

200619039A

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18年度 総括・分担研究報告書

平成19（2007）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

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18年度 総括・分担研究報告書

## 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. グレリンの糖・脂質代謝における意義 -グレリンの肝臓グリコーゲン貯蔵促進効果-	10
寒川賢治 (国立循環器病センター 研究所 副所長)	
2. 肥満モデル、糖尿病モデルマウスにおけるグレリン応答性反応の検討	14
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. 低用量デキサメサゾン誘導性筋萎縮におよぼすグレリン受容体作動薬の効果	17
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. 褐色脂肪組織のノルアドレナリン分泌に対するグレリンの作用	21
芝崎 保 (日本医科大学第二生理 教授)	
5. ラット迷走神経節中のグレリン受容体 GHS-R の調節機構	24
村上 昇 (宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学 教授)	
6. グレリンの生理作用発現における脂肪酸修飾の役割	28
中里雅光 (宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸器内分泌代謝学分野 教授)	
7. 人工股関節置換術の周術期を対象としたグレリン投与臨床第 II 相試験と 新生児糖尿病ラットモデルにおけるグレリン投与の検討	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)	
8. 遺伝子変異モデルを用いたグレリンの生理機能解析	36
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)	
9. 消化器疾患の病態に対するグレリン臨床研究	40
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)	
10. 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 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に対する臨床応用を目的として、当初予定されていた計画を遂行し、次のような成果を得た。ラットへのグレリンの長期投与で血中脂質は低下したが、高用量の投与では体脂肪率が増加し、血糖値が上昇した。このことから、慢性投与では至適投与量や投与期間の設定が重要であることが示された。また、肥満糖尿病マウスでは、グレリンの成長ホルモン（GH）分泌促進作用は低下していたが、低用量のグレリンと GH 放出ホルモン（GHRH）の共投与により、GH 分泌作用の低下が改善した。グレリンの摂食亢進作用に対する脂肪酸修飾の解析から、作用発現には脂肪酸の鎖長が 8 個であることが重要であると考えられた。マイクロダイアリス法にて褐色脂肪細胞のノルアドレナリン分泌の変化を測定し、迷走神経-視床下部を介したグレリンによる機能調節経路の存在が明らかになった。新生児糖尿病モデルラットにグレリンを連続投与すると、成獣時における高血糖発症が阻止されたことから、グレリンの膵β細胞に対する増殖作用またはアポトーシス抑制の可能性が示唆された。迷走神経節のグレリン受容体（GHS-R）の生合成には、中枢性あるいは末梢性に制御された日内変動があり、この GHS-R 合成調節もグレリンの摂食亢進作用に関与していると考えられた。グレリン欠損マウスの作製・解析から、グレリン欠損マウスは致死性でなく、摂食や形態的な異常はないことが示された。体重減少を伴う慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者を対象として、グレリンの運動耐容能改善効果を評価するための多施設二重盲検無作為化比較試験を開始し、安全性、有効性の検証を進めている。高齢者の人工股関節置換術の周術期回復に対するグレリンの効果を検討する臨床試験は症例を集積中である。胃切除後患者へのグレリン補充療法を開始して、今後の臨床応用へ向けた検討を行った。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摂食亢進作用の情報伝達系の解明、膵β細胞への影響、脂肪酸修飾の鎖長の意義などの基礎的な研究成果に加えて、COPD 患者の運動耐容能や胃切除後の食欲に対する効果の評価など、臨床分野においてもグレリン治療の適応疾患の拡大に向けた重要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（日本医科大学大学院医学研究科  
生体統御科学教授）

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 (宮崎大学医学部内科学講座  
神経呼吸内分泌代謝学分野教授)  
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

成長ホルモン (GH) は、成長や代謝調節、老化の抑制に深く関与するホルモンで、哺乳類では思春期をピークとして以降減退する。GH は筋・骨形成、脂肪分解、細胞増殖などの作用を有し、身体機能の維持に重要な役割を担っている。高齢者における GH の分泌低下はソマトポーズとも呼ばれ、骨格筋量や骨量の低下、内臓脂肪型肥満、脂肪肝をきたし生活の質を低下させる大きな要因となることから、超高齢化社会をむかえる我が国において、重要な問題として注目されている。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、循環器系ならびに免疫系の調節にも作用する。これらのことから、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に関連していることが推定される。グレリンの生体機能調節や病態生理学的意義に関する研究は、老化のメカニズム解明やソマトポーズによる健康障害に対する新規治療の開発に貢献できると考えられる。本研究事業は、これまでに蓄積したグレリンの知見や研究基盤に基づき、基礎と臨床の両面からグレリンの生体機能の調節および老化における役割を明らかにし、高齢者のソマトポーズに起因する疾患に対するグレリンの臨床応用を目指し

ている。

#### B. 研究方法

本年度は、グレリンの生体調節機構の解明およびソマトポーズ治療への臨床応用を目指し、以下のような方法で広範な研究を展開した。

- 1) グレリンの慢性投与による糖・脂質代謝に対する影響の解析。
- 2) 肥満糖尿病マウスにおけるグレリンの GH 分泌に与える影響の検討。
- 3) 筋組織に対するグレリンの病態生理学的意義。
- 4) 褐色脂肪細胞内のノルアドレナリン分泌に対するグレリンの作用の解析。
- 5) グレリンの生理作用発現における脂肪酸修飾の検討。
- 6) 膵β細胞および糖尿病に対するグレリンの病態生理学的意義。
- 7) 迷走神経節のグレリン受容体 GHS-R の合成調節機構。
- 8) 遺伝子改変動物を用いたグレリンの生理学的意義に関する研究。
- 9) 変形性股関節症の人工股関節置換術の術後回復におけるグレリンの有効性評価。
- 10) 胃切除後患者におけるグレリン補充療法。
- 11) 体重減少をきたした慢性閉塞性肺疾患患者の運動耐容能改善に対するグレリンの臨床効果。

(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、各施設で定められた臨床研究の規定に従って実施した。また実験動物を用いた研究では、実験動物飼育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) グレリンの慢性投与による糖・脂質代謝に対する影響の解析

寒川は、ラット雄に対してグレリンを約3ヶ月間投与し、糖・脂質代謝に対する影響を検討した。グレリン投与によって、血中コレステロールやトリグリセライド、リン脂質は有意に

低下し、遊離脂肪酸は低下傾向を示した。また、グレリンによる肝グリコーゲンの貯蔵促進作用という新しい作用も認められた。ただし、グレリンの高用量投与群においては体脂肪率の増加と血糖値の上昇がみられた。これらの結果から、グレリンの慢性投与が糖・脂質代謝に与える影響が明らかとなり、臨床応用を行なう際の投与量や投与期間の決定に参考になると思われる。

## 2) 肥満糖尿病マウスにおけるグレリンのGH分泌に与える影響の検討

中尾は、肥満糖尿病マウスにおけるグレリンのGH分泌に与える影響を検討した。db/dbマウス、高脂肪食負荷マウス、Akitaマウスの3種類の肥満糖尿病モデルマウスにおいて、グレリンのGH分泌作用は低下していた。db/dbマウスとAkitaマウスにおいて、グレリンの摂食亢進作用は低下していた。高脂肪食負荷マウスにグレリンとGHRHを共投与したところ、GH分泌はグレリン単独投与に比べて増強された。10日間連続共投与では、摂食、脂肪蓄積は低下傾向にあった。除脂肪体重に有意差は認められなかった。以上より、低用量のグレリンにGHRHを共投与することにより、摂食を亢進させることなく、肥満におけるGH分泌低下状態を改善できる可能性が示唆された。

## 3) 筋組織に対するグレリンの病態生理学的意義

千原は、SD系6週齢の雄ラットを用いて、デキサメサゾン誘導性筋萎縮に対するグレリン作動薬GHRP-2の萎縮抑制効果を組織学的に検討した。また、低用量デキサメサゾン投与誘導性筋萎縮の回復過程に対するGHRP-2の効果についても組織学的検討を行なったが、GHRP-2はいずれにも影響しなかった。細胞内シグナルの変動を調べたところ、GHRP-2はインスリン/IGF-1と異なり、筋蛋白合成に関するS6キナーゼのリン酸化を亢進しなかった。S6キナーゼは蛋白合成を促進する重要な因子であるので、GHRP-2はAtrogin-1、MuRF1発現を抑制し、蛋白分解系を抑制するものの、S6キナーゼを活性化しないため、筋萎縮に明確な作用を発揮しえない可能性が示唆された。

## 4) 褐色脂肪細胞内のノルアドレナリン分泌に対するグレリンの作用の解析

芝崎は、マイクロダイアリシス法にて褐色脂肪細胞のノルアドレナリン分泌の変化を解析した。グレリンの静脈内投与により褐色脂肪細胞内のノルアドレナリン分泌は抑制したが、迷走神経切除ラットおよび迷走神経節のグレリン受容体発現が低下しているトランスジェニックマウスでは、この抑制作用は認められなかった。視床下部の弓状核、室傍核へのグレリン局所投与により褐色脂肪細胞のノルアドレナリン分泌は抑制されたことから、褐色脂肪細胞の交感神経入力に関する視床下部のグレリンの作用部位の一部は弓状核と室傍核である可能性が示唆された。グレリンの迷走神経-視床下部を介した褐色脂肪細胞の機能調節経路が存在する可能性が示唆された。

## 5) グレリンの生理作用発現における脂肪酸修飾の検討

中里は、脂肪酸アシル基の鎖長が0個、4個、8個のグレリン誘導体を用いてグレリンの作用と脂肪酸修飾の関連を検討した。ラットマウスに脂肪酸鎖長の異なるグレリン誘導体の中枢または末梢投与し、摂餌量とGH分泌を測定した結果、グレリンの脳室内投与では脂肪酸鎖長の伸長に伴った摂餌量の増加が認められ、末梢静脈投与では8個の誘導体のみが、摂食とGH分泌の促進を示した。また、ラットの視床下部へのグレリン誘導体の投与では、脂肪酸鎖長が8個の誘導体は、室傍核、外側野、弓状核で摂食亢進を促進させたが、0個または4個のグレリン誘導体では弓状核の投与でのみ摂食亢進作用を示した。

## 6) 膵β細胞および糖尿病に対するグレリンの病態生理学的意義

赤水は、グレリンの膵β細胞および糖尿病に対するグレリンの影響を検討した。新生児糖尿病モデルラットにグレリンを連続投与すると成獣時における高血糖発症を阻止し、グレリンの膵β細胞の再生作用またはアポトーシス抑制の可能性が示唆された。

## 7) 迷走神経節のグレリン受容体 GHS-R の合成調節機構

村上は、迷走神経節のグレリン受容体 GHS-R の合成調節機構について検討した。自由摂食ラットにおいて、迷走神経節の GHS-R mRNA の発現量は明期に高く、暗期に低い日内リズムが認められた。絶食は GHS-R mRNA の発現量を増加させたが、再摂食後にはさらなる増加が認められた。迷走神経切除は GHS-R mRNA の発現量を減少させた。コレシストキニンやガストリンの投与により、GHS-R mRNA の発現量は有意に変化した。この結果は、迷走神経節中の GHS-R の合成が中枢性あるいは末梢性に制御されていることを示しており、この GHS-R 合成調節もグレリンによる摂食調節に関与していると推測された。

## 8) 遺伝子改変動物を用いたグレリンの生理学的意義に関する研究

児島は、グレリン欠損マウスを作製し、その遺伝的背景を C57BL/6J に整えた上で摂食行動等を解析した。グレリン欠損マウスは致死性ではなく、形態的な異常はなかった。また、グレリン欠損マウスの体重、摂食量、行動に目立った変化はなかった。これはグレリンの摂食亢進作用の欠落を補うような機構が、生体内にあることを示しており、食欲の刺激はグレリンが単独で行っているのではなく、複数の因子が関与したものと考えられる。そのため、グレリンが欠損しても、バックアップの因子が食欲・摂食行動を調節することで食欲の低下・消失を防止していると考えられた。

## 9) 変形性股関節症の人工股関節置換術の周術期回復におけるグレリンの有効性評価

赤水は、高齢者の筋骨格系疾患に対するグレリンの有用性と安全性を検討するために、変形性股関節症に対する人工股関節置換術患者の周術期回復におけるグレリンの有効性評価に関する臨床第Ⅱ相試験を 2005 年 9 月から開始した。目標症例は 32 例で、2007 年 1 月末までに 24 例終了した。

## 10) 胃切除後患者におけるグレリン補充療法

大津留は、胃切除後患者へのグレリン補充療法を開始した。グレリン投与により、成長ホル

モン・ACTH のサージが認められ、空腹感が生じないものの食欲が改善し、除脂肪量が増加した。

## 11) 体重減少をきたした慢性閉塞性肺疾患の運動耐容能改善に対するグレリンの臨床効果

永谷は、体重減少をきたした慢性閉塞性肺疾患患者 7 名に対して、グレリン投与により体重が増加し、呼吸筋力と運動耐容能が改善することを示した。この結果を基に、グレリンの臨床効果と安全性を評価するため、体重減少をきたした慢性閉塞性肺疾患患者を対象として、多施設二重盲検無作為化比較試験を開始した。

## E. 結論

本年度は、グレリンの病態生理学的意義の解明やソマトポーズに対する臨床応用に向けて、基礎と臨床の両面から先駆的かつ応用的な研究を展開できた。基礎研究分野では、グレリンの慢性投与による糖・脂質への影響を解明し、肝グリコーゲンの貯蔵促進作用という新しい作用を明らかにした。迷走神経-視床下部を介した褐色脂肪細胞の機能調節経路や迷走神経節のグレリン受容体の合成調節機構の解明などグレリンの情報伝達系について新たな知見を得た。グレリンの膵β細胞再生作用またはアポトーシス抑制の可能性を示した。これらの基礎研究の成果は、今後、グレリンの治療適応の拡大を検討する上で重要な知見と考えられた。遺伝子改変動物の解析からは、グレリン受容体をターゲットとしたエネルギー代謝障害に対しての創薬の方向性が示された。臨床研究分野では、「体重減少をきたした慢性閉塞性肺疾患患者の運動耐容能改善」や「変形性股関節症に対する人工股関節置換術の周術期の回復」など高齢者に多くみられる病態に対するグレリン投与の有効性を評価するための臨床試験を開始し、現在、症例を蓄積している。また、胃切除術後の病態とグレリン欠乏との関連が示され、胃切除術後患者へのグレリン補充療法を開始している。グレリンの作用は、GH 分泌促進や摂食亢進作用だけでなく、循環器、呼吸器、消化器といった主要臓器の機能維持および代

謝や免疫の調節など多岐にわたっている。本年度は、グレリンの「抗老化作用」のメカニズム解明を進展させることにより、ソマトポーズに起因する病態に対する臨床応用に向けたグレリン研究が着実に成果を上げることができた。今後、さらにグレリンの分泌制御機構やソマトポーズを初めとする病態との関連を解明し、臨床応用の確立に向けて研究を展開させることが必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nishizawa T, Suzuki H, Nomoto Y, Masaoka T, Hosoda H, Mori M, Ohara T, Morishita T, Kangawa K, Hibi T. Enhanced plasma ghrelin levels in patients with functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther*, Suppl 2: 104- 110, 2006.
2. Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. Blockade of pancreatic islet- derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high- fat diet- induced glucose intolerance. *Diabetes*, 55: 3486- 3493, 2006.
3. Doki Y, Takachi K, Ishikawa O, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Nakajima H, Hosoda H, Kangawa K, Sasakuma F, Motoori M, Imaoka S. Ghrelin reduction after esophageal substitution and its correlation to postoperative body weight loss in esophageal cancer patients. *Surgery*, 139: 797- 805, 2006.
4. Takahashi H, Kurose Y, Kobayashi S, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y. Ghrelin enhances glucose- induced insulin secretion in scheduled meal- fed sheep. *J Endocrinol*, 189: 67- 75, 2006.
5. Irako T, Akamizu T, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Tojo K, Tajima N, Kangawa K. Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin- treated newborn rats. *Diabetologia*, 49: 1264- 1273, 2006.
6. 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- I levels and bowel movement frequency and negatively with systolic blood pressure. *J Endocrinol*, 188: 333- 344, 2006.
7. 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.
8. 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.
9. Yoshioka S, Takahashi Y, Okimura Y, Takahashi K, Iguchi G, Iida K, Kaji H, Chihara K. Gene expression profile in the heart of spontaneous dwarf rat: In vivo effects of growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, 341: 88- 93, 2006.
10. Kaji H, Yamauchi M, Chihara K, Sugimoto T. The threshold of bone mineral density for vertebral fracture in female patients with glucocorticoid- induced osteoporosis. *Endocr J*, 53: 27- 34, 2006.
11. Kaji H, Tobimatsu T, Naito J, Mei- Fway I, Yamauchi M, Sugimoto T, Chihara K. Body composition and vertebral fracture risk in



- female patients treated with glucocorticoid. *Osteoporos Int*, 17: 627- 633, 2006.
12. Takahashi K, Iida K, Okimura Y, Takahashi Y, Naito J, Nishikawa S, Kadowaki S, Iguchi G, Kaji H, Chihara K. A novel mutation in the von Hippel- Lindau tumor suppressor gene identified in a Japanese family with pheochromocytoma and hepatic hemangioma. *Intern Med*, 45: 265- 269, 2006.
  13. Chihara K, Kato Y, Kohno H, Takano K, Tanaka T, Teramoto A, Shimatsu A. Efficacy and safety of growth hormone (GH) in the treatment of adult Japanese patients with GH deficiency: A randomised, placebo- controlled study. *Growth Horm IGF Res*, 16: 132- 142, 2006.
  14. Kaji H, Mei- Fway I, Naito J, Sugimoto T, Chihara K. A case of primary hyperparathyroidism with marked changes in bone mineral density and geometry after parathyroidectomy. *J Bone Miner Metab*, 24: 349- 352, 2006.
  15. Tobimatsu T, Kaji H, Sowa H, Naito J, Canaff L, Hendy GN, Sugimoto T, Chihara K. Parathyroid hormone increases  $\beta$ -catenin levels through smad3 in mouse osteoblastic cells. *Endocrinology*, 147: 2583- 2590, 2006.
  16. Kaji H, Nomura R, Yamauchi M, Chihara K, Sugimoto T. The usefulness of bone metabolic indices for the prediction of changes in bone mineral density after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism. *Horm Metab Res*, 38: 411- 416, 2006.
  17. Chihara K, Kato Y, Takano K, Shimatsu A, Kohno H, Tanaka T, Irie M. Effect of growth hormone treatment on trunk fat accumulation in adult GH- deficient Japanese patients: a randomised, placebo- controlled trial. *Curr Med Res Opin*, 22: 1973- 1979, 2006.
  18. Suzukamo Y, Noguchi H, Takahashi N, Shimatsu A, Chihara K, Green J, Fukuhara S. Validation of the Japanese version of the quality of life- assessment of growth hormone deficiency in adults (QoL- AGHDA). *Growth Horm IGF Res*, 16: 340- 347, 2006.
  19. Kaji H, Naito J, Sowa H, Sugimoto T, Chihara K. Smad3 differently affects osteoblast differentiation depending upon its differentiation stage. *Horm Metab Res*, 38: 740- 745, 2006.
  20. Miyauchi A, Gotoh M, Kamioka H, Notoya K, Sekiya H, Takagi Y, Yoshimoto Y, Ishikawa H, Chihara K, Takano- Yamamoto T, Fujita T, Mikuni- Takagaki Y.  $\alpha$  v  $\beta$  3 Integrin ligands enhance volume- sensitive calcium influx in mechanically stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*, 24: 498- 504, 2006.
  21. Imanaka M, Iida K, Takahashi K, Tsuji K, Nishizawa H, Fukuoka H, Takeno R, Takahashi Y, Okimura Y, Kaji H, Chihara K. The N131S mutation in the von Hippel- Lindau gene in a Japanese family with pheochromocytoma and hemangioblastomas. *Endocr J*, 53: 819- 827, 2006.
  22. Ito Y, Fujieda K, Tanaka T, Takano K, Chihara K, Seino Y, Irie M. KIGS (Pfizer International Growth Study) Japan Scientific Committee. Low- dose growth hormone treatment (0.175mg/ kg/ week) for short stature in patients with turner syndrome: Data from KIGS Japan. *Endocr J*, 53: 699- 703, 2006.
  23. Chihara K, Shimatsu A, Kato Y, Kohno H, Tanaka T, Takano K, Irie M. Growth hormone (GH) effects on central fat accumulation in adult Japanese GH deficient patients: 6- month fixed- dose effects persist during second 6- month individualized- dose phase. *Endocr J*, 53: 853- 858, 2006.
  24. Mano- Otagiri A, Nemoto T, Sekino A, Yamauchi N, Shuto Y, Sugihara H, Oikawa S, Shibasaki T. Growth hormone- releasing hormone (GHRH) neurons in the arcuate nucleus (Arc) of the hypothalamus are decreased in transgenic rats whose expression

- of ghrelin receptor is attenuated: evidence that ghrelin receptor is involved in the up-regulation of GHRH expression in the arc. *Endocrinology*, 147: 4093- 4103, 2006.
25. Date Y, Shimbara T, Koda S, Toshinai K, Ida T, Murakami N, Miyazato M, Kokame K, Ishizuka Y, Ishida Y, Kageyama H, Shioda S, Kangawa K, Nakazato M. Peripheral ghrelin transmits orexigenic signals through the noradrenergic pathway from the hindbrain to the hypothalamus. *Cell Metab*, 4: 323- 331, 2006.
  26. Sato M, Nakahara K, Goto S, Kaiya H, Miyazato M, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Murakami N. Effects of ghrelin and des- acylghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 350: 598- 603, 2006.
  27. 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*, 147: 2306- 2314, 2006.
  28. Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Nakazato M, Date Y, Bowlus CL, Ishino Y, Watanabe E, Shiiya T, Ueno H, Hoshino H, Satoh K, Sugano K. Changes in plasma ghrelin levels, gastric ghrelin production, and body weight after *Helicobacter pylori* cure. *J Gastroenterol*, 41: 954- 961, 2006.
  29. Tanaka M, Nakahara T, Muranaga T, Kojima S, Yasuhara D, Ueno H, Nakazato M, Inui A. Ghrelin concentrations and cardiac vagal tone are decreased after pharmacologic and cognitive- behavioral treatment in patients with bulimia nervosa. *Horm Behav*, 50: 261- 265, 2006.
  30. Akamizu T. Susceptible genes of autoimmune thyroid disease. *J Kor Soc Endocrinol*, 21: 1- 10, 2006.
  31. Akamizu T, Kangawa K. Translational research on the clinical applications of ghrelin. *Endocr J*, 53: 585- 591, 2006.
  32. Kojima M, Kangawa K. Drug insight. The functions of ghrelin and its potential as a multitherapeutic hormone. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2: 80- 88, 2006.
  33. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Biological, physiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *J Pharmacol Sci*, 100: 398- 410, 2006.
  34. Matsuda K, Nishi Y, Okamatsu Y, Kojima M, Matsuishi T. Ghrelin and leptin: a link between obesity and allergy? *J Allergy Clin Immunol*, 117: 705- 706, 2006.
  35. Yabuki A, Taharaguchi S, Ichii O, Kojima M, Nishi Y, Mifune H, Kamimura R, Matsumoto M, Suzuki S. Immunohistochemical localization of ghrelin in rodent kidneys. *Histochem Cell Biol*, 126: 231- 238, 2006.
  36. Nagaya N, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth hormone- releasing peptide, in the treatment of cardiopulmonary- associated cachexia. *Intern Med*, 45: 127- 134, 2006.
  37. 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*, 147: 1333- 1342, 2006.
  38. Nagaya N, Kangawa K. Therapeutic potential of ghrelin in the treatment of heart failure. *Drugs*, 66: 439- 448, 2006.
  39. Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas EH, Toda K, Takahashi K, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul Pept*, 138: 141- 144, 2007.
  40. 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 Dom. Anim Endocrinol, 32: 93- 105, 2007.
42. Toshinai K, Mondal MS, Shimbara T, Yamaguchi H, Date Y, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin stimulates growth hormone secretion and food intake in aged rats. Mech Ageing Dev, 128: 182- 186, 2007.
43. Sato O, Ashizawa N, Ohtsuru A, Imanishi R, Kawano H, Seto S, Yamashita S, Shimokawa I, Yano K. Fibrotic response to angiotensin II is blunted in the kidney, but not in the heart, in insulin- sensitive long- lived transgenic dwarf rats. Int J Mol Med, 19: 23- 27, 2007.
44. Sato M, Nakahara K, Kojima K, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Regulation of GH secretagogue receptor (GHS- R) gene expression in the rat nodose ganglion. J Endocrinol, in press, 2007.
45. Nakahara T, Kojima S, Tanaka M, Yasuhara D, Harada T, Sagiyama KI, Muranaga T, Nagai N, Nakazato M, Nozoe SI, Naruo T, Inui A. Incomplete restoration of the secretion of ghrelin and PYY compared to insulin after food ingestion following weight gain in anorexia nervosa. J Psychiatr Res, in press, 2007.
46. Mitsutake N, Iwao A, Nagai K, Namba H, Ohtsuru A, Saenko V, Yamashita S. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem- like cells are enriched partly but not exclusively. Endocrinology, in press, 2007.
47. Izumo T, Ohtsuru A, Tokunaga Y, Namba H, Kaneda Y, Nagata I, Yamashita S. Epstein- Barr virus- based vector improves the tumor cell killing effect of pituitary tumor in HVJ- liposome- mediated transcriptional targeting suicide gene therapy. Intern J Oncol, in press, 2007.
2. 学会発表
1. 眞野あすか、大島久幸、関野あずさ、根本崇宏、芝崎 保：グレリンのエネルギー代謝調節機構における役割. 第 79 回 日本内分泌学会学術総会、神戸、2006.
  2. 村上 昇、中原桂子、井田隆徳、寒川賢治：グレリン分子の多様性と生理活性日本畜産学会. 第 106 回 大会企画シンポジウム、福岡、2006.
  3. 村上 昇、西郷みづほ、中村潤子、寒川賢治、中原桂子：ラットの胎児期過体重および幼児期過体重が成熟後の高脂肪食摂取による肥満に及ぼす影響. 第 142 回日本獣医学会、山口、2006.
  4. 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糖代謝を中心とした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 79 回 日本内分泌学会学術総会. 神戸、2006.
  5. 岩倉浩、赤水尚史、村山敏典、手良向聡、三浦和美、坂東委久代、五十子大雅、有安宏之、細田洋司、多田春江、松山晶子、小島伸介、和田泰三、若月芳雄、松林公蔵、河北俊子、清水章、福島雅典、横出正之、寒川賢治：健常高齢者ボランティアにおけるグレリン濃度の検討. 第 79 回 日本内分泌学会学術総会、神戸、2006.
  6. 五十子大雅、赤水尚史、細田洋司、岩倉浩、有安宏之、東條克能、田嶋尚子、寒川賢治：グレリンは新生児糖尿病ラットの糖尿病発症を阻止する. 第 49 回 日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2006.
  7. 児島将康：ニューロメジン U の新しい機能. 第 20 回 日本糖尿病動物研究会、東京、2006.
  8. 児島将康：Neuromedin U と摂食・肥満・炎症. 第 2 回 宮崎サイエンスキャンプ、宮崎、2006.
  9. 児島将康：Novel functions of appetite-regulating peptide. 第 83 回 日本生理学会、前橋、2006.
  10. 児島将康：神経ペプチド“ニューロメジン U”による免疫反応の制御. 第 10 回 多摩ア

- レルギー懇話会、東京、2006.
11. 児島将康：グレリンとニューロメジン U、2 つの摂食調節ペプチドの新しい機能. 第 79 回 日本内分泌学会学術総会、神戸、2006.
  12. 児島将康：グレリンによる摂食調節の分子機構. 北里大学獣医畜産学部ハイテク・リサーチ・センター報告会、三沢、2006.
  13. 児島将康：オーファン受容体を使った新しい生理活性ペプチドの探索 (グレリンを例として). 第 16 回 WS フォーラム、2006.
  14. 柴田英貴、市川辰樹、中尾一彦、本吉康英、藤本真澄、川下浩、宮明寿光、太津留晶、細田洋司、江口勝美：肝脂肪沈着における Ghrelin- GH axis の検討. 第 104 回 日本内科学会、大阪、2007.
  15. Goto S, Sato M, Nakahara K, Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N: Effects of ghrelin and des- acylghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord. 21 世紀 COE 国際シンポジウム, miyazaki, 2006.
  16. Irako T, Akamizu T, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Tojo K, Tajima N, Kangawa K: Effect of ghrelin on streptozotocin- treated newborn diabetic rats: ghrelin prevents development of diabetes at adult age in this model. The 66th annual meeting of American Diabetes Association. Washington DC, 2006.
  17. Kojima M: Hypothalamic ghrelin and its regulation. 2006 Seoul Symposium on Obesity and Diabetes, Seoul, 2006.
  18. Kojima M: Regulation of ghrelin production and secretion. The 7th Biennial Meeting of the Asian- Pacific Society for Neurochemistry, Singapore, 2006.
  19. Kojima M: Discovery of ghrelin and its impact on the basic and clinical research. The 16th International Symposium on Regulatory Peptides, Hakone, 2006.
  20. Kojima M: Regulation of Ghrelin Production and Secretion. The 32th Korean Diabetes Association, Gyeongju, 2006.
  21. Kojima M: The role of ghrelin in GH release

and appetite regulation. The 3rd International Congress of the GRS and the IGF Society, Kobe, 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

## グレリンの糖・脂質代謝における意義 － グレリンの肝臓グリコーゲン貯蔵促進効果－

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

グレリンの慢性投与における糖・脂質代謝に対する効果は未だ不明な点が多いが、臨床応用を行う上でも、グレリンが血糖値や血中脂質濃度にどのような影響を与えるか見極める必要がある。本研究では、ラットに対して約三ヶ月間グレリン（低用量；3  $\mu$ g/kg、中用量；30  $\mu$ g/kg、高用量；100  $\mu$ g/kg）の長期投与を行い、糖・脂質代謝に対する影響を検討した。グレリン中用量投与群において、血中コレステロールやトリグリセリド、リン脂質の有意な低下を認め、遊離脂肪酸は低下傾向にあった。また、グレリンによる肝グリコーゲンの貯蔵促進効果が認められた。一方、グレリン高用量投与群は体脂肪率の増加と血糖値の上昇を来した。これらの結果から、グレリンの慢性効果が糖・脂質代謝調節に与える影響が明らかとなり、臨床応用を行う際の投与量や投与期間などの決定に参考になるものと思われる。また、グレリンの肝グリコーゲンの貯蔵促進効果はこれまで知られておらず、摂食障害や肥満などのエネルギー代謝不均衡が引き起こす病態の解明に役立つものと思われる。

### A. 研究目的

グレリンは、主任研究者らが発見した摂食促進や成長ホルモン（GH）分泌刺激作用を持つ新規ホルモンである。これらの作用はヒトにおいても確認されており、摂食障害やカヘキシアに対する治療薬として期待されている（現在、臨床試験として進行中である）。一方、グレリンの糖・脂質代謝における効果については、未だ一定の見解が得られていない。その理由には、1) グレリンが強力に分泌を促進する GH は、その急性または慢性効果によってインスリン様もしくは抗インスリンと相反する作用を示す、2) グレリンの直接作用と、GH およびそれらに続く二次的な IGF-1 やインスリン、遊離脂肪酸などの代謝パラメーターを介した間接作用が混在する、3) グレリンは糖利用を促進し脂肪蓄積作用を有する、4) グレリンの血糖およびインスリン分泌に対する作用に関して意見が一致していない、などが挙げられる。今後グレリンの臨床応用を進めていく上でも、

糖・脂質代謝調節におけるグレリンの慢性効果は十分検討する必要がある。本研究においては、グレリンの長期投与による糖・脂質代謝に対する影響を検討した。

### B. 研究方法

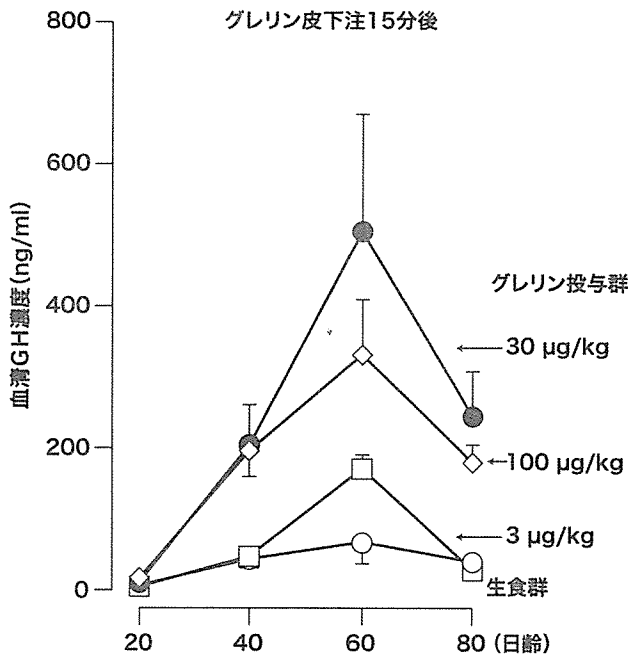
雄 Wistar ラットを用い、生後 3 日目から 90 日齢まで、1 日 1 回グレリンまたは生食の皮下投与を行った。グレリンは低用量（3  $\mu$ g/kg）、中用量（30  $\mu$ g/kg）、高用量（100  $\mu$ g/kg）の 3 群とした。生後 20、40、60、80 日齢にグレリンまたは生食皮下投与 15 分後に尾静脈より採血を行い、血清 GH 値を測定した。最終投与翌日に体重、体長（nose-tail length）、1 日摂食量、体脂肪率（DEXA 法）の測定を行い、成長への影響を評価した。また、血糖および血中脂質濃度も測定した。肝グリコーゲン貯蔵の検討を組織学的に PAS 染色を行い、生化学的に肝グリコーゲン量を測定し、評価した。

### C. 研究結果

#### 1) GH 分泌促進作用 (図 1)

グレリン長期投与時の GH 分泌反応性は、生後 20 日齢では生食投与群と各グレリン投与群との間に有意な差が認められなかったものの、40 日齢から 60 日齢まで経時的に上昇し、80 日齢には 40 日齢と同程度まで低下した。グレリン中用量 (30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) が GH 分泌を最も強く促進し、次いで高用量 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、低用量 (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) の順であった。

図 1 : グレリンの GH 分泌促進作用



#### 2) 成長促進作用 (図 2)

生食群に比べ、グレリン低用量・中用量投与群において 1 割程度の有意な体長の増大が認められたが、高用量群では有意な変化はみられなかった。一方、体重増加はグレリン投与群全てに認められたものの、各群には差がみられなかった。体脂肪率はグレリン高用量群のみに有意な上昇が認められた。1 日摂食量 (体重当たり) については、グレリン投与群と生食群の間に有意な差がみられなかった。

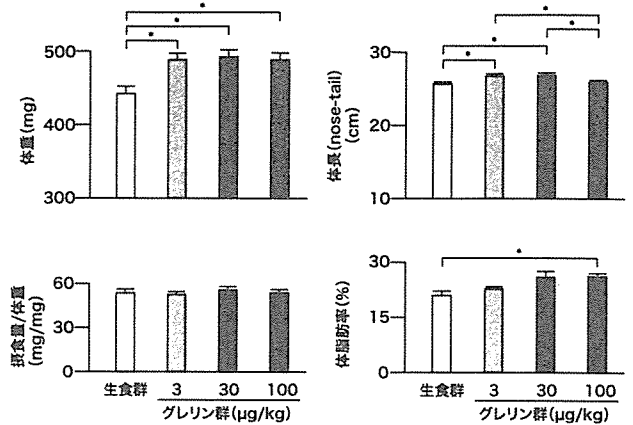


図 2 : 長期グレリン投与ラットにおける成長促進作用

#### 3) 血糖および血中脂質濃度に対するグレリンの効果 (表 1)

グレリンの中用量投与群は、生食群と比較して、総コレステロールやトリグリセリド、リン脂質の血中濃度に有意な低下が認められ、遊離脂肪酸は低下傾向がみられた。低用量や高用量のグレリン投与群においては有意な変化はみられなかった。低用量や中用量のグレリン投与群は血糖値に影響を与えなかったものの、高用量投与群では有意な血糖値の上昇が認められた。

表 1 : 長期グレリン投与ラットにおける血糖・脂質濃度

	生食群	グレリン投与群 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
		3	30	100
血糖 (mg/dL)	154.9 $\pm$ 4.1	149.8 $\pm$ 4.4	145.3 $\pm$ 4.0	175.1 $\pm$ 9.8*
総コレステロール (mg/dL)	62.7 $\pm$ 1.8	67.8 $\pm$ 3.6	52.7 $\pm$ 4.1*	63.1 $\pm$ 2.4
トリグリセリド (mg/dL)	229.2 $\pm$ 32.0	188.7 $\pm$ 14.4	150.9 $\pm$ 16.5*	193.9 $\pm$ 26.8
リン脂質 (mg/dL)	120.9 $\pm$ 6.0	117.4 $\pm$ 3.3	99.8 $\pm$ 5.9**	118.3 $\pm$ 4.7
遊離脂肪酸 (mEq/L)	308.8 $\pm$ 29.0	280.5 $\pm$ 15.7	252.7 $\pm$ 23.0	318.8 $\pm$ 19.9

mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. 生食群.

#### 4) 肝グリコーゲン貯蔵促進作用 (図 3)

正常群では、肝小葉において中心静脈を中心に

グリコーゲン貯蔵が認められ、グリッソン鞘周囲などの肝小葉辺縁ではグリコーゲン貯蔵はみられない。グレリン投与群では肝小葉全体にグリコーゲン貯蔵が認められた。脂肪滴などの脂肪蓄積はみられなかった。低用量や中用量のグレリン投与群において、肝グリコーゲン量の有意な増加を認めた。

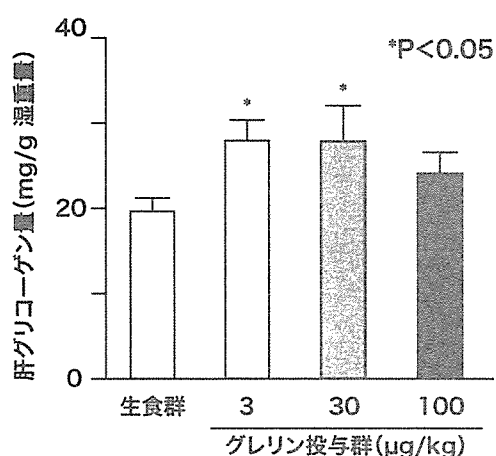


図3：長期グレリン投与によるラット肝グリコーゲンの変化

#### D. 考察

本研究の結果から、グレリン長期投与によってGH分泌促進や成長促進に加えて、1) コレステロールや中性脂肪などの血中脂質濃度が低下し、2) 肝グリコーゲンの貯蔵が促進されることが明らかとなった。グレリンにより分泌が促進されるGHそのものが、糖・脂質代謝に多様な作用を有することが知られている。今回の結果は、一部はGHを介した作用と考えられるが、これまで知られているGH作用と相反する効果も得られている。実際、GH欠損ラットにおいても、グレリンは肝臓での糖代謝調節酵素の遺伝子発現に影響を与える。グレリンは交感神経の抑制作用など自律神経系に対して特異的な作用を有し、自律神経系も糖・脂質代謝調節に関与している (Brain-adipose axis)。また、脂肪細胞におけるグレリンの直接作用として、糖利用促進作用や脂質代謝抑制効果も報告されている。グレリン、GHおよびそれらによって誘導される因子の二次的な作用も相まっており、今回得られた結果の作用機序を厳密に区

別することは困難である。

今回の結果は、今後グレリンの臨床応用を行う際に、投与量や投与期間などを決定する上でも参考になるものと思われる。グレリンの投与量をむやみに多くすれば良い効果が得られるというわけではなく、グレリンの過剰投与は肥満・脂肪蓄積を引き起こし、血糖値の上昇を来す恐れがある。これは、高用量グレリンの長期投与によるGH分泌のダウンレギュレーションによる可能性が考えられる。また、肝グリコーゲンの貯蔵促進効果はこれまで知られておらず、摂食障害や肥満などのエネルギー代謝不均衡が引き起こす病態の解明に役立つものと考えられる。

#### E. 結論

本研究の結果は、グレリンが新しいタイプのエネルギー代謝調節因子であり、摂食障害や肥満などの病態解明や治療に有用である可能性を示唆するものである。その詳細なメカニズムについては、今後さらなる検討が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Nishizawa T, Suzuki H, Nomoto Y, Masaoka T, Hosoda H, Mori M, Ohara T, Morishita T, Kangawa K, Hibi T. Enhanced plasma ghrelin levels in patients with functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther, Suppl 2*: 104- 110, 2006.
- ② Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes*, 55: 3486- 3493, 2006.
- ③ Doki Y, Takachi K, Ishikawa O, Miyashiro I, Sasaki Y, Ohigashi H, Nakajima H, Hosoda H, Kangawa K, Sasakuma F, Motoori M, Imaoka S. Ghrelin reduction after esophageal substitution and its correlation to postoperative body weight loss in esophageal cancer patients. *Surgery*, 139: 797- 805, 2006.
- ④ Takahashi H, Kurose Y, Kobayashi S, Sugino T, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y,

Terashima Y. Ghrelin enhances glucose-induced insulin secretion in scheduled meal-fed sheep. J Endocrinol, 189: 67- 75, 2006.

- ⑤Irako T, Akamizu T, Hosoda H, Iwakura H, Ariyasu H, Tojo K, Tajima N, Kangawa K. Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. Diabetologia, 49: 1264- 1273, 2006.
- ⑥Akamizu 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-I levels and bowel movement frequency and negatively with systolic blood pressure. J Endocrinol, 188: 333- 344, 2006.
- ⑦Takeda 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.
- ⑧Takachi 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.

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  
細田洋司（国立循環器病センター研究所）



## 肥満モデル、糖尿病モデルマウスにおけるグレリン応答性反応の検討

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

肥満状態では、成長ホルモン分泌が低下していることが知られている。グレリンは、強力な成長ホルモン分泌刺激作用を持ち、肥満状態の成長ホルモン分泌低下を改善する可能性がある一方、グレリンの持つ摂食刺激作用は、肥満をより悪化させる可能性もある。今回、グレリンに対する成長ホルモン反応および摂食反応を、肥満モデル、糖尿病モデルマウスにおいて検討した。db/db マウス、高脂肪食負荷マウス、Akita マウスの3種類のモデルマウスにおいて、グレリン投与に対する成長ホルモン反応は、それぞれの対照と比較して低下していた。db/db マウス、Akita マウスにおいて摂食は basal で亢進しており、グレリン負荷に対する摂食増加の程度は対照と比較して低下していた。db/db マウスおよび高脂肪食負荷マウスの下垂体で、GHS-R 遺伝子発現が低下しており、グレリン応答性成長ホルモン分泌反応の低下に一部関与している可能性が示唆された。高脂肪食負荷マウスに、グレリン、GHRH を共投与したところ、成長ホルモン反応は、グレリン単独投与に比べて増強された。生食あるいは、グレリン、GHRH を高脂肪食負荷マウスに、10 日間連続で共投与したところ、標準食負荷マウスでは、グレリン、GHRH 共投与群で、摂食が亢進傾向にあり、脂肪保持効果が認められたが、高脂肪食負荷マウスでは、グレリン、GHRH 共投与群で脂肪はより低下傾向にあった。標準食マウス、高脂肪食負荷マウスのいずれにおいても、グレリン、GHRH 共投与による IGF-1 上昇は認められず、除脂肪体重に有意な差は認められなかった。また、血糖、インスリン値にも生食投与群と比較して有意な差は認められなかった。以上の検討から、低用量のグレリンに GHRH を共投与することにより、摂食を亢進させることなく、肥満における成長ホルモン分泌低下状態を一部改善できる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

肥満者においては、成長ホルモン分泌が低下していることが知られている。グレリンは、その強力な成長ホルモン分泌刺激作用により、肥満状態における成長ホルモン分泌低下を改善する可能性がある一方、その摂食刺激作用により、肥満をより悪化させる可能性がある。今回、肥満モデル、糖尿病モデルマウスにおけるグレリン応答性成長ホルモン分泌および摂食反応を明らかにすることで、肥満状態での成長ホルモン分泌低下に対

するグレリン投与の可能性について検討した。

### B. 研究方法

モデルマウスとして、遺伝性の肥満モデルである 8 週齢雄性 db/db マウスおよび対照マウスを、食餌性の肥満モデルとして、C57BL/6J マウスに 5 週齢から 60%脂肪含有高脂肪食 (HFD) もしくは標準食を 20 週間負荷したマウス、肥満を伴わないインスリン分泌低下型糖尿病モデルとして、Akita マウスおよび対照マウスを用いた。

グレリン単回皮下注射 (40、120、360  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を行い、15 分後に採血し、血清成長ホルモン濃度の測定を行った。また、グレリン単回皮下注射後 1 時間の摂食量を検討した。

視床下部、下垂体におけるグレリン、成長ホルモン関連遺伝子の mRNA 発現を Taqman PCR 法により検討した。

最後に高脂肪食負荷マウスを用いて、10 日間生食もしくはグレリン 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  および GHRH60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を 1 日 2 回共投与し、投与前後で、体重、体脂肪量、除脂肪体重量、摂食量、血糖、インスリン、IGF-1 の変化について検討した。

(倫理面への配慮)

マウスは愛護的に扱い、実験操作やサクリファイスに際しては不必要な苦痛を与えないよう配慮した。

### C. 研究結果

8 週齢の db/db マウスは対照マウスと比較して、有意に高い体重 (control vs. db/db : 23.1  $\pm$  0.25 vs. 42.3  $\pm$  0.20g,  $P < 0.01$ )、血糖 (control vs. db/db : 100.7  $\pm$  6.0 vs. 328.0  $\pm$  10.9 mg/dl,  $P < 0.01$ )、血清インスリン濃度 (control vs. db/db : 1.35  $\pm$  0.5 vs. 25.9  $\pm$  5.7 ng/ml,  $P < 0.01$ )、血清 IGF-1 濃度 (control vs. db/db : 659.9  $\pm$  19.9 vs. 764.1  $\pm$  41.5 ng/ml,  $P < 0.05$ ) および血清 FFA 濃度 (control vs. db/db : 0.78  $\pm$  0.04 vs. 1.68  $\pm$  0.11 mEq/L,  $P < 0.01$ ) を示した。血漿グレリン濃度は有意に低い値を示した

(control vs. db/db : 98.4  $\pm$  5.6 vs. 34.7  $\pm$  8.6 fmol/ml,  $P < 0.01$ )。高脂肪食負荷マウスは、db/db マウスと同様に標準食負荷マウスと比較して、有意に高い体重 (control vs. HFD : 33.3  $\pm$  1.6 vs. 50.3  $\pm$  0.9 g,  $P < 0.01$ )、血糖 (control vs. HFD : 105.5  $\pm$  5.5 vs. 125.1  $\pm$  4.1 mg/dl,  $P < 0.01$ )、血清インスリン濃度 (control vs. HFD : 3.6  $\pm$  1.1 vs. 28.0  $\pm$  6.9 ng/ml,  $P < 0.01$ )、血清 IGF-1 濃度 (control vs. HFD : 301.8  $\pm$  21.6 vs. 426.6  $\pm$  20.0 ng/ml,  $P < 0.01$ ) を示した。血清 FFA 濃度は、対照と比較して有意な差は認められなかった (control vs. HFD : 1.26  $\pm$  0.10 vs. 1.18  $\pm$  0.04 mEq/L,  $P = 0.51$ )。血漿グレリン濃度は、対照と比較して有意に低い値を呈した (control vs. HFD : 164.9  $\pm$  7.5 vs. 67.2  $\pm$  10.6 fmol/ml,  $P < 0.01$ )。8 週齢の Akita マウスは、同様に、

対照マウスと比較して、血糖値は有意に高い値を呈したが (control vs. Akita : 125.9  $\pm$  4.2 vs. 475.3  $\pm$  16.8 mg/dl,  $P < 0.01$ )、体重 (control vs. Akita : 24.6  $\pm$  0.5 vs. 23.1  $\pm$  0.5 g,  $P < 0.01$ )、血清インスリン濃度 (control vs. Akita : 0.25  $\pm$  0.00 vs. 1.42  $\pm$  0.06 ng/ml,  $P < 0.01$ ) は、有意に低い値を示し、血漿グレリン濃度 (control vs. Akita : 113.4  $\pm$  11.8 vs. 182.7  $\pm$  18.1 fmol/ml,  $P < 0.01$ ) は高い値を示した。血清 IGF-1 濃度 (control vs. Akita : 415.8  $\pm$  17.9 vs. 416.4  $\pm$  21.4 ng/ml,  $P = 0.98$ )、血清 FFA 濃度 (control vs. Akita : 1.20  $\pm$  0.01 vs. 1.24  $\pm$  0.05 mEq/L,  $P = 0.53$ ) に有意な差は認められなかった。

グレリン応答性成長ホルモン反応は、db/db (control vs. ghrelin : 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 140.6  $\pm$  34.4 vs. 7.6  $\pm$  1.8 ng/ml,  $P < 0.01$ , 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 196.1  $\pm$  62.7 vs. 16.6  $\pm$  3.8 ng/ml,  $P < 0.01$ , 360  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 213.1  $\pm$  55.5 vs. 27.5  $\pm$  5.5 ng/ml,  $P < 0.01$ )、高脂肪食負荷 (control vs. HFD : 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 60.5  $\pm$  24.4 vs. 8.8  $\pm$  1.4 ng/ml,  $P < 0.01$ , 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 115.0  $\pm$  29.3 vs. 41.1  $\pm$  11.6 ng/ml,  $P < 0.01$ , 360  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 279.1  $\pm$  25.0 vs. 92.5  $\pm$  5.2 ng/ml,  $P < 0.01$ )、Akita マウス (control vs. Akita : 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 25.8  $\pm$  6.4 vs. 29.0  $\pm$  10.3 ng/ml,  $P = 0.2$ , 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 122.5  $\pm$  26.5 vs. 28.0  $\pm$  2.6 ng/ml,  $P < 0.01$ , 360  $\mu\text{g}/\text{kg}$  : 190.9  $\pm$  27.4 vs. 89.9  $\pm$  17.4 ng/ml,  $P < 0.01$ ) のいずれにおいても、対照と比較して著明に低下していた。

db/db マウス、高脂肪食負荷マウスの下垂体においては、グレリン受容体 (GHS-R) の mRNA 発現が低下しており (db/db : 対照の 47.0  $\pm$  8.6%,  $P < 0.01$ , HFD : 対照の 56.0  $\pm$  4.3%,  $P < 0.05$ )、グレリン応答性成長ホルモン分泌反応の低下に一部関与している可能性が示唆された。

db/db マウスの摂食量は basal から亢進しており (control vs. db/db : 0.07  $\pm$  0.02 vs. 0.22  $\pm$  0.05g,  $P < 0.05$ )、低用量 (40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) のグレリン投与では、摂食量の増加は認められなかった (生食 vs. グレリン : 0.30  $\pm$  0.11 vs. 0.18  $\pm$  0.04 g,  $P = 0.30$ )。高用量 (360  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) のグレリン負荷では、摂食量の増加が認められたが (生食 vs. グレリン : 0.14  $\pm$  0.08 vs. 0.39  $\pm$  0.04 g,  $P < 0.05$ )、増加の程度は対照と比較して低下していた (control vs. db/db : 生食投与群の 4.3  $\pm$  0.8 vs. 2.0  $\pm$  0.2 倍,  $P <$

0.05)。Akita マウスでは、摂食は basal で充進しており (control vs. Akita :  $0.15 \pm 0.02$  vs.  $0.28 \pm 0.01$ g,  $P < 0.05$ )、グレリン負荷による摂食増加は認められなかった。

高脂肪食負荷マウスに、グレリンおよび GHRH の単回共投与を行ったところ、グレリン単独投与に比べて、成長ホルモン反応は増強された (グレリン vs. グレリン+GHRH :  $11.7 \pm 0.2$  vs.  $31.1 \pm 9.4$  ng/ml,  $P < 0.05$ )。グレリンの摂食刺激作用を最小限にとどめながら、成長ホルモン分泌刺激作用を最大限に発揮させるため、生食あるいは、グレリン、GHRH の共投与を高脂肪食負荷マウスに 10 日間連続行い、その影響を検討した。標準食負荷マウス、高脂肪食負荷マウスの生食投与群およびグレリン投与群のいずれにおいても、投与のストレスからか、体重は軽度低下した (control : 生食 vs. グレリン、GHRH : 投与前体重の  $91.5 \pm 1.5$  vs.  $93.1 \pm 1.0\%$ ,  $P = 0.29$ , HFD : 生食 vs. グレリン、GHRH : 投与前体重の  $91.4 \pm 1.0$  vs.  $91.1 \pm 1.6\%$ ,  $P = 0.91$ )。標準食負荷マウスでは、グレリン、GHRH 共投与群で、生食投与群と比較して、摂食が充進傾向にあり (生食 vs. グレリン、GHRH :  $109.2 \pm 2.5$  vs.  $121.0 \pm 8.9$  kcal/週,  $P = 0.27$ )、脂肪保持効果が認められた (生食 vs. グレリン、GHRH : 投与前の  $61.6 \pm 3.1$  vs.  $71.3 \pm 3.0\%$ ,  $P < 0.05$ )。高脂肪食マウスでは、グレリン、GHRH 共投与群で体脂肪量は生食群よりもむしろ低下する傾向にあった (生食 vs. グレリン、GHRH : 投与前の  $94.2 \pm 3.2$  vs.  $85.7 \pm 6.9\%$ ,  $P = 0.36$ )。標準食負荷マウス、高脂肪食負荷マウスのいずれにおいても、グレリン、GHRH 共投与による IGF-1 上昇は認められず (control : 生食 vs. グレリン、GHRH :  $277.4 \pm 19.9$  vs.  $268.6 \pm 21.6$  ng/ml,  $P = 0.77$ , HFD : 生食 vs. グレリン、GHRH :  $528.5 \pm 67.5$  vs.  $439.9 \pm 60.8$  ng/ml,  $P = 0.36$ )、除脂肪体重に有意な差は認められなかった (control : 生食 vs. グレリン、GHRH : 投与前の  $98.3 \pm 2.4$  vs.  $100.9 \pm 3.5\%$ ,  $P = 0.58$ , HFD : 生食 vs. グレリン、GHRH : 投与前体重の  $90.0 \pm 0.7$  vs.  $91.6 \pm 2.5\%$ ,  $P = 0.61$ )。また、血糖 (control : 生食 vs. グレリン、GHRH :  $106.6 \pm 4.9$  vs.  $106.5 \pm 6.7$  mg/dl,  $P = 0.50$ , HFD : 生食 vs. グレリン、GHRH :  $116.2 \pm 10.7$  vs.  $92.3 \pm 8.1$  mg/dl,  $P = 0.99$ )、インスリン値 (control :

生食 vs. グレリン、GHRH :  $2.6 \pm 0.32$  vs.  $2.3 \pm 0.27$  ng/ml,  $P = 0.45$ , HFD : 生食 vs. グレリン、GHRH :  $6.9 \pm 1.3$  vs.  $8.8 \pm 2.0$  ng/ml,  $P = 0.45$ ) にも生食投与群と比較して有意な差は認められなかった。

#### D. 考察

グレリン投与に対する成長ホルモン分泌反応、摂食反応は、肥満マウス、糖尿病マウスにおいて低下していた。肥満マウスにおいては、これまでの報告にあるように、血清 IGF-1 の高値、FFA の高値などが成長ホルモン分泌を低下させていることに加えて、下垂体グレリン受容体発現の低下が、成長ホルモン反応の低下に関与している可能性が示唆された。

高脂肪食マウスへの低用量のグレリン、GHRH 慢性共投与では、グレリンに対する摂食反応の低下と、GHRH 共投与による成長ホルモン分泌反応の増強により、グレリン投与で体脂肪の蓄積は認められず、むしろ低下傾向となったと考えられた。

#### E. 結論

肥満、糖尿病マウスでは、グレリン応答性成長ホルモン、摂食反応は低下していた。低用量のグレリンに GHRH を共投与することにより、摂食を充進させることなく、肥満における成長ホルモン分泌低下状態を改善できる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

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

なし