

II. 分担研究報告書

グレリンの腎保護作用に関する研究

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 徳山 博文

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

研究要旨 <背景>成長ホルモン放出促進受容体の内因性リガンドとして発見されたグレリン(Ghr)はミトコンドリア由来の活性酸素(ROS)を減少させることにより酸化ストレスを示す。今回我々はグレリンの腎保護効果について検討した。<方法>in vitroでは腎近位尿細管細胞HK-2細胞にアンジオテンシンII(AII)1 μ Mを投与しscenescenceを誘導し、Ghr同時投与の効果を検討した。またin vivoではAII(1000ng/kg/min)を2週間持続投与したマウスC57BL/6 miceに対し、Ghr(100 μ g/kg/day)を2週間連日腹腔投与し、Ghrの効果を検討した。さらにGhr受容体欠損(GHSR null)マウスを用いた検討も行った。<結果>AII投与によりHK-2細胞のSA β -gal活性の上昇、細胞周期抑制因子p53、p21および炎症性サイトカインであるTGF- β 、PAI-1の発現誘導が認められ、細胞老化、組織線維化が確認され、Ghrはこれらを抑制した。マウスAII持続投与ではGhrはAIIによる尿蛋白増加、尿細管マーカー(NGAL、NAG)の上昇、腎臓のSA β -gal染色等の老化変化を抑制した。4HNE染色においてGhrはAIIによる腎尿細管間質の酸化ストレス上昇を低下させた。Ghr投与によりミトコンドリア(Mit)由来の酸化ストレスを抑制するUCP2の発現が増加し、PGC1 α の上昇により、Mit数は増加した。GhrはAIIによる組織線維化を抑制した。またGHSR nullマウスではWTマウスと比較してAII投与による尿蛋白増加、尿細管障害増悪を認め、腎臓のSA β -gal染色等の老化変化や4HNE染色における酸化ストレス上昇の増悪を認めた。またミトコンドリアの電顕写真ではGHSR nullマウスではWTマウスと比較してミトコンドリアの伸長が認められ、GHSR nullマウスのAII投与群でさらに増強されていた。[結論]Ghrは腎臓において、MitのUCP2の誘導を介しAIIによる活性酸素レベル上昇を低下させた。このことより内因性のGhr/GHSRが尿細管の活性酸素産生調節において重要であることが示唆された。

A. 研究目的

グレリンとはラットとヒトの胃で発見されたペプチドホルモンで、GH分泌促進受容体を介してGH分泌を誘起させるホルモンである。グレリンは摂食行動の生理的信号物質であり、成長ホルモ

ンの分泌と摂食を増進して成長を制御する。従ってその分泌は栄養状態やエネルギーバランスの変化に依存して生じる。グレリンは胃及び脳内の視床下部弓状核のニューロンで産生され、またグレリン受容体は脳のさまざまな部位で発現して

いる。その一方でグレリン、グレリン受容体は腎臓にも発現が認められているが腎臓での働きについては不明な点が多い。一方慢性腎臓病でグレリンの血中レベルは上昇すると報告されており、原因として腎臓からの clearance の低下、CKD での低栄養状態に対する反応、腎臓における分解の低下、胃以外の臓器での産生の亢進などがその機序として想定されている。グレリンの腎での作用についてはマウスの虚血再還流傷害急性腎不全において腎機能を向上させることが報告されており、我々は新規代謝調節ホルモン、グレリンの慢性腎臓病に対する腎保護作用、抗酸化作用について *in vitro* および *in vivo* で検討した。

B. 研究方法

in vivo(マウス)での検討

16 週齢マウス C57BL/6 mice に AII をオスモティックミニポンプで持続静注し、4 週間飼育する。飼育開始 2 週間後よりグレリン群にはグレリンを 100 μ g/kg/day を連日腹腔注射した。ARB 群ではイルベサルタンを 50mg/kg/day を混餌で投与した。次に Ghrelin の降圧作用による効果を除外する目的で同等に降圧して Hydralazine 250mg/dl 投与群との比較を検討した。さらに、Ghrelin の抗加齢抗老化のメカニズムを Ghrelin receptor の発現が証明されている *in vivo*(尿細管細胞株を用いた系)でも検討した。更に内因性 Ghrelin の AII 依存性腎臓病抑制効果について Growth Hormone secretagogue receptor ノックアウトマウスを用いて検討した。

C. 研究結果

In vivo(マウス)のデータ

まず収縮期血圧は、Ghrelin は AII による血

圧上昇を有意に低下させた(図 1)。

次に Ghr による腎臓病抑制効果に関しては、尿細管障害のマーカーである尿中 NAGL および NAG は AII 投与で有意に増加したが、これらの尿細管障害を Ghr は有意に抑制した。しかし、ヒドララジン投与では抑制は出来なかった。また、尿蛋白は AII 投与で増加し、Ghr、ヒドララジン投与で有意に抑制された。以上より Ghr で認められた尿細管保護作用は降圧に依存せず、その一方で尿蛋白抑制効果は降圧に依存すると考えられた(図 2)。

AII による腎臓病の要因の一つに酸化ストレスの上昇が知られている。そこで腎臓組織の酸化ストレスのレベルを 4HNE 染色で検討した。AII で腎皮質において 4HNE 染色が上昇し、Ghr がこれを顕著に抑制していたのを認め、この作用はヒドララジンによる降圧で認められなかった(図 3)。すなわち Ghr による抗酸化作用も血圧非依存性に働いていることが分かった。さらに、この抗酸化作用が腎臓老化反応抑制効果につながるかどうか検討した。腎皮質領域の SA- β -GAL 染色では、AII 投与群で染色が強く認められ、Ghrelin 投与群で染色が低下しているのを認めた。AII 投与による細胞老化を、Ghrelin 投与により抑制されたのが示唆された。またヒドララジンによる降圧は AII による組織の老化を抑えることは出来なかった(図 4)。老化関連因子である p53、p21 についても検討したが、AII により p53 の発現が誘導され、この誘導を Ghr は有意に抑制した。同様の結果が p21 についても認められた(図 5)。

次に老化細胞が発現する TGF- β と PAI-1 の発現調節を RT-PCR 法で検討したが、AII 投与により発現誘導された TGF- β 、PAI-1 両者とも Ghr 投与群で抑制されていた(図 6)。

TGF- β 及び PAI-1 は組織の線維化に関わるサイ

トカインであることが知られている。そこでマッソントリクローム染色で腎組織の線維化を検討した。AII 投与群で NS 群と比較し有意に間質に強い線維化の亢進が認められ、Ghr 投与群で有意に線維化が低下していた。しかし、ヒドララジン投与群では線維化の低下を認めなかった(図 7)。

近年 Ghr の抗酸化作用に関しては明らかになっており、Ghr は神経細胞において、ミトコンドリアの脱共役蛋白である UCP2 の発現を上昇させ、その結果ミトコンドリアの膜電位を低下させ O₂-の産生が抑制された。その結果ミトコンドリア数の増加が認められた報告がされている。そこで我々は Ghr は抗酸化作用を介して組織保護に働くことが示唆され、その分子メカニズムを検討した。抗酸化の鍵分子である UCP2 の mRNA 発現は Ghr 投与した腎臓で有意に上昇していた。また、catalase の発現は 3 群間で有意差を認めなかった。さらに AII による活性酸素産生に関与する NADPH オキシダーゼの isoform である NOX1 と NOX4 は AII 投与で上昇していた。またサブユニットである p22phox も AII 投与で上昇していた。これらを Ghr は有意に低下させた(図 8)。

さらに mitochondria 生合成の鍵分子である PGC1 α の発現は AII で低下し、Ghr で有意に増加し、その結果、Ghr 投与のマウスにおいては mitochondria の数が増加していた(図 9)。

以上 2 つの効果より、Ghr は UCP2 の発現上昇を介しミトコンドリア維持効果をきたしこれが組織保護効果を示したと考えられた。

Ghr は AII により誘導された酸化ストレスの上昇、老化反応、組織障害を抑制した。更に加齢関連のサイトカインである TGF- β および PAI-1 の発現を抑制し、抗線維化作用を示した。また Ghr は UCP2、PGC1 α の発現を誘導し、抗酸化作用、

mitochondria の維持効果を示した。これが Ghr の腎障害保護作用、腎の老化反応抑制を引き起こしたと考えられた。これらの Ghr の作用は血圧非依存性であり尿細管細胞への直接効果と考えられた。

GHSR ノックアウトマウスでの検討

最後に内因性 Ghrelin の AII 依存性腎障害抑制効果について Growth Hormone secretagogue receptor ノックアウトマウスを用いて検討した。GHSR ノックアウトマウスについて、GHSR の遺伝子上流にトランスクリプションブロッキングカセットを組み込んだ total の GHSR ノックアウトマウスを用い、genotyping を行った。更に RT-PCR でノックアウトの確認をした(図 10)。WT と WT に AII 500ng/kg/min を投与したもの、GHSR ノックアウトマウス (KO) と GHSR ノックアウトマウス (KO) に AII 500ng/kg/min を投与したものの 4 群を比較した。まず収縮期血圧では WT 群と KO 群で比較し、KO 群で有意に血圧が上昇していたのを認めた(図 11)。その変化は AII 投与群でも同様のことが確認された。尿蛋白、尿細管障害のマーカーである NGAL、NAG は WT 群と KO 群で比較し、KO 群で有意な増加を認めた。AII 投与に関してはその差ははっきりしなかった(図 12)。

腎皮質領域の老化反応を引き起こす酸化ストレスを 4HNE 染色で検討すると、WT 群に比較し、KO 群が強く染色されていた(図 13)。また SA- β -GAL 染色は 4HNE 染色と同様に WT 群に比較し、KO 群が強く染色されていた(図 14)。内因性 Ghr が抗老化、抗酸化作用をもつことが確認された。最後に MT 染色で腎線維化を検討したが、KO 群で有意に腎線維化が認められた(図 15)。また腎臓の近

位尿細管領域の電顕所見で、ミトコンドリアは酸化ストレスを受けると変形伸展拡大することが報告されているが、KO 群で有意にミトコンドリアの変形、伸展を認めた。さらにミトコンドリアの数は GHSR ノックアウト群で有意に低下していた (図 16)。GHSR ノックアウトマウスは WT と比較して老化の促進、線維化の亢進、酸化ストレスの上昇、腎機能障害の増悪が認められた。

D. 考察

消化管ホルモンである Ghr は腎臓において、ミトコンドリアの UCP2 の誘導を介し AII による活性酸素レベル上昇を低下させたことが示唆された。UCP2 はミトコンドリアの inner membrane に存在し intermembrane space の H^+ を matrix 側へ leak させる脱共役蛋白でありその結果、膜の電位勾配は低下し、活性酸素 (ROS) の産出が低下する。UCP2 はミトコンドリアにおいて O_2^- の産出を抑制する分子であり、細胞内の O_2^- 、ROS のほとんどはミトコンドリア由来であるから UCP2 による O_2^- 産出低下は極めて有効な抗酸化作用を有すると考えられた。実際、血管内皮細胞では P38MAP キナーゼを介した UCP2 の上昇により AII により誘導させた活性酸素発生を抑制し、AII 投与による血管内皮細胞の障害を抑制させたことが報告されている。我々の AII 投与による腎障害モデルやヒト近位尿細管細胞株 (HK-2 細胞) でも UCP2 の上昇を認め、これらの代償機構を確認した。更に Ghr 投与により UCP2 の上昇が誘導され腎組織障害を抑制した。AII 投与群のマウスは NS 投与群のマウスの UCP2 よりも発現が上昇していた為 Ghr、それ自体が UCP2 発現を上昇させ、AII 投与群の UCP2 上昇とは独立して働いたものと考えられた。

AII によって誘導された ROS は病理組織学的にも腎の炎症や線維化に重要な役割を担っている。我々の AII 投与による腎障害モデルにおいても AII は NADPH オキシダーゼの腎臓での主な isoform である NOX1、NOX4 の発現を上昇させた。いままでにも AII は NOX1、NOX4、p47phox、p67phox、p22phox 等の様々な NADPH オキシダーゼのサブユニットの上昇を誘導した報告がある。そして今回 Ghr は NOX1、NOX4、p22phox の発現を低下させた。すなわち Ghr の有する抗酸化作用と考えられた。また NOX の発現は還元反応によって生じていると考えられた。また今回の AII 投与による腎障害モデルで PGC1 α の発現低下とミトコンドリア数は減少していたが Ghr は強力な抗酸化作用によりこれらの低下を軽減させた。また Ghr 投与により AII 投与したマウスの血圧は低下を認めた。これは以前に分離した血管内皮細胞で血管拡張作用による直接的作用であると報告があり、これによるものと考えられた。さらに視床孤束核に Ghr を投与すると血圧低下をみとめることより交感神経に作用して血圧低下が生じた報告もある。これについては GHSR ノックアウトマウス (KO) は WT より血圧高値であったことから内因性の Ghr が血圧低下作用を呈したことも示唆された。我々の実験のモデルは AII 投与のストレスに誘導させ発症させた老化モデルである。これらの老化細胞は炎症性サイトカインである TGF- β や PAI-1 を発現、分泌し、細胞周囲を変化させる。さらに、老化細胞は通常の細胞と比較し、易ストレス感受性になりアポトーシスを起こしやすくなる。老化関連機能障害の原因となるミトコンドリアの酸化障害もその一つである。加齢マウスの組織ではミトコンドリア数が減少し、活性酸素の蓄積やエネルギーの産生低下等の機能障害を示すことが

言われている。我々の AII 投与モデルではミトコンドリア数の減少を認め、それによる ROS の産生増加や近位尿細管領域の組織障害を起こしていた。また AII type1 受容体ノックアウトマウスは WT よりも長期間生存した報告がある。また WT で加齢に伴うミトコンドリアの絶対値密度の低下は AII type1 受容体の数に依存するといわれている。我々の GHSR null (KO) マウスでも腎機能低下や同様の变化を確認している。さらに KO マウスのミトコンドリアは WT と比較し、変形伸展拡大しているミトコンドリアが多く認められた。以前に加齢ラットの心筋のミトコンドリアでも同様のことが報告されている。拡大、延長したミトコンドリアはオートファジーをさせずに蓄積されたミトコンドリアであるといわれている。このことより、KO マウスの近位尿細管領域のミトコンドリアは老化の表現型を示していることは Ghr が腎機能、腎老化を制御していることが示唆された。以前の報告で Ghr はマウスの虚血再還流傷害急性腎不全において腎機能を向上させることがいわれている。その機序として Ghr による GH/IGF-1/ PI3K/Akt の経路が活性化したことがインスリンレセプター基質 II 欠損マウスで確認された。また詳細不明であるが尿細管細胞に抗アポトーシス作用を示したことがいわれている。他の報告では Ghr 投与により前駆炎症サイトカイン、特に TNF α の抑制により急性腎障害を引き起こす内毒素に対し保護的に働くこともいわれている。しかしこれらの報告では腎臓に直接影響しているか検討していない。Ghr 投与により尿中リチウムの排出を変化させずに尿中 Na の排出を増加させる。これは Ghr の遠位尿細管への直接的な作用による Na 再吸収であるとさせる。我々の検討では GHSR の免疫染色で近位尿細管領域に染色性

が高く、さらに近位尿細管細胞株である HK-2 細胞でも GHSR の mRNA の発現を認めている。今回 Ghr が尿細管障害を改善するか近位尿細管マーカーである尿中 NAG、NGAL を測定して検討した。さらに GHSR は近位尿細管で発現し、Ghr は腎臓で GHSR を介して腎保護効果を示すことが示唆された。また以前では Ghr による抗酸化効果については検討されておらず酸化ストレスは虚血再還流傷害急性腎不全において主な要因とする報告があり、Ghr の急性腎障害における腎保護効果は ROS の減少の結果起こっていると考えられた。急性腎障害と同様に酸化ストレスは慢性腎臓病の様々な研究モデルの重要な発症メカニズムと考えられている。

我々は Ghr の抗酸化作用は慢性腎臓病においても有効であることを明らかにした。慢性腎臓病で顕著な体重減少は主な所見である。cachexia は慢性腎臓病により生じ、それらの患者の総 Ghr 濃度はアシル化 Ghr (活性型 Ghr) の変化なく上昇していた。総 Ghr 濃度の上昇は Ghr が腎臓での排出、腎不全による蓄積により生じている可能性もあるが、活性型 Ghr の血中濃度の変化が認められないのは cachexia で臨床的に消費されている可能性が示唆された。いくつかの研究で慢性腎臓病や透析患者における Ghr の有益性を認めた。GHSR ノックアウトマウス (KO) は摂餌量や体重減少を示すことがいわれている。この KO の状態は慢性腎臓病の cachexia に類似している。最近の研究でこれらの Ghr の腎臓への効果か Ghr の体重増加、食欲亢進作用による Ghr の個体へのシステムティックな効果か区別できていない。しかしながら腎不全の進行は cachexia の増悪に密接に関係している。Ghr 投与は腎機能障害だけでなく慢性腎臓病の栄養失調の改善によって腎機能悪化を改

善させる可能性が考えられる。

E. 結論

我々はグレリンが腎組織での酸化ストレス発生を抑制することによりAIIにより誘導された腎障害を改善させたことを明らかにした。Ghrはミトコンドリアで脱共役蛋白であるUCP2を誘導させ、ミトコンドリアの膜電位を低下させ、ミトコンドリア由来のROSの発生を抑制したと考えられた。GHSRノックアウトマウスはWTと比較して線維化、加齢変化を認め、酸化ストレスの上昇による腎機能障害を認めた。これはGhr/GHSR経路が腎臓において活性酸素産生調節に重要な役割を担っていることが示唆された。我々の研究結果よりGhrは腎不全進行に対しての新規治療戦略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

なし

2. 学会発表

藤村慶子、脇野修、水口斉、原義和、長谷川一宏、山口慎太郎、本間康一郎、神田武志、徳山博文、林晃一、伊藤裕 Angiotensin IIによる腎老化作用に対する Ghrelin の腎保護効果、第 34 回日本高血圧学会学術集会、2012 年

Keiko Fujimura, Shu Wakino, Hitoshi Minakuchi, Kazuhiro Hasegawa, Koichi Hayashi

and Hiroshi Itoh. Ghrelin suppresses angiotensin II-induced premature renal senescence by reducing oxidative stress、ASN 2012

藤村慶子、脇野修、水口斉、長谷川一宏、徳山博文、林晃一、伊藤裕 Angiotensin II による腎老化作用に対する Ghrelin の腎保護効果、日本心血管内分泌学会、2012 年

藤村慶子、脇野修、林晃一、伊藤裕 Angiotensin II による腎障害に対する Ghrelin の腎保護効果、第 55 回日本腎臓学会学術集会、2012 年

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

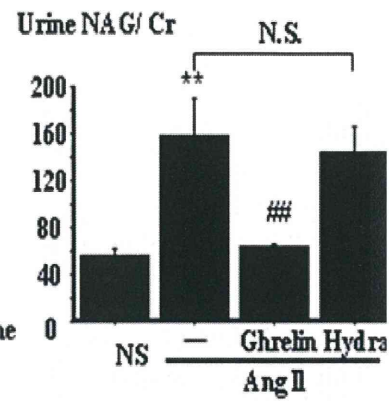
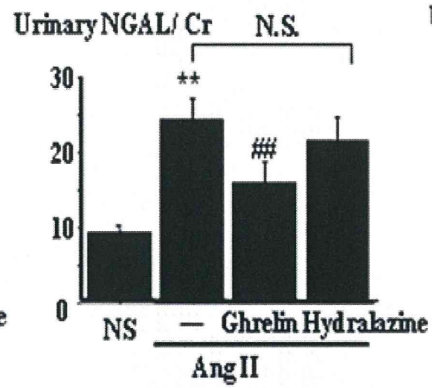
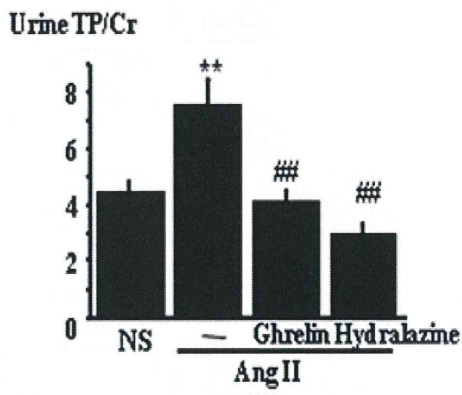
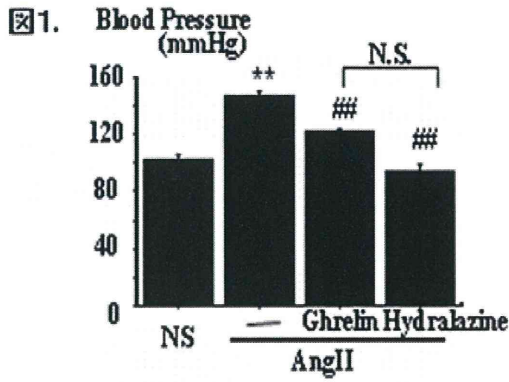


图3. 4HNE staining

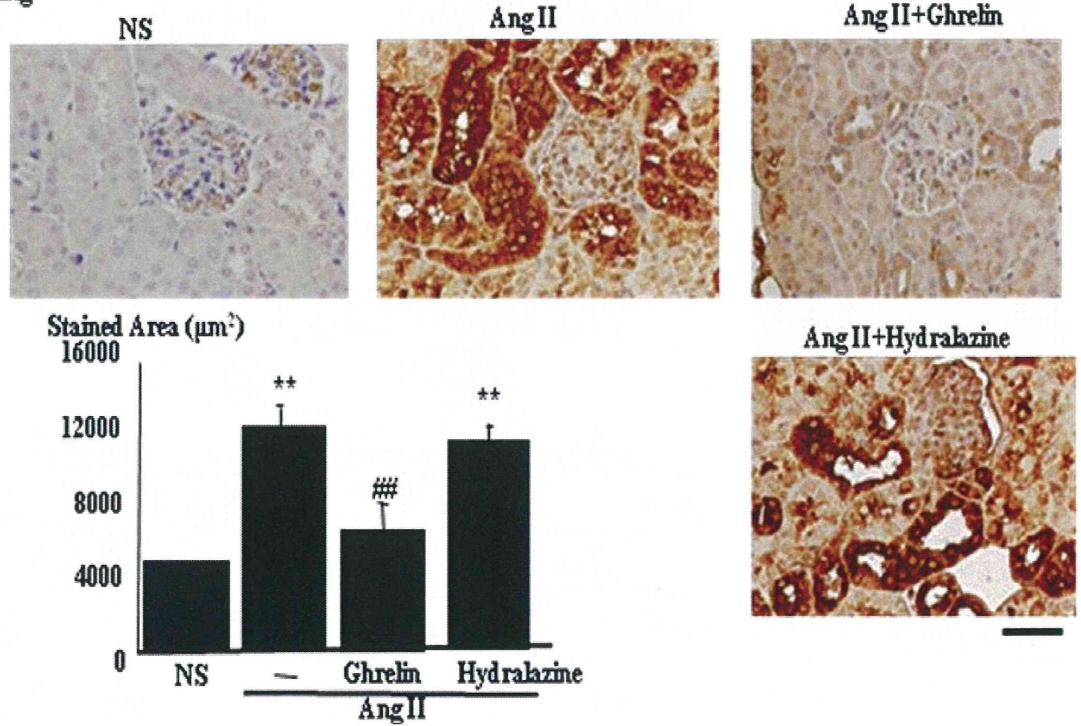


图4. SA-β Gal staining

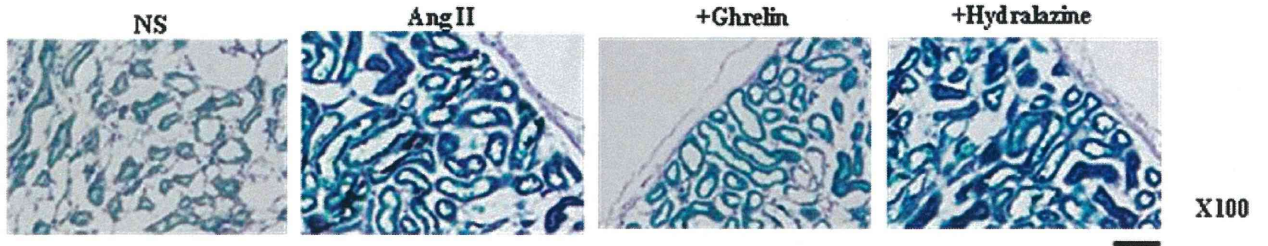


图5.

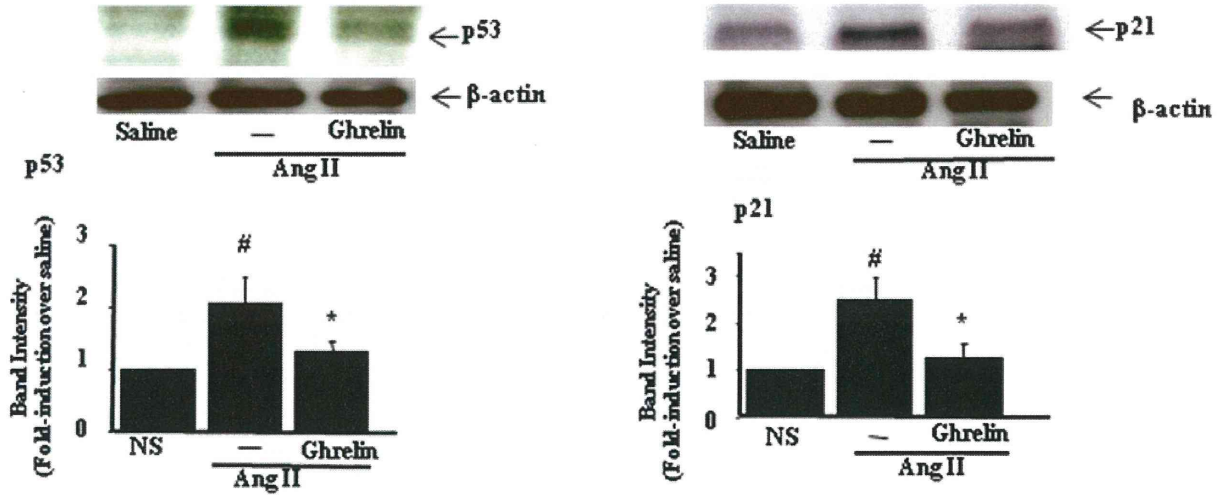


图6.

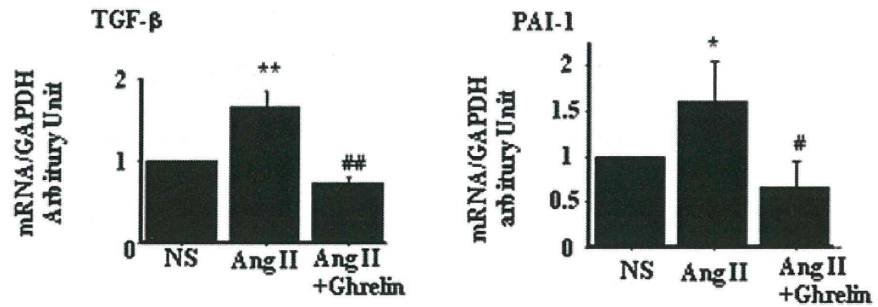


图7.

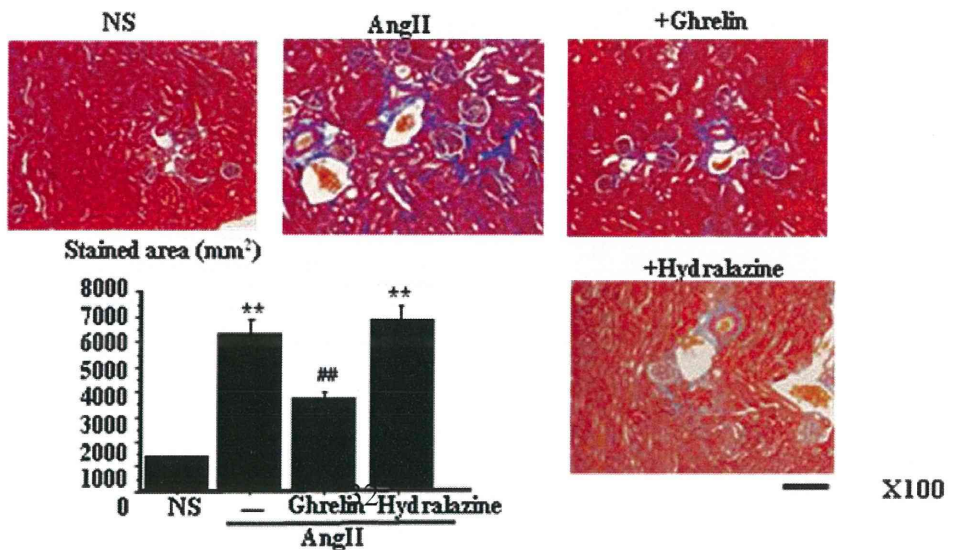
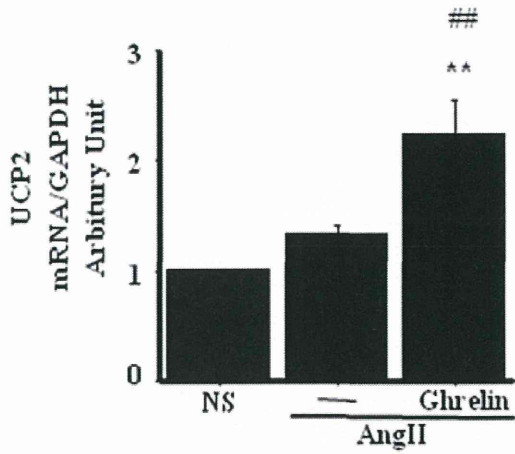
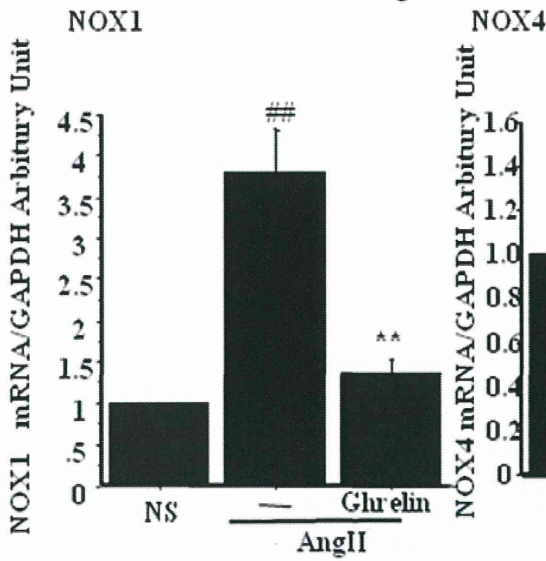
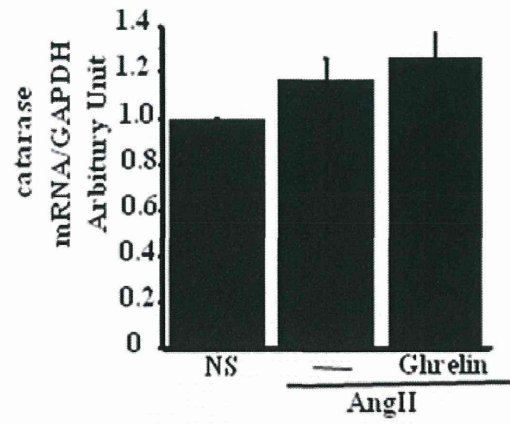


図8.
UCP2



catalase



p22^{phox}

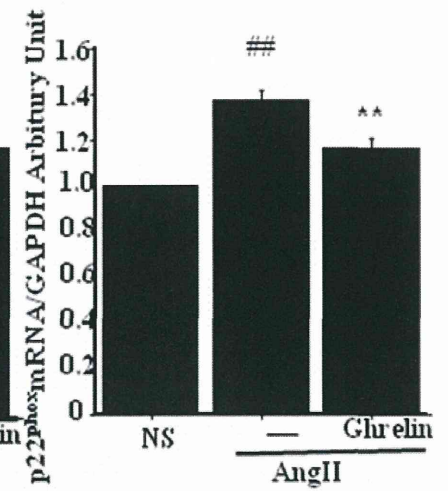
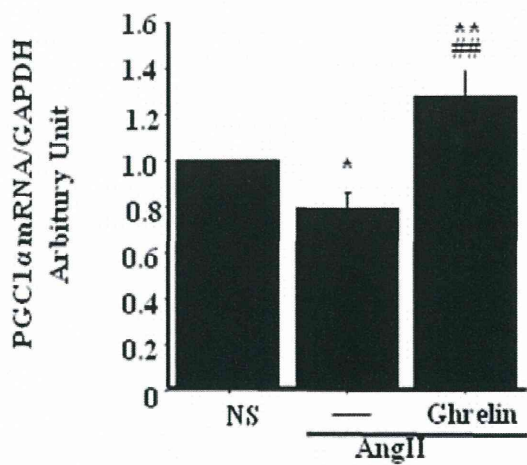
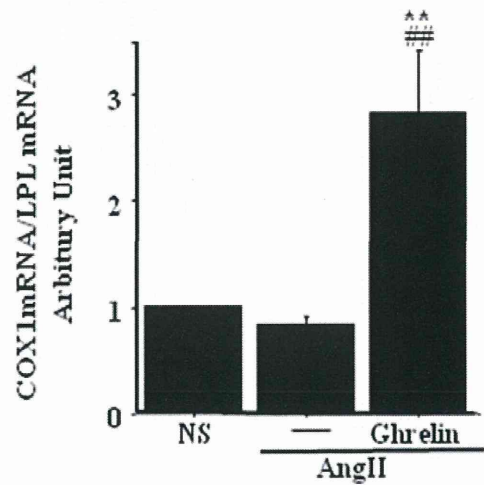


図9 PGC1α



ミトコンドリア数



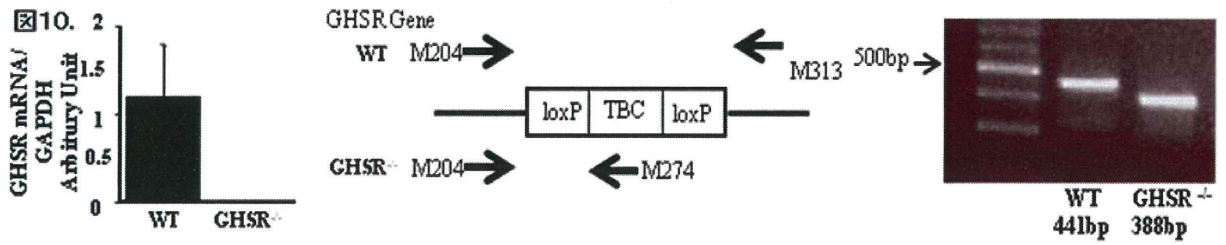


图11. Blood Pressure (mmHg)

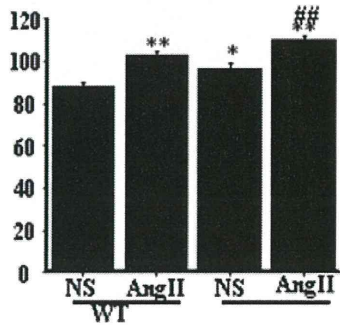
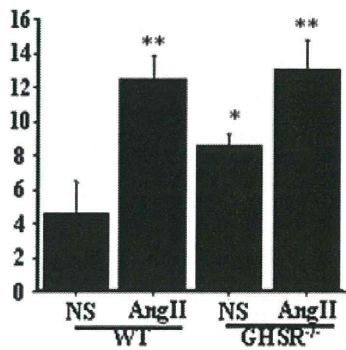
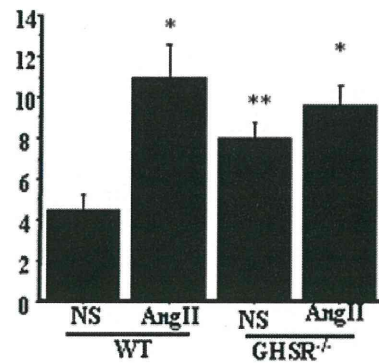


图12. Urenary TP/Cr



Urinary NAGL/Cr



Urinary NAG/Cr

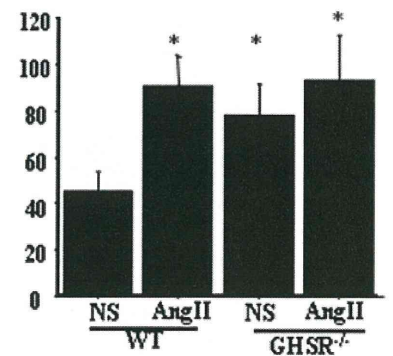


图13. 4HNE染色

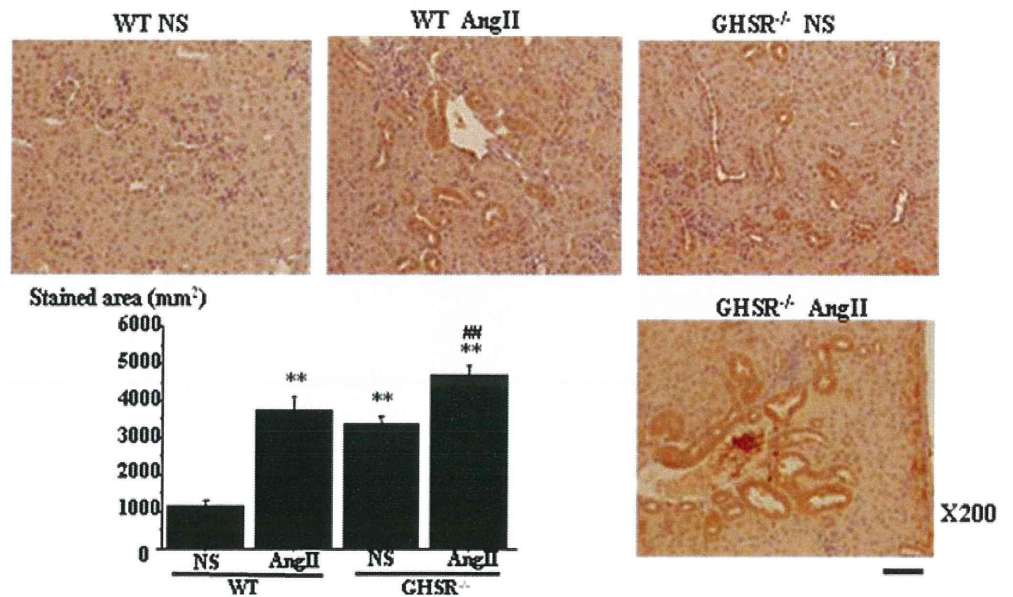
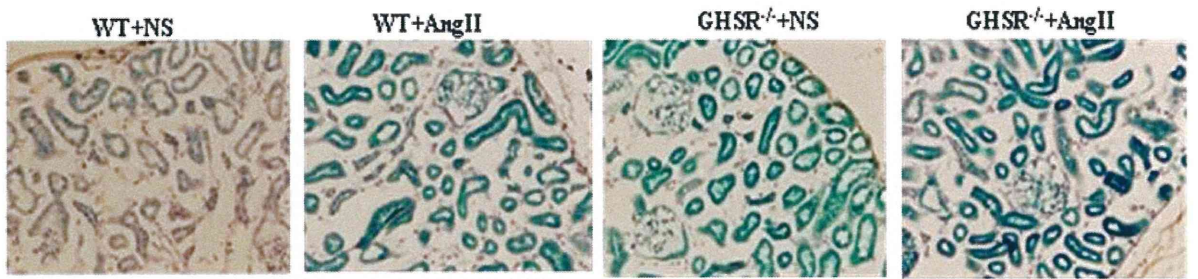
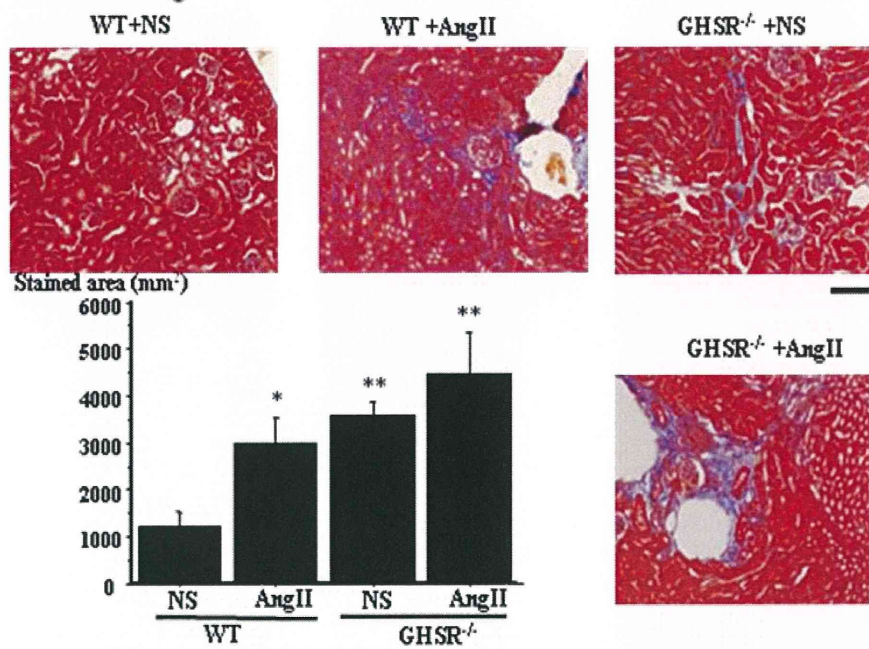


図14. SA-β Gal staining



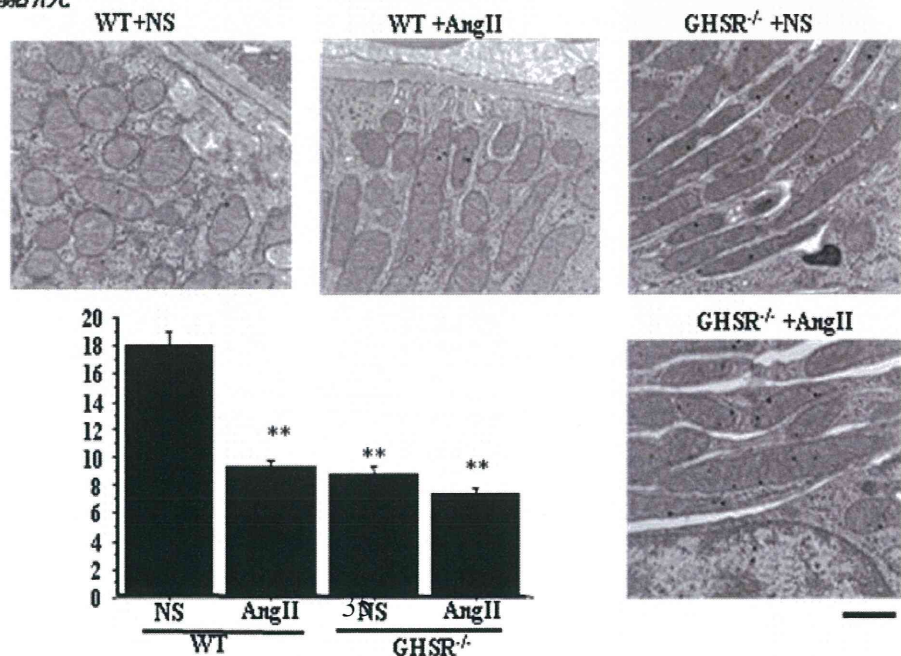
X200

図15. Masson Tricrome staining



X100

図16.電子顕微鏡所見



X18400

臨床試験「新規消化管ペプチドグレリンによる慢性腎臓病患者に対する投与」プロトコールの作成

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 中谷英章
慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科 脇野 修

研究要旨 グレリンは最近我が国で発見された消化管ペプチドである。グレリンには食欲増進作用、抗加齢、抗酸化、臓器保護作用が期待でき、慢性心不全、慢性閉塞性肺疾患、神経性食思不振症などに対して臨床試験が施行され、有効性、安全性が証明されている。また維持透析患者への投与の報告もあり、神経性食思不振症に関しては国内第 III 相試験が進行中である。近年我々はマウスを用いた検討によりグレリンの慢性投与が慢性の腎障害を抑制することを発見した。このメカニズムが ミトコンドリア (Mit) 脱共役蛋白である Uncoupling Protein-2 (UCP-2) の増加、Mit 膜電位差の減少、Mit 由来の酸化ストレスの軽減、さらに Mit 数の増加によることを証明した。本試験は申請者のこれまでの研究と新知見を総合した translational research である。そして CKD 患者の病態の基盤となるエネルギー消費状態である PEW の改善により CKD 患者の腎予後の改善が期待でき、医療費の増加も抑制できる可能性が考えられる。京都大学医学部探索医療センター・グレリン創薬プロジェクトにおいては、健常人にグレリンを静脈内投与した際の安全性、体内動態、薬理作用を検討し、重篤な有害事象を発生しないことを確認し報告している。(Akamizu et al. Eur J Endocrinol. 2004; 150: 447-55)。さらに、グレリンに関する臨床試験・治験として、摂食不振患者や変形性股関節症による人工股関節置換術患者を対象とした臨床第 2 相試験を実施している。一方、アスピオファーマ株式会社では、ヒトグレリンの製造、製剤化に成功し (Makino T et al. Biopolymers. 2005; 79: 238-47.)、グレリンの工業的生産法を確立し、さらに、グレリンの前臨床試験や健常人での安全性や作用を確認し、神経性食欲不振症、ならびにカヘキシアを対象とした臨床第 2 相試験を、日本、及び欧米で開始している。以上の過去の報告を基に今回われわれは慢性腎臓病患者に対するグレリン投与のプロトコールを作成した。

我が国の国民医療費の増加の一因として慢性腎臓病 (CKD) の進行による心血管事故の増加と高額医療である維持透析患者の増加が挙げられる。近年 CKD の発症に対する早期介入および進展阻止のための様々な試みが行われているが、有効な治療方法はなく、新規透析患者数は未だ減少していない。

CKD の基盤病態の一つにエネルギー消費状態である protein-energy wasting syndrome (PEW) が知られている。CKD は腎性インスリン抵抗性症候群を引き起こし、そのためエネルギーの利用障害が起こる。それと並行して酸化ストレスの亢進も腎性インスリン抵抗性症候群を引き起こす。また、尿毒症物質の蓄積により食思不振となり、エネルギー利用障害と相まって PEW の状態となる。

PEW では、筋委縮、脂肪委縮が認められ、体力の消耗、生活の質の低下、易感染性となり、心血管疾患の合併頻度の増加や腎機能障害の進行を来す。

A. 研究目的

このため、抗酸化作用を有し、消耗性の疾患に有用性のある内因性ペプチドの投与により PEW の病態を改善し、腎予後の改善を図るため、消化管ペプチドであるグレリンを投与し、その有効性と安全性を確認するのが本研究の目的である。

B. 研究方法

ヒトへのグレリン投与については、京都大学医学部探索医療センター・グレリン創薬プロジェクトにおいて、健常人にグレリンを静脈内投与した際の安全性、体内動態、薬理作用を検討し、重篤な有害事象を発生しないことが確認され報告されている。(Akamizu et al. *Eur J Endocrinol.* 2004; 150: 447-55)。さらに、グレリンに関する臨床試験・治験として、摂食不振患者や変形性股関節症による人工股関節置換術患者を対象とした臨床第 2 相試験が実施されている。一方、アスピオファーマ株式会社では、ヒトグレリンの製造、製剤化に成功し (Makino T et al. *Biopolymers.* 2005; 79: 238-47.)、グレリンの工業的生産法を確立し、さらに、グレリンの前臨床試験や健常人での安全性や作用を確認し、神経性食欲不振症、ならびにカヘキシアを対象とした臨床第 2 相試験を、日本、及び欧米で開始している。また、血液透析患者に投与した報告もあり、有効性、安全性が示されている。(Damien R. Ashby et al. *Kidney International* 2009; 76: 199-206)

C. 結果

1.1 目的

慢性腎臓病の進展阻止のための有効な治療方法を確立するため、新規消化管ペプチド「グレリン」を慢性腎臓病

患者に投与し、その有効性と安全性を確認すること。

1.2 対象

慶應義塾大学病院腎臓内分泌代謝内科外来通院加療中の慢性腎臓病ステージ G4 および G5 の患者 (eGFR<30ml/min/1.73m²) で、透析導入されていない者

1.2.1 選択基準

以下の条件を全て満たす患者を対象とする

1. 年齢 20 歳以上 (性別は問わない)
2. 慢性腎臓病ステージ G4 および G5 の患者 (eGFR<30ml/min/1.73m²) で、透析導入されていない当院外来患者 (慢性腎臓病の原因疾患は問わない)
3. BMI 25 未満
4. 研究の主旨を十分理解し、協力の同意を得たもの

1.2.2 除外基準

以下の条件に一つでも該当する場合は対象としない。

1. 重度の肝機能障害のある患者
2. 悪性新生物を有する患者
3. 重症感染症を有する者
4. 精神疾患を有する患者
5. 小麦、卵、牛乳アレルギーを有するもの
6. 妊婦または妊娠している可能性のある患者
7. その他主治医が不相当と判断した患者

1.3 試験デザイン

単群での対照を置かない薬剤投与による有効性と安全性の確認のための介入試験

試料 (グレリン) は (株) ペプチド研究所から購入する。また既に国立循環器病研究センター研究所ではグレリンの臨床研究を施行しており、本研究施行に際し指導及び助言を頂く。適格性が確認され、文書による同意取得が行われた研究協力者にグレリン 3 μg/kg 体重を生理食塩水に溶解したものを初期投与として入院の上 10 日間連日投与する。安全性を確認し、問題がなければ維持投与として外来で月に 1 回投与する。維持投与は 3 ヶ月間継続する。

1.4 試験薬、投与量

グレリン (純度 95% 以上、TFA 塩、GMP グレード)

グレリンを秤量し、3.75% マンニトール液に溶解し、グレリン注射液 (200 μg/2ml/バイアル) を作る。3 μg/kg 体重になるようにグレリン注射液 (200 μg/2ml/バイアル) 必要量を生理食塩水 20 ml に溶解し、シリンジポンプを用いて点滴投与する。

1.5 投与期間

初期投与：入院の上、10 日間連日朝食前と夕食前の 2 回シリンジポンプを用いて点滴静注する。

維持投与：外来で月に1回シリンジポンプを用いて点滴静注する。これを3ヶ月間継続する。

1.6 併用治療

試験期間中は医学的に必要と認められる他の薬剤は投与可能である。

1.7 主な検査・観察・評価項目および時期

	試験開始前	入院投薬時	外来受診時
身体計測	○	○	○
血液、尿検査	○	○	○
生理機能・画像検査	○		

1.8 主たる評価項目および評価指標 主要評価項目：3ヶ月後の eGFR の変化率

副次評価項目：

身体計測：体重、BMI、体脂肪量、腹囲、上腕三頭筋囲、上腕三頭筋皮下脂肪厚

腎機能：血清クレアチニン、血清シスタチン C、随時尿の尿中蛋白、随時尿の尿中 NAG、尿中 β 2M、尿中 α 1 ミクログロブリン、尿中クレアチニン

代謝マーカー：血糖、血清脂質、空腹

時インスリン、HOMA-IR

酸化ストレスマーカー：尿中 8-ヒドロキシ-2 デオキシグアノシン (9-OH₂ DG)、尿中 イソプロスタナン (15-Isoprostane F₂)、酸化 LDL

栄養状態：血清アルブミン、プレアルブミン、コリンエステラーゼ

グレリン投与による副作用（腸管運動亢進、腹部違和感、下痢、顔面紅潮、不眠）の発現率

1.9 計画研究協力者数

パイロット study としてグレリン投与群 10 名

1.10 試験実施期間

2012 年 12 月から 2013 年 6 月まで（登録期間 2012 年 12 月から 2013 年 2 月）

D. 考案

過去には透析患者における透析後の投与でのデータが報告されている。その一方で保存期腎不全でのグレリン投与の体内動態は明らかにされていない。したがって、投与量の調節が必要であった。

E. 結論

今回腎不全患者に対するグレリン投与のプロトコールを作製した。保存期腎不全におけるグレリンの代謝が明らかでないので投与の際は注意深い観察が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版
脇野 修, 藤村 慶子, 水口 斉, 長谷川 一宏, 林 晃一, 伊藤 裕	アンジオテンシン II に よる腎障害に対する Ghrelinの腎保護効果	日本内分 泌学会 雑誌	88巻2号	811	2012
脇野 修, 藤村 慶子, 水口 斉, 長谷川 一宏, 徳山 博文, 林 晃一, 伊藤 裕	アンジオテンシン II に よる腎障害に対する Ghrelinの腎保護効果	日本高血 圧学 会総 会 プ ロ グ ラ ム ・ 抄 録 集	35回	443	2012
藤村 慶子, 脇 野 修, 林 晃 一, 伊藤 裕	Ghrelinの腎への保護作 用	Anti-aging Science	3巻Supp l.1	330	2012
藤村 慶子, 脇 野 修, 林 晃 一, 伊藤 裕	アンジオテンシンIIによ る腎障害に対するGhrel inの腎保護効果	日本腎臓 学 会 誌	54巻3号	227	2012
脇野 修, 伊藤 裕	【心腎連関の病態と治療 の進歩-心臓と腎臓から みた循環器疾患】メタボ リックシンドロームに伴 う心腎連関の治療	カレント テ ラ ピー	30巻8号	804-810	2012
脇野 修, 伊藤 裕	【慢性腎臓病:最近の進 歩】慢性腎臓病と各種疾 患 肥満・メタボリック シンドローム	日本内科学 会 雑 誌	101巻5 号	1310-131 7	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷