

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

研究分担者 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

高齢者における sarcopenia、osteopenia 等体組成異常に対する ghrelin 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 ghrelin 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 μ 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、ghrelin 値にも明確な影響を与えなかった。一方、100 μ 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 μ g/kg の GHRP-2 は atrogen-1、MuRF1 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 ghrelin 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。

A. 研究目的

高齢者には生理的な筋萎縮が出現する。疾病により高齢者が長期臥床を余儀なくされたとき、さらに不動性筋萎縮が加わり、増悪した筋萎縮により活動性が低下し、社会生活が制限されることが多い。また、筋萎縮のため姿勢保持が十分でなく、高齢者は転倒しやすい。その結果、大腿骨頸部骨折等をきたし、いわゆる「寝たきり老人」が生じることが多く、さらに筋萎縮が促進される。このような高齢者の sarcopenia は近年注目されている。他に、高齢者では体脂肪量の増加、骨塩量の減少がみられるが、このような変動は、高齢者における生理的 GH 分泌の低下（somatopause）に起因する可能性がある。

ghrelin は GH 分泌を強力に促進するので、高齢者における ghrelin、あるいは ghrelin 受容体作動薬の投与は、体脂肪量増加、骨塩量減少、筋萎縮に抑制的に作用する可能性がある。また、ghrelin は脂肪細胞、骨芽細胞、筋細胞への直接作用も報告されているので、GH を介する間接作用と相俟って、体脂肪量、骨塩量、筋萎縮に影響を及ぼす可能性も考えられる。

私どもは、ghrelin 受容体作動薬 GHRP-2 は筋に直接作用して、Atrogen-1、MuRF1 発現を低下させることを見出した。Atrogen-1、MuRF1 は筋特異的ユビキチンリガーゼであり、種々の筋タンパクをユビキチン化し、プロテアソーム系での分解を亢進させる。実際、種々の筋萎縮で Atrogen-1、MuRF1 発現は増加しており、逆に Atrogen-1、あるいは MuRF1 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おり、ghrelin、ghrelin 受容体作動薬は高齢者の筋萎縮に対して抑制的に作用する可能性がある。

このように、ghrelin、ghrelin 受容体作動薬は高齢者に対して好ましい効果を発揮する可能性がある一方、長期にわたって投与した場合、これまでの報告から推測すると、摂食量を増加させ、体重、および体脂肪量の増加を引き起こすなど好ましくない作用を発揮する可能性も存在する。今回、高齢者に対する ghrelin、ghrelin 作動薬の効果を検討する前段階として、18 ヶ月齢の雄ラットを使用して、GHRP-2 慢性投与（60 日）の摂食量、体重、体組成、血中 GH、IGF-1、desacyl ghrelin 値に及ぼす効果について検討した。

B. 研究方法

1) ghrelin 受容体作動薬 GHRP-2 の摂食量、体重に及ぼす効果

18ヶ月齢のSD系雄ラットを2週間環境に馴化させたのち、3群に分け、それぞれ1) GHRP-2 10 μ g/kg 体重、2回/日、2) GHRP-2 100 μ g/kg 体重、2回/日、3) 同量の生理的食塩水、2回/日を毎日皮下投与し、摂食量、体重を毎日測定した。

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、desacyl ghrelin 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。

3) GHRP-2 のヒラメ筋筋線維断面積、および atrogen-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。

4) GHRP-2 の体組成に及ぼす効果

GHRP-2 投与開始60日目に CT (Latheta, ALOKA) で、ラットの皮下脂肪量、内臓脂肪量、除脂肪体重、骨塩量を測定した。

(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

実験期間中を通して、GHRP-2 10 μ g/kg 投与群 (Low GHRP-2 群)、GHRP-2 100 μ g/kg 投与群 (High GHRP-2 群)、生理的食塩水を投与した対照群間で摂食量に差はなかった。

2) GHRP-2 の体重に及ぼす効果

High GHRP-2 群では、実験期間中を通して体重変動が認められなかった。生理的食塩水を投与した対照群、Low GHRP-2 群では、有意ではないもののしだいに体重が減少する傾向にあった。

3) GHRP-2 の血中 GH、IGF-1 値に及ぼす効果

High GHRP-2 群において、投与開始30日後においてのみ、対照の生食投与群に比べて血中 GH 値は増加していた。血中 desacyl ghrelin 値も、High GHRP-2 群において、投与開始30日後においてのみ低下していた。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。

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、わずかではあるが、有意なヒラメ筋筋線維断面積の減少がみられた。Low GHRP-2 群では、対照群に比べ差はみられなかった。

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

High GHRP-2 群、Low GHRP-2 群、対照群間で、ヒラメ筋における atrogen-1 mRNA、MuRF mRNA 量に有意差はなかった。

6) GHRP-2 の体組成に及ぼす効果

High GHRP-2 群、Low GHRP-2 群、対照群間で、皮下脂肪量、内臓脂肪量、除脂肪体重に有意差はみられなかった。High GHRP-2 群では、投与前に比べ、投与開始後60日で骨塩量の増加がみられた。

D. 考察

18ヶ月齢のラットを使用した今回の検討において、GHRP-2 群と対照群間に、摂食量、体重には明確な違いは認められなかった。また、皮下脂肪量、内臓脂肪量、除脂肪体重にも差異はみられなかった。Ghrelin の慢性投与で、体重、体脂肪量の増加がみられたという報告があるが、今回の成績からはそれを確認することはできなかった。

一方、High GHRP-2 群において、投与開始60日後の骨塩量は、投与開始前に比べ増加していた。これまで、ghrelin は GH を介する作用以外に、直接骨芽細胞に作用して骨形成を促進することが報告されている。慢性投与においても持続的に骨形成を進める可能性がある。

High GHRP-2 群では、ヒラメ筋筋線維断面積の減少もみられた。筋重量を反映すると考えられている除脂肪体重の減少は観察されなかったため、他の筋でも同様の変化が起こっているかどうか不

明である。6 週齢のラットを使用した以前の実験では、GHRP-2 は atrogen-1、MuRF 1 mRNA 量を減少させたが、今回の 18 ヶ月齢のラットでは明確な減少作用を示さなかった。この違いが生じた理由は不明であるが、6 週齢、18 ヶ月齢の atrogen-1、MuRF 1 mRNA 基礎発現量を比べてみると、18 ヶ月齢では著増しており、高齢ラットではこれらの発現が活性化された状態にあると考えられた。これらユビキチンリガーゼの発現が亢進したラットでは GHRP-2 ではその発現を制御できなかった可能性がある。

High GHRP-2 群では対照群に比べ、投与開始 30 日目で血中 GH が増加しており、逆に desacyl ghrelin が低下していた。この両者の変動は、この時点だけで観察されたものであり、意味のある変動であるのか現在のところ不明である。

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。すでに、ghrelin の慢性投与では体脂肪量を増加させるという報告があり、ghrelin が GH 分泌を促進しても、過剰の ghrelin が 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たが、今回の検討では、体脂肪に関しては明確な変化は認められなかった。今回の検討では、GH、IGF-1 の増加も明確ではなく、GHRP-2 の慢性投与による脱感作が存在する可能性も否定できない。今後、間欠的投与等、投与法の工夫も必要であるのかもしれない。

E. 結論

グレリン受容体作動薬 GHRP-2 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、ghrelin 値にも明確な影響を与えなかった。一方、100 μ g/kg の GHRP-2 投与で、骨塩量の増加が観察された。同量の ghrelin 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。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ったが、今回の成績からは、それを確認することはできなかった。

また、筋に対する作用も、これまで検討した 6 週齢、12 ヶ月齢のラットに比べ明確ではなかった。GHRP-2 の慢性投与による ghrelin 受容体の脱感作の可能性も否定できず、さらに投与法の工夫等も行い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 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.
- ② 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.
- ③ Herningtyas EH, Okimura Y, Handayaningsih AV, Yamamoto Y, Maki T, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K. Branched-chain amino acids and arginine suppress MaFbx/atrogen-1 mRNA expression via mTOR pathway in C2C12 cell line. *Biochim Biophys Acta*, 1780: 1115-1120, 2008.
- ④ 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.
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ 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.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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.
- ⑪ 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.
- ⑫ 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.
- ⑬ 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.
- ⑭ 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.
- ⑮ 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.
- ⑯ 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.
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）

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

研究分担者 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

脂肪分解作用を持つ成長ホルモン（GH）の分泌は加齢に伴い減少するため、中年期以降の体脂肪蓄積機序には GH 分泌低下が関与していると考えられている。我々は加齢に伴う体脂肪蓄積機序におけるグレリンの役割について明らかにすることを目的とし、これまでにグレリンの脳室内および静脈内投与により褐色脂肪組織（BAT）のノルアドレナリン（NA）分泌が抑制され、このグレリンの作用は加齢に伴い減弱すること、BAT 重量が加齢に伴い減少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の摂食促進作用も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、GH 分泌不全症に見られる体脂肪増加や GH 分泌が低下する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、体脂肪蓄積作用を示す。褐色脂肪組織（BAT）はエネルギー消費において重要な働きを担っており、その機能は同組織内に入力している交感神経のノルアドレナリン（NA）により促進される。我々はこれまでにグレリンの脳室内および静脈内投与が BAT の 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を明らかにしてきた。さらに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。

本研究では加齢に伴う体脂肪蓄積機序におけるグレリンの役割について明らかにすることを目的とし、本年度はグレリン投与による摂食促進作用およびグレリン/グレリン受容体（GHSR）系による脂肪蓄積作用の加齢による変化の有無について検討した。

B. 研究方法

1) グレリン脳室内投与による摂食促進作用の加齢による変化

自由摂食下 4、8、20 週齢の SD ラットへあらかじめ留置したカニューレを介してグレリンを脳室内（2 nmol/kg 体重）投与し、90 分間の摂食量を測定した。生理食塩水投与群を対照とし、各週齢の摂食量を比較した。

2) GHSR 拮抗薬による BAT の NA 分泌への作用と加齢による影響について

8、20 週齢の SD ラットの BAT にエーテル麻酔下で透析プローブを刺入後、リンゲル液にて灌流し、

無麻酔無拘束下にて灌流液中の NA 分泌を HPLC にて経時的に測定した。基礎分泌が安定した後、あらかじめ留置したカニューレを介して GHSR 拮抗薬である D-Lys³-GHRP6 (10 μg) を脳室内へ投与し、内因性のグレリン/GHSR を阻害することによる BAT の NA 分泌量への影響と加齢による変化について解析した。

3) 高脂肪摂取ラットにおけるグレリンの脂肪蓄積作用の解析

8 週齢の SD ラットに 2 週間高脂肪食 (脂肪分 45%) または普通食 (脂肪分 10%) を与えた。これらのラットの BAT 灌流液中の NA 分泌を無麻酔無拘束下にて HPLC にて経時的に測定した。基礎分泌が安定した後、留置カニューレを介してグレリンを 2 nmol/kg 体重の濃度で脳室内へ投与し、グレリンによる BAT の NA 分泌抑制作用を高脂肪摂取ラットと普通食摂取ラットの間で比較した。

エーテル麻酔下にて高脂肪摂取ラットと普通食摂取ラットを断頭し、BAT と下垂体を採取して抽出した RNA にて BAT の Ucp1 および下垂体の GH mRNA 発現量をノーザンブロット法にて比較した。(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) グレリン脳室内投与による摂食促進作用の加齢による変化

グレリン脳室内投与による摂食促進作用は 8 週齢でのみ認められ、4 週齢、20 週齢では有意な摂食促進作用は認められなかった。

2) GHSR 拮抗薬による BAT の NA 分泌への作用と加齢による影響について

8 週齢ラット、20 週齢ラットへの D-Lys³-GHRP6 の脳室内投与は投与直後から 40 分までの BAT の NA 分泌量を有意に増し、それぞれの頂値は基礎分泌の約 140%、160%で、20 週齢ラットでより大きな増加傾向を示したが 2 群間で促進作用の持続時間、頂値に有意差は認められなかった。現在、4 週齢ラットにおいても同様な解析を行っている。

3) 高脂肪摂取ラットにおけるグレリンの脂肪蓄積作用の解析

普通食摂取ラット、高脂肪摂取ラットへのグレリンの投与は BAT の NA 分泌をそれぞれ約 50%、約 30%抑制し、普通食摂取ラットと比較して高脂肪摂取ラットにおける NA 分泌抑制の程度は小さく ($p=0.08$)、持続も短い傾向が認められた。

普通食摂取ラットと比較し、高脂肪摂取ラットにおける BAT の Ucp1 mRNA 発現量は増加傾向を示し ($p=0.06$)、下垂体の GH mRNA 発現量は有意に減少していた。

D. 考察

昨年までの研究で、20 週齢ラットの BAT での Ucp1 mRNA 発現量は 4 週齢より低値を示し、脂肪滴が蓄積し且つ軽量化し、下垂体での GH mRNA 発現量は有意に減少していたことから、加齢に伴う体脂肪蓄積機序には GH 分泌低下に加え褐色脂肪細胞のエネルギー燃焼機能の低下が関与している可能性を推測してきた。

昨年度は 20 週齢ではグレリン脳室内投与による視床下部弓状核での Fos 発現の増加が認められなかったことも明らかにしてきたが、本年度は既報の如く、20 週齢ラットへのグレリン脳室内投与による摂食促進作用が減弱していることが確認された。グレリン脳室内投与による摂食促進作用は視床下部弓状核を介する神経経路の活性化が必須であることから、20 週齢ではグレリンに対する弓状核ニューロンの感受性が減弱し、摂食促進作用が認められない可能性が示された。

8 週齢ラットへの D-Lys³-GHRP6 脳室内投与は BAT の NA 分泌を有意に促進し、さらに 20 週齢ラットへの D-Lys³-GHRP6 脳室内投与は NA 分泌を 8 週齢より強く増加させる傾向を示したことから 20 週齢ラットでは内因性グレリンのシグナルが 8 週齢ラットより強く作用していると考えられた。昨年度の研究でグレリン投与による BAT における NA 分泌抑制作用は 20 週齢ラットにおいて減弱することが明らかにされたことから、20 週齢ラットではグレリン分泌が亢進しているため外因性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る。マウスでは加齢に伴いグレリン分泌が亢進することが報告されており、加齢に伴いグレリ

ンの分泌が亢進し、それがBATの機能低下の一因になっている可能性が推測される。今回D-Lys³-GHRP6が高用量であったため、8週齢と20週齢の間に明確な有意差が無かった可能性も考えられることから、今後低用量のD-Lys³-GHRP6の投与による各週齢群のBATのNA分泌促進作用を検討する必要がある。

体脂肪が蓄積した20週齢ラットのBATのUcp1 mRNA発現量は8週齢と比較し有意に減少していたが、高脂肪摂取10週齢ラットのBATにおけるUcp1 mRNA発現量は普通食摂取ラットと比較し増加傾向を示したことから、BATの機能は体脂肪蓄積のみでは低下しないと考えられる。高脂肪負荷ラットの下垂体GH mRNA発現量は加齢ラットと同様に有意に低下していたことから、GH分泌低下が脂肪蓄積を助長する可能性が示唆された。

E. 結論

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分泌低下による脂肪分解の抑制に加え、BATの機能低下が関与し、この機序にグレリン/GHSR系が関与してい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

- 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.

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）

グレリンの分泌制御と恒常性維持への関与

研究分担者 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。

A. 研究目的

グレリンは末梢臓器から産生・分泌される唯一の食欲亢進物質であり、主に胃で産生・分泌される。グレリン細胞は、酸分泌腺のある胃体部に多く、管腔とは接していない閉鎖型内分泌細胞であるX/A様細胞から空腹時に多く分泌される。また、血漿グレリン濃度は、BMI (body mass index) と逆相関を示し、その値は肥満で低く、痩せで高いと言われている。グレリンの分泌は空腹により刺激され、摂食やブドウ糖負荷で抑制される。また、ガストリン、グルカゴンあるいはレプチンの投与により増加し、ソマトスタチンにより抑制されることが報告されている。しかし、空腹時のグレリンの分泌が亢進するという機序を考える時、胃内容が無い時（空腹時）に神経性あるいは消化管ホルモンなどによる液性因子により、グレリンの分泌が積極的に促進される機構が作動しているため分泌が亢進するのか、あるいは空腹時のグレリン分泌が本来の基礎値であり、胃内容物の存在する時にはグレリン分泌が積極的に抑制されているため、内容物が無くなると抑制が解除されて基礎値に戻るため、分泌が亢進した状態になるのか、の二つの可能性が考えられる。

そこで、本研究では、後者の可能性を考え、胃に装着した慢性的カニューレを介して、空腹時状態ラットに多量の空気、水、トウモロコシ油、20%エタノール、グルコースなどを直接注入し、径時的に血中のグレリン濃度を測定した。また、グレリン分泌が外部環境やストレスで変動するのかを低温、高温および拘束ストレス環境下で調べた。

B. 研究方法

1) 動物

本実験に使用したラットは、研究室で自家繁殖したwistarラットの雄で、8~9週齢を用いた。（体重300~360g）。動物は、午前7時点灯、午後7時消灯の12時間明：12時間暗（12L：12D）の照明条件下で、室温（23±2℃）を一定に保った環境下で飼育された。手術の1週間前から、全ての動物は個別ケージに移して飼育された。水（水道水）と餌（CRF-1・チャールズ・リバー株式会社）は、手術・投与前日を除いて、全て自由摂食させた。

2) 胃内へのカニューレ挿入手術

ラットを19時より14時間絶食し、ネブター麻酔下で肋骨下から正中に沿って、縦約3cmの

長さで開腹をした。次に、背側頸部の皮膚を約2cm切開し胃カニューレーション用に加工したシリコンチューブを切開した頸部から挿入し、腹腔まで通した。途中の筋肉の層は、小さな穴を開けて通した。次に、胃の前胃に穴を開け、そこにチューブの先端を挿入し、縫合し閉腹した。チューブの反対側の先端は、頸部切開部から約4cmの長さをとって体外に出し頸部の皮膚に固定した。体外に出したチューブの先端は、加工したガラス管で栓をした。術後の回復期間は1週間設け、その間2日間隔でチューブ内に滅菌水2mlを通した。

3) 胃内への投与

カニューレーションを装着してから、1週間後に投与実験を行った。投与は、コントロール群、水投与群、空気投与群、トウモロコシ油群、エタノール群、グルコース群に分けて行った。コントロール群は胃内にカニューレーション装着手術をし、何も投与しない群として設けた (n=7)。水投与群には5mlの水道水を胃内に投与した (n=5)。空気投与群には5および7.5ccの空気を胃内に注入した (各n=5)。トウモロコシ油投与群には3mlのトウモロコシ油 (ナカライテスク株式会社) を胃内に投与した (n=6)。エタノール投与群には99.5%エタノール (ナカライテスク株式会社) を蒸留水で20%に希釈したもの3mlを投与した (n=5)。グルコース投与群にはグルコース (和光純薬工業株式会社) を水道水に10%、および20%容量に溶かし、胃内に3mlを投与した (各n=4)。

4) 低温、高温、拘束ストレス

予め12度の低温室で冷却したケージにラットを入れ、低温暴露を行った。高温暴露は35℃の恒温室で予め暖めたケージ内にラットを入れた。拘束ストレスは、プラスチックの筒に、ラットを入れることによって与えた (n=5)。尚、室温は23度とした。それぞれの環境下で2時間放置し、その間経時的に採血した。

5) 血中グレリンとレプチン濃度の測定

それぞれのラットから tail tip incision 法により約150 μ lの血液を経時的に採集した。血液はアプロチニン・EDTA入りチューブに入れ、遠心分離後、上清 (血漿) を回収し、その1/10量の塩酸 (1規定) と混和し、冷凍保存した。グレリン濃度は活性グレリンELISAキット (三菱化

学ヤトロン) を用いて、また、一部のサンプルについては血中レプチン濃度を血漿レプチン濃度は、Rat Leptin ELISA キット (矢内原研究所) を用いて測定した。

C. 研究結果

1) 血中グレリン濃度に及ぼす機械的伸張刺激の効果

14時間絶食したラットの血中グレリン濃度は86.2 \pm 5.8 fmol/ml (平均 \pm 標準誤差) であり、何も投与しなかった場合には、その後20分、60分、240分の値は殆ど大きな変化が無かった。胃カニューレを通して、空気5mlあるいは7.5mlを胃に直接投与すると、胃は一時的に膨満し、ラットの側面から膨満が観察されたが、注入後の20分、60分、および240分の血中グレリン濃度の有意な変化は認められず、無投与群との間に差は無かった。また、胃へ水を5ml投与しても有意な経時的変化は認められなかった。

2) 血中グレリン濃度に及ぼす栄養物やエタノールの効果

先と同様に14時間の絶食ラットに胃カニューレを介して3mlのトウモロコシ油を注入すると、投与後20分には対象群の88.4 \pm 6.8 fmol/ml に対して64.5 \pm 5.1 fmol/mlと有意な減少が認められた。しかし、60分後には元のレベルに回復した。14時間の絶食ラットに胃カニューレを介して3mlの20%エタノール液を注入すると、投与後20分には対象群の88.4 \pm 6.8 fmol/ml に対して54.6 \pm 8.1 fmol/mlと有意な減少が認められた。また60分、240分にはさらに減少し、40.6 \pm 7.5 fmol/ml、35.6 \pm 4.1 fmol/mlとなった。3mlのグルコース液を注入すると、投与後20分には対象群の88.4 \pm 6.8 fmol/ml に対して34.6 \pm 7.1 fmol/mlとなり、著しい減少が認められた。しかし、その後ゆっくりと上昇し、60分後には48.2 \pm 3.6 fmol/mlに、また、240分後には58.1 \pm 5.3 fmol/mlまで上昇した。

3) 血中グレリンおよびレプチン濃度に及ぼす低温、高温、および拘束ストレスの効果

自由摂食ラットに低温、高温あるいは拘束ストレスを付加した。無処置群およびそれらを付加する直前の血中グレリンのレベルは52.4 \pm 4.9

fmol/mlであった。低温条件下に置いて20分後には血中グレリンの有意な低下が認められた (38.3 ± 4.2 fmol/ml vs 対象 58.3 ± 4.8 fmol/ml)。しかし60分および240分後には元のレベルに回復し、対象群と有意な差は認められなかった。高温暴露群においては、20分後にやや上昇し (58.4 ± 7.8 fmol/ml 有意差なし)、60分では 118.4 ± 3.8 fmol/ml で、240分後には 188.9 ± 10.8 fmol/ml と異常な上昇を起こした。拘束ストレスでは、20分後に 26.4 ± 5.8 fmol/ml まで急低下し、この低下は60分、240分でも継続した (60分 28.5 ± 7.3 fmol/ml 240分 30.4 ± 3.5 fmol/ml)。これらの低温、高温および拘束ストレス下でのグレリンの変化がグレリンに特異的な物かどうかを知るために、同時にレプチン濃度を測定した。血中レプチン濃度は低温などの条件を付加する直前では 625.22 ± 42.8 pg/ml であった。グレリンと異なり、低温暴露60分と240分で有意な上昇が認められた (60分: 693.1 ± 32.6 pg/ml 240分: 738.2 ± 42.5 pg/ml vs 対象群 60分: 585.9 ± 34.3 pg/ml 240分: 522.6 ± 31.8 pg/ml)。一方高温暴露群では全く有意な変化は認められなかった。拘束ストレスを付加すると、240分に有意な増加が認められた (648.23 ± 40.0 pg/ml vs 対象群 522.6 ± 31.8 pg/ml)。

D. 考察

グレリン分泌は高温刺激を除き、すべて抑制的に反応した。これは空腹シグナルとしてのグレリン分泌が、常に胃内容物において抑制的に制御されていることを示唆しており、動物が空腹を常時感じなくてすむ仕組みを作り出しているのかも知れない。即ち、空腹時のグレリン分泌の亢進は、この抑制が解除されたことによる結果であり、空腹刺激により積極的にグレリン分泌が亢進したものでは無い可能性を示唆している。また、胃を空気や水で膨張させた時の機械的な伸張刺激ではグレリン分泌は抑制されず、化学的刺激での抑制が主であることは興味深い。この化学的抑制効果が胃への直接刺激であるのか、あるいは消化管ホルモンや神経性による二次的な作用であるのかは今回の研究では明らかではないが、消化管ホ

ルモンの多くがグレリンに対して促進的であることからすれば、直接的作用の可能性は否定できない。今回、唯一認められた高温刺激でのグレリン分泌増加の意義は、摂食亢進のためではなく、熱生産を抑えるためのものと推測された。我々は以前にグレリンの投与が体温の低下を招くこと、またこの体温低下作用は動物を高温下においた時に、より顕著に表れることを報告した。このことから高温条件下でのグレリンの分泌亢進は高温条件下での体温上昇を防ぐことに寄与していると推測される。一方、レプチンはグレリンと相反的に変動し、その制御は抑制性ではなく、むしろ促進性と思われた。しかし、このレプチン分泌促進反応には刺激後かなりの時間経過を要したことから、レプチンはグレリンの様な急速な情報伝達ホルモンではなく、摂食抑制やエネルギー消費を慢性的に調節して BMI の恒常性の維持に寄与しているのかも知れない。

E. 結論

本研究により、空腹情報シグナルとしてのグレリン分泌は胃内容物による抑制的制御が解除されたために起こる二次的なものであること、またグレリン分泌は環境要因やストレスに対応して分泌が変動することが示された。恐らくグレリンはレプチンと相反的に変動し、動物の恒常性維持にとって重要な役割を演じていると推測される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.

2. 学会発表

- ① 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.

- ② 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ス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.

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. 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）

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

研究分担者 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

慢性下気道感染症は好中球の浸潤を主体とする気道炎症で、呼吸筋疲弊、栄養状態の悪化からADLが低下する。本研究では、摂食亢進、抗炎症作用を有するグレリンを体重減少のある慢性下気道感染症患者に投与し臨床効果を評価した。平均年齢73.3歳、平均BMI15.8の患者7名に合成ヒトグレリン2 μ g/kgを2回/日で3週間経静脈的に投与した。投与後、摂食量、体重、血清蛋白、内臓蛋白が増加し、酸素化能や運動耐容能が改善した。喀痰量や痰中好中球数は減少し、痰中の炎症性サイトカイン濃度は低下した。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。

A. 研究目的

慢性下気道感染症は、気管支拡張症や肺結核後遺症、びまん性汎細気管支炎など肺構造が破壊された患者において、気道へ病原体が定着することにより、好中球の浸潤を主体とする気道炎症が持続する病態である。好中球の肺内集積の持続による肺傷害はさらなる肺構造の破壊を生じ、肺機能は低下する。上皮傷害により気道クリアランスは低下し、緑膿菌や黄色ブドウ球菌の持続感染をもたらす。肺炎の反復や耐性菌出現の要因となっている。肺機能の低下は、過剰な呼吸エネルギーの消費と体重減少を引き起こし、栄養障害の要因となる。現在この悪循環を回避する治療法はなく、新規治療が待望されている。

グレリンは胃から分離された成長ホルモン分泌促進ペプチドで、成長ホルモンとは独立した機序により摂食を亢進し、体重増加を促す。さらに、エネルギー蓄積、心血管保護、抗炎症など多彩な作用を有する。慢性閉塞性肺疾患や慢性心不全により悪液質となった患者への合成グレリン投与にて、運動耐容能や心機能の改善、交感神経抑制、体重増加が示されている。これまで、*in vitro*では、炎症細胞におけるグレリンの受容体の存在、単球や内皮細胞から遊離される炎症誘発性サイ

トカインの抑制が示され、一方、*in vivo*では、エンドトキシンショックモデル動物での宿主保護作用、大腸炎モデル動物における腸上皮細胞への炎症細胞浸潤の抑制など、抗炎症作用が示されている。

本研究では、これらの研究結果を基に、体重減少をきたした慢性下気道感染症患者に対して、グレリン投与を行い、その臨床効果を評価した。

B. 研究方法

6ヶ月以上続く喀痰排出と喀痰中に多剤耐性菌を認めている慢性下気道感染症患者7人を対象とした。年齢が73.3 \pm 4.1歳、BMIが15.8 \pm 2.6、基礎疾患として気管支拡張症が5人で慢性閉塞性肺疾患が2人であった。書面での同意を得た後に、合成ヒトグレリン2 μ g/kgを朝夕の一日二回、経静脈的に3週間投与した。投与前後での栄養状態と気道炎症の変化を評価した。栄養状態は食事摂取量、体重、血清中の総蛋白や内臓蛋白を評価した。気道炎症のマーカーとして、喀痰量、痰中の好中球数、炎症性サイトカインを用いた。また、血漿中のカテコールアミンを測定し、酸素化能および6分間歩行試験による運動耐容能の評価を行った。

C. 研究結果

3週間のグレリン投与で食事摂取量は1200±400 Kcal/日から1600±340 Kcal/日に、体重は39.4±9.7 Kgから41.8±9.9 Kgへそれぞれ有意に増加した。血清総蛋白濃度は6.9±0.6 g/dLから7.4±0.8 g/dLへ、内臓蛋白もプレアルブミンが16.9±8.5 mg/dLから18.9±9.6 mg/dLへ、レチノール結合蛋白が1.67±0.6 mg/dLから1.96±0.8 mg/dLへ、トランスフェリンが208±36 mg/dLから238±47 mg/dLへそれぞれ有意に増加した。喀痰量は22.5±6.7 g/日から16.8±6.1 g/日へ、痰中好中球数が28.6±16.4×10⁵個/gから1.2±0.4×10⁵個/gへ有意に減少した。喀痰中の炎症性サイトカイン濃度は、IL-8が235±121 ng/mLから34.6±9.4 ng/mLへ、TNF-αが2.7±1.5 ng/mLから1.5±1.0 ng/mLへ有意に低下した。血漿ノルエピネフリン濃度は721±380 pg/mLから487±197 pg/mLへ有意に減少した。酸素化能(AaDO₂)は24.3±5.3 mmHgから20.2±7.5 mmHgへ有意に改善し、6分間歩行距離は294±124 mから348±101 mへ歩行距離の有意な延長が認められた。なお、重篤な有害事象は認めなかった。

D. 考察

IL-8は好中球の化学遊走因子であり、TNF-α刺激で気道上皮、血管内皮細胞等から分泌される。TNF-αは外的刺激により肺胞マクロファージをはじめとする免疫担当細胞から放出されている。慢性下気道感染症患者は喀痰中の好中球数が増加し、IL-8やTNF-α濃度が上昇していることが知られている。喀痰中の多剤耐性菌による慢性的な刺激により肺胞マクロファージ等からTNF-αが放出され、気道上皮、血管内皮からのIL-8の放出を介して、気道中への好中球の遊走・接着・浸潤が促されている。さらに、好中球自体が他の炎症細胞や気道上皮細胞に作用し、炎症性サイトカインの放出を促す。好中球から放出される好中球エラスターゼやミエロペルオキシダーゼは粘液産生を増加させ、繊毛運動を傷害し上皮組織を破壊する。炎症性サイトカインは、それ自体が細胞障害を惹起し、また好中球や他の炎症細胞を遊走させ、さらなる肺障害をもたらす。

慢性下気道感染症患者へのグレリン投与で喀

痰中の好中球数が減少し、IL-8/TNF-α濃度が低下したことは、多剤耐性菌による刺激以降の気道炎症をグレリンが抑制していることを示す結果と考えられた。免疫担当細胞にグレリン受容体の存在が示された研究や、TNF-α刺激による血管内皮細胞上の接着分子発現をグレリンが抑制する研究は、グレリンが直接的作用により気道炎症を改善させる可能性を示唆したもので、本研究結果を支持するものである。

気道炎症改善による喀痰量の減少、炎症細胞浸潤の軽減が酸素化能を改善させ、グレリン投与による栄養状態改善が酸素化能改善と相乗して、6分間歩行距離の延長といった運動耐容能の改善をもたらした。

E. 結論

グレリン投与は慢性下気道感染症患者の気道炎症を抑制し、栄養状態の改善と運動耐容能の改善をもたらした。グレリンは難治性慢性下気道感染症に対する新規治療として期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② Ueno H, Yamaguchi H, Mizuta M, Nakazato M. The role of PYY in feeding regulation. *Regul Pept*, 145: 12-16, 2008.
- ③ 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.
- ④ Yano Y, Toshinai K, Inokuchi T, Shimada K, Katio 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.

- ⑤ Nakazato M. Ghrelin: A peripheral hunger-signalling molecule. J Brain Sci, 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

- ① 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

上部消化管外科領域におけるグレリンの臨床応用

研究分担者 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

体重減少は上部消化管癌手術に特異的かつ最も重篤な術後後遺症であるがその主たる要因の一つとしてグレリンの減少が関与している可能性を明らかにした。そこで今回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するのに対し、グレリン群では除脂肪体重の減少は有意ではなかった。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。

A. 研究目的

経口摂取障害、体重減少は上部消化管癌手術に特異的な後遺症であり、患者自身の愁訴の中で最も高頻度かつ重症なものである。また、低体重は健常人においても予後不良因子で厚労省の疫学調査によると BMI 19 以下の人は約 2.5 倍の死亡リスクがあると報告されている。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、低体重は上部消化管術後患者の予後も増悪させていると推測される。

胃切除後の体重減少の原因としては様々なものがあるが、食事摂取量の低下が最も重要である。しかし、外科的に貯留嚢（パウチ）を作成しても体重維持には効果はないことより貯留容積の減少ではなく、食欲低下が主因であると考えられるようになった。確かに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について検討し、術後早期に胃全摘術では約 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、食道癌において術後グレリン値と体重減少が相関することを報告した。以上より、上部消化管手術で減少したグレリンを補充することにより、術後の食欲、経口摂取量の低下を防ぎ、生理的に術後体重減少を予防することが期待される。

B. 研究方法

大阪大学倫理審査委員会の承認を得て臨床試験「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」を平成 18 年より行っている。

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(3mg/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、理解を求める。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

21例登録し20例(グレリン群10例、プラセボ群10例)にて解析を行った。背景(年齢、性、術前体重、術式、癌の進行度)に差を認めない。グレリン群 vs プラセボ群で食事摂取カロリーは(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。また、体組成ではプラセボ群は脂肪体重、除脂肪体重とも有意に減少する(-7.6%、-7.8%)のに対し、グレリン群では、脂肪は有意に減少する(-8.8%)ものの除脂肪体重の減少は(-2.9%)有意ではなかった。基礎代謝はプラセボ群では有意に減少する(21.8 to 19.4kcal/kg)

が、グレリン群では有意ではなかった(22.6 to 21.4kcal/kg)。

また血液学的データでは投与前と比較して、グレリン群では、血清総蛋白、アルブミン、総コレステロール、トリグリセリドの上昇を認めるが、プラセボ群では認めなかった。

D. 考察

呼吸不全、心不全、癌終末期など他のグレリンの臨床試験が、元々いそうによりグレリンが高値を示しているところにさらにグレリンを投与するというモデルで、馴化による反応性の低下が懸念されるのに対し、上部消化管術後は手術でグレリンが低下している状態に対してグレリンを補充するというより整理的なモデルである。ただ、術式として迷走神経を切断していることがどの程度グレリンの効果発現に影響するか懸念されたが、少なくとも食欲に関する効果は維持されており、今後成長ホルモン、消化管運動に関するより詳細な検討が必要であろう。

問題はグレリンの長期投与であり、術後の体重減少は3ヶ月から6ヶ月継続することより、今回の10日間投与では不十分であることが予想される。投与経路、経口剤など今後薬剤としての開発が期待される。

E. 結論

胃全摘後の術後早期の体重減少の予防にグレリン投与が有効であることが確認された。今後食道癌など幅広い対象で同様の有効性が確認されることが期待される。

F. 健康危険情報

試験登録の21例中1例に投与直後のみ軽度の発汗(NCI-CTCAE grade1)を認め、試験を中止した。そのほかグレリン投与による合併症は認めない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② 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: 1307-13150, 2008.
- ③ 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.
- ④ 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.
- ⑤ 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.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ 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
なし
- 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
研究協力者
瀧口修司（大阪大学医学部）
足立真一（大阪大学医学部）
山本和義（大阪大学医学部）

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

研究分担者 赤木尚史 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。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）のグレリン投与が平成19年8月に終了したが、そのデータ解析を今年度行った。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、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ のグレリンまたはプラセボを1日2回静注し、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-I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。

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年度から実施し、人工股関節置換術を受けた高齢者患者の機能回復に対するグレリンの臨床効果と安全性について検討した。

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、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。除外基準として、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名であった。治療計画は、手術の1週間前から術後2週間投与まで一日2回（朝食後と夕食前）、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与した。術後4週間のリハビリテーションを経て退院するので、計5週間の入院期間であった。

主要エンドポイントは、筋力（股関節外転群と膝関節伸展群）と歩行速度の改善とした。

副次エンドポイントとして以下を測定した。

- ・DEXA法による体組成（体脂肪率、除脂肪体重、骨塩量）
- ・種々のホルモンや代謝マーカー（空腹時血糖、空腹時インスリン、一日尿中CPR、HbA1c、

HOMA-1R、中性脂肪、コレステロール、アルブミン、コリンエステラーゼ、GH、IGF-I)

- ・他の筋力や握力
- ・大腿周囲径
- ・MRIによる筋断面積
- ・日本整形外科学会股関節機能判定基準 (JOA hip score: 疼痛、可動域、歩行能力、日常生活動作)
- ・有害事象発生の有無 (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

32名 (男性7名、女性25名、平均年齢60.4 ± 10.9歳、平均BMI 22.3 ± 3.4、平均HbA1c 5.3 ± 0.5%) が試験に参加し、31名において3週間の投与を終了した。1例は、手術による出血が原因と見られる有害事象のため、投与12日目に中止となった。グレリンによると考えられる重篤な有害事象は認められなかった。

グレリン投与群では、投与により血清GHの上昇を認め、day 8において血清IGF-I濃度の上昇を認めた。ただし、3週間のグレリン投与によってGH分泌刺激作用は有意に低下していた (day 1, 28.7 ± 19.7 [n=16] vs. day 22, 10.0 ± 5.8 ng/ml [n=15]; P=0.002)。(図1)。部分集団解析では、1) 年齢による成長ホルモン分泌刺激反応の差異 (P=0.045) (図1)、2) 性別による血中IGF-I濃度と一部の筋力の変動、に対する交互作用が示唆された。Day36において、体重には差を認めなかったが、DEXA法により測定した体脂肪量は有意に減少し (P=0.017)、除脂肪体重は有意に増加した (P=0.012) (図2)。筋力、歩行速度には差を認めなかった。空腹時血糖、空腹時インスリン、一日尿中CPRに有意な差は認められなかった。

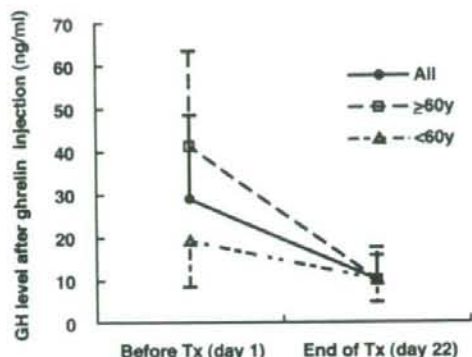


図1 グレリン治療後のグレリンに対する成長ホルモン分泌反応

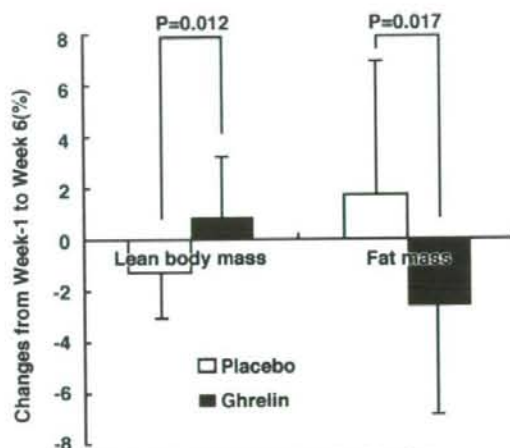


図2 グレリン投与による体組成の変化

D. 考察

筋力と歩行速度の改善を認めなかったのは、試験デザイン (特に投与期間の不足) と対象疾患 (必ずしも著明なカタボリック状態ではなく、術後の機能状態も元来良好) に問題があったと推察される。今回の対象疾患の場合、投与期間の延長は少なくとも3-6ヶ月必要と考えられるが、現在の静注ではなく、皮下注や点鼻などのDDSの改良を要すると考えられる。他の対象疾患としては、カタボリック状態がより重篤でグレリンの食欲増進作用も有用と考えられる疾患を探索すべきと考えられる。また、性や年齢によるグレリン反応性の影響も考慮する必要があるかもしれない。

有害事象に関しては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。筋力と歩行速度に関しては、グレリン投与による効果を認めなかったが、DEXA 測定による除脂肪体重の有意な増加と体脂肪率の有意な低下を認めた。また、グレリン投与によるGH反応の有意な低下があった。部分集団解析で、1) 年齢によるGH分泌刺激反応変動、2) 性別による血中IGF-1濃度と一部の筋力の変動、に対する交互作用が示唆された。有害事象に関しては、グレリン投与に関連して発生した重篤なものはない。今後、プロトコルの改訂や対象疾患の新たな探索が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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, Kanagawa K, OA-THR Clinical Study Team: Effects of ghrelin treatment in patients undergoing total hip replacement for osteoarthritis: different outcomes from studies in patients with cardiac and pulmonary cachexia. *J Am Geriatr Soc*, 56: 2363-2366, 2008.
 - ② 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.
 - ③ 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*, 158: 491-498, 2008.
 - ④ 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.
 - ⑤ Ariyasu H, Iwakura H, Yamada G, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. Efficacy of Ghrelin as a therapeutic approach for age-related physiologic changes. *Endocrinology*, 149: 3722-3728, 2008.
- ### 2. 学会発表
- ① 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.
 - ② Ohwada R, Hotta M, Akamizu T, Shibasaki 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.
 - ③ Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K: Administration of Ghrelin to Patients with Functional Anorexia: Its Effects on Appetite and Food Intake, 13th International Congress of Endocrinology, Rio de Janeiro, Brazil, Nov. 08-12, 2008.
 - ④ 赤水尚史: 機能的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.
 - ⑤ 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