

(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。また、当大学の実験動物委員会へ実験計画を提出し許可を得た。

C. 研究結果

3ライン (1-5、3-1、4-3) のトランスジェニックマウスの樹立継代に成功した。このうち、1-5ラインでは、甲状腺、胃、膵臓に腫瘍が生じ早期に死亡し、4-3ラインではグレリン分泌細胞の増殖が緩徐であり血中グレリン濃度の上昇が認められなかった。そこで、グレリン分泌細胞の増殖速度が中程度であり、グレリン血中濃度の上昇が確認できた3-1ラインのGP-Tag Tgマウスを主に解析した。

GP-Tag Tgマウスでは、成長と共に胃壁の肥厚が認められ、免疫染色では、グレリン細胞の増殖が確認できた。血中グレリン濃度もグレリン細胞の増殖に一致して上昇し、12週齢以降では、血中グレリンおよびデスアシルグレリンが、最大でコントロールの約10倍程度まで上昇した。この際、摂食、性別、体重によるグレリン濃度調節が維持されていることが確認できた。

血中グレリン濃度の上昇にも関わらず、GP-Tag Tgマウスの体重は低値を示した。体長は変わらず、CTによる解析では、除脂肪体重には変化が無く、体脂肪の減少が確認された。摂食量は低下しており、体重減少は、摂食量低下によるやせであると考えられた。視床下部でのグレリンの下流の遺伝子NPY、AGRP、GHS-R mRNA発現に変化は認められず、外部からのグレリン投与ではTgマウスにおいてもコントロールマウスと同程度の摂食刺激反応が認められた。

摂食量低下から、栄養状態はむしろ悪いと考えられるのにも関わらず、GP-Tag Tgマウスの血中IGF-I濃度は上昇していた。成長ホルモン (GH) 基礎値およびグレリン負荷後のGH反応に変化は認められなかったものの、GHRH負荷後のGH反応はGP-Tag Tgマウスにおいて亢進傾向を示した。この際、視床下部、下垂体におけるGH、GHRH、somatostatin、GHS-R、GHRH-R mRNA発現に変化はなく、また下垂体のsomatotrophのサイズにも明

らかな変化は認められなかった。

摂食量低下、体重減少にも関わらず、GP-Tag Tgマウスは、糖負荷試験において耐糖能の悪化を呈した。インスリン負荷試験ではインスリン感受性には異常が無く、糖負荷試験でのインスリン分泌は低下していた。この際、膵インスリンmRNAおよび膵インスリン含量には変化は認められなかった。

D. 考察

今回、我々は、グレリンプロモーターの下流にSV40T抗原を結合することで、グレリン細胞が増殖し、血中グレリン濃度が慢性的に上昇するトランスジェニックマウスの作製に成功した。

グレリンは外部からの急性投与で、ヒトや動物において、成長ホルモン分泌を強力に刺激することが知られているが、GH-IGF-I軸に対する慢性作用に関しては十分解明されていなかった。今回、GP-Tag Tgマウスでは、血中IGF-I濃度の上昇が認められた。血中IGF-I濃度は、GHによる刺激だけではなく、栄養状態によっても調節を受け、肥満状態では血中濃度が上昇することが知られている。GP-Tag Tgマウスは、摂食量が減少していることから、このIGF-I濃度の上昇は、GH-IGF-I軸を介していると考えられる。GH-IGF-I軸の活性化が観察されたことから、生理的範囲の血中グレリン濃度の慢性的な上昇が、GH-IGF-I軸を活性化しうるということが、今回初めて示された。GP-Tag Tgマウスでは、GHS-Rのダウンレギュレーションや、グレリンに対するGH反応の低下は観察されず、グレリン長期投与でも、GH分泌反応が維持されることが期待される。高齢者では、ソマトポーズにより、GH-IGF-I軸は抑制されており、今回の知見は低容量のグレリン長期投与がGH-IGF-I軸の活性化に、有効な治療となりうることを示す結果である。

一方、GP-Tag Tgマウスでは、摂食量が落ちているにも関わらず、インスリン分泌低下を介した耐糖能の悪化が認められた。これまでも、ヒトあるいはマウスへのグレリン投与が、インスリン分泌を抑制し、血糖を上昇させることが報告されており、今回の結果も既報に一致するものであった。グレリン臨床応用の際には、持

続投与では無く、間欠投与が考えられ、糖代謝への影響はより軽微であることが予想されるが、特にコントロール不良な糖尿病患者などへの投与時には、慎重な観察が必要かもしれない。

摂食量低下に関して、外部からのグレリンに対する摂食応答は低下しておらず、グレリンへの感受性低下は否定的であった。原因は不明ではあるが、胃壁の肥厚が著明であり、摂食に影響を与えた可能性は否定できないと考えられた。今回、摂食量低下のため、かえって摂食刺激を介さないグレリンの慢性作用を評価出来たという利点はあったが、一方で、摂食、エネルギー代謝に対する作用は十分解析できなかったため、今後別のモデル動物を用いた検討が望まれる。

E. 結論

GP-Tag Tg では、血中グレリン濃度が上昇し、GH-IGF-I 軸の活性化、インスリン分泌の抑制を介した耐糖能の低下が認められた。これらの結果は、グレリノーマの病態やグレリン慢性作用の理解のみならず、グレリンの GH 分泌刺激作用を介した、ソマトポーズ等への臨床応用の際の有益な情報となりうると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
 - ② Iwakura H, Ariyasu H, Li Y, Kanamoto N, Bando M, Yamada Go, 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.
 - ③ Akamizu T, Iwakura H, Ariyasu H, Kangawa K, Ghrelin and Functional Dyspepsia. *International Journal of Peptides*, inpress.
 - ④ 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 Iwakura H, Ariyasu H, T 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.
 - ② 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.
 - ③ 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.
 - ④ 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.
 - ⑤ 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.
 - ⑥ 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.

- ⑦ 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.
- ⑧ 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.
- ⑨ 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.
- ⑩ 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.
- ⑪ 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.
- ⑫ 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
研究協力者
岩倉 浩（京都大学医学部）
有安宏之（京都大学医学部）

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

研究分担者 児島将康 久留米大学分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門 教授

高齢者ではしばしば自律神経機能の異常が認められる。それは循環器機能（血圧・心拍の異常）、消化管運動の機能障害、体温調節機能の異常などである。われわれはこれまで、グレリンが自律神経機能の恒常性維持に必要なホルモンであり、その欠損は血圧・心拍数の日内リズム消失や不安定化、消化管運動不全、体温調節不全などの自律神経機能異常の表現型を示すことを報告してきた。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。こういった結果から、グレリン欠損の影響は β アドレナリン受容体が大いに関与していると推察された。事実、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 $\beta 3$ 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。さらに心拍変動の周波数解析から、グレリンKOマウスの自律神経活動は、交感神経抑制で副交感神経が亢進であることを示している。このようにグレリンは自律神経の恒常性維持に重要であることがわかった。

A. 研究目的

高齢者ではしばしば自律神経機能の異常を伴う。生体にとって最も基本的な循環、呼吸、消化、代謝、分泌、体温維持、排泄、生殖などの機能は自律機能と呼ばれ、自律神経は平滑筋、心筋および腺を支配し、自律機能を協調的に調節している。自律神経は生体の恒常性（ホメオスタシス）の維持に重要な役割を果たすが、われわれのこれまでの研究で摂食行動を促進するホルモンのグレリンが自律神経の恒常性維持に必要であることを明らかにした。グレリンの欠損マウスの解析から、このマウスでは血圧・心拍数の日内リズムが消失し、また不安定になっていることを見いだした。また消化管の運動機能も低下しており、消化物の腸管内輸送に障害を受けている。

このグレリンの自律神経機能の恒常性維持機構を明らかにするため、下記の3項目について検討した。

- ①グレリンKOマウスにおける循環器系の機能解析
- ②グレリンKOマウスにおける消化管運動の解析
- ③グレリンによる体温調節機能

B. 研究方法

1) グレリンKOマウスの血圧・心拍数の日内リズムの欠如および不安定性については昨年度報告した。本年度はそのメカニズムの解明を試みた。無線テレメトリーでマウスの血圧・心拍数を連続モニターして、KOマウスにグレリンあるいはグレリン受容体アゴニストのGHPR6を投与して、血圧・心拍数の変動を調べた。さらに β ブロッカーのプロプラノロールと α ブロッカーのブナゾシンを投与したときのグレリンKOマウスの血圧変化を調べた。

2) グレリンKOマウスでは自律神経機能のうち、消化管運動も異常を示すことを昨年度報告した。すなわち、グレリンKOマウスでは餌を与えた後の一定時間後に胃残留物重量は野生型マウスよりも多く、腸管輸送能は低かった。本年度はこのグレリンの腸管運動作用について、さらに検討した。グレリンの腸管運動の作用が直接的なものか、あるいは神経を介した間接的な効果なのかを調べた。

3) グレリンKOマウスでは体温調節機能が異常を示し、体温の日内リズムの消失や基礎値の不安定性などが認められる。本年度、われわれはグレリンに体温低下作用があることを見つけ、そのメカニズムを調べた。

(倫理面への配慮)

実験に用いた動物に対しては、動物愛護上の配慮として、長時間にわたり強い苦痛をもたらす方法を適用する時には、しかるべき鎮痛、鎮痛剤、または麻酔剤を獣医学的に認められた方法を用い、あるいは適切な麻酔剤を用いて安楽死させた。

C. 研究結果

① グレリンKOマウスにおける循環器系の機能解析

解析: グレリンKOマウスにグレリンを投与すると、暗期開始直後では血圧がわずかに低下した。野生型マウスでは暗期から明期に移行する午前7時前に活動量が増加するが、グレリン欠損マウスでは、活動量はあまり増えなかった。グレリン受容体アゴニストのGHRP6投与では血圧の低下はあまり認められなかった。暗期から明期への移行期の活動量はここでも野生型マウスで大きく、グレリンKOマウスではあまり認められなかった。

プロプラノロールの投与でグレリンKOマウスの血圧はわずかに低下した(図1)。暗期と明期のどちらでもグレリンKOマウスの方が野生型マウスよりも血圧低下の作用が強かった。このことはβアドレナリン受容体がグレリンの循環器作用に関与していることを示している。グレリンKOマウスは血圧がやや高めになるが、これはβアドレナリン受容体がグレリンKOマウスで機能亢進していることを示している。事実、後に記載するようにグレリンKOマウスでは交感神経機能の亢進が認められる。

次にαブロッカーのブナゾシンを投与した。ブ

ナゾシン投与に直後ではグレリンKOマウスおよび野生型マウスのどちらも血圧が一時的に低下した。血圧の低下は暗期から明期に移行する午前7時の投与時に顕著だった。しかし明期の血圧はグレリンKOマウスの方が野生型よりも優位に高い傾向があり、αブロッカーの効果は明期ではあまりないと考えられた。

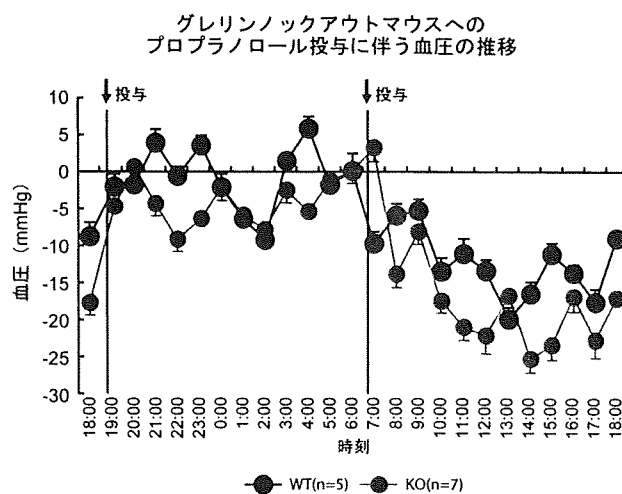


図1 グレリンKOマウスにβブロッカーのプロプラノロールを投与したときの血圧変化。グレリンKOマウスではプロプラノロール投与によって暗期および明期のどちらでも野生型よりも血圧がやや低下した。グレリンKOではβブロッカーに対する感受性が高まっていると考えられた。

② グレリンKOマウスにおける消化管運動の解析

まずグレリンKOマウスの腸管では腸管神経の発生が異常であるかどうかを検討するために組織像を調べた。その結果、調べた限りにおいて、グレリンKOの腸管組織像は、野生型のものと同まったく変化はなかった。腸管神経についても変化はなかった。

グレリンを野生型マウスに腹腔投与すると、胃残留物重量はコントロールに比べて低下し、また腸管輸送能は増加した。グレリンが確かに腸管運動を刺激することが確認されたが、自律神経機能に関するグレリンの作用から、おそらくグレリンは腸管の平滑筋に直接作用するのではなく、神経を介した間接的な作用だと考えられる。今後のさらなる検討が必要だと考える。

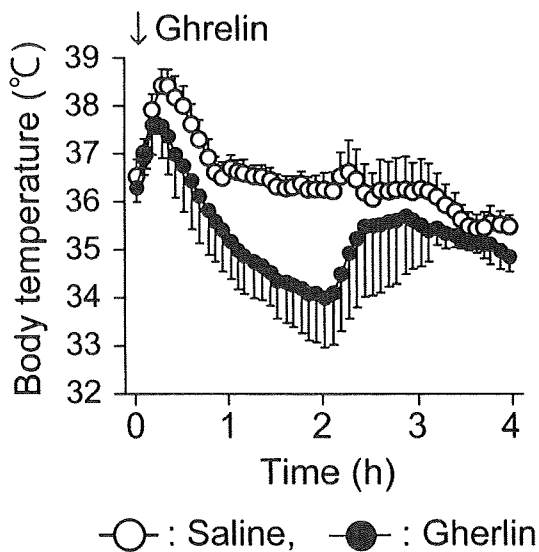


図2 グレリンは体温を低下させる作用がある。マウスにグレリンを投与すると体温が2時間にわたって低下した。

③ グレリンによる体温調節機能

マウスにグレリンを投与すると体温が下がる(図2)。投与後数分して体温は下がり始め、投与2時間でもとの体温よりも2度以上の低下を認めた。もちろんこの体温低下は室温よりも下がることはないことから、言い換えれば体温低下は「熱産生の抑制」のためと考えられる。予備的な実験ではこの体温低下はヒトにおいても認められる。

末梢(胃)からのグレリンがどのような経路で体温調節に関与するのか、われわれは順行性の神経トレーサーであるmicro-rubyを用いて、その神経連絡路を調べた。その結果、胃から分泌されたグレリンは迷走神経を刺激し延髄孤束核に到達、そこから延髄縫線核に至ることがわかった(図3)。

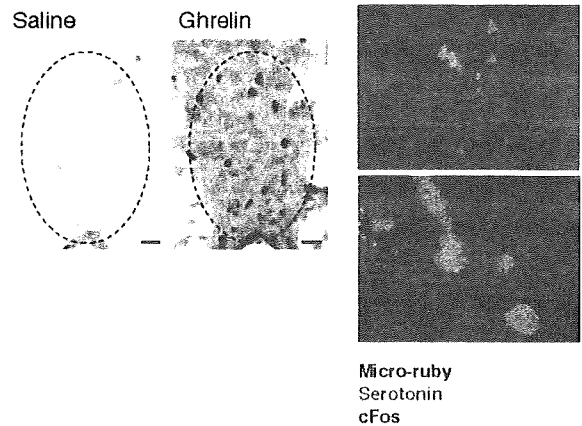


図3 グレリンによる体温調節の神経回路解析。グレリンを投与すると延髄縫線核のc-Fos発現が増える。Micro-rubyを用いたトレーサー実験では、延髄孤束核に注入したトレーサーが延髄縫線核に達し、グレリン神経とシナプスを形成していることが視覚化された。セロトニン神経にはシナプス形成はないようだ。

この延髄縫線核はグレリン投与によって神経活性化のマーカーc-Fosタンパク質の発現が上昇することからも裏付けられた。延髄縫線核においてはグレリン反応性神経は延髄孤束核からの神経と連絡し、またそれはセロトニン神経とは別の神経である。

一方、迷走神経を切断するとこの延髄縫線核でのc-Fosタンパク質誘導は抑制されるため、確かに胃から延髄縫線核への神経ルートが存在する。また興味深い現象は迷走神経切断によって、体温の日内リズムが消失し、またベースラインも不安定になるなど、ちょうどグレリン欠損マウスの表現型と似たものになる。

このグレリンによる体温低下のメカニズムを探るために、まずわれわれは生体内の熱産生の主要組織である褐色脂肪組織(以下、BAT: brown adipose tissue)について調べた。BATに入力する交感神経の電気活動をモニターすると、グレリン投与によってBAT入力神経は抑制される。このことはグレリンが交感神経抑制作用を持つことから裏付けられる。

また、血中カテコールアミン濃度を測定すると、グレリン欠損マウスでは36時間の絶食によってアドレナリンとノルアドレナリン濃度の上昇が認め

られた。野生型マウスでは上昇は見られない。このことはグレリンがないと、交感神経の抑制機能が失われ、生体内のエネルギー消費を抑制すべき絶食時でも、交感神経活動が活発になって、エネルギーの消費が持続することを示している。

BAT での酸素消費（それはすなわちエネルギー消費である）を調べてみると、グレリン投与によってBAT 培養液中の放出酸素濃度の低下がコントロールに比べて抑制され、それはBAT 細胞内での酸素消費量が抑制されることを示している（図4）。つまりグレリンはBAT においてエネルギー消費を抑制している。

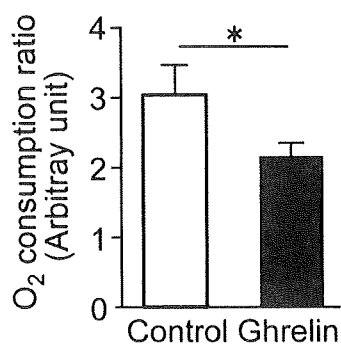
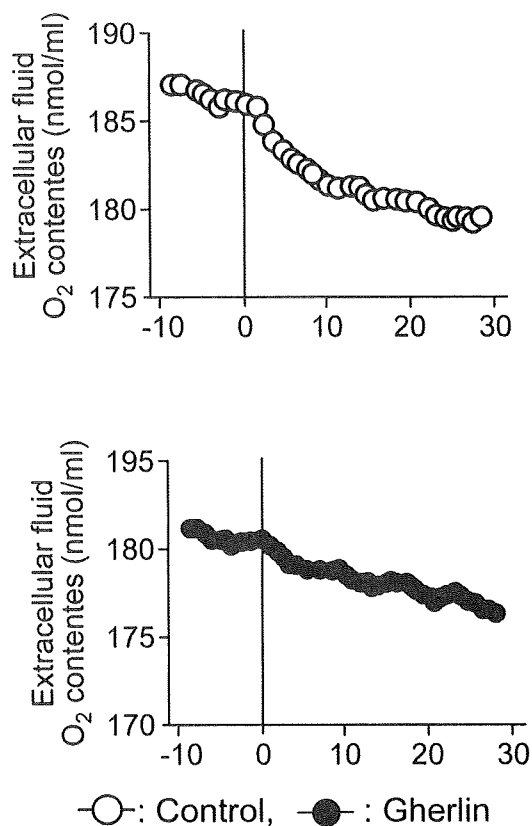


図4 グレリン投与後のBATの分化培養細胞系における酸素消費量。BAT細胞培養液中の酸素濃度はグレリン添加によって減少幅が抑制される（上の図と中央の図）。すなわちグレリンによってBAT細胞内の酸素消費量は抑制される（下の図）。

予備的なグレリン欠損マウスの絶食実験とグレリン投与マウスでの結果を考えると、グレリンはミトコンドリアでの熱産生に重要な転写因子や転写補助因子の発現を抑制して、熱産生タンパク質のUCP1機能を低下させ、その結果、熱産生抑制、体温低下につながると考えられる。

D. 考察

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。こういった結果から、グレリン欠損の影響はβアドレナリン受容体が大きいに関与していると推察された。事実、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β3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。さらに心拍変動の周波数解析から、グレリンKOマウスの自律神経活動は、交感神経抑制で副交感神経が亢進であることを示しており、これらの結果は一致する。

今後検討すべき課題として、自律神経機能（交感神経、副交感神経を含めて）の日内リズムの消失が、視交叉上核（SCN）の生体内時計の機能不全によるものなのか、あるいは自律神経リズムはSCNによるコントロールとは別の制御を受けているのかを明らかにする必要がある。それによって、生体リズムと自律神経リズムの乖離を是正する方法が見いだされるのではないかと期待される。

またグレリンはBATに入力する交感神経活動を抑制して、最終的にはUCP1の発現や機能を抑制して体温低下をもたらすと考えられる。

E. 結論

生体内にエネルギーを蓄えることは健康であるために非常に重要なことであり、高齢者ではしばしば、この生体内へのエネルギー蓄積がうまくいかない。体内のエネルギーの蓄えを増やすには①摂食量を増やすことと、②エネルギー消費を抑えること、の2つがある。グレリンは強力な摂食亢進ホルモンであることが、これまでの多くの研究で明らかにされてきたが、今回われわれの研究によって摂食亢進作用以外に、グレリンにはBATに作用してエネルギー消費を抑制することで、体内に貯蔵するエネルギー量をキープすることがわかった。このようなグレリンの2つの作用が補い合って、総合的に体内にエネルギーを蓄えるのだと思われる。

またグレリンは自律神経機能の恒常性維持に必要なホルモンであり、高齢者でしばしば認められる自律神経の機能異常にグレリンが関与しているのかもしれない。こういったことから高齢者の自律神経機能異常の治療にグレリンが応用できるかもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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.
- ② 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.
- ③ Garcia EA, King P, Sidhu K, Ohgusu H, Walley A, Lecoer 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.

- ④ 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.
 - ⑤ Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: From Gene to Physiological Function. *Results Probl Cell Differ*. inpress.
- ### 2. 学会発表
- ① 児島将康 : Peptide hunting: from Drosophila to Human: Satellite Symposium of 9th VIP/PACAP Symposium in Yakushima, 屋久島, 平成21年10月2日.
 - ② 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.
 - ③ 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.
 - ④ 児島将康 : Phenotypic analysis of ghrelin knockout mouse : 2009 International Symposium on Ghrelin, 東京, 平成 21 年 11 月 18 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

グレリン投与による慢性閉塞性肺疾患治療

研究分担者 永谷憲歳 国立循環器病センター研究所 再生医療部 客員研究員

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

A. 研究目的

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

ギー代謝改善効果が認められた。また、cachexia を伴った COPD 患者 7 例に対しパイロット臨床試験を行い、グレリンの安全性および有効性について検討したところ、血清 GH 濃度の上昇、交感神経活性の抑制、摂食の促進、呼吸筋力の改善、運動耐容能の改善、エネルギー代謝の改善効果が認められた（Chest. 128 (3) :1187-93, 2005）。

これらの結果をふまえ、グレリンの cachexia に対する治療効果の検討および安全性の検証を目的として、国立病院機構刀根山病院、宮崎大学医学部、奈良県立医科大学との多施設無作為化二重盲検比較試験を開始した。

B. 研究方法

1) 対象者の選択基準

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

2) 臨床試験薬

実薬：合成ヒトグレリン (2 μ g/kg) +生理食塩水 (10 mL)

偽薬：生理食塩水 (10 mL)

3) 臨床試験の方法

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

4) 評価項目

○有効性の評価

主要項目：SGRQ (QOL score)

6分間歩行試験

副次項目：SF-36

MRC dyspnea scale

peak V02 (心肺運動負荷試験)

食事摂取量

VC

FEV1%

Maximal inspiratory pressure

Maximal expiratory pressure

血漿ノルアドレナリン濃度

5) 目標例数

実薬群、偽薬群をそれぞれ15例、合計30例

6) 臨床試験予定期間

2005年8月から2009年3月まで

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

国立病院機構刀根山病院20例、宮崎大学医学部7例、奈良県立医科大学6例、の計33例をもって、本臨床試験を完了した。平均年齢73.9歳、

BMI=18.0 \pm 2.1 (kg/m²)、FEV1%=34.5 \pm 9.1であった。自覚症状として胃腸の蠕動亢進感(4例)、口渇感(1例)、空腹感(3例)、ほかほか感(4例)、気分不良(1例)を認めた。また、試験薬投与中に有害事象が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。更に、試験終了後肺癌が確認された症例が報告されたが、発症までの期間が2年9ヶ月と長いこと、その急激な腫瘍増大などから、グレリンとの因果関係は効果安全性評価委員会でも否定された。その他、臨床検査値異常として低蛋白血症(3例)、高脂血症(1例)、肝機能障害(1例)を認めたが、いずれも投与終了後に速やかに改善している。

現在、効果安全性評価委員会承認の元キーオープンし、本試験に関する統計解析を外部機関に委託し、その詳細な結果を検討している最中である。

D. 考察

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

Cachexiaでは血漿グレリン濃度が代償性に上昇しており、グレリンは交感神経抑制、摂食促進、エネルギー代謝改善作用などの生理作用を有することから、グレリン投与はCOPD患者の呼吸筋力や下肢筋力の改善およびエネルギー代謝の是正に働く可能性が考えられ、重症COPD患者のcachexiaに対する新たな治療法として期待できる。我々は、パイロット臨床試験によりCOPD症例に対するグレリン治療の安全性を確認した後、今回、有効性評価に関し無作為化二重盲検比較試験を開始し、症例数を重ねて検討を行った。現在までに計33例の臨床試験が完了し、最低目標である30症例に到達した。有害事象としてこれまでに細菌性肺炎と抑うつ状態の悪化を各1例認め、試験薬の投与を中止した。二重盲検比較試験であるため実薬群で

あったかは明らかではないが、いずれの有害事象も軽症かつ速やかに改善しており、また安全評価委員会においてグレリンとの因果関係はないと判断されている。更に本試験終了後、急激に増大する肺癌を発症した症例が効果安全性評価委員会において報告された。本症例は、本試験終了後も COPD に対し胸部レントゲンおよび CT にて定期的に経過観察を行っていたが、試験終了 2 年 9 ヶ月後に肺癌を確認し、その後わずか 3 ヶ月で胸壁まで浸潤した。その経過観察期間および急激な進展から、本試験との因果関係は否定された。

E. 結論

我々は cachexia を伴う COPD 患者に対するグレリン投与の安全性、有効性を検討するため、多施設無作為化二重盲検比較試験を行い、予定症例数に到達した。効果安全性評価委員会の承諾のもと、キーオープンを行い、本試験に関しての統計解析を外部機関に委託し、その詳細な結果を検討している。

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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

