

20082/03/A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者医療とQOL改善に対する  
グレリンの臨床応用とその基盤的研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21（2009）年3月

研究代表者 寒川 賢治  
国立循環器病センター研究所  
所長

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者医療とQOL改善に対する  
グレリンの臨床応用とその基盤的研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

## 目 次

I. 総括研究報告	
高齢者医療とQOL改善に対するグレリンの臨床応用とその基盤的研究	1
寒川 賢治 (国立循環器病センター 研究所 所長)	
II. 分担研究報告	
1. 新規グレリンアシル基転移酵素の遺伝子発現様式と脂肪酸修飾活性について	12
寒川 賢治 (国立循環器病センター 研究所 所長)	
2. 加齢に伴うソマトポーズおよび食欲低下に対するグレリンの有用性の研究	16
中尾 一和 (京都大学大学院医学研究・内科学講座・内分泌代謝内科 教授)	
3. 高齢ラットにおけるghrelin受容体作動薬の筋、体脂肪、骨塩量に及ぼす作用	18
千原 和夫 (神戸大学大学院医学系研究科・内科学講座・糖尿病・代謝・ 内分泌内科学 客員教授)	
4. 加齢に伴う体脂肪蓄積機序におけるグレリンの役割解析	22
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)	
5. グレリンの分泌制御と恒常性維持への関与	25
村 上 昇 (宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学 教授)	
6. 体重減少をきたした慢性下気道感染症患者におけるグレリン投与の臨床効果	29
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. 上部消化器外科領域におけるグレリンの臨床応用	32
土岐祐一郎 (大阪大学大学院医学系研究科・外科学講座・消化器外科 教授)	
8. 人工股関節置換術周術期や機能的摂食不振患者を を対象としたグレリン投与臨床第Ⅱ相試験	35
赤水 尚史 (京都大学附属病院探索医療センター・探索医療開発部 教授)	
9. グレリン欠損マウスの作製と解析	39
児島 将康 (久留米大学分子生命科学研究所・遺伝子情報部門 教授)	
10. グレリン投与による慢性閉塞性肺疾患治療	42
永谷 憲歳 (国立循環器病センター研究所再生医療部 客員研究員)	

## 高齢者医療と QOL 改善に対するグレリンの臨床応用とその基盤的研究

研究代表者 寒川賢治（国立循環器病センター研究所 所長）

胃から産生・分泌されるホルモンであるグレリンの病態生理学的意義の解明、および高齢者医療と QOL 改善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。グレリンの生物活性発現に重要な脂肪酸修飾と、それを行うアシル転移酵素の遺伝子発現に明らかな関連性を認めなかった。グレリン分泌は、機械的刺激より化学的刺激で抑制されており、環境要因やストレスに対する恒常性維持機構に関与している可能性が示唆された。ラットの加齢に伴う体脂肪蓄積には、成長ホルモン(GH)分泌低下に加え、褐色脂肪組織の機能低下が関与しており、この機序にグレリン/グレリン受容体系が関わっていた。高齢ラットへのグレリン受容体作動薬 GHRP-2 低用量持続投与では明らかな変化を認めなかったが、高用量では骨塩量が増加し、ヒラメ筋筋線維断面積が減少した。デアシルグレリンを過剰発現するトランスジェニックマウスでは成長、体組成、摂食、GH/IGF-1 系に異常を認めなかったが、インスリン感受性は亢進していた。グレリン欠損マウスでは消化管運動の機能低下、体温低下と体温の日内変動リズム消失、体温基礎値の大きな変動といった自律神経機能異常を認めた。体重減少を伴う慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者を対象として、グレリンの臨床効果を評価するための二重盲検無作為化比較試験 (RCT) を開始しており症例を集積中である。変形性股関節症に対する人工股関節置換術後の患者を対象にした RCT では、グレリン投与群で有意な血清 IGF-1 濃度の上昇、体脂肪量の減少、除脂肪体重の増加を認めしたが、筋力、歩行速度には差を認めなかった。胃切除術後患者に対する RCT では、グレリン投与群で摂食量、食欲、体重が有意に増加しており、除脂肪体重の減少が抑制された。慢性下気道感染症患者に対するグレリンの反復投与試験では、摂食量、体重、血清蛋白の上昇、酸素化能や運動耐容能の改善、喀痰量や痰中好中球数の減少、痰中の炎症性サイトカイン濃度の低下を認めた。本年度は、グレリンの自律神経障害への病態生理学的意義の解明、グレリンアシル化酵素と酵素活性、グレリンの分泌調節機構、加齢による脂肪蓄積や食欲低下に対する改善効果などの基礎的な研究成果に加えて、COPD、慢性下気道感染症、人工股関節置換術後、胃切除後の患者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 所長)
- 中尾 一和 (京都大学大学院医学研究科 内科学講座 内分泌代謝内科 教授)
- 千原 和夫 (神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 糖尿病・代謝・内分泌内科学 客員教授)
- 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)
- 土岐祐一郎 (大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 消化器外科学 教授)
- 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)
- 児島 将康 (久留米大学分子生命科学研究科 遺伝情報研究部門 教授)
- 永谷 憲歳 (国立循環器病センター研究所 再生医療部 客員研究員)

## 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、その血中濃度は哺乳類では思春期をピークとして以降減少する。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(QOL)を低下させる大きな要因となることから、超高齢化社会を迎える我が国において重要な問題として注目されている。研究代表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

らひに免疫系の調節にも作用する。以上より、老化現象や高齢者のQOLを低下させる要因である骨・筋量の低下、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とグレリン作用の減弱が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、高齢者医療とQOL改善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高齢者医療とQOL改善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) 新規グレリンアシル基転移酵素の遺伝子発現様式と脂肪酸修飾活性について。
- 2) グレリンの分泌制御と恒常性維持への関与。
- 3) 体重減少をきたした慢性下気道感染症患者におけるグレリン投与の臨床効果。
- 4) 加齢に伴う体脂肪蓄積機序におけるグレリンの生理的役割の検討。
- 5) 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の有用性の検討。
- 6) 高齢ラットにおけるグレリン受容体作動薬の筋、体脂肪、骨塩量に及ぼす作用の検討。
- 7) 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。
- 8) 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。
- 9) 上部消化管外科領域におけるグレリンの臨床応用。
- 10) 体重減少をきたした慢性閉塞性肺疾患患者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) 新規グレリンアシル基転移酵素の遺伝子発現様式と脂肪酸修飾活性について

寒川は、グレリンの生合成および生物活性発現に重要なステップである脂肪酸修飾化と、それを行うアシル基転移酵素 (Ghrelin O-acyltransferase: GOAT) の遺伝子発現について検討した。ラット出生後の成長発達において、胃組織でのグレリンおよび GOAT 遺伝子の発現は、生後 1 週目まで低く、その後増加を認め、思春期前の 5 週齢にはほぼ頂値となった。胃でのグレリンのペプチド量および遺伝子発現と GOAT 遺伝子発現は、ほぼ一致した経時的变化を示した。48 時間絶食により、胃グレリンのペプチド量はほぼ半減し、血漿グレリン濃度は上昇した。オクタン酸水による飼育によって、脂肪酸修飾を受けた胃グレリンのペプチド量は有意に増加したが、グレリンのペプチド総量には変化を認めなかった。高脂肪食負荷では脂肪酸修飾を受けた胃グレリンのペプチド量は変化しなかったが、グレリンのペプチド総量は減少した。しかし、絶食、オクタン酸水での飼育、高脂肪食負荷のいずれにおいても、グレリンおよび GOAT の遺伝子発現は変化を示さなかった。これらの結果から、グレリンの脂肪酸修飾と GOAT 遺伝子発現に明らかな関連性を見出すことは出来なかった。

### 2) グレリンの分泌制御と恒常性維持への関与

村上は、グレリンの分泌制御機構を明らかにする目的で、ラットの胃に装着したカニューレを介して種々の物質や栄養物を投与し、血中グレリンの変動を調べた。また、低温、高温暴露、拘束ストレス下などの外部要因のグレリン分

泌への影響を調べた。絶食ラットに、トウモロコシ油、20%グルコースおよび 20%エタノールを投与するとグレリン分泌の著しい抑制が認められた。抑制の強さと持続時間はエタノール>グルコース>トウモロコシ油の順であった。一方、空気や水の投与による胃の伸張作用では有意な抑制は認められなかった。自由給餌ラットを高温に暴露した時、グレリン濃度の著しい増加が認められ、一方、低温暴露や拘束ストレスでは、有意な減少が認められた。以上の結果から、グレリン分泌は機械的刺激より化学的刺激で抑制されていることや、環境要因やストレスに対する恒常性維持機構に関与している可能性が推測された。

### 3) 体重減少をきたした慢性下気道感染症患者におけるグレリン投与の臨床効果

中里は、体重減少をきたした慢性下気道感染症患者におけるグレリン投与の臨床効果について検討した。平均年齢 73.3 歳、平均 BMI 15.8 の患者 7 名に合成ヒトグレリン 2  $\mu$ g/kg を 2 回/日で 3 週間経静脈的に投与した。投与後に摂食量、体重、血清蛋白や内臓蛋白 (総蛋白、プレアルブミン、レチノール結合蛋白、トランスフェリン) が有意に上昇し、酸素化能 (AaD02) および 6 分間歩行距離で評価した運動耐容能が有意に改善した。喀痰量や痰中好中球数は有意に減少し、痰中の炎症性サイトカイン濃度 (IL-8、TNF- $\alpha$ ) も有意に低下した。以上の結果から、グレリン投与は慢性下気道感染症患者の栄養状態改善と気道炎症抑制に有効であり、新規治療法として期待できる。

### 4) 加齢に伴う体脂肪蓄積機序におけるグレリンの生理的役割の検討

芝崎は、中年期以降の体脂肪増加機序におけるグレリンの関与の有無を加齢に伴う生理的な GH 分泌低下との関連を含めて検討した。これまでにグレリンの脳室内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認め、グレリンは BAT の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を明らかにした。また、このグレリン投与の効果は加齢に伴い減弱すること、グレリンの視床下部室傍核および弓状核

への局所投与がBATのNA分泌を抑制することを明らかにしてきた。本年度は、外因性のグレリンによる摂食促進作用は加齢に伴い変化する一方で、グレリン受容体(GHSR)拮抗薬を用いた実験結果から、内因性のグレリンによるBATのNA分泌抑制作用は加齢ラットでは若年ラットと同様に維持されていることを明らかにした。これらの研究結果から、加齢ラットでは内因性グレリンの分泌が高まっているため外因性のグレリンに対する感受性が低下している可能性が考えられ、加齢に伴う体脂肪蓄積機序には、従来から示唆されているGH分泌低下に加え、BATの機能低下の関与の可能性が示唆され、この機序にグレリン/GHSR系が関わっていると推測された。

#### 5) 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の有用性の検討

中尾は、グレリンがアシル基を失ったデスアシルグレリンの病態生理的意義を明らかにするため、デスアシルグレリンを肝臓で過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを開発し、そのフェノタイプを解析した。Tgマウスは野生型(Wt)マウスの約100倍の血中デスアシルグレリン濃度を有していた。TgマウスはWtマウスに比して成長、体組成、摂食、GH/IGF-1系には差がみられないが、ITTにおいてインスリン感受性が有意に亢進していた。以上の結果より、デスアシルグレリンはインスリン感受性を亢進する可能性が示唆された。

#### 6) 高齢ラットにおけるグレリン受容体作動薬の筋、体脂肪、骨塩量に及ぼす作用の検討

千原は、高齢者における sarcopenia、osteopenia 等体組成異常に対するグレリンの臨床応用の可能性を検討する目的で、高齢ラットにおけるグレリン受容体作動薬 GHRP-2 の筋、体脂肪、骨塩量に及ぼす効果を検討した。GHRP-2 (10 および 100  $\mu$ g/kg) の投与は、18 ヶ月齢の SD 系雄ラットにおいて、摂食量、体重、内臓脂肪量、皮下脂肪量、除脂肪体重に変化を及ぼさなかった。また、血中 GH、IGF-1、グレリン値にも明確な影響を与えなかった。一方、100  $\mu$ g/kg の GHRP-2 投与により骨塩量の増加

が観察された。また、100  $\mu$ g/kg の GHRP-2 は atrogen-1、MuRF 1 mRNA 発現には影響を及ぼさなかったが、ヒラメ筋筋線維断面積を減少させた。GHRP-2 の慢性投与によるグレリン受容体の脱感作が種々の臓器でおこっていた可能性も否定できず、さらにその効果を検討する必要がある。

#### 7) 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 に整えた上で摂食量、体重、糖代謝、脂質代謝、自律神経機能等を解析した。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が自律神経系の異常を来すことを見いだした。睡眠・覚醒によって血圧・心拍や体温は変化するが、グレリン欠損マウスではその変動の幅が狭く、また基礎的な値の変動が著しかった。さらに血圧・心拍数の日内リズムが欠如し、血圧・心拍数が不安定で変動が大きかった。また、消化管運動の機能低下が見られ、体温低下と体温の日内変動リズム消失、体温基礎値の大きな変動を認めた。グレリン欠損マウスにグレリンを投与すると体温低下が抑制された。中枢性摂食異常症の患者は単に摂食障害だけでなく、その他の様々な異常を訴える。これらは血圧・体温・消化管機能などの自律神経系の異常が多く、今回のグレリン欠損マウスの表現型との関連が興味深い。

#### 8) 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。人工股関節置換術周術期患者に術前 1 週、術後 2 週、計 3 週間、2  $\mu$ g/kg のグレリンまたはプラセボを 1 日 2 回静脈内投与し、day36 まで入院観察した。32 名(男性 7 名、女性 25 名、平均年齢 60.4 歳、平均 BMI 22.3、平均 HbA1c 5.3%) が参加し、31 名で投与終了した。グレリン群で、有意な血清 IGF-1 濃度の上昇、体脂肪量の減少、除脂肪体重の増加を認めたが、筋

力、歩行速度には差を認めなかった。重篤な有害事象はなかった。今後、高齢者や術後カタボリズムに対するグレリン臨床応用に関して、対象疾患や試験デザインの大幅な変更を含めた検討を要すると考えられた。

#### 9) 上部消化管外科領域におけるグレリンの臨床応用

土岐は、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グレリンの減少が関与している可能性を明らかにしてきた。そこで、術後にグレリンを投与することにより体重減少を予防することが可能であるか否かについて、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」を行い検討した。胃全摘患者 20 名をグレリン投与群 (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  1 日 2 回 10 日間) とプラセボ群にランダム割り付けし、食事摂取カロリー、食欲 (VAS)、体重、体組成を計測した。食事摂取カロリー (14.3 vs 11.8 kcal/kg/day,  $p=0.030$ )、食欲 (5.9 vs 4.1 cm,  $p=0.032$ )、体重 (10 日目 99.1% vs 96.8%,  $p=0.044$ ) といずれもグレリン群の方が有意に優れていた。体組成では、プラセボ群は脂肪体重、除脂肪体重とも減少したのに対し、グレリン群では除脂肪体重の減少は有意ではなかった。以上より、胃全摘後の体重減少予防にグレリン投与が有効であることが示された。

#### 10) 体重減少をきたした慢性閉塞性肺疾患患者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、グレリン投与によるパイロット臨床試験を行い、血清 GH 濃度の上昇、交感神経活動の抑制、摂食亢進、体重増加、呼吸筋力と運動耐容能の改善を認めた。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 2005 年 8 月から開始し、2009 年 1 月までに国立病院機構刀根山病院 20 例、奈良県立医科大学 5 例、宮崎大学 7 例の計 32 例の臨床試験が完了した。自覚症状として胃腸の蠕動亢進感 (3 例)、口渇感 (1 例)、空腹感 (3 例)、

ほかほか感 (3 例)、気分不良 (1 例) を認めた。また、試験薬投与後に有害事象として 2 例発生し (細菌性肺炎、抑うつ状態の増悪)、投与中止となったが、いずれも軽症かつ速やかに改善した。その他臨床検査値異常として低蛋白血症 (2 例)、高脂血症 (1 例) を認めたが、いずれも投与終了後に速やかに改善した。臨床試験予定期間は 2009 年 3 月までであり、その後キーオープンを行い、グレリンの有用性、安全性について検討を行う。

#### E. 結論

本年度は、グレリンの病態生理学的意義の解明、および高齢者医療や QOL 改善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、最近発見されたグレリンアシル化酵素の遺伝子発現と脂肪酸修飾活性についてさまざまな病態における意義を明らかにし、グレリン分泌は機械的刺激より化学的刺激で抑制されていることや、環境要因やストレスに対する恒常性維持機構に関与している可能性を明らかにした。また、デスアシルグレリンがインスリン感受性を亢進する可能性を示した。加齢に伴う体脂肪蓄積、筋量減少、食欲低下には GH 分泌低下や褐色脂肪細胞の機能低下が関与し、グレリン/グレリン受容体の経路が重要であることを明らかにした。これらの基礎研究の成果により、グレリンやグレリン受容体作動薬は加齢変化に対する新しい治療法となる可能性が示唆され、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、グレリンの自律神経機能調節に対する病態生理学的重要性が示され、グレリンの新たな生理作用や自律神経障害への創薬の方向性が示された。臨床研究分野では、「慢性下気道感染症に対する臨床効果」、「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」、「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」「胃切除術後患者に対するグレリンの臨床効果」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た。

現在、症例を蓄積中のものもあるが、一部の臨床試験は終了しており、グレリンの有益な臨床効果を確認している。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筋・骨代謝、糖・脂質代謝、さらには免疫の調節など多岐にわたっている。本年度は、グレリンのもつ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や QOL 低下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、デスアシルグレリンの生理作用やシグナル伝達経路の解明、グレリンアシル化酵素へのアプローチ、および老化に起因する病態とグレリンとの関連を解明し、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. Iwasaki E, Suzuki H, Sugino Y, Iida T, Nishizawa T, Masaoka T, Hosoda H, Kangawa K, Hibi T. Decreased levels of adiponectin in obese patients with gastroesophageal reflux evaluated by videoesophagography: possible relationship between gastroesophageal reflux and metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*, 23: S216-221, 2008.
2. Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Murayama T, Sumi E, Teramukai S, Goto K, Ohnishi E, Akiyama H, Kawanabe K, Nankaku M, Ichihashi N, Tsuboyama T, Tamai K, Kataoka M, Nakamura T, Kangawa K. Osteoarthritis-Total Hip Replacement Clinical Study Team. Effects of ghrelin treatment on patients undergoing total hip replacement for osteoarthritis: different outcomes from studies in patients with cardiac and pulmonary cachexia. *J Am Geriatr Soc*, 56: 2363-2365, 2008.
3. 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 OSA before and after nasal CPAP treatment. *Respirology*, 13: 810-816, 2008.
4. Fukumoto K, Nakahara K, Katayama T, Miyazatao M, Kangawa K, Murakami N. Synergistic action of gastrin and ghrelin on gastric acid secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 374: 60-63, 2008.
5. Schwenke DO, Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Shirai M, Cragg PA, Kangawa K. Early ghrelin treatment after myocardial infarction prevents an increase in cardiac sympathetic tone and reduces mortality. *Endocrinology*, 149: 5172-5176, 2008.
6. Kodama T, Ashitani J, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin treatment suppresses neutrophil-dominant inflammation in airways of patients with chronic respiratory infection. *Pulm Pharmacol Ther*, 21: 774-779, 2008.
7. Tanaka K, Morinobu S, Ichimura M, Asakawa A, Inui A, Hosoda H, Kangawa K, Yamawaki S. Decreased levels of ghrelin, cortisol, and fasting blood sugar, but not n-octanoylated ghrelin, in Japanese schizophrenic inpatients treated with olanzapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32: 1527-1532, 2008.
8. Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Efficacy of ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiological changes. *Endocrinology*, 149: 3722-3728, 2008.
9. 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, FD Clinical Study Team. Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on food

- intake and appetite. *Eur J Endocrinol*, 158: 491-498, 2008.
10. Yamamoto H, Kouhara H, Iida K, Chihara K, Kasayama S. A novel growth hormone receptor gene deletion mutation in a patient with primary growth hormone insensitivity syndrome (Laron syndrome). *Growth Horm IGF Res*, 18: 136-142, 2008.
  11. Chihara K, Kato Y, Shimatsu A, Tanaka T, Kohno H. Efficacy and safety of individualized growth hormone treatment in adult Japanese patients with growth hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res*, 18: 394-403, 2008.
  12. Herningtyas EH, Okimura Y, Handayani AV, Yamamoto Y, Maki T, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K. Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogin-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochim Biophys Acta*, 1780: 1115-1120, 2008.
  13. Ikeshita N, Kawagishi M, Shibahara H, Toda K, Yamashita T, Yamamoto D, Sugiyama Y, Iguchi G, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Identification and Analysis of Prophet of Pit-1-Binding Sites in Human Pit-1 Gene. *Endocrinology*, 149: 5491-5499, 2008.
  14. Kaji H, Yamauchi M, Chihara K, Sugimoto T. Relationship between endogenous parathyroid hormone and bone metabolism/geometry in female patients treated with glucocorticoid. *Horm Metab Res*, 40: 60-65, 2008.
  15. Inoue Y, Kaji H, Hisa I, Tobimatsu T, Naito J, Iu MF, Sugimoto T, Chihara K. Vitamin D status affects osteopenia in postmenopausal patients with primary hyperparathyroidism. *Endocr J*, 55: 57-65, 2008.
  16. Takahashi M, Takahashi Y, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kitazawa R, Iida K, Okimura Y, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K. Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett*, 582: 573-578, 2008.
  17. Kaji H, Yamauchi M, Chihara K, Sugimoto T. Glucocorticoid excess affects cortical bone geometry in premenopausal, but not postmenopausal, women. *Calcif Tissue Int*, 82: 182-190, 2008.
  18. Chihara K, Kato Y, Kohno H, Takano K, Tanaka T, Teramoto A, Shimatsu A. Safety and efficacy of growth hormone (GH) during extended treatment of adult Japanese patients with GH deficiency (GHD). *Growth Horm IGF Res*, 18: 307-317, 2008.
  19. Takahashi Y, Iida K, Takeno R, Kitazawa R, Kitazawa S, Kitamura H, Fujioka Y, Yamada H, Kanda F, Ohta S, Nishimaki K, Fujimoto M, Kondo T, Iguchi G, Takahashi K, Kaji H, Okimura Y, Chihara K. Hepatic failure and enhanced oxidative stress in mitochondrial diabetes. *Endocr J*, 55: 509-514, 2008.
  20. Kaji H, Naito J, Inoue Y, Sowa H, Sugimoto T, Chihara K. Statin Suppresses Apoptosis in Osteoblastic Cells: Role of Transforming Growth Factor-beta-Smad3 Pathway. *Horm Metab Res*, 40: 746-751, 2008.
  21. Imanaka M, Iida K, Murawaki A, Nishizawa H, Fukuoka H, Takeno R, Takahashi Y, Okimura Y, Kaji H, Chihara K. Growth hormone stimulates mechano growth factor expression and activates myoblast transformation in C2C12 cells. *Kobe J Med Sci*, 54: E46-54, 2008.
  22. Hisa I, Kaji H, Inoue Y, Sugimoto T, Chihara K. Fasting plasma glucose levels are related to bone mineral density in postmenopausal women with primary hyperparathyroidism. *Int J Clin Exp Med*, 1: 319-326, 2008.
  23. 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.
24. 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: 165-71, 2008.
  25. Toda K, Yamamoto D, Fumoto M, Ikeshita N, Hemingtyas 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.
  26. Kodama T, Ashitani J, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin treatment suppresses neutrophil-dominant inflammation in airways of patients with chronic respiratory infection. *Pulm Pharmacol Ther*, 21: 774-779, 2008.
  27. Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept*, 145: 12-16, 2008.
  28. Makino T, Doki Y, Miyata H, Yasuda T, Yamasaki M, Fujiwara Y, Takiguchi S, Higuchi I, Hatazawa J, Monden M. Use of (18)F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography to evaluate responses to neo-adjuvant chemotherapy for primary tumor and lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery*, 144: 793-802, 2008.
  29. Takeno A, Takemasa I, Doki Y, Yamasaki M, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Matsubara K, Monden M. Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. *Br J Cancer*, 99: 1307-1315, 2008.
  30. Zhang Y, Fujiwara Y, Doki Y, Takiguchi S, Yasuda T, Miyata H, Yamazaki M, Ngan C Y, Yamamoto H, Ma Q, Monden M. Overexpression of tyrosine kinase B protein as a predictor for distant metastases and prognosis in gastric carcinoma. *Oncology*, 75: 17-26, 2008.
  31. Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yamasaki M, Sohma I, Gotoh K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Uchiyama Y, Monden M. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers. *Int J Oncol*, 33: 461-468, 2008.
  32. Yoshioka A, Miyata H, Doki Y, Yasuda T, Yamasaki M, Motoori M, Okada K, Matsuyama J, Makari Y, Sohma I, Takiguchi S, Fujiwara Y, Monden M. The activation of Akt during preoperative chemotherapy for esophageal cancer correlates with poor prognosis. *Oncol Rep*, 19: 1099-1107, 2008.
  33. Okada K, Yano M, Doki Y, Azama T, Iwanaga H, Miki H, Nakayama M, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Ishida N, Monden M. Injection of LPS causes transient suppression of biological clock genes in rats. *J Surg Res*, 145: 5-12, 2008.
  34. Miyata H, Doki Y, Yasuda T, Yamasaki M, Higuchi I, Makari Y, Matsuyama J, Hirao T, Takiguchi S, Fujiwara Y, Monden M. Evaluation of clinical significance of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in superficial squamous cell carcinomas of the thoracic esophagus. *Dis Esophagus*, 21: 144-150, 2008.
  35. 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.
  36. Iwakura H, Ariyasu H, Kanamoto N, Li Y, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Establishment Novel Mouse Model of Neuroblastoma. *Int J Oncol*, 33: 1195-1199, 2008.

37. 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. *Respirology*, 13: 810-816, 2008.
38. Kojima M. The discovery of ghrelin--a personal memory. *Regul Pept*, 145:2-6, 2008.
39. Kojima M, Ida T, Sato T. Structure of mammalian and nonmammalian ghrelins. *Vitam Horm*, 77:31-46, 2008.
40. Kojima M, Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ*, 46:89-115, 2008.
41. Miyazato M, Mori K, Ida T, Kojima M, Murakami N, Kangawa K. Identification and functional analysis of a novel ligand for G protein-coupled receptor, Neuromedin S. *Regul Pept*, 145:37-41, 2008.
42. Sato T, Kurokawa M, Nakashima Y, Ida T, Takahashi T, Fukue Y, Ikawa M, Okabe M, Kangawa K, Kojima M. Ghrelin deficiency does not influence feeding performance. *Regul Pept*, 145:7-11, 2008.
43. Miura T, Maruyama K, Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K. Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides*, in press.
44. Kaiya H, Furuse M, Miyazato M, Kangawa K. Current knowledge of the roles of ghrelin in regulating food intake and energy balance in birds. *Gen Comp Endocrinol*, in press.
45. Yano Y, Toshinai K, Inokuchi T, Kangawa K, Shimada K, Kario K, Nakazato M. Plasma des-acyl ghrelin, but not plasma HMW adiponectin, is a useful cardiometabolic marker for predicting atherosclerosis in elderly hypertensive patients. *Atherosclerosis*, in press.
46. Nakazato M, Kawagoe T, Shimbara T, Toshinai K, Date Y, Mondal MS, Kangawa K, Matsuo H, Matsukura S. Ghrelin: a novel peptide hormone involved in the regulation of growth hormone secretion and energy balance. *Endocr J*, in press.
47. Yano Y, Toshinai K, Inokuchi T, Shimada K, Kario K, Nakazato M. Plasma Des-acyl ghrelin level, but not HMW adiponectin, is a proper risk calculator for predicting atherosclerosis in elderly hypertensive patients. *Atherosclerosis*, in press.
48. Nakazato M. Ghrelin: A peripheral hunger-signalling molecule. *J Brain Sci*, in press.
2. 学会発表
1. 眞野あすか、岩寄あずさ、芝崎 保：グレリンの褐色脂肪組織におけるノルアドレナリン分泌抑制作用への加齢の影響，第 81 回日本内分泌学会学術総会，青森，2008。
  2. 眞野あすか、岩寄あずさ、芝崎 保：高脂肪摂取下のエネルギー代謝調節機構におけるグレリンの役割の解明，第 35 回日本神経内分泌学会学術集会，東京，2008。
  3. 福元 香、中原桂子、安田達司、宮里幹也、寒川賢治、村上 昇：グレリン分泌への胃内容物による選択的抑制制御と自律神経系制御の可能性，第 146 回日本獣医学会，宮崎，2008。
  4. 井上賀之、中原桂子、宮里幹也、寒川賢治、村上 昇：ラット胎児と新生児の培養神経細胞に対するグレリンとデアシルグレリンの増殖作用の相違，第 146 回日本獣医学会，宮崎，2008。
  5. Iwakura H, Ariyasu H, Irako T, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T: Effects of Ghrelin Administration on Glucose Metabolism and beta Cell Mass in Rats with Partial Pancreatectomy. The Endocrine Society's Annual Meeting, San Francisco, June 15-18, 2008.
  6. Ohwada R, Hotta M, Akamizu T, Shibusaki T, Kangawa K, Takano K: The Effect of Ghrelin on Appetite, Food Intake and Nutritional Parameters in Patients with Anorexia Nervosa, The Endocrine Society's Annual Meeting, San

Francisco, June 15-18, 2008.

7. Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K: Administration of Ghrelin to Patients with Functional Anorexia: Its Effects on Appetite and Food Intake. 13<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Rio de Janeiro, Brazil, Nov. 08-12, 2008.
  8. 赤水尚史: 機能性摂食不振患者に対するグレリン反復投与 (臨床第 II 相試験), 第 81 回日本内分泌学会学術総会, H20 年 5 月 16 日~18 日, ホテル青森, 青森市文化会館.
  9. 堀田眞理, 赤水尚史, 大和田里奈, 高野加寿恵, 芝崎保, 寒川賢治: グレリンの神経性食欲不振患者の食欲と栄養状態の改善に及ぼす効果, 第 81 回日本内分泌学会学術総会, H20 年 5 月 16 日~18 日, ホテル青森, 青森市文化会館.
  10. 有安宏之, 岩倉浩, 山田豪, 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 81 回日本内分泌学会学術総会, H20 年 5 月 16 日~18 日, ホテル青森, 青森市文化会館.
  11. 山田豪, 有安宏之, 岩倉浩, 荒井宏司, 寒川賢治, 赤水尚史, 中尾一和: des-acyl Ghrelin 過剰発現トランスジェニックマウスを用いた des-acyl Ghrelin の生理的意義に関する検討, 第 81 回日本内分泌学会学術総会, H20 年 5 月 16 日~18 日, ホテル青森, 青森市文化会館.
  12. 岩倉浩, 有安宏之, 五十子大雅, 細田公則, 中尾一和, 寒川賢治, 赤水尚史: NOD マウスへのグレリン長期投与の検討, 第 81 回日本内分泌学会学術総会, H20 年 5 月 16 日~18 日, ホテル青森, 青森市文化会館.
  13. 岩倉浩, 有安宏之, 五十子大雅, 細田公則, 中尾一和, 寒川賢治, 赤水尚史: ラット膵部分切除モデルに対するグレリン投与による効果の検討, 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会, H20 年 5 月 22 日~24 日, 東京国際フォーラム.
  14. Akamizu T: Clinical Applications of Ghrelin. The 5<sup>th</sup> International Forum on Progressive Endocrinology, I'FOPE 2008. Metabolic Syndrome, H20 年 5 月 24 日, 読売ホール.
  15. 堀田眞理, 赤水尚史, 大和田里奈, 芝崎保, 寒川賢治: グレリンの神経性食欲不振患者の食欲と摂食量の改善に及ぼす効果, 第 35 回日本神経内分泌学会, 第 23 回日本下垂体研究会合同学術集会, 平成 20 年 8 月 28 日~30 日, 政策研究大学院大学.
  16. 大和田里奈, 赤水尚史, 堀田眞理, 高野加寿恵, 芝崎保, 寒川賢治: グレリンの神経性食欲不振患者の栄養マーカーの改善に及ぼす効果, 第 35 回日本神経内分泌学会, 第 23 回日本下垂体研究会合同学術集会, 平成 20 年 8 月 28 日~30 日, 政策研究大学院大学.
  17. 井田隆徳, 児島将康: 制限給餌下での予知行動に対するニューロメジン U の関与について, 第 146 回日本獣医学会学術集会, 平成 20 年 9 月 25 日, 宮崎.
  18. 井田隆徳, 児島将康: ニューロメジン S 遺伝子欠損マウスの機能解析, 第 81 回日本内分泌学会学術集会, 平成 20 年 5 月 17 日, 青森.
  19. 佐藤貴弘, 児島将康: グレリンによる自律神経機能の調節メカニズムの解明, 第 81 回日本内分泌学会学術集会, 平成 20 年 5 月 16 日, 青森.
  20. 佐藤貴弘, 児島将康: グレリン遺伝子欠損マウスからグレリンの生理機能を探る, 第 35 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本下垂体研究会合同学術集会, 平成 20 年 8 月 29 日, 東京.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
    1. 発明名称: 伴侶動物のグレリンによる治療方法  
出願年月日: 2009 年 3 月上旬 (予定)  
出願国: 世界  
発明者 (所属): 村上 昇 (宮崎大学), 中原桂子 (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. 発明名称: グレリン及びその誘導体又は成長ホルモン分泌促進因子レセプター1a アゴニストを有効成分とする慢性呼吸器感染症治療剤

出願年月日: 2008年3月28日

出願国: 日本

出願番号: 特願 2008-88324号

発明者(所属): 中里雅光(宮崎大学)、  
芦谷淳一(宮崎大学)、  
小玉 剛士(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

## 新規グレリンアシル基転移酵素の遺伝子発現様式と 脂肪酸修飾活性について

研究分担者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 所長

グレリン (Ghrelin) は主に胃から分泌される生理活性ペプチドで、特徴的な脂肪酸修飾を受ける。最近、この脂肪酸を修飾する酵素 (グレリンアシル基転移酵素、Ghrelin O-acyltransferase: GOAT) が同定された。本研究では、グレリン生合成の重要なステップである脂肪酸修飾化と GOAT の遺伝子発現との関連について、ラット胃組織を用いて検討した。ラット出生後の成長発達において、胃でのグレリンのペプチド量および遺伝子発現と GOAT 遺伝子発現は、ほぼ一致した経時的变化を示した。一方、絶食状態や高脂肪食およびオクタン酸水による飼育によって、胃グレリンのペプチド量や脂肪酸修飾化に有意な変化を認めたものの、グレリンおよび GOAT の遺伝子発現は変化を示さなかった。これらの結果から、グレリンの脂肪酸修飾と GOAT 遺伝子発現に明らかな関連性を見出すことは出来なかった。

### A. 研究目的

グレリンはアミノ酸 28 個からなるペプチドで、N 末端から 3 番目のセリン残基 (Ser3) が脂肪酸のオクタン酸 (C8:0) によって修飾された特徴的な構造を有している。この脂肪酸修飾基はグレリンの生物活性発現に必須であり、これまでの生理活性ペプチドに見られない構造をしている。最近、グレリンに脂肪酸を修飾するアシル基転移酵素

(Ghrelin O-acyltransferase: GOAT) も同定された。グレリンは主に胃から分泌され、成長ホルモン分泌促進作用をはじめ、摂食促進作用や脂肪蓄積効果、消化管機能調節などエネルギー代謝調節に対して重要な作用をもつ。血中グレリン濃度は飢餓や絶食時に上昇し、食後や肥満などの栄養過多のときには低下を認め、このことはエネルギーバランスの変化に対して代償的にグレリン分泌調節が行われていることを示唆している。グレリンの生合成および分泌調節機構を明らかにすることはエネルギー代謝調節機構の解明に役立つものと思われる。本研究では、グレリン生合成の重要なステップである脂肪酸修飾化と新たに同定された GOAT の遺伝子発現の関連について、ラットを用い

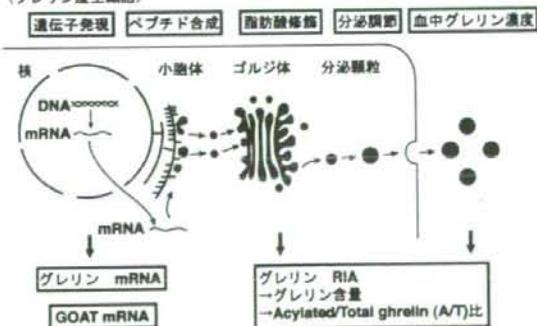
て生理的および幾つかのエネルギーバランスを変化させた栄養状況下において検討した。

### B. 研究方法

#### 【1】ラット胃におけるグレリンおよび GOAT 遺伝子の出生後経時的变化

内分泌細胞内において合成されたペプチドホルモンは分泌顆粒に貯蔵され、刺激に応じて血中に放出される。グレリンに特異的な脂肪酸修飾は、恐らく小胞体で行われる。グレリンの生合成は主に 3 つのステップで調節されている。すなわち、

(グレリン産生細胞)



(図1) グレリン生合成機構

①遺伝子発現とその転写翻訳、②脂肪酸修飾、③血中への分泌調節である(図1)。本研究では、胃組織におけるグレリンおよびGOATの遺伝子発現を定量的PCR法で、胃や血中のグレリン含量をラジオイムノアッセイ(RIA)法を用いて測定した。このRIAは我々がすでに開発したものであり、アシル基のあるグレリンN末端側を特異的に認識する抗体を用いて得られた値をAcylated ghrelin、脂肪酸修飾の有無に関係ないC末端側を認識する抗体で測定した値をTotal ghrelinとした。Acylated ghrelinとTotal ghrelinの比率(A/T比)の変化から脂肪酸修飾活性を検討した。

Sprague-Dawley ラットの胎生21日目、生後1日目、3日目、1週目、3週目、5週目および7週目(各群n=5-11)に胃を摘出し、グレリンとGOATの遺伝子発現およびグレリン組織含量を定量した。

## [2] 48時間絶食によるグレリン生成の変化

雄Sprague-Dawleyラットを自由摂食群と48時間絶食群に分け(n=6-8)、胃および血漿を採取し、各項目を測定した。

## [3] 0.5%オクタン酸水自由摂取マウスにおけるグレリン生成の変化

雄マウスに0.5%オクタン酸水を自由に摂取させ、摂取前および摂取後1週間と2週間に胃組織を採取し、各項目を測定した(n=7-10)。

## [4] 高脂肪食(HFD)摂取によるグレリン生成の変化

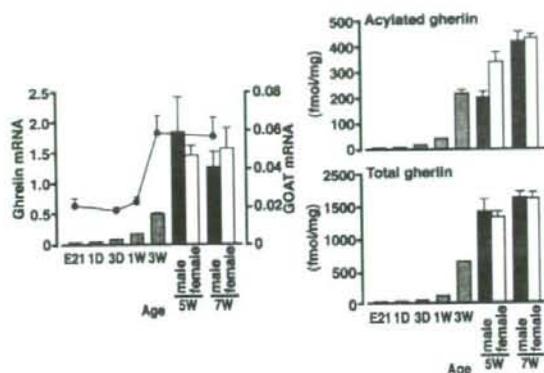
雄Sprague-DawleyラットにHFDを2週間与え、同様に各項目を測定した(n=5)。

## C. 研究結果

### [1] ラット胃におけるグレリン生成の経時的変化

胃組織でのグレリンおよびGOAT遺伝子の発現は、生後1週目まで低く、その後増加を認め、思春期前の5週齢にはほぼ頂値となった(図2)。同様に、胃グレリン組織含量はAcylated ghrelinおよびTotal ghrelinともに、生後1週間は低く、その後増加した。大きな雌雄差は認められなかった。ラット胃でのグレリン生成について、グレ

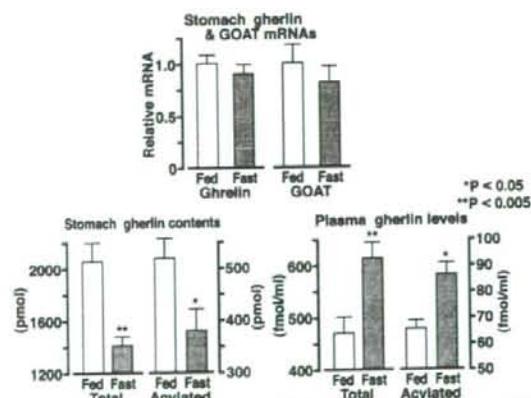
リンおよびGOAT遺伝子とペプチド量、脂肪酸修飾化はほぼ一致した出生後の経時変化を認めた。



(図2) ラット成長発達に伴う胃GhrelinとGOATの変化

### [2] 絶食による胃グレリン生成の変化

自由摂食群と比較して、48時間絶食によりAcylated ghrelinおよびTotal ghrelinの胃組織含量はともにほぼ半減し、血漿グレリン値はいずれも増加を認めた(図3)。血中への分泌亢進によるもの変化と考えられる。胃組織のA/T比は軽度上昇し、脂肪酸修飾活性が促進されたものと思われる。一方、グレリンおよびGOAT遺伝子に絶食による変化を認めなかった。

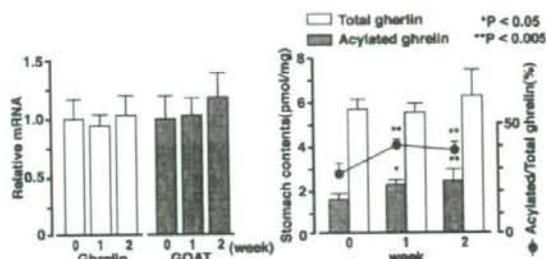


(図3) グレリン生成の自由摂食群と48時間絶食群の比較

### [3] オクタン酸水摂取による胃グレリン生成の変化

0.5%オクタン酸水の2週間自由摂取により、グレリンおよびGOAT遺伝子に変化はみられなかったものの、Acylated ghrelin値の有意な上昇を認

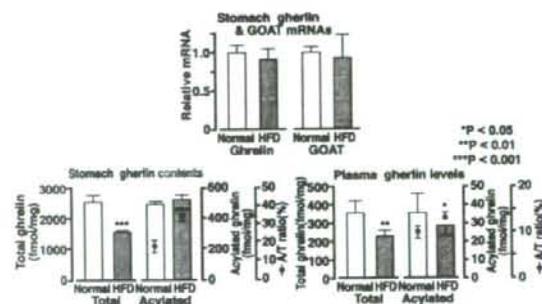
めた(図4)。Total ghrelin 値は変化しなかった。脂肪酸基質の増加に伴う Acylated ghrelin 値の上昇と思われる。



(図4) 0.5%オクタン酸水自由摂食マウスにおける変化

#### [4] HFD 摂取による胃グレリン生合成の変化

普通食群と比べ、2週間のHFDによって約10%の体重増加を認めた(p=0.0002)。HFDにより胃および血漿中のTotal ghrelin 値は有意に減少し、既報通りペプチド合成は抑制されたものと思われる(図5)。一方、Acylated ghrelin 値自体に変化はみられないが、相対的にA/T比の有意な上昇を認めた。これも脂肪酸基質の増加に伴うものと思われる。グレリンおよびGOAT 遺伝子発現への影響は認められない。



(図5) 高脂肪食摂2週間ラットにおける変化

#### D. 考察

グレリンの生物活性発現に必要なアシル基は、Ser3の側鎖水酸基にエステル結合している。新たにアシル基転移酵素であるGOATが同定されたことで、グレリン生合成の調節機構解明につながるものと期待される。本研究では、幾つかのエネルギー代謝環境下でのGOAT 遺伝子発現の変化を明らかにし、グレリン生合成への影響を検討した。ラット出生後の成長発達に伴い、胃におけるグレリンとGOATの遺伝子発現様式はほぼ一致してお

り、グレリンとGOATの発現に相互の関係が示唆された。今後、これらの発現調節に関して、両因子間での影響を検討する必要がある。一方、絶食状態やオクタン酸水およびHFDによる飼育によって、胃グレリンのペプチド量や脂肪酸修飾に有意な変化を認めたものの、グレリンおよびGOATの遺伝子発現は変化を示さなかった。グレリン生合成には遺伝子発現調節以外の調節系も大きく関与しているものと思われる。興味深いことに外来性の脂肪酸基質も脂肪酸修飾を促進しており、内在性または外来性の基質自体がアシル基転移酵素活性に影響するかどうか今後の検討課題である。

#### E. 結論

本研究の結果では、グレリン生合成において、グレリンおよびGOAT 遺伝子発現の相互的関連性が示唆された。しかし、グレリンの脂肪酸修飾とGOAT 遺伝子発現に明らかな関連性を見出すことは出来なかった。グレリン生合成におけるGOATの酵素活性や脂肪酸基質の影響も今後さらに検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Iwasaki E, Suzuki H, Sugino Y, Iida T, Nishizawa T, Masaoka T, Hosoda H, Kangawa K, Hibi T. Decreased levels of adiponectin in obese patients with gastroesophageal reflux evaluated by videoesophagography: possible relationship between gastroesophageal reflux and metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*, 23: S216-221, 2008.
- ② Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Murayama T, Sumi E, Teramukai S, Goto K, Ohnishi E, Akiyama H, Kawanabe K, Nankaku M, Ichihashi N, Tsuboyama T, Tamai K, Kataoka M, Nakamura T, Kangawa K. Osteoarthritis-Total Hip Replacement Clinical Study Team. Effects of ghrelin treatment on patients undergoing total hip

- replacement for osteoarthritis: different outcomes from studies in patients with cardiac and pulmonary cachexia. *J Am Geriatr Soc*, 56: 2363-2365, 2008.
- ③ 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 OSA before and after nasal CPAP treatment. *Respirology*, 13: 810-816, 2008.
- ④ Fukumoto K, Nakahara K, Katayama T, Miyazato M, Kangawa K, Murakami N. Synergistic action of gastrin and ghrelin on gastric acid secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 374: 60-63, 2008.
- ⑤ Schwenke DO, Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Shirai M, Cragg PA, Kangawa K. Early ghrelin treatment after myocardial infarction prevents an increase in cardiac sympathetic tone and reduces mortality. *Endocrinology*, 149: 5172-5176, 2008.
- ⑥ Kodama T, Ashitani J, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin treatment suppresses neutrophil-dominant inflammation in airways of patients with chronic respiratory infection. *Pulm Pharmacol Ther*, 21: 774-779, 2008.
- ⑦ Tanaka K, Morinobu S, Ichimura M, Asakawa A, Inui A, Hosoda H, Kangawa K, Yamawaki S. Decreased levels of ghrelin, cortisol, and fasting blood sugar, but not n-octanoylated ghrelin, in Japanese schizophrenic inpatients treated with olanzapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32: 1527-1532, 2008.
- ⑧ Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Efficacy of ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiological changes. *Endocrinology*, 149: 3722-3728, 2008.
- ⑨ 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, FD Clinical Study Team. Repeated administration of ghrelin to patients with functional dyspepsia: its effects on food intake and appetite. *Eur J Endocrinol*, 158: 491-498, 2008.
- ⑩ Miura T, Maruyama K, Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K. Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. Peptides, in press.
- ⑪ Kaiya H, Furuse M, Miyazato M, Kangawa K. Current knowledge of the roles of ghrelin in regulating food intake and energy balance in birds. *Gen Comp Endocrinol*, in press.
- ⑫ Yano Y, Toshinai K, Inokuchi T, Kangawa K, Shimada K, Kario K, Nakazato M. Plasma des-acyl ghrelin, but not plasma HMW adiponectin, is a useful cardiometabolic marker for predicting atherosclerosis in elderly hypertensive patients. *Atherosclerosis*, in press.
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  
宮里幹也（国立循環器病センター研究所）  
細田洋司（国立循環器病センター研究所）

## 加齢に伴うソマトポーズおよび食欲低下に対するグレリンの有用性の研究

研究分担者 中尾一和 京都大学大学院医学研究科  
内科学講座・内分泌代謝内科 教授

グレリンは摂食と GH 分泌の亢進作用を有するアシル化ペプチドである。アシル基を失ったデスアシルグレリンは、GHS-R への親和性を持たないことから不活性型のグレリンと考えられてきたが、近年独自の生理/薬理作用を有することを示唆する報告がある。我々はデスアシルグレリンの病態生理的意義を明らかにするため、デスアシルグレリンを肝臓で過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを開発し、そのフェノタイプを解析した。Tg マウスは野生型 (Wt) マウスの約 100 倍の血中デスアシルグレリン濃度を有していた。Tg マウスは Wt マウスに比して成長、体組成、摂食、GH/IGF-1 系には差が見られないが、ITT においてインスリン感受性が有意に亢進していた。以上の結果より、デスアシルグレリンはインスリン感受性を亢進する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

グレリンは 28 アミノ酸からなるアシル化ペプチドで、摂食と GH 分泌の亢進作用を有することからソマトポーズに対する臨床応用が期待されている。グレリンは分泌された後、体内において速やかにアシル基を失い GHS-R への親和性を持たないデスアシルグレリンとなって不活性化されると言われている。デスアシルグレリンは血中にグレリンの 10 倍の濃度で存在する。最近デスアシルグレリンにもグレリンとは異なった生理/薬理作用があるとする種々の報告がなされているが、未だコンセンサスは得られていない。我々は本研究において、デスアシルグレリンを過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを開発し、その病態生理的意義を解析した。

### B. 研究方法

**Tg マウスの作成:** SAP プロモーターの下流にマウスグレリン cDNA を結合したコンストラクトを C57BL6 受精卵にマイクロインジェクションすることにより、デスアシルグレリンを肝臓特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し

た。

**血中デスアシルグレリン濃度:** ELISA (三菱ヤマトロン, Japan) にて測定した。

**フェノタイプの解析:** 各 n=11, 8-10 週齢

#### 1) 成長・体組成への影響

体重、吻殿長、CT による体脂肪率を測定した。

#### 2) 摂食への影響

夜間・昼間摂食量、overnight fast 後の再摂食時の 2 時間摂食量、胃内容排泄率、視床下部摂食関連ペプチド発現量を定量 PCR (ABI Prism 7700 system, Applied Biosystems, USA) にて測定した。

#### 3) 糖代謝への影響

血糖・血清インスリン濃度の測定、糖負荷試験 (ipGTT、ブドウ糖 1.5 g/kg, 3.0g/kg)、インスリン負荷試験 (0.75U/kg) を施行した。

#### 4) GH/IGF-1 系への影響

血清 GH、IGF-1 濃度を EIA (SPI bio, France; Diagnostics Systems Laboratories, USA) にて測定した。

#### 5) グレリンに対する感受性への影響

視床下部における GHS-R 発現量 (定量 PCR)

およびグレリン (360  $\mu$ g/kg sc) 投与による摂食促進作用を測定した。

**統計処理**：有意差検定は two-way ANOVA もしくは Student's t-test によった。p<0.05 を有意とした。(倫理面への配慮)

本研究における全ての動物実験は京都大学動物実験委員会の認可を受けている。

### C. 研究結果

42 匹の F0 から 11 匹の Tg マウスを得た。解析に供した Tg マウスの血中デスアシルグレリン濃度は野生型 (Wt) マウスの約 100 倍 (48288.9  $\pm$  4433.6 vs. 416.7  $\pm$  63.6 fmol/ml, mean  $\pm$  SEM) に達していた。

#### 1) 成長・体組成への影響

外観、体重、吻殿長、体脂肪率に Tg と Wt の間で有意差は見られなかった。

#### 2) 摂食への影響

夜間・昼間摂食量、overnight fast 後の再摂食時の 2 時間摂食量、胃内容排泄率に Tg マウスと Wt マウスの間で有意差は見られなかった。視床下部における摂食関連ペプチド (NPY, AgRP, Orexin) mRNA 発現量にも有意差はなかった。

#### 3) 糖代謝への影響

血糖・血清インスリン濃度、糖負荷試験における耐糖能に有意差はなかったが、インスリン負荷試験において Tg のインスリン感受性が Wt に比して有意に亢進していることが明らかとなった。

#### 4) GH/IGF-1 系への影響

血清 GH 濃度、IGF-1 濃度に有意差は認められなかった。

#### 5) グレリンに対する感受性への影響

視床下部における GHS-R mRNA 発現量、外因性グレリンによる摂食促進作用に有意差は見られなかった。

### D. 考察

デスアシルグレリンは中枢投与において摂食促進作用があることが報告されているが、末梢投与の効果については一定の見解が得られていない。本研究の結果から、慢性的な血中デスアシルグレリン濃度の上昇は摂食に影響を及ぼさないことが示された。

デスアシルグレリンの糖代謝への影響については、これまでインスリン分泌の亢進やインスリン感受性の亢進を示す報告がある一方で、影響を与えないとするものもある。今回の結果は、デスアシルグレリンの末梢への慢性投与がインスリン感受性を改善する可能性を示唆するものであった。

### E. 結論

以上の結果より、デスアシルグレリンは、成長、体組成、摂食、GH/IGF-1 系に影響を与えないが、インスリン感受性を亢進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  
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