

スリン抵抗性改善作用は未だ検討されていない。

本年度、我々は、慢性肝疾患患者を対象に、BCAA のインスリン抵抗性改善効果を検討した。

B. 研究方法

当大学病院外来通院中の患者で下記の基準を満たす 12 名を対象とした。

【適応基準：下記 2 項目を満たす者】

- ① ウイルス性慢性肝疾患患者
- ② 食事摂取量が保たれているにも関わらず、低アルブミン血症 (3.5 - 4.0 g/dL) を認める者

【除外基準：下記のいずれかに該当する者】

- ① 肝性脳症を認める者
- ② 腹水を認める者
- ③ 肝細胞癌を認める者
- ④ 腎不全を認める者

対象者に BCAA 含有食品(アミノフィール®、生活文化舎、東京) 2 包を 90 日間連日投与した。30 日毎に身体計測、体組成測定、血液生化学検査を行い、BCAA 含有食品のインスリン抵抗性に及ぼす影響を前後比較試験にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の研究内容はヘルシンキ宣言 (1975 年) に準じており、久留米大学倫理委員会にて承認を受けている。研究内容を十分に説明し、書面にて同意の得られた患者を対象者とした。本研究では、通常の日常診療における医療従事者が行うべき守秘義務に加え、個人が識別できる情報 (I. D., 氏名) は、暗号化し、プライバシーの保護

に留意した。また、本研究により得られたデータは本試験の目的以外には利用していない。

表1 BCAA 含有食品の組成(アミノフィール®)

| | |
|--------------------------|-----------|
| BCAAs | 3200.0 mg |
| Valine | 800.0 mg |
| Leucine | 1600.0 mg |
| Isoleucine | 800.0 mg |
| Calcium | 22.1 mg |
| Magnesium | 12.6 mg |
| Zinc | 5.0 mg |
| Copper | 0.2 mg |
| Selenium | 49.6 µg |
| Chromium | 14.4 µg |
| Pantothenic acid calcium | 6.8 mg |
| Vitamin A | 315.0 µg |
| Vitamin B1 | 2.4 mg |
| Vitamin B2 | 2.6 mg |
| Vitamin B6 | 2.4 mg |
| Vitamin B12 | 10.0 µg |
| Folic acid | 0.2 mg |
| Vitamin C | 40.0 mg |
| Vitamin D3 | 3.0 µg |
| Vitamin E | 6.4 mg |
| Vitamin K2 | 29.6 µg |
| Niacin | 12.0 mg |

C. 研究結果

(1) 体組成に及ぼす影響

BCAA 含有食品投与後 90 日の BMI, 体脂肪

率、骨格筋体重率、内臓脂肪面積は、投与前と比較して優位な変化を認めなかった。

(2) 蛋白代謝におよぼす影響

BCAA 含有食品投与後 30 日、60 日の BCAA/Tyr 比は、投与前と比較して優位な上昇を認めた (投与前: 5.1 ± 0.4 , 投与後 30 日: 6.6 ± 0.8 ; $p < 0.05$, 投与後 60 日: 7.2 ± 0.9 ; $p < 0.01$)。また、BCAA 含有食品投与後 60 日のアルブミン値は、投与前と比較して優位な上昇を認めた (投与前: 3.8 ± 0.1 , 投与後 60 日: 3.9 ± 0.1 ; $p < 0.05$)。

(3) 糖質代謝におよぼす影響

BCAA 含有食品投与後 30 日、60 日、90 日の空腹時血糖、HbA1c、インスリン値、HOMA-IR、HOMA-%B は、投与前と比較して優位な変化を認めなかった。

<層別化解析: 性別>

(1) 体組成に及ぼす影響

男性群・女性群の両群において、BCAA 含有食品投与後 90 日の BMI、体脂肪率、骨格筋体重率、内臓脂肪面積は、投与前と比較して優位な変化を認めなかった。

(2) 蛋白代謝におよぼす影響

女性群において、BCAA 含有食品投与後 60 日の BCAA/Tyr 比は、投与前と比較して優位な上昇を認めた (投与前: 5.5 ± 5.0 , 投与後 60 日: 8.5 ± 1.3 ; $p < 0.05$)。しかし、BCAA 含有食品投与後 30 日、60 日、90 日のアルブミン値は、投与前と比較して優位な上昇を認めなかった。

男性群において、BCAA 含有食品投与後 60 日の BCAA/Tyr 比は、投与前と比較して優位な上昇を認めた (投与前: 4.6 ± 0.6 , 投与後 60 日: 5.5 ± 0.7 ; $p < 0.05$)。ま

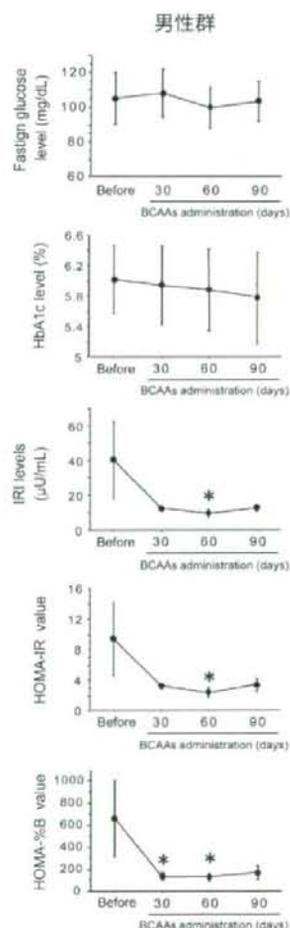
た、BCAA 含有食品投与後 90 日のアルブミン値は、投与前と比較して優位な上昇を認めた (投与前: 3.8 ± 0.1 , 投与後 90 日: 4.0 ± 0.1 ; $p < 0.05$)。

(3) 糖質代謝におよぼす影響

女性群では、BCAA 含有食品投与後 30 日、60 日、90 日の空腹時血糖、HbA1c、インスリン値、HOMA-IR、HOMA-%B は、投与前と比較して優位な変化を認めなかった。

一方、男性群では、BCAA 含有食品投与後 60 日のインスリン値、HOMA-IR、HOMA-%B は投与前と比較して優位な低下を認めた (図 1)。

図1 BCAAの糖質代謝に及ぼす影響



D. 考察

本研究により、BCAA 含有栄養剤は、男性の慢性ウイルス性肝疾患患者においてインスリン抵抗性を改善することが示された。BCAA 含有栄養剤投与前後において、対象者の BMI、体脂肪率、内臓脂肪面積は有意な変化を認めなかった事より、インスリン抵抗性改善作用は BCAA の直接作用である可能性が示唆された。

男性群は女性群に比べ、有意にインスリン抵抗性を改善した。性差によるインスリン抵抗性改善効果の差異については明らかではないが、性ホルモンの関与が考えられる。①男性ホルモンの一種であるテストステロンは、チロシン合成酵素を活性化し、チロシンの産生を高める (Dhondt JL et al. *Mech Ageing Dev* 1979;10:219-24)。②チロシンは、エピネフリンのプレカーサーであり、インスリン抵抗性を惹起する (Deibert DC et al. *J Clin Invest* 1980;65:717-21)。③BCAA は、細胞内にチロシンを取り込む作用を有する (Desai SP et al. *Arch Surg* 1985;120:1345-50)。上記の3知見に加え、本研究において、「BCAA 含有食品投与により、チロシンは有意に低下し、その経時的変動と HOMA-IR の経時的変動は同じパターンを示す」といった事が明らかとなった。以上より、BCAA は、テストステロンに制御されているチロシンを減少させることにより、インスリン抵抗性を改善するといった機序が考えられる。このように男性ホルモンの関与が、BCAA によるインスリン抵抗性改善効果に性差が存在する理由と推察される。

E. 結論

本研究により、BCAA 含有栄養剤は、男性の慢性ウイルス性肝疾患患者においてイン

スリン抵抗性を改善することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawaguchi T, Nagao Y, Matsuoka H, Ide T, Sata M. Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. *Int J Mol Med* 2008;22:105-112.
2. Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Ibi R, Okada T, Mutou M, Shiraishi S, Uchida Y, Otsuka M, Umeki Y, Oriishi T, Hayabuchi H, Tanaka S, Takakura M, Sata M. Body cell mass is a useful parameter for assessing malnutrition and severity of disease in non-ascitic cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma or esophageal varices. *Int J Mol Med* 2008;22:589-594.
3. Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Mutou M, Ibi R, Shiraishi S, Okada T, Uchida Y, Otsuka M, Tonan T, Fujimoto K, Oriishi T, Tanaka S, Takakura M, Sata M. Supplement improves nutrition and stresses caused by examination-associated fasting in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2008;38:1178-1185.
4. Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sumie S, Oriishi T, Mitsuyama K,

Tsuruta O, Ueno T, Sata M. Altered expression of glucagon-like peptide-1 and dipeptidyl peptidase IV in patients with HCV-related glucose intolerance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:244-251.

2. 学会発表

1. Morita Y, Taniguchi E, Kawaguchi T, Shirachi M, Iwamoto H, Ide T, Nagata E, Sata M. An association between use of sulfonylureas or exogenous insulin and the presence of hepatocellular carcinoma in hepatitis c patients with diabetes mellitus. 43th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Milano, Italy, 2008.
2. Sakata M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Abe M, Yanagimoto C, Miyajima I, Koga H, Harada H, Oriishi T, Sata M. Oxidized albumin is associated with water retention and severity of disease in patients with liver cirrhosis. Digestive Disease Week 2008 (Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases). San Diego, USA, 2008.
3. Taniguchi E, Kawaguchi T, Morita Y, Sata M. Use of exogenous insulin or sulfonylureas is a potential risk factor for hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients with

diabetes mellitus. The Liver Meeting® 2008 American Association for the Study of Liver Diseases's 59th Annual Meeting. San Francisco, USA, 2008.

4. Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Oriishi T, Sumie S, Mitsuyama K, Tsuruta O, Ueno T, Sata M. Decreased active glucagon-like peptide-1 and increased dipeptidyl peptidase-4 expression in patients with HCV-related insulin resistance. The Liver Meeting® 2008 American Association for the Study of Liver Diseases's 59th Annual Meeting. San Francisco, USA, 2008.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許出願中 2008-090544, 肝疾患に伴う浮腫の判定方法, 出願人 学校法人久留米大学、味の素株式会社 共同出願, 発明者 佐田通夫、川口巧、坂田雅浩、惣中一郎

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究協力者： 社会保険中京病院 消化器科 大野 智義

研究：分岐鎖アミノ酸製剤の肝硬変患者投与時における酸化ストレス、炎症反応に及ぼす影響について

研究要旨；慢性C型肝炎において慢性の持続する炎症と酸化ストレスが肝発がんに関与すると考えられている一方、分岐鎖アミノ酸製剤の長期内服により肝発がんが抑制されるという報告もあるが分岐鎖アミノ酸製剤の内服によりこれら持続する炎症や酸化ストレスに及ぼす影響に関する報告はない。そこで本研究ではHCV陽性肝硬変患者に分岐鎖アミノ酸製剤を内服する群と内服なしで経過を見た群にわけ検討した。登録患者数は27名で内服群18名非内服群9名であった。非内服群においては経過とともに酸化ストレスマーカー（尿中8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)、15-F2t-Isoprostane (8-IsoPs))は有意に増加し内服群では尿中8-OHdGが有意に減少した。さらに内服前後での変化量を両群で比較検討すると高感度CRP、フェリチン、尿8-OHdG、8-IsoPsが有意に低下することが判明した。これらのことから分岐鎖アミノ酸製剤を内服すると持続する慢性の炎症と酸化ストレスが減少し肝発がんの抑制に寄与するのではないかと推測された。

A. 研究目的

酸化ストレス下においてはreactive oxygen species (ROS)の産生が亢進し、このROSにより蛋白、脂質、DNAは障害を受ける。損傷を受けたDNAの傷が修復されることなく蓄積すると遺伝子の点変異や染色体異常につながりひいては肝がんへの進展につながるのではないかと考えられている。一方ではHCV陽性肝硬変患者において分岐鎖アミノ酸(BCAA)製剤を内服させると肝硬変合併症の併発を減らしその予後を改善することや肝がんの合併が抑制される可能性が報告された。その機序としては肝機能の改善のみならずインスリン抵抗性の改善やアルブミンにおける酸化アルブミンの比率を減らすことなどが指摘されている。

これまで肝発がんには慢性の持続する炎症や酸化ストレスが大切であることがマウスモデル等で指摘されている、そしてHCV関連蛋白発現トランスジェニックマウスにおいては酸化ストレスの産生が亢進することも証明された。しかしながらHCV陽性でBCAA製剤内服肝硬変患者における持続する炎症や酸化ストレスに対する影響という観点からの検討はこれまでがない。そこで本研究ではpreliminaryではあるがHCV陽性肝硬変患者でBCAA製剤内服群と内服していない群での炎症と酸化ストレスに対する影響について検討した。

B. 研究方法

文書によるIC取得後HCV陽性肝硬変患者を内服群(18名)と非内服群(9名)にわけ内服前および内服後1、3、6ヵ月後に採血および採尿し外来で行う通常の血液・生化学検査項目とそうでない項目、フェリチン、高感度CRP(H-CRP)、酸化ストレスマーカーとして尿中8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)と15-F2t-Isoprostane (8-IsoPs)を検討項目とした。このうちフェリチン、H-CRP、酸化ストレスマーカーとして尿中8-OHdGと8-IsoPsは一括測定した。得られた項目についてはT-test および Mann-Whitney U-test、Wilcoxon順位和検定により検討した。

C. 研究結果

1) BCAA製剤非内服群では6ヵ月後には尿中8-OHdGと8-IsoPsが有意に増加し、内服群では内服前に比較して内服6ヵ月後ではフェリチン尿中8-OHdGが有意に低下していることが示唆された。図1-1

2) 内服群・非内服群における内服前と内服6ヵ月後の値の変化量について比較すると非内服群に比較して内服群でフェリチン、H-CRP、酸化ストレスマーカーである尿中8-OHdGと8-IsoPsが有意に低下していることが示唆された。図1-2

図1-1

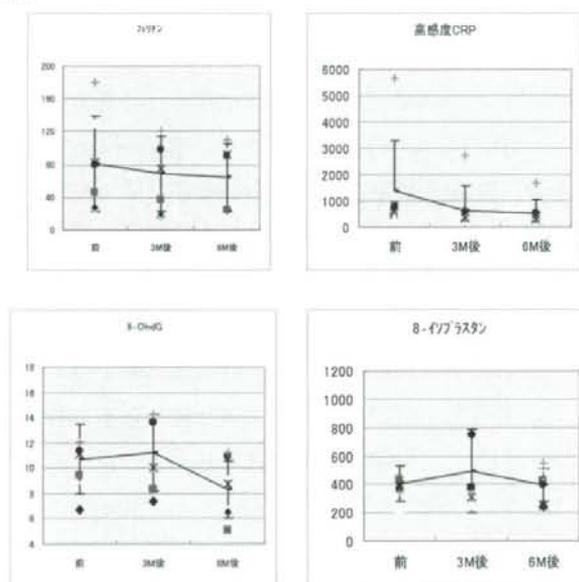
| | Ferritin | H-CRP | 8-OHdG | 8-IsoPs |
|--------|--------------|---------|--------------|--------------|
| P (0M) | 65.03 | 1043.56 | 11.07 | 373.96 |
| P (6M) | 53.15 | 351.28 | 6.03 | 337.89 |
| T-test | 0.024 | 0.095 | 0.003 | 0.518 |
| C (0M) | 45.23 | 428.11 | 9.35 | 338.57 |
| C (6M) | 44.87 | 591.44 | 10.64 | 512.41 |
| T-test | 0.881 | 0.311 | 0.042 | 0.047 |

図1-2

| Mann-Whitney | P<0.05 | P<0.05 | P<0.01 | P<0.05 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|
|--------------|--------|--------|--------|--------|

3) このフェリチン、H-CRP、尿中8-OHdGと8-IsoPsについて時間的経過に関して検討してみるとフェリチン、H-CRPがまず低下しそれに引き続いて尿中8-OHdGと8-IsoPsが低下、すなわち酸化ストレスの産生低下が起きることが示唆された。

図2



D. 考察

C型慢性肝炎・肝硬変患者における肝発がんの頻度に比べHCV感染のない自己免疫性肝炎やアルコール性肝炎における発がんの頻度が低いこと、また同様に無症候性キャリアにおける肝発がんは極めてまれであることから肝発がんには慢性的持続する炎症やHCV感染が重要であると指摘されている。

その一方で最近、種々の分野で酸化ストレスが問題となっており、高酸化ストレス状況ではReactive oxygen species (ROS)の産生が亢進しこのROSにより

たんぱく質、糖質、脂質さらにはDNAが傷害されると言われている。そしてこのROSによるDNAの傷害が修復されないと遺伝子の傷が蓄積し発ガンにつながると推測されている。C型慢性肝炎・肝硬変患者においてはHCV関連蛋白による酸化ストレスの亢進が報告されている。

そして、BCAA製剤を内服することにより肝硬変患者における重篤な合併症が減少しその予後が改善することそしてさらに最近、長期内服により肝がんの発がんが抑制されることが報告された。そしてその機序としてはインスリン抵抗性の改善などが指摘されているが慢性的持続する炎症や酸化ストレスとの関係についての報告はない。

そこで本研究にあるようにBCAA製剤を内服することにより微細な炎症や酸化ストレスの産生が抑制されることが示唆されたことは発がん抑制の機序として極めて示唆に富む結果と考えられた。また同時にフェリチンの低下などから鉄代謝の関与も示唆された。

E. 結論

C型慢性肝炎・肝硬変患者がBCAA製剤を内服すると肝発がんにとって重要な役割を持つ酸化ストレスや慢性的炎症が有意に抑制され、このことがBCAA製剤の長期内服により肝がんの発がんが抑制される機序のひとつであると考えられた。今後は症例数を増やすとともに鉄代謝や脂質代謝を含めた検討が必要であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohno T, Tanaka Y, Sugauchi F, Orito E, Hasegawa I, Nukaya H, Kato A, Matunaga S, Endo M, Tanaka Y, Sakakibara K, Mizokami M. Suppressive effect of oral administration of branched-chain amino acid granules on oxidative stress and inflammation in HCV-positive patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2008;38:683-688.

2. 学会発表

1. 大野智義、長谷川泉、榑原健治。C型肝硬変患者における分岐鎖アミノ酸(BCAA)製剤内服による慢性炎症、酸化ストレスに及ぼす影響について JDDW 東京 2008

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者： 清家 正隆 大分大学医学部 肝疾患相談センター 講師
研究協力者： 井上 恵 大分大学医学部 総合内科学第一講座 大学院
後藤 孔郎 大分大学医学部 総合内科学第一講座 医員

研究： 脾臓摘出による肝臓における脂質代謝への影響

研究要旨：肝硬変症に対する治療戦略として、脾臓摘出や脾動脈塞栓術を併用した治療が広く行われているが、脾臓摘出による他臓器への影響は明らかではない。本研究では、高脂肪食誘導性ラットを用いた動物実験により、脾臓摘出が全身の脂質・糖代謝および肝臓に及ぼす影響について検討した。

まず SD ラット（雄、8 週齢）に高脂肪食を 4 週間投与して肥満ラットを作成した。その後、脾臓摘出群（SPX）群とシャム（Sham）群とに分け、さらに高脂肪食を 24 週間投与した後肝臓を摘出した。血中脂質代謝マーカー（中性脂肪、総コレステロール、遊離脂肪酸）、肝機能（ALT）の測定、糖負荷試験を行った。摘出肝臓では肝病理組織を評価し、肝臓内の脂質合成マーカー（SREBP1c、FAS）と脂肪分解マーカー（UCP2、CPT1、CD36）を Western Blot 法にて測定した。

高脂肪食誘導性肥満ラットでは SPX 群で摂食量は低下し、体重増加は有意に抑制された。また、血中中性脂肪および遊離脂肪酸濃度は SPX 群で有意に高値であり、糖負荷試験ではインスリン抵抗性を認めた。摘出肝臓においては両群ともに肝臓内の脂肪沈着を認めたが、特に SPX 群では Sham 群と比較して脂肪化は高度であり、肝臓組織中の中性脂肪および血中の ALT 値は有意差をもって SPX 群で高値を呈していた。肝臓内の脂質合成マーカー（SREBP1c、FAS）と脂肪分解マーカーである CPT1 の発現は SPX 群で低下していた。UCP2 の発現は SPX 群で亢進していた。脾臓摘出による肝脂肪化の要因の一つとして、 β 酸化に寄与する CPT1 の発現抑制があることが示唆された。CPT1 の発現抑制により脂肪蓄積がおき、その down regulation として脂質合成系が抑制され、UCP2 を介した熱産生が亢進し、結果として脂質合成・分解のバランスが脂肪蓄積の方向に傾いていると考えられた。

おり、脾臓摘出による他臓器への影響は明らかではない。

本研究では、高脂肪食誘導性肥満ラットを用いて脾臓摘出が全身の脂質代謝および糖代謝、さらに肝臓に及ぼす影響について検討した。

A. 研究目的

肝硬変症に対する治療戦略として、脾臓摘出（脾摘）ないし部分的脾動脈塞栓療法（PSE）併用 IFN 治療が広く行われている。しかし脾摘併用の場合、感染症による死亡例も報告されて

B. 研究方法

SD ラット(雄、8 週齢)に高脂肪食を 4 週間投与して肥満ラットを作成した。その後、脾臓摘出群(SPX)群とシャム(Sham)群とに分け、さらに高脂肪食を 24 週間投与した後肝臓を摘出した。血中脂質代謝マーカー(中性脂肪、総コレステロール、遊離脂肪酸)、肝機能(ALT)の測定、糖負荷試験を行った。摘出肝臓では肝病理組織を評価(Sudan 染色、HE 染色)し、肝臓内の脂質合成マーカーとして SREBP1c、FAS を、脂肪分解マーカーとして UCP2、CPT1、CD36 を Western Blot 法にて測定した。

C. 研究結果

(1) 脾臓摘出による体重・摂食量の変化

高脂肪食誘導性肥満ラットでは SPX 群で摂食量は低下し、体重増加は有意に抑制された。

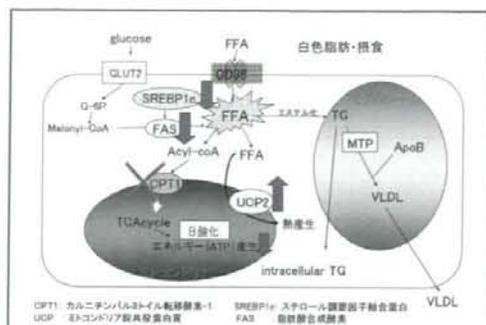
(2) 糖・脂質代謝における脾臓摘出の影響

血中中性脂肪および遊離脂肪酸濃度は、末梢血では SPX 群で有意に高値であったが、門脈血では逆に低値であった。総コレステロール値には差はなかった。さらに糖負荷試験では SPX 群にインスリン抵抗性を認めた。

(3) 脾臓摘出による肝臓への影響

摘出肝臓においては両群ともに肝臓内の脂肪沈着を認めたが、特に SPX 群では Sham 群と比較して脂肪化は高度であり、肝臓組織中の中性脂肪および血中の ALT 値は有意差をもって SPX 群で高値を呈していた。肝臓内の脂質合成マーカー(SREBP1c、FAS)と脂肪分解マーカーである CPT1 の発現は SPX 群で低下していた。UCP2 の発現は SPX 群で亢進していた。(図 1)

図 1



D. 考察

高脂肪食誘導性肥満ラットにおいて脾臓摘出により脂質糖代謝の悪化を認めた。脂肪化および肝機能の増悪をもたらすことが確認された。脾臓摘出後の肝脂肪化の要因が、肝細胞内の脂肪分解(β 酸化)に寄与する CPT1 の発現抑制によるものであることが示唆された。すなわち CPT1 の発現抑制により脂肪蓄積が生じる一方で、その down regulation により脂質合成系が抑制される。脂肪合成・分解のバランスが脂肪蓄積の方向に傾いていると考えられた。

E. 結論

今回の動物実験で、脾臓摘出による肝臓への脂肪蓄積機序が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者: 角間辰之 久留米大学バイオ統計センター 教授

研究: 肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究における生物統計学的解析

研究要旨: 本研究事業の目標は、慢性肝疾患患者の病態の多様性(食欲の低下、インスリン抵抗性、口腔粘膜病変、肝再生力の低下)に対応しうる新規治療法の開発であるが、本年度はその第一ステージとして、臨床病態データを用いて生物統計学的解析を行なった。

A. 研究目的

慢性肝疾患患者の病態データを用いて生物統計学的な予備解析を行なう。具体的には、(1)非B非C型肝炎患者の予測因子に関する統計学的考察、と(2)分岐鎖アミノ酸(=BCAA)食品(商品名アミノフィル)の市販後調査の preliminary 統計解析、を行なう。

B. 研究方法

(1)非B非C型肝炎患者の予測因子に関する統計学的考察: 現在非B非C型肝炎になる場合の特徴や予測因子に関する科学的エビデンスが乏しく、探索的データ解析手法を用いて非B非C型肝炎患者から測定された様々なリスク因子の関連性を考察する。

(2)分岐鎖アミノ酸(=BCAA)食品の市販後調査の統計解析: BCAA食品の preliminary な有効性評価を行なう。有効性指標の測定回数、測定時期がアンバランスであることから、アンバランスな経時データに対してフレキシブルな統計解析手法、例えば線形混合モデル、を用いることが重要となる。

(倫理面への配慮)

統計解析に用いられるデータは、個人が特定できないように加工されており、解析データはセキュリティの高いコンピュータのハードディスクに保存され、データが外部へ流出する危険性は極めて低い。

C. 研究結果

(1)非B非C型肝炎の特徴と予測因子の Preliminary 統計学的考察

非B非C型肝炎データベースには1373症例のデータが蓄積されており、リスク因子として(年齢、性、家族歴、輸血歴、アルコール摂取量、糖代謝異常、肝硬変、HBc抗体、ALT、AST、AFP、PIVKA-II、特異肝疾患病名、CEA、CA19-9)が記録されている。

これらのリスク因子の内(年齢、性、家族歴、輸血歴、アルコール摂取量、糖代謝異常、肝硬変、ALT、AST、PIVKA-II)を用い欠損値を除いた690名の肝癌患者データを今回解析した。反応変数には、肝癌の大きさによるTokyo分類(3群)を用い、リスク因子との関連性の検討をグラフィカルモデリングと樹形モデルを用いて行なった。

グラフィカルモデリングの長所は、(i)先験的(a priori)な統計モデル設定の必要性がない、(ii)複数の変数の関連性を多変量解析の立場で捕らえることができる、(iii)

変数の尺度は連続、離散の両方を同時に扱える。図1にグラフィカルモデリングの解析結果の例を示す。Tokyo 分類に直接関連性を持つリスク因子は肝硬変とPIVKA-IIで、その他のリスク因子が複雑に関連していることを視覚的に捉えることができる。

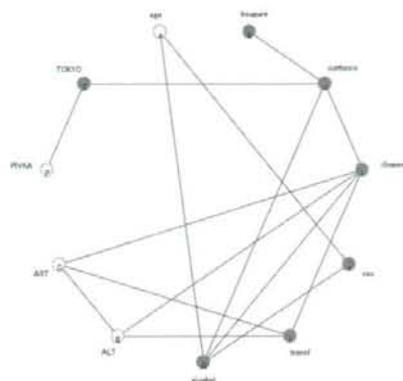


図1: グラフィカルモデリングの結果の例

樹形モデルはリスク因子の組み合わせによって反応変数を同質化させていく手法である。図2にアルコール摂取量、糖代謝異常、PIVKA(PIVKA-IIの値によって3群に分類)を用いた樹形モデルを示す。赤がTokyo分類1、緑がTokyo分類2、青がTokyo分類3を表す。

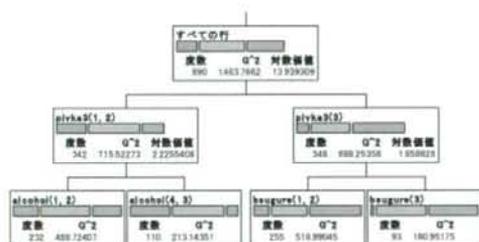


図2: 樹形モデルの例

この例では690症例が(pivka=1,2 且つ、alcohol=1,2)、(pivka=1,2 且つ、alcohol=3,4)、(pivka=3 且つ、bsugure=1,2)、(pivka=3 且つ、bsugure=3)の4つのリスク因子プロファイル群に分類された。このリスク因子の組み合わせはリスク因子間の相互作用として

解釈できる。次の解析ステップは、臨床的に解釈が可能な臨床モデルの探索的構築である。

(2) 分岐鎖アミノ酸(=BCAA)食品(商品名アミノフィール)の市販後調査のPreliminary統計解析

BCAA服用者(123名)、非服用者(65名)に対し、繰り返し臨床検査が行なわれた。但し、検査回数、検査間のインターバルは不揃い(アンバランス)である。図3の左はベースラインをゼロとした時の非服用群の臨床検査測定時間の分布、右は服用群の臨床検査測定時間を示す。

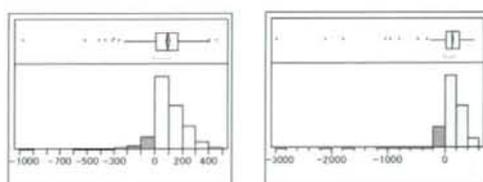


図3: 服用群と非服用群の測定時間の分布

測定時間が不揃いな経時データでは、反応変数の平均値が一意的に定義できず、臨床的考慮の元での定義が重要となる。平均値の定義から群全体の反応プロファイルが算出でき、視覚的に効果を捉えることが可能となり、このプロファイルを参考に線形混合モデルによる効果の解析が出来る。

D. 研究発表

1. 論文発表: 該当分野での論文なし
2. 学会発表: 該当分野での発表なし
3. 知的所得権の所得状況: なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|----------------|--|----------------|----------------------------------|-------------------|------------|----------|----------|
| 中村徹, 佐田通夫 | 血管内皮前駆細胞を用いた肝臓再生療法 | 「肝胆膵」編集委員会 | 肝胆膵 | 株式会社 アークメディア | 東京都千代田区三番町 | 2008年9月号 | P459-466 |
| 中村徹, 佐田通夫, | 自己末梢血単核球細胞を用いた非代償性肝硬変患者に対する肝臓再生医療の開始 -基礎研究から臨床研究へ- | 学術アドバイザー 小保政男 | 消化器疾患における Translational Research | 株式会社 アークメディア | 東京都千代田区三番町 | 2008年10月 | P63-68 |
| 中村徹 | 非代償性肝硬変患者に対する自己末梢血単核球細胞移植再生療法 | 小寺弘晃 | Liver Forum in Kyoto 第10回学術集会 | 株式会社 メディカルトリビューン社 | 東京都千代田区二番町 | 2008年12月 | P41-46 |
| 長尾由実子, 佐田通夫 | Q6 最近口内炎がよく出来ます。肝臓が悪いことと関係があるのでしょうか? | 松崎靖司, 宜保行雄 | 患者さんの質問に答える慢性肝疾患診療 改訂2版 | 南山堂 | 東京 | 2008 | 19-21 |
| 長尾由実子, 佐田通夫 | Q55 キャリアの血液に触れたのですが、どのように対処したらよいのでしょうか? | 松崎靖司, 宜保行雄 | 患者さんの質問に答える慢性肝疾患診療改訂2版 | 南山堂 | 東京 | 2008 | 188-190 |
| 長尾由実子, 佐田通夫 | C型肝炎患者が専門医に聞く88の質問. | 長尾由実子, 佐田通夫 | C型肝炎患者が専門医に聞く88の質問. 追補版 | 新興医学出版社 | 東京 | 2008 | 1-132 |
| 川口 巧, 佐田通夫 | Q8 シカやイノシシの生肉を食べると肝炎になるという記事を読みました。好物なのですが肝炎にかからぬようにワクチンを打っていただけますか? | 松崎靖司, 宜保行雄 | 患者さんの質問に答える慢性肝疾患診療 改訂2版 | 南山堂 | 東京 | 2008 | 26-27 |

| | | | | | | | |
|---------------|-------------------------------------|---------------|--|-----|----|------|---------|
| 川口 巧, 佐田通夫 | Q56 海外旅行に行くのですが、ウイルス性肝炎の予防接種は必要ですか？ | 松崎靖司, 宜保行雄 | 患者さんの 質問に答える 慢性肝疾患 診療 改訂 2 版 | 南山堂 | 東京 | 2008 | 183-185 |
| 川口 巧, 佐田通夫 | Q57 ウイルス性肝炎のワクチンはないのですか？ | 松崎靖司, 宜保行雄 | 患者さんの 質問に答える 慢性肝疾患 診療 改訂 2 版 | 南山堂 | 東京 | 2008 | 186-187 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|---|--------------|---------|-----------|------|
| Sato T, Kurokawa M, Nakashima Y, Ida T, Takahashi T, Fukue Y, Ikawa M, Okabe M, Kangawa K, <u>Kojima M.</u> | Ghrelin deficiency does not influence feeding performance. | Regul Pept. | 145 | 7-11 | 2008 |
| Taura N, <u>Yatsuhashi H</u> , Nakao K, Ichikawa T, Ishibashi H. | Long-term trends of the incidence of hepatocellular carcinoma in the Nagasaki prefecture, Japan. | Oncol Rep | 21(1) | 223-7 | 2009 |
| Chiba T, Miyagi S, Saraya A, Aoki R, Seki A, Morita Y, Yonemitsu Y, <u>Yokosuka O</u> , Taniguchi H, Nakauchi H, Iwama A. | The polycomb gene product BMI1 contributes to the maintenance of tumor-initiating side population cells in hepatocellular carcinoma. | Cancer Res | 68 (19) | 7742-7749 | 2008 |
| Maruyama H, Takahashi M, Ishibashi H, Okugawa H, Okabe S, Yoshikawa M, <u>Yokosuka O.</u> | Ultrasound-guided treatments under low acoustic power contrast harmonic imaging for hepatocellular carcinomas undetected by B-mode ultrasonography. | Liver Int | | 1-8 | 2008 |
| Maruyama H, Okugawa H, Yoshizumi H, Kobayashi S, <u>Yokosuka O.</u> | Hemodynamic features of gastrosplenic shunt: a Doppler study in cirrhotic patients with gastric fundal varices. | Acad Radiol. | 15(9) | 1148-1154 | 2008 |

| | | | | | |
|--|---|-------------------------|---------|-----------|------|
| Tomizawa M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K, Iwase K, Takiguchi M, Saisho H, <u>Yokosuka O.</u> | Hepatoblast-like cells enriched from mouse embryonic stem cells in medium without glucose, pyruvate, arginine, and tyrosine. | Cell Tissue Res | 333 (1) | 17-27 | 2008 |
| Kobayashi S, Maruyama H, Okugawa H, Yoshizumi H, Matsutani S, Ebara M, <u>Yokosuka O.</u> | Contrast-enhanced US with Levovist for the diagnosis of hepatic hemangioma: time-related changes of enhancement appearance and the hemodynamic background. | Hepatogastr oenterology | 55 (85) | 1222-1228 | 2008 |
| Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Muroyama R, Fukai K, Imazeki F, Kawabe T, <u>Yokosuka O.</u> , Omata M. | Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma. | Clin Cancer Res | 14 (12) | 3768-3776 | 2008 |
| Inada M, <u>Yokosuka O.</u> | Current antiviral therapies for chronic hepatitis B. | Hepatol Res | 38(6) | 535-542 | 2008 |
| Maruyama H, Yoshikawa M, <u>Yokosuka O.</u> | Current role of ultrasound for the management of hepatocellular carcinoma. | World J Gastroenter ol. | 14(11) | 1710-1719 | 2008 |
| Imazeki F, <u>Yokosuka O.</u> , Fukai K, Kanda T, Kojima H, Saisho H. | Prevalence of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C: comparison with hepatitis B virus-infected and hepatitis C virus-cleared patients. | Liver Int | 28 (3) | 355-362 | 2008 |
| Fujiwara K, Yasui S, Yonemitsu Y, Fukai K, Arai M, Imazeki F, Suzuki A, Suzuki H, Sadahiro T, Oda S, <u>Yokosuka O.</u> | Efficacy of combination therapy of antiviral and immunosuppressive drugs for the treatment of severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. | J Gastroenter ol | 43(9) | 711-719 | 2008 |

| | | | | | |
|---|---|----------------------------|-----|-----------|------|
| Ogata K, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hara K, Honda H, <u>Ide T</u> , Kumashiro R, Kohara K, Sata M, Watanabe H, Hamada N | A mutational shift from domain III to II in the internal ribosome entry site of hepatitis C virus after interferon-ribavirin therapy | Arch Virol | 153 | 1575-1579 | 2008 |
| Kuwahara R, Kumashiro R, <u>Ide T</u> , Koga Y, Hino H, Hisamochi A, Tanaka K, Ogata K, Koga H, Takao Y, Sata M | Predictive factors associated with the progression to hepatic failure caused by Lamivudine-Resistant HBV | Dig Dis Sci | 53 | 2999-3006 | 2008 |
| <u>Nagao Y</u> , Kawasaki K, Sata M. | Insulin resistance and lichen planus in patients with HCV-infectious liver diseases. | J Gastroenterol Hepatol | 23 | 580-585 | 2008 |
| <u>Nagao Y</u> , Matsuoka H, Kawaguchi T, <u>Ide T</u> , Sata M. | HBV and HCV infection in Japanese dental care workers. | Int J Mol Med | 21 | 791-799 | 2008 |
| Kawaguchi T, <u>Nagao Y</u> , Matsuoka H, <u>Ide T</u> , Sata M. | Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. | Int J Mol Med | 22 | 105-112 | 2008 |
| <u>Nagao Y</u> , Hiromatsu Y, Nakashima T, Sata M. | Graves' ophthalmopathy and tongue cancer complicated by peg-interferon α 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C: A case report and review of the literature. | Molecular Medicine Reports | 1 | 625-631 | 2008 |

| | | | | | |
|--|--|-----------------|-----|---------|------|
| Nagao Y, Kawakami Y, Yoshiyama T, Sata M. | Analysis of factors interfering with the acceptance of interferon therapy by HCV-infected patients. | Med Sci Monit | 14 | 45-52 | 2008 |
| 長尾由実子, 川口巧, 井出 達也, 佐田通夫. | HCVあるいはHBV感染者における歯科治療時の自己申告調査 | 感染症誌 | 82 | 213-219 | 2008 |
| 長尾由実子, 佐田通夫. | 日常診療に必要なウイルス肝炎の知識と対策 A型肝炎の現況と予防. | 臨床と研究 | 85 | 964-968 | 2008 |
| 長尾由実子, 佐田通夫. | C型肝炎ウイルス感染者に対するインターフェロン治療の状況-患者と医師のアンケート調査から- | HCV News letter | 3 | 1-4 | 2008 |
| 長尾由実子, 今福信一, 佐田通夫. | 肝臓病の方の皮膚や粘膜には,さまざまな症状が現れます。とくにインターフェロン治療中には注意が必要です。-肝臓病と皮膚・粘膜の病気- | 肝外病変シリーズ | 2 | 1-22 | 2008 |
| 今福信一, 中山樹一郎 | シクロスポリン投与中の乾癬患者におけるテルミサルタンの腎機能及び血圧に対する効果・安全性の検討 | 西日本皮膚科 | 70. | 204-207 | 2008 |
| 今福信一, 中山樹一郎 | 乾癬のシクロスポリン1.2mg/kg療法 | 西日本皮膚科 | 70 | 436-441 | 2008 |
| Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Ibi R, Okada T, Mutou M, Shiraishi S, Uchida Y, Otsuka M, Umeki Y, Oriishi T, Hayabuchi H, Tanaka S, Takakura M, Sata M. | Body cell mass is a useful parameter for assessing malnutrition and severity of disease in non-ascitic cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma or esophageal varices. | Int J Mol Med | 22 | 589-594 | 2008 |

| | | | | | |
|---|--|--------------------------------|----|-----------|------|
| Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Mutou M, Ibi R, Shiraishi S, Okada T, Uchida Y, Otsuka M, Tonan T, Fujimoto K, Oriishi T, Tanaka S, Takakura M, Sata M. | Supplement improves nutrition and stresses caused by examination-associated fasting in patients with liver cirrhosis. | Hepatol Res | 38 | 1178-1185 | 2008 |
| Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sumie S, Oriishi T, Mitsuyama K, Tsuruta O, Ueno T, Sata M. | Altered expression of glucagon-like peptide-1 and dipeptidyl peptidase IV in patients with HCV-related glucose intolerance. | J Gastroenter ol Hepatol | 23 | 244-251 | 2008 |
| Ohno. T, Tanaka. Y, Su gauchi. F, Orito. E, H asegawa. I, Nukaya. H , Kato. A, Matunaga. S , Endo. M, Yoshito. T, Sakakibara. k, Mizok ami. M | Suppressive effect of oral administration of branched-chain amino acid granules on oxidative stress and inflammation in HCV- positive patients with liver cirrhosis | Hapatol Res | 38 | 683-688 | 2008 |

IV. 研究成果の刊行物



Review

Ghrelin deficiency does not influence feeding performance

Takahiro Sato a,*, Mamoru Kurokawa b, Yoshiki Nakashima a, Takanori Ida a, Tomoko Takahashi a, Yoshihiko Fukue a, Masahito Ikawa d, Masaru Okabe d, Kenji Kangawa c, Masayasu Kojima a,*

a Molecular genetics, Institute of Life Sciences, Kurume University, B-3, Kurume research center building, 1-1, Hyakunen-koen, Kurume, 839-0864, Japan

b Department of Anatomy, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852-8523, Japan

c Department of Biochemistry, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita 565-8565, Japan

d Department of Experimental Genome Research, Genome Information Research Center, Osaka University, Suita 565-0871, Japan

Available online 18 September 2007

Abstract

Ghrelin is an endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor that is synthesized predominantly in the stomach. Previous studies demonstrated that ghrelin stimulates growth hormone release and food intake. These data suggested that antagonism of ghrelin could serve as a useful treatment for eating disorders and obesity. To study the role of endogenous ghrelin in feeding performance further, we generated ghrelin-deficient (ghrl-/-) mice. Unexpectedly, ghrl-/- mice exhibited normal growth, cumulative food intake, reproduction, histological characters, and serum parameters. There were no differences in feeding patterns between ghrl+/+ and ghrl-/- mice. Ghrl-/- mice displayed normal responses to scheduled feedings as seen for ghrl+/+ mice. Memory-related feeding performances of ghrl-/- mice were indistinguishable from ghrl+/+ littermates. These data indicate that ghrelin is not critical for feeding performance.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ghrelin knockout mouse; Feeding pattern; Memory

Contents

1. Introduction 8
2. Materials and methods 8
2.1. Animal care 8
2.2. Generation of ghrl-/- mice 8
2.3. Preparation to tissue and ELISA 8
2.4. Immunohistochemistry. 8
2.5. The analysis of feeding performance and memory 8
2.6. Statistical analysis 8
3. Results 8
3.1. Target disruption of the ghrl locus 8
3.2. Feeding pattern of ghrl-/- mice 9
3.3. Adaptation capability to negative energy states of ghrl-/- mice. 9
3.4. Memory-related feeding performances of ghrl-/- mice 10
4. Discussion 10
Acknowledgments 11
References 11

* Corresponding authors. Tel.: +81 942 37 6313; fax: +81 942 31 5212. E-mail address: mkojima@lsi.kurume-u.ac.jp (M. Kojima).

1. Introduction

Ghrelin is an endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) [1]. Ghrelin is primarily released from the stomach, but is also secreted from the duodenum and pancreas [1,2]. Peripherally-produced ghrelin influences pituitary hormone secretion, appetite, metabolism, gastrointestinal function, cardiovascular performance, and immune responses. Recently, we characterized ghrelin within the rat hypothalamus [3]; the physiological role(s) of ghrelin secreted from the hypothalamus, however, remains unclear.

Histological analysis indicated that ghrelin receptors localize to a variety of brain regions, including the suprachiasmatic nucleus (SCN) and arcuate nucleus (Arc) within the hypothalamus and the hippocampus [4]. The SCN is important region functioning in the regulation of circadian rhythms, while the Arc plays a primary role in feeding control. The hippocampus has a central role in the regulation of memory. Hypothalamic ghrelin also localizes to the Arc [3]; intracerebroventricular injection of ghrelin induces gene expression of neuropeptide Y and agouti-related peptide and impairs the electrical activity of proopiomelanocortin neurons [5–8]. These results indicate that hypothalamic ghrelin regulates feeding patterns and memory related to feeding.

In this study, we sought to investigate if ghrelin regulates feeding performances by generating ghrelin knockout mice.

2. Materials and methods

2.1. Animal care

All animal protocols were approved by the Ethical Committee for the Research of Life Science of Kurume University. All mice were housed in a 7 a.m. to 7 p.m. light cycle. All experiments were performed with F6 littermate pairs; mice were individually caged during experiments.

2.2. Generation of *ghrl*^{-/-} mice

These animals will be described in detail in another report. All exons were replaced by a neo cassette. Targeted ES cells and resultant wild-type (*ghrl*^{+/+}), heterozygous (*ghrl*^{+/-}), and homozygous (*ghrl*^{-/-}) pups were genotyped by Southern blot analysis using a 5'-probe, 3'-probe, and exon probe.

2.3. Preparation to tissue and ELISA

To confirm the absence of ghrelin from the stomachs of *ghrl*^{-/-} mice, tissues were quickly removed after mice were sacrificed. Each sample was diced and boiled for 5 min in a 10-fold volume of water to inactive intrinsic proteases. After cooling, solutions were adjusted to final concentrations of 1 M AcOH and 20 mM HCl. Tissues were homogenized with a Polytron mixer; after centrifugation at 15,000 rpm for 10 min, supernatants were loaded onto Sep-Pak C18 cartridges (Waters, Milford, MA). Cartridges were then washed in 0.9% NaCl and 10% CH₃CN/0.1% TFA before bound peptide was eluted with

60% CH₃CN/0.1% TFA. The eluate was lyophilized and analyzed using an active ghrelin ELISA Kit (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokyo, Japan).

2.4. Immunohistochemistry

Mice were perfused with 4% PFA solution and embedded in paraffin. Immunohistochemical staining of ghrelin was performed using the avidin–biotinylated-enzyme complex (ABC) method in conjunction with a VECTASTAIN ABC-PO kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Immunostaining was performed as previously described [3,9]. Briefly, sections were deparaffinized in xylene and a graded series of ethanol. Sections were then pretreated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 5 min to endogenous peroxidase activity. After rinsing with PBS, sections were treated for 30 min with 1.5% normal goat serum, then incubated with polyclonal rabbit anti-ghrelin antibody (#6-6; diluted 1:80,000) for 16 h at 4 °C. Sections were rinsed in PBS and incubated with biotinylated anti-rabbit IgG for 40 min. After rinsing in PBS, sections were incubated with avidin–biotinylated reagents for 1 h. Sections were visualized with DAB solution (DAKO, Kyoto, Japan).

2.5. The analysis of feeding performance and memory

Ghrl^{-/-} mice were housed in a K2-CABIN apparatus (Phenotype analyzing, Nagasaki, Japan) and given a powder diet (CREA, Tokyo, Japan) to estimate feeding patterns. Animals were given free access to feed and water. Using this system, we recorded the amounts of food and water intake every 15 min for 12 days. To reveal the adaptation capability of mice to a negative energy state, we instituted scheduled feedings. Mice were given feeds for a 4 h period only from 9 a.m. to 1 p.m. We then measured the 4-h food intake at 1 p.m. To investigate memory in *ghrl*^{-/-} mice, mice were housed in the KUROBOX apparatus (Phenotype analyzing, Nagasaki, Japan) [10].

2.6. Statistical analysis

Results are presented as the means±SD for each group. Comparisons between groups were made using ANOVA with a Williams test. *P*<0.05 was accepted as statistically significant.

3. Results

3.1. Target disruption of the *ghrl* locus

Loss of the *ghrl* allele was confirmed by southern blot and PCR analysis of DNA isolated from *ghrl*^{+/+}, *ghrl*^{+/-}, and *ghrl*^{-/-} mice (data not shown). Measurement of ghrelin levels by ELISA indicated that the stomachs of *ghrl*^{-/-} mice did not contain ghrelin. Immunohistochemistry also demonstrated the absence of ghrelin-producing cells in the stomachs of *ghrl*^{-/-} mice (data not shown). We observed a normal birth ratio of *ghrl*^{+/+}, *ghrl*^{+/-}, and *ghrl*^{-/-} mice as predicted by Mendelian genetics (*ghrl*^{+/+} : *ghrl*^{+/-} : *ghrl*^{-/-} = 243 : 498 : 257). All