

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.

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

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 ghrelin 受容体作動薬の効果

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。

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、このような変動はいずれも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。

私どもは、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が筋萎縮に抑制的に作用する可能性を想定し、ghrelin 受容体作動薬 GHRP-2 の作用を検討した。その結果、GHRP-2 は筋に直接作用して、Atrogin-1、MuRF1 発現を低下させることを見出した。Atrogin-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 Atrogin-1、MuRF1 発現は増加しており、逆に Atrogin-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。

そこで、私どもは、GHRP-2 が実際に vivo で効果を発揮するか検討する目的で、デキサメサゾン誘導性筋萎縮モデルラットを使用して検討した。しかし、6 週齢のラットに対して、600 μ g/kg および 100 μ g/kg のデキサメサゾンを投与したところ、筋萎縮は確かに誘導されるものの、GHRP-2 はこれを回復せず、その有効性は確認できなかった。今回、年齢により GHRP-2 の効果に違いが生じる可能性を考え、18 ヶ月齢の高齢ラットにおいて同様の実験をおこない、GHRP-2 の筋萎縮抑制効果を検討した。

B. 研究方法

1) ghrelin 受容体作動薬 GHRP-2 の筋線維断面積に及ぼす効果

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、① デキサメサゾン 100 μ g/kg 体重、

腹腔内投与、1回/日、② GHRP-2 100 μ g/kg 体重、皮下投与、2回/日、③ デキサメサゾンおよび GHRP-2 両者の投与、④ デキサメサゾンおよび GHRP-2 の代わりに同量の生理的食塩水を投与の4群に分けた。5日間処置を施したのち、ペントバルビタール麻酔下でヒラメ筋を採取し、凍結切片を作成、ATPase 染色 (pH 10.3) を行ない、Type I、TypeII 線維を分染し、筋線維断面積を NIH image で測定した。

2) GHRP-2 の筋線維組成に及ぼす効果

6週齢および、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、① デキサメサゾン 100 μ g/kg 体重、腹腔内投与、1回/日、② GHRP-2 100 μ g/kg 体重、皮下投与、2回/日、③ デキサメサゾンおよび GHRP-2 両者の投与、④ デキサメサゾンおよび GHRP-2 の代わりに同量の生理的食塩水を投与の4群に分けた。5日間処置を施したのち、ペントバルビタール麻酔下でヒラメ筋を採取し、凍結切片を作成、ATPase 染色 (pH 10.3) を行ない、Type I、TypeII 線維を分染し、全筋線維を Type I、TypeII 線維に区分した。

(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) ghrelin 受容体作動薬 GHRP-2 の筋線維断面積に及ぼす効果

100 μ g/kg のデキサメサゾンは、筋線維断面積を20%減少させた。GHRP-2 単独投与は筋線維断面積に影響を及ぼさなかったが、デキサメサゾンと GHRP-2 の同時投与では筋線維断面積減少が観察されなかった。筋線維別に評価すると、TypeI 線維に対しては、GHRP-2 はデキサメサゾン誘導性筋線維断面積の減少を回復させたが、TypeII 線維に対しては GHRP-2 はデキサメサゾン誘導性筋線維断面積減少を回復させなかった。

2) GHRP-2 の筋線維組成に及ぼす効果

6週齢ラットヒラメ筋において約30%の筋線維がTypeII線維であったが、18ヶ月齢のラットヒラメ筋では約10%の筋線維がTypeII線維であった。デキサメサゾン投与は、TypeI、TypeII線維組成に影響

を及ぼさなかったが、GHRP-2投与はどちらのラットにおいても、TypeII/TypeI比を増加させた。この効果は18ヶ月齢のラットにおいて著明であった。しかし、デキサメサゾンとGHRP-2の同時投与時には、TypeII/TypeI比の増加は有意ではなかった。

D. 考察

私どもは以前に、GHRP-2 は筋細胞に直接作用して筋特異的ユビキチンリガーゼ (Atrogin-1、MuRF1) の基礎発現、およびデキサメサゾン誘導性 GHRP-2 発現を抑制することを報告した。Atrogin-1、MuRF1 の筋萎縮発症における重要性はすでにそれらのノックアウトマウスから確認されている。そこで、実際に vivo において、GHRP-2 はデキサメサゾン誘導性筋萎縮を抑制するか検討したところ、6週齢ラットを使用した場合、デキサメサゾン誘導性筋萎縮に対する GHRP-2 の抑制効果は認められなかった。しかし、今回、18ヶ月齢の高齢ラットを使用したところ、GHRP-2 はデキサメサゾン誘導性筋萎縮を抑制することを見出した。

GHRP-2 のデキサメサゾン誘導性筋萎縮に対する抑制効果は、TypeI 線維において明確であった。6週齢ラットに比べ、18ヶ月齢のラットではTypeI 線維の割合が増加しており、ほとんど TypeI 線維からなる。18ヶ月齢のラットでのみ、GHRP-2 の効果が観察されたのは TypeI 線維数の増加による可能性がある。GHRP-2 とは異なるものの、分岐鎖アミノ酸も筋特異性ユビキチンリガーゼ発現を抑制すること、筋萎縮抑制効果を有することを私どもは報告しており、一部に GHRP-2 と共通する機構がある可能性が考えられるが、分岐鎖アミノ酸の効果も TypeI 線維が多いヒラメ筋では観察されるものの、TypeII 線維が圧倒的に多い長趾伸筋ではみられなかった。

GHRP-2 は筋線維組成に対しても影響を及ぼした。GHRP-2 は6週齢ラット、18ヶ月齢ラットいずれにおいても、TypeII/TypeI 線維比を増加させた。しかし、デキサメサゾンと GHRP-2 の同時投与時には、TypeII/TypeI 比の増加は有意ではなかったことから、この作用はデキサメサゾン誘導性筋萎縮に対する GHRP-2 の抑制作用とは関連しな

いと考えられた。元来、ヒラメ筋は赤筋であり、TypeI 線維優位である。TypeII/TypeI 線維比が増加したといっても TypeI 線維数が多いことには変わりはないが、GHRP-2 が、TypeI 線維の増加という加齢変化と逆行する方向に筋線維組成を変化させたことは興味深い。これが、TypeI 線維から TypeII 線維への転換が生じたためであるのか、筋衛星細胞からの TypeII 線維に対する誘導が生じたのかは不明である。予備実験として、筋衛星細胞の活性化（増殖）に対する GHRP-2 の効果を検討したが、筋衛星細胞初代培養系では、筋衛星細胞の活性化における GHRP-2 の効果は確認できなかった。

E. 結論

グレリン受容体作動薬 GHRP-2 の投与は、18 ヶ月齢ラットヒラメ筋におけるデキサメサゾン誘導性筋萎縮を抑制した。この効果は、TypeI 線維でみられたが、TypeII 線維では明確でなく、筋線維によって作用が異なる可能性が示唆された。また、18 ヶ月齢ラットでは、6 週齢ラットに比べて TypeII/TypeI 線維比が減少していたが、GHRP-2 は TypeII/TypeI を増加させた。この効果は、6 週齢ラットに比べて、18 ヶ月齢ラットにおいて著明であり、加齢に逆行する変化であった。GHRP-2 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唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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: 41-6, 2009.
- ② 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.

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 分泌低下が少なくとも一部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が褐色脂肪組織（BAT）のノルアドレナリン（NA）分泌を抑制し、このグレリンの BAT への作用は加齢に伴い減弱すること、さらに BAT 重量も加齢に伴い減少することを明らかにしてきた。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 BAT の NA 分泌抑制作用および視床下部背内側核ニューロン興奮の抑制作用は、4 週齢ラットでは認められないが、8 週齢と 20 週齢ラットでは認められること、また血中グレリンは 20 週齢ラットが最も高い値を示すことを明らかにした。これらの結果から加齢ラットでは内因性グレリンによる BAT の熱産生機能抑制が強いために脂肪蓄積が増している可能性が考えられた。以上より、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 の機能低下の関与が示唆され、後者には視床下部背内側核を介したグレリン/GHS-R 系が関与している可能性が考えられた。

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 分泌促進作用に加え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、その熱産生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明らかにし、この結果はグレリンが BAT の熱産生機能を介しても脂肪蓄積作用を発揮することを示唆している。さらにこのグレリン投与の効果は加齢に伴い減弱することも明らかにしてきた。

BAT の熱産生機構は視床下部から交感神経を介

した支配を受けている。この神経機構において視床下部背内側核（DMH）は中心的な役割を担っていることが報告されている。DMH は延髄縫線核を介して褐色脂肪組織へ興奮性の神経投射を送っていることも報告されているが、グレリンによる BAT の熱産生調節機構における DMH の役割については明らかではない。

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、本年度は内因性グレリン/GHS-R 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) GHS-R 拮抗薬の脳室内投与による DMH での Fos 発現への影響と加齢による影響の変化
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 GHS-R 拮抗薬である D-Lys³-GHRP6 を脳室内 (10 μg) へ投与し、投与から 90 分後に 4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定した。固定された脳にて DMH 全域を含む厚さ 40 μm の冠状切片を作成し、抗 Fos 抗体を用いた ABC 法にて免疫組織化学的に Fos 陽性ニューロン数を DMH の全域に渡り定量した。生理食塩水投与群を対照とし、各週齢の DMH における Fos 発現を比較した。

2) GHS-R 拮抗薬の脳室内投与による BAT の NA 分泌への影響と加齢による影響の変化

4、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 GHS-R 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/GHS-R の阻害が BAT の NA 分泌量へ与える影響と加齢による影響の変化について解析した。生理食塩水投与群を対照とし、各週齢の分泌の変化を比較した。

3) 血中グレリン値の解析

ペントバルビタール麻酔下にて 4、8、20 週齢ラットの SD ラットの右下静脈より採血しアプロチニンと EDTA2Na を添加した採血管にて直ちに血漿を遠心分離し、塩酸を添加後 -80°C にて保存した。この血漿中のグレリン濃度とデスアシルグレリン濃度を ELISA 法にて測定した。

(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) GHS-R 拮抗薬の脳室内投与による DMH での Fos 発現への影響と加齢による影響の変化

D-Lys³-GHRP6 の脳室内投与は 4 週齢ラットの DMH における Fos 発現量を変えなかったが、8、20 週齢ラットへの D-Lys³-GHRP6 の脳室内投与は DMH における Fos 発現量を対照群と比較して有意に増した。

2) GHS-R 拮抗薬の脳室内投与による BAT の NA 分泌への影響と加齢による影響の変化

D-Lys³-GHRP6 の脳室内投与は、8 週齢ラットでは投与直後から 20 分まで、20 週齢ラットでは投与直後から 40 分までの BAT の NA 分泌量をそれぞれ有意に増した。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い増加傾向と長い増加持続時間を示したが、それぞれの 2 群間値に有意差は認められなかった。4 週齢ラットへの D-Lys³-GHRP6 の脳室内投与は NA 分泌を促進する傾向はあるものの対照群と比較して有意差は認められなかった。

3) 血中グレリン値の解析

20 週齢ラットの血中グレリン値は 4、8 週齢と比較し有意に高い値を示した。一方で血中デスアシルグレリン値は 3 群間に有意な差は認められなかった。

D. 考察

昨年までの研究で、20 週齢ラットでは 4 週齢より BAT での熱産生の指標である Ucp1 mRNA 発現量が低値を示し、褐色脂肪細胞内には脂肪滴が蓄積し、且つ軽量化していた。さらに 20 週齢ラットの下垂体での 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。また 20 週齢ではグレリン投与による摂食促進作用、視床下部弓状核における Fos 発現および BAT の NA 分泌抑制作用が減弱していることも明らかにしてきたが、グレリンに対する反応性の低下と加齢に伴う脂肪蓄積との関連は明らかではなかった。

昨年度は 20 週齢ラットへの D-Lys³-GHRP6 脳室内投与が BAT の NA 分泌を 8 週齢より強く増加させる傾向を示したことを明らかにしていたが、本年度はこれらのラットより体脂肪蓄積が少ない 4 週齢ラットでは D-Lys³-GHRP6 脳室内投与により BAT の NA 分泌が増加しないことが明らかとなったことから、内因性グレリンによる BAT の熱産生抑制作用は加齢に伴い増大する可能性が考えられた。我々は外因性グレリンの BAT における NA 分泌抑制作用が 20 週齢ラットにおいて減弱することも前々年度に明らかにしている。マウスでは加齢に

伴い血中グレリン値が高い値を示すことが報告されている。本研究で血中グレリン値の測定を行ったところ、3群間では20週齢ラットの血中グレリン値が最も高い値を示すことが明らかとなった。これらの結果から加齢に伴いグレリンの分泌が亢進し、それがBATの機能を抑制しているために、20週齢ラットでは外因性グレリンに対する反応性が低下していると推測された。

グレリンがBATのNA分泌を抑制する神経機構について明らかにする目的でD-Lys³-GHRP6投与後のDMHでのFos発現を検討した。DMHは前視索野や室傍核、腹内側核等の体温調節や熱産生調節を担っている神経核から投射を受けており延髄縫線核ニューロンを介してBATへ興奮性入力を送っていることが明らかとなっている。グレリン脳室投与によりDMHのニューロペプチドY (NPY) ニューロンにFosが発現し、このDMHのNPYニューロンの活性化がグレリンの摂食促進作用に関与しているとの報告がある。グレリンは弓状核NPYニューロンに対しては興奮性に、プロオピオメラノコルチンニューロンに対しては抑制性に作用することが報告されているので、DMHでも同様にグレリンにより活性化する細胞と抑制される細胞が存在し、D-Lys³-GHRP6投与によりFosが発現した細胞はグレリンによる抑制が解除されるために活性化した可能性が考えられた。

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/GHS-R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

- ① 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.

- ② 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.

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82回日本内分泌学会学術総会，前橋，2009.

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）

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

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

バリン欠乏食給餌をラットに給餌することで拒食症モデルを作出した。バリン欠乏食を給餌すると翌日から著しい摂食低下が認められ、5日後には通常の摂食量の1/5まで低下し、体重も1割近く減少した。このとき血中グレリン濃度はアシル・デスアシルグレリンとともに約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。バリン欠乏食給餌マウスにバリンを投与すると、第3および第4脳室周辺の細胞（上衣細胞）にcFosの発現が認められ、バリンのセンシングの局在が示唆された。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かと推測される。

A. 研究目的

動物の血液中や脳脊髄液中の各種アミノ酸濃度はそれぞれに一定に維持されており、その恒常性は極めて厳密に調整されている。もし、餌の中のアミノ酸が一つでも欠乏すると、動物はその餌を摂取しない。そのような餌を摂取すると体液中のアミノ酸バランスが壊れ、不足したアミノ酸を補充するためには、自己の体タンパク質を異化することで補うとする機構が働くためである。もし体タンパク質を異化すると、さらにアミノ酸バランスの不均衡を生じるため、体タンパク質異化作用は永久的に継続し、最終的には死を招くのである。それを避けるために動物はあるアミノ酸欠乏食が給餌されると、空腹にも関わらず拒食状態になると言われている。このような空腹を伴う拒食状態では血中グレリン濃度は高い値を示していると推測されるにも関わらず、グレリンの摂食亢進作用が働いていない可能性がある。

グレリンの摂食亢進作用機序（あるいは作用機構）は中枢性グレリンと末梢性グレリンで異なると考えられている。すなわち中枢へグレリンを投与したときの摂食亢進は中枢のグレリン受容体

（GHSR）を介してNPYやAGRPの合成・分泌を促進することによるが、末梢グレリン投与による摂食亢進は迷走神経の求心性情報を介して、ノルアドレナリン作動性情報として中枢を刺激すると推測されている。そこで、本研究ではラットを用いて、1) バリン欠乏食を給餌したときの拒食症モデルの特徴を調べ、2) その拒食症に対して、中枢性あるいは末梢性グレリン投与の摂食への影響、さらに3) バリンの脳内センシング機構を検討した。

B. 研究方法

1) 動物とアミノ酸欠乏食の給餌

チャールズリバーより成熟（8週齢）の雄Wistarラットを購入し、12時間明：12時間暗（7時点灯、19時消灯）で、恒常温度（27度）下で飼育した。ラットは粉末CRF-1diet（regular laboratory chow; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan）で4日間飼育し、その後AIN93G powdered standard dietの組成に従って合成した粉末飼料（以下通常食と略）を給餌した。またこの粉末飼料からバリンのみを欠如させ、代わりにグルタミンを加えた

(以下バリン欠乏食と略)。ラットの摂食量と体重は毎日測定した。バリン欠乏食給餌ラットの一部分は5日後から通常食に戻し、摂食の回復の有無を判定した。また一部のラットから血液と脳脊髄液を採取し、各種アミノ酸濃度をamino acid analyzer (L-8800A; Hitachi, Tokyo, Japan) で測定した。

2) 血中グレリン、デスアシルグレリン濃度の測定

バリン欠乏食4日目のラットおよび対照の通常食群のラットを断頭し、アプロチニン・EDTA入りの遠心管に血液を採取し、直ちに遠心分離後血漿を回収した。これに1/10量の1M酢酸を加え、 -20 度で保存した。アシルグレリンおよびデスアシルグレリンはELISAキット (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc, Tokyo, Japan) を用いて測定した。グレリンのイントラおよびインターアッセイ精度はそれぞれ6.5%と9.8%であり、デスアシルグレリンでは3.7%と8.1%であった。

3) 摂食促進系ペプチドの投与

通常食 (コントロール)、およびバリン欠乏食給餌後5日目にグレリン5nmolを腹腔内に投与し、2時間の摂食量を測定した。対象には生理食塩水を投与した。またラットに側脳室カニューレを装着し、グレリン ($0.5 \text{ nmol}/10 \mu\text{l}$)、NPY ($2.0 \text{ nmol}/10 \mu\text{l}$)、あるいはAGRP ($2.0 \text{ nmol}/10 \mu\text{l}$) を投与し2時間の摂食量を測定した。これらのペプチドはPeptide Institute, Inc. (Osaka, Japan) から購入した。

4) バリン投与後の cFos 発現の免疫染色

バリン欠乏食および通常食給餌ラットに側脳室カニューレを装着し、欠乏食給餌後2日目にバリンを $10 \text{ nmol}/10 \mu\text{l}$ の濃度で側脳室に投与した。また対象として生理食塩水を投与した。投与90分後に断頭し脳を採取した。脳は直ちにTissue-Tek O. C. T. compound (Sakura Finetek, Japan Co, Ltd, Tokyo, Japan) で包埋し、凍結切片を作成した。切片はパラホルムアルデヒドで固定後、 $0.3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 、 5% 正常ヤギ血清で処理し、anti-c-Fos antiserum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; final dilution 1:1000) で4度一晩インキュベーションした。その後ABC法 (Vectastain Elite ABC kit; peroxidase substrate kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) で

染色し可視化した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際してはその愛護に留意し、痛みを防止するための適切な麻酔薬などを用いて実験を行った。また、実験動物数は最小限に留め、屠殺は法令で定められた方法に準拠した。また、本実験は宮崎大学動物実験委員会の承認 (2006-052) を得て行われた。

C. 研究結果

1) バリン欠乏食による拒食症ラットの評価

通常粉末餌での環境に適応させた後にバリン欠乏食を給餌すると、 $23.12 \pm 0.35 \text{ g}$ の平均摂食量が、 $8.17 \pm 1.22 \text{ g}$ まで減少した。また通常食での体重の増加は1日当たり $+6.74 \text{ g}$ であったのに対し、バリン欠乏食に切り替えた後は -5.40 g と減少した。そのため、欠乏食に切り替える直前の平均体重は 330 g で通常食群はその5日後には 360 g に達しているのに対し、バリン欠乏食給餌群のラットでは逆に 270 g まで減少した。一部のラットで、バリン欠乏食給餌5日目から通常食に戻すと、直ちに摂食量と体重は増加して回復に向かった。

2) バリン欠乏食給餌下での血中グレリン濃度

バリン欠乏食を給餌すると血漿アシルグレリン濃度は 84.0 ± 9.1 から $158.7 \pm 8.7 \text{ fmol}/\text{ml}$ に増加した。一方、デスアシルグレリン濃度は対象群では $411.3 \pm 87.8 \text{ fmol}/\text{ml}$ に対して、バリン欠乏食給餌群では $1083.0 \pm 67.6 \text{ fmol}/\text{ml}$ に増加した。これらの増加を24時間絶食させたラットの血漿レベルと比較するため、絶食ラットでの値を調べた結果、アシルグレリンが $146.7 \pm 5.7 \text{ fmol}/\text{ml}$ であり、デスアシルグレリンは $658.3 \pm 12.5 \text{ fmol}/\text{ml}$ であった。このことからバリン欠乏食による拒食症は24時間絶食に相当する空腹感をもたらしていると推測された。

3) 拒食症ラットへのグレリンおよび中枢性摂食関連ペプチド投与の摂食への効果

通常食給餌ラットでのグレリンの腹腔内投与での2時間の摂食量は、 1.60 ± 0.20 から $2.60 \pm 0.30 \text{ g}$ に増加した。一方、バリン欠乏食給餌ラットへのグレリン投与は 0.62 ± 0.10 から $0.85 \pm 0.32 \text{ g}$ で有意な差は認められなかった。

一方、中枢投与においては、通常食給餌群で、

生理食塩水:2.03±0.17、グレリン:4.64±0.60、NPY 5.00±1.20、AGRP:3.47±0.30gでいずれも生理食塩水投与群より有意な増加を示した。バリン欠乏食給餌群では生理食塩水投与:0.66±0.05グレリン投与:1.66±0.64、NPY 2.09±0.23、AGRP:0.68±0.04gであった。すなわちバリン欠乏食給餌群では対照群ほどには摂食亢進作用は認められないものの、グレリンとNPYの中樞投与においては有意な摂食亢進作用が認められた。

4) バリン投与による脳内cFos発現部位

通常食給餌ラットの側脳室にバリンを投与してもcFosの発現は認められなかった。しかし、バリン欠乏食を給餌したラットにバリンを側脳室投与すると、第3脳室および第4脳室周辺の上皮細胞にcFosの濃密な発現が確認された。

D. 考察

本研究によりアミノ酸の一つであるバリンを欠乏させた食事をラットに給餌すると著しい拒食が起こり、それに伴い体重も低下することが確認された。この拒食はバリン欠乏食給餌直後の脳脊髄液中のバリン濃度の減少後に現れることから、バリンのセンシングによるものであり、嗜好性によるものでは無いと推測された。このセンシングはcFosの発現部位から第3脳室と第4脳室の周辺にあると推測された。この周辺の上皮にはtanycytes(上衣細胞の一種)が多く存在し、これらには糖やアミノ酸のトランスポーターの一部が発現していることが知られている。恐らくバリンもこのようなトランスポーターを有する上衣細胞でセンシングされていると推測される。

さて、今回のバリン欠乏食給餌ラットでの拒食では血液中のグレリンとデスアシルグレリンの著しい上昇が見られた。それにも関わらず摂食は抑制されており、末梢からのグレリンでは摂食亢進を誘起できないのではないかと予想された。事実、グレリンの末梢からの投与では、拒食症の改善は全く見られなかった。一方グレリンの中樞性投与では摂食量の亢進が認められた。またNPYの投与でも摂食亢進は認められたが、AGRPには効果が無かった。これらの結果から、中樞性グレリン投与によるこの拒食症モデルラットでの摂食亢進はNPYのみを介した作用によるのかも知れ

ない。また、AGRPの作用が認められなかった事は、バリン欠乏食給餌による拒食症がAGRP系あるいは末梢グレリンからの作用系に対し、障害を及ぼしているのかも知れない。

最近、グレインがventral tegmental area(VTA)のドーパミンニューロンに作用することが報告されている。またこのVTAにはGHSRの発現が多い事も判明している。VTAにグレリンを局所投与するとaccumbens(側坐核)のドーパミンターナーノバーが増加するとともに摂食を促進させること、あるいはVTAのGHSRを局所的に阻害すると絶食後のリバウンド性摂食亢進を阻害することが示されている。末梢からのグレリンがこの拒食症モデルラットで作用しなかった原因に、バリン欠乏によりVTAのドーパミン系の異常が起こっている可能性も除外できない。

拒食症に対するグレリンの摂食回復効果は恐らく、拒食の原因によって異なると考えられるが、今回の拒食症モデルでは、グレリンの中樞投与と末梢投与で摂食回復の有効性が全く異なるものであった。このことは今後の拒食症へのグレリンによる治療法に何らかの示唆を与えるかも知れない。

E. 結論

本研究により、アミノ酸欠乏食給餌ラットで作出した拒食症モデルにおいて、グレリンの中樞投与では摂食の回復が起こるが、末梢投与で作用しないことが判明した。このことから、拒食症の種類によっては、このようにグレリンの投与方法の違いにより摂食改善効果の有無に違いが起こるかも知れない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.

② 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.

2. 学会発表

① 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.

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（アスビオファー
マ株式会社）

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）

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

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

グレリンは成長ホルモン分泌促進、食欲亢進といった作用を持ち、心不全、慢性閉塞性肺疾患、悪性腫瘍などに伴うカヘキシアに対する臨床応用が始まっている。しかし、外来性にグレリンを投与するには点滴静注する必要があり、簡便性に欠けている。そこで、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ことが示唆された。

A. 研究目的

グレリンは胃内分泌細胞から発見された新規ペプチドで、成長ホルモン（GH）の分泌を促進し、食欲を亢進させる作用を持つ。近年、グレリンの持つ生理作用を応用し、心不全、慢性閉塞性肺疾患、悪性腫瘍といったカヘキシアをきたす疾患に対する臨床応用が始まっている。カヘキシアを呈する患者にグレリンを投与することで、摂食量増加、体重増加、体組成改善（除脂肪体重の増加）といった有用な効果が報告されている。しかしながら、現状ではグレリンは朝夕二回点滴静注する必要があり、投与方法の簡便性に欠けており、通常は入院での投与が必要になる。

グレリンは3番目のセリン残基にオクタン酸が結合しており、その脂肪酸修飾がグレリンの活性発現には必須である。げっ歯類においては、特定の炭素数の脂肪酸を多く摂取させると、その摂取した脂肪酸が結合したグレリンが血中に

多くみられることが報告されており、脂肪酸の経口摂取とグレリンの産生・分泌には相関のみられる可能性がある。

本研究では、ヒトグレリンに結合している脂肪酸のほとんどを占める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。

B. 研究方法

宮崎大学倫理審査委員会の承認を得て、以下の対象と方法で検討を行った。対象は平均Body mass index（BMI）16.0、2.0の慢性呼吸器疾患患者23名（気管支拡張症9名、慢性閉塞性肺疾患8名、陈旧性肺結核6名、男性13名）と、年齢と性別を一致させた健常人10名（BMI：20.4、5.7）である。オクタン酸高含有食品としてラコール[®]（400kcal/400ml、炭水化物62%、蛋白質17.5%、脂質20.5%、オクタン酸2.8g、大塚製薬工場）を使用した。

- ① 入院中の患者4名を対象にして、1800kcalの病院食を可能な限り摂取しつつ、血中グレリンおよびデスアシルグレリン濃度の日内変動を検討した。その翌日の朝昼食間にラコール400mlを摂取して、血中グレリンおよびデスアシルグレリン濃度の日内変動を同様に検討した。
- ② 外来患者19名を対象にして、ラコール400ml/日を2週間摂取させ、前後で体重、血液生化学検査、各種ホルモン値（カテコラミン3分画、GH、IGF-I）、Visual analogue scaleで評価した食欲を検討した。

（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、宮崎大学倫理委員会による審査・承認のもとで実施された。

C. 研究結果

外来の慢性呼吸器疾患患者19名の平均グレリン濃度は健常人よりも低い傾向（ 11.0 ± 11.1 vs 15.1 ± 12.9 fmol/ml）、およびデスアシルグレリン濃度は高い傾向（ 90.1 ± 52.4 vs 68.7 ± 62.0 fmol/ml）がみられたが、いずれも有意差は認めなかった。総グレリン濃度は患者において健常人よりも有意に高値であった（ 101.1 ± 58.8 vs 83.7 ± 74.3 fmol/ml）。グレリン/デスアシルグレリン比は患者において健常人よりも有意に低値であった（ 0.15 ± 0.16 vs 0.24 ± 0.10 ）。

入院患者4名を対象にした日内変動の検討では、血中グレリンおよびデスアシルグレリン濃度は既報通り食前に高値になり、食後には低下した。ラコール400mlを摂取した日では、摂取していない日に比べて、夕食前から翌朝食前にかけての血中グレリン濃度が高値となり、特に夕食前と翌朝食前は有意に高値であった。一方、血中デスアシルグレリン濃度はラコール摂取の有無により差を認めなかった。

外来患者に2週間ラコール400ml/日を摂取させたところ、2週間後にはBMI（ 16.0 ± 2.00 → 16.3 ± 2.00 ）、食欲（ 40 ± 22 → 64 ± 27 ）、早朝空腹時の血中グレリン濃度（ 11.0 ± 11.1 → 14.8 ± 7.20 fmol/ml）、総蛋白（ 6.9 ± 0.6 → 7.3 ± 0.7 g/dl）、アルブミン（ 3.8 ± 0.4 → 4.0

± 0.4 g/dl）、プレアルブミン（ 15.8 ± 4.2 → 17.9 ± 3.9 mg/dl）、トランスフェリン（ 198 ± 41 → 231 ± 570 mg/dl）、レチノール結合蛋白（ 1.9 ± 0.4 → 2.3 ± 0.5 mg/dl）、IGF-I（ 87 ± 36 → 98 ± 39 ng/ml）が有意に増加した。血中デスアシルグレリン、GH濃度には変化を認めなかった。血中カテコラミン3分画は低下傾向であったが有意差は認めなかった。血中グレリン濃度の増加と体重や血液学的パラメータの間に有意な相関を認めなかった。

D. 考察

カヘキシアを呈する患者にオクタン酸を多く含有するラコール400mlを摂取させると、一回だけの摂取でも血中グレリン濃度が増加し、2週間連続で摂取することにより食欲や体重の増加、および栄養状態を示すさまざまな血中パラメータの改善を認めた。手技や手間が煩雑で、施行する施設も限られているグレリン点滴静注を行わなくても血中グレリン濃度が増えたこと、および食欲や体重が増えたことは、すべての医療機関で実施可能であることを意味するため意義深い。しかし、本研究において、摂取エネルギー量は試験期間中ラコールの分だけ増加しているため、オクタン酸含量の多いラコールを摂取したことが本研究結果につながったかどうかは、オクタン酸を含まない同エネルギー量の食事をした場合と比較する必要がある、今後の検討課題としたい。

既報ではBMIと血中総グレリン値は逆相関を示しており、長期のエネルギーバランスを保つための代償反応と考えられていた。本研究でもBMI正常の健常人と比べて、痩せた慢性呼吸器疾患患者では血中総グレリン濃度が高値であったが、グレリン濃度には差がなく、グレリン/デスアシルグレリン比は患者において健常人よりも低値であった。この結果から、カヘキシアを呈する患者では、グレリンやデスアシルグレリンの血中濃度だけでなく、グレリン/デスアシルグレリン比も重要であること、また、グレリンのアシル化に問題がある可能性が示唆され、グレリンアシル化酵素活性などの検討が必要と考えられた。

本研究では、ラコールの2週間連続摂取により血中IGF-Iの増加を認めた。IGF-Iは加齢とともに低下し、筋や骨などにおけるソマトポーズに伴う変化に関係している。ラコールの摂取に伴う内因性グレリンの増加により、GH分泌亢進を介してIGF-I増加につながったと考えられるが、長期的にIGF-Iの増加が続けば、特に高齢者でのQOL改善にもつながることが期待される。

E. 結論

カヘキシアを伴う慢性呼吸器疾患患者にグレリン合成に必須なオクタン酸を多く含有するラコールを摂取することで、内因性グレリンの増加とともに、体重や食欲、栄養状態の改善を認めた。カヘキシアを呈する患者には内因性グレリンを増やす栄養療法も重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② 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.
- ③ 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.
- ④ Toshinai K, Nakazato M. Neuroendocrine regulatory peptide-1 and -2: novel bioactive peptides processed from VGF. *Cell Mol Life Sci*,

66: 1939-1945, 2009.

- ⑤ Ashitani J, Matsumoto N, Nakazato M. Ghrelin and its therapeutic potential for cachectic patients. *Peptides*, 30:1951-1956, 2009.
 - ⑥ Kyoraku I, Shiomi K, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin reverses experimental diabetic neuropathy in mice. *Biochem Bioph Res com*, 389: 405-408, 2009.
 - ⑦ 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.
 - ⑧ 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.
 - ⑨ Ueno H, Shiiya T, Nakazato M. Translational research of ghrelin. *Ann N Y Acad Sci*, inpress.
- ### 2. 学会発表
- ① 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.
 - ② 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.
 - ③ 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.

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

芦谷淳一（宮崎大学医学部）

松元信弘（宮崎大学医学部）

十枝内厚次（宮崎大学医学部）

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。我々はグレリンの減少がその主たる要因の一つとして、術後グレリンを補充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を検討した。昨年度は胃全摘患者を対象として「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、その有効性を検証した。本年度は、「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に関するランダム化第 II 相臨床試験」を実施した。患者 20 名をグレリン投与群（3 μ g/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。食事摂取カロリーを測定した。いずれのパラメーターもグレリン投与で改善を認めた。食道切除胃管再建術は胃全摘術と比べて、グレリン減少の程度は軽微であるが、侵襲が大きく体重減少もより高度であるという差がある。食道切除胃管再建術における有効性はグレリンの抗侵襲・炎症作用による可能性があり今後の検討課題としてゆきたい。

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、胃癌術後患者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 BMI19 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。胃全摘患者の約 45% が BMI19 以下になっている事実より、低体重は胃癌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。

我々は胃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、幽門側切除術では約 1/2 に減少することを報告した。以上より、胃切除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。

一方、食道癌根治手術である食道切除胃管再建術では、グレリンの減少は約 1/2 と胃全摘より軽微であるが、体重減少（BMI19 以下）は 55% と胃全摘より高頻度で見られ、やはり、術後グレリン値と体重減少が相関するという知見を得ている。グレリンには食欲増進、食事量増加、成長ホルモン分泌という作用だけではなく、抗侵襲、抗炎症、呼吸循環動態安定という作用も報告されている。食道切除胃管再建術は胃全摘術に比べて侵襲が高度であることよりグレリンの後者の作用も影

響しているかもしれない。

以上より、臨床試験を通じて様々な上部消化管癌手術の術後体重減少に対しグレリン投与が有効であるか否かを検証することを本研究の目的とする。

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 年よりを行っている。

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（3 μ g/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。

なお同じ試験デザインで「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に関するランダム化第 II 相臨床試験」を平成 19 年度より行っている。

C. 研究結果

胃全摘試験：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。食事摂取カロリー、食欲（VAS）、体重減少、いずれのパラメーターにおいてもグレリン群はプラセボ群より優れていた。また、体組成ではグレリン群では除脂肪体重、基礎代謝はプラセボ群では有意に減少するがグレリン群では有意な減少は無かった。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。

食道切除胃管再建試験：20 例（グレリン群 10 例、プラセボ群 10 例）の登録解析を行った。食欲および摂取カロリーはグレリンが有意に多かった（874kcal/day vs 605kcal/day；P=.015）。10 日間の体重減少率は（-1.02% vs -3.40%，p=0.019）とグレリン群で有意に少なかった。体組成については胃全摘試験と同様にグレリン投与により除脂肪体重の減少が抑制されていた。

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、元々る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。

また、胃全摘、食道切除胃管再建という 2 つの病態はグレリン低下や体重減少の程度、手術侵襲の大ききの点から同じ上部消化管手術でも微妙

に異なる。すなわち食道切除胃管再建は、グレリン減少の程度は50%とやや軽微であるが、手術侵襲は遙かに大きく、体重減少も多い。このことより食道切除胃管再建ではグレリンの抗炎症・抗侵襲もしくは呼吸循環動態安定作用が貢献している可能性がある。現在、食道癌術後急性期の炎症反応と血中グレリンとの関係を調べる臨床研究を行っている。

2つの試験で有効性は検証されたが臨床応用における最大の問題はグレリンの長期投与である。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

胃全摘術、食道切除胃管再建術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、幅広い臨床応用が期待される。

F. 健康危険情報

胃全摘試験の試験登録の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ていない。食道切除胃管再建では副作用は認めなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② 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*, 100: 442-446, 2009.
- ③ 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.

- ④ 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.
 - ⑤ 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.
- ### 2. 学会発表
- ① 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.
 - ② 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, Nov18-20, 2009.
 - ③ 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。
 - ④ 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。

- ⑤ 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．

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）

日浦祐一郎（大阪大学医学部）

グレリン産生腫瘍（グレリノーマ）モデルマウスの樹立

研究分担者 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

グレリンの慢性作用を明らかにするためには、トランスジェニックマウスの利用が有効であると考えられるが、通常のプロモーターを用いたグレリン cDNA の過剰発現では、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。今回我々は、グレリンプロモーター下流に SV40T 抗原を結合し、トランスジェニックマウス (GP-Tag Tg) を作製した。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。以上の結果は、グレリノーマの病態、グレリン慢性上昇の影響の理解だけではなく、ソマトポーズへのグレリン応用時に有益な情報となり得ると考えられる。

A. 研究目的

グレリンは、胃より分泌される 28 アミノ酸から成るペプチドホルモンである。グレリンがその受容体 GHS-R に結合し作用を発揮するには、2008 年に同定されたグレリンアシル化酵素

(GOAT) による、3 番目のセリン残基へのオクタン酸修飾が必須である。グレリンは、強力な成長ホルモン分泌作用、摂食亢進作用をはじめとして様々な生理活性作用を持つが、多くの知見は、グレリンの急性投与によって得られたものであり、その慢性作用に関しては十分明らかになっていない。

グレリンの慢性作用を明らかにするためには、トランスジェニックマウスの利用が有効であると考えられる。実際に、これまで、我々の施設でも、種々のプロモーター（ β アクチン、インスリン、グルカゴン等）を用いたトランスジェニックマウスを作成してきた。しかし、通常のプロモーターを用いたグレリン cDNA の過剰発現では、GOAT 発現細胞がほぼグレリン産生細胞に限定されることもあり、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。

ホルモン産生腫瘍の病態の理解が、そのホルモンの慢性作用の理解につながることはしばしばである。グレリンに関しても、ある程度の数のグレリン産生腫瘍（グレリノーマ）の症例報告があるが、多くは免疫染色で発現が確認されたのみであり、血中グレリン濃度が上昇している症例は数例にとどまるため、グレリノーマの病態は十分解明されているとは言えない。

今回、我々は、グレリノーマの病態、および、そこから、グレリンの臨床応用を視野に入れたグレリン慢性上昇の影響を検討することを目的として、グレリン細胞を SV40T 抗原により増殖させることで、グレリン血中濃度が上昇するトランスジェニックマウスの作製を試みた。

B. 研究方法

ヒトグレリンプロモーターの下流に、SV40T 抗原を結合したコンストラクトを作成し、C57/BL6 マウスの受精卵に遺伝子導入を行い、ICR 擬妊娠マウスへ移植することで産仔 (GP-Tag Tg) を得た。