

全の実態を明らかにする目的で、健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者に対して、GH 分泌刺激試験を行なった。本研究における被験者の中には、高血圧症や糖尿病で治療されている者も含まれているが、病歴、検査成績から判断すると軽症であり、質的には、健常者群と大きな差異はないと判断した。高齢になるにしたがって、このような生活習慣病の罹患頻度は上昇するため、今回の調査対象集団は、全体として“比較的元気な高齢者の方々”ととらえている。

今回、高齢者の GH 分泌を検討する目的で、61 名の健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者に対し、GH 分泌刺激試験をおこなった。アルギニン試験および L-ドーパ試験に参加した 55 名のうち、両試験とも GH 頂値が 3 ng/ml 以下であったものは 9 名 (16%) で、予想以上に多いものであった。この結果を解釈するさいに、いくつか注意すべき事項がある。第一に、いずれの GH 分泌刺激試験においても GH 頂値が 3 ng/ml というカットオフ値が妥当なものであるかということである。これまで、海外では成人 GH 分泌不全のガイドラインが作成され、GH 分泌不全の診断には ITT が望ましく、ITT における GH 頂値が 3-5 ng/ml 以下が 1 つの基準とされている。しかし、高齢者では、潜在性の虚血性心疾患を有する可能性があり、安易に ITT を使用することは危険である。このため、本研究ではアルギニン試験、L-ドーパ試験を使用した。Biller らは、成人 GH 分泌不全症診断に関して、各種 GH 分泌刺激試験の感度と特異性を比較し、ITT における GH 頂値 5 ng/ml に相当する区分点は、アルギニン試験で GH 頂値 1.4 ng/ml、L-ドーパ試験では 0.64 ng/ml であると報告している。この値に基づくと、該当者は少なくなり、アルギニン試験で 3 名 (4.9%)、L-ドーパ試験で 5 名 (9.0%)、両者共に該当するものは 2 名 (3.6%) となる。もう 1 つ考慮すべき点は、GH 測定系である。ヒト GH の測定系として種々のキットが使用されており、その測定系間の差異はかなり大きい。本研究で使用した測定系は GH 値を低値に測定する傾向にあるものであり、それが本研究の結果に影響している可能性がある。

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 頂値には、有意な正の相関が認

められたが、それぞれの GH 頂値と、IGF-I 値の間には相関は認められなかった。IGF-I 値は、GH 分泌不全の適切な指標にはなりがたいことがすでに報告されているが、本研究においてもそれと合致する成績であった。Biller らは、IGF-I が 77 ng/ml 以下が成人 GH 分泌不全の 1 つの目安になると述べているが、本研究において IGF-I が 77 ng/ml 以下の群 (7 名) では、アルギニン試験、L-ドーパ試験いずれにおいても、GH 頂値は低値ではなく、むしろ全体の平均値より若干高めであった。これは、IGF-I 低値が原因で、GH 分泌抑制が減弱している者が含まれていることを示唆する。実際に、IGF-I が 59 ng/ml で被験者中最低値をとった者は、アルギニン試験、L-ドーパ試験において、GH 頂値はそれぞれ 44.0、16.4 ng/ml と高値であった。一方、この 7 名のうち 2 名はアルギニン試験および、L-ドーパ試験のいずれにおいても、GH 頂値が 3 ng/ml 以下であり、この 2 名に関しては GH 分泌不全が原発するものと考えられる。

IGF-I のほかに、GH 分泌を抑制するものとして肥満がある。アルギニン試験、L-ドーパ試験とともに GH 頂値が 3 ng/ml 以下であった GH 分泌不全群では、BMI が GH 分泌良好群に比較して高値であった。9 名中 3 名で BMI が 30 を超えており、この結果として GH 分泌が抑制された可能性も除外できない。しかし、肥満者では IGF-I が上昇することが多いが、この 3 名では IGF-I も低値であり、この被験者においては GH 分泌不全が原発した可能性がある。また、6 名においては、BMI が低く、肥満のため GH 分泌が抑制されていたとは考えがたい。GH は体組成を変化させ、体脂肪量を減らすことはよく知られており、GH 分泌不全群で観察された肥満は、GH 分泌不全の結果である可能性が高い。

今回おこなったアンケート調査では、GH 頂値が 3 ng/ml 以下であった被験者はいずれも GH 分泌不全による可能性のある何らかの自覚症状を訴えていた。なかでも、集中力の低下、筋力の低下を訴える者は、GH 頂値が 3 ng/ml 以上の者と比べ有意に多かった。これを裏付ける身体所見が存在するのか、および、それが GH 分泌不全によると考えることが真に妥当であるのかという点は今

後明らかにすべき重要な問題である。また、GH 分泌刺激試験の判定基準を定める根拠を明確にするためにも、GH 分泌不全によると想定される症状、身体所見の発現頻度と、GH 分泌刺激試験における GH 頂値の関連性をさらに検討する必要がある。

グレリン基礎値をアルギニン試験、L-ドーパ試験前に各 1 回測定したところ、個々の被験者内では極めて再現性よく測定できた。しかし、被験者全体でみると大きな分散を示した。また、グレリン基礎値と GH 分泌反応には、いずれの刺激においても有意な相関は認められなかった。血漿グレリン基礎値も、GH 分泌不良者と、GH 分泌良好者において有意差はなかった。これらの成績は、血漿グレリン値は GH 分泌反応に大きく影響しない可能性を示唆する。すでに、私どもは、ラットにおける脈動的 GH 分泌に血漿グレリンは影響しないことを報告しているが、今回の成績も同様に、末梢血中グレリンは GH 分泌反応に関与しないことを示しているものと考えられる。一方、興味深いことに、GH 刺激試験開始後 30 分のグレリン値は基礎値に比べ有意に減少していた。この現象は、GH 分泌不良群でも、良好群でも観察し得たことより、末梢 GH 増加によるものとは考えられない。この現象の機序は不明である。

E. 結論

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り、このような GH 分泌不全者が特有の臨床像を示すのか、今後明らかにする必要がある。また、GH 低反応者と、GH 分泌良好者において血漿グレリン基礎値に有意差はなく、血漿グレリン値は GH 分泌反応に大きく影響しない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

- ①Takeno 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.

- ②Chihara K, Koledova E, Shimatsu A, Kato Y, Kohno H, Tanaka T, Teramoto A, Bates PC, Attanasio AF. Adult GH deficiency in Japanese patients: effects of GH treatment in a randomized, placebo-controlled trial. *Eur J Endocrinol*, 151: 343-350, 2004.

- ③Rosilio M, Blum WF, Edwards DJ, Shavrikova EP, Valle D, Lamberts SWJ, Erfurth EM, Webb SM, Ross RJ, Chihara K, Henrich G, Herschbach P, Attanasio AF. Long-term improvement of quality of life during growth hormone (GH) replacement therapy in adults with GH deficiency, as measured by questions on life satisfaction-hypopituitarism (QLS-H). *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 1684-1693, 2004.

- ④Hayakawa M, Shimazaki Y, Tsushima T, Kato Y, Takano K, Chihara K, Shimatsu A, Irie M. Metabolic effects of 20-kilodalton human growth hormone (20K-hGH) for adult with growth hormone deficiency: results of an exploratory uncontrolled multicenter clinical trial of 20K-hGH. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 1562-1571, 2004.

- ⑤Kaji H, Chihara K. Direct causes of death in Japanese patients with hypopituitarism as analyzed from a nation-wide autopsy database. *Eur J Endocrinol*, 150: 149-152, 2004.

2. 学会発表

- ①置村康彦、工藤 工、竹野亮子、福岡秀規、高橋健太郎、吉岡嗣朗、高橋路子、麓万里子、井口元三、高橋 裕、加治秀介、佐藤倫明、喜多哲也、千原和夫：健常高齢者および軽症疾患罹患高齢者における GH 分泌反応。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

3. その他

2. 実用新案登録

該当なし

研究協力者

高橋健太郎（神戸大学医学部）

井口元三（神戸大学医学部）

飯田啓二（神戸大学医学部）

工藤 工（神戸大学医学部）

竹野亮子（神戸大学医学部）

福岡秀規（神戸大学医学部）

高橋裕（神戸大学医学部）

加治秀介（兵庫県立大学）

置村康彦（兵庫県立大学）

エネルギー代謝調節機構におけるグレリン/GHSRの役割

分担研究者 芝崎 保 日本医科大学第二生理 教授

グレリンは成長ホルモン分泌促進、摂食促進作用、エネルギー蓄積作用を有することが知られているが、内因性グレリンの作用機構の詳細は明らかではない。エネルギー代謝調節機構におけるグレリンの役割を明らかにするため、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、褐色脂肪組織に対するグレリンの作用を検討した。また、末梢からのグレリンの情報伝達において重要な役割を担っている迷走神経節での GHSR 発現について検討した。Tg ラットでは褐色脂肪組織のノルアドレナリン含量が多く、交感神経の出力の亢進が示唆された。マイクロダイアリシス法を用い、無麻酔無拘束下で褐色脂肪組織でのノルアドレナリン分泌を経時的に測定した結果、グレリンの脳室内投与により対照ラットではノルアドレナリン分泌が抑制されたが、Tg ラットでは抑制が認められなかった。グレリンは中枢から褐色脂肪組織への交感神経出力を抑制し、Tg ラットでは中枢からのグレリンによるエネルギー蓄積情報伝達が障害されているために痩せを呈していると考えられた。Tg ラットの迷走神経節において GHSR アンチセンスの発現が認められ、GHSR 発現量は低下していた。迷走神経節は末梢から中枢へのグレリンの情報伝達経路であり、Tg ラットではこの情報伝達系の機能が障害されていると推測される。

A. 研究目的

Growth hormone secretagogue (GHS) 受容体 (GHSR) の内因性のリガンドとして、グレリンが胃の抽出物より単離された。グレリンおよび GHS は摂食促進作用や GH 分泌促進作用を示す以外に、エネルギー蓄積作用を有していることが明らかになっている。しかし、内因性グレリンのエネルギー蓄積作用機構の詳細については未だ明らかではない。我々はグレリンの視床下部における作用を明らかにするため、視床下部弓状核に強く発現している tyrosine hydroxylase (TH) のプロモーターの下流に GHSR のアンチセンスを挿入した導入遺伝子を用いて GHSR 発現抑制トランスジェニック(Tg)ラットを作製した。昨年度の本研究事業にて、高脂肪食負荷時に Tg ラットでは対照ラットと比べ体脂肪蓄積が抑制されること、エネルギー消費の指標である褐色脂肪組織の uncoupling protein (UCP)1 遺伝子発現量

が有意に増加することを明らかにした。麻酔下のラットにおいてグレリンの脳室内投与による褐色脂肪組織の交感神経活動の抑制が報告されており、褐色脂肪組織でのエネルギー代謝調節においてグレリンおよび GHSR が重要な働きを担っている可能性が示唆される。本研究では、対照ラットと Tg ラットにおける褐色脂肪組織に対するグレリンの作用について検討し、グレリン/GHSR のエネルギー代謝調節機構における役割を明らかにすることを目的とした。また、末梢組織から中枢神経系へのグレリンの情報伝達において重要な役割を担っていると考えられている迷走神経節において GHSR が発現していることが報告されているため、Tg ラットの迷走神経節での GHSR 発現についても検討を加えた。

B. 研究方法

7-8 週齢の Tg ラットと対照ラットを用いて以

下の実験を行った。

1) 褐色脂肪組織に対するグレリンの作用

(a) 褐色脂肪組織の UCP1 遺伝子発現への GHS 脳室内投与の効果

GHS の一種である KP-102 (100 pmol) の脳室内投与 3 および 6 時間後に褐色脂肪組織を採取し、ノーザンブロット法にて UCP1 mRNA 量を、ウェスタンブロット法にて UCP1 タンパク質量を定量した。

(b) 褐色脂肪組織のノルアドレナリン含量

ラットの褐色脂肪組織全量からカテコールアミンをアルミナ抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いてノルアドレナリン含有量を測定した。

(c) 褐色脂肪組織におけるノルアドレナリン分泌に対するグレリン脳室内投与の効果

脳室内投与用カニューレを留置したラットに、実験当日エーテル麻酔下にて褐色脂肪組織にマイクロダイアリシス用プローブを刺入し、透析膜の部分を褐色脂肪組織内に留置した。その後、無麻酔無拘束下で、プローブをコイル状のチューブに接続し、リングル液を 2 ml/分 の速度で灌流し、20 分毎に回収された灌流液 (40 ml) 中のノルアドレナリン量を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。安定したノルアドレナリン分泌が得られた後、3 回の基礎分泌を測定してから、グレリン (500 pmol) の脳室内投与を行った。3 回のノルアドレナリンの基礎分泌の平均を 100 とし、以後のノルアドレナリン分泌量の変化率を算出した。対照群には生理食塩水を脳室内投与し、グレリン投与群と比較した。

2) 迷走神経節における GHSR 発現量の解析

対照ラットと Tg ラットの迷走神経節を採取し、RT-PCR にて Tg ラットの迷走神経節の GHSR アンチセンス遺伝子発現を確認した。次に迷走神経節をパラフィンで包埋後、厚さ 2 μ m の連続切片を作製し、in situ hybridization (ISH) 法にて TH 遺伝子と GHSR アンチセンス遺伝子の共発現について解析した。対照ラットの迷走神経節を用い、蛍光二重免疫染色法で TH と GHSR の共存の有無を検討した。対照ラットと Tg ラットの迷走神経節の GHSR タンパク質量をウェスタンブロット法にて定量した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際してはその愛護に留意し、投与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) 褐色脂肪組織に対するグレリンの作用

(a) 褐色脂肪組織の UCP1 遺伝子発現に対する GHS の作用

対照ラットと Tg ラットにおいて KP-102 投与 3 および 6 時間後の褐色脂肪組織における UCP1 の mRNA とタンパク質の発現量に変化は認められなかった。

(b) 褐色脂肪組織のノルアドレナリン含量

褐色脂肪組織中のノルアドレナリン含量は、Tg ラットが対照ラットの約 2.3 倍と有意に高い値を示した。

(c) 褐色脂肪組織におけるノルアドレナリン分泌に対するグレリン脳室内投与の効果

生理食塩水の脳室内投与では、対照ラットと Tg ラットにおいてノルアドレナリンの分泌量に変化は認められなかった。対照ラットにグレリンを脳室内投与するとノルアドレナリン分泌が有意に低下し、20 および 40 分後には基礎値の約 1/2 の値を示し、60 分後には基礎分泌のレベルまで回復した。Tg ラットにおいては、対照ラットで認められたようなグレリン投与によるノルアドレナリン分泌抑制効果は認められなかった。

2) 迷走神経節における GHSR 発現量の解析

Tg ラットの迷走神経節において RT-PCR 法により GHSR アンチセンス mRNA が確認され、ISH 法により TH が発現している細胞に GHSR アンチセンス mRNA の発現が認められた。これに対し、対照ラットでは GHSR アンチセンス mRNA は認められなかった。蛍光二重免疫染色にて対照ラットの TH 陽性細胞に GHSR が共存している像が認められた。Tg ラットの迷走神経節の GHSR タンパク質発現量は、対照ラットの約 1/2 に有意に減少していた。

D. 考察

褐色脂肪組織のノルアドレナリン含量は Tg ラットにおいて高値を示した。グレリンが交感神経

活動抑制作用を有することが報告されているが、本研究でも対照ラットにおける褐色脂肪組織でのノルアドレナリン分泌はグレリンの脳室内投与により抑制される結果が得られた。GHSR発現が抑制されているTgラットではノルアドレナリン分泌抑制が認められず、グレリンの中樞神経系から褐色脂肪組織への交感神経抑制作用が阻害されている結果、褐色脂肪組織のノルアドレナリン含量が増していたと考えられる。

UCP1の合成は交感神経終末から褐色脂肪組織内へ分泌されるノルアドレナリンにより促進し、その結果熱産生が亢進する。GHSによるエネルギー蓄積作用に関する過去の報告では、グレリンの皮下単回投与または脳室内持続投与により呼吸商が増加すること、GHRP2の長期皮下投与により脂肪が蓄積することが明らかになっている。GHSの単回脳室内投与による呼吸商や脂肪蓄積の変化についての報告はないが、グレリン(1 nmol)の単回脳室内投与により交感神経活動が抑制されること、我々が用いたKP-102の濃度は摂食促進作用を示すことから、KP-102の脳室内投与によりUCP1遺伝子発現が抑制されることが期待された。しかし本研究結果ではKP-102の脳室内単回投与により褐色脂肪組織のUCP1遺伝子発現量に変化は認められず、今後、投与量、投与方法等を変えて、UCP1遺伝子発現への影響を再検討する必要がある。

Tgラットの導入遺伝子はTHのプロモーターの下流にGHSRのアンチセンスを挿入した構造をしており、本研究ではTgラットの迷走神経節のTHが発現している細胞にGHSRのアンチセンスが共発現していることを確認できた。さらに対照ラットの迷走神経節のTHとGHSRのタンパク質レベルでの共存を蛍光二重免疫染色により検討した結果、THとGHSRが共存する細胞が認められた。したがってTgラットの迷走神経節におけるGHSRの発現量が低下したのは、導入遺伝子が機能した結果であると考えられる。以上より、Tgラットではグレリンの胃から中樞神経系への情報伝達経路も抑制されていることが示唆される。今後、エネルギー代謝調節機構における末梢からの迷走神経を介した中樞神経系へのグレリン情報伝達系の役割に関する機能解析が必要である。

グレリンによる脂肪蓄積作用機序の一部には、褐色脂肪組織を支配している交感神経系に対するグレリンの機能抑制が関与していると考えられる。Tgラットでは視床下部のみならず迷走神経節のGHSRの発現抑制も認められたことから、グレリンの末梢から中樞神経系への情報伝達経路も影響を受けている可能性が考えられた。

E. 結論

グレリンのエネルギー蓄積作用機序には、少なくともグレリン/GHSR系の中樞神経系から褐色脂肪組織への交感神経系を介した経路が関与していると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Hotta 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.

2. 学会発表

- ①眞野あすか、根本崇宏、関野あずさ、稲田詩乃、大坂寿雅、周東佑仁、杉原仁、及川眞一、芝崎保：グレリン受容体発現抑制トランスジェニックラットにおけるエネルギー代謝機構について。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

眞野あすか（日本医科大学）

根本崇宏（日本医科大学）

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

分担研究者 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

胃切除術後の患者 QOL を低下させている症状は、グレリン欠乏による特異的な胃内分泌機能低下症にもとづく可能性が考えられる。胃切除後のグレリンの血中動態とその意義を明らかにする目的で、胃全摘、亜全摘、および膵頭十二指腸切除などの 53 症例を対象とし、グレリンの測定を行った。胃摘術後の食欲低下や体重減少とは、グレリンの低下は相関する結果が得られたが、膵頭十二指腸切除による体重減少にはグレリンの関与は認めなかった。一方、ヘリコバクター・ピロリによる萎縮性胃炎でも、その程度に比例して、グレリンの産生低下が認められた。これらの結果より、現在、胃摘出術後に認められる様々な機能障害の病態メカニズムにグレリン欠乏が関与していると考え、胃切除術後患者に対するグレリン補充療法の臨床研究を行っている。

A. 研究目的

胃癌の診断や手術の進歩に伴い、胃切除術を受けられた多くの患者の方々に、長期間生存が得られるようになった。しかし一方で、胃切除にともなう様々な機能障害が患者の QOL にとって重要な問題となってきている。そこで、胃切除後の機能障害にグレリンの欠乏が関与するかどうか、検討することを本分担研究の第 1 の目的とした。

また消化性潰瘍の治療に当たって H. pylori の除菌療法が保険適応となり、胃癌の予防になる可能性が示唆され、一般臨床の現場でも盛んに施行されるようになってきた。しかしながら、除菌に纏わる幾つかの問題点も指摘されている。除菌後の肥満（体重増加）もその 1 つであり、生活習慣病の観点から非常に重要な点である。このことは、除菌治療は潰瘍の再発や胃癌の発生の抑制という点ではメリットがあるが、肥満の抑制という点ではデメリットとなる可能性も考えられ、その病態解明は重要な課題である。そこで、ヘリコバクター感染に伴う慢性胃炎などにより、グレリンの産生に影響が出るかどうか検討することを第 2 の目的とした。

最後にグレリンが非生理的に欠乏した患者さんにおいて、グレリン補充療法の治療的意義を見極める目的で、現在胃切除患者におけるグレリン補充療法臨床研究を行っている。

B. 研究方法

胃全摘、亜全摘、および膵頭十二指腸切除などの 53 症例（男性：33 例、女性：20 例、年齢：38～89 歳、平均年齢：67 歳）を対象とした。このうち 15 例に関しては術前、術後 2 週と 1 ヶ月の経過を検討した。研究方法は長崎大学倫理委員会の承認後、インフォームドコンセントの得られた治療切除可能な胃切除予定症例、および術後 6 ヶ月以上経過し再発の認められない上記症例に関し、血漿、血清を採取し、グレリン(N-terminal & C-terminal)、IGF-I、GH、レプチンの測定を行った。また身長・体重より術前・術後の BMI を求め、術後経過を追った症例の摂食量も検討した。

慢性萎縮性胃炎でのグレリン産生に関する検討は、長崎大学医学部附属病院光学診療部で胃内視鏡検査を受けた患者 112 名を対象に、方法は胃

切除術のグレリンの検討に準じて行った。

以下に示す基準をグレリン補充療法臨床研究の症例のエントリー基準とした。

- ① 年齢 50 歳～75 歳
- ② 手術は curative operation で、イレウス、縫合不全、創部感染症などの術後合併症を認めない症例。
- ③ その他の進行性悪性腫瘍の合併がないこと。
- ④ 重篤な肝疾患 (Child B 以上)、心疾患 (NYHA III 度以上)、腎疾患 (Cr クリアランス 20 以下) を有しないこと。
- ⑤ 自らの意思でこの臨床研究に参加を申し出て、書面による同意があること。
- ⑥ 細菌や真菌などによる活動性感染症を持たないこと。
- ⑦ Performance Status II 度以上の活動性があること。
- ⑧ 除外基準としては、妊婦・授乳婦、担当医師が不適と認めた症例。

またヒト投与用の精製グレリンは、ペプチド研究所に委託して化学合成し、循環器病センターで品質検定を行ったペプチド原末を用いた。これを長崎大学病院薬剤部の無菌製剤用のクリーンベンチの中で、d-mannitol (final: 3.75%) を含む注射用蒸留水で溶解し、0.22 μm の filter を通した後、グレリン 200 mg/ml の濃度で、1 ml ずつ分注し、 -30°C で使用時まで保存する。同ペプチド製剤を用いて、循環器病センター、京都大学探索医療センターおよび神戸大学医学部附属病院で、すでに第 I 相および第 II 相臨床試験が施行され、単回投与および 2 週間連続投与の安全性と認容性が確認されており、院内製剤ではあるが極めて安全性は高いことが示されている。今回長崎大学病院においても院内製剤として投与する。院内調剤については薬剤部においてその審査と調剤マニュアルを作成した。

グレリン注射薬の投与方法は、グレリン 3 mg/kg を生理的食塩水 50 ml にし、15 分間で点滴静注する。プラセボはグレリン溶液と等量の 3.75% d-mannitol 液を 50 ml 生理的食塩水に混入し同様に点滴静注する。術直後症例は術後 14 日目より 10 日間、朝食前に投与する (実薬 12 例、プラセボ 12 例)。一方、術後 1 年以上の症例は、

10 日間投与行うが、double blind でなくグレリンのみを朝食前に点滴投与する。

(倫理面への配慮)

- ① 患者本人がグレリンの臨床研究について十分な説明を受けた後に、患者個人の自由意志により決定されなければならない。
- ② 本薬剤による治療は患者本人の意志によりいつでも中止することができる。
- ③ 本薬剤による治療経験を学術論文などで公表する際は、患者個人の人権、プライバシーは厳重に保証されなければならない。
なお、本研究計画は、長崎大学医学部倫理審査委員会にて承認された (承認番号 16091054)。

C. 研究結果

N-端アッセイで活性型のグレリンを見た場合、術前のグレリンレベルを 100% とすると、グレリンの血中レベルは幽門側胃切除では 78%、胃全摘術では 32% に低下していた。また、摂食量も術後 4 週時点で幽門側胃切除術が術前の 80% に、胃全摘術は 50% 程度に低下し、それはグレリンの低下と比例していた。さらに、術後 6 ヶ月以上経過した安定期で、術前と術後 BMI を比較すると、グレリンの血中レベルと %BMI 減少率に負の相関が見られた ($r = 0.734$, $p < 0.001$)。幽門側胃切除と胃全摘術では、残存する胃の体積が当然異なるので、術後のグレリンレベルはそれを反映しているとも考えられるが、今回検討した幽門側切除術は Billroth I 法で再建しているのに対し、全摘術は Roux-en-Y 再建を行っているため、再建方法による影響の可能性も否定できない。そこで部分胃切除だが、Roux-en-Y 再建により近い Billroth II 法による再建術をおこなっている膵頭十二指腸切除術との比較を行った。この手術では体重の減少率は胃全摘術とほぼ同じだが、血中グレリンのレベルの低下は認められなかった。よって我々の検討では、グレリンレベルは再建術式ではなく、グレリン産生細胞の切除範囲に規定されており、それが術後の食欲低下や体重減少にも影響があると考えられた。レプチンのレベルは BMI と相関が認められたが、グレリンとの関連は認めなかった。また、術後のグレリンの変動にもレプチン

やGHとの連動性はなかったが、IGF-Iはグレリンと同様な経時的変動が見られた。

H. pylori 感染・非感染患者に分けて、胃で産生される消化管ホルモン（グレリン、レプチン、ガストリン）の測定を行った。血漿グレリン値はペプシノーゲン 1/2 比でみた胃粘膜萎縮度と有意な負の相関性がみられた。また H. pylori 陽性者では、加齢との関連性も認められた。レプチンと H. pylori 感染に関しては、血漿レベルではBMIで補正した場合有意差はなかったが、胃粘膜局所では陽性患者で高値を呈した。血漿ガストリン値は、H. pylori 陽性者で上昇傾向にありレプチンとの相関性がみられた。

D. 考察

胃全摘出術後に認められる体重減少、食欲不振、ダンピング症候群、貧血、骨粗鬆症、消化管運動障害などの様々な機能障害の一部もしくは、かなりの病態メカニズムにグレリン欠乏が関与している可能性が示唆された。今後、胃切除術を受けた患者さんに対して臨床研究を行い、グレリン治療による胃切除術後の病態改善が可能かどうか、さらに検討を行っていきたいと考えている。

また、長期的な H. pylori 感染が各種消化管ホルモンの影響を及ぼしている可能性が示唆された。除菌前後の変化も現在検討中だが、除菌後数ヶ月で血中グレリンレベルが回復してくる例が多く認められた。このことは、H. pylori 持続感染による局所炎症性サイトカインなどによるグレリン産生内分泌細胞の turn-over に対する影響などが考えられた。幽門側胃切除でも血中グレリンのレベルに幅があるのは残存胃の H. pylori 感染の状態が影響を与えている可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により、グレリン欠乏は胃切除後患者における体重減少をはじめとする様々な病態の一因になっている可能性があり、グレリン補充療法によるそれらの患者の治療研究が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Isomoto 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.
- ②Imanishi R, Ashizawa N, Ohtsuru A, Akiyama-Uchida Y, Kawano H, Kuroda H, Nakashima M, Saenko VA, Yamashita S, Yano K. GH suppresses TGF-b-mediated fibrosis and retains cardiac diastolic function. Mol Cell Endocrinol, 218: 137-146, 2004.
- ③大津留 晶、永田康浩、円城寺昭人、兼松隆之、山下俊一：臨床分子内分泌学（1）心血管内分泌代謝系（上）III.グレリン 病態と疾患からみたグレリン：胃切除 日本臨床 62: 406-409, 2004.
- ④Iwanaga K, Takamura N, Abe Y, Zhaojia Y, Shinzato K, Hosoda H, Kangawa K, Ohtsuru A, Kohno S, Yamashita S, Aoyagi K. Plasma Concentrations of Adrenomedullin and Ghrelin in Hemodialysis Patients with Sustained and Episodic Hypotension. Endocr J, in press.

H. 知的所有権の取得状況

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

細田洋司（国立循環器病センター生化学部）

森下真理子（長崎大学医学部）

高村 昇（長崎大学医学部）

永田康浩（長崎大学医学部）

円城寺昭人（長崎大学医学部）

磯本 一（長崎大学医学部）

赤水尚史（京都大学医学部）

中里雅光（宮崎大学医学部）

兼松隆之（長崎大学医学部）

寒川賢治（国立循環器病センター研究所）

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

分担研究者 児島将康 久留米大学分子生命科学研究所

グレリンの脂肪酸修飾に対して、摂取脂肪酸と母乳の効果を調べた。脂肪酸の食餌性摂取によって、摂取した脂肪酸と同じ炭素鎖数の脂肪酸で修飾されたグレリン濃度が上昇したが、総グレリン濃度とグレリン mRNA 発現には変化がなかった。生体内や食物中にはない炭素数7個のグリセロール・トリヘプタノエイト摂取によって、炭素数7個の脂肪酸で修飾されたグレリンが生成された。これらの結果から、食餌中の脂肪酸が直接グレリンの脂肪酸修飾基として利用されることがわかった。また母乳中には中鎖脂肪酸が多く含まれており、母乳摂取時の新生仔胃では中鎖脂肪酸で修飾されたグレリン濃度が増加していることが明らかになった。このように中鎖脂肪酸摂取によって活性型グレリン濃度が上昇することから、中鎖脂肪酸摂取によるグレリン濃度の上昇がソマトポーズ治療に有効である可能性が考えられた。

A. 研究目的

グレリンは脂肪酸で修飾された生理活性ペプチドで、この脂肪酸修飾が活性発現に必須であるというこれまでにない構造である。グレリンはおもに胃から分泌され、強力な成長ホルモン分泌促進活性と摂食亢進作用を持ち、内分泌・エネルギー代謝に関与するホルモンである。

ソマトポーズにおいては、一般に成長ホルモン濃度が成長ホルモン分泌不全症と同レベル、あるいはそれよりも低い値となり、この成長ホルモンの低値が高齢者の身体機能低下をもたらす大きな原因であると考えられている。そのためグレリンによる成長ホルモン増加、筋肉量増加、骨密度増加などの作用から、ソマトポーズ治療へのグレリンの応用が考えられている。ここでは内因性の活性型グレリンの合成・分泌量を増加させることで、グレリンのソマトポーズ治療への応用を試みた。具体的には、トリアシルグリセリドなどの脂肪酸摂取による生体内グレリンの合成・分泌動態への効果を調べた。さらに母乳には中鎖脂肪酸が多く含まれており、新生仔における母乳摂取による活性型グレリンの産生を調べた。

B. 研究方法

1) グレリン測定

グレリン測定にはわれわれが開発した2種類のRIA系を用いた。一つはグレリンの脂肪酸修飾部位に特異的なRIA (N-RIA)、もう一つはグレリンのC末端部分に特異的なRIA (C-RIT)である。RIAに用いるサンプルの処理、RIAは先に発表した方法と同じ手順で行った。すなわち、摘出した胃を速やかに沸騰水中で5分間ボイルして、ペプチドを分解する酵素類を失活させた。酸で抽出後、セパック・カラムにてペプチド画分を抽出、凍結乾燥後そのままRIAで測定あるいはHPLCで展開後グレリン免疫活性を定量した。

2) トリアシルグリセロール摂取

トリアシルグリセロールは油性なので、餌に混ぜてマウスに投与した。雄マウス(C57BL/6J)へトリアシルグリセロールを混ぜた餌を0~14日間食べさせた。トリアシルグリセロールの脂肪酸の長さは炭素数4、6、8、10、12、16のものを使った。マウスにトリアシルグリセロール投与後、胃を摘出し、ボイルしてプロテアーゼを失活させてからペプチド画分を抽出した。抽出したペプチド画分はHPLCで展開後、あるいは直接、RIAでグレリン濃度を定量した。またHPLCで展開したサ

ンプルを用いて、同時にグレリン受容体への作用をみた。

3) ノーザンブロット

トリアシルグリセロールを含んだ餌を食べさせたマウスから胃 mRNA を抽出し、アガロースゲルにて展開し、ナイロンメンブレンに移した。ノーザンブロットにはラットグレリンの cDNA プロンプを使用した。

4) トリヘプタノイル(C7:0)・グリセロール摂取後の胃のグレリン分子型

食物中や生体内にはない脂肪酸として炭素数 7 個のトリヘプタノイル(C7:0)・グリセロールを摂取させ、胃ペプチド抽出物を HPLC で展開し、グレリンの溶出時間を調べた。また脂肪酸で修飾されたグレリンを、グレリン IgG を使ったアフィニティー・クロマトグラフィーで精製し、グレリンの修飾基の分子フォームを質量分析計で調べた。

(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) トリアシルグリセリド摂取によるグレリンの脂肪酸修飾に対する効果

マウスやラットに中鎖脂肪酸含有の食餌を摂取させると、胃においてアシル化された活性型グレリン含量が増加した。炭素数が 6 個から 10 個の中鎖脂肪酸からなるトリアシルグリセリドを摂取させると、摂取した脂肪酸と同じ炭素数の脂肪酸によって修飾されたグレリンが増加した。特に炭素数 8 個のオクタン酸による効果が高かった。また血中でもオクタン酸によって修飾されたグレリン濃度が上昇した。一方、脂肪酸のついていない des-acyl グレリン濃度は、脂肪酸摂取によって変化がなかった。このことから、トリアシルグリセリド摂取はグレリンの脂肪酸修飾過程のみを活性化することがわかった。内因性のグレリンではオクタン酸によって修飾されたグレリンが最も多く存在することから、この脂肪酸修飾のメカニズムは炭素数 8 個の脂肪酸を最も適した基質とすることが伺われた。一方で炭素数 12 以上の長鎖脂肪

酸や炭素数 6 以下の短鎖脂肪酸では摂取したトリアシルグリセリドに応じた炭素数の脂肪酸修飾は起こらなかった。

2) 母乳摂取のグレリン脂肪酸修飾に及ぼす効果

母乳中には中鎖脂肪酸のトリグリセリド体が多量に含まれているため、母乳摂取によって新生仔の胃グレリンの分子フォームがどのように変化するかを調べた。その結果、活性型のオクタン酸修飾型グレリンは、生後 3 週目にピークとなり、離乳の開始とともに減少した。しかし、活性型のオクタン酸修飾型グレリンと脂肪酸のついていない des-acyl グレリンを合わせた総グレリン含量は、母乳期・離乳期の移行で変化がなかった。自然離乳の前に強制的に離乳させ、早期に普通食に移行させた新生児マウスでは、胃での活性型のオクタン酸修飾型グレリンは減少した。これらのことから、母乳摂取によって、活性型の脂肪酸で修飾されたグレリンが増加することがわかった。

3) 摂取された脂肪酸が直接グレリンの脂肪酸修飾に使われることの証明

トリアシルグリセリド摂取によって脂肪酸で修飾されたグレリンのみが増加するが、摂取されたトリアシルグリセリドが直接グレリンの脂肪酸修飾に使われる可能性を確かめるために、生体内や食餌中に存在しないトリアシルグリセリドを摂取させ、グレリンの脂肪酸修飾基がどのようになるのかを調べた。そのためのトリアシルグリセリドとして炭素数 7 個のグリセロール・トリヘプタノエイトを使い、マウスに摂取させた。投与後 3 日目に胃からペプチド画分を抽出し、HPLC で展開後、C-RIA にてグレリン・ペプチドの分子型を調べた。その結果、炭素数 8 個のオクタン酸と炭素数 6 個のヘキサン酸で修飾されたグレリンの溶出位置の間に、グレリンの免疫活性が認められた。炭素数 8 個のオクタン酸で修飾されたグレリンはメインのグレリン分子フォームであり、炭素数 6 個のヘキサン酸で修飾されたグレリンも微量ではあるが生体内に存在する。それに対して、この新たなグレリン免疫活性に相当する位置には、これまでに全くグレリンがみられない溶出位置であった。これらのことから、炭素数 7 個のグリセロール・トリヘプタノエイトの摂取によって、生体内にはない脂肪酸で修飾されたグレリン分子フォー

ムが生じた可能性が考えられた。

そこで次に、この炭素数7個のグリセロール・トリヘプタノエイト摂取によって新たに生成されたグレリン免疫活性を単離・同定することを試みた。グリセロール・トリヘプタノエイトを3日間投与したマウスの胃からペプチド画分を抽出し、イオン交換、ゲル濾過、グレリン・イムノ・アフィニティー・クロマトグラフィーの順に精製を行い、最終的にHPLCにて単一のピークを得た。このピークはアミノ酸配列はグレリンと全く同一で、質量分析計にて測定した分子量は炭素数7個のヘプタン酸によって修飾されたグレリンの推定分子量と一致した。またグレリン受容体発現細胞株での細胞内カルシウム濃度上昇活性は、オクタン酸修飾グレリンの活性とヘキササン酸修飾グレリンの活性とのちょうど中間であった。これらのことから炭素数7個のグリセロール・トリヘプタノエイト摂取によって新たに生成したグレリン分子フォームは、炭素数7個のヘプタン酸によって修飾されたグレリンであると結論した。

D. 考察

以上の結果から、外部から摂取したトリアシルグリセリドは、グレリンの mRNA 発現やグレリンのペプチド総量を変化させることなく、グレリンの脂肪酸修飾過程のみを活性化する。また生体内で合成されず食餌中にも含まれていない炭素数7個のグリセロール・トリヘプタノエイト摂取によって、炭素数7個のヘプタン酸で修飾されたグレリン分子フォームが生成してくることから、摂取したトリアシルグリセリドの脂肪酸がグレリンの修飾基として直接使われることが証明された。

グレリンは脂肪酸で修飾された分子フォームだけが活性を持つため、トリアシルグリセリド（とくにグリセロール・トリオクタノエイト）摂取によって生体内の活性型グレリンを増加させることができる。このとき同時に血中の活性型グレリン濃度も上昇している。今後の展開として、グリセロール・トリオクタノエイト摂取を増やすことで、生体内で活性型グレリン濃度を増加させ、ソマトポーズ治療への応用が考えられる。

E. 結論

摂取したトリアシルグリセリドは、直接グレリンの脂肪酸修飾基質として使われる。また母乳中には多量のトリグリセリド体が含まれており、母乳摂取によって新生児仔での活性型のオクタン酸修飾型グレリンが増加し、母乳から普通食に早期に切り替えると活性型のオクタン酸修飾型グレリンが減少することがわかった。これらのことから、トリグリセリドの摂取によって生体内の活性型グレリン濃度が増加し、ソマトポーズ治療に応用できる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kaiya H, Sakata I, Kojima M, Hosoda H, Sakai T, Kangawa K. Structural determination and histochemical localization of ghrelin in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gen Comp Endocrinol*, 138: 50-57, 2004.
- ② 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.
- ③ Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Clinical endocrinology and metabolism. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 18: 517-530, 2004.
- ④ Miura H, Tsuchiya N, Sasaki I, Kikuchi M, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Ohnami Y. Changes in plasma ghrelin and growth hormone concentrations in mature Holstein cows and three-month-old calves. *J Anim Sci*, 82: 1329-1333, 2004.
- ⑤ 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.

- ⑥ Sugino T, Hasegawa Y, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Terashima Y. Effects of ghrelin on food intake and neuroendocrine function in sheep. *Anim Reprod Sci*, 82-83: 183-194, 2004.
- ⑦ Yabuki A, Ojima T, Kojima M, Nishi Y, Mifune H, Matsumoto M, Kamimura R, Masuyama T, Suzuki S. Characterization and species differences in gastric ghrelin cells from mice, rats and hamsters. *J Anat* 205: 239-246, 2004.
- ⑧ 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.

2. 学会発表

- ① Hanada R, Teranishi H, Ueta Y, Kangawa K, Kojima M. Neuromedin U is required for the regulation of energy homeostasis independent of the leptin action. 12th International Congress of Endocrinology, August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal.
- ② Nishi Y, Hosoda H, Hanada R, Kangawa K, Kojima M. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl-modification of ghrelin. 12th International Congress of Endocrinology, August. 31-September 4, 2004, The Lisbon Congress Centre, Lisbon, Portugal.
- ③ 花田礼子、寺西仁志、伊達 紫、村上 昇、芹野良太、上田陽一、中里雅光、吉松博信、寒川賢治、児島将康：ニューロメジンUの摂食抑制機構の解明。第77回日本内分泌学会学術総会，京都，2004。
- ④ 西 芳寛、福江善彦、佐藤貴弘、細田洋司、寒川賢治、児島将康：中鎖脂肪酸によるグレリンのアシル化調節に関する検討。第77回日本内分泌学会学術総会，京都，2004。
- ⑤ 寺西仁志、大楠英子、福嶋信広、森山麻衣子、花田礼子、福江善彦、佐藤貴弘：イモリから単離された新規VIP関連ペプチドの遺伝子クローニングとその発現。第77回日本生化学会大会，横浜，2004。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

出願日：2004年10月19日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

西芳寛（久留米大学分子生命科学研究所）

京都大学・探索医療センターにおけるグレリン臨床試験

分担研究者 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

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を有している。我々はグレリンの成長ホルモン分泌促進作用を利用して高齢者患者に対する治療薬としての臨床応用を図っている。昨年度は、グレリンの安全性を確認する臨床第Ⅰ相試験を施行し、グレリンの臨床効果と安全性を確認した。そこで本年度は、臨床第Ⅱ相試験を計画している。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および健常高齢者の血中グレリン濃度を検討した。健常成人の結果については、性差や BMI・インスリン抵抗性などとの関連を認めた。健常高齢者については現在解析中である。

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。そこで我々は、これらの作用を利用してグレリンの臨床応用を図っている。前者の作用に対して成長ホルモン分泌低下状態にある脆弱高齢者や成長ホルモン分泌不全症患者が、後者の作用に対しては神経性食欲不振症やカヘキシアなどの摂食異常患者が候補として考えられる。摂食不振は種々の疾患で見られ、体重減少、体力や気力の低下を招来し、ひいては原疾患の悪化、生命力や活動性の消失にまでつながる。その治療には、原疾患の改善が原則であるが困難または不可能な場合が少なくない。昨年度は、グレリンの安全性を確認する臨床第Ⅰ相試験を施行し、グレリンの臨床効果と安全性を確認した。そこで本年度は、臨床第Ⅱ相試験の計画している。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および健常高齢者の血中グレリン濃度を検討し、高齢者におけるグレリンの生理的意義や有病高齢者における血中グレリン濃度評価として利用する。

B. 研究方法

高齢者を対象とした臨床試験として、対象疾患を絞り、実施計画書を作成する。

健常高齢者約 120 名（男性 60 名、女性 60 名）に

ついて血中グレリン濃度を測定する。測定キットは三菱化学 BCL 社で新規に開発された ELISA キット（active ghrelin kit, desacyl ghrelin kits）を用いる。（倫理面への配慮）

臨床試験実施計画書作成はプロトコル委員会を開催し、京都大学医学研究科医の倫理委員会で承認を受ける。血中グレリン濃度測定についてもプロトコル委員会を組織して臨床研究実施計画書を作成し、京都大学医学研究科医の倫理委員会で承認を受けた。被験者からは十分な説明のもと文書による同意を得た。

C. 研究結果

高齢者を対象とした臨床試験として、「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」の実施を決定し、実施計画書の作成に入った。プロトコルはほぼ完成しており、本年度中に京都大学医学研究科医の倫理委員会に提出予定である。

健常高齢者の血中グレリン濃度測定のため、約 120 のサンプルを収集した。本年度中に、統計的解析を終了する予定である。今後有病高齢者に関する実施計画書を作成する。健常成人の血中グレリン濃度測定では、性差や BMI・インスリン抵抗性などとの関連を認めた（表1、2）。

Table 1. Plasma ghrelin concentrations and various parameters in healthy subjects

Parameters	All (n=36)	Male (n=16)	Female (n=20)	Male vs Female (P value in t-test*)
Age (yr)	33.5 ± 9.0	34.7 ± 7.1	32.6 ± 10.3	0.486
BMI (kgm ⁻²)	21.7 ± 2.8	23.4 ± 3.0	20.3 ± 1.9	0.001
GH (ngml) ^a	4.10 ± 6.38	0.29 ± 0.24	7.15 ± 7.27	0.001
IGF-1 (ngml)	263.1 ± 71.0	258.25 ± 57.8	266.9 ± 81.4	0.722
Insulin (μU/ml)	7.1 ± 4.3	7.95 ± 5.5	6.5 ± 3.0	0.311
Glucose (mgdl)	88.4 ± 6.6	92.4 ± 4.9	85.3 ± 6.1	0.001
HOMA-IR	1.6 ± 1.0	1.8 ± 1.3	1.4 ± 0.7	0.180
Leptin (ngml)	7.2 ± 5.2	5.4 ± 2.8	8.7 ± 6.2	0.054
NEFA (mEq/l)	0.43 ± 0.16	0.37 ± 0.14	0.48 ± 0.16	0.030
active ghrelin (fmol/ml)	15.9 ± 9.4	10.9 ± 6.1	19.9 ± 9.8	0.003
des-acyl ghrelin (fmol/ml)	66.1 ± 45.3	49.1 ± 23.5	79.8 ± 53.9	0.041
A[A+D] ratio	19.6 ± 5.9	18.0 ± 5.6	20.8 ± 5.1	0.129
A/D ratio	24.9 ± 8.4	22.6 ± 8.8	26.8 ± 7.8	0.139

*: p < 0.05. Bold values: P < 0.05.

Systems International (SI) units for GH, micrograms per liter (conversion factor, 1.0); for IGF-I to nanomoles per liter (0.131); for glucose, millimoles per liter (0.05551); for insulin, picomoles per liter (6.945); for leptin, nanomoles per liter (0.08).

Table 2. Correlations between plasma ghrelin concentrations and various parameters in healthy subjects

	All (n = 36)		Male (n = 16)		Female (n = 20)	
	r	p	r	p	r	p
Active ghrelin						
Age	-0.256	0.132	-0.219	0.421	-0.232	0.331
BMI	-0.387	0.019	-0.195	0.476	-0.193	0.421
GH	0.567	0.0002	0.402	0.125	0.470	0.036
IGF-1	0.085	0.624	-0.031	0.910	0.085	0.624
Insulin	-0.370	0.026	-0.314	0.242	-0.442	0.050
Glucose	-0.535	0.0006	-0.175	0.525	-0.450	0.046
HOMA-IR	-0.401	0.015	-0.327	0.221	-0.463	0.039
Leptin	-0.053	0.760	-0.065	0.814	-0.053	0.760
NEFA	0.251	0.140	-0.082	0.766	0.171	0.476
Desacyl ghrelin						
Age	-0.178	0.302	-0.112	0.684	-0.155	0.519
BMI	-0.364	0.028	-0.189	0.490	-0.324	0.224
GH	0.446	0.0058	0.364	0.169	0.337	0.148
IGF-1	0.149	0.390	0.104	0.706	0.149	0.390
Insulin	-0.381	0.021	-0.348	0.191	-0.488	0.028
Glucose	-0.508	0.0013	-0.090	0.744	-0.495	0.025
HOMA-IR	-0.398	0.015	-0.350	0.188	-0.504	0.022
Leptin	-0.076	0.663	-0.155	0.572	-0.076	0.663
NEFA	0.174	0.312	0.069	0.803	0.044	0.857

r: correlation coefficient. Bold values: P < 0.05

D. 考察

健常成人の血中グレリン濃度測定では、性差や BMI・インスリン抵抗性などとの関連を認めたことより、グレリンがこれらに関連する生理病態的意義があることが示唆された。また、健常成人の血中グレリン濃度の基準が設定されたことから、今後健常高齢者の同濃度の評価が容易となったと考えられる。

E. 結論

グレリン投与の臨床第 II 相試験として「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」の実施を計画し、準備中である。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および健常高齢者の血中グレリン濃度を検討した。その結果、健常成人の結果については、性差や BMI・インスリン抵抗性などとの関連を認めた。健常高齢者につ

いては現在解析中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Li YS, Kanamoto N, Hataya Y, Moriyama K, Hiratani H, Nakao K, Akamizu T. Transgenic Mice Producing MHC Class II Molecules on Thyroid Cells Do Not Develop Apparent Autoimmune Thyroid Diseases. *Endocrinology*, 145: 2524-2530, 2004.
- ②Akamizu 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.
- ③Kanamoto 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.
- ④Nakai 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.
- ⑤Akamizu 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, 2005.
- ⑥Ariyasu 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.

⑦赤水尚史、西條美佐:特集 分子甲状腺学の進歩 2004. 刺激型抗 TSH 受容体トランスジェニックマウスの作製と解析。ホルモンと臨床, 52: 243-248, 2004.

⑧金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、森山賢治、中尾一和:Ⅲ. グレリン. 基礎研究の進展. グレリン遺伝子発現調節。日本臨床(増刊号)臨床分子内分泌学1-心血管内分泌代謝系(上)-, 62: 340-343, 2004.

⑨赤水尚史、五十子大雅、細田洋司、高屋和彦、寒川賢治:Ⅲ. グレリン. 特論. グレリンのトランスレショナルリサーチ-内分泌代謝疾患-。日本臨床(増刊号)臨床分子内分泌学 1-心血管内分泌代謝系(上)-, 62: 424- 429, 2004.

2. 学会発表

- ①Hataya 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.
- ②Kanamoto 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赤水尚史、五十子大雅、細田洋司、高屋和彦、寒川賢治:内分泌代謝領域のトランスレショナルリサーチ-グレリンの臨床応用。第77回日本内分泌学会学術総会メインシンポジウム, 京都, 2004.
- ④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.
- ⑤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.

- ⑥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.
- ⑦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，福岡，2004.
- ⑧赤水尚史：成長ホルモン分泌促進物質の再生医療への応用。第 20 回日本 DDS 学会シンポジウム，東京，2004.
- ⑨赤水尚史：TSH レセプター、同抗体およびその測定アッセイに関して。第 5 回日本内分泌学会近畿支部学術集会，大阪，2004.
- ⑩平谷仁美、Donald Bowden、清水章、赤水尚史：TSH レセプター遺伝子内 SNP を用いた日本人
- ⑪自己免疫性甲状腺疾患の Case-Control 解析および連鎖不平衡解析。第 47 回日本甲状腺学会，群馬，2004.
- ⑫赤水尚史：甲状腺疾患に関わる SNP 解析。第 47 回日本甲状腺学会，群馬，2004.
- ⑬旗谷雄二、赤水尚史、金本巨哲、森山賢治、荒井宏司、島津章、中尾一和：大量胸水、全身浮腫および多彩な検査異常を伴った特発性粘液水腫の一例。第 47 回日本甲状腺学会，群馬，2004.

村山敏典(京都大学医学部附属病院)
横出正之(京都大学医学部附属病院)
手良向聡(京都大学医学部附属病院)
福島雅典(京都大学医学部附属病院)

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

五十子大雅(京都大学医学部附属病院)

岩倉 浩(京都大学医学部附属病院)

寒川賢治(国立循環器病センター)

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

分担研究者 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(12ヶ月齢および24ヶ月齢ラット)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。グレリンの静脈内投与により、両ラットの血中成長ホルモンレベルは上昇し、2時間摂餌量も亢進した。中年と高齢ラット間では、グレリンに対する反応性に差はなかった。また、従来から知られている運動による成長ホルモン分泌亢進とグレリンの関係を明らかにするために、健常男性6名の漸増運動負荷および長時間運動時の血中グレリン動態をモニターした。成長ホルモン上昇に伴う血中グレリンレベルの上昇は見られず、漸増運動後にはノルアドレナリンの上昇に伴いグレリンレベルが持続的に低下した。これまでに知られているグレリンの心拍出量増加や運動機能改善作用から、グレリンが高齢者の運動習慣や心肺機能の負荷の軽減に有効である可能性は十分にあり、高齢者の運動機能とグレリンの関連については、今後さらなるデータの蓄積が必要と考えられる。

A. 研究目的

老化は、加齢性変化の蓄積が中高年層以降に形態的、機能的に表面化する現象であり、その原因には、遺伝、ホルモン分泌の変化、酸化ストレス、免疫機能低下などがあげられる。抗加齢を目指したこれまでの研究成果から、酸化ストレスの軽減や免疫機能の亢進は、栄養、休息、運動等のライフスタイルを改善することにより可能であると考えられている。しかし加齢性変化の中でホルモン分泌機能改善の研究は少なく、その具体的な対策もまだない。

加齢性のホルモン分泌の変化の中でも、特に成長ホルモン分泌低下はソマトポーズとも呼ばれ、除脂肪体重の減少、脂肪量の増大、骨量の低下、運動能力の減少を引き起こし、肥満の悪化のみならず加齢性変化を加速化させ、糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化等を引き起こす。本研究では、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(12ヶ月齢および24ヶ月齢ラット)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する。高齢者の生活の質(QOL)の維持および運動機

能改善に、成長ホルモン分泌亢進作用を持つグレリンがどのように関与するかを解明するために、運動による成長ホルモン分泌亢進とグレリンの関係を研究する。

B. 研究方法

1) 中年および高齢ラットにおけるグレリンによる成長ホルモン分泌作用

12および24ヶ月齢の雄性 Long-Evans ラットを各群7匹使用した。ラットはプラスチックケージで個別に飼育し、12時間の明暗サイクルの温度および湿度一定の条件下で飼育した。ネブタール麻酔下で頸静脈にカテーテルを留置し、体重および摂餌量が術前の状態に回復したことを確認した後、実験に用いた。頸静脈カテーテルより生理食塩水に溶かしたグレリンおよび GHRH を 10 nmol/kg 投与し、0、15、30、60 分後に採血を行った。血漿成長ホルモン濃度は RIA 法により測定した。

2) 中年および高齢ラットにおけるグレリンによる摂食亢進作用

12および24ヶ月齢の雄性 Long-Evans ラッ

トを各群 7 匹使用した。1)と同様にネンブタール麻酔下で頸静脈にカテーテルを留置し、実験に用いた。また投与時のラットのストレスを軽減する目的で、術後毎日ラットのハンドリングを行った。午前 10 時にカテーテルより生理食塩水に溶かしたグレリンを 10 nmol/kg 投与し、2 時間摂餌量を測定した。

3) 漸増運動負荷試験時の血漿グレリンおよび成長ホルモン動態

健常な成年男性 6 名を対象に運動負荷試験を行った。被験者には事前に自転車エルゴメーターを用いて最大漸増運動負荷試験を行ってもらい、その結果、それぞれの最大酸素摂取量、乳酸閾値(LT)、乳酸蓄積開始点(OBLA)が算出された。被験者は、運動負荷試験前日の夜間から 12 時間絶食し、30 分間の安静の後、運動前の採血が行われた。(1) 1/2 LT、(2) LT、(3) OBLA、(4) OBLA と最大酸素摂取量時の運動強度との中間(OBLA-peak)の 4 つの運動強度を 10 分毎に漸増的に施行し、各ステージの最後 1 分間に採血を行った。さらに運動後の回復期として、運動終了後 3、20、40、60 分に採血を行い、血漿中のグレリンと成長ホルモン濃度を RIA 法によって測定した。

4) LT 強度長時間運動時の血漿グレリンおよび成長ホルモン動態

3)の被験者に LT 強度で 60 分間運動してもらい、運動前、運動終了直後、運動終了 30 分後に採血を行い、血漿中のグレリンと成長ホルモン濃度を RIA 法によって測定した。

(倫理面への配慮)

実験動物にはその愛護に留意し、投与実験や屠殺の際の苦痛を最小限度にとどめるように配慮した。被験者に対しては、研究目的、方法、実験に際しての危険性を本人に十分説明し、理解を得た後、文書にて同意を確認した。実験結果を個別に通知し、個人情報管理には万全を期した。

C. 研究結果

1) グレリンの成長ホルモン分泌作用における加齢の影響

12ヶ月齢および24ヶ月齢ラットの麻酔下における血漿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。また、GHRH に対する反応もグレリンと同様に投与 15 分後に有意な増大が認められたが、加齢の影響は認められなかった。

2) グレリンの摂食亢進作用における加齢の影響

24ヶ月齢ラット(570 ± 4 g)の体重は、12ヶ月齢ラット(522 ± 3 g)に比較して有意に増大していた($P < 0.01$)。24時間摂餌量は、12ヶ月齢ラット(21.5 ± 0.5 g)と24ヶ月齢ラット(21.3 ± 0.6 g)間で有意差は認めなかった。無麻酔無拘束ラットへのグレリン静脈内投与により、ラットの摂餌量は生食投与群に比べ有意に増加した($P < 0.001$)。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。また、24時間摂餌量に対するグレリンの摂食亢進作用にも両ラット間での差は認めなかった。

3) 漸増運動負荷試験時のグレリンと成長ホルモン分泌動態

血中グレリンは、OBLA強度の運動により減少傾向を示し、運動終了後3分以降は安静時レベルに比べ有意に低値を示した。さらに、運動終了60分後でも、血中グレリンレベルは低値を維持し安静時レベルに復さなかった。一方、成長ホルモンは、LT強度から有意に増加し、OBLA強度でもっとも高値を示した。OBLA強度での成長ホルモンレベルは、運動終了直後、速やかに安静時レベルに復したが、運動終了60分後に遅延した増加反応が認められた。交感神経活動の指標である血漿ノルアドレナリン濃度の変化率は、グレリンの変化率と負の相関関係を示した($r = 0.70$, $P < 0.001$)。

4) LT強度運動時のグレリンと成長ホルモン分泌動態

グレリンは、運動直後ならびに運動終了30分後においても安静時レベルを維持し、LT強度の運動における血中レベルの変動は認められなかった。また、成長ホルモンは、運動終了直後に有意に増大し、運動終了30分後には安静時レベルに復した。

D. 考察

下垂体から分泌される成長ホルモンは、筋肉と骨量を増加させ、脂肪分解を促進することにより、

健康の維持・増進に重要な役割を担っている。成長ホルモン分泌低下は、ソマトポーズとも呼ばれ、筋肉と骨量の低下および内臓脂肪蓄積型肥満をもたらす、QOLの低下や老化を促進する因子となっている。本研究では、高齢者におけるソマトポーズの抑制や遅延に対するグレリンの有効性を評価するために、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作用ならびに摂食亢進作用について検討した。結果に示すとおり、中・高齢ラットにおけるグレリンの作用は、成長ホルモン分泌、摂食亢進作用いずれにおいても保たれていた。これらの結果から、高齢者におけるソマトポーズの予防に、グレリンが効果的に作用する可能性が示唆された。

これまでの運動生理学の研究から、運動は成長ホルモン分泌を一過性に亢進させることが知られており、その機序には、性、年齢、栄養状態、喫煙、トレーニング状況など多くの因子の関与が推定されている。運動による一過性成長ホルモン分泌を調節する液性因子については、ソマトスタチンや成長ホルモン分泌促進ホルモンを介する機序が検討されているが、未だ一定の見解には至っていない。今回私たちは、漸増運動負荷によるグレリンと成長ホルモンの分泌動態をモニターしたが、血中成長ホルモンレベルの上昇に伴い血中グレリンはむしろ低下していた。また、長時間運動においても、血中成長ホルモンレベルは上昇したが、グレリンレベルには変動は見られなかった。従って、運動による成長ホルモン分泌が、グレリンにより制御されている可能性は極めて低い。しかし、グレリンには、心拍出量の増加作用や心不全モデル動物における運動機能改善作用あるいは低酸素状態での運動機能維持作用などがあり、高齢者の運動習慣を保ち、寝たきりや骨粗鬆症、代謝性疾患の予防に貢献する可能性は期待できる。また、漸増運動負荷でのノルアドレナリン上昇に伴う血中グレリンの急激な低下は、グレリンと自律神経トーンスあるいは自律神経系によるグレリン分泌制御についての検討を行う上で、興味深い知見である。

E. 結論

本研究は、グレリンの末梢投与が、中年および高齢ラットにおいても成長ホルモン分泌亢進や摂食亢進に作用することを示した。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、高齢者のQOL向上の実現に貢献することが期待される。また、運動時の血中グレリン動態の検討から、運動による成長ホルモン分泌亢進は、グレリンには依存しないことが明らかになった。しかし、グレリンの心血管系、呼吸器系、自律神経系に対する作用から、高齢者の運動機能維持や持久力増進に対するグレリンの薬理効果は十分に期待でき、高齢者の運動機能とグレリンの関連についての検討は今後の重要な研究課題の一つであると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Hanada 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.
- ②Isomoto 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 Med*, 117: 429-432, 2004.
- ③Shimbara T, Mondal MS, Kawagoe T, Toshinai K, Koda S, Yamaguchi H, Date Y, Nakazato M. Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neurosci Lett*, 369: 75-79, 2004.
- ④Tanaka M, Nakahara T, Kojima S, Nakao T, Muranaga T, Nagai N, Ueno H, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T. Effect of nutritional rehavioitation of circulating ghrelin and growth hormones levels in patients with anorexia nervosa. *Regul Pept*, 122: 163-168, 2004.
- ⑤Kojima S, Nakahara T, Nagai N, Muranaga T,