

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

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・血液腫瘍内科学教室 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である Atrogin-1 および MuRF1 の発現が増加し、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。我々はすでにグレリンおよびグレリン受容体作動薬 GHRP-2 が Atrogin-1、MuRF1 発現を抑制することを見いだしたが、組織学的検索では GHRP-2 が高用量デキサメサゾン（600 μ g/kg/日、腹腔内5日間投与）により惹起される筋萎縮を抑制するという成績は得られなかった。今回、低用量デキサメサゾン（100 μ g/kg/日、腹腔内5日間投与）により生じる筋萎縮に対する GHRP-2 の効果を6週齢のSD系雄ラットで検討した。また、低用量デキサメサゾン投与により引き起される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。2つの実験系いずれにおいても GHRP-2 は筋萎縮に影響を及ぼさなかった。細胞内シグナルを調べたところ、GHRP-2 は、インスリン/IGF-I と異なり、ラットヒラメ筋において蛋白合成に関与する Akt、S6 kinase のリン酸化を亢進しなかった。S6 kinase 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を抑制する方向に進めるものの、S6 kinase 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推測された。

A. 研究目的

神経切断、不働、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。昨年我々は、グレリンおよびグレリン受容体作動薬が、ラットヒラメ筋においてデキサメサゾン誘導性筋萎縮で亢進する

Atrogin-1、MuRF1 発現を抑制することを見だし報告した。しかし、筋の組織学的検討では、筋萎縮抑制効果を確認できなかった。その実験では、極めて大量のデキサメサゾン（600 μ g/kg/日）を使用し筋萎縮を作成しているため、グレリン、グレリン受容体作動薬の効果が見いだせなかった可能性も否定できない。そこで今回、デキサメサゾン量を減らし、臨床的に使用されているデキサメサゾン量に近い量を使用し、グレリン受容体作動薬の効果を検討した。また、デキサメサゾンで筋萎縮を起こしたのち、それが回復する過程に及ぼすグレリン受容体作動薬の効果を検討した。

B. 研究方法

1) 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(100 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。

2) デキサメサゾン誘導性筋萎縮の回復過程に及ぼすGHRP-2の効果

6週齢のSD系雄ラットに、デキサメサゾン投与(100 μ g/kg/日、腹腔内)を5日間おこなった。6日目より2週間にわたってGHRP-2(200 μ g/kg/日)、あるいは対照としての生理的食塩水を連日皮下投与した。デキサメサゾン投与直後、GHRP-2投与開始後1週、2週の時点で屠殺、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。

3) グレリン受容体作動薬GHRP-2のインスリンシグナルに及ぼす効果

6週齢のSD系雄ラットに(a)対照としての生理的食塩水、(b)インスリン(10U/kg)、(c)GHRP-2(5mg/kg)の投与を行なった。30分後にそれぞれの処置をしたラットからヒラメ筋を摘出し、ホモジナイズし筋粗抽出液を得た。1レーンあたり60mgの蛋白を含む筋粗抽出液を使用しSDS-PAGEを行なった。PVDFメンブレンに転写した後、Akt抗体(BD #610860)リン酸化Akt抗体(Cell signaling #9271)、S6 kinase抗体(Santa Cruz #sc-230)、リン酸化S6 kinase抗体(Cell signaling #9206)を使用しウェスタンブロットを行ない、Akt、S6 kinaseのリン酸化について調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては学内規定を遵守して、動物愛護に留意し、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) 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100 μ g/kg/日の投与により有意に減少した。

しかし、その減少度はデキサメサゾン600 μ g/kg/日の投与での成績に比べ小さいものであった。

GHRP-2単独投与時は筋線維断面積に影響しなかった。また、GHRP-2は、デキサメサゾン100 μ g/kg/日の投与により誘導された筋線維断面積の減少にも影響を与えなかった。

2) デキサメサゾン誘導性筋萎縮の回復過程に及ぼすGHRP-2の効果

予備実験で、5日間のデキサメサゾン投与(100 μ g/kg/日)腹腔内投与により生じた筋萎縮は投与中止2週間後にはほぼ回復するという成績を得ていたため、デキサメサゾン投与中止直後、1、2週間後の時点を選択し、組織所見を解析した。いずれの時点においても、GHRP-2投与群のヒラメ筋断面積は、生理的食塩水を投与した対照群と比較し、有意な差異を示さなかった。

3) グレリン受容体作動薬GHRP-2のインスリンシグナルに及ぼす効果

インスリン投与により、ラットヒラメ筋においてAkt、S6 kinaseのリン酸化がそれぞれ約4倍、8倍に増加した。一方、GHRP-2投与では、Akt、S6 kinaseのリン酸化は亢進せず、むしろ減少傾向にあった。インスリン、GHRP-2刺激により総Akt、S6 kinase量に変動を認めなかった。

D. 考察

グレリン、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の基礎発現を抑制することを我々はすでに報告した。また、この効果は、GH/IGF-Iの分泌亢進によるものではなく、筋肉への直接作用であることをも報告した。しかしながら、デキサメサゾン誘導性筋萎縮におよぼすGHRP-2の効果を組織学的に検討したところ、ラットヒラメ筋の筋線維断面積は、デキサメサゾン600 μ g/kg/日の投与により処置により減少したが、GHRP-2の同時投与によって回復せず、グレリン受容体作動薬が筋萎縮抑制に意義を有するか確認できなかった。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が、使用したデキサメサゾン量が大量であるため、GHRP-2の効果をマスクし

てしまっている可能性も除外できなかった。

最近、100 μ g/kg/日という比較的少量のデキサメサゾンでも筋萎縮が作成できるとの報告があり、今回はデキサメサゾン投与量を減少させて同様の実験を行なった。このデキサメサゾン量は治療目的で使用される比較的少量の副腎皮質ステロイドホルモン量に匹敵する量と考えられるが、このデキサメサゾン量により惹起される筋萎縮に対しても同時に投与したGHRP-2は筋萎縮抑制効果を示さなかった。また、デキサメサゾン中止後の筋萎縮の回復にもGHRP-2は影響を与えなかった。

筋萎縮は、筋蛋白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かかわらず、筋萎縮抑制が確認されなかった理由として、蛋白合成系が十分に亢進していない可能性を考えた。蛋白合成の促進にはS6 kinaseの活性化が大きな役割を果たしている。インスリンやIGF-IはPI3kinase-Akt系を活性化した結果、S6 kinaseのリン酸化を起し、蛋白合成を活性化すると報告されている。今回、ラットヒラメ筋におけるAkt、S6 kinaseのリン酸化を検討したが、対照としたインスリンと異なって全くこれらのリン酸化を促進せず、グレリン受容体刺激は蛋白合成系を活性化しないことが推測された。我々は、肝細胞培養系で、グレリンが、インスリン、IGF-Iと同様にPI3キナーゼは活性化するものの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。筋においてもグレリン刺激はこの系を活性化しないと考えられた。

本実験条件下ではGHRP-2は筋萎縮を抑制しないが、GHRP-2が全く筋萎縮に影響しないとは必ずしも断定できない。たとえば、高齢ラットでは異なった成績が得る可能性や、蛋白合成系を活性化する物質と同時に処置することによって筋萎縮が改善する可能性も否定できない。この点はさらに検討される必要があろう。

E. 結論

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考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①Yoshioka 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.
- ②Kaji 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.
- ③Kaji 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.
- ④Takahashi 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.
- ⑤Chihara 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.
- ⑥Kaji 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.
- ⑦Tobimatsu T, Kaji H, Sowa H, Naito J, Canaff L, Geoffrey NH, Sugimoto T, Chihara K. Parathyroid hormone increases β -catenin levels through smad3 in mouse osteoblastic cells.

- Endocrinology, 147: 2583- 2590, 2006.
- ⑧Kaji 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.
- ⑨Chihara 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.
- ⑩Suzukamo 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.
- ⑪Kaji 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.
- ⑫Miyauchi 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.
- ⑬Imanaka 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.
- ⑭Ito 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.
- ⑮Chihara 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.
- ⑯Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas E. H, 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.
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
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）

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

分担研究者 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

投与実験によりグレリンの脂肪蓄積作用が明らかになっているが、内因性グレリンの体脂肪代謝調節機序における役割についての詳細は不明である。我々はグレリン受容体発現抑制トランスジェニック (Tg) ラットの体脂肪が減少していること、対照ラットで認められるグレリンの脳室内投与による褐色脂肪組織 (BAT) 内のノルアドレナリン (NA) の分泌抑制が本 Tg ラットでは認められないことを明らかにし、グレリンは BAT への交感神経入力を抑制することにより脂肪蓄積をもたらす可能性を示している。今年度は対照ラットへのグレリンの静脈内投与でも BAT 内の NA 分泌が減少し、この減少は迷走神経節のグレリン受容体発現が低下している Tg ラットでは認められないこと、さらに対照ラットの迷走神経切除によりこの抑制作用は消失することを明らかにし、迷走神経を介した末梢グレリンの BAT の機能抑制経路の存在の可能性を示した。一方で弓状核、室傍核へのグレリン微量注入により BAT の NA 分泌が減少したことから、BAT の交感神経入力に関与する視床下部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明らかになった。

A. 研究目的

グレリンの投与は摂食促進作用に加え、脂肪蓄積作用を示す。グレリンによる脂肪蓄積作用には白色脂肪細胞の分化促進と脂肪燃焼抑制が示唆されている。我々はグレリンの脳室内投与により褐色脂肪組織 (BAT) のノルアドレナリン (NA) の分泌が抑制されることを明らかにしている。我々が tyrosine hydroxylase (TH) のプロモーターの下流にグレリン受容体 (GHS-R) アンチセンスを導入した遺伝子を用いて作成した GHS-R 発現抑制 Tg ラットでは、普通食摂取下での BAT の UCP1 発現量の増加、酸素消費量、二酸化炭素産生量の増大、体温上昇、高脂肪食負荷時の脂肪蓄積の抑制が認められていることから、エネルギー消費の促進により脂肪蓄積が抑制されている可能性が示唆される。我々は Tg ラットの導入遺伝子である GHS-R アンチセンスが迷走神経節の TH 細胞に発現し、同ラットの迷走神経節における GHS-R の mRNA およびタンパク質の発現量が減

少していることを明らかにし、迷走神経節の GHS-R 発現の低下も Tg ラットのエネルギー消費促進に関与している可能性、更には迷走神経節が末梢グレリンによるエネルギー代謝調節に関与している可能性を示唆してきた。しかしながらグレリンの投与によるエネルギー代謝調節作用について、また、エネルギー代謝調節における内因性のグレリンの役割についての詳細は解明されていない。本研究では BAT の NA 分泌に対する末梢および中枢でのグレリンの作用機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

麻酔下で 8 週齢の slc : SD ラット (対照ラット) と Tg ラットの褐色脂肪組織内にマイクロダイアリシス用プローブを刺入し、リングル液にて灌流し、無麻酔無拘束下で 20 分毎に回収されたサンプル中の NA 分泌を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。安定した基礎分泌を 3 回測定した後

にグレリンの投与を行った。

1) グレリン静脈内投与と迷走神経切除

頸静脈内に留置したカニューレを介して生理食塩水 500ml、グレリン 20mg/500ml または 100mg/500ml を投与し BAT の NA 分泌の変化を解析した。迷走神経切除群は対照ラットの横隔膜直下にて迷走神経を全切除し、1 週間の回復期を設けた後に実験に用いた。開腹後、迷走神経を露出するのみで切除を行わない群を sham 群として用いた。

2) 中枢神経系におけるグレリンの交感神経刺激作用部位の特定

Paxinos and Watson のラット脳地図に従い挿入したカニューレを介して弓状核および室傍核内にグレリン 0.16 μ g/0.5 μ l/5min を局所投与し、BAT の NA 分泌の変化を解析した。実験終了時にカニューレに色素を注入してホルマリンにて灌流固定した脳の切片により刺入部位を確認し、弓状核および室傍核に刺入部位が認められたラットのみを統計学的処理に用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験に際してはその愛護に留意し、投与実験や屠殺の際に苦痛を最小限にとどめるように十分に配慮した。

C. 研究結果

1) グレリン静脈内投与と迷走神経切除

グレリン 20mg の静脈内投与では NA 分泌に有意な変化は認められなかった。しかしながら 100mg のグレリンの静脈内投与は、投与 20 分後には NA を基礎分泌の 75% までに有意に抑制した。Tg ラットへの 100mg のグレリンの静脈内投与は、NA 分泌に有意な抑制をもたらさなかった。

Sham 群ではグレリン 100mg の投与により 20 分後に NA 分泌が有意に抑制された。迷走神経切除ラットではグレリン 100mg の静脈内投与による NA 分泌抑制は認められなかった。Sham 群、迷走神経切除群ともに生理食塩水の投与では BAT の NA 分泌に変化は認められなかった。

2) 中枢神経系におけるグレリンの交感神経刺激作用部位の特定

弓状核にグレリンを投与すると投与直後に NA 分泌は有意に抑制され 1 時間後には基礎分泌のレベルまで回復した。視床下部室傍核にグレリンを

投与すると投与直後に NA 分泌は有意に抑制された。静脈内投与による抑制と比較すると抑制の開始は速やかであった。

D. 考察

対照ラットにおいてグレリン 100mg の静脈内投与により BAT の NA 分泌は抑制され、この抑制は Tg ラットでは認められなかった。さらに迷走神経切除ラットにおいてグレリンの BAT における NA 分泌抑制作用が認められなかったことから、末梢グレリンの情報が迷走神経を介して中枢神経系に伝わり、中枢から BAT への交感神経の NA 分泌を抑制する経路が存在する可能性が示唆された。Tg ラットでは中枢神経系でのグレリンの作用に加え、迷走神経を介した求心性入力も抑制されているために、グレリンによる NA の分泌抑制が阻害されていると考えられた。

視床下部の弓状核または室傍核へのグレリンの微量注入投与により BAT の NA 分泌は抑制された。これらの神経核へのグレリンの投与により摂食が促進し、呼吸商が増加することも報告されている。グレリンの脳室内投与による NA 分泌抑制は、少なくとも一部はこれらの神経核に存在する GHS-R を介している可能性が示唆された。

E. 結論

中枢神経系内および迷走神経節の GHS-R は褐色脂肪組織の機能調節において重要な役割を担っている可能性が示された。末梢グレリンの迷走神経-視床下部を介した BAT の機能を調節する経路が存在す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

- ①Mano- 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.

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

眞野あすか（日本医科大学生理学第二）

大島 久幸（日本医科大学生理学第二）

根本 崇宏（日本医科大学生理学第二）

ラット迷走神経節中のグレリン受容体 GHS-R の調節機構

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

グレリン受容体 GHS-R が迷走神経節中の知覚神経で合成され、軸索輸送で神経終末に輸送された後、グレリンと結合することが示されている。本研究ではこの GHS-R の合成調節機構について検討した。自由摂食ラットの迷走神経節中 GHS-R mRNA の発現量には明期に高く、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。迷走神経切除は同側の迷走神経節 GHS-R mRNA の発現量を減少させた。また、消化管ホルモンのコレシストキニンやガストリンの投与により、GHS-R mRNA 発現量は有意に変化した。以上の結果は、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事を示しており、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る。

A. 研究目的

末梢の消化管ホルモンによる摂食の促進や摂食の抑制は、一般的には神経性あるいは液性に中枢へ伝達されると考えられる。2004年に Woodsらは、神経性伝達には迷走神経による求心性伝達があり、弧束核を経由して視床下部に伝えられることを提唱した。Dateらは迷走神経節にグレリン受容体 GHS-R が存在すること、また、その GHS-R は軸索輸送により、神経終末へ運ばれることを免疫組織学的あるいはオートラジオグラフィにより証明した。事実、頸部迷走神経の切断はグレリンの末梢投与による摂食亢進作用を阻止した。その後、迷走神経節中には種々の消化管ホルモンの受容体、例えばコレシストキニン、レプチン、オレキシンあるいはニューロペプチド YY などの受容体が認められている。しかしながら、これらのホルモン受容体の合成が何らかの機序で調節されているのか、されているとすればどのような調節系が存在するのかについては殆ど明らかにされていない。

そこで本研究では、迷走神経節中の GHS-R mRNA の発現量に影響する因子を探索し、GHS-R の合成調節機構の有無を検討した。グレリン受容

体には GHS-R1a と GHS-R1b が存在するが、グレリンの結合は GHS-R1a のみであり、そのため本研究では GHS-R1a に特異的な mRNA の発現を調べた。

B. 研究方法

1) 動物

研究室で飼育している Wistar ラット 9 週齢の雄を用いた。すべての動物は 12 時間明：12 時間暗（7 時点灯、19 時消灯）の明暗条件下で飼育し、特別の実験を除いては自由摂食とした。

2) 実験計画

実験 1：迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現の日内変動の有無を調べるために、自由摂食ラットを 9 時から 24 時間、4 時間間隔で屠殺し、迷走神経を摘出して GHS-R mRNA 発現を調べた。

実験 2：絶食および再給餌の GHS-R mRNA におよぼす影響を調べるため、ラットを 11 時から 24 時間絶食した群、絶食後 2 時間給餌した群、および自由摂食群の 3 群を作り、それぞれの迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現量を調べた。

実験 3 : 頸部迷走神経切断が迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現に影響を与えるか否かを調べるため、左側の頸部迷走神経を切断し、12 時間および 24 時間後に左右の迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現量を調べた。

実験 4 : 消化管ホルモンの GHS-R mRNA 発現への影響を調べるため、コレシストキニン、ガストリン、ソマトスタチンおよびグレリンを末梢投与し、2 時間および 4 時間後に迷走神経節を取り出し GHS-R mRNA の発現量を調べた。

3) GHS-R mRNA の定量

迷走神経節を摘出し mRNA を抽出した。GHS-R mRNA の発現量はリアルタイム PCR で測定した。用いたプローブは GHS- R1a ; 5'- TGAAGATGC TTGCTGTGGTGGTGT- 3'、GAPDH ; 5'- GAAAC CCATCACCATCTCCAGGAG- 3'、18s ribosomal RNA ; 5'- TGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG- 3'、である。

4) ガストリンのグレリン分泌に及ぼす影響

先の実験 4 においてガストリンが GHS-R mRNA 発現に対して有意な変化を起こしたことから、この時にグレリンの分泌が変化しているか否かを調べた。ラットをアプロチニンで麻酔し、胃静脈に P10 チューブを装着し、ガストリン投与 30 分前から 15 分間隔で採血した。採血中はラットを 37 度の保温マットで包み、体温低下を防止した。血中のグレリンは市販の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) 日内変動

迷走神経節中の GHS-R mRNA は明期に高く暗期に低い日内変動を示した。明期では 5 時から 13 時まで増加し、13 時をピークに減少した。増加の開始と減少の開始は点灯 2 時間前と消灯 2 時間前に見られた。またこのリズムは胃内容物の重量の

日内リズムと 90 度の位相角差を生じ、胃内容物のリズムと並行に 4 時間遅れで変動した。

2) 絶食と再給餌の影響

24 時間の絶食により迷走神経節中の GHS-R mRNA の発現量は約 2 倍に増加したが有意な差は認められなかった。しかし、絶食後に 2 時間の再給餌を行うと、さらに増加し、有意な増加が認められた。この有意差はインターナルコントロールを GAPDH から 18s に変えても認められた。

3) 頸部迷走神経切除の影響

頸部迷走神経切段が迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現に影響を与えるか否かを調べた。左側の頸部迷走神経を切断すると、24 時間後には左側の迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現量のみが有意に減少した。

4) 消化管ホルモンの影響

コレシストキニンとガストリンの投与により迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現量に変化が認められたが、その影響は投与後の時間により異なった。すなわち、投与 2 時間後では GHS-R mRNA の発現量の有意な増加を起こした、投与 4 時間後には有意な減少を引き起こした。一方、グレリンおよびソマトスタチン投与は迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現には影響しなかった。ガストリンの投与は、胃静脈血中のグレリンの濃度を一過的に増加させた。この増加は投与 30 分後から認められ、約 30 分間継続した。

D. 考察

これまでに GHS-R mRNA の発現に対する研究では、以下の報告がある。下垂体の GHS-R mRNA 発現量がグルココルチコイドや甲状腺ホルモンによって増加すること、また弓状核の GHS-R mRNA がグレリンによって増加しレプチンの投与によって減少することである。しかし、迷走神経節中の GHS-R mRNA についての制御機構は全く不明であった。今回の研究において、まず迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現に日内リズムが認められることが判明した。このリズムは胃内容物の日内リズムの位相に相関が認められたことから、胃の伸展情報が中枢へ伝達され、その情報を視交叉上核が受け取り、GHS-R mRNA のリズムを形成していると思われる。しかし、迷走神経節

の知覚神経に、神経入力があるのかどうかは疑わしいところであり、今後の検討を待たなければならない。

グレリンは空腹時に分泌される空腹情報ホルモンであり、このことから迷走神経節中の GHS-R mRNA の発現は絶食によって上昇すると期待された。しかし、有意な増加は認められず、むしろ、絶食後の再給餌によって有意な増加が起こった。この増加はコレシストキニンに関係しているように思われた。なぜなら、コレシストキニンはグレリンと逆に、摂食抑制ホルモンであり、空腹によって分泌が減少し食後に増加する。また、コレシストキニン投与は2時間後に有意な GHS-R mRNA 発現量の増加を起こしたからである。

今回の研究では、頸部迷走神経の片側切断が GHS-R mRNA の発現量を変化させることを示した。興味深いことに、切断側のみの迷走神経節の GHS-R mRNA が減少した。この理由は明らかではないが、迷走神経節中の GHS-R mRNA が迷走神経の求心性神経情報に影響される事を示すものと思われる。

ガストリンやコレシストキニンは迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現量を変化させたが、その変化は投与後の時間経過で異なった。この相違については明らかでないが、これらのホルモンが迷走神経終末から作用したのか、あるいは中枢から作用したのかは興味深い謎である。一方、グレリンの投与は影響を与えなかったことから、グレリンによるフィードバック制御は無いのかも知れない。ガストリンは迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現量のみならず、グレリンの分泌も増加させた。また以前我々はコレシストキニンがグレリンの分泌を増加させることを報告しており、これらのホルモンはグレリンとグレリン受容体の両者に影響を及ぼすと言える。

今回の研究により迷走神経節中の GHS-R mRNA 発現が種々の因子によって調節されていることが示された。このことは、グレリンや他の摂食関連ペプチドの末梢からの摂食促進や抑制作用が、単にそれらのホルモンの分泌量のみの変動で調節されるものではなく、その受容体の調節を含めて制御されていることを示唆するものである。

E. 結論

本研究ではグレリンの受容体である GHS-R の迷走神経節での合成が様々な因子で調節されていることを示した。この調節がグレリンの摂食促進作用にどのように関わっているかは不明であるが、少なくとも、グレリンの摂食亢進作用が、単にグレリンの分泌変動のみならず受容体の発現量の変動でも制御されている可能性を示すものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② 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.
- ③ 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.
- ④ 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.

2. 学会発表

- ① 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。
- ② 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.

- ③Goto 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、宮崎、2006.

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

グレリンの生理作用発現における脂肪酸修飾の検討

分担研究者 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

グレリンは3番目のセリン残基が8個の脂肪酸によりアシル化修飾された構造を有する。今回我々は脂肪酸アシル基の鎖長を変えたグレリン誘導体を用い、グレリンの生理作用と脂肪酸修飾との関連を検討した。脂肪酸鎖長が0個（C0）、4個（C4）、8個（C8）の各種グレリン誘導体を、ラット視床下部の室傍核、外側野、弓状核に微量投与し、摂餌量を測定した。また、ラットおよび遺伝的にグレリン受容体を欠いた GHS-R KO マウスにグレリン誘導体を中枢または末梢投与し、摂餌量と成長ホルモン（GH）分泌を測定した。

脳室内投与において、脂肪酸鎖長の伸長に伴った摂餌量の増加が認められたが、GHS-R KO マウスでは C4、C8 による摂食亢進作用は認められなかった。C8 投与時のみ GH 分泌が促進した。視床下部の微量投与では、室傍核、外側野、弓状核の全ての領域で C8 投与による摂食亢進作用を認められたが、C0、C4 では弓状核への投与のみ摂食が亢進した。グレリンおよび脂肪酸アシル基の鎖長を変えたグレリン誘導体は、弓状核のグレリン受容体を介して摂食亢進をきたすことが明らかとなった。また、C8 体のみ GH 分泌促進作用を持つことが明らかとなった。C0 体であるデスアシルグレリンは弓状核への投与で摂食を亢進させるが、GHS-R 以外の受容体を介して生理作用を発揮する可能性が考えられた。

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、3番目のセリン残基が8個の脂肪酸によりアシル化修飾された構造を有する。この脂肪酸アシル構造は、哺乳類に限らず鳥類や両生類、魚類から発見されたグレリンにも共通することから、グレリンの生理活性に重要な役割を持つと考えられる。今回我々は脂肪酸アシル基の鎖長を変えたグレリン誘導体を用い、グレリンの生理作用と脂肪酸修飾との関連を検討した。

B. 研究方法

1) 動物

本研究では、9-11 週齢の雄性 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、室温・湿度を一定に保った環境下で個別のケージにて自由摂餌・摂水で飼育した。全ての実験を通して、ペントバルビタール麻酔下で手術を行い、一週間の術後回復期間において測定に用いた。

2) 異なる数の脂肪酸修飾基を持つグレリン中枢および末梢投与後の摂餌量測定

脂肪酸修飾基を持たないデスアシルグレリン、2個から10個までの異なる数の脂肪酸修飾基を持つグレリンをラット側脳室内に投与し、投与後2時間の摂餌量を測定した。デスアシルグレリンまたは脂肪酸が8個の天然型グレリンをラット静脈内に投与し、投与後2時間の摂餌量を測定した。

3) GHS-R KO マウスへの異なる脂肪酸修飾基を持つグレリン投与後の摂餌量測定

遺伝的にグレリン受容体を欠いた GHS-R KO マウスに脂肪酸鎖長が 0 個 (C0)、4 個 (C4)、8 個 (C8) の各種グレリン誘導体を側脳室内、または腹腔内投与し、投与後 2 時間の摂餌量を測定した。

4) 異なる脂肪酸修飾基を持つグレリン投与後の成長ホルモン (GH) 分泌の測定

デスアシルグレリンまたは脂肪酸が 8 個の天然型グレリンをラット静脈内に投与し、投与後 15、30、60 分の成長ホルモン (GH) 分泌量を測定した。遺伝的にグレリン受容体を欠いた GHS-R KO マウスに脂肪酸鎖長が 4 個 (C4)、8 個 (C8) の各種グレリン誘導体を腹腔内投与し、投与後 15 分の成長ホルモン (GH) 分泌量を測定した。

5) 異なる脂肪酸修飾基を持つグレリンの脳内微量投与後の摂餌量測定

脂肪酸鎖長が 0 個 (C0)、4 個 (C4)、8 個 (C8) の各種グレリン誘導体をラット視床下部の室傍核、外側野、弓状核にそれぞれ 30 pmol 微量投与し、投与後 2 時間の摂餌量を測定した。

C. 研究結果

1) 異なる脂肪酸修飾基を持つグレリン中枢投与後の摂餌量測定

グレリン脳室内投与において、脂肪酸鎖長の伸長に伴い、投与後 2 時間での摂餌量の漸増的な増加が観察された。脂肪酸修飾基を持たないデスアシルグレリンも含め、全てのグレリン誘導体投与で生理食塩水コントロール群に比べ有意に摂餌量は増加した。

2) 異なる脂肪酸修飾基を持つグレリン末梢投与後の摂餌量測定

中枢への投与時とは異なり、脂肪酸が 8 個の天然型グレリン投与時のみ摂餌量が有意に増加し、脂肪酸修飾基を持たないデスアシルグレリン投与後には摂食亢進作用は認められなかった。

3) GHS-R KO マウスへの異なる脂肪酸修飾基を持つグレリン投与後の摂餌量測定

GHS-R KO マウスへの脳室内投与において、脂肪酸 8 基の天然型グレリン投与後には摂食亢進作用は見られなかったが、脂肪酸修飾基を持たないデスアシルグレリン投与後で摂餌量の有意な

増加を認めた。

腹腔内投与においては、脂肪酸鎖長が 8 個の天然型グレリン投与後に摂食亢進作用は認められなかった。

4) 異なる脂肪酸修飾基を持つグレリン末梢投与後の GH 分泌

ラットへの静脈内投与において、デスアシルグレリン投与後に GH 分泌はなかったが、脂肪酸が 8 個の天然型グレリン投与後 15 分目で有意に血中 GH 濃度が増加した。

一方、GHS-R KO マウスへの腹腔内投与においては、グレリン投与後の GH 分泌はなかった。

5) 異なる脂肪酸修飾基を持つグレリン脳内微量投与後の摂餌量測定

室傍核、視床下部外側核では脂肪酸 8 基の天然型グレリン投与時のみ有意な摂食亢進作用を認めたが、弓状核においては、脂肪酸 4 基のグレリン、脂肪酸修飾を持たないデスアシルグレリン投与により摂食が亢進した。

D. 考察

ラット脳室内へのグレリンおよび脂肪酸アシル基の鎖長を変えたグレリン誘導体投与の結果、脂肪酸鎖長の伸長に伴う摂餌量の増加が認められたが、GHS-R KO マウスを用いた実験では C4、C8 による摂食亢進作用は認められず、デスアシルグレリン投与時のみ摂食が亢進した。これらのことから、グレリンによる摂食亢進作用の発現には脂肪酸による修飾が重要であること、また、デスアシルグレリンに関しては GHS-R 以外の受容体を介して摂食亢進に働く経路が存在することが示唆された。

摂食亢進作用とは異なり、静脈内投与後の GH 分泌は C8 グレリン投与後に増加したが、デスアシルグレリン投与後に変化はなかった。

ラット視床下部の微量投与では、C8 投与により、室傍核、外側野、弓状核の全ての領域で摂食亢進作用を認めた。これらの領域ではいずれも GHS-R の遺伝子発現が確認されており、C8 グレリンがこれらの領域に存在する GHS-R に結合し、摂食亢進作用を惹起していると考えられる。

C8 グレリンとは異なり、C0、C4 では弓状核

への投与時のみ摂食亢進作用を認めた。ラットおよび GHS-R KO マウスへの脳室内投与の実験結果から、少なくとも C4、C8 投与による摂食亢進作用は GHS-R を介したものであると考えられる。弓状核とそれ以外の室傍核、外側野へのグレリン微量投与で結果が乖離した点に関しては、弓状核、室傍核、外側野でのグレリンに対する反応の閾値の違いなどが考えられる。

デスアシルグレリンは弓状核投与により摂食亢進に働くが、室傍核、外側野への投与では摂食行動は起こらないこと、また GHS-R KO マウスへの脳室内投与でも摂食亢進作用が行動が見られることから、弓状核に存在する GHS-R 以外の受容体を介して生理作用を発揮する可能性が考えられる。

E. 結論

本研究では、脂肪酸 8 基の修飾を受ける天然型のグレリンは弓状核、室傍核、視床下部外側野などに存在する GHS-R を介して摂食亢進作用を発揮し、脂肪酸アシル基の鎖長を変えたグレリン誘導体は、少なくとも弓状核の GHS-R を介して摂食亢進作用を起こすことが明らかとなった。GH 反応は天然型のグレリンのみ分泌促進作用を持つことが明らかとなった。デスアシルグレリンは弓状核投与で摂食亢進に働くが、GHS-R 以外の受容体を介して生理作用を発揮する可能性が考えられた。

これらの結果は、グレリンおよびデスアシルグレリンの生理作用発現の機序を考える上で重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

①Date 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.

- ②Toshinai 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.
- ③Osawa 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.
- ④Sato M, Nakahara K, Goto S, Kaiya H, Miyazato M, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Murakami N. Effects of ghrelin and des- acyl ghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord. Biochem Biophys Res Commun, 350: 598- 603, 2006.
- ⑤Tanaka 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.
- ⑥Toshinai 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.
- ⑦Nakahara T, Kojima S, Tanaka M, Yasuhara D, Harada T, Sagiya 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.

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

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

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

我々はグレリンの成長ホルモン分泌促進作用を利用して高齢者患者に対する治療薬としての臨床応用を図っている。昨年度、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）を開始したが、平成19年度1月末現在目標症例32例中24例でグレリン投与を終了した。来年度中に試験完了予定である。また、膵β細胞および糖尿病におけるグレリンの病態生理学的意義を検討するために、生直後にストレプトゾトシン（STZ）を投与する新生児糖尿病モデルラットにグレリンを一週間連続投与した。その結果、成獣時における高血糖発症を阻止し、グレリンによるインスリン産生、膵β細胞増殖、pdx-1発現の亢進が認められ、グレリンの膵β細胞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。

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、治療対象候補として考えられる。昨年度は、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。我々はすでに京都大学医学部附属病院・探索医療センターで臨床第Ⅰ相試験を実施してグレリンの安全性を確認した。そこで我々は、平成16年度から高齢者を対象としたグレリン投与の臨床第Ⅱ相試験を計画し、平成17年度から実施することとした。

一方、我々はグレリン作用に関する基礎的研究も行っている。グレリンは胃以外にも膵臓を含めた多臓器で産生され、その受容体発現も同様である。また、グレリンは糖代謝を含めた多彩な作用を示し、糖尿病患者におけるその血中濃度低下が報告されている。そこで我々は、膵β細胞および

糖尿病におけるグレリンの病態生理学的意義を、糖尿病モデル動物を用いて検討した。

B. 研究方法

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た。高齢者におけるグレリン治療対象疾患として、以下の条件を満たすものを探索した。1) 筋肉量が低下しており、これを回復することが必要な疾患、2) 現在十分な治療法がないもの、3) すでに成長ホルモン投与のエビデンスがある疾患、4) 安全性の問題がない、5) 京大病院において症例の確保可能。その結果、変形性股関節症で人工股関節置換術を受ける患者を対象とすることに決定した。本疾患は、高齢者に多く、高齢化に伴って増加し、人工置換術の術後に足筋力や歩行などの回復が高齢によって遅延することが問題となっている。また、京大病院で症例が非常に豊富であり、術式や術後のリハビリテーションが一つのクリティカルパスとしてほぼ一定しているので評価に適している。そこで、平成16年から「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」のプロトコル作成を開始し、平成 17 年 3 月に倫理委員会の承認を得た。適格基準として片側性の手術と 40 歳以上という年齢制限を設定した。除外規準として、股関節以外の機能障害や関節痛、慢性関節リウマチなどの全身性自己免疫疾患、BMI 30 以上の肥満、重症の糖尿病・高血圧・心疾患を設けた。試験デザインはプラセボコントロール下の二重盲検で、目標症例数は 32 名である。試験スケジュールは手術の 1 週間前から術後 2 週間投与まで一日 2 回投与する。退院時における筋力と歩行速度の改善をエンドポイントとした。

新生児糖尿病モデルラットに関する検討では、生後 1 日のラットにストレプトゾトシン (STZ) 100mg/kg を腹腔内投与してモデル動物を作成した。尿糖強陽性発現を確認した後、グレリン 100 μ g/kg を一日 2 回、一週間皮下投与した。コントロール (生食投与) 群 (C 群)、グレリン単独投与群 (G 群)、STZ 単独投与群 (STZ 群)、STZ + G 投与群 (STZ + G 群) の 4 群にて比較検討した。Day21 と Day70 に体重、血糖、血中インスリン濃度、膵臓内インスリンの含量・遺伝子発現・陽性細胞数、Pdx-1 の遺伝子発現・陽性細胞数の各測定を行った。またインスリンと phosphohistone H3 (PHH3) の二重免疫染色による膵 β 細胞の増殖評価を行った。

(倫理面への配慮)

臨床第 II 相試験に関しては、京都大学医学研究科医の倫理委員会で承認を受けた。被験者には説明文書作成して十分理解を得、文書による同意確認の上試験を実施した。動物実験は、京都大学大学院医学研究科の動物実験委員会の承認を受け、京都大学大学院医学研究科・医学部動物実験実施要項に従い、関連法案に遵守の上で施行した。

C. 研究結果

「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」の実施開始し、平成 19 年度 1 月末現在目標症例 32 例中 24 例でグレリン投与を終了している。来年度中に試験完了予定である。

新生児糖尿病モデルラットに関する検討

1) Day21 : STZ 群に比較して STZ + G 群では、

膵臓内インスリン遺伝子発現と同陽性細胞数、膵臓内 Pdx-1 の遺伝子発現と同陽性細胞数、すべてにおいて有意に増加していた。さらに、インスリンと PHH3 二重免疫染色では、グレリン投与による二重染色陽性細胞の有意な増加を示した (STZ 群 vs. STZ + G 群、または C 群 vs. G 群)。

2) Day70 : STZ 群に比較して STZ + G 群では有意な空腹時血糖の低下を認めた (11.8 ± 0.3 vs. 7.6 ± 0.4 mmol/l. $p < 0.0005$) (表 1)。膵臓内インスリンの遺伝子発現・陽性細胞数、膵臓内 Pdx-1 遺伝子発現は、STZ 群に比較して STZ + G 投与群で有意に増加していた。ただし、この時点ではインスリンと PHH3 の二重免疫染色では二重陽性細胞の増加は認められなかった。

D. 考察

「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」の実施は目標症例数の 2/3 を終了して順調に推移しており、来年度中に試験完了が可能と考えられる。

新生児糖尿病モデルラットに関する検討では、グレリンの膵 β 細胞増殖やインスリン産生に対する増加作用、およびそれらの作用による新生児糖尿病モデルラット発症阻止、の可能性が示唆された。

E. 結論

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) を実施中である。また、新生児糖尿病モデルラットにおいて、グレリン投与による糖尿病発症阻止が観察された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

① 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.

②Irako 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.

③Akamizu T. Susceptible genes of autoimmune thyroid disease. *J Kor Soc Endocrinol*, 21: 1-10, 2006.

④Akamizu T, Kangawa K. Translational research on the clinical applications of ghrelin. *Endocr J*, 53: 585-591, 2006.

2. 学会発表

①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。

②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。

③五十子大雅、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。

④Irako 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究協力者

五十子大雅（京都大学医学部）

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研究所）

表 1 : 生後 70 日目の血糖値

	Control	STZ	STZ/Ghrelin
空腹時血糖 (mg/dl)	103.3±15.6 (6)	213±12.5 (5) *	137.3±28.7 (13) **

数値は、平均±標準誤差 (ラット数)。

* : Control 対 STZ、 $P < 0.0001$

** : STZ 対 STZ/Ghrelin、 $P < 0.0001$

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情報研究部門 教授

摂食促進ホルモンのグレリンについて、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などの解析を行った。グレリン欠損マウスは致死性でなく、形態的な異常は見られない。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うまく食欲・摂食行動を調節して食欲の低下・消失を防止し、それによる栄養不良や死ぬことがないようにしていると考えられる。

A. 研究目的

研究分担者らは 1999 年に胃組織から、オープン受容体 GHS-R (growth hormone secretagogue receptor: 成長ホルモン放出促進因子受容体) 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、中枢における食欲の調節や摂食障害の病態と密接な関連があることが明らかになってきた。さらにグレリンは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、摂食障害や心不全などでグレリンの補充による治療応用が期待されている。

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製・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もどのような影響を及ぼすのかを検討した。

B. 研究方法

1) グレリン欠損マウスの作製

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 C57BL/6J との交配を重ね、9 世代以上バッククロスを繰り返した。

2) グレリン欠損マウスの解析

遺伝的背景を C57BL/6J にしたグレリン欠損マウスを使って、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