

200921002A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

平成 22 (2010) 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 21 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. 循環器疾患におけるグレリン投与の治療的意義 ----- 11
寒川 賢治 (国立循環器病センター 研究所 所長)
2. グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発 ----- 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デキサメサゾン誘導体筋萎縮に及ぼす
ghrelin 受容体作動薬の効果 ----- 19
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. バリン欠乏食給餌による拒食症モデルラットでの
グレリンによる摂食機能回復について ----- 25
村 上 昇 (宮崎大学農学部獣医学科家畜生理学 教授)
6. オクタン酸高含有食品の摂取による内因性グレリンの増加と臨床応用 ----- 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 ----- 33
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. グレリン産生腫瘍 (グレリノーマ) モデルマウスの樹立 ----- 37
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. グレリンによる食欲調節およびエネルギー代謝のメカニズムについて ----- 41
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 ----- 46
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。グレリンは末梢神経求心路を介して心筋梗塞後の心臓交感神経を抑制し、心筋梗塞後の急性期死亡率を減少させ、慢性低酸素による肺高血圧と肺動脈リモデリングを改善した。拒食症モデルラットを使用した研究から、拒食症の種類によってはグレリンの摂食誘起効果が中枢性と末梢性投与で異なることが推測された。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。グレリン受容体作動薬は高齢者におけるデキサメサゾン誘導性筋萎縮を抑制する薬物となる可能性が示された。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。グレリン過剰発現動物を二つのアプローチから作出し、成長や摂食、耐糖能などの発現型を検討中である。臨床研究分野では、「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」の試験を終了し、結果を解析中である。「胃切除術後患者」および「食道切除胃管再建術後患者」に対するグレリンの臨床効果を検討した二重盲検比較試験では、摂食量増加や体重減少の抑制などの有益な臨床効果を確認した。一方、オクタン酸高含有食品を摂取すると内因性グレリンが増加し、カヘキシアを呈する患者の栄養療法として重要であることが示された。本年度は、グレリンの自律神経障害や循環器疾患への病態生理学的意義の解明、加齢による脂肪蓄積や筋萎縮に対する改善効果などの基礎的な研究成果に加えて、慢性閉塞性肺疾患、胃切除後や食道切除胃管再建術後の患者に対する効果の評価、および内因性グレリンを増加させる方策の解明など、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
所 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、循環器系並び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・筋肉量の低下、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に関する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) 循環器疾患におけるグレリン投与の治療的意義
- 2) バリン欠乏食給餌による拒食症モデルラットでのグレリンによる摂食機能回復について
- 3) オクタン酸高含有食品の摂取による内因性グレリンの増加と臨床応用
- 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) グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発
- 6) 高齢ラットにおけるデキサメサゾン誘導性筋萎縮に及ぼすグレリン受容体作動薬の効果
- 7) グレリンによる食欲調節およびエネルギー代謝のメカニズムについて
- 8) グレリン産生腫瘍 (グレリノーマ) モデルマウスの樹立
- 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) 循環器疾患におけるグレリン投与の治療的意義

寒川は、前年度までの研究から、グレリン投与は、心筋梗塞後の心臓交感神経活動を著明に抑制し、急性期死亡率を有意に減少させ、また、慢性期左室リモデリングも有意に改善することを明らかにしている。本年度の結果より、心筋梗塞後の心臓におけるグレリン受容体の局在が、細胞マーカーの解析から末梢神経終末であることが明らかとなった。この事実より、グレリンの交感神経抑制機序の少なくとも一部は、末梢神経求心路を介している可能性が示唆された。さらに、2週間連日グレリン皮下投与が、慢性低酸素による肺高血圧と肺動脈リモデリングを改善することを明らかにした。この結果から、グレリンは慢性低酸素による肺高血圧の治療薬として有用であると考えられた。

2) バリン欠乏食給餌による拒食症モデルラットでのグレリンによる摂食機能回復について

村上は、バリン欠乏食給餌をラットに給餌することにより、拒食症モデルラットを作出した。バリン欠乏食群では著しい摂食低下とそれに伴う体重減少が起こった。血中グレリン濃度は約3倍に上昇しており、空腹感が亢進しているにも関わらず拒食状態にあると推測された。この拒食症ラットにグレリンを腹腔内投与しても摂食の亢進は認められなかったが、グレリンを中枢へ投与すると有意な摂食増加が認められた。以上の結果、拒食症の種類によってはグレリンの摂食誘起効果が中枢性と末梢性投与で異なる可能性があることが推測された。

3) オクタン酸高含有食品の摂取による内因性グレリンの増加と臨床応用

中里は、グレリンの活性発現に必須である3番目のセリン残基へのオクタン酸修飾に注目し、オクタン酸を多く摂取することで、内因

性グレリン分泌の変化、および臨床応用の可能性について検討した。カヘキシアを呈する慢性呼吸器疾患患者を対象にして、400mlあたり2.8gのオクタン酸を含有するラコールを摂取させると、摂取当日の血中グレリン濃度が有意に増加した。また、ラコールを2週間連続で摂取させると、体重、食欲、空腹時の血中グレリン濃度、血中グレリン/デスアシルグレリン比、IGF-Iが増加し、栄養状態を反映する血中パラメータも改善した。以上より、オクタン酸高含有食品の摂取は、内因性グレリンの増加をもたらす、カヘキシアを呈する患者の栄養療法として重要であると考えられた。

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、本年度はグレリン受容体(GHS-R)拮抗薬を用いた実験結果から、内因性グレリンによる褐色脂肪組織(BAT)のノルアドレナリン(NA)分泌抑制作用は、4週齢では認められないが、20週齢では8週齢と同様に認められること、また、血中グレリンは3群間で20週齢ラットが最も高値を示すことを明らかにした。これらの結果から加齢に伴い内因性グレリンによるBATの機能抑制が強まり脂肪蓄積が増している可能性が示された。加齢に伴う体脂肪蓄積機序にはGH分泌低下に加え、BATの機能低下の関与が示唆され、後者にはグレリン/GHS-R系が関与している可能性が考えられた。

5) グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発

中尾は、アシル化を経ずにGhrelin様活性を有するGhrelin-analog過剰発現Tgマウスを作製した。3番目のSerをTrpに置き換えたペプチド(Trp-Ghrelin)は、投与実験ではGhrelinの10-20倍の濃度においてGhrelin同様の摂食促進作用とGH分泌促進作用を発揮した。Trp-Ghrelin cDNAをSAP promoterの下流に繋いだコンストラクトを構築し、Tgマウスを作製した。得られたTgマウスの血中には、WTの血漿Ghrelin濃度の約220倍のTrp-Ghrelin

が存在しており、耐糖能に変化を認めた。現在、フェノタイプの詳細な解析を行っている。

6) 高齢ラットにおけるデキサメサゾン誘導性筋萎縮に及ぼすグレリン受容体作動薬の効果

千原は、高齢者におけるデキサメサゾン誘導性筋萎縮に及ぼす ghrelin の臨床応用の可能性を検討する目的で、18ヶ月齢のSD系雄ラットにおいてデキサメサゾン(100 μ g/kg \times 1回/日 \times 5日)を投与した。デキサメサゾンはヒラメ筋線維断面積を減少させたが、デキサメサゾンと同時に ghrelin 受容体作動薬 GHRP-2(100 μ g/kg \times 2回/日 \times 5日)を投与したところ、筋線維断面積の減少は認められなかった。この効果は TypeI 線維では観察されたが、TypeII 線維では観察されなかった。これらの成績から、GHRP-2 が高齢者におけるデキサメサゾン誘導性筋萎縮を抑制する薬物となる可能性が示唆された。

7) グレリンによる食欲調節およびエネルギー代謝のメカニズムについて

児島は、グレリン欠損マウスを作製し、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出した。グレリン欠損マウスでは、睡眠・覚醒による血圧・心拍や体温の変動幅が狭く、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。今年度の研究によって、グレリンによる自律神経機能異常は、交感神経と副交感神経のバランスの崩れ、そしてこれらの日内変動リズムの消失によって生じるものであると考えられた。また、グレリンKOマウスへのカテコールアミンブロッカーの投与実験で、 β ブロッカーがある程度グレリンKOマウスの血圧を低下させることがわかった。一方、 α ブロッカーの効果はあまり認められなかった。以上の結

果から、グレリン欠損の影響は β アドレナリン受容体が大きく関与していると推察された。実際、グレリンによる体温低下作用に関する研究から、グレリンがBATにおいて β 3アドレナリン受容体を抑制して、交感神経機能を抑制することがわかった。

8) グレリン産生腫瘍(グレリノーマ)モデルマウスの樹立

赤水は、グレリンの慢性作用を明らかにするため、グレリンプロモーター下流にSV40T抗原を結合したトランスジェニック(Tg)マウス(GP-Tag Tg)を作製した。これまでのTgマウスではデスアシルグレリンのみが産生される結果に終わっていたが、GP-Tag Tgでは、胃のグレリン細胞の増生、血中グレリン濃度の上昇が確認された。血中IGF-I濃度は上昇、GHRH負荷後GH反応は亢進傾向であり、GH-IGF-I軸の活性化が示唆された。糖負荷試験では、インスリン分泌抑制を介した耐糖能の悪化が示唆された。

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、グレリン投与により上部消化管手術の術後体重減少を予防するという臨床試験を行った。現在までに胃全摘および食道切除胃管再建の2つの疾患モデルにおいて、術後経口摂取再開時よりグレリン3 μ g/kgもしくは生食を1日2回投与するというランダム化比較試験(それぞれの試験で各群10例)を行った。安全性に関しては、合計21例のグレリン投与群のうち1例にgrade1の発汗を認めて試験を中止した他は有害事象を認めなかった。結果は2つの試験ともほぼ同じで、グレリン投与により食欲、食事摂取カロリー、体重の改善を認めた。また、体組成においては脂肪の減少は抑制されないが除脂肪体重の減少が抑制された。この効果はグレリンの食欲増進およびGH作用によるものが大きいと思われるが、我々は抗炎症・侵襲さらに呼吸循環動態安定作用にも注目している。術直後経口摂取開始前からグレリンを投与することや、消化器癌における化学療法時の食欲不振に対するグレリンの効果は今後の検討課題である。

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3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6例、宮崎大学7例の計33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。目標予定症例に到達し、効果安全性評価委員会の承認のもと、キーオープンを行い、現在解析中である。

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、グレリンは心筋梗塞後の心臓交感神経を少なくとも一部は末梢神経求心路を介して抑制すること、急性期死亡率を減らすこと、慢性低酸素による肺高血圧と肺動脈リモデリングを改善することを明らかにした。また、拒食症ラットを使用した研究から、拒食症の種類によってはグレリンの摂食誘起効果が中枢性と末梢性投与で異なる可能性があることが推測された。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。さらに、グレリン受容体作動薬は高齢者

におけるデキサメサゾン誘導性筋萎縮を抑制する薬物となる可能性が示された。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。また、グレリン過剰発現動物を二つのアプローチから作出し、成長や摂食、耐糖能などの発現型を検討中である。臨床研究分野では、「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」、「胃切除術後患者に対するグレリンの臨床効果」、「食道切除胃管再建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行った。現在、結果を解析中のものもあるが、終了した臨床試験の結果では、グレリンの有益な臨床効果を確認している。一方、オクタン酸高含有食品を摂取すると内因性グレリンが増加し、カヘキシアを呈する患者の栄養療法として重要であることが示された。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、グレリンの有する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挙げることができた。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. 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*, 30: 758-765, 2009.
2. Hiejima H, Nishi Y, Hosoda H, Yoh J, Mifune H, Satou M, Sugimoto H, Chiba S, Kawahara Y, Tanaka E, Yoshimatsu H, Uchimura N, Kangawa K, Kojima M. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon fasting in rodents. *Regul Pept*, 156: 47-56, 2009.
3. Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda H, Hosoda K, Shimatsu A, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. A mouse model of ghrelinoma exhibited activated growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297: E802-811, 2009.
4. Kaiya H, Riley LG, Janzen W, Hirano T, Grau EG, Miyazato M, Kangawa K. Identification and genomic sequence of a ghrelin receptor (GHS-R)- like receptor in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci*, 26: 330-337, 2009.
5. Takahashi H, Kurose Y, Suzuki Y, Kojima M, Yamaguchi T, Yoshida Y, Ogino M, Hodate K, Azuma Y, Sugino T, Kangawa K, Hasegawa Y, Kobayashi S. Ghrelin differentially modulates the GH secretory response to GHRH between the fed and fasted states in sheep. *Domest Anim Endocrinol*, 37: 55-60, 2009.
6. 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*, 204: 590-594, 2009.
7. 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*, 163: 33-38, 2009.
8. Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford JL, Hosoda H, Theil J, von Horsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kangawa K, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin. *J Immunol*, 183: 2859-2866, 2009.
9. Kaiya H, Mori T, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin receptor (GHS-R) -like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 153: 438-450, 2009.
10. Kyoraku I, Shiomi K, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin reverses experimental diabetic neuropathy in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 389: 405-408, 2009.
11. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K. Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocr J*, 56: 1119-1128, 2009.
12. Kaiya H, Kodama S, Ishiguro K, Matsuda K, Uchiyama M, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin-like peptide with fatty acid modification and O-glycosylation in the red stingray, *Dasyatis akajei*. *BMC Biochem*, 10: 30, 2009.
13. Kishimoto I, Tokudome T, Schwenke DO, Soeki T, Hosoda H, Nagaya N, Kangawa K. Therapeutic potentials of ghrelin in cardiac diseases. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 4: 283-289, 2009.
14. Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Okimura Y, Nose O, Chihara K. Difference between Japanese and Caucasian populations in the allelic frequency of growth hormone receptor polymorphism. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 22: 41-46, 2009.

15. Mano-Otagiri A, Ohata H, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Shibasaki T. Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *J Endocrinol*, 34: 226-237, 2009.
16. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Effect of octanoic acid-rich formula on plasma ghrelin levels in cachectic patients with chronic respiratory disease. *Nutr J*, 8: 25, 2009.
17. Yamaguchi N, Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Ohnita K, Shikuwa S, Mizuta Y, Nakazato M, Kohno S. Concentrations of alpha- and beta-defensins in plasma of patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*, 58: 192-197, 2009.
18. Toshinai K, Nakazato M. Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2: novel bioactive peptides processed from VGF. *Cell Mol Life Sci*, 66: 1939-1945, 2009.
19. Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Ghrelin and its therapeutic potential for cachectic patients. *Peptides*, 30:1951-1956, 2009.
20. Kato K, Kannan H, Ohta H, Kemuriyama T, Maruyama S, Tandai-Hiruma M, Sato Y, Nakazato M, Nishimori T, Ishida Y, Onaka T, Nishida Y. Central endogenous vasopressin induced by central salt-loading participates in body fluid homeostasis through modulatory effects on neurons of the PVN in conscious rats. *J Neuroendocrinol*, 21: 921-934, 2009.
21. Saitoh Y, Hongwei W, Ueno H, Mizuta M, Nakazato M. Telmisartan attenuates fatty-acid-induced oxidative stress and NAD(P)H oxidase activity in pancreatic beta-cells. *Diabetes Metab*, 35: 392-397, 2009.
22. Yamamoto K, Fujiwara Y, Nishida T, Takiguchi S, Nakajima K, Miyata H, Yamasaki M, Mori M, Doki Y. Induction chemotherapy with docetaxel, 5-FU and CDDP (DFP) for advanced gastric cancer. *Anticancer Res*, 29: 4211-4215, 2009.
- 23 Miyata H, Yamasaki M, Takiguchi S, Nakajima K, Fujiwara Y, Nishida T, Mori M, Doki Y. Salvage esophagectomy after definitive chemoradiotherapy for thoracic esophageal cancer. *J Surg Oncol*, 1;100: 442-446, 2009.
24. Motoori M, Takemasa I, Yamasaki M, Komori T, Takeno A, Miyata H, Takiguchi S, Fujiwara Y, Yasuda T, Yano M, Matsuura N, Matsubara K, Monden M, Mori M, Doki Y. The feasibility of using biopsy samples from esophageal cancer for comprehensive gene expression profiling. *Int J Oncol*, 35: 265-271, 2009.
25. Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford JL, Hosoda H, Theil J, von Hörsten S, Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kangawa K, Yamamura T. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol*, 183: 2859-2866, 2009.
26. Takahashi T, Ida T, Sato T, Nakashima Y, Nakamura Y, Tsuji A, Kojima M. Production of n-octanoyl-modified ghrelin in cultured cells requires prohormone processing protease and ghrelin O-acyltransferase, as well as n-octanoic acid. *J Biochem*, 146: 675- 682, 2009.
27. Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, Kojima M. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun*, 386: 153-158, 2009.
28. Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoœur C, Gueorguiev M, Khalaf S, Davies D, Grossman AB, Kojima M, Petersenn S, Froguel P, Korbonits M. The role of ghrelin and ghrelin-receptor gene variants and promoter activity in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*, 161: 307-315, 2009.
29. Mano-Otagiri A, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Ohata H, Shuto Y, Nakabayashi H, Sugihara H, Oikawa S, Shibasaki T. Genetic suppression of ghrelin receptors activates brown adipocyte function and decreases fat storage in rats.

- Regul Pept, 160: 81-90, 2010.
30. Goto S, Nagao K, Bannai M, Takahashi M, Nakahara K, Kangawa K, Murakami N. Anorexia in rats caused by a valine-deficient diet is not ameliorated by systemic ghrelin treatment. *Neuroscience*, 166: 333-340, 2010.
 31. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ*, inpress.
 32. Kangawa K. Challenge for novel peptide hormones: from discovery to therapeutic application. *Endocr J*, inpress.
 33. Adachi S, Takiguchi S, Okada K, Yamamoto K, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Fujiwara Y, Hosoda H, Kangawa K, Mori M, Doki Y. Effects of ghrelin administration after total gastrectomy: A prospective randomized placebo-controlled phase II study. *Gastroenterology*, inpress.
 34. Yamamoto K, Takiguchi S, Miyata H, Adachi S, Hiura Y, Yamasaki M, Nakajima K, Fujiwara Y, Mori M, Kangawa K, Doki Y. Randomized phase II study of clinical effects of ghrelin after esophagectomy with gastric tube reconstruction. *Surgery*, inpress.
 35. Yamamoto D, Maki T, Herningtyas EH, Ikeshita N, Shibahara H, Sugiyama Y, Nakanishi S, Iida K, Iguchi G, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Branched-chain amino acid protects against dexamethasone-induced soleus muscle atrophy in rats. *Muscle Nerve*, inpress.
 36. Inoue Y, Nakahara K, Kangawa K, Murakami N. Transitional change in rat fetal cell proliferation in response to ghrelin and des-acyl ghrelin during the last stage of pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*, inpress.
 37. Ueno H, Shiiya T, Nakazato M. Translational research of ghrelin. *Ann N Y Acad Sci*, inpress.
 38. Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K. Ghrelin and Functional Dyspepsia. *International Journal of Peptides*, inpress.
 38. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K. Ghrelin Increases Hunger and Food Intake in Patients with Restricting-type Anorexia Nervosa: A Pilot Study. *Endocr J*, inpress.
2. 学会発表
 1. 山田豪, 有安宏之, 岩倉浩, 寒川賢治, 赤水尚史, 中尾一和: The analysis of transgenic mice over-expressing ghrelin derivatives. *International Ghrelin Symposium*, 東京, 2009年11月19日.
 2. 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82回日本内分泌学会学術総会, 前橋, 2009.
 3. Goto S, Nagao K, Bannai M, Takahashi M, Nakahara K, Murakami N. Dietary valine deficiency induces anorexia that is reversed by neither ghrelin, NPY nor AGRP. *Society for Neuroscience 39th Annual Meeting*, Chicago, Nov 11, 2009.
 4. Shiiya T, Ueno H, Shiomi K, Nakazato M. Bolus injection of ghrelin immediately before a liquid meal does not worsen glucose metabolism in type 2 diabetic patients. 17th *International Symposium on Regulatory Peptides*. Santa Barbara, California, USA, January 25-28, 2009.
 5. Ueno H, Shiiya T, Kodama T, Matsumoto N, Ashitani J, Nakazato M. Oral administration of omega-3 polyunsaturated acids improves cachectic status in patients with chronic respiratory disease through the elevation of plasma ghrelin levels. 17th *International Symposium on Regulatory Peptides*. Santa Barbara, California, USA, January 25-28, 2009.
 6. Ueno H, Nakazato M. Feeding regulation and translational research of gut peptides. 15th *Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus*. Jeju island, Korea, November 19-21, 2009.
 7. Adachi S, Takiguchi S, Yamamoto K,

- Yamasaki M, Miyata H, Fujiwara Y, Hosoda H, Kangawa K, Mori M, Doki Y: Effects of ghrelin administration after total gastrectomy : A Prospective randomized placebo-controlled phase II study. International Symposium on Ghrelin, Tokyo, Nov 18-20, 2009.
8. Yamamoto K, Takiguchi S, Miyata H, Adachi S, Yamasaki M, Fujiwara Y, Hosoda H, Mori M, Kangawa K, Doki Y: Randomized phase II study of clinical effects of ghrelin after esophagectomy with gastric tube reconstruction. International Symposium on Ghrelin, Tokyo, Nov 18-20, 2009.
9. 足立真一、瀧口修司、山本和義、山崎誠、宮田博志、中島清一、藤原義之、森正樹、土岐祐一郎: 胃全摘術後患者に対するグレリンの臨床効果と安全性に関する第 II 相臨床試験. 第 109 回日本外科学会定期学術集会, 福岡, 平成 21 年 4 月 2 日~4 日.
10. 足立真一、瀧口修司、山本和義、山崎誠、宮田博志、中島清一、藤原義之、西田俊朗、森正樹、土岐祐一郎: 胃全摘術後患者に対する合成グレリンを用いた術後栄養管理の新たなアプローチ. 第 64 回日本消化器外科学会総会, 大阪, 平成 21 年 7 月 16 日~18 日.
11. 山本和義、足立真一、瀧口修司、宮田博志、山崎誠、中島清一、藤原義之、西田俊朗、森正樹、土岐祐一郎: 当科における食道癌周術期管理とグレリン臨床試験. 第 46 回日本外科代謝栄養学会学術集会, 東京, 平成 21 年 7 月 9 日~10 日.
12. Iwakura H, Ariyasu H, Murayama T, Teramukai S, Akiyama H, Kawanabe K, Nakamura T, Kangawa K, Akamizu T: Effects of Three Weeks Treatment of Ghrelin on Body Composition and Metabolic Parameters in Patients Undergoing Total Hip Replacement for Osteoarthritis. 91st The Endocrine Society's Annual Meeting. Washington DC, June 10-13, 2009.
13. 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: 遺伝子改変動物を用いて検討した Des-acyl Ghrelin の糖代謝への影響. 第 82 回日本内分泌学会学術総会, 平成 21 年 4 月 23 日~25 日, 群馬県民会館.
14. 岩倉浩、有安宏之、細田公則、中尾一和、寒川賢治、赤水尚史: グレリン細胞腫瘍化トランスジェニックマウスの解析. 第 82 回日本内分泌学会学術総会, 平成 21 年 4 月 23 日~25 日, 群馬県民会館.
15. 有安宏之、岩倉浩、赤水尚史、寒川賢治: 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の検討. 第 82 回日本内分泌学会学術総会, 平成 21 年 4 月 23 日~25 日, 群馬県民会館.
16. 岩倉浩、有安宏之、寒川賢治、赤水尚史: グレリン投与がヒトの糖代謝に与える影響の検討—人工股関節置換術期患者に対するグレリン無作為二重盲検偽薬対照比較試験より. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪, ホテル NCB, 平成 21 年 5 月 21 日~24 日.
17. 赤水尚史、佐倉伸夫、但馬剛、細田洋司、岩倉浩、有安宏之、寒川賢治: 脂肪酸酸化異常症における血中グレリン濃度の変動. 第 51 回日本先天代謝異常学会, 京王プラザホテル, 平成 21 年 11 月 5 日~7 日.
18. Akamizu T: Clinical applications of ghrelin to disorders related to feeding and GH secretion. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Tokyo, Nov 18-20, Tokyo International Forum, 2009.
19. Yamada G, Ariyasu H, Iwakura H, Kangawa K, Akamizu T, Nakao K: The analysis of transgenic mice over-expressing ghrelin derivatives. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Tokyo, Nov 18-20, Tokyo International Forum, 2009.
20. Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T,

- Takano K, Kangawa K: Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Tokyo, Nov 18-20, Tokyo International Forum, 2009.
21. Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Hosoda H, Hosoda K, Kangawa K, Akamizu T, Nakao K: Establishment of a mouse model of ghrelinoma. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Tokyo, Nov 18-20, Tokyo International Forum, 2009.
22. Chin K, Takahashi K, Akamizu T, Oga T, Chihara Y, Harada Y, Handa T, Tsuboi T, Mishima M, Kanagawa K: Ghrelin level in patients with obstructive sleep apnea before and after CPAP treatment. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Tokyo, Nov 18-20, Tokyo International Forum, 2009.
23. Miyake S, Theil MM, Hosoda H, Akamizu T, Kangawa K, Yamamura T: Ghrelin suppresses microglial activation and the development of EAE. 2009 International Symposium on Ghrelin - The 10th Anniversary of the Discovery of Ghrelin, Tokyo, Nov 18-20, Tokyo International Forum, 2009.
24. 児島将康 : Peptide hunting: from Drosophila to Human: Satellite Symposium of 9th VIP/PACAP Symposium in Yakushima, Yakushima, Oct 2, 2009.
25. 児島将康 : グレリンによる摂食調節と自律神経機能 : 第30回日本肥満学会, 浜松, 平成21年10月10日.
26. 児島将康 : Phenotypic analysis of ghrelin knockout mouse : 第82回日本生化学会大会, 神戸, 平成21年10月21日.
27. 児島将康 : Phenotypic analysis of ghrelin knockout mouse : 2009 International Symposium on Ghrelin, Tokyo, Nov 18, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

- ① 名称：加療中動物の回復促進治療剤
 出願年月日：2010年1月15日
 出願国：日本
 出願番号：特願2010-6557
 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

なし

循環器疾患におけるグレリン投与の治療的意義

研究分担者 寒川賢治 国立循環器病センター研究所 所長

本研究では、新規成長ホルモン分泌促進ペプチドであるグレリンの循環器疾患における意義を検討しているが、前年度までに、グレリンが心筋梗塞後の心臓交感神経活動を著明に抑制し、急性期死亡率を有意に減少させる事実を明らかにしてきた。また心筋梗塞後慢性期左室リモデリングも有意に改善することを証明した。本年度は、①グレリンの作用機序および、②肺高血圧における治療的意義に検討を進めている。

A. 研究目的

心筋梗塞による死亡は、急性期においては心臓交感神経の過剰興奮に由来する不整脈が多く、慢性期においては左室リモデリングに由来する心不全が多い。また、原発性や種々の疾患に伴う肺高血圧も有効な治療法が限られており実際の診療に難渋することが多い。高齢化社会において、これらの心疾患の予後やQOLの改善は医療のみならず社会的にも重要な課題である。我々は1999年にオーファン受容体であった成長ホルモン（GH）分泌促進因子受容体の内因性リガンドとして、グレリンと名付けた新規ペプチドをラットおよびヒトの胃から発見した。これまでに、心臓カヘキシアを有する慢性心不全の治療薬として有用性（Nagaya et al. Circulation 2001）、心筋梗塞急性期における死亡率改善効果（Schwenke DO et al. Endocrinology 2008）、心筋梗塞慢性期における心不全改善効果（Soeki T et al. Am J Physiol. 2008）を、われわれの手で明らかにしている。グレリンの心血管系への作用にはGH/IGF-1を介したものと、介さない独自作用があることもすでに明らかにしているが（Kojima et al. Physiol Rev 2005）、前年度までの本研究において報告しているようにGH/IGF-1に影響しない量のグレリン投与による交感神経抑制・抗左室リモデリング作用を証明しており、循環器系に対するグレリンの（GH系を介さない）作用の存在が示唆されている。そこで本年度はその機序に関して検討を進めた。

B. 研究方法

【実験1】交感神経系抑制機序の検討

雄 Sprague-Dawley ラット（280-340g）に Urethane 麻酔下で左冠動脈結紮により心筋梗塞を作製し、経時的（1日目、3日目、2週間後、1月後）に心臓組織のサンプリングを行った。4%PFAによる還流固定後にパラフィン包埋し2ミクロンの薄切切片を作製した後、病理学的検討を行った。グレリン受容体に対する特異抗体を宮崎大学伊達教授・中里教授（Date Y et al. Gastroenterology 2002）より供与いただき免疫組織染色により受容体の局在を検討した。

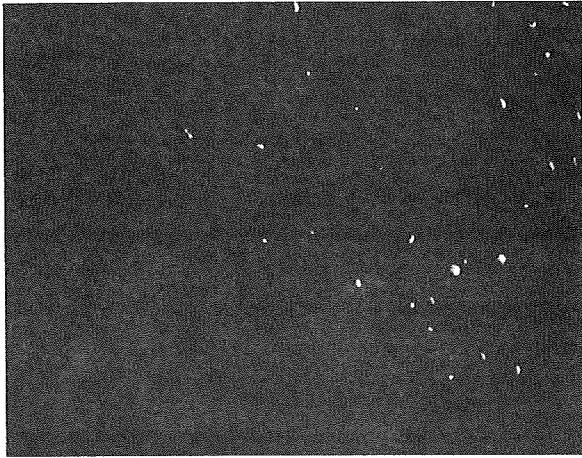
【実験2】肺高血圧モデルへの治療的効果の検討

雄 Sprague-Dawley ラット（180-220g）を慢性低酸素下に飼育し肺高血圧モデルを作製したモデルにおけるグレリンの治療効果を検討した。肺動脈圧測定のためのテレメトリックトランスミッターを埋め込み一週間回復期の後に低酸素チャンバー内で飼育した。最初8%の急性低酸素刺激下に10分刺激しその後10%酸素下に慢性低酸素刺激を2週間の後再度急性実験を行った。この2週間の間グレリン 150 μg/kg/day または生理食塩水を毎日皮下注射し、両群を比較検討した。心臓組織のサンプリングを行った後、病理学的検討としてヘマトキシリンエオジン染色を行った。

C. 研究結果

【実験 1】心臓におけるグレリン受容体の局在検討

グレリン受容体特異的抗体を用いた梗塞後心筋の免疫染色の結果を図 1 に示している。



<図 1>心臓におけるグレリン受容体発現の局在

心筋梗塞後 3 日目の心室におけるグレリン受容体発現を免疫染色で検討したもの。グレリン受容体特異的の一次抗体で染色後 TRITC-coupled anti-Rabbit IgG で発色している。赤色で示されている心筋梗塞後のグレリン受容体の局在は特徴的な染色パターンを呈していた。

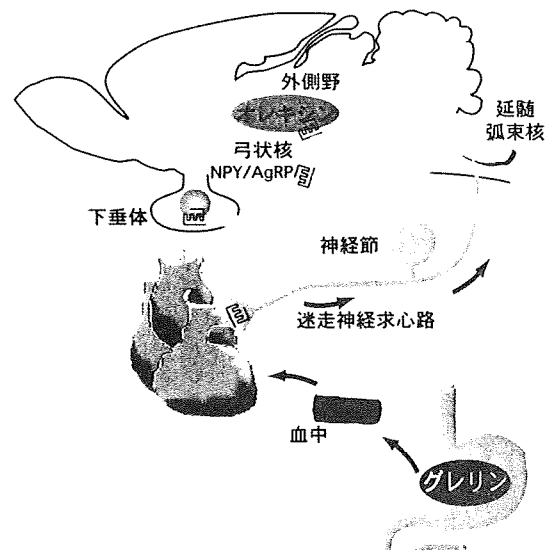
図 2 に示すようにこのパターンは末梢神経終末のマーカである CGRP やアセチルコリンエステラーゼの染色パターンと一致していることから心筋梗塞後の心臓におけるグレリン受容体は末梢神経終末に局在することが示唆された。



<図 2>心臓における CGRP と AChE 発現の局在

心筋梗塞後 3 日目の心室における Calcitonin gene related peptide (CGRP; 左) と Acetylcholine Esterase (AChE; 右) 発現を免疫染色各タンパクの特異的 1 次抗体と HRP 結合 2 次抗体で染色後に DAB 色素を用いて発色している。レンガ色で示されている心筋梗塞後の CGRP および AChE の局在は図 1 に示したグレリン特徴的な染色パターンと類似していた。

この事実からグレリンの交感神経活性抑制効果が末梢神経終末におけるグレリン受容体を介していることが示唆された。実際、宮崎大学の伊達らは、①グレリンの摂食亢進作用は胃における迷走神経終末を介すること、②グレリン受容体遺伝子が迷走神経求心路の神経核である nodose ganglion に多量に証明されることを示している。Nodose ganglion からの孤束核への入力は延髄の交感神経中枢を抑制的に調節することはよく知られた事実であり、これらのことを考え合わせると図 3 に示したようなメカニズムが考えられる。



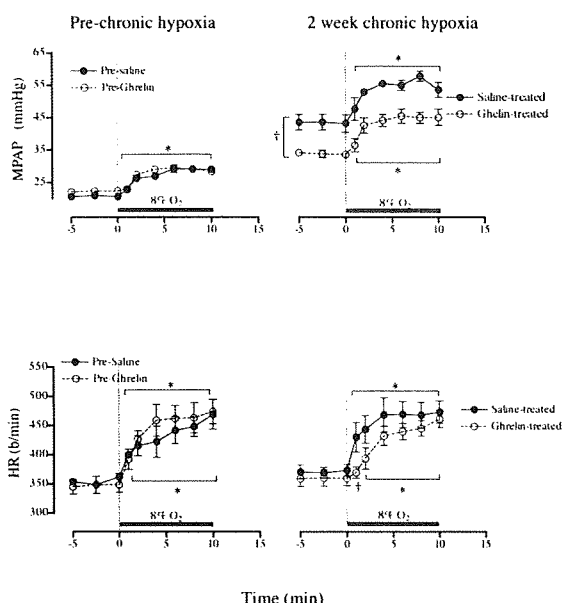
<図 3>グレリンの交感神経抑制機序

胃から分泌された内因性グレリンまたは投与したグレリンは心筋梗塞後の心臓における末梢神経終末に作用した迷走神経求心路と孤束核を介して

延髄にその情報を伝達し活性化された交感神経系を抑制的に調節する。

【実験 2】肺高血圧モデルへの治療的効果の検討

ラットを肺動脈圧モニターのためのテレメトリーを埋め込んだ後、2 週間低酸素 (10% O₂) チャンバーで飼育したところ平均肺動脈圧は、21.5 mmHg から 34.5 mmHg と有意に上昇した。グレリンは急性低酸素刺激による肺動脈圧上昇に影響しなかったが、慢性低酸素による肺高血圧を有意に改善した (図 4)。

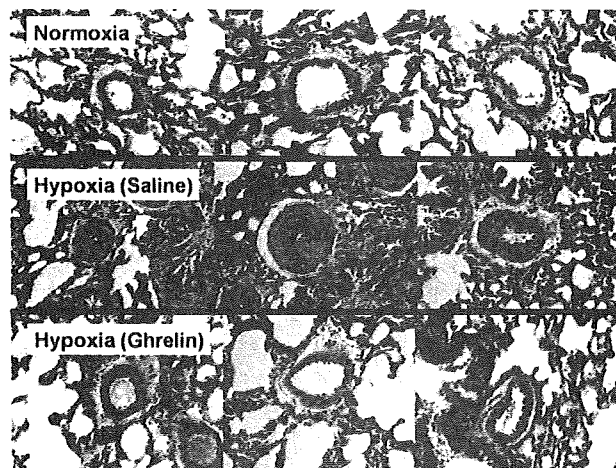


＜図 4＞慢性低酸素による肺高血圧に対するグレリンの効果

慢性低酸素前 (左) と後 (右) の平均肺動脈圧 (上段) と心拍数 (下段) を示している。グレリン投与群 (白丸) は生食投与対照群 (黒丸) に比較して有意に肺高血圧を抑制していた。一方、心拍数は慢性低酸素負荷やグレリン投与による影響を受けなかった。慢性低酸素の前後で 8%O₂ による急性低酸素負荷を行った。肺動脈圧と心拍数は急性低酸素負荷により上昇したがグレリン投与による影響は認めなかった。

これらの動物の肺組織を検討したところ生食

投与群では慢性低酸素後に肺動脈壁は著明に肥厚していた。グレリン投与群ではこの壁肥厚が劇的に改善していた (図 5)。



＜図 5＞慢性低酸素後の肺動脈壁肥厚に対するグレリンの改善効果

対照群 (Normoxia) に比較して慢性低酸素群 (Hypoxia) では肺動脈壁が明らかに肥厚していた。グレリン投与群 (Ghrelin) ではこの慢性低酸素による肺動脈壁肥厚が著明に抑制された。

D. 考察

われわれは前年度までの研究でグレリンが心筋梗塞による過剰な心臓交感神経活性化を抑制し、おそらく心室性不整脈の出現を抑えることで急性期死亡率を有意に減少させること、またグレリンが心筋梗塞慢性期における左室機能を改善し、心臓リモデリングの進展を抑制することを明らかにしている。しかしながら、このグレリンによる交感神経抑制の機序は明らかでなかった。また、心筋梗塞以外の循環器疾患における治療的意義も不明であった。

本年度の結果は、実験 1 においては、心筋梗塞後の心臓におけるグレリン受容体の局在が細胞マーカーの解析から末梢神経終末であることが明らかとなった。交感神経興奮ニューロン (Sympathoexcitatory neuron, SEN) は吻側延髄腹外側野 (RVLM) と中脳中心灰白質 (PAG) に集中して分布している。RVLM 内の狭い領域に集中して分布する SEN 群は、孤束核を経由して到達する圧

受容器からのインパルスが増加することによってその活動を減弱させる。おそらく末梢神経終末のグレリン受容体が刺激された結果、この経路を介して交感神経系が抑制されるものと推測された。よってグレリンの交感神経抑制機序の少なくとも一部はこの神経回路（図 3）を介している可能性が示唆された。

実験 2 においては、2 週間連日グレリン皮下投与が慢性低酸素による肺高血圧と肺動脈リモデリングを改善することを明らかにした。急性低酸素による肺動脈圧上昇は局所の血管収縮による機能的なものであり、慢性低酸素による肺高血圧は血管のリモデリングなど形態変化に基づくものである。グレリンは急性低酸素刺激による肺動脈圧上昇に影響しなかったが、慢性低酸素による肺高血圧を有意に改善した。

血圧や心拍数に対しては交感神経活動の増強が主な調節因子であるが、肺動脈圧は肺泡低酸素状態に起因する肺血管攣縮により規定されると推察されている。実際、交感神経系による血管トーン調節は他臓器に比較して肺では非常に少ない。われわれの検討では、グレリン投与による肺動脈圧上昇の抑制は心拍数の減少を伴っておらず、少なくとも心臓交感神経系に対する影響は明らかでなかった。よって肺高血圧モデルにおけるグレリンの効果は交感神経系以外のメカニズムを介していることが考えられた。さらに今後肺高血圧抑制効果の機序に関して検討を進める予定である。

E. 結論

本研究の結果は、グレリンが神経系を介した独自の機序により心臓を保護する治療薬として有用である可能性を示唆している。さらに肺高血圧に対しても顕著な治療効果が明らかとなっており、今後その機序を解明して循環器難病に対する安全で効果的な治療薬としての開発を目指したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

① 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*, 30: 758-765, 2009.

- ② Hiejima H, Nishi Y, Hosoda H, Yoh J, Mifune H, Satou M, Sugimoto H, Chiba S, Kawahara Y, Tanaka E, Yoshimatsu H, Uchimura N, Kangawa K, Kojima M. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon fasting in rodents. *Regul Pept*, 156: 47-56, 2009.
- ③ Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Yamada G, Hosoda H, Hosoda K, Shimatsu A, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. A mouse model of ghrelinoma exhibited activated growth hormone-insulin-like growth factor I axis and glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297: E802-811, 2009.
- ④ Kaiya H, Riley LG, Janzen W, Hirano T, Grau EG, Miyazato M, Kangawa K. Identification and genomic sequence of a ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci*, 26: 330-337, 2009.
- ⑤ Takahashi H, Kurose Y, Suzuki Y, Kojima M, Yamaguchi T, Yoshida Y, Ogino M, Hodate K, Azuma Y, Sugino T, Kangawa K, Hasegawa Y, Kobayashi S. Ghrelin differentially modulates the GH secretory response to GHRH between the fed and fasted states in sheep. *Domest Anim Endocrinol*, 37: 55-60, 2009.
- ⑥ 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*, 204: 590-594, 2009.
- ⑦ 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*, 163: 33-38, 2009.
- ⑧ Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford JL, Hosoda H, Theil J, von Horsten S,

- Yokote H, Chiba A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kangawa K, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by ghrelin. *J Immunol*, 183: 2859-2866, 2009.
- ⑨ Kaiya H, Mori T, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 153: 438-450, 2009.
- ⑩ Kyoraku I, Shiomi K, Kangawa K, Nakazato M, Ghrelin reverses experimental diabetic neuropathy in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 389: 405-408, 2009.
- ⑪ Hotta M, Ohwada R, Akamizu T, Shibasaki T, Takano K, Kangawa K, Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study. *Endocr J*, 56: 1119-1128, 2009.
- ⑫ Kaiya H, Kodama S, Ishiguro K, Matsuda K, Uchiyama M, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin-like peptide with fatty acid modification and O-glycosylation in the red stingray, *Dasyatis akajei*. *BMC Biochem*, 10: 30, 2009.
- ⑬ Kishimoto I, Tokudome T, Schwenke DO, Soeki T, Hosoda H, Nagaya N, Kangawa K. Therapeutic potentials of ghrelin in cardiac diseases. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 4: 283-289, 2009.
- ⑭ Goto S, Nagao K, Bannai M, Takahashi M, Nakahara K, Kangawa K, Murakami N. Anorexia in rats caused by a valine-deficient diet is not ameliorated by systemic ghrelin treatment. *Neuroscience*, 166: 333-340, 2010.
- ⑮ Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: from gene to physiological function. *Results Probl Cell Differ*, inpress.
- ⑯ Kangawa K. Challenge for novel peptide hormones: from discovery to therapeutic application. *Endocr J*, inpress.
- ⑰ Adachi S, Takiguchi S, Okada K, Yamamoto K, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Fujiwara Y, Hosoda H, Kangawa K, Mori M, Doki Y. Effects of ghrelin administration after total gastrectomy: A prospective randomized placebo-controlled phase II study. *Gastroenterology*, inpress.
- ⑱ Yamamoto K, Takiguchi S, Miyata H, Adachi S, Hiura Y, Yamasaki M, Nakajima K, Fujiwara Y, Mori M, Kangawa K, Doki Y. Randomized phase II study of clinical effects of ghrelin after esophagectomy with gastric tube reconstruction. *Surgery*, inpress.
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）
徳留 健（国立循環器病センター研究所）
岸本一郎（国立循環器病センター病院）
添木 武（徳島大学医学部）
Daryl O. Schwenke（University of Otago）

グレリン過剰発現トランスジェニックマウスの開発

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

我々はこれまで Ghrelin 過剰発現 Tg マウスの作製を試みてきたが、Des-acyl Ghrelin のみが上昇する結果となっている。そこで我々はアシル化部位を他のアミノ酸に置換し、アシル化を経ずに Ghrelin 様活性を有する Ghrelin Analog 過剰発現 Tg マウスの作成を計画した。既報によると 3 番目のセリン (Ser) 残基をトリプトファン (Trp) に置き換えたペプチド (Trp-Ghrelin) は、Ghrelin の 1/24 程度の活性を有している。投与実験では、Ghrelin の 10-20 倍の濃度において Ghrelin 同様の摂食促進作用と GH 分泌促進作用を発揮した。そこで Ghrelin cDNA の 3 番目の Ser (AGC) を Trp (TGG) に変異させた Trp-Ghrelin cDNA を SAP (Serum Amyloid P) promoter の下流に繋いだコンストラクトを構築し、Trp-Ghrelin 過剰発現 Tg マウスを作製した。得られた Tg マウスの血中には、WT の血漿 Ghrelin 濃度の約 220 倍の Trp-Ghrelin が出現しており、耐糖能に変化が認められた。現在さらにフェノタイプの詳細な解析を行っている。

A. 研究目的

Ghrelin が発見された当初から我々は Ghrelin を過剰発現する Tg マウスの作製を試みてきた。種々のプロモーターを用いて Tg マウスを作製したが、それらのマウスでは、Des-acyl Ghrelin の上昇のみが認められるに終わっている。そこで我々は、3 番目のセリン残基を他のアミノ酸に置換し、アシル化という過程を経ずに Ghrelin 様活性を有する Ghrelin Analog を体内で過剰発現するマウスを作成することを計画した。(尚、2008 年の GOAT の発見までは Ghrelin のアシル化のメカニズムは不明であり、本研究は GOAT の発見前に着手したものである。)

Ghrelin Analog の選択には、2001 年の松本らの論文 (Biochem Biophys Res Commun 2001) を参考にした。その論文では、3 番目のセリン (Ser) 残基を種々のアミノ酸に置換した Ghrelin Analog を作成し、GHR-R を強制発現させた培養 (CHO) 細胞において細胞内 Ca の上昇を検討する方法によって Ghrelin 様活性を評価して報告して

いる。我々は、その Ghrelin Analog の中で、合成可能かつもっとも高い Ghrelin 様活性を有するペプチドを使用することにした。この条件に合う Ghrelin Analog は、セリン (Ser) 残基をトリプトファン (Trp) に置き換えたペプチド (Trp-Ghrelin) であった。その論文によると、この Trp-Ghrelin は、上記の系を用い測定した EC50 が、Ghrelin 1.3 nM に対し Trp-Ghrelin 31nM と、Ghrelin の 1/24 程度の活性を有していることが記されている。そこで我々は、まず最初に Trp-Ghrelin が in vitro でも Ghrelin 様作用、特に GH 分泌促進作用と摂食促進作用、を有しているか否かを検討し、その後、Trp-Ghrelin を過剰発現するマウスの作成に着手した。

B. 研究方法

実験 1 (Trp-Ghrelin の外来性投与による効果の検討) : 8 週齢、雄性 C57BL6 マウスは SLC から購入し、3 群に分けて実験に用いた。

摂食促進作用 : マウスに対し AM10:00 に、生食、

Ghrelin (120 μ g/kg, 360 μ g/kg)、Trp-Ghrelin (360 μ g/kg, 1200 μ g/kg, 3600 μ g/kg) を皮下投与し2時間摂食量を測定した。

GH 分泌促進作用：別の群に AM9:00-10:00 の間に、生食、Ghrelin (4 μ g/kg, 12 μ g/kg, 40 μ g/kg, 120 μ g/kg)、Trp-Ghrelin (12 μ g/kg, 40 μ g/kg, 120 μ g/kg, 360 μ g/kg) を尾静脈から投与し10分後に眼窩静脈から採血し、血清分離後 GH 濃度を測定した。

c-fos の発現：さらにまた別の群に、AM10:00、生食、Ghrelin (300 pmol)、Trp-Ghrelin (300 pmol, 1 nmol) を脳室内投与した。投与30分後、マウスの脳を摘出し凍結切片用処理し、弓状核の c-fos の発現を免疫組織化学にて検討した。(もう少し詳細な方法が記載必要)

Ghrelin はペプチド研究所から購入し、Trp-Ghrelin は、アスピオファーマから供与していただいた。

実験2 (Trp-Ghrelin 過剰発現 Tg マウスの作成) :

Mutagenesis Kit (Promrga 社) を用いて、グレリン cDNA 上で3番目のセリンをコードする AGC をトリプトファンをコードする TGG に変異させ、その cDNA を SAP (Serum Amyloid P) promoter の下流に繋いだコンストラクトを作製し、受精卵にインジェクションした。得られた Tg マウスの血中 Ghrelin、Trp-Ghrelin 濃度を RIA にて測定した。また、HPLC にて循環血中に出現しているペプチドと WT 血清に添加した Trp-Ghrelin が同一のピークをなすことを確認した。

(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

実験1：120 μ g/kg、360 μ g/kgのGhrelin皮下投与後2時間の摂食量は、生食投与群に対しそれぞれ、2倍、2.2倍であった。3600 μ g/kgのTrp-Ghrelin は、360 μ g/kgのGhrelinと同等の摂食促進作用を発揮した。

40 μ g/kg、120 μ g/kgのGhrelin経静脈投与後の血清GH濃度は、それぞれ138.8 ng/ml、126 ng/mlであった。360 μ g/kgのTrp-Ghrelinでは、血清GH

濃度は、133.9 ng/mlまで上昇した。Ghrelinの約10倍量の投与で同程度のGH分泌促進作用が確認された。Ghrelin及びTrp-Ghrelinの脳室内投与による弓状核のc-fosの発現は、Ghrelinよりも高濃度必要ではあるがTrp-Ghrelin投与によって発現亢進した。

実験2：27匹のF0マウスのうち、high copyラインを含む6匹のTgマウスを得て、そのうち2匹のライン化 (Tg6-2、Tg6-5) に成功した。WTとTgとの間でN-RIAで測定したGhrelin (Aclated-form) には差は認めなかった。高発現ラインであるTg6-2では、C-RIAで測定したTotal Ghrelinが著明に上昇していた。そこにはTrp-Ghrelinが含まれていると考えられ、WT miceの血漿Ghrelin濃度の220倍の上昇を認めた。HPLCにてTrp-Ghrelinが血中に出現していることも確認できた。予備実験ではTgマウスの耐糖能に変化が認められた。

D. 考察

Trp-Ghrelinは、GH分泌・摂食に関して、Ghrelin様活性を有するペプチドであることが明らかになった。さらに我々は、Trp-Ghrelin を過剰発現するマウスの作成に成功した。このマウスの血中には、WT の血漿中の Ghrelin の約 220 倍の Trp-Ghrelin が存在している。これは、Trp-Ghrelin の Ghrelin に対する Relative Potency が 1/24 であることから、約 9-10 倍 (220 \times 1/24 \approx 9.3) の Ghrelin に相当すると推測される。

E. 結論

Ghrelin Analog を過剰発現するマウスの作成に成功した。現在、フェノタイプの詳細な解析を行っている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

① 山田豪、有安宏之、岩倉浩、寒川賢治、