

200400284A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者のソマトポーズとエネルギー代謝に及ぼす
新規ホルモン グレリンの役割と臨床応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17（2005）年3月

主任研究者 寒川賢治
国立循環器病センター研究所
生化学部・部長

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者のソマトポーズとエネルギー代謝に及ぼす
新規ホルモン グレリンの役割と臨床応用

平成16年度 総括・分担研究報告書

目次

I. 総括研究報告

- 高齢者のソマトポーズとエネルギー代謝に及ぼす新規ホルモングレリンの役割と臨床応用 ----- 1
寒川賢治 (国立循環器病センター 研究所生化学部 部長)

II. 分担研究報告

1. エンドトキシン投与モデルラットを用いたグレリンの病態生理学的作用の検討 ----- 7
寒川賢治 (国立循環器病センター 研究所生化学部 部長)
2. グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発 ----- 12
中尾一和 (京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学第二内科 教授)
3. 健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者における GH 分泌予備能と血漿グレリン値 ----- 15
千原和夫 (神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科学教室教授)
4. エネルギー代謝調節機構におけるグレリン/GHSR の役割 ----- 21
芝崎 保 (日本医科大学第二生理 教授)
5. 胃切除術後症状の病態に対するグレリン補充療法臨床研究 ----- 24
大津留 晶 (長崎大学医学部・歯学部附属病院
永井隆記念国際ヒバクシャ医療センター 助教授)
6. グレリンの脂肪酸修飾に及ぼす脂質摂取および母乳の影響 ----- 27
児島将康 (久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門 教授)
7. 京都大学・探索医療センターにおけるグレリン臨床試験 ----- 31
赤水尚史 (京都大学医学部附属病院探索医療センター 助教授)
8. 高齢者のソマトポーズ抑制に対する運動とグレリンの役割 ----- 35
中里雅光 (宮崎大学医学部第三内科 教授)

高齢者のソマトポーズとエネルギー代謝に及ぼす新規ホルモン グレリンの役割と臨床応用

主任研究者 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 部長）

新規ホルモン；グレリンの病態生理学的意義や高齢者のソマトポーズ治療に対する有効性を検討するために、基礎と臨床の両面から研究を行い、次のような成果を得た。食餌性に摂取した脂肪酸がグレリンのアシル化基質として使用されることを脂質あるいは母乳摂取マウスの解析から明らかにした。グレリントランスジェニックマウスの開発で得られた des-acyl グレリン過剰発現マウスは、small phenotype を呈し、グレリンに対する成長ホルモン(GH)の反応が有意に低下していることが示された。さらにグレリン受容体(GHSR)発現抑制トランスジェニックラットの機能解析から、グレリンが中枢からの交感神経出力を抑制し、同化促進に機能していることが証明された。エンドトキシン投与ラットでは、血中グレリン濃度が上昇し、同ラットへのグレリン投与により、摂餌量・体重の増加が認められた。敗血症などの critical illness に対するグレリン投与の有効性が示唆された。加齢ラットにおいても、グレリン末梢投与に対する GH 分泌促進ならびに摂食亢進作用が確認され、高齢者のソマトポーズに対してグレリンの効果が十分に期待できるものと考えられた。GH 分泌不良を呈する高齢者の血中グレリン値は正常であり、GH との相関関係は認めなかった。一方で、胃摘出術後の食欲低下や体重減少と血中グレリン濃度とは相関があり、胃切除患者を対象にグレリン補充療法を開始した。また、人工変形性股関節置換術周術期患者に対するグレリンの臨床効果に関する第II相臨床試験を計画し、グレリンの幅広い臨床応用に向けての研究を進めている。

【研究組織】

- 寒川賢治（国立循環器病センター研究所
生化学部長）
- 中尾一和（京都大学大学院医学研究科
臨床病態医科学第二内科教授）
- 千原和夫（神戸大学大学院医学系研究科応用
分子医学講座教授）
- 芝崎 保（日本医科大学第二生理学教授）
- 大津留晶（長崎大学医学部歯学部附属病院
永井隆記念国際ヒバクシャ
医療センター助教授）
- 児島将康（久留米大学分子生命科学研究所
遺伝情報研究部門教授）

- 赤水尚史（京都大学医学部附属病院探索
医療センター助教授）
- 中里雅光（宮崎大学医学部第三内科教授）

A. 研究目的

下垂体から分泌される成長ホルモン(GH)は、筋肉と骨量を増加し、また脂肪分解を促進して、健康の維持・増進さらには老化の抑制に重要な役割を担っている。ヒトやラットなどの哺乳類の GH 分泌は思春期をピークとして以後減退する。GH の分泌低下は、ソマトポーズとよばれ、筋肉と骨量の低下および内臓脂肪蓄積型肥満などをもたらし、生活の質(QOL)の低下を引き起こす。

代表研究者らがラットおよびヒトの胃から発見・構造決定した新規ペプチド;グレリンは、下垂体からの成長ホルモン分泌促進作用に加え、摂食亢進、エネルギー代謝調節、循環器系の調節ならびに免疫系の調節にも作用する。つまり、老化現象として知られる骨・筋肉量の低下、エネルギー代謝障害、心肺機能の低下あるいは免疫能低下などは、グレリン作用の減弱と密接な繋がりのあることが示唆される。グレリンの病態生理学的意義や抗老化作用に関する研究は、高齢期に生じる寝たきりや代謝性疾患の予防に重要であると思われる、高齢期の不可逆的な退行性変化の抑制に貢献するものと期待される。

本年度の研究では、基礎研究として、グレリンの食餌性の脂肪酸修飾機構、遺伝子改変動物を用いた機能解析、敗血症などの critical illness におけるグレリンの役割を検討し、臨床研究として、高齢者を対象にしたグレリン動態およびその作用を解析した。さらに、高齢者の QOL 向上を目指したグレリンの臨床応用に向けて、胃切除術後患者へのグレリン投与や臨床第 II 相試験の計画をスタートさせた。

B. 研究方法

本年度は、グレリンの実質的な臨床応用に向けて、以下のような広範な検討を行った。

- 1) グレリンの脂肪酸修飾に及ぼす脂質摂取および母乳の影響
- 2) グレリントランスジェニックマウスの機能解析
- 3) グレリン受容体アンチセンス導入トランスジェニックラットを用いたグレリンのエネルギー代謝調節機構の解明
- 4) エンドトキシン投与ラットにおけるグレリンの病態生理学的意義
- 5) 高齢ラットにおけるグレリン作用の評価
- 6) 高齢者における GH 分泌予備能とグレリンの関連
- 7) 胃切除術後患者へのグレリン補充療法およびグレリンの臨床第 II 相試験に向けての取り組み

(倫理面への配慮)

本研究においてヒトを対象とした研究を行う

に際しては、各研究施設で定められた臨床研究の規定に従って実施した。また、実験動物を用いた研究では、実験動物飼養および保管に関する基準、各研究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実施した。

C. 研究結果、および D. 考察

1) グレリンの脂肪酸修飾に及ぼす脂質摂取および母乳の影響

グレリンの生物活性には、28 アミノ酸のうち 3 番目セリンの脂肪酸修飾が必須である。児島は、食餌性に摂取した脂肪酸がグレリンの脂肪酸修飾に利用されるかどうかを明らかにするために、トリアシルグリセリドを混ぜた餌をマウスに摂取させ、胃のグレリン含量とその分子型および遺伝子発現について検討した。その結果、炭素数 4 個以下あるいは 12 個以上の短鎖および長鎖脂肪酸は、グレリンの脂肪酸修飾に影響しなかったが、炭素数 6 個から 10 個の中鎖脂肪酸を摂取させると、摂取した脂肪酸の炭素数で修飾されたグレリンが増加した。総グレリン含量とグレリン mRNA 発現には変化はなかった。また、中鎖脂肪酸を多く含む母乳を摂取している新生仔マウスは、強制的に早期離乳させた新生仔マウスに比べ、中鎖脂肪酸で修飾されたグレリンが増加していた。以上の結果は、経口での中鎖脂肪酸摂取が活性型グレリンを増加させ、ソマトポーズの治療に応用できる可能性を示している。

2) グレリントランスジェニックマウスの機能解析

中尾は、グレリンの生理学的意義を検討する目的で、トランスジェニックマウス(Tg)の開発を試みた。作製された Tg マウスは、des-acyl グレリンを過剰産生し、均整の取れた small phenotype を呈していた。Tg マウスの血清 GH および IGF-I の基礎値は低下しており、外因性グレリンに対する GH の反応も有意に低下していた。これらの結果から、過剰に産生された des-acyl グレリンが GH-IGF-I axis を抑制し、small phenotype を呈した可能性、さらには GH 分泌に対する des-acyl グレリンとグレリンとの競合作用も推察される。本研究の成果は、これまでに知られていなかった des-acyl グレリンの生

物学的意義や作用機構を検討する上で、重要な知見である。

3) グレリン受容体アンチセンス導入トランスジェニックラットを用いたグレリンのエネルギー代謝調節機構の解明

芝崎は、痩せを呈するグレリン受容体(GHSR)アンチセンス導入トランスジェニック(Tg)ラットを用いて、エネルギー代謝調節機構におけるグレリンの役割を解析した。このTgラットでは対照ラットと比べ褐色脂肪組織(BAT)のノルアドレナリン(NA)含量が多く、交感神経出力の亢進が示唆された。無麻酔無拘束下でBATのNA分泌をマイクロダイアリシス法で測定した結果、対照ラットのNA分泌はグレリンの脳室内投与により抑制されたが、Tgラットでは変化が認められなかった。従って、グレリンには中枢神経系からBATへの交感神経出力を抑制する作用があり、Tgラットでは中枢からのグレリンによる交感神経出力抑制系の情報伝達が障害されて痩せを呈していると考えられた。

4) エンドトキシン投与ラットにおけるグレリンの病態生理学的意義

寒川は、敗血症などのcritical illnessではsomatotrophic axisが変化し、るいそうを呈したり蛋白異化が亢進することに着目し、敗血症モデル動物を用いて、グレリンの病態生理学的意義と薬理作用を検討した。エンドトキシン連続投与時、血中GH・IGF-Iの低下に対して血中グレリン値は増加を認め、グレリンがなんらかの生理作用を有している可能性が示唆された。このモデルに外因性にグレリンを投与することにより、摂餌量や体重の増加、ヘモグロビンの軽度の増加が認められ、critical illnessに対するグレリン投与の有効性が示された。

5) 高齢ラットにおけるグレリン作用の評価

中里は、高齢者のソマトポーズに対するグレリンの有用性を明らかにする目的で、中年および高齢ラットでのグレリンによる成長ホルモン分泌および摂食亢進作用を検討した。12ヶ月齢および24ヶ月齢のラットに、無麻酔無拘束下でグレリン10 nmol/kgを静脈内投与し、0、15、30、60分後の血中GH濃度を測定した。いずれのラットにおいても成長ホルモン濃度は、グレリン静

脈内投与15分後に有意に増大し($P < 0.001$)、60分後には基礎値に復した。12ヶ月齢ラットと24ヶ月齢ラット間でのグレリンに対する反応性の違いは認められなかった。12ヶ月および24ヶ月齢の無麻酔無拘束ラットにグレリンを静脈内投与し、ラットの2時間摂餌量を測定した。グレリン投与群は生食投与群に比べ有意に摂餌量が増加した($P < 0.001$)。グレリンによる摂食亢進作用は、12ヶ月齢ラットと24ヶ月齢ラット間で差はなかった。これらの結果から、グレリンは高齢者のソマトポーズ抑制に有効に作用することが示唆された。

6) 高齢者におけるGH分泌予備能とグレリンの関連

千原は、健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者、計61名を対象に、GH分泌予備能と血漿グレリン値の検討を行った。アルギニンおよびL-ドーパによるGH分泌刺激試験において、GH反応の頂値が3 ng/ml以下の低反応者は、各々21% (13/61)、38% (21/55)であり、両試験ともに低反応であった者は16% (9/55)であった。この9名のGH分泌不良群とそれ以外のGH分泌良好群(46名)を比較すると血中グレリン基礎値に有意差はなく、グレリン基礎値とGH分泌反応にも有意な相関は認められなかった。GH分泌反応から判断すると、一般高齢者のなかに、器質的疾患によるGH分泌不全症患者に匹敵するGH分泌不全者が存在する可能性がある。また、高齢者におけるGH分泌予備能の低下に、血中グレリン値は関与しない可能性が示唆された。

7) 胃切除術後患者へのグレリン補充療法およびグレリンの臨床第II相試験に向けての取り組み

大津留は、胃切除術後の患者の病態とグレリンとの関連を明らかにするために、胃全摘、亜全摘、および膵頭十二指腸切除術後の53症例を対象に、血中グレリン濃度の測定を行った。術後の食欲低下や体重減少と血中グレリン濃度との間には相関関係が見られた。これらの結果から、胃摘出術後に認められる様々な機能障害にグレリン欠乏が関与している可能性が示唆され、現在胃切除患者に対するグレリン補充療法臨床研究を開始している。

赤水は、昨年度、グレリンの臨床第 I 相試験を実施し、グレリンの臨床効果と安全性を確認した。本年度は、臨床第 II 相試験「人工変形性股関節置換術周術期患者に対するグレリンの臨床効果に関する第 II 相臨床試験」を計画し、準備を進めている。また、新規に開発された ELISA によるグレリン測定キットを使用して健常成人の血中グレリン濃度を検討した。その結果、健常成人のグレリン濃度と性差や BMI・インスリン抵抗性などとの関連が明らかになった。現在健常高齢者での結果と比較検討している。

E. 結論

本年度は、遺伝子改変動物によるグレリンの生理学的意義や免疫系におけるグレリンの役割、脂質摂取によるグレリンの脂肪酸修飾などの基礎的な研究成果に加え、高齢者の GH 分泌機構とグレリンの関連や胃切除患者へのグレリンの治療応用など、臨床分野においてもきわめて先駆的な研究を行うことができた。

グレリンのアシル化機構については未だ解明には至っていないが、食餌性に、あるいは母乳から摂取した脂肪酸が、生体内でグレリンのアシル化基質として利用されることは、脂肪酸の経口摂取が活性型グレリンを増加させ、ソマトポーズ治療に応用できる可能性を示している。

des-acyl グレリンを過剰発現したトランスジェニックマウスの解析からは、des-acyl グレリンによる GH-IGF-I axis の抑制機構が示唆され、des-acyl グレリンの作用機構やグレリンとの相互作用などを検討する上で重要な知見である。

痩せを呈する GHSR アンチセンス導入トランスジェニックラットでは、交感神経出力の亢進が認められた。このことからエネルギー代謝調節系におけるグレリンの情報伝達は、交感神経出力を抑制し同化促進に作用する可能性が示唆された。

グレリンおよびグレリン受容体は、免疫応答細胞でも産生され、グレリンの immunomodulator としての作用が注目されている。エンドトキシン投与ラットでは血中グレリンが増加し、同ラットへのグレリン投与により摂餌量や体重の増加が認められた。グレリンは critical illness に対しても有効に作用する可能性

が示唆された。

高齢者を対象とした GH 分泌刺激試験では、約 40% に分泌不良型を認めたが、グレリンの血中濃度は正常であった。中年および高齢ラットへのグレリン投与は、GH 分泌および摂餌量を亢進させた。これらの結果から、グレリンの血中濃度や作用機構は加齢による影響を受けにくく、グレリンのソマトポーズ治療薬としての有効性が期待される。

胃切除患者の食欲低下や体重減少と血中グレリン濃度との相関が明らかとなり、同患者を対象としたグレリン補充療法を開始した。さらに臨床第 II 相試験「人工変形性股関節置換術周術期患者に対するグレリンの臨床効果に関する第 II 相臨床試験」を計画し、グレリンの治療応用に向けて準備を進めている。

G. 研究発表

- ① Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, Ono F, Kangawa K. Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem*, 50: 1077-1080, 2004.
- ② Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K. Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 110: 3674-3679, 2004.
- ③ Itoh T, Nagaya N, Yoshikawa M, Fukuoka A, Takenaka H, Shimizu Y, Haruta Y, Oya H, Yamagishi M, Hosoda H, Kangawa K, Kimura H. Elevated plasma ghrelin level in underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 170: 879-882, 2004.
- ④ Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kanagawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*, 146:

- 751-755, 2005.
- ⑤ Takeno R, Okimura Y, Iguchi G, Kishimoto M, Kudo T, Takahashi K, Takahashi Y, Kaji H, Ohno M, Ikuta H, Kuroda Y, Obara T, Hosoda H, Kangawa K, Chihara K. Intravenous administration of ghrelin stimulates growth hormone secretion in vagotomized patients as well as normal subjects. *Eur J Endocrinol*, 151: 447-450, 2004
 - ⑥ Hotta M, Ohwada R, Katakami H, Shibasaki T, Hizuka N, Takano K. Plasma levels of intact and degraded ghrelin and their responses to glucose infusion in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 5707-5712, 2004.
 - ⑦ Isomoto H, Nakazato M, Ueno H, Date Y, Nishi Y, Mukae H, Mizuta Y, Ohtsuru A, Yamashita S, Kohno S. Low plasma ghrelin levels in patients with helicobacter pylori-associated gastritis. *Am J Medicine*, 117: 429-432, 2004.
 - ⑧ Imanishi R, Ashizawa N, Ohtsuru A, Akiyama-Uchida Y, Kawano H, Kuroda H, Nakashima M, Saenko VA, Yamashita S, Yano K. GH suppresses TGF- β -mediated fibrosis and retains cardiac diastolic function. *Mol Cell Endocrinol*, 218: 137-146, 2004.
 - ⑨ Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K, Gomita Y. Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides*, 25: 279-287, 2004.
 - ⑩ Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl-modification of ghrelin. *Endocrinology*, in press.
 - ⑪ Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K, Kangawa K. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol*, 150: 447-455, 2004.
 - ⑫ Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology*, 145: 4144-4153, 2004.
 - ⑬ Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K. Short-term secretory regulation of active form of ghrelin and total ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 150: 913-934, 2004.
 - ⑭ Hanada T, Toshinai K, Date Y, Kajimura N, Tsukada T, Hayashi Y, Kangawa K, Nakazato M. Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. *Metabolism*, 53: 84-88, 2004.
 - ⑮ Kojima S, Nakahara T, Nagai N, Muranaga T, Tanaka M, Yasuhara D, Masuda A, Date Y, Ueno H, Nakazato M, Naruo T. Altered ghrelin and peptide YY responses to meals in bulimia nervosa. *Clin Endocrinol*, 62: 74-78, 2005.
 - ⑯ Kageyama H, Funahashi H, Hirayama M, 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 distribution in the rat pancreas. *Regul Pept*, 126: 67-71, 2005.
 - ⑰ Mondal M S, Date Y, Yamaguchi H, Toshinai K, Kangawa K, Nakazato M. Identification of ghrelin neurons and its receptor, GHS-R, in rat brain. *Regul Pept*, 126: 55-59, 2005.
 - ⑱ Ueno H, Yamaguchi H, Nakazato M. Ghrelin: A gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regul Pept*, 126: 11-19, 2005.
 - ⑳ Osawa H, Nakazato M, Date Y, Kita H, Ohnishi H, Ueno H, Shiiya T, Sato K, Ishino Y, Sugano K. Impaired production of gastric ghrelin combined with decreased plasma ghrelin in chronic gastritis associated with *helicobacter pylori*. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 10-16, 2005.

F. 健康危険情報

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特許出願

グレリンの生理学的機能のレギュレーター

国内出願番号: 特願2004-171245

提出: 2004年8月9日

海外用PCT出願

出願番号: PCT/JP2004/015413

名称: グレリンの生理学的機能のレギュレーター

ー

出願日: 2004年10月19日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

エンドトキシン投与モデルラットを用いたグレリンの病態生理学的作用の検討

主任研究者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 部長

敗血症など Critical illness では somatotropic axis をはじめ種々のホルモンが変化する。慢性的な Critical illness の状態ではいそうを呈することが臨床的に経験され、蛋白異化が亢進している。グレリンには GH 分泌刺激作用、摂食亢進作用、脂肪蓄積作用があり、Critical illness への臨床応用が期待される。そこで、同モデル動物を用いて、グレリンの病態生理学的意義と薬理作用を検討した。エンドトキシン連続投与時、2-5 日目で血中 GH・IGF-I の低下が認められたが、逆に血中グレリン値は増加を認めた。エンドトキシン投与により血中グレリン濃度が変化することから、グレリンがなんらかの生理作用を有している可能性が示唆された。このモデルに外因性にグレリン投与することにより、摂食量や体重の増加、ヘモグロビンの軽度の増加が認められた。敗血症などの Critical illness に対してグレリン投与が有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

グレリンは成長ホルモン分泌促進作用や食欲増進作用など多彩な生理作用を有していることが明らかにされてきた。感染症など Critical illness では somatotropic axis をはじめ種々のホルモンが変化することが知られている。ヒトでは、急性期には GH の上昇、IGF-I の低下が、慢性期には GH、IGF-I が低下することが知られている (Van den Berghe G, et al. JCEM 1998)。ラットでは、エンドトキシン投与急性期、連続投与時ともに GH、IGF-I が低下することが知られている (Fan J, et al. Endocrinology 1994, Soto L, et al. J. Endocrinology 1998)。また、ヒトの Critical illness において GHS の投与により GH、IGF-I の上昇がみられることなどから、内因性 GHS (=グレリン)の関与が示唆されていた (Van den Berghe G, et al. JCEM 1997)。慢性的な Critical illness の状態ではいそう症候群を呈することが臨床的に経験される。このような状態では食べているにも関わらず低アルブミン血症などが認められ、蛋白異化が亢進していると考えられる。アナボリック作用のある GH の投与が窒素バランスを改善することが期待され様々な研

究が行われているが、その効果に関しては未だ意見の分かれるところである。グレリンには GH 分泌刺激作用のほかに摂食亢進作用、脂肪蓄積作用 (Tschop M, et al. Nature 2000 etc.) などがわかっており、Critical illness への臨床応用が期待される。そこで、同モデル動物を用いて、グレリンの病態生理学的意義と薬理作用を検討した。

B. 研究方法

- 1) エンドトキシン投与時の somatotropic axis (GH - IGF-I) とグレリンとの関係についての検討。
 - ・リポポリサッカライド (LPS) 単回投与時の血中グレリン値と GH、IGF-I 値の測定。
 - ・LPS 連続投与時の血中グレリン値と GH、IGF-I 値の測定。
- 2) エンドトキシン投与モデルラットを用いて、グレリン投与による臨床応用への可能性についての検討。
 - ・LPS 連続投与ラットにグレリンを外因性に投与したときの各パラメーターの変化についての検討。

3) 対象: Wister ST rat 7-week ♂ (200~250 g)

4) 負荷物質: LPS (E. coli O26:B6) LD50=約 50mg/kg、ラットグレリン

5) ホルモン測定: グレリン (RIA 法)、GH、IGF-I、leptin (ELA 法)

6) 生化学: CBC 検査: SRL に依頼 (倫理面への配慮)

動物実験に際しては当施設のカイドラインに従い、その愛護に留意し投与と実験や屠殺の際に苦痛を最小限にとどめるように十分に配慮した。

C. 研究結果

1) LPS 単回投与時 (acute phase) の血中グレリン、GH、IGF-I 値

saline、LPS 10 mg/kg を腹腔内投与し、各時間に下大静脈より採血、投与後は絶食した。図1のように、血中グレリン濃度は低下した。

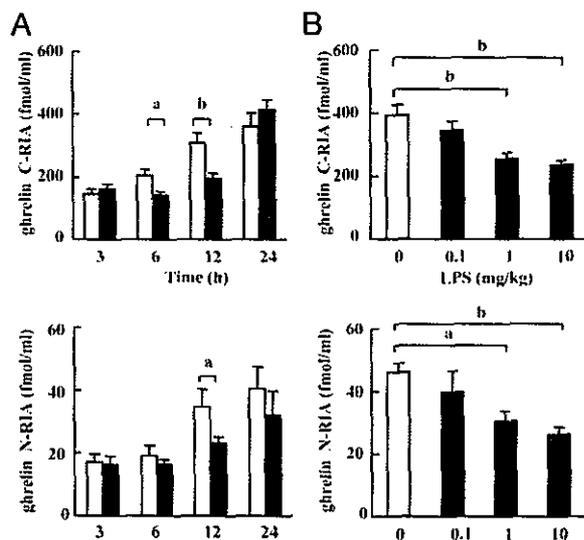
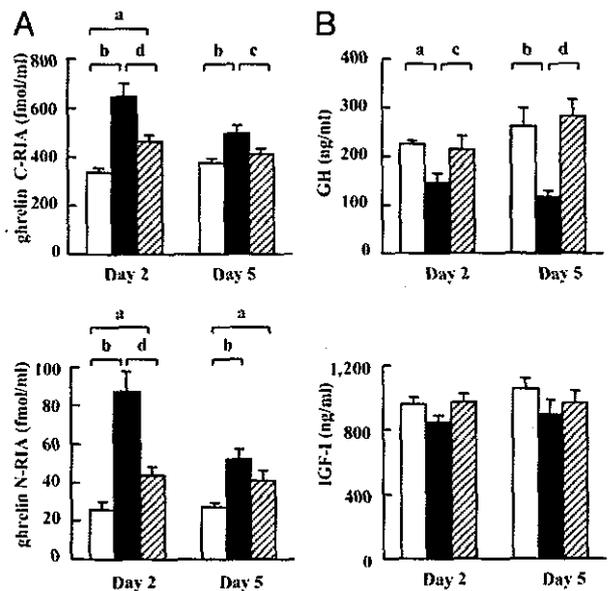


図1: LPS 単回投与による血中グレリン、GH、IGF-I 値への影響。値は、mean ± SEM (n = 6 for each group). a, P < 0.05; b, P < 0.01 (vs. saline).

2) LPS 連続投与時 (chronic phase) の血中グレリン、GH、IGF-I 値

次に、AM 8:00 に saline、LPS 1 mg/kg を連日腹腔内投与。Day 2 および Day 5 の投与後、12 時間絶食後に採血した。図2のように、血中グレリン濃度は上昇した。その傾向は、pair feeding (PF)でも同様であった。

図2: LPS 連続投与による血中グレリン、GH、



IGF-I 値への影響。a, P < 0.05 vs. saline; b, P < 0.01 vs. saline; c, P < 0.05 vs. PF; d, P < 0.01 vs. PF. □: saline, ■: LPS, ▨: PF.

3) LPS 連続投与に対するグレリン treatment の効果 (摂餌量、体重)

このモデルにグレリンを投与することにより、図3のように、摂餌量と体重の増加を認めた。

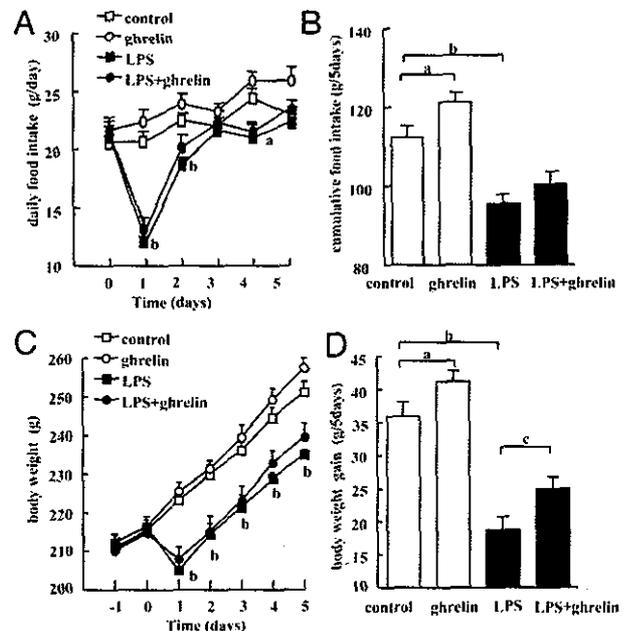


図3: LPS 連続投与に対するグレリン投与の影響 (摂餌量、体重)。a, P < 0.05 vs. control; b, P < 0.01 vs. control; c, P < 0.05 vs. LPS.

D. 考察

LPS 単回投与時、投与後 6、12 時間で C-RIA グレリン、12 時間で N-RIA グレリンの抑制が認められ、その効果は LPS の用量依存性であった。しかし、GH の低下は血中グレリン値の抑制以前(3 時間)より認められ、血中グレリン値と GH とのはっきりとした関係は認められなかった。

LPS 連続投与時、2 日、5 日目で血中 GH、IGF-I の低下が認められたが、逆に血中グレリン値は増加を認めた。さらに PF 群よりも増加していた。エンドトキシン投与急性期、慢性期において血中グレリンが変化することから、グレリンがなんらかの生理作用を有している可能性が示唆された。

LPS 連続投与により体重、摂餌量の減少、低アルブミン血症、ヘモグロビン低下、血小板数の増加などの所見が認められた。このモデルに外因性にグレリン投与することにより、体重の増加、脂肪量の増加、ヘモグロビンの軽度の増加が認められた。敗血症などの Critical illness に対してグレリン投与が有効である可能性が示唆された。

E. 結論

LPS 連続投与によって、血中グレリン値は増加を認めた。さらに PF 群よりも増加していた。エンドトキシン投与により血中グレリンが変化することから、グレリンが敗血症に対してなんらかの生理作用を有している可能性が示唆された。また、LPS 連続投与により体重、摂餌量の減少、低アルブミン血症、ヘモグロビン低下などの所見が認められた。このモデルに外因性にグレリンを投与することにより、摂食量や体重の増加、ヘモグロビンの軽度の増加が認められた。敗血症などの Critical illness に対してグレリン投与が有効である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y, Kangawa K. Separate measurement of plasma levels of acylated and

desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 6-9, 2004.

- ②Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Arai Y, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*, 146: 355-364, 2004.
- ③Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya T, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology*, 145: 4144-4153, 2004.
- ④Akamizu T, Takaya K, Irako T, Hosoda H, Teramukai S, Matsuyama A, Tada H, Miura K, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Tanaka K, Kangawa K. Pharmacokinetics, safety, endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol*, 150: 447-455, 2004.
- ⑤Hosoda H, Doi K, Nagaya N, Okumura H, Nakagawa E, Enomoto M, Ono F, Kangawa K. Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem*, 50: 1077-1080, 2004.
- ⑥Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nomura S, Kangawa K, Ishii H. Helicobacter pylori infection modifies gastric and plasma ghrelin dynamics in Mongolian gerbils. *Gut*, 53: 187-194, 2004.
- ⑦Hanada T, Toshinai K, Date Y, Kajimura N, Tsukada T, Hayashi Y, Kangawa K, Nakazato M. Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. *Metabolism*, 53: 84-88, 2004.
- ⑧Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K, Gomita Y. Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides*, 25: 279-287, 2004.

- ⑨ Nakai Y, Hosoda H, Nin K, Ooya C, Hayashi H, Akamizu T, Kangawa K. Short-term secretory regulation of active form of ghrelin and total ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 150: 913-934, 2004.
- ⑩ Nagaya N, Moriya J, Yasumura Y, Uematsu M, Ono F, Shimizu W, Ueno K, Kitakaze M, Miyatake K, Kangawa K. Effects of Ghrelin Administration on Left Ventricular Function, Exercise Capacity, and Muscle Wasting in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation*, 110: 3674-3679, 2004.
- ⑪ Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T. Endogenous Ghrelin in Pancreatic Islets Restricts Insulin Release by Attenuating Ca^{2+} Signaling in α -Cells: Implication in the Glycemic Control in Rodents. *Diabetes*, 53: 3142-3151, 2004.
- ⑫ Takeno R, Okimura Y, Iguchi G, Kishimoto M, Kudo T, Takahashi K, Takahashi Y, Kaji H, Ohno M, Ikuta H, Kuroda Y, Obara T, Hosoda H, Kangawa K, Chihara K. Intravenous administration of ghrelin stimulates growth hormone secretion in vagotomized patients as well as normal subjects. *Eur J Endocrinol*, 151: 447-450, 2004.
- ⑬ Itoh T, Nagaya N, Yoshikawa M, Fukuoka A, Takenaka H, Shimizu Y, Haruta Y, Oya H, Yamagishi M, Hosoda H, Kangawa K, Kimura H. Elevated plasma ghrelin level in underweight patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 170: 879-882, 2004.
2. 学会発表
- ① Hataya Y, Akamizu T, Hosoda H, Kanamoto N, Moriyama K, Takaya K, Arai H, Kangawa K, Nakao K. Alteration of plasma ghrelin levels in rats with lipopolysaccharide-induced wasting syndrome and effects of ghrelin treatment on the syndrome. 12th International Congress of Endocrinology, August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal.
- ② Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Arai H, Kangawa K, Nakao K. Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. 12th International Congress of Endocrinology, August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal.
- ③ Kangawa K. Novel peptide discovery. 12th International Congress of Endocrinology, August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal.
- ④ Kangawa K. Ghrelin and feeding. The 43rd Karolinska Institutet Nobel Conference "Brain control of feeding behaviour", 2004, Stockholm, Sweden.
- ⑤ Kangawa K. Discovery of Bioactive Peptides: Ghrelin. JSPS International Meeting "Frontiers of Proteomics -Aims and Perspective-", 2004, Osaka.
- ⑥ Kangawa K. Ghrelin: Discovery and physiological significance. The 3rd Biennial Scientific Meeting of Asia Pacific Paediatric Endocrinology Society, 2004, Kobe, Japan.
- ⑦ Takamura N, Iwanaga K, Abe Y, Ohtsuru A, Hosoda H, Kangawa K, Shinzato K, Kohno S, Yamashita S, Aoyagi K. Increased plasma ghrelin and adrenomedullin in hemodialysis patients with sustained and episodic hypotension. 12th International Congress of Endocrinology, August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal.
- ⑧ Dezaki K, Watanabe M, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. Suppression by ghrelin of glucose-induced insulin release via inhibition of Ca^{2+} signaling in rat pancreatic β -cells. 12th International Congress of Endocrinology, August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal.
- ⑨ Soya H, Iwasaki M, Hosoda H, Kangawa K, Omori T, Nishijima T. Consistent decrease in plasma ghrelin levels after prolonged exhaustive exercise in man: possible link with enhanced lipolytic condition. 12th International Congress of

- Endocrinology, August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal.
- ⑩ 赤水尚史、五十子大雅、細田洋司、高屋和彦、寒川賢治：グレリンの臨床応用。第 77 回日本内分泌学会学術総会，京都，2004.
- ⑪ 金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、旗谷雄二、有安宏之、森山賢治、高屋和彦、細田洋司、児島将康、荒井宏司、寒川賢治、中尾一和：USF (Upstream stimulatory factor) はヒトグレリン遺伝子発現に関与する。第 77 回日本内分泌学会学術総会，京都，2004.
- ⑫ 有安宏之、高屋和彦、細田洋司、荒井宏司、赤水尚史、寒川賢治、中尾一和：グレリンの分泌調節とトランスジェニックマウスによる作用の解明。第 77 回日本内分泌学会学術総会，京都，2004.
- ⑬ 岩倉 浩、細田公則、孫 徹、藤倉純二、富田努、野口倫生、高屋和彦、伊藤裕、赤水尚史、益崎裕章、小川佳宏、林 達也、井上 元、細田洋司、児島将康、寒川賢治、中尾一和：Rat glucagon promoter-および rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mouse の解析。第 77 回日本内分泌学会学術総会，京都，2004.
- ⑭ 旗谷雄二、赤水尚史、細田洋司、金本巨哲、森山賢治、高屋和彦、荒井宏司、寒川賢治、中尾一和：エンドトキシン投与ラットを用いたグレリンの臨床応用への検討。第 41 回日本臨床分子医学会学術集会，京都，2004.
- ⑮ 寒川賢治：新規ペプチドホルモンの発見・構造決定とその基盤的研究。第 77 回日本内分泌学会学術総会（学会賞受賞講演），京都，2004.
- ⑯ 三浦直子、細田洋司、杉原茂孝、寒川賢治：胎児および小児期におけるグレリンの発現変化と分布特異性の検討。第 77 回日本内分泌学会学術総会，京都，2004.
- ⑰ 十枝内厚次、伊達 紫、嶋田充志、吉松博信、塩田清二、寒川賢治、中光里雅：ラット視床下部腹内側核破壊後のグレリン生合成の変化，第 77 回日本内分泌学会学術総会。京都，2004.
- ⑱ 村下真理、久住一郎、細田洋司、寒川賢治、小山 司：新規向精神病薬オランザピン治療による血中グレリンの変化，第 77 回日本内分泌

学会学術総会，京都，2004.

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
研究協力者
旗谷雄二（京都大学医学部）
細田洋司（国立循環器病センター研究所）
赤水尚史（京都大学医学部）

グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発

分担研究者 中尾一和 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科 教授

グレリンの生理学および臨床的意義を検討するために、全身の諸臓器でグレリンを過剰発現するトランスジェニックマウス（Tg マウス）の作製を試みた。

chicken β -actin promoter の下流に preproghrelin cDNA を組み込み、3'端に rabbit β -globin 遺伝子を付加したコンストラクトを用いて、2 ラインの Tg マウスを得た。

我々の作成した Tg マウスは、グレリンではなく des-acyl ghrelin を過剰産生していた。Tg マウスは均整の取れた small phenotype を呈した。摂餌量や栄養状態には有意差を認めないが、血清 GH、IGF-I 濃度が低下していた。下垂体重量や組織像に変化はなかった。GHRH に対する GH の反応に有意差はないが、グレリンに対する GH の反応は Tg マウスで低下していた。下垂体の GHSR 発現は Tg マウスで亢進し、視床下部における GHRH、ソマトスタチンの発現には有意差を認めなかった。以上より、過剰発現した des-acyl ghrelin が、GH-IGF-I axis を抑制して small phenotype を生ずることが示唆された。

A. 研究目的

グレリン (ghrelin) は、growth hormone secretagogue 受容体 (GHSR) の内因性リガンドとして同定され、GH 分泌促進、摂食亢進、胃酸分泌促進、胃の蠕動運動亢進などの多彩な作用を有する。グレリンは主として胃体部に存在する X/A 細胞で産生されている。胃切除後患者の平均血漿グレリン濃度を検討したところ、平均血漿グレリン濃度は健常群のおよそ 1/3 に低下しており、ヒトにおいて血中に存在するグレリンの主分泌源は胃と考えられている。しかしながら、グレリンは消化管以外にも視床下部、下垂体、腎臓、膵臓、精巣、胎盤など全身的に発現を認めることが報告されている。一方、GHSR も視床下部や下垂体だけでなく、全身的に発現していることが報告されている。

ホルモンなどの生理活性物質の生理的薬理的意義を解析するためには遺伝子を過剰に発現させたトランスジェニック動物の開発がしばしば有効なツールとなりうる。上述のようにグレリンは消化管以外にも全身の種々の組織での発現が確認されているが、グレリンの特徴的な 3 番目の

セリン残基の脂肪酸修飾は、体内のどの部位で、またどのようなメカニズムで行われているか、現在のところ不明である。そこで我々はグレリンの生理学及び臨床的意義を検討するために、chicken β -actin promoter (CAG promoter) の下流にグレリン cDNA を組み込んだコンストラクトを作製し、全身の諸臓器でグレリンを過剰発現するグレリン過剰発現トランスジェニックマウス (Tg マウス) の作製を試みた。

B. 研究方法

CAG promoter の下流にマウス preproghrelin cDNA 全長を組み込み、3'端に rabbit β -globin 遺伝子を付加したコンストラクトを作成した。BDF1 マウスの受精卵 200 個にマイクロインジェクションし、6 匹のグレリン過剰発現 Tg マウスを得た。そのうち 2 匹のライン化に成功した (Tg10-1 : 6-copy line, Tg9-2 : 12-copy line)。血中および組織中のグレリン測定は国立循環器病センター研究所生化学部 細田洋司先生にお願ひし、RIA 法にて測定した。

(倫理面への配慮)

動物への扱いは、実験動物飼養および保管に関する基準、各研究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実施した。

C. 研究結果

1) グレリン mRNA の遺伝子発現分布

定量 PCR 法によりグレリン mRNA の遺伝子発現分布を検討したところ、野生型 (WT) マウスにおいて、グレリン mRNA は胃に最も多く発現しており、小腸、視床下部、下垂体、肺でも若干ながら発現していた。WT マウスの胃での発現レベルを 100 とした時、Tg マウスの胃では、2 ラインでそれぞれ 1100 (Tg9-2) と 5200 (Tg10-1) であった。胃以外にも、大脳、肝臓、下垂体など検索しえたすべての臓器でグレリンの遺伝子発現亢進を認めた。

2) 血中および組織中グレリン濃度

血中グレリン濃度は、C 端認識抗体で測定した total ghrelin の濃度が、WT で 1104.5 ± 94.4 fmol/ml であるのに対し、Tg9-2 は約 10 倍の 11230.6 ± 1147.1 fmol/ml、Tg10-1 は約 44 倍の 48565.5 ± 9291.5 fmol/ml に上昇していた。一方、N 端認識抗体で測定した acylated ghrelin の濃度は、WT で 83.7 ± 11.9 fmol/ml であるのに対し、Tg9-2 は 79.7 ± 10.1 fmol/ml、Tg10-1 は 86.3 ± 21.1 fmol/ml であり、acylated ghrelin の上昇は認めなかった。組織内グレリン濃度も、血液の場合と同様に、total ghrelin は上昇していたが、acylated ghrelin の上昇は認めなかった。

3) 体重及び組織重量

Tg マウスは、同腹の WT マウスに比べて small phenotype を呈した。雄の体重は、Tg9-2 は WT の 90%、Tg10-1 は約 70% で、雌の Tg10-1 は WT の約 80% であり、週齢を経ても追いつくことはなかった。マウスの体重を吻臀長の 2 乗で割った BMI は、8 週齢雄マウスで、WT : 34.4 ± 0.8 g/cm² に対して、Tg9-2 : 34.7 ± 0.6 g/cm²、Tg10-1 : 34.5 ± 0.8 g/cm² であり 3 者の間に有意差を認めなかった。また各組織重量の体重比も有意差はなかった。下垂体重量も有意差を認めなかった。

4) 下垂体の免疫組織学的検討

抗グレリン抗体を用いて Tg マウス下垂体の

免疫染色を行ったところ、グレリンの C 端認識抗体で染色される細胞が確認できたものの、N 端認識抗体では染色される細胞は認めなかった。

5) 摂餌量および栄養状況

8 週齢雄マウスで体重あたりの摂餌量は、WT : 149.1 ± 7.6 mg/g(BW)/day に対して、Tg9-2 : 154.2 ± 3.2 mg/g(BW)/day、Tg10-1 : 155.2 ± 5.9 mg/g(BW) /day であり 3 者の間に有意差を認めなかった。また、栄養状態の指標である血糖、蛋白、コレステロール等も Tg マウスと WT マウスの間で有意差はなかった。

6) 血清 GH 濃度・IGF-I 濃度

血清 GH 濃度は、WT > Tg9-2 > Tg10-1 の順に低下する傾向があった (8 週齢雄 ; WT : 5.5 ± 1.9 ng/ml, Tg9-2 : 3.7 ± 0.7 ng/ml, Tg10-1 : 2.3 ± 0.9 ng/ml)。血清 IGF-I 濃度は、WT > Tg9-2 > Tg10-1 の順に有意に低下していた (8 週齢雄 ; WT : 522.0 ± 23.6 ng/ml, Tg9-2 : 413.2 ± 49.0 ng/ml, Tg10-1 : 346.1 ± 25.6 ng/ml)。

7) GH 以外の下垂体前葉ホルモン

Tg マウスと WT マウスの間で LH, FSH, TSH, ACTH に有意差を認めなかった。

8) 下垂体の組織学的検討

Tg マウスと WT マウス下垂体重量に有意差はなく、HE 染色による組織学的検討においても両者に差は認めなかった。抗 GH 抗体による免疫組織化学的検索では、ソマトトロフの分布・数に有意な差を認めなかった。

9) GHRH 負荷試験・グレリン負荷試験

GHRH に対し、雌雄とも Tg10-1、WT マウス間で GH の反応に差を認めなかった。グレリンに対しては、Tg10-1 において GH の反応性の低下を認めた。

10) 下垂体の GHSR の遺伝子発現

下垂体における GHSR の遺伝子発現は、WT を 1 とした時、Tg9-2 で 1.56、Tg10-1 で 3.46 と、Tg マウスで亢進していた。

11) 視床下部の GHRH、ソマトスタチンの遺伝子発現

視床下部における GHRH の遺伝子発現は、WT を 1 とした時、Tg9-2 で 0.88、Tg10-1 で 0.80、ソマトスタチンの遺伝子発現は、WT を 1 とした時、Tg9-2 で 1.08、Tg10-1 で 0.97 と、GHRH、

ソマトスタチンとともに Tg マウス、WT マウスの間で有意差を認めなかった。

D. 考察

グレリン過剰発現 Tg マウスの作製を試みたものの、検索しえた限りにおいては、我々の作製した Tg マウスは、グレリンではなく des-acyl ghrelin を全身で過剰産生していた。現在のところ、グレリンの脂肪酸修飾が体内のどの部位で、またどのようなメカニズムで行われているか不明であるが、脂肪酸修飾が全身の諸臓器でユビキタスには行われていないことが示唆された。しかしながら、Tg マウスは均整の取れた small phenotype を呈した。摂餌量や栄養状態は Tg マウスと WT マウスの間で有意差を認めず、GH-IGF-I axis が抑制されていることが明らかになり、過剰発現した des-acyl ghrelin が GH-IGF-I axis を修飾した可能性が示唆された。下垂体重量や組織学的検討から、GH-IGF-I axis の抑制の原因は、下垂体の発生学的な問題ではないことが示された。

GHRH 負荷試験とグレリン負荷試験の結果から、我々は、過剰発現した des-acyl ghrelin がグレリンに対する GH 分泌反応の低下を引き起こし、small phenotype を呈したのではないかと推測した。更に下垂体における GHSR 発現の亢進は、des-acyl ghrelin が下垂体の GHSR において antagonist として作用していることを疑わせるが、Bednarek らは、GHSR に対する des-acyl ghrelin の結合能は非常に低くグレリンの antagonist にはなりえないと報告している。このことから、Tg マウスにおいてグレリン投与による GH の分泌反応が低下していたのは、過剰発現した des-acyl ghrelin が未知の受容体を介して作用した可能性が考えられる。

GH の分泌には視床下部の GHRH が促進的に、ソマトスタチンが抑制的に働くが、Tg マウスにおいて GHRH、ソマトスタチンの遺伝子発現は有意差を認めなかった。しかしながら、GHRH やソマトスタチンは律動的な分泌によって GH 分泌を調節しており、遺伝子発現量に有意差を認めないからといって、一概に変化なしとは言いがたい。また、GH の分泌が低下しているにもかかわらず、

からといって、一概に変化なしとは言いがたい。また、GH の分泌が低下しているにもかかわらず、GHRH やソマトスタチンが positive feedback や negative feedback を受けていないことは、視床下部レベルにも des-acyl ghrelin が何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。

E. 結論

我々の作成した Tg マウスの解析の結果、des-acyl ghrelin が、GH-IGF-I axis を抑制して small phenotype を生ずることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, Hosoda H, Akamizu T, Arai Y, Kangawa K, Nakao K. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*, 146: 355-364, 2005.

2. 学会発表

- ①有安宏之、高屋和彦、細田洋司、荒井宏司、赤水尚史、寒川賢治、中尾一和：グレリンの分泌調節とトランスジェニックマウスによる作用の解明。第 77 回日本内分泌学会学術総会、京都、2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

荒井宏司（京都大学医学部）

有安宏之（京都大学医学部）

金本巨哲（京都大学医学部）

旗谷雄二（京都大学医学部）

健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者における GH分泌予備能と血漿グレリン値

分担研究者 千原和夫 神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座
内分泌代謝・神経・血液腫瘍内科学 教授

GH分泌は加齢とともに低下するが、GH欠乏状態に陥る高齢者の割合やその機序は不明である。今回、62歳以上の健常高齢者、および軽症高血圧、糖尿病等で治療をうけているが他に大きな異常所見のない患者（軽症疾患罹患高齢者）に対してGH分泌刺激試験を行ない、GH反応を検討した。また、血中グレリン値を測定し、GH分泌反応と比較し、末梢血中グレリンのGH分泌反応における意義について検討した。61名（男性25名、女性36名）の被験者にアルギニンおよびL-ドーパを投与したところ、GH反応の頂値が3 ng/ml以下の低反応者は各々21%（13/61）、38%（21/55）であった。両試験ともに低反応であった者は16%（9/55）であった。この9名のGH分泌不良群とそれ以外のGH分泌良好群（46名）を比較すると血漿グレリン基礎値に有意差はなく、グレリン基礎値とGH分泌反応にも有意な相関は認められなかった。GH分泌反応から判断すると、一般高齢者のなかに、器質的疾患によるGH分泌不全症患者に匹敵するGH分泌不全者が存在する可能性がある。また、高齢者におけるGH分泌予備能の低下に、血漿グレリン値は関与しない可能性が示唆された。

A. 研究目的

成人GH分泌不全症では、血中脂質・内臓脂肪の増加や、骨塩量・筋力の低下が出現すること、さらにこれらの所見はGH投与によって改善することが明らかとなり、最近では、小児のGH分泌不全症と同様に、成人のGH分泌不全症も治療すべきであると考えられている。一方、GH分泌は加齢とともに低下するので、明らかな視床下部下垂体の器質的疾患が無いにもかかわらずGH分泌不全症に陥っている方々が高齢者の中に潜在する可能性も考えられる。そこで今回、60歳以上の健常高齢者、および軽症高血圧、糖尿病等で治療をうけているが他に大きな異常所見のない患者（軽症疾患罹患高齢者）に対してGH分泌刺激試験を行ない、GH反応を検討した。また、血中IGF-I値を測定し、GH分泌反応と比較した。また、この検査によって抽出されたGH分泌不全者が、特有の症状を持つのか検討する目的で、アンケート

調査をおこなった。さらに、末梢血中グレリンのGH分泌予備能に果たす意義を検討する目的で、GH刺激試験前、および30分後のグレリン値を測定した。

B. 研究方法

62歳以上の健常高齢者（34名、男性15名、女性19名）、および軽症高血圧、糖尿病、高脂血症等で治療をうけているが他に大きな異常所見のない患者（軽症疾患罹患高齢者27名、男性10名、女性17名）に対し、GH分泌刺激試験を行なった。被験者は朝食をとらずに、異なった日の午前中に、アルギニン試験（アルギニンを30g、30分かけて静脈内投与）、およびL-ドーパ試験（L-ドーパ0.5 mgを経口投与）をうけた。薬剤の投与前、投与開始後15、30、45、60、90、120分の時点で採血、血漿を分離、凍結保存した。その後、血漿GH値をIEMA（トーソー）で測定し、各被験者のGH

分泌能を検討した。また、GH 分泌刺激前に採取した血漿を使用して、IGF-I、adiponectin、総タンパク、アルブミン、GOT、GPT、総コレステロール、中性脂肪、クレアチニン値を測定した。変数間の相関関係は Pearson の相関係数を算出、有意検定した。GH 分泌刺激前、および刺激 30 分後に、グレリン測定用に EDTA・アプロチニン採血を行い、血漿分離後、血漿の 1/10 容の 1 規定塩酸を加え、測定まで -70°C で保存した。その後、一括して desacyl-ghrelin ELISA kit (三菱化学ヤトロン) でトータルグレリン値を測定した。アルギニン試験、および L-ドーパ試験前後の血漿グレリン値の変動は、paired T 検定により検定し、 $P < 0.05$ のとき有意とした。

自覚症状を調べる目的で、調査用紙を郵送、アンケート調査を行なった。質問は同世代の他の人に比べ、自分自身に次の症状がみられるかどうかを問うものであった。質問内容は、同世代の他の人に比べ、(1) 疲れやすいか？ (2) スタミナの低下を感じる？ (3) 集中力の低下を感じるか？ (4) 他の人に比べ、気が落ちていると感じるか？ (5) 自分自身が何ごとをするにもおっくうであると感じるか？ (6) 皮膚が乾燥しているように感じるか？ (7) 体毛が柔らかくなったと感じるか？ (8) 体に脂肪がついてきたと感じるか？ (9) 筋力が落ちてきたと感じるか？ という 9 項目であり、A. あてはまらない、B. あてはまる、C. 非常によくあてはまる、の 3 段階のいずれに該当するか返答を依頼した。GH 分泌不全群 (アルギニン試験、および L-ドーパ試験において、ともに GH 頂値が 3 ng/ml 以下) と GH 分泌が保たれている群 (アルギニン試験、L-ドーパ試験の少なくとも 1 つにおいて GH 頂値が 3 ng/ml 以上) で、症状の重症度を示す尺度である A、B、C の出現率に違いがあるか、マンホイットニーの U 検定で比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は神戸大学医学部附属病院医薬品及び医療用具の臨床研究審査委員会の許可を得て行なったものであり、被験者には、口頭、および書面で十分に説明の上、同意を得た。

C. 研究結果

実際に本研究における被験者は 62 歳から 91 歳までの 61 名で、平均年齢は 71 歳であった。年齢分布は、62~69 歳: 27 名 (男性 11 名、女性 16 名)、70~79 歳: 27 名 (男性 13 名、女性 14 名)、80~89 歳: 6 名 (男性 1 名、女性 5 名)、90 歳代 1 名 (女性) であった。BMI は平均 23.4 ± 3.4 であった。

軽症疾患罹患高齢者 (27 名) が治療 (生活習慣の改善指導をも含む) を受けている疾患は、高血圧 (17 名)、高脂血症 (8 名)、糖尿病 (5 名)、内分泌疾患 (4 名、すべて橋本病)、肝疾患 (3 名)、心疾患 (3 名、狭心症 2 名、不整脈 1 名)、骨粗鬆症 (2 名)、消化器疾患 (1 名、胃潰瘍)、泌尿器系疾患 (1 名、前立腺肥大)、膠原病 (1 名、シェーグレン症候群) であった。

アルギニン試験 (被験者数 61 名) において、平均血漿 GH 頂値は 8.1 ± 7.1 (mean \pm SD) ng/ml であり、 3 ng/ml 以下であったものは 13 名 (21%) であった。L-ドーパ試験 (被験者 55 名) において、平均血漿 GH 頂値は $5.9 \pm 6.1 \text{ ng/ml}$ であり、 3 ng/ml 以下であったものは 21 名 (38%) であった。両試験を受けた 55 名中、血漿 GH 頂値が 3 ng/ml 以下であったものは 9 名 (16%) であった。Biller らが提唱する GH 分泌不全の基準にしたがって、GH 頂値のカットオフ値を、アルギニン試験では 1.4 ng/ml 、L-ドーパ試験では 0.64 ng/ml とすると、それぞれ 3 名 (4.9%)、5 名 (9.1%) が該当し、共に該当するものは 2 名 (3.6%) であった。アルギニン試験における GH 頂値と、L-ドーパ試験における GH 頂値の間には、相関係数 0.49 (危険率 $p < 0.05$) の有意な相関がみられた。アルギニン試験、L-ドーパ試験において、GH 頂値がともに 3 ng/ml 以下であった GH 分泌不全群と、少なくとも 1 つが 3 ng/ml 以上であった GH 分泌良好群に分類したとき、GH 分泌不全群では、GH 頂値が低い以外に、BMI が大である傾向にあったが、年齢、IGF-I 値には差がなかった。

IGF-I 値は $120.9 \pm 32.4 \text{ ng/ml}$ で、Biller らによる GH 分泌不全を示唆する 1 つの目安である 77 ng/ml 以下のものは 7 名であった。この 7 名の GH 頂値の平均は、アルギニン試験で 11.9 ng/ml 、L-ドーパ試験で 8.6 ng/ml であり、GH 頂値は必

ずしも低値ではなかった。アルギニン試験、およびL-ドーパ試験ともに3 ng/ml以下であったものは、7名のうち2名のみであった。IGF-I値とアルギニン試験のGH頂値、L-ドーパ試験におけるGH頂値の間には、それぞれ明確な相関はみられなかった。なお、血漿IGF-I値は重篤な肝障害時に低下するが、血液生化学検査から、本研究の被験者のうちには重篤な肝障害に該当する者はいないと判断した。

BMIが25以上である肥満者は、被験者61名のうち、13名(21%)であった。肥満者ではGH分泌が抑制される傾向にあるが、BMIとアルギニン試験、およびL-ドーパ試験におけるGH頂値の間には相関関係は認められなかった。BMIと血漿IGF-I値の間にも相関関係は認められなかった。

GH分泌不全者では、血漿adiponectinが低下しているという報告、およびGHの補償によって増加するという報告がある。adiponectinは糖尿病、動脈硬化症の発症に関与する可能性が示されており、GH分泌不全における動脈硬化症の発症、進展にも関与する可能性があるため、adiponectinを測定したが、血漿adiponectin値とBMI、GH頂値、およびIGF-I値の間に有意な相関関係は認められなかった。

被験者のうち、総タンパク、アルブミン、GOT、GPTに明らかな異常を示す者はなかった。総コレステロールが220 mg/dl以上であった者は10名で、中性脂肪が150 mg/dl以上であった者は3名であった。クレアチニン値は、被験者のうち、最高齢の91歳の1名において軽度上昇していた。

アンケート調査(総回答数48(回収率79%))では、アルギニン試験、L-ドーパ試験両者において、GH頂値が3 ng/ml以下であったGH分泌不全群(回答数7(回収率78%))と、少なくとも1つが3 ng/ml以上であったGH分泌良好群(回答数41(回収率79%))の間に、(3)集中力の低下を感じるか?(9)筋力が落ちてきたと感じるか?という質問に対するA、B、Cの返答出現率に相違がみられ、いずれもGH分泌不全群で、そのような自覚症状を感じる者が多かった。

血漿グレリン基礎値は、GH分泌不良群と不良群に該当しない46名からなるGH分泌良好群において、それぞれ61.5±49.0、75.4±59.5

fmol/mlであり、両群間に有意差はなかった。また、血漿グレリン基礎値とアルギニン試験のGH頂値、L-ドーパ試験におけるGH頂値の間には、それぞれ明確な相関はみられなかった。興味深いことに、血漿グレリン値は、アルギニン、およびL-ドーパ投与開始30分後に、いずれにおいても有意に低下した。また、この血漿グレリンの低下反応はGH分泌不良群、良好群のいずれにおいても観察された。

D. 考察

最近、成人におけるGH分泌不全は血中脂質・内臓脂肪の増加を引き起こし、動脈硬化を進展させ、心血管病変による死亡率を上昇させることが報告されている。また、成人GH分泌不全により骨塩量・筋力の低下が惹起されること、GH投与により骨塩量が明確に増加することが報告され、高齢者にみられる骨折や、それによる長期臥床状態の防止に有効である可能性が示唆されている。これまで、小児期から持続した例、器質的疾患に伴って出現した例における成人GH分泌不全について検討、考察されてきたが、加齢とともにGH分泌が減少するならば、健常高齢者においても、同様のGH分泌不全、それに伴う症状が出現する可能性がある。しかし、加齢とともにGH分泌が減少することが知られているものの、その発症頻度やそれに起因する症状の有無などは明らかではない。

平成13年、間脳下垂体機能障害調査研究班により、成人GH分泌不全の診断の手引きが作成された。その手引きによれば、成人GH分泌不全症の診断は、GH分泌不全によると考えられる症状、所見の存在とGH分泌刺激試験におけるGH頂値の低値の2点から診断することになっている。GH分泌刺激試験として、インスリン低血糖刺激試験(ITT)、アルギニン試験、L-ドーパ試験、グルカゴン試験が用いられ、いずれか2つのGH分泌刺激試験において、刺激前および刺激後120分にわたり、30分ごとに測定した血清GHの頂値が5 ng/ml以下であることを判定基準の1つとしている。さらに、GH頂値が3 ng/ml以下である時、重症のGH分泌不全と判定するとしている。今回、この手引きをもとに、高齢者におけるGH分泌不