

- 森, 青森市文化会館.
- ⑥ 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.
- ⑦ 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.
- ⑧ 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.
- ⑨ 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: ラット臍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.
- ⑩ Akamizu T: Clinical Applications of Ghrelin. The 5th International Forum on Progressive Endocrinology, I'FOPE 2008. Metabolic Syndrome, H20 年 5 月 24 日, 読売ホール.
- ⑪ 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, p 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.
- ⑫ 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.

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)

欠損マウスによって明らかになったグレリンによる自律神経の恒常性維持機構

研究分担者 児島将康 久留米大学分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門 教授

摂食促進ホルモンのグレリンについて、グレリン欠損マウスを作成し、その遺伝的背景をC57BL/6Jに整えた上で摂食行動などの解析を行った。グレリン欠損マウスは致死性でなく、形態的な異常は見られない。またグレリン欠損マウスの体重、摂食量、行動に目立った変化はなかった。われわれは最近、摂食促進ホルモンのグレリンが、自律神経によってコントロールされている生体機能（体温調節、血圧・心拍数、消化管運動など）の正常な維持に必要なことを見いだした。目立った表現型の報告のないグレリン・ノックアウトマウス（以下グレリンKOマウス）について、このマウスの表現型を詳細に解析したところ、グレリンKOマウスは自律神経系の異常を示すことがわかった。グレリンKOマウスは自律神経によってコントロールされている生体機能（体温調節、血圧・心拍数など）の日内リズムが欠如し、ベースラインが不安定で変動が大きい。以上のような自律神経の異常は、グレリン投与によって回復することから、グレリンが自律神経の正常な機能維持に必要なことがわかった。

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促進作用を有し、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。

中枢性摂食異常症の患者において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い。本研究計画では摂食調節ペプチドのグレリンの遺伝子改変マウスを使って、グレリンと自律神経機能の関連を調べた。

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は通常の作製法によって行った。すなわち、マウスのグレリンcDNA全長部分を完全に欠損させるためのプラスミド・ベクターから欠損ES細胞をピックアップし、キメラ・マウスを得た。交配によってグレリンのホモ欠損

マウスを誕生させた。遺伝的背景を整えるために、野生型のC57BJ/6Jとの交配を重ね、9世代以上バッククロスを繰り返した。

②グレリン欠損マウスの解析

遺伝的背景をC57BJ/6Jにしたグレリン欠損マウスを使って、血圧・心拍数・体温・消化管運動などの自律神経機能を調べた。非侵襲的な解析を行うために、埋め込み式の血圧測定器・体温測定器を用いて、1週間以上の長期間にわたり、血圧・心拍数・体温を連続測定した。野生型マウス、グレリンKOマウスに埋め込み型テレメトリーを手術によって腹腔内および頸動脈内に設置し、連続して血圧・心拍数などをモニターすることで評価した。

また消化管機能を調べるために、色素を含んだ餌を用いて胃排出能試験を行った。

(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配慮した。

C. 研究結果

①グレリンKOマウスの自律神経機能異常の解析

これまでに海外の2研究グループからグレリン・ノックアウトマウスの解析が報告されているが、目立った表現型は見つかっていない。申請者らはグレリンKOマウスを作製し、野生型マウスと比較して詳細に検討した。その結果、グレリンKOマウスにおいて自律神経機能に異常があることを見つけた。

心機能亢進、気管支拡張、肝グリコーゲン分解、脂肪分解などの、自律神経によって支配されている生体機能は多いが、グレリンKOマウスでは血圧・心拍調節、体温調節、消化管運動などに異常が見られる。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KO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。

②グレリンKOマウスにおける循環器系の機能解析

グレリンKOマウスでは血圧・心拍数の日内リズムが欠如し、また血圧・心拍数が不安定で変動が大きかった。

③グレリンKOマウスにおける消化管運動の解析

グレリン投与によって胃酸分泌や胃の蠕動運動が刺激されるが、グレリンKOマウスでは消化管運動の機能低下が見られることを申請者らは見いだした。

④グレリンによる体温の恒常性維持

動物の体温は行動性および自律性調節の2つの調節を受け、代謝やエネルギー消費量を一定に保つために厳密にコントロールされている。申請者らはグレリンKOマウスでは野生型マウスに比べて逆に体温が上昇していることを見いだした。またグレリンKOマウスでは体温の日内変動リズムが消失し、体温の基礎値が大きく変動し不安定になっていた。

⑤グレリン投与による体温の変化

体温測定は簡便には実験動物の直腸温で計測した。それとともに、実験動物に測定によるストレスを与えないために、無線によって体温計測値を持続的に記録できるテレメーターシステムを用いて測定した。その結果、ある程度まではグレリンの投与量を増やすと、体温低下が投与量に比例して低下することがわかった。グレリンの投与量によって、マウスにおいては基礎体温から -7°C 程度の低下まで観察した。またかなりのグレリン投与量においても、マウスには目立った有害事象は認められなかった。

D. 考察

無線テレメトリーシステムを用いて非侵襲的に血圧・心拍数・体温などの自律神経機能を調べた結果、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とが明らかになった。中枢性摂食異常症の患者において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。

またグレリン投与によって体温が低下することがわかった。すなわちグレリンは体温を下げることで、余分なエネルギー消費を抑えて、生体の生存に有利な栄養蓄積を行うのだと考えられた。

グレリンは主に胃を中心とする消化管で合成さ

れ血中に分泌される。このグレリンの体温低下作用に関する神経伝達経路はまだ明らかではない。体温は視床下部の視索前野・前視床下部や延髄の淡蒼線核 (raphe pallidus nucleus) で調節されているが、グレリンがこれらの神経核に作用するにはどのような経路をたどるのかを調べる必要がある。一般に血中を流れるペプチド・ホルモンは血液脳関門を通過できないために、末梢から中枢へのシグナル伝達には、なんらかの間接的な経路が必要だと考えられる。

またグレリンによる自律神経機能維持が、どのような神経回路によって制御されているのか、複数の手法を用いて明らかにする必要がある。予備的な実験で、迷走神経切断マウスでは血圧・心拍や体温の日内リズム消失やベース値の不安定性が見られることから、おそらく末梢から迷走神経を介したグレリン・シグナルが自律神経機能の恒常性維持に重要だと考えられる。この末梢からのグレリンが、どこの神経核を中継して自律神経機能維持を行うのかもまだ不明である。これを明らかにするために、コレラ・トキシンやその他のトレーサー毒素、グレリン遺伝子部分を GFP マーカーで置換したノックイン・マウスなどを使った実験を計画している。

E. 結論

グレリン欠損マウスの表現型を詳細に解析したところ、血圧・脈拍数・体温・消化管運動などの自律神経系の異常を見いだした。グレリンはまた体温を低下させるホルモンであることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Kojima M. The discovery of ghrelin--a personal memory. *Regul Pept*, 145:2-6, 2008.
- ② Kojima M., Ida T, Sato T. Structure of mammalian and nonmammalian ghrelins. *Vitam Horm*, 77:31-46, 2008.

③ Kojima M., Kangawa K. Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ*, 46:89-115, 2008.

④ 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.

⑤ 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.

2. 学会発表

- ① 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R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。
- ② 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。
- ③ 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。
- ④ 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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

グレリン投与による慢性閉塞性肺疾患治療

研究分担者 永谷憲哉 国立循環器病センター研究所 再生医療部 客員研究員

慢性閉塞性肺疾患（COPD）では呼吸機能の悪化と共に cachexia が進行する。cachexia は重症慢性疾患において生じる体重減少、骨格筋量の減少、食欲不振により衰弱した状態を指し、cachexia 自体が COPD の独立した予後規定因子であることから、重症 COPD の治療には呼吸機能の改善のみならず cachexia の是正が必要である。cachexia を伴った COPD 患者では、代償的に内因性グレリンの産生が増加しているが、外因性にグレリンを補充することにより、その成長ホルモン（GH）分泌作用、あるいはグレリン独自の作用により COPD 患者の呼吸・下肢筋力の改善およびエネルギー代謝の是正に働く可能性が考えられる。我々は COPD 症例においてグレリン投与による cachexia 治療のパイロット臨床試験を行ったところ、血清 GH 濃度の上昇、交感神経活性の抑制、摂食の促進、呼吸筋力の改善、運動耐容能の改善、エネルギー代謝の是正を確認した。これらの結果を踏まえ、cachexia を伴う COPD 患者を対象に多施設二重盲検試験を開始し、グレリン投与の安全性および有効性の検討に関し、目標予定症例に到達した。

A. 研究目的

グレリンは(1)下垂体からの成長ホルモン（GH）分泌の促進、(2)交感神経抑制、(3)血管拡張・心拍出量増加、(4)摂食促進、(5)エネルギー代謝の調節などの生理活性を有することが明らかとなっている。一方、慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者においては、換気効率低下がもたらす呼吸筋エネルギー消費量増大、食事摂取量の低下などによりエネルギーインバランスとなりやすく、栄養障害を伴う体重減少を認めることが多い。COPDにおける低栄養状態（cachexia）はその独立したの予後因子となることが知られている。cachexia とはがんや COPD などの慢性疾患において生じる体重減少、骨格筋量の減少、食欲不振により衰弱した状態をさし、米国においては 500 万人以上が罹患しているとされている。グレリンの生理活性を考えると、COPD に伴う cachexia の是正にグレリンが有効である可能性がある。実際に慢性心不全患者 10 例に対しグレリンを投与したところ、エネルギー代謝改善効果が認められた。また、cachexia

を伴った COPD 患者 7 例に対しパイロット臨床試験を行い、グレリンの安全性および有効性について検討したところ、血清 GH 濃度の上昇、交感神経活性の抑制、摂食の促進、呼吸筋力の改善、運動耐容能の改善、エネルギー代謝の改善効果が認められた。

これらの結果をふまえ、グレリンの cachexia に対する治療効果の検討および安全性の検証を目的として、多施設無作為化二重盲検比較試験を開始した。

B. 研究方法

1) 対象者の選択基準

- ① COPD 患者（FEV1%<70%、%FEV1<50%）
- ② 体重減少がある患者（BMI<21kg/m²）
- ③ 20 歳以上 85 歳以下の患者
- ④ その他

2) 臨床試験薬

実薬：合成ヒトグレリン（2μg/kg）+生理食塩水（10 mL）

偽薬：生理食塩水（10 mL）

3) 臨床試験の方法

対象患者にグレリン（実薬）もしくは生理食塩水（偽薬）を1回あたり30分かけて1日に2回（朝食前と夕食前）、3週間の点滴投与を行う。薬剤の投与は入院後に行うこととし、また、全例に呼吸リハビリテーションを合わせて行う。グレリンの有効性を評価するために、投与の前後で①問診による自覚症状の調査、②静脈採血 20 mL、③尿検査、④動脈採血、⑤呼吸機能検査、⑥摂食量の調査、⑦6分間歩行試験、⑧骨格筋量、骨量、脂肪量の測定、⑨24時間心電図、⑩運動負荷心肺機能試験、⑪握力測定、⑫呼吸筋力測定を行う。全ての評価は盲検下で行う。

4) 評価項目

○有効性の評価

主要項目：SGRQ (QOL score)

6分間歩行試験

副次項目：SF-36

MRC dyspnea scale

peak V02 (心肺運動負荷試験)

食事摂取量

VC

FEV1%

Maximal inspiratory pressure

Maximal expiratory pressure

血漿ノルアドレナリン濃度

5) 目標例数

実薬群、偽薬群をそれぞれ15例、合計30例

6) 臨床試験予定期間

2005年8月から2009年3月まで

(倫理面への配慮)

本臨床試験はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、臨床試験計画書を遵守し、各施設の倫理委員会による審査・承認のもと実施される。

C. 研究結果

現在までのところ、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。平均年齢74.2歳、BMI=17.9±2.1 (kg/m²)、FEV1%=37.4±8.1であった。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。

D. 考察

COPDによるcachexiaの原因は、閉塞性障害や肺過膨張による換気効率低下がもたらす呼吸筋エネルギー消費量増大、COPDの重症化に伴う食事摂取量の減少、蛋白異化に伴う全身性の筋肉低下などが考えられる。cachexiaはCOPDの独立した予後規定因子であることがわかっており、重症のCOPDの治療には呼吸機能の改善のみならずcachexiaの是正が必要である。

Cachexiaでは血漿グレリン濃度が代償性に上昇しており、グレリンは交感神経抑制、摂食促進、エネルギー代謝改善作用などの生理作用を有することから、グレリン投与はCOPD患者の呼吸筋力や下肢筋力の改善およびエネルギー代謝の是正に働く可能性が考えられ、重症COPD患者のcachexiaに対する新たな治療法として期待できる。我々は、パイロット臨床試験によりCOPD症例に対するグレリン治療の安全性を確認した後、今回、有効性評価に関し無作為化二重盲検比較試験を開始し、症例数を重ねて検討を行った。現在までに計32例の臨床試験が完了し、最低目標である30症例に到達した。有害事象としてこれまでに細菌性肺炎と抑うつ状態の悪化を各1例認め、試験薬の投与を中止した。二重盲検比較試験であるため実薬群であったかは明らかではないが、いずれの有害事象も軽症かつ速やかに改善しており、また安全評価委員会においてグレリンとの因果関係はないと判断されている。今後、キーオープンを行い、COPD症例におけるcachexiaに対するグレリン投与の有効性に関し、検討を行う。

E. 結論

我々はcachexiaを伴うCOPD患者に対するグレリン投与の安全性、有効性を検討するため、多施設無作為化二重盲検比較試験を行い、予定症例数に到達した。今後、キーオープンを行い、その有

効性について検討する。

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

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