

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

ソマトポーズに対するグレリンの
臨床応用と基盤的研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

平成18（2006）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
副所長

目次

I. 総括研究報告

- ソマトポーズに対するグレリンの臨床応用と基盤的研究 ----- 1
寒川賢治（国立循環器病センター研究所 副所長）

II. 分担研究報告

1. グレリンの心血管系における意義—グレリンの心筋梗塞後左室リモデリング抑制効果 ---- 8
寒川賢治（国立循環器病センター研究所 副所長）
2. 膵臓におけるグレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発と解析 ----- 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. グレリン、およびグレリン受容体作動薬の筋萎縮抑制効果の検討 ----- 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. グレリンは成長ホルモン放出ホルモンの発現調節に促進的に関与する ----- 18
芝崎 保（日本医科大学第二生理 教授）
5. ラット胎児の皮膚および脊髄の細胞増殖促進作用 ----- 21
村上 昇（宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学 教授）
6. デスアシルグレリンの摂食亢進作用 ----- 25
中里雅光（宮崎大学医学部第三内科 教授）
7. 末梢グレリンのノルアドレナリン神経系を介する摂食調節機構 ----- 29
中里雅光（宮崎大学医学部第三内科 教授）
8. 京都大学・探索医療センターにおけるグレリン臨床試験 ----- 32
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）
9. 遺伝子変異モデルを用いたグレリンの生理機能解析 ----- 37
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）
10. 消化器疾患の病態に対するグレリン臨床試験 ----- 42
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）
11. グレリン投与による慢性閉塞性肺疾患治療 ----- 46
永谷憲歳（国立循環器病センター研究所再生医療部 部長）

ソマトポーズに対するグレリンの臨床応用と基盤的研究

主任研究者名 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 副所長）

新規ホルモン；グレリンの病態生理学的意義の解明と高齢者のソマトポーズ治療に対する臨床応用を目的として、当初予定していた計画を遂行し、次のような成果を得た。急性心筋梗塞ラットにおいて、グレリンが心筋梗塞後早期の左室リモデリングを抑制することを明らかにした。この結果から、グレリンの抗左室リモデリング薬としての有用性が示された。グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの解析から、デスアシルグレリンが糖代謝に影響することが証明された。また、グレリン欠損マウスには形態的な異常はなく、体重、摂食量、行動にも変化はないことが確認された。筋細胞株において、グレリン、GHRP-2はAtrogin-1、MuRF1発現を抑制したことから、筋萎縮抑制効果が期待できるものと考えられた。ラットにおいて母親由来のグレリンとデスアシルグレリンが胎児へ移行し、胎児の細胞の分化・増殖を促進することで、胎児の成長に重要であると推測された。健常高齢者を対象とした血漿グレリン濃度および各種パラメーターの検討から、グレリンが加齢に伴うGH/IGF-1系の調節や血圧、排便回数の変化に影響を与えることが明らかになった。従来生理作用がないといわれていたデスアシルグレリンにも、グレリン同様に摂食亢進作用が認められた。グレリンの末梢投与による摂食亢進にノルアドレナリンが関与していることが示唆された。胃切除術患者にグレリンを補充することで、非胃切除健常人と同様に食欲の改善や体重減少の消失が認められた。また、グレリン投与による慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者の運動耐容能の改善について、多施設二重盲検比較試験を開始し、安全性、有効性の検証を進めている。さらに高齢者を対象とした臨床第II相試験（人工股関節置換術の周術期を対象としたグレリンの投与試験）を開始し、グレリンの治療応用に向けて臨床検討を進めている。本年度は遺伝子改変動物によるグレリンの病態生理学的意義や心血管系に対する効果、細胞増殖におけるグレリンの役割などの基礎的な研究成果に加え、COPD患者の運動耐容能や胃切除後の食欲に対する効果評価など、臨床分野においてもきわめて先駆的な成果を得ることができた。

[研究組織]

○寒川賢治（国立循環器病センター研究所
副所長）
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（日本医科大学生理学第二教授）
村上 昇（宮崎大学農学部獣医学科
家畜生理学講座教授）
中里雅光（宮崎大学医学部第三内科教授）
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）

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）

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）

永谷憲歳（国立循環器病センター研究所
再生医療部部長）

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ち、生活の質(QOL)の低下を引き起こす。主任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GH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。本年度の研究では、基礎研究として、遺伝子改変動物を用いた機能解析、摂食調節機能の情報伝達系の解明、皮膚や脊髄の細胞増殖作用や急性心筋梗塞ラットの梗塞後左室リモデリングの抑制におけるグレリンの役割を検討し、一方、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。脂肪肝や非アルコール性脂肪性肝炎、インターフェロン治療後の食思不振にグレリン低値が関与していることが示唆された。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、胃切除後やCOPD患者へのグレリン投与を開始し、高齢者を対象とした臨床第II相試験を進めた。

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) グレリンの心筋梗塞後左室リモデリング抑制効果の検討。
- 2) 膵臓におけるグレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発と解析。
- 3) 遺伝子変異モデルを用いたグレリンの生理機能解析。
- 4) グレリンおよびグレリン受容体作動薬の筋萎縮抑制効果の評価。
- 5) ラット胎児の皮膚および脊髄細胞増殖促進作用の評価。
- 6) デスアシルグレリンの摂食機能に与える影響とグレリンの末梢投与による摂食亢進の情報伝達系の解明。
- 7) 消化器疾患の病態におけるグレリンの作用解析。
- 8) グレリン投与によるCOPDの治療。
(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、実施動物飼養および保管に関する基準、各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) グレリンの心筋梗塞後左室リモデリング抑制効果

寒川は、グレリンが梗塞後早期の左室リモデリングを抑制するという仮説をたて、グレリンの心血管系における意義を検討した。急性心筋梗塞後の左室リモデリングは、その後の心不全発症および死亡の主要な原因である。雄SDラットに心筋梗塞を作製し、梗塞の翌日よりグレリンまたは生食の皮下投与を2週間行った。その結果、心筋梗塞ラットにおいて、グレリンは心拍数を減少させた。また、梗塞後の左室進展はグレリンにより抑制され、左室拡張末期圧、最大および最小dP/dtといった指標も改善された。これらの結果は、グレリンが心筋梗塞後早期の抗左室リモデリング薬として有用であることを示すものである。

2) 膵臓におけるグレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発と解析

中尾は、ラットのインスリンIIおよびグルカゴンプロモーターを用いて、膵臓でグレリンを発現する2種類のトランスジェニックマウス

(RIP-G Tg, RGP-G Tg) を作製した。RIP-G Tgでは膵組織および血中デスアシルグレリン濃度が上昇していたが、グレリン濃度に有意差はなかった。耐糖能は正常で、インスリン感受性が亢進していた。インスリン分泌能や膵島構造に変化はなかった。RGP-G Tgでは、膵組織デスアシルグレリン濃度は上昇していたがグレリン濃度に差はなく、血中グレリン濃度、デスアシルグレリン濃度にも変化は認められなかった。以上よりデスアシルグレリンが糖代謝に影響する可能性が示唆された。

3) 遺伝子変異モデルを用いたグレリンの生理機能解析

児島は、グレリン欠損マウスを作製した。グレリン欠損マウスには臓器・組織に目立った異常はなく、体重、摂食量、行動にも変化はない。グレリンは骨芽細胞に直接作用して、その分化を誘導し、骨形成を促進することからソマトポーズでの骨折や骨粗鬆症の治療応用が考えられる。グレリンは視床下部においてもオクタン酸で修飾されたものが主要な分子フォームで、これは胃でのグレリン分子フォームと同じである。一方で視床下部において、グレリンと他の摂食亢進性ペプチドとの動きは異なっていることがわかった。

4) グレリンおよびグレリン受容体作動薬の筋萎縮抑制効果の評価

千原は、グレリンおよびグレリン受容体作動薬 GHRP-2 の筋萎縮抑制作用を調べる目的で、デキサメサゾン筋萎縮モデルを使用し検討した。デキサメサゾンはラットヒラメ筋における筋特異的ユビキチンリガーゼ Atrogin-1、MuRF1 発現を増加させたが、GHRP-2 はこの発現亢進を抑制した。筋細胞株 C2C12 細胞においても in vivo の成績と同様に、グレリン、GHRP-2 は Atrogin-1、MuRF1 発現を抑制した。しかし、デキサメサゾンによるヒラメ筋筋線維断面積の減少は GHRP-2 投与によって回復せず、本実験条件下で

は GHRP-2 の in vivo における筋萎縮抑制効果は確認できなかった。

5) ラット胎児の皮膚および脊髄細胞増殖促進作用

村上は、妊娠中の母親のグレリンが胎児の成長にどのような影響を与えるかを検討した。妊娠ラットにグレリンを連日投与すると、新生児の分娩時体重が増加することが判明した。子宮内胎児の各組織には広範囲にグレリン受容体の発現が認められ、胎児の皮膚や脊髄での培養細胞において、グレリンあるいはデスアシルグレリンを添加すると細胞の分裂増殖が促進した。以上のことから、胎児期には母親由来のグレリンとデスアシルグレリンが胎児へ移行し、胎児の細胞の分化・増殖を促進することで、胎児の成長に重要な役割を演じていると推測された。

6) デスアシルグレリンの摂食機能の解明とグレリンの末梢投与による摂食亢進の情報伝達系の解明

中里は、C57BL/6 マウス、オレキシンノックアウトマウス、GHS-R ノックアウトマウスを用いて、デスアシルグレリンの摂食亢進作用の検討を行った。デスアシルグレリンは、グレリンより弱い摂食亢進作用があり、その標的蛋白は GHS-R 以外と考えられた。さらにデスアシルグレリンの情報伝達の下流シグナルは、オレキシン系であることを明らかにした。また、グレリン末梢投与による中枢の摂食亢進に関与する情報伝達系を解析した。9-11 週齢の雄性 Wistar ラットにグレリンを末梢投与することにより、孤束核のノルアドレナリン生合成が増加し、視床下部弓状核内でのノルアドレナリン分泌が増加した。脳内でのノルアドレナリン神経系の遮断により、末梢グレリンの摂食亢進作用は減弱またはキャンセルされたことから、グレリンの視床下部を介した摂食亢進の情報伝達系にノルアドレナリンが関与していることを明らかにした。

7) 消化器疾患の病態におけるグレリンの作用解析

大津留は、消化器疾患におけるグレリンの役割を明らかにする目的で、まず胃切除術患者におけるグレリン補充療法を行った。グレリン投与により非胃切除健康人と同様に、成長ホルモ

ン、ACTHのサージが認められ、やや反応は緩徐であるが食欲も改善し、体重も減少しなくなった。症例を増やし、慢性期における効果を含めさらに検討を進めている。また、ソマトポーズにおけるグレリンの役割を日内変動に着目し、解析中である。さらに慢性肝疾患、脂肪肝およびC型慢性肝炎インターフェロン治療群の血漿グレリン値と臨床像の比較検討を行っている。

8) グレリン投与による慢性閉塞性肺疾患の治療およびグレリンの臨床第II相試験の開始

永谷は、グレリンの臨床応用として、慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者への投与による運動耐用量改善を評価した。低栄養状態(cachexia)はCOPDの独立した予後規定因子であり、重症のCOPDの治療には呼吸機能の改善のみならずcachexiaの是正が必要である。これまでにcachexiaを伴うCOPD患者を対象としたパイロット臨床試験を行い、グレリン投与がCOPD患者の呼吸筋力、運動耐容能、エネルギー代謝を改善することを明らかにした。また、多施設二重盲検比較試験を開始し、グレリン投与によるCOPD治療の安全性、有効性について検証を行っている。

赤水は、加齢に伴うグレリン分泌の変化の生理学的意義を検討する目的で、健常高齢者ボランティアを対象に、血漿グレリン濃度および各種パラメーターを測定した。高齢女性において、血漿グレリン濃度は若年女性よりも低い傾向を示し、血清IGF-1濃度および排便回数と正の相関を、収縮期血圧とは負の相関関係を示した。この結果により、グレリンが加齢に伴うGH/IGF-1系の調節や血圧、排便回数の変化に影響を与える可能性が示唆された。さらに、高齢者を対象とした臨床第II相試験(人工股関節置換術の周術期を対象としたグレリンの投与試験)を開始した。

E. 結論

本年度は、遺伝子改変動物によるグレリンの病態生理学的意義や心血管系に対する効果、細胞増殖におけるグレリンの役割などの基礎的な研究成果に加え、COPD患者の運動耐容能や胃切除後の食欲に対する効果評価など、臨床分野に

においてもきわめて先駆的な成果を得ることができた。グレリンが急性心筋梗塞後早期の左室リモデリングを抑制した結果は、抗左室リモデリング薬としての可能性を示している。グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの解析から、デスアシルグレリンが糖代謝に影響することが明らかになった。また、グレリン欠損マウスには形態的な異常はなく、体重、摂食量、行動にも変化はないことが証明された。筋細胞株において、グレリン、GHRP-2はAtrogin-1、MuRF1発現を抑制したことから、筋萎縮抑制効果の臨床応用が期待される。母親由来のグレリンとデスアシルグレリンが胎児へ移行し、胎児の細胞の分化・増殖を促進することで、胎児の成長に重要であると推測された。健常高齢者を対象とした血漿グレリン濃度および各種パラメーターの検討から、グレリンが加齢に伴うGH/IGF-1系の調節や血圧、排便回数の変化に影響を与えることが示された。デスアシルグレリンに摂食亢進作用があることが明らかにされ、さらにグレリンの末梢投与による摂食亢進の情報伝達にノルアドレナリンが関与していることは重要な知見と考えられた。胃切除術患者にグレリンを補充することで、非胃切除健常人と同様に食欲の改善や体重減少の消失が認められ、同患者に対する新規治療としてグレリン投与が期待される。また、グレリン投与によるCOPD患者の運動耐容能の改善について、多施設二重盲検比較試験を開始し、安全性、有効性の検証を進めている。さらに高齢者を対象とした臨床第II相試験「人工股関節置換術の周術期を対象としたグレリンの投与試験」を開始し、グレリンの治療応用に向けて臨床検討を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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*, 146: 2255-2264, 2005.

2. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*, 85: 495-522, 2005.
3. Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, Spedding M, Kojima M, Kangawa K. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev*, 57: 541-546, 2005.
4. Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, Nakao K. Analysis of rat insulin II promoter-ghrelin transgenic mice and rat glucagon promoter-ghrelin transgenic mice. *J Biol Chem*, 280: 15247-15256, 2005.
5. Chihara K, Koledova E, Shimatsu A, Kato Y, Kohno H, Tanaka T, Teramoto A, Bates PC, Attanasio AF. An individualized GH dose regimen for long-term GH treatment in Japanese patients with adult GH deficiency. *Eur J Endocrinol*, 153: 57-65, 2005.
6. Naito J, Kaji H, Sowa H, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K. Menin suppresses osteoblast differentiation by antagonizing the AP-1 factor, JunD. *J Biol Chem*, 280: 4785-4791, 2005.
7. Yokoyama M, Nakahara K, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Influencing the between-feeding and endocrine responses of plasma ghrelin in healthy dogs. *Eur J Endocrinol*, 152: 155-160, 2005.
8. Shousha S, Nakahara K, Kojima M, Miyazato M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Different effects of peripheral and central ghrelin on regulation of food intake in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol*, 141: 178-183, 2005.
9. Yokoyama M, Murakami N, Naganobu K, Hosoda H, Kangawa K, Nakahara K. Relationship Between Growth and Plasma Concentrations of Ghrelin and Growth Hormone in Juvenile Beagle Dogs. *J Vet Med Sci*, 67: 1191-1194, 2005.
10. 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.
11. Kageyama H, Funahashi H, Hirayama M, Takenoya F, Kita T, Kato S, Sakurai J, Lee EY, 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.
12. Mondal MS, 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.
13. Ueno H, Yamaguchi H, Nakazato M. Ghrelin: A gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regul Pept*, 126: 11-19, 2005.
14. Isomoto H, Ueno H, Nishi Y, Wen CY, Nakazato M, Kohno S. Impact of helicobacter pylori infection on ghrelin and various neuroendocrine hormones in plasma. *World J Gastroenterol*, 11: 1644-1648, 2005.
15. Isomoto H, Ueno H, Nishi Y, Yasutake T, Tanaka K, Kawano N, Ohnita K, Mizuta Y, Inoue K, Nakazato M, Kohno S. Circulating ghrelin levels in patients with various upper gastrointestinal diseases. *Dig Dis Sci*, 50: 833-838, 2005.
16. Isomoto H, Nishi Y, Ohnita K, Mizuta Y, Kohno S, Ueno H, Nakazato M. The relationship between plasma and gastric ghrelin levels and strain diversity in *Helicobacter pylori* virulence. *Am J Gastroenterol*, 100: 1425-1427, 2005.
17. Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Niijima A, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology*, 146: 3518-3525, 2005.
18. Isomoto H, Ueno H, Saenko VA, Mondal MS, Nishi Y, Kawano N, Ohnita K, Mizuta Y, Ohtsuru A, Yamashita S, Nakazato M, Kohno S.

- Impact of *Helicobacter pylori* infection on gastric and plasma ghrelin dynamics in humans. *Am J Gastroenterol*, 100: 1711-1720, 2005.
19. Shinomiya T, Fukunaga M, Akamizu T, Irako T, Kangawa K, Nakai Y, Nakai Y. Plasma acylated ghrelin levels correlate with subjective symptoms of functional dyspepsia in female patients. *Scand J Gastroenterol*, 40: 648-653, 2005.
 20. Akamizu 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.
 21. Ariyasu 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.
 22. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, Fukue Y, Tachibana T, Ishikawa H, Takeda S, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kangawa K, Nagata K, Kojima M. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res*, 20: 790-798, 2005.
 23. Hashizume T, Horiuchi M, Nonaka S, Kasuya E, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Effects of ghrelin on growth hormone secretion in vivo in ruminants. *Regul Pept*, 126: 61-65, 2005.
 24. Itoh F, Komatsu T, Yonai M, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y, Hodate K. GH secretory responses to ghrelin and GHRH in growing and lactating dairy cattle. *Domest Anim Endocrinol*, 28: 34-45, 2005.
 25. Kaiya H, Small BC, Bilodeau AL, Shepherd BS, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen Comp Endocrinol*, 143: 201-210, 2005.
 26. Kurose Y, Iqbal J, Rao A, Murata Y, Hasegawa Y, Terashima Y, Kojima M, Kangawa K, Clarke IJ. Changes in expression of the genes for the leptin receptor and the growth hormone-releasing peptide/ghrelin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus with long-term manipulation of adiposity by dietary means. *J Neuroendocrinol*, 17: 331-340, 2005.
 27. Moriyama M, Sato T, Inoue H, Fukuyama S, Teranishi H, Kangawa K, Kano T, Yoshimura A, Kojima M. The neuropeptide neuromedin U promotes inflammation by direct activation of mast cells. *J Exp Med*, 202: 217-224, 2005.
 28. Nishi Y, Hiejima H, Mifune H, Sato T, Kangawa K, Kojima M. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology*, 146: 2709-2715, 2005.
 29. Nishi Y, Hiejima H, Mifune H, Sato T, Kangawa K, Kojima M. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology*, 146: 2709-2715, 2005.
 30. Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology*, 146: 2510-2516, 2005.
 31. Iwanaga 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*, 52: 23-28, 2005.
 32. Nagaya N, Itoh T, Murakami S, Oya H, Iwase T, Uematsu M, Yokota S, Maekura R, Yamagishi M, Miyatake K, Kangawa K. Treatment of cachexia with ghrelin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chest*, 128:1187-93, 2005.
 33. Takachi K, Doki Y, Ishikawa O, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Nakajima H, Hosoda H, Kangawa K, Sasakuma F, Imaoka S. Postoperative ghrelin levels and delayed recovery from body weight loss after distal or total gastrectomy. *J Surg Res*, 130: 1-7, 2006.
 34. Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H,

- Nagata D, Oba S, Sata M, Takahashi M, Yamamoto Y, Terauchi Y, Kadowaki T, Kangawa K, Kitamura T, Nagai R, Hirata Y. Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 17:113-121, 2006.
35. Akamizu T, Murayama T, Teramukai S, Miura K, Bando I, Irako T, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Tada H, Matsuyama A, Kojima S, Wada T, Wakatsuki Y, Matsubayashi K, Kawakita T, Shimizu A, Fukushima M, Yokode M, Kangawa K. Plasma ghrelin levels in healthy elderly volunteers: the levels of acylated ghrelin in elderly females correlate positively with serum IGF-1 levels and bowel movement frequency and negatively with systolic blood pressure. *J Endocrinol*, 188: 333-344, 2006.
36. Nakahara K, Nakagawa Y, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology*, 147: 1333-1342, 2006.
37. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T, Murakami N, Miyazato M, Kangawa K, Nakazato M. Des-acyl Ghrelin Induces Food Intake by a Mechanism Independent of the Growth Hormone Secretagogue Receptor. *Endocrinology*, in press, 2006.
38. Ida T, Miyazato M, Naganobu K, Nakahara K, Sato M, Rin S, Kaiya H, Murakami N, Kangawa K. Feline ghrelin: peptide purification, cDNA cloning and biological activity. *Domest Anim Endocrin*, in press, 2006.
39. Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Kaiya H, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology*, in press, 2006.
40. Moriyama M, Fukuyama S, Inoue H, Matsumoto T, Sato T, Tanaka K, Kinjyo I, Kano T, Yoshimura A, Kojima M. The neuropeptide neuromedin U activates eosinophils and is involved in allergen-induced eosinophilia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, in press, 2006.
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
特許出願
発明名称：グレリンを使った骨粗鬆症、骨折の治療応用
出願年月日：2005年3月4日
出願国：日本
出願番号：特願 2005-60837
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

グレリンの心血管系における意義 -グレリンの心筋梗塞後左室リモデリング抑制効果-

主任研究者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 副所長

急性心筋梗塞後の左室リモデリングは、その後の心不全発症および死亡の主要な原因である。本研究では、新規成長ホルモン分泌促進ペプチドであるグレリンが、心筋梗塞後早期の左室リモデリングを抑制するという仮説をたて、検討した。雄 Sprague-Dawley ラットに心筋梗塞を作製し、梗塞の翌日よりグレリン 200 μ g/kg/day (n=15) または生食の皮下投与 (n=15) を 2 週間行った。心筋梗塞ラットにおいて、グレリンは心拍数を減少させたが動脈圧には影響しなかった。梗塞後の左室リモデリングの進展はグレリンにより抑制され、左室拡張末期圧、最大および最小 dP/dt といった指標も改善された。これらの結果から、グレリンは心筋梗塞後早期の抗左室リモデリング薬として有用であると考えられた。

A. 研究目的

急性心筋梗塞後の左室リモデリングは、その後の心不全発症および死亡の主要な原因であり、高齢化社会において、これらの心疾患の予後や QOL の改善は医療のみならず社会的にも重要な課題である。一方、グレリンは胃から単離された新規の成長ホルモン (GH) 分泌促進ペプチドであり、心カケキシアを有する慢性心不全に対する治療薬として有用であることが示唆されている。

(Nagaya N, et al. *Circulation*, 2001.)。しかしながら、グレリンの心筋梗塞急性期における抗リモデリング作用を検討した報告はなく、本研究において生理学的、病理学的、生化学的検討を行った。また、グレリンの心血管系への作用には、GH/IGF-1 を介したもの（蛋白同化作用、強心作用、血管拡張作用）と介さない独自の作用（血管拡張作用、エネルギー代謝改善作用、交感神経抑制作用、抗アポトーシス作用など）がある (Kojima M, et al. *Physiol Rev*, 2005.)。本研究においては、GH/IGF-1 に影響しない量のグレリン投与による抗左室リモデリング作用を検討した。

B. 研究方法

左冠動脈結紮により雄 Sprague-Dawley ラット (180~220g) に心筋梗塞を作製し、梗塞の翌日よりグレリン 200 μ g/kg/day (n=15) または生食の皮下投与 (n=15) を 2 週間行った。また、心筋梗塞群のコントロールとして Sham 手術群 (n=12) を用意した。梗塞あるいは Sham 手術後 1 日目と 14 日目に心エコーにより左室リモデリングの進展および心機能に関する評価を行い (SONOS 5500, Hewlett Packard)、14 日目に心臓カテーテルによる血行動態評価 (PowerLab system, AD Instruments) と、血漿および心臓組織のサンプリングを行った。病理学的検討として、Masson's trichrome 染色による梗塞サイズの評価、Sirius red F3BA 染色によるコラーゲン密度定量を行った。また、非梗塞巣において心肥大に関連した ANP 遺伝子、線維化に関連したコラーゲン I、コラーゲン III 遺伝子の発現をノーザンブロットにより検討した。さらに、グレリンの血清 IGF-1 濃度への影響についても検討した (Active Rat IGF-1 EIA, DSL Inc.)。

C. 研究結果

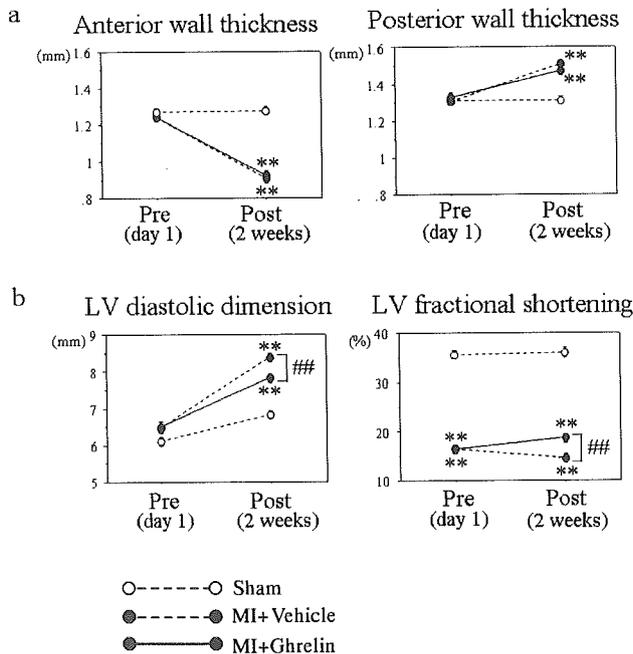
1) 体重、心重量、心筋梗塞サイズへのグレリン投与の影響

心筋梗塞群は Sham 群に比し体重の減少がみられたが、グレリン投与により体重の回復が認められた (Sham 群 302g、梗塞+生食群 260g、梗塞+グレリン群 272g)。心重量に関してはグレリン投与により有意な変化は認められなかった。心筋梗塞サイズについても、グレリン投与群と非投与群の間に有意差はみられなかった。

2) 心エコーおよび心臓カテーテルによるグレリン投与後の評価

心筋梗塞の 2 群は Sham 群に比べ、前壁の菲薄化および後壁の肥厚がみられたが、グレリン投与後においてもこれらの指標に有意な変化は認められなかった。しかしながら、グレリンは左室拡張末期径の拡大並びに左室収縮能 (fractional shortening) の低下を有意に抑制した (図 1)。

図 1



心拍数は心筋梗塞後 (生食群において) 有意に増加していたが、グレリン投与により Sham 群と変わらないレベルまで減少した。心筋梗塞によって左室拡張末期圧は高くなり、+dP/dt、-dP/dt は低下したが、グレリンは動脈圧に影響を与えるこ

となく、これらの左室収縮および拡張機能の指標を有意に改善した (表 1)。

表 1

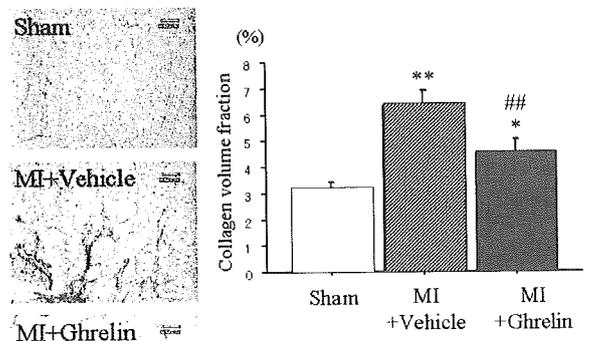
	Sham	MI+Vehicle	MI+Ghrelin
HR, beats/min	427±7	449±8*	422±9 #
MAP, mmHg	122±4	108±2**	108±3**
LVSP, mmHg	140±4	121±3**	123±3**
LVEDP, mmHg	7±1	21±2**	15±2** #
LV dP/dtmax, mmHg/s	7544±238	5391±282**	6274±304** #
LV dP/dtmin, mmHg/s	-5664±182	-4108±184**	-4902±255* #

Values are mean ± SEM. **P<0.01 compared with sham-operated group; ##P<0.01 compared with MI+vehicle group by analysis of variance and Bonferroni's multiple-comparison *t* test. MI = myocardial infarction; HR = heart rate; MAP = mean arterial pressure; LVSP = left ventricular systolic pressure; LVEDP = left ventricular end-diastolic pressure; LV dP/dt max or min = peak rate of left ventricular rise or fall.

3) コラーゲン密度および遺伝子発現に対するグレリンの効果

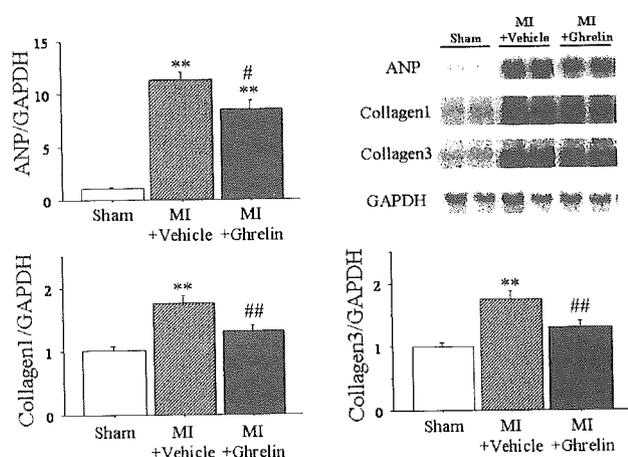
グレリンは非梗塞部位における形態学的コラーゲン密度の増加を明らかに軽減した (図 2)。さらに、グレリンは非梗塞部において、線維化に関連したコラーゲン I とコラーゲン III、心肥大に関連した ANP について、それぞれの mRNA の発現量の増加を著明に抑制した (図 3)。

図 2



**P<0.01, *P<0.05 compared with Sham-operated group; ##P<0.01 compared with MI+Vehicle group.

図 3



**P<0.01 compared with Sham-operated group; ##P<0.01, #P<0.05 compared with MI+Vehicle group.

4) グレリン投与による血清 IGF-1 値への影響

血清 IGF-1 値は心筋梗塞後有意に減少していたが、グレリン投与群と生食群の間に有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究の結果は、グレリンが左室機能を改善し、左室リモデリングの進展を抑制することを示唆している。グレリンが GH/IGF-1 を刺激し、慢性心不全において心筋の成長を促すことが知られているが、本研究においては、グレリン投与により血中 IGF-1 値の増加がみられず、GH/IGF-1 系に非依存的なグレリン独自の抗リモデリング作用があることが示唆された。グレリン投与は血圧に対し影響しなかったが、心拍数を明らかに減少させたことから、交感神経系の抑制作用が抗リモデリング作用の機序のひとつと考えられる。また、グレリンの受容体である GHS-R は心室、心房などにも存在していることが示されており、心臓への直接作用も考えられるが、詳細なメカニズムは不明である。また、グレリンは心臓のコラーゲン密度の増加を軽減し、線維化に関連したコラーゲン I とコラーゲン III、心肥大に関連した ANP のそれぞれの mRNA の発現量の増加を著明に抑制したが、これらが直接的に心機能改善に結びついたのか、二次的なものであるかは不明である。

E. 結論

本研究の結果は、グレリンが新しいタイプの抗左室モデリング薬あるいは心臓保護薬とし

て有用である可能性を示唆している。その詳細なメカニズムについては不明な点が多く、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ①Nishi 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*, 146: 2255-2264, 2005.
 - ②Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*, 85: 495-522, 2005.
 - ③Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, Spedding M, Kojima M, Kangawa K. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev*, 57: 541-546, 2005.
 - ④Takachi K, Doki Y, Ishikawa O, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Murata K, Nakajima H, Hosoda H, Kangawa K, Sasakuma F, Imaoka S. Postoperative ghrelin levels and delayed recovery from body weight loss after distal or total gastrectomy. *J Surg Res*, 130: 1-7, 2006.
 - ⑤Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Nagata D, Oba S, Sata M, Takahashi M, Yamamoto Y, Terauchi Y, Kadowaki T, Kangawa K, Kitamura T, Nagai R, Hirata Y. Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 17: 113-121, 2006.
- ##### 2. 学会発表
- ①Soeki T, Kishimoto I, Hosoda H, Yoshida M, Tokudome T, Horio T, Schwenke D, Pearson J, Shirai M, Kangawa K. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and attenuates early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. The 69th annual scientific meeting of the Japanese circulation society, Yokohama, 2005.
 - ②Soeki T, Kishimoto I, Hosoda H, Yoshida M, Tokudome T, Horio T, Schwenke D, Kangawa K, Ito S. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and attenuates early left ventricular

remodeling in rats with myocardial infarction.
American Heart Association Scientific Sessions.
USA, 2005.

G. 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

岸本 一郎 (国立循環器病センター研究所)

添木 武 (徳島大学医学部)

膵臓におけるグレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発と解析

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

ラットインスリンIIプロモーターおよびラットグルカゴンプロモーターにグレリン遺伝子を結合し、膵臓においてグレリンを発現する2種類のトランスジェニックマウス（RIP-G Tg、RGP-G Tg）を作製した。RIP-G Tgでは、膵組織および血中グレリン濃度は上昇しておらず、膵組織および血中デスアシルグレリン濃度はそれぞれ約1000倍、3.4倍に上昇していた。ブドウ糖負荷に対するインスリン分泌は抑制されていたが、耐糖能異常は認めなかった。アルギニン刺激によるインスリン分泌や膵組織のインスリン発現、 β 細胞量、膵島構造、GLUT2とPDX-1の発現に変化はなく、単離膵島のインスリン分泌能にも差はなかった。RGP-G Tgでは、膵組織デスアシルグレリン濃度は約50倍に上昇していたが、グレリン濃度には有意差は見られなかった。血中グレリン濃度、デスアシルグレリン濃度に変化はなく、膵臓の形態、機能にも変化は認められなかった。以上よりデスアシルグレリンが糖代謝に影響す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物質受容体（GHS-R）の内因性リガンドとして同定された28アミノ酸からなるペプチドで、3番目のセリン残基がアシル化修飾を受ける特徴的な構造を有している。グレリンの発現はこれまで胃、腸管、視床下部、下垂体、腎、胎盤、および睾丸で報告されている。GHS-Rを介したグレリンの作用にはアシル化が必須であることが知られているが、その詳細なメカニズムやアシル化が行われる部位については解明されていない。近年、膵臓ランゲルハンス島内の細胞にグレリンの発現が報告されている。しかし、グレリンの膵島内での局在やインスリン分泌に対するグレリンの効果については意見の一致を見ていない。

本研究において、われわれは膵島 β 細胞および α 細胞特異的にグレリン遺伝子を過剰発現するラットインスリンIIプロモーター-グレリントランスジェニックマウス（RIP-G Tg）およびラットグルカゴンプロモーター-グレリントランスジェニックマウス（RGP-G Tg）を作製し、それらのフェノタイプの解析を通じて膵臓におけるグレリンの

病態生理的意義を検討した。

B. 研究方法

1) 膵島特異的グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの作製

マウス胃組織より作製したcDNAライブラリーより、ラットグレリンcDNAをプローブとしてスクリーニングを行い、マウスグレリンcDNAをクローニングした。ラットインスリンIIプロモーターおよびラットグルカゴンプロモーターの下流にマウスグレリンcDNAを結合したフュージョン遺伝子をC57/BL6受精卵に注入し、偽妊娠ICRマウス卵管に移植して、既報に従いトランスジェニックマウスを作製した。以下の実験にはHeterozygotesを使用した。

（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、その愛護に留意し、苦痛を最小限にとどめるように十分配慮した。すべての実験は、京都大学大学院動物実験委員会により承認を受けている。

2) 免疫組織化学染色

ホルマリン固定-パラフィン包埋したマウス組

織を、avidin-biotin peroxidase complex 法によって染色した。5 μ m 切片を、抗 C 末端グレリン[13-28]抗体（最終希釈倍率 1:1000）、抗 N 末端グレリン[1-11]抗体（1:2000）、抗グルカゴン抗体（1:500）、抗インスリン抗体（1:500）、抗ソマトスタチン抗体（1:500）、抗 Pancreatic polypeptide（PP）抗体（1:500）、抗 PDX-1 抗体（1:2000）および抗 GLUT-2 抗体（1:200）と反応させた。β細胞面積の測定は、インスリン染色したプレートをを用いて Axio Vision (Carl Zeiss) および Scion Image (Scion Corp.) により行った。マウス (n=5) 1 匹あたり 10 断面 (200 μ m 間隔) を測定した。

3) 血中および組織中グレリン濃度の測定

10 週齢 RIP-G Tg および対照マウスより自由摂食下に血漿をサンプリングした。RIP-G Tg からは一晩絶食の後にサンプリングを行った。採血は後眼球静脈もしくは門脈中樞側よりエーテル麻酔下に行い、直ちに氷冷した EDTA-aprotinin 管に移して血漿分離の後、塩酸を最終濃度 0.1 規定となるように加えて -80 $^{\circ}$ C で凍結保存した。血漿グレリン濃度は、desacyl ghrelin ELISA kit および active-ghrelin ELISA kit (三菱化学) を用いて測定した。

組織中グレリン濃度の測定には、8 週齢マウスからサンプリングを行い、10 倍量の水中で 5 分間煮沸した後、最終濃度 1M となるよう酢酸を加え、ホモゲナイズした。遠心分離後の上清を測定に用いた。組織中グレリン濃度は、抗グレリン[13-28]抗体を用いた RIA (C-RIA) および抗グレリン[1-11]抗体を用いた RIA (N-RIA) により行った。

4) 体重および摂餌量の測定

マウスは 12 時間明暗サイクルの室温・湿度一定の条件下で個別のケージにて飼育し、自由摂餌・摂水とした。体重は毎週測定し、摂餌量は毎朝 9 時に餌量を測定し計算した。

5) 体脂肪率および内臓脂肪/皮下脂肪比

40 週齢マウスを用い、ペントバルビタール麻酔下に Latheta LTC-100 により体脂肪率および内臓脂肪/皮下脂肪比を測定した。

6) 糖負荷試験およびインスリン負荷試験

糖負荷試験は一晩絶食の後 1.5g/kg ブドウ糖腹腔内注射により、インスリン負荷試験は 4 時間絶食の後 2.0mU/g ヒトレギュラーインスリン腹腔内

注射により行った。

7) インスリン分泌能の測定

一晩絶食の後、3.0g/kg ブドウ糖もしくは 0.25g/kg L-アルギニンを腹腔内注射し、尾静脈から採血してインスリン濃度を ELISA で測定した。

8) 膵組織インスリン濃度の測定

麻酔下にサンプリングした膵組織を酸-エタノール抽出した。

9) 膵島培養

麻酔下に IV 型コラゲナーゼを膵管に注入し、膵臓を摘出後 Ficoll gradient により膵島を分離した。5 個の膵島をブドウ糖を添加したクレブス-リンゲル緩衝液/0.2%ウシ血清アルブミン 500 μ l 内で 37 $^{\circ}$ C 1 時間培養し、上清のインスリン濃度を測定した。

10) ノザンプロットおよび定量 PCR

インスリン発現はマウスインスリン I cDNA をプローブとしてノザンプロットにて、GHS-R およびグレリン発現はリアルタイム定量 PCR (TaqMan) にて測定した。

C. 研究結果、および D. 考察

1) RIP-G Tg

RIP-G Tg では、膵組織および血中グレリン濃度には変化が見られなかった (膵組織 0.054 \pm 0.017 fmol/mg vs. 0.038 \pm 0.006 fmol/mg, NS; 末梢血 78.5 \pm 13.4fmol/ml vs. 66.1 \pm 7.1 fmol/ml, NS; 門脈血 104.6 \pm 15.3fmol/ml vs. 71.4 \pm 9.0 fmol/ml, NS)。膵組織および末梢血中デスアシルグレリン濃度はそれぞれ約 1000 倍 (1024 \pm 108.9 fmol/mg vs. 1.2 \pm 0.1 fmol/mg, p<0.01)、約 3.4 倍 (2805.5 \pm 236.4 fmol/ml vs. 825.9 \pm 244.4 fmol/ml, p<0.01) に上昇していた。門脈血中デスアシルグレリン濃度も有意に上昇していた (1108.0 \pm 257.3 fmol/ml vs. 825.9 \pm 244.4 fmol/ml, p<0.05)。RIP-G Tg マウスでは、腹腔内グルコース負荷にて、耐糖能に差は認められなかった。しかし、負荷後 2 分、30 分のインスリン分泌反応が対照と比較して有意に低反応であった (P<0.05)。一方、膵島単離培養での検討では、2.8、8.3、16.7 mM グルコースに対するインスリン分泌反応は対照と有意差は認められなかった。インスリン負荷試験では低血糖反応がより強い傾向を示した。アルギニン刺激によるインスリン分泌や膵

組織のインスリン発現、 β 細胞量、膵島構造、GLUT2 と PDX-1 の発現に変化はなく、単離膵島のインスリン分泌能にも差はなかった。また、膵臓および下垂体における GHS-R mRNA の発現量にも差は見られなかった。以上より、RIP-G Tg のグルコース負荷試験におけるインスリン分泌の低下は、血中濃度の上昇したデスアシルグレリンによるインスリン感受性の亢進によるものである可能性が示唆された。

2) RGP-G Tg

RGP-G Tg では、膵組織デスアシルグレリン濃度は約 50 倍に上昇していた (48.9 ± 2.5 fmol/mg vs. 1.2 ± 0.1 fmol/mg, $p < 0.01$) が、膵組織グレリン濃度は 2 倍程度に上昇傾向が見られたものの有意差は検出できなかった (0.076 ± 0.019 fmol/mg vs. 0.038 ± 0.006 fmol/mg, NS)。血中グレリン濃度 (末梢血 98.3 ± 18.7 vs. 133.5 ± 25.3 fmol/ml, NS; 門脈血 154.3 ± 20.7 vs. 198.9 ± 34.9 fmol/ml, NS)、デスアシルグレリン濃度 (末梢血 661.6 ± 38.0 vs. 1024.7 ± 27.1 fmol/ml, NS、門脈血 1320.6 ± 164.7 vs. 1442.9 ± 361.5 fmol/ml, NS) に変化はなかった。耐糖能、インスリン感受性、インスリン分泌能にも対照マウスとの差は見られなかった。膵臓の形態、機能にも変化は認められなかった。

E. 結論

以上より、デスアシルグレリンが糖代謝に影響する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Iwakura H, Hosoda K, Son C, Fujikura J, Tomita T, Noguchi M, Ariyasu H, Takaya K, Masuzaki H, Ogawa Y, Hayashi T, Inoue G, Akamizu T, Hosoda H, Kojima M, Itoh H, Toyokuni S, Kangawa K, Nakao K. Analysis of Rat insulin II Promoter- Ghrelin Transgenic Mice and Rat Glucagon Promoter- Ghrelin Transgenic Mice. J Biol Chem, 280: 15247-15256, 2005.

2. 学会発表

なし

G. 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

グレリン、およびグレリン受容体作動薬の筋萎縮抑制効果の検討

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

種々の筋萎縮において筋特異的ユビキチンリガーゼ Atrogin-1 および MuRF1 発現が増加し、ユビキチン-プロテアソーム系が亢進していることが最近報告されている。今回、デキサメサゾン誘導性筋萎縮モデルを使用し、グレリンおよびグレリン受容体作動薬 GHRP-2 の Atrogin-1、MuRF1 発現に及ぼす効果を *in vivo* および *in vitro* の実験系で検討した。また、ラットの筋線維断面積に及ぼす GHRP-2 の効果を組織学的に検討した。デキサメサゾン（600 μ g/kg/日、腹腔内に5日間投与）は6週齢のSD系雄ラットのヒラメ筋における Atrogin-1、MuRF1 発現を増加させたが、GHRP-2（200 μ g/kg/日、皮下に5日間投与）はこの発現亢進を抑制した。GHRP-2 は IGF-1 を介してデキサメサゾンによる Atrogin-1、MuRF1 発現増加を抑制した可能性があるため、血漿 IGF-I およびヒラメ筋 IGF-I mRNA 発現を測定したが、GHRP-2 はこれらに影響を及ぼさなかった。GHRP-2 が直接筋に作用する可能性が考えられたので、マウス筋細胞株 C2C12 細胞を用いて検討した。筋細胞への分化に伴い C2C12 細胞のグレリン受容体発現が増加し、分化した C2C12 細胞においてデキサメサゾンは Atrogin-1、MuRF1 発現を増加させ、グレリン、GHRP-2 はこれらの発現を用量反応的に抑制した。しかし、デキサメサゾン（600 μ g/kg/日）によるヒラメ筋筋線維断面積の減少は GHRP-2 によって回復せず、この条件下では GHRP-2 の *in vivo* における筋萎縮抑制効果は確認できなかった。

A. 研究目的

神経切断、不動、感染症、悪性腫瘍、腎不全、糖尿病、グルココルチコイド過剰など種々の状況、疾患において、筋萎縮が発症する。最近、筋萎縮の発症機構の解明が進み、これらの種々の状況、疾患に共通して、ユビキチン・プロテアソーム系が活性化されていることが明らかとなってきた。なかでも、筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1、MuRF1 発現はこれらの筋萎縮に共通して増加していること、逆にこれらのノックアウトマウスでは筋萎縮が抑制されることから、その生理的重要性が認識されてきている。この Atrogin-1、MuRF1 発現を減少させることは筋萎縮抑制に結びつく可能性があるが、Atrogin-1、MuRF1 発現はインスリンあるいは IGF-I によっ

て低下することが報告されている。グレリンおよびグレリン受容体作動薬は GH 分泌を亢進させ、さらに IGF-I 分泌を促進するため、グレリン、グレリン受容体作動薬は筋萎縮を抑制する可能性がある。そこで、今回、グレリンおよびグレリン受容体作動薬 GHRP-2 の筋萎縮抑制作用を *in vivo*、*in vitro* で検討した。

B. 研究方法

1) グレリン受容体作動薬 GHRP-2 の筋 Atrogin-1、MuRF1、IGF-I 発現、血漿 IGF-I 値に及ぼす効果

6週齢のSD系雄ラットを (a) 対照としての生理的食塩水、(b) デキサメサゾン（600 μ g/kg/日、腹腔内）、(c) GHRP-2（200 μ g/kg/日、皮下）、

(d) デキサメサゾン+GHRP-2 投与群 (各群 n = 6) に分け、5 日間にわたって上記の処置をしたのち、ヒラメ筋を摘出し Atrogin-1、MuRF1、IGF-I mRNA 発現を定量 PCR 法 (QuantiTect SYBR Green PCR kit; QIAGEN) で検討した。また、血漿 IGF-I は 10 ml の血漿を使用して、EIA

(ACTIVE Mouse/Rat IGF-I Enzyme Immunoassay Kit, Diagnostic Systems Laboratories) で測定した。

2) C2C12 細胞における Atrogin-1、MuRF1、IGF-I mRNA 発現に及ぼす GHRP-2、グレリンの効果

筋芽細胞株 C2C12 細胞は、10% の牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。培養液を 2% 馬血清を含む DMEM に置換することにより筋細胞に分化させ、置換 6 日後に実験に使用した。無血清 DMEM に培養液を置換し、さらに 6 時間培養した後、デキサメサゾン (10mM)、GHRP-2 (1nM、1mM)、あるいはその両者を添加した。さらに 24 時間培養した後 RNA を抽出、Atrogin-1、MuRF1、IGF-I mRNA 発現を定量 PCR 法で調べた。また、GHRP-2 の代わりにグレリン (1nM、1mM) を使用し、同様の実験を行なった。

3) ヒラメ筋筋線維断面積に及ぼすデキサメサゾン、GHRP-2 の効果

6 週齢の SD 系雄ラットを (a) 生理的食塩水、(b) デキサメサゾン (600 μ g/kg/日、腹腔内)、(c) GHRP-2 (200 μ g/kg/日、皮下)、(d) デキサメサゾン+GHRP-2 投与群 (各群 n=6) に分け、5 日間にわたって処置をした後、ヒラメ筋を摘出し、急速凍結し凍結切片を作製した。ATPase 染色 (pH 10.3) を行ない、Type I、Type II 線維を分染し、筋線維断面積を NIH image で測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関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) グレリン受容体作動薬 GHRP-2 の筋 Atrogin-1、MuRF1、IGF-I 発現、血漿 IGF-I 値に及ぼす効果

デキサメサゾンの投与は、ラットヒラメ筋にお

いて Atrogin-1 発現を有意に亢進させた。MuRF1 発現に対しては増加傾向を示した。GHRP-2 の投与は、デキサメサゾンによる Atrogin-1、MuRF1 発現亢進を有意に抑制した。また、GHRP-2 は、MuRF1 の基礎発現を有意に抑制した。GHRP-2 は、IGF-I 発現亢進を介してデキサメサゾンによる Atrogin-1、MuRF1 発現増加を抑制した可能性があるため、血漿 IGF-I およびヒラメ筋 IGF-I mRNA 発現を測定した。デキサメサゾンはヒラメ筋における IGF-I 発現、血漿 IGF-I 値を減少させたが、GHRP-2 はこれらに影響を及ぼさなかった。

2) C2C12 細胞における Atrogin-1、MuRF1、IGF-I mRNA 発現に及ぼす GHRP-2、グレリンの効果

1) の成績から、GHRP-2 が直接筋に作用する可能性が考えられたので、マウス筋細胞株 C2C12 細胞を用いて検討した。筋細胞への分化に伴い C2C12 細胞のグレリン受容体発現が増加し、分化した C2C12 細胞において、デキサメサゾンは Atrogin-1、MuRF1 発現を増加させた。グレリン、GHRP-2 はこれらの発現を用量反応的に抑制した。また、グレリン、GHRP-2 は Atrogin-1、MuRF1 の基礎発現を用量反応的に抑制した。C2C12 細胞における IGF-I 発現はデキサメサゾン、および GHRP-2 処置によって影響を受けなかった。

3) ヒラメ筋筋線維断面積に及ぼすデキサメサゾン、GHRP-2 の効果

ラットヒラメ筋の筋線維断面積は、デキサメサゾン処理により有意に減少した。GHRP-2 の同時投与は、デキサメサゾンによる筋線維断面積の減少に影響を与えなかった。また、GHRP-2 単独投与時も、筋線維断面積に影響しなかった。

D. 考察

GHRP-2 は、ラットヒラメ筋において、デキサメサゾンによる Atrogin-1、MuRF1 発現増加、および MuRF1 の基礎発現を抑制した。すでに GHRP-2 は GH 分泌を促進することが報告されている。一般に GH は、Atrogin-1、MuRF1 発現を抑制することが知られている IGF-I の分泌を促進するので、GHRP-2 は、IGF-I を介して Atrogin-1、MuRF1 発現を抑制したと当初考えた。しかし、

GHRP-2 は血漿 IGF-I 値を増加させず、筋肉内の IGF-I 発現にも影響を与えなかった。この成績から、GHRP-2 は IGF-I を介さずに作用する可能性が示唆された。

GHRP-2 の筋への直接作用を検討する目的で、筋細胞 C2C12 細胞を使用した。C2C12 細胞は分化とともにグレリン受容体 GHSR1a を発現した。in vivo 実験と同様に、GHRP-2 は Atrogin-1、MuRF1 発現を用量反的に抑制し、直接筋細胞に作用することが明らかとなった。グレリン投与においても同様にこの効果は観察され、グレリン受容体を介する刺激で生じるものと考えられた。また、C2C12 細胞においても、GHRP-2 は IGF-I 発現を増加させず、IGF-I のパラクライン作用を介さずに、Atrogin-1、MuRF1 発現を抑制することが考えられた。

この Atrogin-1、MuRF1 発現抑制効果が実際に筋萎縮抑制に結びつくものか明らかにする目的で、デキサメサゾン、GHRP-2 処置時の筋萎縮について組織学的に検討した。ラットヒラメ筋の筋線維断面積は、デキサメサゾン処置により減少したが、GHRP-2 の同時投与によって回復しなかった。また、GHRP-2 単独投与時、筋断面積に影響はみられなかった。以上の成績から、少なくともこのデキサメサゾン 600 μ g/kg/日投与により生じた筋萎縮において、GHRP-2 投与は Atrogin-1、MuRF1 発現を抑制しタンパク分解を抑制する方向に作用するものの、筋萎縮抑制には結びついていないと考えられた。

筋萎縮は、筋タンパクの崩壊が合成を上回ったときに出現すると考えられている。Atrogin-1、MuRF1 発現が抑制されたにも関わらず、筋萎縮抑制が確認されなかった理由として、タンパク合成系が十分に亢進していない可能性がある。我々は、グレリンが、insulin、IGF-I と同様に PI3 キナーゼを活性化するものの Akt の活性化に結びつかず、その下流にシグナルが伝達されないことを以前に報告した。タンパク合成を促進する代表的なシグナル物質である S6 キナーゼはこの下流にあるので、GHRP-2 は筋タンパク合成促進作用に乏しいため筋萎縮が残存した可能性がある。また、この筋萎縮モデルラット作製に使用したデキサメサゾン量は、これまでに報告された動物実験成績

から選択したが、通常ヒトでは使用されない量であり、より少量の条件下では異なった成績が得られた可能性も否定できない。さらに検討する必要がある。

E. 結論

GHRP-2 はラットにおいて、筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1、MuRF1 発現を抑制した。GHRP-2 およびグレリンのこの作用は培養筋細胞でも観察でき、筋細胞に対する直接効果であると考えられた。しかし、デキサメサゾンによる筋萎縮は GHRP-2 の投与によって抑制されなかった。グレリン受容体作動薬の筋萎縮抑制作用については、筋萎縮モデルをさらに考慮して検討すべきであるとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Chihara K, Koledova E, Shimatsu A, Kato Y, Kohno H, Tanaka T, Teramoto A, Bates PC, Attanasio AF. An individualized GH dose regimen for long-term GH treatment in Japanese patients with adult GH deficiency. *Eur J Endocrinol*, 153: 57-65, 2005.
- ② Naito J, Kaji H, Sowa H, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K. Menin suppresses osteoblast differentiation by antagonizing the AP-1 factor, JunD. *J Biol Chem*, 280: 4785-4791, 2005.

2. 学会発表

なし

G. 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

置村 康彦 (神戸大学医学部)

山本 大輔 (神戸大学医学部)

グレリンは成長ホルモン放出ホルモンの発現調節に促進的に関与する

分担研究者 芝崎 保 日本医科大学生理学第二 教授

成長ホルモン分泌促進物質(GHS)/グレリンは、グレリン受容体(GHS-R)を介して強力な成長ホルモン(GH)分泌作用と摂食促進作用を発現する。我々のチロシン水酸化酵素遺伝子プロモーター下流にGHS-Rアンチセンスを挿入した導入遺伝子を用いて作製したGHS-R発現抑制トランスジェニック(Tg)ラットでは、視床下部弓状核でのGHS-Rの発現が低下し、同週齢対照ラットとの比較での一日摂食量の減少、低体重、低体脂肪、雌ラットでのGH、IGF-1の分泌量の低下がみられることを報告してきた。さらに本Tgラットの弓状核のGHRHニューロン数が減少していることからグレリンがGHS-Rを介してGHRH mRNA発現に促進的に関与していることが考えられるが、グレリンの脳室内投与はGHRH mRNA発現量に変化を与えないとの報告がある。そこで、本研究はラット視床下部ニューロンの初代培養を行い、GHSのGHRH mRNA発現への促進的作用をcompetitive RT-PCR法を用いて証明することを目的に施行した。KP-102はNPY mRNA発現量を有意に増加させたが、ソマトスタチン mRNA発現には影響を与えなかった。NPYとソマトスタチンは、GHRH mRNA発現量を有意に抑制した。KP-102はGHRH mRNA発現量を増加させる傾向を示し、抗NPY抗体との同時添加でGHRH mRNA発現量を有意に増加させた。KP-102と抗ソマトスタチン抗体の同時添加ではGHRH mRNA発現に変化はみられなかった。以上より、GHSはNPY分泌を促進し、NPYがGHRH mRNA発現に抑制的に作用すること、GHSそのものはGHRH mRNA発現を促進することが明らかになった。また、GHSはソマトスタチン分泌に影響を与えない可能性が示唆された。グレリンは、GHRHニューロンのGHS-Rを介してGHRHの発現に促進的に作用していると考えられる。

A. 研究目的

成長ホルモン分泌促進物質受容体(GHS-R)の内因性のリガンドとして発見されたグレリンは、強力な成長ホルモン(GH)分泌作用と摂食促進作用を発現する。我々のチロシン水酸化酵素遺伝子プロモーター下流にGHS-Rアンチセンスを挿入した導入遺伝子を用いて作製したGHS-R発現抑制トランスジェニック(Tg)ラットでは、視床下部弓状核でのGHS-Rの発現が低下していた。また、このTgラットが同週齢対照(Wt)ラットとの比較で一日摂食量の減少、低体重、低体脂肪、雌ラットでのGH、IGF-1の分泌量の低下がみられ

ることを報告してきた。視床下部弓状核内側に存在するニューロペプチドY(NPY)のニューロン数にはTgラットとWtラットとの間に有意な差は認められていないが、視床下部弓状核外側に存在している成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)ニューロン数は、TgラットでWtラットに比べ減少している。さらに、視床下部のGHRHニューロンにGHS-Rを過剰発現させたマウスでは、GHRH mRNA発現量が増加したという結果が報告されていることから、グレリンがGHS-Rを介してGHRH mRNA発現に促進的に関与していることが推測される。しかしながら、グレリンの脳室内