

2) GHRP-2 の血中 GH、IGF-1、および肝における IGF-1 発現に及ぼす効果

GHRP-2 投与開始前、および 15、30、45 日後に、尾静脈より採血、血中 GH、IGF-1 を測定した。60 日目にはペントバルビタール麻酔下に頸静脈より採血、同項目を測定した。また、肝臓を摘出、IGF-1 mRNA 量を real time quantitative PCR (RT-QPCR) で測定した。

3) GHRP-2 のヒラメ筋筋線維断面積、および atrogin-1、MuRF1 発現に及ぼす効果

GHRP-2 投与開始 60 日目に麻酔下でヒラメ筋を摘出、atrogin-1 mRNA、MuRF mRNA を RT-QPCR で測定した。また、ヒラメ筋を急速凍結し凍結切片を作製、ATPase 染色 (pH 10.3) を行ない、Type I、Type II 線維を分染し、筋線維断面積を NIH image で測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に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) GHRP-2 の摂食量に及ぼす効果

GHRP-2、10 μ g/kg 投与群 (Low GHRP-2 群) は、摂食量を増加させる傾向を示した。その効果は初期に明瞭であったが、経過とともに減弱した。GHRP-2 100 μ g/kg 投与群 (High GHRP-2 群) も同様の効果を示したが、Low GHRP-2 群に比べると小さいものであった。

2) GHRP-2 の体重に及ぼす効果

対照の生食投与群では、開始後 10 日から体重増加は明確ではなくなり、体重はしだいに減少した。High GHRP-2 群でも同様であったが、Low GHRP-2 群では、体重減少がみられなかった。

3) GHRP-2 の血中 GH、IGF-1 値、肝における IGF-1 mRNA 量に及ぼす効果

High GHRP-2 群では、対照の生食投与群に比べて、血中 GH 値は増加しなかったが、Low GHRP-2 群では、投与実験中いずれの時点でも対照群に比べ GH の上昇がみられた。投与実験中いずれの時点でも、血中 IGF-1 値には 3 群間で差がなかった。GHRP-2 投与開始後 60 日における肝の IGF-1 mRNA 量にも 3 群間で差を認めなかった。

4) GHRP-2 のヒラメ筋筋線維断面積に及ぼす効果

High GHRP-2 群では、対照の生食投与群に比べて、ヒラメ筋筋線維断面積は増加しなかったが、Low GHRP-2 群ではヒラメ筋筋線維断面積の増加が認められた。

5) GHRP-2 の atrogin-1 mRNA、MuRF mRNA に及ぼす効果

High GHRP-2 群、Low GHRP-2 群で、対照群に比べヒラメ筋における atrogin-1 mRNA、MuRF mRNA 量が減少していた。

D. 考察

今回の検討において、Low GHRP-2 群では血中 GH が増加傾向にあり、摂食量、体重の増加も観察された。一方、High GHRP-2 群では、血中 GH、摂食量、体重の増加は明確ではなかった。Low GHRP-2 群のほうが明確な作用を示した理由は不明であるが、高用量の GHRP-2 が脱感作を起こした可能性も考えられる。

Low GHRP-2 群では対照群に比べて、血中 GH 値が投与実験中いずれの測定点でも高く、GHRP-2 10 μ g/kg の投与は GH を上昇させたと考えられるが、血中 IGF-1 値は、対照群のそれと差がみられなかった。血中 IGF-1 の 80% は肝に由来するが、肝の IGF-1 mRNA 量にも差は認められなかった。私どもは 6 週齢のラットを使用した実験でも、同様に、GHRP-2 連続投与 (5 日間) は IGF-1 の増加を引き起こさないという成績を得ている。一方、ヒトに対して、別の GHRP である GHRP-6 を経鼻投与した際、血中 GH、IGF-1 は増加することを私どもは報告している。この IGF-1 反応性の違いが、種差によるものなのか、GHRP の種類による違いなのか不明である。これまで、他のグループからも GHRP-2 投与が IGF-1 上昇に結びついていないという報告があり、GHRP-2 が IGF-1 の産生、分泌に GH 以外の経路を介して影響を及ぼしている可能性も否定できない。

GHRP-2 は GH 分泌促進作用を有するだけでなく、摂食亢進作用、体重増加作用といった作用を持っているので、GHRP-2 の臨床応用を考慮する上で、GHRP-2 長期投与によるこれら GH 分泌以外への影響を評価することは重要である。興味深いことに、

Low GHRP-2 群のほうが High GHRP-2 群に比べてこれらの効果も強く、GH 増加効果と相関していた。これまで、グレリン投与では体脂肪量を増加させるという報告があり、GH の体脂肪減少作用を打ち消している可能性が推測されている。GHD 患者では、体脂肪量の増加が存在するので、GH の代わりに GHRP-2 を使用するときには注意が必要となる。今回は体組成について評価できていないが、今後検討する必要がある。

体組成に影響を与えるもう 1 つの因子は、筋肉量である。ヒラメ筋において GHRP-2 は筋線維断面積を増加させることが明らかとなった。最近、筋細胞内での atrogen-1、MuRF1 の発現亢進が筋萎縮を引き起こすこと、それらの抑制が筋萎縮抑制をもたらすことが報告されている。今回、atrogen-1、MuRF1 mRNA 量を測定したところ、Low GHRP-2 群、High GHRP-2 群いずれでも、対照群に比べ低下していた。しかし、筋線維断面積の増加は Low GHRP-2 群でのみ観察されたので、単に atrogen-1、MuRF1 発現抑制に起因したわけではなく、GH 分泌の増加が影響を与えている可能性は否定できない。

E. 結論

グレリン受容体作動薬 GHRP-2 の投与 (10 μ g/kg、2 回/日、60 日間) は、12 ヶ月齢の SD 系雄ラットにおいて、摂食量、体重、血中 GH を増加させた。100 μ g/kg の GHRP-2 の投与のそれらに対する効果は、明瞭なものではなかった。10 μ g/kg の GHRP-2 の投与は、ヒラメ筋筋線維断面積を増加させ、筋萎縮を抑制する可能性が考えられた。10 μ g/kg および 100 μ g/kg の GHRP-2 投与で、ヒラメ筋 atrogen-1、MuRF1 mRNA 量は減少したが、ヒラメ筋筋線維断面積への効果は 10 μ g/kg GHRP-2 投与時のみ観察された。GHRP-2 のヒラメ筋筋線維断面積増加効果は、単に atrogen-1、MuRF1 の発現減少によるものでなく、GH 上昇を伴うことが必要であるのかもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Takahashi M, Takahashi Y, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Iida K, Okimura Y, Kaji H, Chihara K. CXCL14 enhances insulin-dependent glucose uptake in adipocytes and is related to high-fat diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 364: 1037-1042, 2007.
- ② 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.
- ③ Imanaka M, Iida K, Nishizawa H, Fukuoka H, Takeno R, Takahashi K, Kaji H, Takahashi Y, Okimura Y, Kaji H, Imanishi Y, Chihara K. McCune-Albright syndrome with acromegaly and fibrous dysplasia associated with the GNAS gene mutation identified by sensitive PNA-clamping method. *Intern Med*, 46: 1577-1583, 2007.
- ④ Kaji H, Iida K, Takahashi Y, Okimura Y, Chihara K. Hormone replacement therapy and vascular risk disorders in adult hypopituitarism. *Endocr J*, 54: 239-245, 2007.
- ⑤ Takahashi Y, Iida K, Takahashi K, Yoshioka S, Fukuoka H, Takeno R, Imanaka M, Nishizawa H, Takahashi M, Seo Y, Hayashi Y, Kondo T, Okimura Y, Kaji H, Kitazawa R, Kitazawa S, Chihara K. Growth hormone reverses nonalcoholic steatohepatitis in a patient with adult growth hormone deficiency. *Gastroenterology*, 132: 938-943, 2007.
- ⑥ Chihara K, Shimatsu A, Hizuka N, Tanaka T, Seino Y, Kato Y, for the KP-102 Study Group. A simple diagnostic test using GH-releasing peptide-2 in adult GH deficiency. *Eur J Endocrinol*, 157: 19-27, 2007.
- ⑦ Urushihara H, Fukuhara S, Tai S, Morita S, Chihara K. Heterogeneity in responsiveness of perceived quality of life to body composition

changes between adult-and childhood-onset Japanese hypopituitary adults with GH deficiency during GH replacement. *Eur J Endocrinol*, 156: 637-645, 2007.

- ⑧ Fukuoka H, Takahashi Y, Iida K, Kudo T, Nishizawa H, Imanaka M, Takeno R, Iguchi G, Takahashi K, Okimura Y, Kaji H, Chihara K. Low serum IGF-I/GH ratio is associated with abnormal glucose tolerance in acromegaly. *Horm Res*, 69: 165-171, 2008.
- ⑨ Toda K, Yamamoto D, Fumoto M, Ikeshita N, Herningtyas EH, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Involvement of mPOU (Brn-5), a class VI POU protein, in the gene expression of Pit-1 as well as PRL. *Mol Cell Endocrinol*, 280: 20-29, 2008.
- ⑩ Yamamoto D, Ikeshita N, Matsubara T, Tasaki H, Herningtyas EH, Toda K, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. GHRP-2, a GHS-R agonist, directly acts on myocytes to attenuate the dexamethasone-induced expressions of muscle-specific ubiquitin ligases, Atrogin-1 and MuRF1. *Life Sci*, 82: 460-466, 2008.

2. 学会発表

- ① Fukuoka H, Takahashi Y, Iida K, Nishizawa H, Imanaka M, Takeno R, Iguchi G, Takahashi K, Takahashi M, Okimura Y, Kaji H, Chihara K. IGF-I stimulates reactive oxygen species (ROS) production, thereby affecting insulin sensitivity in adipocytes. The 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, Canada, 2007.
- ② 福岡秀規、高橋裕、西沢衡、今中真理、竹野亮子、飯田啓二、中江淳、置村康彦、加治秀介、千原和夫：成長ホルモンは、FoxO1の遺伝子発現、活性を調節し脂肪細胞におけるインスリンシグナルに拮抗する，第34回日本神経内分泌学会，群馬，2007.
- ③ 千原和夫：皮膚と成長ホルモン，第16回日本形成外科学会基礎学術集会，神戸，2007.
- ④ 千原和夫：成人成長ホルモン分泌不全症の臨床，第37回日本内科学会近畿支部生涯教育講演会，京都，2007.

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（神戸大学医学部保健学科）
山本大輔（神戸大学医学部保健学科）
池下伸子（神戸大学医学部保健学科）
牧 大貴（神戸大学医学部保健学科）
Elizabeth Henny Herningtyas
（神戸大学大学院医学研究科内科学講座）

加齢に伴う体脂肪蓄積機序におけるグレリンの役割の解析

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

成長ホルモン（GH）は脂肪分解作用を持つため、中年期以降の体脂肪増加に GH 分泌低下が関与していると考えられている。我々はグレリンの投与が褐色脂肪組織（BAT）のノルアドレナリン（NA）分泌を抑制することを明らかにしており、グレリンは BAT の熱産生機能を抑制し脂肪蓄積作用を示す可能性を示してきた。今年度は加齢に伴い、BAT の UCP1 mRNA 発現量が減少すること、BAT の白色脂肪化が生じること、外因性のグレリンによる弓状核 Fos 発現や BAT 内の NA 分泌抑制反応が減弱することを明らかにした。これらの結果は褐色脂肪細胞の機能低下が加齢による体脂肪蓄積機序に関与している可能性を示し、また、この機能低下機序へのグレリンの関与は否定的であることが明らかになった。加齢ラットにおいて下垂体の GH mRNA 発現が減少していたことから GH の合成低下に伴う GH 分泌低下が体脂肪増加に関与している可能性が考えられた。今後、加齢に伴う GH 合成・分泌低下へのグレリンの関与に関する解析が必要である。

A. 研究目的

成長ホルモン（GH）は脂肪代謝を促進して体脂肪を減少させる作用を有するため、中年期以降の体脂肪の蓄積に GH 分泌低下が関与していると考えられている。グレリンは GH 分泌促進作用、摂食促進作用、体脂肪消費抑制作用を示す。我々はこれまでにグレリンの脳室内投与および静脈内投与が褐色脂肪組織（BAT）のノルアドレナリン（NA）分泌を抑制することを明らかにしており、グレリンは BAT の熱産生機能を抑制することによっても脂肪蓄積作用を発揮する可能性が示唆される。しかしながら高齢者の食欲不振、るいそうの病態や中年者の肥満発症機序におけるグレリン/グレリン受容体（GHSR）系の機能の関与は不明である。

本研究では加齢に伴う体脂肪増加機序におけるグレリンの関与の有無について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

体脂肪の少ない 4 週齢（130-150 g）、体脂肪の増加が始まる 8 週齢（230-250 g）、体脂肪が蓄積している 20 週齢（480-500 g）の SD 雄ラットを用

いて以下の実験を行った。

1) 血中グルコースおよびインスリン濃度、体脂肪組織重量、各臓器における各種物質の mRNA 発現量の解析

ペントバルビタール麻酔下で下大静脈より血中グルコース、インスリン値測定用の採血後、断頭し、副睾丸周囲、後腹膜、腸間膜の白色脂肪組織と BAT の重量を測定し、体重 100 g あたりの脂肪量を算出した。BAT、下垂体、視床下部から RNA を抽出し、BAT の UCP1、視床下部の GHSR、グレリンの mRNA 発現量を real time PCR 法にて定量した。下垂体の GH mRNA は northern blot 法にて解析した。

2) 弓状核における Fos 発現の解析

グレリン（2 nmol/kg 体重）を脳室内投与した 90 分後にラットを灌流固定し、取り出した脳にて冠状切片を作成し、免疫組織化学的手法を用いて弓状核における Fos 発現を解析した。

3) BAT における NA 分泌へのグレリンの作用の解析

各週齢のラットの BAT にエーテル麻酔下で透析プローブを刺入後、リング液にて灌流し、無麻

酔無拘束下灌流液中の NA 分泌を経時的に測定した。基礎分泌が安定した後、グレリンを 2 nmol/kg 体重の濃度で脳室内へ、または 120 nmol/kg 体重の濃度で静脈内へ投与し、グレリンによる BAT の NA 分泌抑制作用を各週齢にて比較した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) 血中グルコースおよびインスリン濃度、脂肪組織重量、各臓器における各種物質の mRNA 発現量の解析結果

副睾丸周囲と後腹膜の脂肪量は週齢を経るごとに増加したが、腸間膜の脂肪量は 8 週齢まで増加はなく、20 週齢ラットにおいて有意に増加していた。8 週齢ラットの BAT 重量は他の群と比較して大であったが、20 週齢ラットの BAT 重量は有意に減少していた。組織像を見ると 20 週齢ラットでは BAT 内に脂肪滴の蓄積が認められた。

20 週齢ラットの血中グルコース濃度は 4 週齢ラットと比較して有意に高値を示したが、8 週齢ラットとの差は認められなかった。血中インスリン値は 8 週齢と 20 週齢ラットで高値を示した。

BAT の UCP1 mRNA 発現量は 4 週齢ラットにおいて有意に高値を示した。下垂体の GH mRNA 発現量は 4 週齢ラットにおいて多く、週齢が進むにつれて減少する傾向がみられ、20 週齢ラットでの mRNA 発現量は 4 週齢ラットと比較し有意に低値を示した。

視床下部における GHSR mRNA 発現量は 8 週齢ラットで有意に多く、視床下部におけるグレリン mRNA 発現量には 3 群間で有意差は認められなかった。

2) 弓状核における Fos 発現の解析

4 週齢、8 週齢ラットへのグレリン脳室内投与は弓状核における Fos 発現を有意に増加させたが、20 週齢ラットへのグレリン脳室内投与は Fos 発現を増やす傾向は認められるものの有意な変化ではなかった。各週齢のグレリン投与群を比較すると 4 週齢と比較して 20 週齢の Fos 発現量は有意に減少していた。

3) BAT における NA 分泌へのグレリンの作用の解析

4 週齢ラットにおいてグレリン脳室内投与により投与直後から 40 分後まで BAT の NA 分泌は抑制された。8 週齢ラットでは 4 週齢と同様にグレリンの脳室内投与により投与直後から 40 分後まで NA 分泌の抑制が認められた。しかしながら 20 週齢ラットにおいてはグレリンの脳室内投与による NA 分泌抑制作用は認められなかった。

4 週齢ラットにおいてグレリン静脈内投与により生食投与群と比較し投与後 20 分から 60 分後まで BAT の NA 分泌の抑制が認められた。8 週齢ラットではグレリンにより投与後 20 分から 40 分後まで NA 分泌の抑制が認められた。20 週齢ラットにおいてもグレリン投与により投与後 20 分から 40 分後まで NA 分泌の抑制が認められたが、抑制の程度は軽かった。

D. 考察

100g 体重あたりの BAT 重量は 8 週齢において重く、20 週齢の BAT では褐色脂肪細胞と混在する脂肪滴が多く認められた。褐色脂肪細胞の白色脂肪細胞への変化は BAT における UCP1 の活性の低下を惹起ものであり、このことから 20 週齢の BAT における UCP1 による熱産生機能は低下している可能性が示された。また、4 週齢の UCP1 mRNA 発現量は他の週齢より高値を示した。ラットの UCP1 mRNA は胎生期より発現し生後 4 日目に頂値を示し、以後次第に減少することが報告されていることから 4 週齢における UCP1 mRNA の発現量が多いことはこの週齢での脂肪蓄積の抑制に関与していると考えられる。

20 週齢の血中グルコース濃度は 4 週齢と比較して有意に高値を示し、インスリン値は 8 週齢の約 2 倍の値を示していることから、20 週齢においてはインスリン感受性が低下している可能性が考えられた。

下垂体の GH mRNA 発現量は 4 週齢が最も多く、20 週齢で有意に減少しており、GH 分泌量は測定していないが、GH 分泌量の低下が体脂肪量の増加をもたらしている可能性が示唆された。

ラット視床下部 GHSR mRNA 発現量は 7 日齢、15 日齢ラットと比較し 30 日齢、70 日齢ラットにお

いて増加していると報告されている。8週齢の視床下部 GHSR mRNA 発現量が有意に高かったことから GHSR mRNA 発現量には週齢差があることが示唆された。胃のグレリン発現量には加齢による差が認められないことが報告されているが、加齢に伴う視床下部のグレリンを比較した報告はない。視床下部グレリン mRNA 発現量には3群間で有意な差は認められなかったことから、視床下部のグレリン mRNA 発現量も胃と同様加齢によって変化しない可能性が推測された。

グレリン脳室内投与による弓状核における Fos の発現は4週齢が最も多く、外因性のグレリンに対する弓状核における反応性は4週齢が高いことが示された。20週齢においてグレリン脳室内投与による Fos 発現が増加しなかったことから20週齢では弓状核におけるグレリンに対する反応性は低下している可能性が示唆された。

グレリンの脳室内投与により、4週齢、8週齢では BAT の NA 分泌は抑制されたが、20週齢では分泌抑制作用は認められなかった。各週齢においてグレリンの静脈内投与により BAT の NA 分泌は抑制されたが、4週齢、8週齢と比較して20週齢の抑制の程度は軽度であることが明らかとなり、これらのことから20週齢では中枢神経系または末梢からのグレリンに対する BAT を支配する交感神経系の反応が低下している可能性が示唆された。

E. 結論

加齢に伴い体脂肪が蓄積する機序には、褐色脂肪細胞の機能低下が関与していると考えられる。しかしながらこの機能低下にグレリンが関与している可能性は少ないと考えられた。12ヶ月齢では GH の分泌が低下しているという報告があり、GH mRNA 発現が減少していたことから20週齢では GH の合成が低下しそれに伴う GH 分泌の低下が体脂肪増加に関与している可能性も考えられ、今後、この GH 分泌低下機序におけるグレリンの役割の有無の解明が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- ① 眞野あすか、大畠久幸、岩寄あずさ、根本崇宏、周東裕仁、杉原 仁、及川眞一、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の解析，第80回日本内分泌学会学術総会，東京，2007.

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生体統御学）

根本 崇宏（日本医科大学生理学生体統御学）

グレリンによる中枢神経細胞の増殖促進作用

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

ラットの中枢神経、特に視床下部ニューロンに対するグレリンの効果を検討した。グレリン受容体 GHS-R の mRNA 測定によって、胎児期および新生児期の視床下部ニューロンにはグレリン受容体が発現していることが判明した。グレリンは胎児期および新生児期（5 日齢）いずれの場合も視床下部培養神経細胞の増殖を促進し、特に神経芽細胞に対する効果が顕著であった。一方、デスアシルグレリンは胎児期のみ増殖を促進し、新生児期のニューロンには作用しなかった。また、幼児期にグレリンを慢性投与し、成熟後の学習能力を評価した。その結果、有意差は無いがグレリン投与群で記憶の保持が長い傾向 ($P < 0.1$) が認められた。以上の知見は神経再生に対するグレリンの応用への可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

以前の研究で、母体内の胎児の成長が母親由来のグレリンによって大きく影響されることを明らかにした。すなわち、母親にグレリンを投与すると体重の大きな新生児が誕生し、逆に母親のグレリンを中和すると体重の減少した新生児が誕生した。胎児の皮膚や脊髄細胞の培養実験の結果、胎児の成長に対する作用は、グレリンの胎児細胞増殖促進による直接効果と推察された。

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、この胎児の細胞に対して、デスアシルグレリンはグレリンと同等の細胞増殖促進作用を有していた。

ニューロンは出産後には増殖しないと一般的に考えられて来たが、中枢にも神経芽細胞が存在し、それらは分化・増殖することが報告されている。先の結果から推測すれば、中枢に存在するグレリンあるいは末梢からのグレリンの一部が中枢の神経芽細胞に作用し、分化・増殖に影響する可能性は否定できない。そこで、本研究では、胎

児および新生児の視床下部ニューロンに対するグレリンとデスアシルグレリンの影響について検討した。

B. 研究方法

1) ラット胎児・新生児の視床下部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 17、19 日の胎児および分娩後 0、5 日の新生児ラットの視床下部および対象として脊髄を採取した。これを RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて mRNA の抽出および精製に供した。

First-strand cDNA はトータル RNA $2\mu\text{g}$ 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 PCR 解析を行った。対照には GAPDH を用いた。

2) 視床下部および脊髄神経の培養と細胞増殖の判定

妊娠 17 日の胎児および分娩後 5 日の新生児から視床下部および脊髄を採取し、パ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。

3) グレリン受容体、ネスチン、MAP2、ニューロフィラメントの免疫染色

上記2)で作製したそれぞれの培養神経細胞に対して、神経芽細胞のマーカーとしてネスチン抗体、神経細胞のマーカーとしてMAP2抗体および神経線維のマーカーとしてニューロフィラメント抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。また、グレリン受容体の抗体を用いて、どの細胞にグレリン受容体が存在しているのかを二重免疫染色で同定した。さらに、グレリン添加時でのBrdUの取り込み増加がどの神経細胞の分裂増殖によるのかを確認するため細胞マーカーとBrdU抗体の二重免疫染色を行った。

4) 幼児期グレリンの慢性投与による学習・記憶能力の評価

出生後から1週間毎日朝夕2回グレリンを1nmol皮下投与した。対象は生理食塩水を投与した。50日齢に達した後、ウォーターメイズ試験で学習能力と記憶保持能力を常道に従って評価した。

(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。また、本実験は宮崎大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1) ラット胎児・新生児の視床下部におけるグレリン受容体mRNAの発現

妊娠17、19日の胎児および分娩後0、5日の新生児ラットの視床下部および脊髄ともにGHS-R mRNAの発現を認めた。しかし、脊髄では胎児期・新生児期ともに顕著なバンドが認められたのに対し、視床下部では胎児期の方が強く、新生児期では弱い発現しか認められなかった。

2) グレリンによる視床下部神経の増殖

胎児期・新生児期の視床下部から調整した神経細胞の培養液にグレリンあるいはデスアシルグレリンを添加し、BrdUの取り込みを調べた結果、

グレリンでは0.03~3.0nmol/mlの濃度で有意な増加が認められた。一方、デスアシルグレリンでは胎児期の神経細胞のみ0.03~3.0nmol/mlの濃度で有意な増加が認められたが、新生児期の神経細胞では有意な増加は起こらなかった。脊髄神経では新生児期でもデスアシルグレリンでの増加が認められた。また、グレリンでの神経細胞増殖促進作用は培養液中からNGFを除いたものでも認められた。

3) グレリン受容体、ネスチン、MAP2、ニューロフィラメントの免疫染色

胎児・新生児いずれの培養神経細胞もGHS-Rの発現を認め、特にネスチン陽性細胞に多く発現していた。MAP2とのダブル染色像もわずかに認められたが、ニューロフィラメントとの二重染色ではGHSR陽性像は全く認められなかった。

4) 幼児期グレリンの慢性投与による学習・記憶能力の評価

グレリン投与、非投与ラットのウォーターメイズ試験では学習能力(足場に行くまでの時間)には差が認められなかったが、2および5日後の再試験での結果はグレリン投与ラットの方が早くたどり着く傾向を示した。しかし、有意な差には至らなかった($P < 0.1$)。

D. 考察

今回の研究により、中枢神経の神経細胞においてもグレリンにより分化・増殖が促進されることが判明した。この作用は特に、神経芽細胞を標的にしたものと推測された。以前の研究において、デスアシルグレリンも胎児の脊髄神経細胞を増殖させ、これがデスアシルグレリンに親和性の高い受容体を介しての作用であることを示した。しかし、今回の新生児における神経細胞ではデスアシルグレリンにその作用は認められなかった。このことは、出生後にはデスアシルグレリン受容体は消失している可能性を示唆するものである。一方で、我々は成熟ラットにおいて、デスアシルグレリンの中樞投与は摂食を促進することを報じている。この摂食誘起作用はオレキシンニューロンに作用するが、この結果はデスアシルグレリンの中樞での受容体の存在を示唆している。そのため、今

回のデスアシルグレリンの細胞増殖作用の欠如は、恐らく、神経芽細胞においてのみの受容体消失を意味し、中枢全体での消失を意味するものではないと考えられる。

神経細胞の増殖因子は極めて限られており、その代表的なものが NGF であるが、グレリンによる増殖促進作用は NGF の添加を必要としない。これは、胎児の皮膚細胞のグレリンによる増殖促進作用に EGF が必要であったことと大きく異なる。即ち、神経細胞に対してグレリンは単独で細胞増殖を起こす、いわゆる、神経細胞分化・増殖因子の範疇に入るものである。

神経細胞の増殖を期待して、新生児にグレリンを慢性投与し、成熟後の学習、記憶能力の亢進を期待したが、有意な差を得ることはできなかった（記憶の保持は向上する傾向は認められた）。これについては投与量や投与期間などを含めて、さらなる詳細な検討が必要であろう。

E. 結論

本研究により、グレリンが中枢の神経細胞を増殖させる可能性が示された。一方、デスアシルグレリンにはその作用が認められなかった。グレリンの標的は主に神経芽細胞であった。神経の再生、分化・増殖は極めて難しく、それらに関わる因子は少ないが、グレリンにそのような作用があることは、今後応用への展開に期待できると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Ida T, Miyazato M, Naganobu K, Nakahara K, Sato M, Lin XZ, Kaiya H, Doi K, Noda S, Kubo A, Murakami N, Kangawa K. Purification and characterization of feline ghrelin and its possible role. *Domest Anim Endocrinol*, 32: 93-105, 2007.
- ② Sato M, Nakahara K, Kojima M, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Regulation of GH secretagogue receptor (GHS-R) gene expression in the rat nodose ganglion. *J Endocrinol*, 194: 1-7,

2007.

- ③ Katayama T, Shimamoto S, Oda H, Nakahara K, Kangawa K, Murakami N. Glucagon receptor expression and glucagon stimulation of ghrelin secretion in rat stomach. *Biochem Biophys Res Commun*, 357: 865-870, 2007.

2. 学会発表

- ① 村上 昇、中原桂子、寒川賢治：新規摂食関連ペプチドを用いた摂食機構の解析，第 143 回日本獣医学会，シンポジウム，筑波，2007.
- ② 井上賀之、中原桂子、岩永智江、村上 昇：グレリンによる新生児視床下部ニューロンの増殖作用，第 144 回日本獣医学会，北海道，2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

- ① 名称：グレリン及びその誘導体又は GHS-R1a に作用する物質を有効成分とする脊髄神経修復促進治療剤

出願年月日：2007 年 8 月 10 日

出願国：世界

出願番号：PCT/JP2007/065774

発明者（所属）：村上 昇（宮崎大学）、

中原桂子（宮崎大学）、橋本美穂（宮崎大学）、寒川賢治（国立循環器病センター研究所）、林友二郎（第一アスピオファーマ）

- ② 名称：デスアシルグレリン及びその誘導体を有効成分とする脊髄神経修復促進治療剤

出願年月日：2007 年 8 月 10 日

出願国：世界

出願番号：PCT/JP2007/065769

発明者（所属）：村上 昇（宮崎大学）、

中原桂子（宮崎大学）、橋本美穂（宮崎大学）、寒川賢治（国立循環器病センター研究所）、林友二郎（第一アスピオファーマ）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

共同研究者

中原桂子（宮崎大学農学部獣医学科）

糖尿病性ニューロパチーに対するグレリンを用いた新たな治療法の開発

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

糖尿病性ニューロパチーは、糖尿病三大合併症の中でも糖尿病患者のQOLに大きく影響を及ぼすものである。現在の治療薬はいずれも神経障害の進行を阻止する効果は得られるものの、障害神経の修復効果は得られていない。グレリンは、胃内分泌細胞から発見された新規ペプチドで、成長ホルモン分泌促進作用や摂食亢進作用の他に、心不全の際の心筋保護作用なども報告されている。ストレプトゾトシンを投与した糖尿病モデルマウスに合併する糖尿病性ニューロパチーに対し、グレリンを急性または慢性投与したところ末梢神経保護および神経修復作用を認めた。これらの結果から、グレリンは糖尿病性ニューロパチーに対する新規治療法となりうることが示唆された。

A. 研究目的

グレリンは胃内分泌細胞から発見された新規ペプチドで、成長ホルモン（GH）の分泌を促しエネルギー代謝に関与し、また心筋梗塞や心不全の際の心筋保護や再生を促す効果あるいは骨新生を促し骨粗鬆症を予防する効果があり、近年では迷走神経背側運動核の神経成長を促進するという報告もある。我々は糖尿病性ニューロパチーにおける神経障害修復作用をもった治療法の確立を目指し、グレリンによる神経保護および神経修復作用について検討した。さらにグレリンはGHとは無関係に摂食中枢を刺激することが明らかとなっており、今回グレリンの末梢神経への作用がGHと関連があるのかを明らかにするために作用機序について検討した。

B. 研究方法

6週齢のマウスにストレプトゾトシン（STZ）（140mg/kg）を投与し糖尿病モデルマウスを作製した。神経障害の指標としてマウスの坐骨神経および腓腹神経の運動と感覚神経伝導速度を測定した。グレリンによる神経障害予防効果を検討するため、STZ投与開始時よりグレリンを併

用（6mol×2回/日、腹腔内投与）した実験系を確立した。またこの系を用いてグレリンの治療閾値を検討した。次にグレリンによる神経障害修復作用を検討するため、STZ投与8週後の神経障害が完成した後よりグレリンを投与（6mol×2回/日、腹腔内投与）する実験系を確立した。それぞれの実験系において、体重、摂餌量、血糖を測定した。また治療に関与する因子の検討のため、炎症性および酸化ストレスマーカーと血流の変化を検索した。

また、6週齢のグレリン受容体ノックアウト（GHS-R^{-/-}）マウスとGH欠損ラット（SDR; spontaneous dwarf rats）にSTZを投与し、糖尿病モデル動物を作製した。各々のモデル動物において、グレリン投与群（6mol×2回/日、腹腔内投与）と非投与群で坐骨神経伝導速度を1週ごとに測定し、4週まで観察した。

C. 研究結果

STZ単独投与群とSTZとグレリン併用投与群では血糖（27.5±1.3/27.8±1.8 nmol/l）、体重（17.2±2.2/16.4±1.8g）および摂餌量（7.0±0.2/6.8±0.3g/日）において有意差を認

めなかった。STZ 単独投与群の運動神経伝導速度は、投与第 1 週目より低下傾向となり、第 4 週目には $30.9 \pm 3.8 \text{ m/sec}$ と同週齢の正常コントロール群の $40.2 \pm 2.2 \text{ m/sec}$ の約 70% まで低下した。これに対して、グレリン併用群では $39.8 \pm 2.8 \text{ m/sec}$ であり有意な神経伝導速度の低下をきたさなかった。このグレリンの予防効果の閾値は投与量 1 nmol/day であった。神経障害修復作用を検討する系では、STZ 投与 8 週目からグレリン投与を開始した。神経伝導速度はグレリン開始 2 週目から $34.5 \pm 2.5 \text{ m/sec}$ と改善を認め、4 週目には $38.6 \pm 1.5 \text{ m/sec}$ と正常コントロール群のほぼ 90% に回復した。感覚神経伝導速度においてもほぼ同様の結果を得た。正常コントロール群、STZ 単独群および STZ とグレリン併用群において、炎症性マーカーに有意差はみられなかったが、酸化ストレスマーカーの 8-isoprostane は STZ 単独群が $64.7 \pm 10.7 \mu\text{g/ml}$ に対しグレリン併用群では $24.5 \pm 4.6 \mu\text{g/ml}$ と有意に低下していた。

また、GHS-R^{1a} マウスにおいて、STZ 投与を行った群では、投与 2 週目より STZ 非投与のコントロール群に比べて坐骨神経の運動神経伝導速度は有意に低下し、4 週目では投与前よりも低下傾向となった。STZ 投与後グレリンを連日投与した群は、STZ 単独群とほぼ同じ伝導速度の推移を示し、2 週目から伝導速度は低下し改善は示さなかった。さらに GH 欠損ラットでは 6 週齢から 10 週齢にかけて坐骨神経伝導速度は徐々に速くなり、 $31.4 \pm 1.4 \text{ m/s}$ から $46.3 \pm 1.7 \text{ m/s}$ へと充進した。STZ を投与すると伝導速度は 10 週齢では $40.4 \pm 2.1 \text{ m/s}$ で伸びなくなった。STZ 投与後グレリンを投与すると神経伝導速度は速くなり、10 週齢では $45.7 \pm 1.2 \text{ m/s}$ となり、STZ 単独群と明らかな差を示すようになった。この傾向は腓腹神経でも同様にみられ、感覚神経も同様な傾向を示すことが明らかとなった。

D. 考察

グレリンは STZ 誘発の糖尿病性神経障害において、神経伝導速度の低下を抑制し改善することが明らかとなった。グレリン投与群と非投与群との間で、血糖や体重の差はみられず、神経障害を抑制あるいは改善することは糖代謝の改善を介しているものではないと考えられた。グレリン投

与群において、酸化ストレスマーカーや血行力学的有意差が認められたことから、神経障害の予防および改善作用にはグレリンの抗酸化作用や血行改善作用が関与している可能性が示唆された。また、GHS-R^{1a} マウスではグレリンの効果がみられず、GH 欠損ラットではグレリンによる改善効果が認められたことから、グレリンの末梢神経に対する作用は、グレリン受容体を介する作用で GH は関与しないことが示された。

E. 結論

アナボリックペプチドであるグレリンは、STZ 誘発の糖尿病性神経障害を抑制および改善する作用があることが明らかとなった。今後糖尿病性神経障害の新規治療薬として大いに効果を期待できるものである。またグレリンによる末梢神経障害の治療効果は酸化ストレスや血行動態の改善が関与していることが示唆されることから、他疾患における神経障害の治療への応用が期待できるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Toshinai K, Nakazato M. Hormone replacement Up-to-date. Ghrelin, growth hormone and somatopause. Clin Calcium, 17: 1392-1399, 2007.
- ② Yamaguchi H, Sasaki K, Satomi Y, Shimbara T, Kageyama H, Mondal MS, Toshinai K, Date Y, Gonzalez LJ, Shioda S, Takao T, Nakazato M, Minamino N. Peptidomic identification and biological validation of neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2. J Biol Chem, 282: 26354-26360, 2007.
- ③ 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.
- ④ Ueno H, Shiiya T, Mizuta M, Mondal MS, Nakazato M. Plasma ghrelin concentrations in different clinical stages of diabetic complications

and glycemic control in Japanese diabetics.

Endocr J, 54: 895-902, 2007.

- ⑤ Toshinai K, Kawagoe T, Shimbara T, Tobina T, Nishida Y, Mondal MS, Yamaguchi H, Date Y, Tanaka H, Nakazato M. Acute incremental exercise decreases plasma ghrelin level in healthy men. Horm Metab Res, 39: 849-851, 2007.
- ⑥ Ogawa N, Yamaguchi H, Shimbara T, Toshinai K, Kakutani M, Yonemori F, Nakazato M. The vagal afferent pathway does not play a major role in the induction of satiety by intestinal fatty acid in rats. Neurosci Lett, 433: 38-42, 2008.
- ⑦ Mondal MS, Yamaguchi H, Date Y, Tsuruta T, Shimbara T, Toshinai K, Shimomura Y, Mori M, Nakazato M. Ontogeny of a new enteric peptide, neuropeptide W (NPW), in the developing rat stomach. Regul Pept, 145: 141-146, 2008.
- ⑧ Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. Regul Pept, 145: 12-16, 2008.

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

発明名称：成長ホルモン分泌促進因子レセプターに作用する物質または薬物的に許容される塩を有効成分とする糖尿病性神経障害治療剤

出願年月日：2007年5月7日

出願国：世界

出願番号：特願 2007-122897号

発明者（所属）：中里雅光（宮崎大学）、
京楽 格（宮崎大学）、塩見一剛（宮崎大学）、
寒川賢治（国立循環器病センター研究所）、
林友二郎（アスピオファーマ株式会社）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

上部消化管外科領域におけるグレリンの臨床応用

分担研究者 土岐祐一郎 大阪大学大学院医学研究科
外科学講座 消化器外科 准教授

胃癌、食道癌などの上部消化管癌手術に特異的な術後後遺症である体重減少についてその病態とグレリンの関係を検討した。術後7日目までの検討においてデスアシルグレリンは胃全摘で約1/10、幽門側胃切除、食道切除胃管再建で約1/2に減少した。長期経過例の検討においても胃全摘ではグレリンの回復は見られず、幽門側胃切除、食道切除胃管再建では数年の経過をもって回復傾向が見られた。この知見に基づき「胃切除術後患者に対するグレリンの臨床効果に関するランダム化第Ⅱ相臨床試験」を開始した。

A. 研究目的

経口摂取障害、体重減少は上部消化管癌（胃癌、食道癌）手術に特異的な後遺症で、同じ消化器癌手術でも大腸切除や肝臓切除では認められない。胃切除患者団体のアンケートによると「やせ」は胃切除患者の約半数、その中で重症とされるものが約3分の1と最も高頻度かつ重篤な胃切除後障害であった（Medical ASAHI, July 2007:23）。一般に低体重は予後不良因子で、厚生労働省の大規模疫学調査によると中年期無病男女の10年間の経過観察でBMI 19以下の人は喫煙、飲酒などを補正しても約2.5倍の死亡リスクがあると報告されている。（Tsugane S et al. Int J Obes Relat Metab Disord. 26:529-537, 2002）。胃全摘、幽門側切除、食道切除胃管再建の術後患者の約45%、30%、55%がBMI19以下になっている事実より考えると、低体重は上部消化管術後患者の予後を増悪させていることが推測される。

胃切除後の体重減少の原因としては、食事摂取量の低下が最も重要である。ほかに消化機能低下、逆流性食道炎、下痢、腸内細菌叢の変化なども影響しうるが、消化剤や止瀉薬の効果は限定的であり、体重減少の主たる要因ではないと考えられている。一方、摂取栄養量を改善す

るために、食事へ介入して少量・頻回食を遵守させたり、腸瘻で強制栄養すれば、胃切除後の体重の維持はかなりの部分まで可能である。そこで外科的に貯留嚢（パウチ）を作製することによる経口摂取量の増加が試みられたが、実際には長期的な体重維持には効果的ではないという報告が多く、現在パウチ造設術はわが国の殆どの施設で採用されていない。これらの事実より、胃切除後は貯留容積の減少による摂取栄養量の低下ではなく、空腹感の欠如、食欲低下のために十分な食事摂取が行われずに体重が維持できないと推測されるようになった。しかしながら、幾つかの食欲抑制性の消化管ホルモン（コレシストキニン、セクレチンなど）は胃切除後に上昇しているという報告が存在するが、その程度、作用は軽微で積極的に術後体重減少の原因となっているとは考えにくいものであった。

我々は上部消化管癌手術周術期のグレリンと体重変化について検討し、1) 術後早期に血中グレリンが胃全摘術では約1/5~1/10、幽門側切除術、食道切除胃管再建術では約1/2に減少すること、2) 胃全摘では血中グレリンは数年しても回復しないが、幽門側切除術、食道切除胃管再建術では2~5年で正常値まで回復すること、3) 術後の血中グレリン値は術後体重減少と相関す

ることなどを見いだした (Takachi K et al. J Surg Research 130: 1- 7, 2006, Doki Y et al. Surgery 139:797-805, 2006)。上部消化管手術において、体重は術後より急速に減少し、3～6ヶ月まで減少を続け、その後は安定もしくは微増する。現在、術後早期の過度の体重減少に対しでは、点滴などによる強制栄養が唯一の手段である。しかし、手術による急激なグレリン減少が上部消化管術後の体重減少の原因であれば、グレリン投与による経口摂取増加でより生理的に術後体重減少を予防することが期待される。

また、グレリンの多彩な生理学的作用は交感神経緊張抑制作用、同化促進作用と集約され、これは侵襲に対する防御反応としてグレリンが貢献する可能性を示唆している。実際、動物実験の敗血症モデルでは、グレリン投与による予後の改善を認めている。また、グレリン投与が呼吸不全、心不全に対する臨床試験で有効であったということは、呼吸循環動態に著しい影響を与える食道癌手術などの侵襲の大きな手術においてもグレリン投与が有効である可能性を示唆している。外科手術におけるグレリンの変動、外科手術に対するグレリン投与の効果というのは全く検討されていない題目で、グレリン研究における新しい展開が期待される場所である。

B. 研究方法

我々は平成 18 年より臨床試験「胃切除術後患者に対するグレリンの臨床効果に関するランダム化第Ⅱ相臨床試験」を行っている。

<症例選択基準>

1. 胃癌で胃全摘術を施行した症例
2. 治癒切除が行われた症例
3. 年齢20歳から80歳以下の症例
4. 経口摂取が可能な症例
5. 文書による同意の得られている症例

<試験方法>

胃全摘術後経口摂取開始日(術後5～7日)よりグレリン(3μg/kg)もしくは生理食塩水の点滴静注を1日2回を10日間行う。

<評価項目>

食事摂取量、体重、食欲(VAS)、体組成(DEXA)、

基礎代謝、吸収能(13Cオクタノイル酸)など
<症例数と試験期間>

グレリン群10例、プラセボ群10例
2年間

(倫理面への配慮)

インフォームドコンセントについて: 無作為による比較試験の意義について説明の上、理解を求め。また、本試験に不参加の場合でも不利益を受けないこと、自由意志による参加であることを文書のみでなく口頭で説明する。

個人情報の保護について: 本試験では個人情報管理責任者をおき、個人情報の管理を徹底する。登録患者の同定照会は、連結匿名化を行い、認識番号を用いる。直接患者を識別できる情報は、第三者には知りえない。

健康上の不利益が生じた場合について: 被験者に健康被害が生じた場合は、健康被害状況、それに対する治療内容などについて十分な説明を行った上で、一般診療と同様に医師として最善をつくして適切な対処を行う。

C. 研究結果

2008年1月までに19例の試験登録があった。

D. 考察

今回は胃全摘術後を対象にしているが、切除により低下したグレリンを補充するという理にかなった試験で副作用もなく効果も期待される。今後、同様のデザインを食道癌手術後患者や胃切除後長期経過して低体重を訴える外来患者などを対象にした試験を展開し有効性を証明したい。

E. 結論

上部消化管術後のグレリンの臨床応用として臨床試験「胃切除術後患者に対するグレリンの臨床効果に関するランダム化第Ⅱ相臨床試験」を開始した。

F. 健康危険情報

試験登録の19例については、1例に軽度に発汗を認めたのみでグレリン投与による重篤な合併症は認めていない。Informed consentを取得したが、胃全摘の術後合併症のためグレリン投与が出

来なかった症例は数例ある。

G. 研究発表

1. 論文発表

① Doki Y, Okada K, Miyata H, Yamasaki M, Fujiwara Y, Takiguchi S, Yasuda T, Hirao T, Nagano H, Monden M. Long-term and short-term evaluation of esophageal reconstruction using the colon or the jejunum in esophageal cancer patients after gastrectomy. *Dis Esophagus*, 21: 132-138, 2008.

2. 学会発表

① Doki Y. Postoperative bodyweight loss and ghrelin in esophageal cancer patients. THE 20TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM: Physiological Changes and QOL of Cancer Patients after Radical Surgery, Tokyo, 2007.

② 土岐祐一郎、瀧口修司、岡田一幸、藤原義之、宮田博志、山崎誠、細田洋司、寒川賢治：胃切除後体重減少におけるグレリンの意義と臨床応用の可能性について，第79回日本胃癌学会総会，名古屋，2007.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

人工股関節置換術の周術期や機能性摂食不振患者を対象とした グレリン投与臨床第Ⅱ相試験

分担研究者 赤水尚史 京都大学医学研究科
医学部附属病院 探索医療センター 教授

我々はグレリンの成長ホルモン分泌促進作用や摂食亢進作用を利用して高齢者や摂食不振患者に対する治療薬としての臨床応用を図っている。一昨年度、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8月に目標症例32例のグレリン投与を終了した。重篤な有害事象を認めず、現在データ解析中である。また、平成18年度11月に終了したグレリン投与臨床第Ⅱ相試験「摂食不振患者への投与試験」のデータ解析が終了した。主要エンドポイントである一日摂食量は、グレリン投与によって統計的有意な増加傾向が認められた。副次エンドポイントである空腹度はグレリン投与直後有意に上昇し、重篤な有害事象はなかった。以上より、グレリンの安全性と摂食亢進作用が示唆され、摂食不振に対するグレリンの臨床応用に関して更なる検討が必要と考えられた。

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。具体的には高齢者に多い変形性股関節症に対する人工股関節置換術の周術期を対象としたグレリン投与の臨床第Ⅱ相試験を平成17年度から実施することとした。また、食欲増進作用に関しては、機能性摂食不振症における摂食量低下や体重減少に対してグレリンが有効な臨床効果を示すかどうかを検討した。

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、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17年に「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」のプロトコルを作成し、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。

機能性胃腸症 (Functional dyspepsia : FD) やその他の機能性摂食不振を呈する患者を対象としたグレリン反復投与試験 (臨床試験第Ⅱ相) の実施計画書 (プロトコル) を作成し、平成16年に倫理委員会の承認を受けた。

適格規準は、1) FD またはその他の機能性摂食不振と診断された者で、かつ摂食低下 (一日摂取カロリー平均が日本人の栄養所要量 [厚生省が定める「平成12年第6次改定日本人の栄養所要量」に基づく] 以下に低下している者) およびやせを呈する (標準体重以下 [BMI<22]) 者、2) 臨床試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者、3) 一年以内に上部消化管内視鏡にて器質性疾患を否定された者、とした。

除外規準は、1) 摂食低下ややせを来すような器質性疾患、2) 神経性無食欲症、非定型神経性無食欲症、3) 肥満の恐怖やボディイメージのゆがみのある者、4) 習慣性嘔吐を有する者、5) 統合失調症や自殺念慮を有する者、6) 悪性腫瘍の既往のある者、7) 妊婦、授乳者、8) 本試験に影響を及ぼすような薬剤の服用者、などとした。治療計画は、入院の上対象患者に一日2回 (毎朝夕食前)、合成ヒトグレリンを2週間点滴静注 (約30分かけて) した。投与量を3 μ g/kg、目標登録症例数を10例とした。投与前後各1週間は観察期間とし、計4週の入院期間であった。主要エンドポイントは、1日摂食量 (カロリー) とした: 試験薬投与開始前と投与開始2週後の1日摂食エネルギー量の差をそれぞれ3日間の平均で比較した。副次エンドポイントとして、体重、VAS (Visual Analogue Scale) による空腹度スコア、体脂肪率、除脂肪体重、骨塩量 (DEXA法で測定)、血清GH、IGF-1値などの内分泌検査、有害事象の発生を検討した。臨床実施期間は、平成16年7月から平成18年11月であった。データ解析を平成18年度末から平成19年度にか

けて行った。

(倫理面への配慮)

臨床試験の実施に際しては、京都大学医学研究科医の倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

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は、平成17年9月から開始し、平成19年8月に目標症例32例のグレリン投与を終了した。重篤な有害事象を認めなかった。現在、データを解析中である。

平成18年11月に終了したグレリン投与臨床第Ⅱ相試験「摂食不振患者への投与試験」のデータ解析が終了した。6人が登録され、全員FDであった。うち2人はそれぞれうつ病とパニック障害を合併していた。BMIと摂食量の平均はそれぞれ17.6 \pm 1.9 kg/m² と63.2 \pm 17.4% (mean \pm SD) であった。6人中5人は3週間のグレリン投与を完遂したが、1人は投与6日目に退院してグレリン投与中止となった。また、グレリン投与完遂5人のうち、1人は投与終了直後に退院したため、投与終了後1週間の観察ができなかった。グレリン点滴静注投与終了時のグレリンおよびデスアシルグレリン濃度はそれぞれ3425 \pm 1032 fmol/ml and 1037 \pm 249.2 fmol/mlであった。グレリン投与によって、主要エンドポイントである一日摂食量は増加傾向を示したが、統計的有意には達しなかった (1256 \pm 596 Kcal v. s. 1620 \pm 703 Kcal, N=5, P=0.084)。摂食量の増加傾向は投与終了1週間後も持続した (1692 \pm 815 Kcal, N=4)。グレリン投与による空腹度は有意に増加した (N=149, P<0.0001)。その増加は朝 (N=75, P<0.0001)、夕 (N=74, P=0.0002) 共に認められた。体重の変化はなかったが、体組成では体脂肪率に低下傾向、除脂肪率に増加傾向があった。血中IGF-1レベルは増加傾向を示したが、統計的有意差には至らなかった (183 \pm 51 ng/ml v. s. 226 \pm 92 ng/ml, N=5, P=0.091)。重篤な有害事象は全く認めなかった。軽度の有害事象をそれぞれ36事象認め、うち11事象はグレリンと因果関係があると判断されたが、いずれもすでに報告のあるもの (胃腸蠕動運動感、空腹、胃部不快、ほてり、眠気、多汗) でグレリン投与終了後改善した。4事象の中等度有

害事象があったが、グレリンとの因果関係は不明でグレリン投与終了後改善した。血液、臨床化学検査、不安尺度において特に異常を認めなかった。

D. 考察

摂食不振患者への反復投与試験では、グレリン投与によって一日摂食量増加傾向を認めたが、統計的有意には達しなかった。その最大の要因はデータ解析可能症例数が5例と目標の8-10例に比して少なかったことが考えられる。さらに、全症例がFDであったが、一部精神疾患を合併し、不均一な集団であったことも要因として挙げられよう。グレリン投与による有意な空腹度亢進も認められており、グレリンの摂食不振に対する有用性に関して今後の検討が必要と考えられる。また、グレリンの作用は、摂食作用のみならず、消化管運動や食物排出作用にも影響を与える。さらに、グレリン投与終了後1週においても摂食量増加傾向を認めたことからグレリンの慢性作用が示唆される。従って、これらの点に関しても更なる検討を要すると考えられる。

有害事象に関しては2つの臨床試験とも軽度または中等度のものしかなく、それらはグレリン投与終了後ほとんど改善したことから、グレリン反復投与は安全と考えられた。

E. 結論

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完遂した。また、グレリン投与による一日摂食量の増加傾向を認め、グレリン投与直後の有意な空腹度上昇を認めたことから、グレリンの摂食亢進作用が示唆された。有害事象に関しては重篤なものはなく、グレリン治療の安全性が示された。今後、摂食不振に対するグレリン臨床応用の更なる検討が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Akamizu T, Kangawa K. Emerging results of anti-catabolic therapy with ghrelin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10: 278-283, 2007.
- ② Kim TS, Asato R, Akamizu T, Harada D, Nakashima Y, Higashi T, Yamamoto N, Tamura Y, Tamaki H, Hirano S, Tanaka S, Ito J. A rare case of hyperfunctioning papillary carcinoma of the thyroid gland. *Acta Otolaryngol Suppl*, 557: 55-57, 2007.
- ③ Iwakura H, Akamizu T, Ariyasu H, Irako T, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K. Effects of ghrelin administration on decreased growth hormone status in obese animals. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293: E819-E825, 2007.
- ④ Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, Ban Y, Chistiakov DA, Frydecka I, Ghaderi A, Gough SC, Hiromatsu Y, Ploski R, Wang PW, Ban Y, Bednarczuk T, Chistiakova EI, Chojm M, Heward JM, Hiratani H, Juo SH, Karabon L, Katayama S, Kurihara S, Liu RT, Miyake I, Omrani GH, Pawlak E, Taniyama M, Tozaki T, Ioannidis JP. CTLA-4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 92: 3162-3170, 2007.
- ⑤ Hataya Y, Akamizu T, Kanamoto N, Moriyama K, Shimatsu A, Nakao K. A case of subclinical hypothyroidism developing marked pleural effusions and peripheral edema with elevated vascular endothelial growth factor. *Endocr J*, 54: 577-584, 2007.
- ⑥ Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Murayama T, Yokode M, Teramukai S, Seno H, Chiba T, Noma S, Nakai Y, Fukunaga M, Nakai Y, Kangawa K, and FD Clinical Study Team. Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on appetite and food intake. *Eur J Endocrinol*, in press.
- ⑦ Takahashi K, Chin K, Akamizu T, Morita S, Sumi K, Oga T, Matsumoto H, Niimi A, Tsuboi T, Fukuhara S, Kangawa K, Mishima M. Acylated

ghrelin level in patients with obstructive sleep apnoea before and after nasal CPAP treatment.

Respiration, in press.

2. 学会発表

- ① 赤水尚史：グレリン創薬のトランスレーショナルリサーチ，第80回日本整形外科学会学術総会，神戸，2007.
- ② 赤水尚史：甲状腺クリーゼの新たな診断基準の作成，第80回日本内分泌学会学術総会，東京，2007.
- ③ 有安宏之、岩倉浩、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史：加齢に伴うソマトポーズ及び食欲低下に対するグレリン有用性の研究，第34回日本神経内分泌学会，前橋，2007.
- ④ 赤水尚史：甲状腺クリーゼ（赤水班），第50回日本甲状腺学会，神戸，2007.
- ⑤ 五十子大雅、赤水尚史：抗甲状腺剤による治療中に筋肉痛・関節痛を呈したバセドウ病の一例，第50回日本甲状腺学会，神戸，2007.
- ⑥ 南波崇、渡邊幹夫、赤水尚史、岩谷良則：インターロイキン4およびその受容体の遺伝子多型と自己免疫性甲状腺疾患の病態との関連，第50回日本甲状腺学会，神戸，2007.
- ⑦ 赤水尚史：甲状腺クリーゼの診断と治療，第44回日本臨床生理学会，大阪，2007.

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

岩倉 浩（京都大学医学部）

有安宏之（京都大学医学部）

グレリン欠損マウスの作製と解析

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

グレリンは、摂食亢進や脂肪蓄積などの作用を持つエネルギー代謝調節ホルモンである。我々は、糖尿病や肥満症の発症におけるグレリンの作用機構を明らかにするために、グレリン欠損マウスを作出した。野生型マウスとグレリン欠損マウスの比較において、体重と積算摂食量に差は認められず、摂食行動の日内リズムや、制限給餌による摂食量、餌探し課題による学習記憶能にも差は認められなかった。一方、グルコース負荷試験において野生型マウスとグレリン欠損マウスの間に血糖値の差は認められなかった。絶食を行ない、肝臓のアセチル CoA カルボキシラーゼ、脂肪酸合成酵素、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼの遺伝子発現量を検討したが差は認められなかった。しかしグレリン欠損マウスは血圧不安定、体温維持機構の異常、消化管運動の低下、血圧・体温の日内リズム異常など、自律神経系の異常を示す。この自律神経系の異常は視床下部や延髄を中心とした中枢性のものである。

A. 研究目的

研究分担者らは 1999 年に胃組織から、オーファン受容体 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。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。我々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を詳細に検討した。

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詳細に検討した。欠損マウスは通常で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