

投与は NPY や AGRP の mRNA 発現量を増すが、GHRH の mRNA 発現量に変化を与えないとの結果が複数のグループにより報告されている。これらの結果は、GH 分泌調節機構に GH によるソマトスタチン、NPY、GHRH 等を介した複雑なフィードバック機構が関与していることを示すものと考えられる。そこで本研究では、GHS/グレリンの GHRH 発現への促進的作用を明らかにすることを目的とし、GH のフィードバックの影響を受けない視床下部初代培養ニューロンを用いて、GHS の GHRH、NPY、ソマトスタチンの mRNA 発現量への影響とこれらペプチドによるそれぞれの遺伝子発現への影響を検討した。

B. 研究方法

1) ラット視床下部ニューロンの初代培養

ウイスター系の生後 1-2 日齢ラットの視床下部ニューロンを単層培養して実験に用いた。

2) competitive RT-PCR

competitive RT-PCR は、培養ニューロンから抽出した RNA サンプルを DNase で処理後、それぞれ β -actin プライマーによって半定量し、mRNA 量が比較対象間で等しくなるように調整した後、RNA コンペティターを同一チューブに加えて RT-PCR を行った。今回は PCR により作製したサイズの小さなホモログスコンペティターを pGEM ベクターにクローニングし、*in vitro* 翻訳によって得られた RNA コンペティターを 10^5 から 3×10^7 コピーとなるように加え、相対的な定量を行った。それぞれの対象遺伝子とコンペティターとの PCR による増幅レベルを定量し、それぞれのバンドの濃さが等しくなるコンペティターのコピー数をターゲット遺伝子の発現量として示した。

C. 研究結果

1) KP-102 による GHRH mRNA 発現量への影響

KP-102 は、20 nM、2 時間の添加で GHRH 発現量を対照に比し 1.77 ± 0.46 倍 (mean \pm SEM, n = 8, p = 0.09) までに増加させる傾向を示したが、有意な変化ではなかった。

2) KP-102 による NPY 及びソマトスタチンの mRNA 発現量への影響

NPY mRNA 発現量は 20nM の KP-102 の 24 時間添加で対照に比し 1.33 ± 0.07 倍 (mean \pm SEM, n = 6, p < 0.05) までに有意に増加した。ソマトスタチン mRNA 発現量は、同濃度の KP-102 の 2 時間の添加で対照に比し 1.44 ± 0.23 倍 (mean \pm SEM, n = 6, p = 0.12) に増加する傾向を示したが、有意な変化ではなかった。

3) NPY あるいはソマトスタチンによる GHRH mRNA 発現量の変化

1nM の NPY の 2 時間添加は、GHRH mRNA 発現量を対照の $64.0 \pm 12.0\%$ (mean \pm SEM, n = 4, p < 0.05) までに有意に減少させた。10 nM あるいは 100 nM のソマトスタチンの添加は、GHRH mRNA 発現量をそれぞれ対照の $51.9 \pm 11.1\%$ 、 $55.5 \pm 7.4\%$ (mean \pm SEM, n = 4, p < 0.05) までに有意に減少させた。

4) NPY あるいは KP-102 と抗 NPY 抗体の同時添加の GHRH mRNA 発現への影響

3.6 mg/ml の抗 NPY 抗体は、1nM の NPY による GHRH mRNA 発現抑制作用を阻止し、20nM の KP-102 と抗 NPY 抗体の同時添加は、対照としての正常ウサギ血清 IgG 添加に比し GHRH mRNA 発現量を 2.58 ± 0.45 倍 (mean \pm SEM, n = 6, p < 0.05) までに有意に増加させた。

5) ソマトスタチンあるいは KP-102 と抗ソマトスタチン抗体の同時添加の GHRH mRNA 発現への影響

3.6 mg/ml の抗ソマトスタチン抗体は、10nM のソマトスタチンによる GHRH mRNA 発現抑制作用を阻止したが、20nM の KP-102 による GHRH mRNA 発現増加作用に影響を与えなかった。

D. 考察

視床下部弓状核の GHRH ニューロンと NPY ニューロンには GHS-R が発現している。Tg ラットの視床下部弓状核における GHRH ニューロン数は Wt ラットに比べ減少しているが、視床下部弓状核内側に存在する NPY ニューロンの数は Tg ラットと Wt ラットとの間で有意な差はみられていない。ほとんどの NPY ニューロンにはチロシン水酸化酵素 (TH) は存在しないとの結果が報告されていることから、Tg ラットの NPY ニューロンには GHS-R のアンチセンスが発現せず、NPY ニュー

ニューロンにおける GHS-R および NPY の発現量に変化がみられなかったと考えられる。

GH 分泌は、GH による NPY、ソマトスタチン、GHRH を介したフィードバック機構で制御されている。GH の静脈内投与は視床下部弓状核の GH 受容体を発現している NPY ニューロンでの c-fos mRNA 発現量を増すことや、NPY の脳室内投与は GH 分泌を抑制すること、NPY はソマトスタチンの分泌を増すことなどが明らかになっている。弓状核の NPY ニューロンは室周囲核のソマトスタチンニューロンに線維を伸ばしシナプスを形成している。また、ソマトスタチンニューロンには GH 受容体が発現し、GH の静脈内投与はソマトスタチンニューロンの c-fos mRNA 発現をもたらしことも知られている。これらの事実から、GHS/グレリンにより分泌された GH は、NPY ニューロンやソマトスタチンニューロンに作用してそれらの分泌を増すことにより GHRH の分泌を抑制する可能性が考えられる。

本研究の視床下部神経ニューロンの単層培養系で、KP-102 は NPY の mRNA 発現量を有意に増加させたが、ソマトスタチン mRNA 発現量には有意な変化をもたらさなかった。NPY やソマトスタチンは GHRH mRNA 発現を有意に抑制したことから、KP-102 により分泌された NPY あるいはソマトスタチンが GHRH mRNA 発現量を減少させている可能性が考えられ、その有無を検討した。KP-102 と抗 NPY 抗体の同時添加は GHRH mRNA 発現量を有意に増加させたが、KP-102 と抗ソマトスタチン抗体の同時添加では GHRH mRNA 発現に変化がみられなかった。したがって、ソマトスタチンが KP-102 による GHRH mRNA 発現調節に関与している可能性は少なく、KP-102 により分泌が亢進した NPY が GHRH mRNA 発現に抑制的に作用していることが明らかになった。KP-102 は GHRH ニューロンに直接作用し、GHRH mRNA 発現に促進的に作用することから、グレリンは GHRH ニューロンの GHS-R を介して GHRH 発現に促進的に作用していると考えられる。

E. 結論

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 は

GHS-R を介して GHRH ニューロンに直接作用し 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- ①眞野 あすか、関野 あずさ、根本 崇宏、稲田 詩乃、周東 佑仁、杉原 仁、及川 眞一、芝崎 保：グレリン/growth hormone secretagogue (GHS) の褐色脂肪組織への作用. 第 78 回 日本内分泌学会学術総会、東京、2005 年.

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

根本 崇宏 (日本医科大学生理学第二)

眞野あすか (日本医科大学生理学第二)

ラット胎児の皮膚および脊髄の細胞増殖促進作用

分担研究者 村上 昇 宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学講座 教授

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する目的で、母親にグレリンを投与した時の胎児の成長を検討した結果、分娩時体重が増加することが判明した。また、胎児の各組織において広範囲にグレリン受容体の発現を認めた。さらに、胎児の皮膚や脊髄での培養細胞において、グレリンを添加すると細胞の分化・増殖が促進された。この細胞増殖促進作用は、デスアシルグレリンにおいても顕著に現れた。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る。また、以上の知見は母体内未熟児などの臨床応用への有効性を示唆するものと考えられる。

A. 研究目的

母体内の胎児の成長は、母親由来の成長関連ホルモンや胎盤由来の成長関連ホルモンの制御を受けており、その他にも母体の内分泌環境や栄養環境、あるいは精神的状態などに大きく左右される。近年、成長ホルモン（GH）分泌促進物質受容体の内因性リガンドとして発見されたグレリンは、GHの分泌を促進することから、妊娠中の母親のグレリン動態は母親の成長ホルモンの分泌に影響を与え、結果的に胎児成長に影響を及ぼす可能性が推測される。また、グレリンには強力な摂食亢進作用があることから、母親の摂食量の調節を通して、少なからず胎児の成長に影響している可能性が推測される。

グレリンには3番目のセリン残基がオクタン酸で修飾されたグレリン（アシルグレリン）とオクタン酸の無いデスアシルグレリンがあり、血中には両者が分泌されており、後者の方がその濃度が圧倒的に高い。従来、デスアシルグレリンには生理作用が無いと言われていたが、最近、幾つかの報告では、このデスアシルグレリンに生理活性が見い出されている。

そこで、本研究では、妊娠期母親のグレリンが胎児成長にどのような影響を与えているのか、またデスアシルグレリンの関与が存在するのかを

母親の血中動態、母親にグレリンを投与した時の胎児の成長への影響、胎児のグレリン受容体 mRNA の発現の有無、あるいは胎児の皮膚や脊髄培養細胞でのグレリンの効果などを検討した。

B. 研究方法

1) 胎児の各組織におけるグレリン受容体 mRNA の発現

研究室で飼育している Wistar ラットを交配させ、妊娠 15、17、19 日の胎児および分娩後 0、2 日の新生児ラットを材料に供した。胎児から脳、肝臓、皮膚、脊髄、下垂体、胃、腸、骨、筋肉などを採取し、RNeasy Micro Kit（Qiagen）を用いて mRNA の抽出及び精製を行った。First-strand cDNA はトータル RNA 2 μ g から random primer reverse transcription 法で作製した。cDNA は GHS-R1a 特異的プライマーを用いて PCR 解析を行った。対照には GAPDH を用いた。

2) 胎児の成長におよぼすグレリンの影響

妊娠 17 日の胎児の凍結切片を作製し、グレリン受容体の免疫染色および放射性ラベルしたグレリンでのオートラジオグラフィを行った。出生時の体重に及ぼすグレリンの影響を調べるため、妊娠ラットに分娩前 5 日間グレリンを投与し、出生時の新生児重量を測定した。

3) グレリンの血液中の分泌動態

妊娠ラットの15日から分娩時まで、母親と胎児の血中グレリン濃度およびデスアシルグレリン濃度を市販のキットで測定した。また、母親にグレリンを静脈内投与し、投与後に胎児および母親から血液を経時的に採取し、母親から胎児へのグレリンの移行の有無を検討した。また、妊娠17日の羊水を採取し、羊水中のグレリン濃度を測定した。

4) 胎児皮膚および脊髄の培養と細胞増殖の判定

妊娠17日の胎児から皮膚および脊髄を採取し、コラゲナーゼおよびパイン処置により細胞に分離した。これを96穴の培養皿に蒔き、24時間培養した。その後、BrdUを添加し、さらに12時間後にグレリンおよびデスアシルグレリンを添加した。その12時間後に培養液を取り除き、BrdUの取り込み量を、測定キットを用いて測定した。(倫理面への配慮)

動物実験に際してはその愛護に留意し、痛みを防止するための適切な麻酔薬などを用いて実験を行った。また、実験動物数は最小限に留め、屠殺は法令で定められた方法に準拠した。

C. 研究結果

1) 胎児の各組織におけるグレリン受容体 mRNA の発現

妊娠15日から分娩時までの胎児の各組織には広範囲にグレリン受容体 mRNA の発現が認められた。特に、皮膚と脊髄での発現は顕著であった。19日からは下垂体においても発現が確認された。胎児全身の凍結切片でもグレリン受容体抗体を用いた免疫染色で多くの組織が陽性を示した。放射性ラベルしたグレリンによるオートラジオグラフィでは、広範囲の結合部位が検出された。この結合はラベルしていないグレリンあるいはデスアシルグレリンの添加により、置換された。

2) 胎児の成長におよぼすグレリンの影響

妊娠母親に妊娠中期から毎日グレリンを皮下投与すると、生食水投与ラットと比較して、分娩時の体重が増加した新生児が誕生した。生理食塩水投与群から生まれた新生児体重は 5.6 ± 0.5 gであったのに対し、グレリン 1.5 nmol 投与群では 6.4 ± 0.2 gであった。また、グレリン 3.0 nmol 投与群

ではさらに新生児体重は増加し、 6.8 ± 0.4 gであった。いずれも生理食塩水投与群から生まれた新生児よりも有意に体重が増加していた。

3) 妊娠ラットおよび胎児の血中グレリン分泌動態

妊娠ラットでは、妊娠中期から末期まで、およそ $20 \sim 30$ fmol/ml の間でグレリンは推移し、分娩時に最高の 40.2 ± 1.6 fmol/ml を示した。グレリンは胎児血液循環中にも認められたが、その値は $2 \sim 4$ fmol/ml で極めて低いレベルであった。しかし、胎児血液循環中には母親よりも約10倍高濃度のデスアシルグレリンが検出され、特に妊娠17日の胎児血液には 4200 ± 340 fmol/ml という極めて高濃度のデスアシルグレリンが認められた。さらに羊水中においても 5800 ± 480 fmol/ml のデスアシルグレリンが認められた。

母親にグレリンを静脈内投与すると、投与後5分で胎児血液循環中にグレリンの上昇が確認され、10分後をピークとしてその後減少した。

4) 胎児皮膚および脊髄の培養と細胞増殖

妊娠17日の胎児から採取した皮膚と脊髄の培養において、グレリンは細胞増殖を添加量依存的に増加した。またデスアシルグレリンも同様の効果を示した。例えば、グレリンの最大有効量の 50 pmol/ml の添加では無添加群に対し胎児皮膚細胞で $146 \pm 9.2\%$ の細胞数増加となった。また、デスアシルグレリンでは $163 \pm 10.6\%$ となった。同様な結果が ^3H -thymidine の取り込みでも確認された。

D. 考察

今回の研究により、妊娠ラットにおいて、母親のグレリンが胎児の成長に重要な役割を演じていることが判明した。母親にグレリンを連日投与すると、生まれてきた新生児の体重が対照群よりも有意に増加していた。このことは母親のグレリンにより、直接的あるいは間接的に胎児の成長が促進されることを示唆している。グレリンは摂食亢進作用があることから、当然のことながら、グレリン投与によって母親の摂食量が亢進し、豊富な栄養が胎児循環へ供給された可能性が考えられた。しかし、グレリンを投与した母親の摂食量を制限しても、胎児重量増加の促進は認められた

(結果未発表)ことから、単に栄養的なものではないことが推測された。グレリンは成長ホルモンの増加を起こすことから、母親へのグレリン投与は母親あるいは胎児の成長ホルモンを増加させ、それによって、胎児の成長が促進された可能性は否定できない。しかし、予備実験において、胎児あるいは母親のインスリン様成長ホルモンを測定した結果は、その可能性を否定するものであった。すなわち、母親へのグレリン投与は成長ホルモンの血液中濃度の上昇を起こさなかった。

一方、母親にグレリンを投与すると、胎児循環中のグレリン濃度が増加することから、母親のグレリンは容易に胎児へ移行することが判明し、このグレリンが直接胎児の成長を促進している可能性が示唆された。また、胎児の各組織には広範囲にグレリン受容体を発現していることが、免疫組織学的に確認された。さらにオートラジオグラフィでの検討では胎児の各組織にはグレリン以外にデスアシルグレリンに親和性を有する受容体が存在することが示唆された。以上の知見から母親のグレリンは胎児へ移行し、胎児の各組織へ直接作用している可能性が強く推測された。事実、胎児の皮膚および脊髄の培養細胞において、グレリンとデスアシルグレリンは BrdU の取り込みやチミジンの取り込みを増加させた。このことから、グレリンとデスアシルグレリンはこれらの細胞増殖を促進することが判明した。母親の羊水中や胎児の血液中には多量のデスアシルグレリンが存在していたが、先の細胞増殖作用をあわせて考えると、胎児は羊水から外性的にも、内性的にもデスアシルグレリンに曝される環境にあり、これによって胎児の各組織が分裂増殖を促進されているのかも知れない。

E. 結論

本研究では、妊娠時の母親のグレリンが胎児の成長に重要な役割を果たしていること、その作用は胎児細胞へ直接作用し細胞分裂増殖を促進するものであること、また、従来生理作用が無いと言われていたデスアシルグレリンが細胞増殖に有効であることを示した。このような今回の結果は、妊娠時の未熟胎児のデスアシルグレリンあるいはグレリンの臨床的応用へ繋がるものと期待

される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② Shousha S, Nakahara K, M Kojima, Miyazato M, Hosoda H, Kangawa K, Murakami N. Differential effects of peripheral and central ghrelin on regulation of food intake in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol*, 141: 178-183, 2005.
- ③ 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.
- ④ 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.
- ⑤ 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.

2. 学会発表

- ① 西郷みづほ、中原桂子、寒川賢治、村上 昇：ラットの胎児数および幼児数の制限と成長過程におけるグレリンとの関係。第140回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2005。
- ② 村上 昇、中原桂子、西原真杉、寒川賢治：摂食促進ホルモン“グレリン”と抑制ホルモン“ニューロメジンU”の室傍核および弓状核での作用比較。第140回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2005。
- ③ 佐藤美穂、中原桂子、寒川賢治、村上 昇：ラット胎仔脊髄の神経前駆細胞に対するグレリンおよびデスアシルグレリンの細胞増殖効果。

第 140 回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2005.

G. 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

なし

デスアシルグレリンの摂食亢進作用

分担研究者 中里雅光 宮崎大学医学部第三内科 教授

デスアシルグレリンは、グレリンと同一の前駆体から産生され、グレリン同様にエネルギー代謝に関与している可能性がある。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による摂食亢進作用の検討や情報伝達系の解析を行った。デスアシルグレリンは、グレリンより弱いものの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った。

A. 研究目的

胃および視床下部で合成され、分泌されるグレリンは、成長ホルモン分泌と摂食亢進に機能する。グレリンは、前駆体であるプレプログレリンより産生されるデスアシルグレリンの3番目のセリンがオクタン酸で修飾されている構造をもつ。この修飾がグレリン受容体である成長ホルモン分泌促進物質受容体（GHS-R）を介した作用に重要である。近年、デスアシルグレリンが心筋細胞の保護や脂肪細胞の分化、増殖に機能していることが明らかになった。これらの解析で用いられた細胞のいくつかは、GHS-R を発現していないことから、GHS-R 非依存的なデスアシルグレリンの作用の存在が確認されている。デスアシルグレリンは、グレリンと同様に空腹やエネルギー不足により、末梢および中枢において分泌が亢進する。このことは、デスアシルグレリンもエネルギー代謝における役割が存在することを予測させるものである。我々は、グレリンは視床下部弓状核のニューロペプチド Y 系およびオレキシン系を介していることを明らかにしてきたが、本研究では、デスアシルグレリンの摂食亢進作用およびその下流シグナルについて解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) 動物

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た。全ての動物は12時間明暗サイクルの室温・湿度を一定の条件下で個別のケージにて自由摂餌・摂水で飼育した。各実験では、ペントバルビタール麻酔下で側脳室もしくは頸静脈にカニューレを留置した動物を、術後一週間後に使用した。

2) デスアシルグレリン投与による摂食亢進作用

ラット グレリンおよびラット デスアシルグレリン（200 pmol）をラット脳室内に投与した。また、ラット デスアシルグレリンを1.5 nmol と5 nmol の2つの容量を用いてラット静脈内に投与した。それぞれ、投与後2時間の摂餌量を測定した。

3) デスアシルグレリン摂食亢進の下流シグナルの同定

デスアシルグレリンをラットの脳室内に投与し、視床下部における神経細胞の活性化の指標である Fos 蛋白発現を免疫組織化学的に観察した。Fos 蛋白発現が視床下部外側野に認められたことから、Fos 蛋白と視床下部外側野に発現するオレキシンおよびメラニン凝集ホルモン（MCH）との二重免疫染色をおこなった。

デスアシルグレリンのラット脳室内投与3時間前に抗オレキシン抗体および抗ニューロペプ

チド Y 抗体を前投与し、デスアシルグレリン投与後 2 時間の摂餌量を測定した。また、オレキシンノックアウトマウスの脳室内にデスアシルグレリンを投与し、2 時間の摂餌量を測定した。ラットの視床下部外側野からオレキシンニューロンを単離し、デスアシルグレリン添加によるオレキシンニューロンのカルシウム反応をカルシウム感受性蛍光指示薬である Fluo-3 を用いて、カルシウムイメージング画像解析装置（浜松ホトニクス社製 FDSS/IMACS）により解析した。

4) デスアシルグレリンの標的蛋白の検討

GHS-R ノックアウトマウスの脳室内にデスアシルグレリンを投与し、2 時間の摂餌量を測定した。また、GHS-R ノックアウトマウスへのデスアシルグレリン投与による Fos 蛋白の発現および Fos 蛋白とオレキシンの二重免疫染色をおこなった。

（倫理面への配慮）

動物実験に際してはその愛護に留意し、投与および屠殺の際の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) デスアシルグレリンの摂食亢進作用

デスアシルグレリンの中樞投与は、グレリンの作用よりも弱い、有意に摂食を亢進させた。一方、末梢投与では、グレリンと異なって、摂食亢進作用はなかった。

2) デスアシルグレリンの下流シグナル

デスアシルグレリン投与により、ラット視床下部外側野にのみ Fos 蛋白の発現が観察された。この Fos 蛋白は、オレキシンニューロンの 22% に発現したが、MCH ニューロンには発現しなかった。グレリンの摂食亢進作用において重要な視床下部弓状核への Fos 蛋白の発現はなかった。抗オレキシン抗体前投与により、デスアシルグレリンの摂食作用は完全に消失した。一方、抗ニューロペプチド Y 抗体はデスアシルグレリンの摂食に影響しなかった。さらにオレキシンノックアウトマウスでは、デスアシルグレリンによる摂食亢進作用は認められなかった。ラット単離オレキシンニューロンへのデスアシルグレリンの添加は、オレキシンニューロンの一部の細胞内カルシウム濃

度を増大させた。

3) デスアシルグレリンの摂食機能と GHS-R の関係

GHS-R ノックアウトマウスの脳室内へのデスアシルグレリンの投与は、有意に摂食を増大させた。加えて、デスアシルグレリンの投与は GHS-R ノックアウトマウスのオレキシンニューロンに Fos 蛋白を発現した。

D. 考察

同一の前駆体から合成されるグレリンとデスアシルグレリンは、生体のエネルギーバランスを反映して、中樞および末梢において一定の比率を保って、その生合成が変動する。グレリンとデスアシルグレリンはともに、負のエネルギーバランス時に分泌が亢進することから、同化に機能するペプチドであると考えられる。グレリンは、中樞において視床下部弓状核のニューロペプチド Y ニューロンと視床下部外側野のオレキシンニューロンを活性化することにより、摂食亢進に機能する。本研究では、デスアシルグレリンは、視床下部においてグレリンと同様に摂食亢進に機能することを示した。デスアシルグレリンの脳室内投与は、オレキシンニューロンへの Fos 蛋白の発現を刺激した。また、オレキシン中和抗体によってデスアシルグレリンの摂食亢進作用が消失し、オレキシンノックアウトマウスにおいてもデスアシルグレリンが摂食亢進に機能しなかった。これらのことは、デスアシルグレリンの摂食機能における下流シグナルがオレキシン系であることを示唆している。

次に、オレキシンニューロンに対するデスアシルグレリンの作用をみるため、細胞内シグナルのセカンドメッセンジャーであるカルシウムの変化を観察した。グレリンは、パッチクランプ法により、オレキシンニューロンの細胞内カルシウムを増大させることが知られている。本研究では、デスアシルグレリンも単離オレキシンニューロンの細胞内カルシウム濃度を増大させることを示した。また、デスアシルグレリンは、GHS-R ノックアウトマウスにおいてもオレキシンニューロンの活性化によって摂食亢進を示すことから、デスアシルグレリンの標的蛋白は GHS-R 以

外のものが存在することが明らかとなった。

近年、デスアシルグレリンが脂肪細胞の分化、増殖や心筋細胞の保護に機能することが報告されている。これらの細胞に対するデスアシルグレリンの機能は GHS-R を必要としないことから、デスアシルグレリンの標的蛋白が末梢の細胞に発現していることが推察される。末梢グレリンは、迷走神経に発現している GHS-R に結合し、迷走神経求心路を介して視床下部へ空腹情報を伝達する。従って、末梢デスアシルグレリンも標的蛋白を介して摂食亢進に機能するかを検討した。しかしながら、デスアシルグレリンの末梢投与は、摂食を増大させなかった。これは末梢におけるデスアシルグレリンの情報が、中枢まで伝達しないことを示している。

グレリンは末梢と中枢において、デスアシルグレリンは中枢において摂食亢進に機能している。現在、GHS-R にはホモロジー検索の結果、サブタイプが存在しないと考えられており、デスアシルグレリンの標的蛋白は GHS-R とは全く異なる構造をしていることが予想される。今後、新たな戦略によりデスアシルグレリンの標的蛋白を同定し、グレリンとデスアシルグレリンの機能の相違を明らかにすることにより、グレリンの薬剤としての可能性がさらに広がると考えられる。

E. 結論

デスアシルグレリンは、グレリン同様に摂食亢進作用を有しているが、その標的蛋白は GHS-R 以外であり、情報伝達の下流シグナルはオレキシン系であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Osawa H, Nakazato M, Date Y, Kita H, Ohnishi H, Ueno H, Shiya 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.
- ② 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.
- ③ 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.
- ④ Ueno H, Yamaguchi H, Nakazato M. Ghrelin: A gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regul Pept*, 126: 11-19, 2005.
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Nijima A, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology*, 146: 3518-3525, 2005.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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.

2. 学会発表

- ①伊達 紫、十枝内厚次、幸田修一、寒川賢治、中里雅光：中脳切断ラットにおけるグレリンおよびPYYの摂食調節機能. 第78回日本内分泌学会、東京、2005.
- ②十枝内厚次、新原琢也、Mondal Muhtashan、伊達 紫、中里雅光：グレリンの摂食および成長ホルモン分泌機能に及ぼす加齢の影響. 第78回日本内分泌学会、東京、2005.
- ③新原琢也、Mondal Muhtashan、十枝内厚次、川越 隆、伊達 紫、中里雅光：ラットの食餌嗜好性におけるグレリン中枢投与および末梢投与の比較. 第78回日本内分泌学会、東京、2005.
- ④中里雅光：消化管ペプチドによる摂食調節作用の分子論的基盤. 第12回消化管分子機構研究会、2005.

G. 知的財産の出願・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

十枝内厚次（宮崎大学医学部）

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

分担研究者 中里雅光 宮崎大学医学部第三内科 教授

グレリン末梢投与による摂食亢進に關与する情報伝達系を解析した。9-11 週齡の雄性 Wistar ラットを用いた実験で、グレリンの末梢投与により、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。また、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。以上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關与していることが明らかになった。

A. 研究目的

グレリンは、胃および視床下部で合成・分泌されるペプチドで、末梢投与により摂食亢進に作用する。末梢産生物質が摂食調節に作用するためには、何らかの伝達経路を介し、その情報が中枢に到達する必要がある。我々のグループは、グレリンの摂食亢進作用が、迷走神経遮断および中脳切断ラットにおいてキャンセルされること、末梢投与したグレリンは、迷走神経求心線維に存在するグレリン受容体に結合し、その電気活動を変化させることにより空腹情報を視床下部へと伝達することを証明した (Gastroenterology, 2002.)。さらに、消化管ペプチド；peptide YY (PYY) の摂食抑制機構およびグレリンと cholecystokinin

(CCK) の相互作用についての研究から、エネルギーバランス制御における迷走神経求心路の重要性を呈示してきた (Endocrinology, 2005, a, b.)。グレリン、PYY、CCK の摂食調節に関するシグナルは、迷走神経経由で延髄孤束核に到達し、ニューロンを変換して視床下部へ伝達されることが考えられる。延髄孤束核は、迷走神経をメディアエーターとする末梢の物理・化学的刺激あるいはホルモンなどの液性因子情報の入力部位であり、視床下部に投射する多数のノルアドレナリン (NA) 産生ニューロンを含んでいる。今回我々は、グレリン末梢投与による孤束核での NA 生合成および視床下部弓状核での NA 分泌を評価し、神経解剖学的知見と併せて、グレリンによる摂食行動と

NA 神経系との機能連関を検討した。

B. 研究方法

1) 動物

本研究では、9-11 週齡の雄性 Wistar ラットを実験に用いた。全ての動物は 12 時間明暗サイクルの室温・湿度を一定の条件下で個別のケージにて自由摂餌・摂水で飼育した。各実験では、ペントバルビタール麻酔下で各手術を施した動物を、術後一週間後に使用した。

2) 中脳束切断モデルラットにおけるグレリン末梢投与後の摂餌量測定

脳幹から視床下部へ投射しているノルアドレナリン神経束を機械的に切断したラットを作製し、グレリン 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 静脈内投与後 2 時間の摂餌量の測定を行った。

3) グレリン投与後の視床下部弓状核におけるノルアドレナリン分泌の測定

グレリン静脈内投与後の視床下部弓状核でのノルアドレナリンレベルをマイクロダイアリシス法にて測定した。グレリン投与量は 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、中脳束切断モデルについても同様の検討を行った。

4) グレリン投与後の視床下部孤束核における DBH 遺伝子発現の定量

グレリン投与 2 時間後のラット孤束核より RNA を抽出し、ドパミンからノルアドレナリンへの変換酵素である dopamine β hydroxylase

(DBH) 遺伝子発現を定量 PCR 法で解析した。

5) 末梢グレリン投与におけるノルアドレナリン受容体の関与

アドレナリン受容体拮抗薬 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 遮断薬) をラット脳室内に前投与し、グレリン投与 2 時間後の摂餌量を測定した。

6) ノルアドレナリン神経破壊ラットにおけるグレリン末梢投与後の摂餌量測定

視床下部弓状核に抗 DBH 抗体を conjugate した saporin 神経毒 (DSAP) をマイクロインジェクションすることにより、弓状核でのノルアドレナリンを選択的に枯渇させたラットを作製 (DSAP ラット) し、グレリン静脈内投与後 2 時間の摂餌量を測定した。

7) グレリン投与による弓状核 NPY ニューロンの活性化の同定

グレリン投与により活性化される視床下部弓状核ニューロンへの DBH 含有神経線維の投射を、抗 Fos 蛋白抗体、抗ニューロペプチド Y (NPY) 抗体、抗 DBH 抗体を用いた 3 重免疫染色にて解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際してはその愛護に留意し、投与および屠殺の際の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) 中脳束切断モデルラットにおけるグレリン末梢投与後の摂餌量

グレリン静脈内投与による摂食亢進作用は中脳ノルアドレナリン神経束の切断により消失した。

2) グレリン投与後の弓状核におけるノルアドレナリン分泌

グレリン静脈内投与により、視床下部弓状核周囲でのノルアドレナリン放出量は濃度依存性を伴い増加した。また、この作用は中脳ノルアドレナリン神経束を切断したラットでは惹起されなかった。

3) グレリン投与後の孤束核における DBH 遺伝子発現

グレリン静脈内投与後 2 時間での延髄孤束核における DBH 遺伝子発現は有意に増加した。

4) 末梢グレリン投与におけるノルアドレナリン受容体の関与

$\alpha 1$ および $\beta 2$ アドレナリン受容体拮抗薬の前投与により、グレリン末梢投与による摂食亢進作用は減弱した。

5) ノルアドレナリン神経破壊ラットにおけるグレリン末梢投与後の摂餌量

DSAP ラットでは、孤束核 NA ニューロンの約 60% が脱落しており、グレリン静脈内投与による摂食亢進作用は消失した。

6) グレリン投与による弓状核 NPY ニューロンの活性化

グレリン静脈内投与は視床下部弓状核の NPY ニューロンを活性化し、その約 50% が DBH 含有神経線維の投射を受けていた。

D. 考察

迷走神経経路で延髄に到達した末梢グレリンシグナルは、孤束核のノルアドレナリン合成を増加させ、視床下部弓状核内でのノルアドレナリン分泌を増加させた。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。延髄孤束核に入力した末梢グレリンシグナルは、ノルアドレナリン神経系に変換され、弓状核 NPY ニューロンを活性化することにより摂食亢進に機能することが明らかになった。本研究により、胃内分泌細胞から分泌されるグレリンの視床下部への一次、二次神経を介する情報伝達経路の全貌が初めて明らかになった。

E. 結論

グレリン末梢投与による摂食亢進は、孤束核でのノルアドレナリン合成や視床下部弓状核でのノルアドレナリン分泌の亢進、さらに弓状核 NPY ニューロンを介した情報伝達系が重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.

- ② 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.
- ③ 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.
- ④ Ueno H, Yamaguchi H, Nakazato M. Ghrelin: A gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. Regul Pept, 126: 11-19, 2005.
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Nijima A, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. Endocrinology, 146: 3518-3525, 2005.
- ⑨ 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.

- ⑩ 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.

2. 学会発表

- ① 伊達 紫、十枝内厚次、幸田修一、寒川賢治、中里雅光：中脳切断ラットにおけるグレリンおよびPYYの摂食調節機能。第78回日本内分泌学会、東京、2005。
- ② 十枝内厚次、新原琢也、Mondal Muhtashan、伊達 紫、中里雅光：グレリンの摂食および成長ホルモン分泌機能に及ぼす加齢の影響。第78回日本内分泌学会、東京、2005。
- ③ 新原琢也、Mondal Muhtashan、十枝内厚次、川越 隆、伊達 紫、中里雅光：ラットの食餌嗜好性におけるグレリン中枢投与および末梢投与の比較。第78回日本内分泌学会、東京、2005。
- ④ 中里雅光：消化管ペプチドによる摂食調節作用の分子論的基盤。第12回消化管分子機構研究会、東京、2005。

G. 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
新原 琢也（宮崎大学医学部）

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。本年度は、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。105人の健常高齢者ボランティア（男性49人、女性56人、平均年齢73.4±6.3歳）を対象として検討を行い、高齢女性において、血漿アシル化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、また、収縮期血圧とは負の相関関係を示した。高齢男性では、デスアシルグレリン濃度が、排便回数と弱い相関を示したのみであった。今回の結果により、血中アシル化グレリン濃度が、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。さらに今年度は、高齢者を対象としたグレリンの臨床効果を検討する臨床第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。

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。一昨年度は、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。また昨年度は、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。そこで、本年度は、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。また今年度は、高齢者を対象としたグレリンの臨床効果を検討するために、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。

B. 研究方法

健常高齢者ボランティア105人（男性49人、女性56人、平均年齢73.4±6.3歳）の血中グレリン濃度を測定した。健常高齢者の定義として、65歳以上かつ、SENIEUR protocolを満たすもの、上部消化管の手術既往がなく、ホルモン治療を受けていないものとした。条件を満たす105人の健常高齢者を対象として検討を行った。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）を用いた。また、種々の代謝マーカーなども測定し、血

中グレリン濃度との関連を解析した。

高齢者を対象とした臨床試験として、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）の実施計画書を作成し、実施を開始した。

（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た。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

健常高齢者の血中グレリン濃度測定では、高齢女性において血中アシル化グレリン濃度は若年女性よりも低い傾向を示し（図 1）、血清 IGF-1 濃度および排便回数と正の相関を（表 1、2）、また、収縮期血圧とは負の相関関係を示した（表 3）。高齢男性では、デアシルグレリン濃度が、排便回数と弱い相関を示したのみであった（表 2）。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）。

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」の実施を開始し、平成 18 年 1 月現在 5 例終了した。

D. 考察

今回の健常高齢者の血中グレリン濃度測定結果により、血中アシル化グレリン濃度が、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。

E. 結論

健常高齢者における血中グレリン濃度測定を行い、結果をまとめて報告した。また、高齢者を対象としたグレリンの臨床効果を検討する臨床

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ①Iwakura 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 glucagons promoter-ghrelin transgenic mice. *J Biol Chem*, 280: 15247-15256, 2005.
 - ②Shinomiya 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.
 - ③Akamizu 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.
 - ④Ariyasu 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.
 - ⑤Akamizu 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.
- #### 2. 学会発表
- ①Akamizu T: Genetic susceptibility and familial Graves' disease. 13th International Thyroid

Congress, Argentina, 2005.

- ②Akamizu T: Susceptible genes of autoimmune thyroid diseases. Journal of Korean Society of Endocrinology, Korea, 2005.
- ③有安宏之、岩倉浩、五十子大雅、金本巨哲、中尾一和、赤水尚史、寒川賢治：甲状腺機能亢進状態におけるエネルギーバランス変動の血中グレリン濃度に与える影響。第48回日本甲状腺学会、東京、2005.
- ④平谷仁美、赤水尚史：Ch5q23-q33領域内候補遺伝子のSNPを用いた自己免疫性甲状腺疾患との関連解析。第48回日本甲状腺学会、東京、2005.
- ⑤金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、旗谷雄二、有安宏之、森山賢治、八十田明宏、小松弥郷、荒井宏司、中尾一和：甲状腺ホルモンによるヒトグレリン遺伝子転写調節に関する検討。第48回日本甲状腺学会、東京、2005.
- ⑥岩倉浩、細田公則、藤倉純二、冨田努、有安宏之、五十子大雅、赤水尚史、細田洋司、中尾一和、寒川賢治：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解析。第42回日本臨床分子医学会学術集会、京都、2005.
- ⑦金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、旗谷雄二、有安宏之、森山賢治、荒井宏司、寒川賢治、中尾一和：ヒトグレリン遺伝子発現調節機構の解析。第102回日本内科学会総会、大阪、2005.
- ⑧有安宏之、高屋和彦、金本巨哲、岩倉浩、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および作用の解明とその臨床的意義。第102回日本内科学会総会、大阪、2005.
- ⑨金本巨哲、赤水尚史、田上哲也、端谷雄二、有安宏之、森山賢治、細田洋司、児島将康、荒井宏司、寒川賢治、中尾一和：ヒトグレリン遺伝子プロモーター解析と遺伝子転写調節におかえるUFS (Upstream stimulatory factor) の意義。第78回日本内分泌学会学術総会、東京、2005.
- ⑩平谷仁美、Bowden Donald、池上賢、清水章、赤水尚史：HLA-DRB1遺伝子型およびCTLA-4遺伝子多型の遺伝子間相互作用の検討。第78

回日本内分泌学会学術総会、東京、2005.

G. 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）
岩倉浩（京都大学医学部）
有安宏之（京都大学医学部）
寒川賢治（国立循環器病センター）

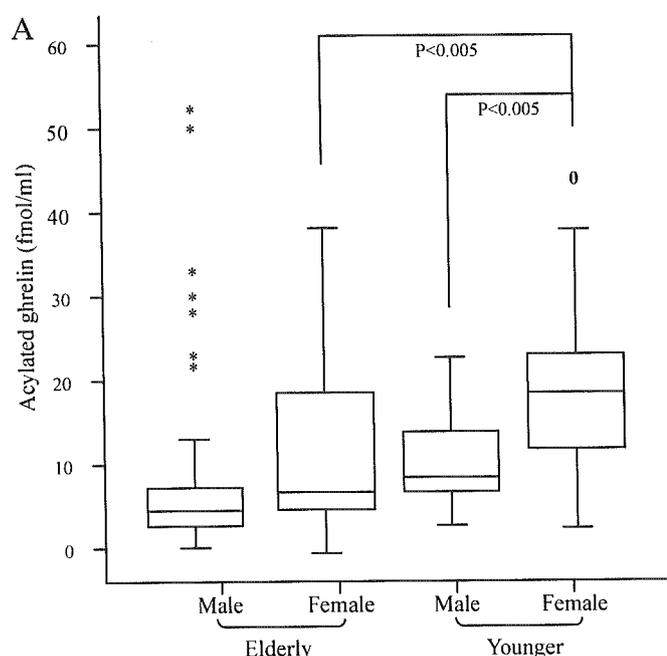


図1 健常高齢者における血中アシル化グレリン濃度

表1 グレリン濃度と要因との関連性—多変量解析

	男性 (n=49)			女性 (n=56)		
	β	p	r^2 (%)	β	p	r^2 (%)
Acylated ghrelin						
リクルート先	-0.076	0.831	0.1	0.540	0.087	6.2
年齢	0.005	0.873	<0.1	-0.012	0.721	0.3
BMI	-0.070	0.426	1.7	0.149	0.065	7.2
GH	-0.003	0.938	<0.1	0.094	0.123	5.1
IGF-1	0.003	0.588	0.8	0.015	0.010	13.6
Insulin	-0.024	0.657	0.5	-0.008	0.847	<0.1
Glucose	0.000	0.993	<0.1	0.008	0.619	0.5
Leptin	-0.009	0.920	<0.1	-0.052	0.176	3.9
睡眠時間	-0.030	0.813	0.1	0.157	0.369	1.8
Desacyl ghrelin						
リクルート先	-0.566	0.124	6.1	-0.044	0.858	<0.1
年齢	-0.004	0.881	<0.1	-0.015	0.550	0.8
BMI	-0.046	0.604	0.7	0.047	0.457	1.2
GH	0.012	0.756	<0.3	0.060	0.213	3.4
IGF-1	0.000	0.994	<0.1	0.008	0.094	6.0
Insulin	-0.018	0.740	0.3	-0.007	0.826	0.1
Glucose	-0.002	0.937	<0.1	0.016	0.212	3.4
Leptin	0.020	0.819	0.1	-0.014	0.634	0.5
睡眠時間	-0.004	0.974	<0.1	-0.002	0.989	<0.1

太字: $P < 0.05$ 、 β : regression coefficient、 r^2 (%): squared partial correlation coefficient

表2 グレリン関連ホルモンと便通との関連性

	人数	Acylated ghrelin		Desacyl ghrelin		A/D ratio	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
排便回数 (男性)							
³ 2/day	15	10.8	10.1	62.9	42.6	15.4	6.0
1/day	29	9.4	13.1	52.7	41.4	17.8	10.3
<1/day	5	4.0	3.1	27.7	34.2	27.0	21.5
p-value*		0.144		0.037		0.249	
(≥1/day vs.<1/day)							
排便回数 (女性)							
³ 2/day	11	15.0	9.8	91.1	43.0	15.6	4.8
1/day	38	12.3	10.2	71.3	47.8	17.3	9.0
<1/day	7	5.5	4.4	45.2	28.6	11.8	6.1
p-value*		0.014		0.188		0.008	
(≥1/day vs.<1/day)							

*: リクルート先, 年齢, 睡眠時間, BMI, blood levels of GH, IGF-1, insulin, glucose, leptin で調整
 太字: P<0.05

表3 グレリン濃度と血圧との関連性

	Acylated ghrelin		Desacyl ghrelin		A/D ratio	
	β	p*	β	p*	β	p*
男性						
収縮期血圧	-0.003	0.789	0.009	0.467	-0.012	0.050
拡張期血圧	0.012	0.616	-0.016	0.525	0.028	0.027
女性						
収縮期血圧	-0.022	0.039	-0.016	0.074	-0.006	0.291
拡張期血圧	-0.007	0.719	-0.001	0.969	-0.007	0.565

*: リクルート先, 年齢, BMI, 睡眠時間, 血圧 (mutually), blood levels of GH, IGF-1, insulin, glucose, leptin で調整
 太字: P<0.05

遺伝子変異モデルを用いたグレリンの生理機能解析

分担研究者 児島将康 久留米大学分子生命科学研究所遺伝子情報部門 教授

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。

A. 研究目的

分担研究者らは1999年に胃組織から、オーファン受容体 GHS-R（成長ホルモン分泌促進物質受容体）の内因性リガンドであるグレリン（ghrelin）の発見、構造決定に成功した。グレリンは強力な成長ホルモン（GH）分泌促進活性をもつアミノ酸28個からなるペプチドであり、3番目のSer残基の側鎖が脂肪酸であるn-オクタン酸（C8:0）によってアシル化修飾を受けており、さらにこの脂肪酸修飾が活性発現に必須であるという極めてユニークな構造をしている。申請者らはこれまでの研究で、胃がグレリンの主な産生臓器であり、胃から分泌されたグレリンが血流を介して下垂体に作用し、GH分泌を刺激するという、新しいGH分泌調節経路を示した。また、グレリンが強力な摂食亢進作用を有し、慢性投与によって脂肪組織増大性の肥満を誘発することを見出した。このような研究からグレリンは摂食抑制ホルモンであるレプチンと作用の点で拮抗するホルモンであり、生活習慣病の病態と密接な関連がある。グレリンは、GH分泌促進作用だけでなく、全身のエネルギー消費・代謝の調節、肥満との関連、循環調節系における心血管の保護作用など、幅広い生理的役割が示唆されており、ソマトポーズにおけるグレリンの補充療法が期待されている。

このような多くの生理作用を持つグレリンの

機能を解明するためにノックアウトマウスの作成・解析は欠かせない。本研究計画ではグレリン欠損マウスを作製し、グレリン欠損が生体にどのような影響を及ぼすのか、グレリン欠損マウスが老化したときにどのようなようになるのか検討する。

上記研究を遂行して、グレリンによる新しい生体制御機構の解明を行い、ソマトポーズにおける新しい診断薬、治療薬への臨床応用に向けたグレリンの可能性を見出したい。

B. 研究方法

1) グレリン欠損マウスの作製と解析

グレリン欠損マウスを作製し、グレリン欠損の影響を検討した。欠損マウスは通常の作製法によって行った。すなわち、マウスのグレリン cDNA 全長部分を完全に欠損させるためのプラスミド・ベクターから欠損 ES 細胞をピックアップし、キメラ・マウスを得た。交配によってグレリンのホモ欠損マウスを誕生させた。遺伝的背景を整えるために、野生型の C57BJ/6J との交配を重ね、9世代バッククロスを繰り返した。誕生した遺伝的背景を C57BJ/6J にしたグレリン欠損マウスにおいて、成長障害の有無、摂食障害の有無、身体・臓器の奇形の有無等を調べた。欠損マウスでの血中成長ホルモン濃度、他の血中ホルモン濃度、身長・体重の増加、摂食量などを測定し、グレリン欠損の影響を調べた。グレリン受容体が海馬にも

存在することから、グレリンの記憶形成における役割が示唆されるので、欠損マウスにおいて記憶障害の有無を調べた。

2) グレリンの骨作用の検討

摂食調節ホルモンと骨分化、骨形成との関連はよく指摘されていたが、グレリンと骨との関連は不明であった。そこで *in vitro* で骨芽細胞に対するグレリンの増殖作用やカルシウム沈着作用を調べた。また、マウスにグレリンを投与したときの骨密度の変化を調べた。

3) 視床下部グレリンの検討

視床下部の摂食調節領域にもグレリンが存在することが免疫組織染色から示されているが、それがどのような分子フォームであるのか、また、どのような生合成・分泌調節を受けているのかは明らかではなかった。本研究では、これらの点を解明することを試みた。ラットあるいはマウス視床下部からペプチド画分を抽出し、高速液体クロマトグラフィーで展開したのち、グレリンのラジオイムノアッセイ系を用いて、視床下部グレリンの分子フォームを検討した。また、リアルタイムPCRによって、絶食や過食状態での、視床下部グレリンや視床下部の他の摂食調節ペプチドの mRNA 発現の変化を調べた。

(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は苦痛を最小限にとどめるように十分配慮した。

C. 研究結果

1) グレリン欠損マウスの作製と解析

われわれは平成 17 年度に成長ホルモン分泌促進活性および摂食亢進活性をもつホルモンであるグレリンのノックアウトマウスの作製を完了した。グレリン遺伝子変異マウスは、ヘテロ欠損マウス、ホモ欠損マウスを得て、順調に匹数が増えており、現在、様々な表現系の解析を行っている。

グレリン欠損マウスは不妊ではなく、妊娠や出産の過程、出産数は野生型と変わらない。新生児にも特に目立った外見上の異常は見られず、順調に成長する。身長と体重も正常に増加し、体型や成長曲線も野生型マウスと変化ない。調べた限り

では臓器・組織の奇形や異常もなかった。

また、グレリン欠損マウスでは血中の成長ホルモン濃度、レプチン濃度、インスリン濃度、血中グルコース濃度、血中脂質濃度などは野生型マウスと差がなかった。摂食量と飲水量も欠損マウスと野生型マウスとでは差がなかった。摂食パターンについても野生型マウスと違いはなかった。

2) グレリンの骨作用の検討

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がわかった。グレリンの骨作用は、その成長ホルモン分泌促進活性から、成長ホルモンを介した間接的な作用も考えられたが、成長ホルモン欠損ラットを使った実験から、グレリンが直接、骨芽細胞に作用して、骨形成を刺激することが明らかになった。また実験動物にグレリンを投与すると、骨密度が上昇することも確認し、骨折や骨粗鬆症の治療応用につながるかと期待される。

3) 視床下部グレリンの検討

① 視床下部グレリンの分子フォームについて

ラット視床下部を取り出し、沸騰水中でボイルすることによって、内因性プロテアーゼによるペプチド分解を防止した。抽出したペプチド画分を HPLC によって展開し、RIA によって分子フォームを調べると、おもに 2 種類の分子フォームで存在していた。一つは胃でのグレリンの主要な分子フォームであるオクタン酸で修飾されたグレリンで、もう一つは脂肪酸修飾のないデスアシル型のグレリンであった。これまで、免疫組織染色によって視床下部でのグレリンの存在が示唆されていたが、われわれの実験から視床下部には確かにグレリンが存在し、胃と同じくオクタン酸修飾のグレリンがメインの活性型分子フォームであることがわかった。また、視床下部においても、脂肪酸が付いていない非活性型のデスアシルグレリンも存在することがわかった。

② 絶食による視床下部グレリンの変化

胃においては絶食によってグレリン mRNA の発現量は増加するが、視床下部においては絶食によってグレリン mRNA 量は逆に減少した。実験系に間違いがないか、NPY、AgRP、MCH などの絶食によって増加する神経ペプチドの mRNA 発現を調べたが、これらは文献どおり絶食によって