研究結果

IL-1Ra 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 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、インスリン分泌異常、脂質代謝異常を示すことがわかった。

MSG の新生仔期の投与は、視床

下部・弓状核神経の脱落を引き起こし、血中インスリンレベルの亢進が認められる。興味深いことに、IL-1Ra 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認められなかった。この結果、IL-1Ra にみられるインスリンの分泌低下は、中枢を介していることが示唆された。

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、 α -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 α -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。

さらに、MSG 処理マウスでは脂肪組織の顕著な増大も認められた。そこで、 β アドレナリン作動薬 (isoproterenol) を慢性投与した結果、コントロール処理群に比べ、顕著な白色脂肪蓄積の低下が認められた。

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 MSG 処理によって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。

D. 考察

IL-1Ra 欠損マウスでみられる体重増加の停滞は、摂餌量や食欲制御性の脳内遺伝子の発現が変わらなかったことから、食欲の抑制によらず、エネルギー維持機構の低下であると考えられた。このマウスでインスリン産生レベルが低下していたことから、これが脂肪蓄積量低下の原因であることが示唆された。

MSG 投与による神経除去性肥満、代謝異常は、視床下部・弓状核神経支配のインスリン産生制御機構に IL-1 が関与することを明らかにした。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低下が高インスリン血症の原因となっていること

ことが示唆された。

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同じく視床下部神経支配によることから、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 欠損マウスで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。

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やインスリン分泌調節に関与していることが初めて明らかとなった。インスリン分泌調節は交感神経及び副交感神経を介する経路で行われており、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いることがわかった。これらの遺伝子の中にはインスリン分泌に直接作用するもののほか、β細胞の増殖に関与するものも含まれているものと考えられ、現在その機能を検討している。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β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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Ikegaya, Y., Delcroix, I., Iwakura, Y., Matsuki, N. and Nishiyama, N. Interleukin-1_α abrogates long-term depression of hippocampal CA1 synaptic transmission. *Synapse*, 47, 54-57 (2003).
2. 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 Meltrin₁ (ADAM12)-deficient mice: involvement of Meltrin₁ in

- adipogenesis and myogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 55-61 (2003).
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.*, 71, 117-125 (2003).
 4. 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.*, 15, 251-260 (2003).
 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*, 24, 167-175 (2003).
 6. 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).
 7. 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.*, 45, 313-324 (2003).
 8. 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).
 9. 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).
 10. Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., and Seshima, M. Lack of interleukin-1 α decreases the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 656-660 (2003).
 11. 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).

12. 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) .

13. 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).

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*, 100, 5986-5990 (2003).

15. 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 α -1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Blood*, 102, 1678-1685 (2003).

16. 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).

17. Isoda, K., Shiigai, M., Ishigami, N., Matsuki, T., Horai, R., Nishikawa, K., Kusuhara, M., Nishida, Y., Iwakura, Y., and Ohsuzu, F. Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist promotes neointimal formation after injury. *Circulation*, 108, 516-518 (2003).

18. 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 *tax* transgenic mice and in humans. *Arthritis Rheum.*, 48, 1890-1900 (2003).

19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. 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).
23. Kariyone, A., Tamura, T., Kano, H., Iwakura, Y., Takeda, K., Akira, S., and Takatsu, K. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in T_H1 development: role of IFN- γ . *Int. Immunol.*, 15, 1183-1194 (2003).
24. Norose, K., Mun, H.S., Aosai, F., Chen, M., Piao, L.X., Kobayashi, M., Iwakura, Y., and Yano, A. IFN- γ -Regulated *Toxoplasma gondii* Distribution and Load in the Murine Eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44, 4375-4381 (2003).
25. 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).
26. 西城忍, 岩倉洋一郎: 自然免疫と関節炎, *医学のあゆみ* 205: 92-96 (2003)
27. 角田茂, 岩倉洋一郎: トランスジェニックマウスとノックアウトマウスの作製法の最近の進歩, *生物工学会誌* 81: 345-357 (2003)
28. 岩倉洋一郎: 炎症、アレルギー病態における IL-17 の役割, *Molecular Medicine* 40 (臨時増刊号) 免疫 2004: 252-258 (2003)
29. 安田二郎, 岩倉洋一郎: トランスジェニックマウスの作製法 (第7章 個体レベルの解析), 須藤カツ子, 岩倉洋一郎: アグリゲーション法による変異マウスの作製 (第7章 個体レベルの解析 2. ジーンターゲット)

ング), 崔秉日, 岩倉洋一郎: コン
ディショナルターゲティング法 (第
7章 個体レベルの解析 2. ジーンタ
ーゲティング), 改訂第4版 新 遺
伝子工学ハンドブック (松村正實,
山本雅 編集)実験医学別冊:248-253,
266-277 羊土社

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機能解析
—肝再生におけるグレリンの治療効果の検討—

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、成長ホルモン分泌促進作用や摂食亢進作用をもち、エネルギー代謝調節に重要な新規ホルモンである。グレリンのこれらの生理作用は、迷走神経系を介したものである。一方、グレリンが自律神経系を介して消化管系の保護に働く可能性が示唆されていた。今回、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り、また、グレリンが腸管や膵臓、肝臓など消化器系臓器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可能性を示した。

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（GHS-R）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。グレリンは主に胃から分泌されるが、その産生細胞は既知の消化管ホルモンとは異なり、胃における主要な内分泌細胞であるにもかかわらずそれまで役割が不明であった X/A 様細胞であることを明らかにした。また、グレリンは小腸や膵臓でも胃に比べると低レベルながら産生され、さらに脳内では脳視床下部の弓状核とその周囲でも産生される。

グレリンは、強力な GH 分泌促進のほかにも、摂食亢進や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もつ新規ホルモンである。グレリンのこれらの生理活

性は迷走神経系を介した作用であり、胃から分泌されたグレリンが自律神経を介して様々な調節機構に関与しているものと考えられている。

これまでに我々は、グレリンの迷走神経を介した肝血流量増加作用を見出しており、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。

今回本研究では、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、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。

B. 研究方法

1) グレリンの肝細胞増殖促進作用の検討

Wistar 系雄ラット（6週齢）を用いて、大腿静脈よりグレリン（30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）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。

2) 肝障害モデルラットを用いたグレリンの薬理学的効果

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）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。

3) 肝部分切除ラットにおけるグレリンの肝再生促進作用

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）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。

（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) グレリンのラット静脈内投与 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。

2) 5週間の DMN 投与により、薬剤性肝硬変モデルラットを作製した。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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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。

3) 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。

D. 考察

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。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、延髄弧束核を経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。これまでに我々は、グレリンの迷走神経を介した肝血流量増加作用を見出しており、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。

そこで今回、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。

グレリンのこの効果は、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、こ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。

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。

以上のように今回の結果は、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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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).

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).

- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).

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).

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).

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).

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).

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）

VMH 破壊ラットにおける腹部臓器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 破壊による胃粘膜増殖は絶食及び 60%エタノール負荷による胃粘膜病変誘発試験に対して抵抗性を示す主因と考えられた。3)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。4)VMH 破壊による増殖・再生因子の候補因子に、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 E₂ が考えられることを示唆する結果をえた。5)VMH 破壊ラット血清は Hela 細胞増殖を亢進させた結果からは VMH 破壊ラットは血中に増殖・再生因子を分泌させている可能性も示唆された。

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、血中グレリンの測定も行い、グレリン産生能を検討した。2)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。3)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。4) 肝の 60% 部分切除を施行し肝の再生能を検討した。5) 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、6) 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。

(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、特に増殖帯上部粘膜の増高、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したが、血中グレリンは高値を示さなかった。

2) VMH 破壊ラットでは対照ラットと比べて、胃酸分泌亢進、ガストリン分泌亢進と強い攻撃因子の増強を認めしたが、防御因子の粘膜増高と胃潰瘍病変、胃潰瘍係数の低値を示した。

3) 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、デオキシブ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た。

4) 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

されていた。現在、再生肝の肝機能を検討中である。

5) VMH 破壊ラットの 40% 部分切除膵は対照ラットの 40% 部分切除膵と比較して 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。

6) 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。

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。VMH 破壊により免疫組織的にはグレリン産生も亢進していたが、血中グレリンは高値を示さなかったため、VMH 破壊によるグレリンの役割は更に検討を要することがわかった。

2) VMH 破壊ラットの胃粘膜増殖能促進が抗胃潰瘍作用を強くしていることが明らかになった。胃粘膜増殖因子を探索中である。

3) VMH 破壊ラットの小腸粘膜が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 PE₂) 産生増加がその増殖に関与していることが示唆された。今後、VMH 破壊ラットにおける PE₂ を測定する予定である。

4) 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、色素排泄 (ICG) 能、蛋白合成能(血中アルブミン、血中ブレアルブミン)を検討中である。

5) 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。

6)VMH破壊ラットの血清中に、増殖促進作用を認めたことはVMH破壊ラットにおける増殖・再生因子は各臓器において増殖・再生因子が作られて、血液を介して標的細胞に到達している可能性もあることが示唆された。

E. 結論

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ブラスタグランジンE₂も候補因子のひとつである。

F. 研究発表

1)Ito,R., Kanazawa,M., Endo,Y., Osaka,T., Kobayashi,T., Sakamoto,M., Torikai,Y., Inoue,S. Pancreatic islet regeneration after partial pancreatectomy in venteromedial hypothalamic lesioned (VMH) rats. (submitted)

2)Sakurai,J., Kanazawa,M., Ito,R., Torikai,Y., Kanai,Y., Shioda,S., Inoue,S., Ventromedial hypothalamic lesioned rats are resistant to the stimulation of gastric mucosal lesions through mucosal cell proliferation. (submitted)

3)Kageyama,H., Hirayama,Y., Funahashi,H., Takenoya,F., Kita,T., Kato,S., Sakurai,J., Lee,E.Y., Inoue,S., Date,Y., Nakazato,M., Kanga wa,K., Shioda,S.:Morphological analysis of ghrelin and its receptor in the rat pancreas.Reg.Pept.(in press)

4)Kageyama,H., Kita,T., Horie,S., Takenoya,F., F

unahashi,H.,Kato,S.,Hirayama,Y.,Lee,E.Y.,Inoue,S.,Shioda,S.:Immunohistochemistry study of cholecystokinin A receptor in the rat pancreas. Reg.Pept. (in press)

5)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,(2003) 23,907-915

6)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 (2003) 27, 1006-1013

7)Wang,J., Osaka,T., Inoue,S., Orexin - A - sensitive site for energy expenditure localized in the arcuate nucleus of the hypothalamus. Brain Res,(2003) 971, 128-134

8)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, (2003) 61,S27-33

9)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-γ in brown adipose tissue of ventromedial hypothalamus-lesioned rats. Life.Sci. (2003) 72,3035-3046

10)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,日本臨床生理学雑誌,(2003) 33,133-139

11)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,(2003) 1753,1-4

12)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,(2003) 51,23-30

13)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,(2003) 39 685-690

14)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,(2003) 61,555-563

15)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,(2003) 61,655-660

16)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(2003) 61,661-667

17)辻正富,斉藤宣彦,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(2003) 61,668-675

18)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(2003) 61,814-819

19)井上修二,糖尿病・肥満と歯周病の関係,(財)8020 推進財団,(2003) 20-24

20)井上修二,肥満は増加していますか,肥満と糖尿病,(2003) 2 13-15

21)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,(2003) 2, 143-158

22)井上修二,砂糖と肥満 砂糖とストレス,日経メディカル,(2003) 10,110-111

23)横川博英,井上修二,遺伝子診断とは? 肥満と糖尿病,(2003) 2,13-15