

图4. SA- $\beta$  Gal staining

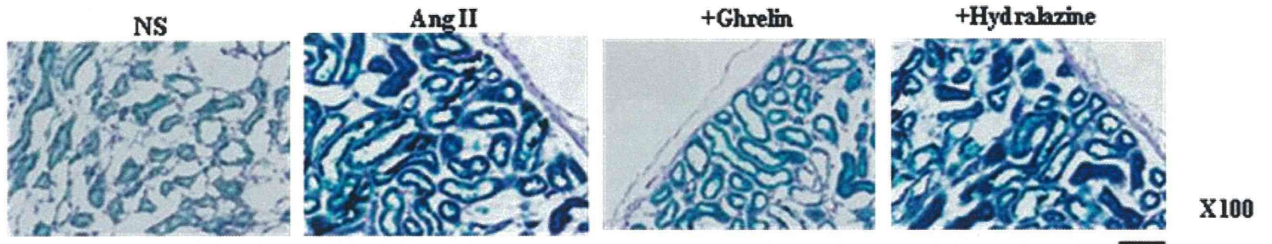


图5.

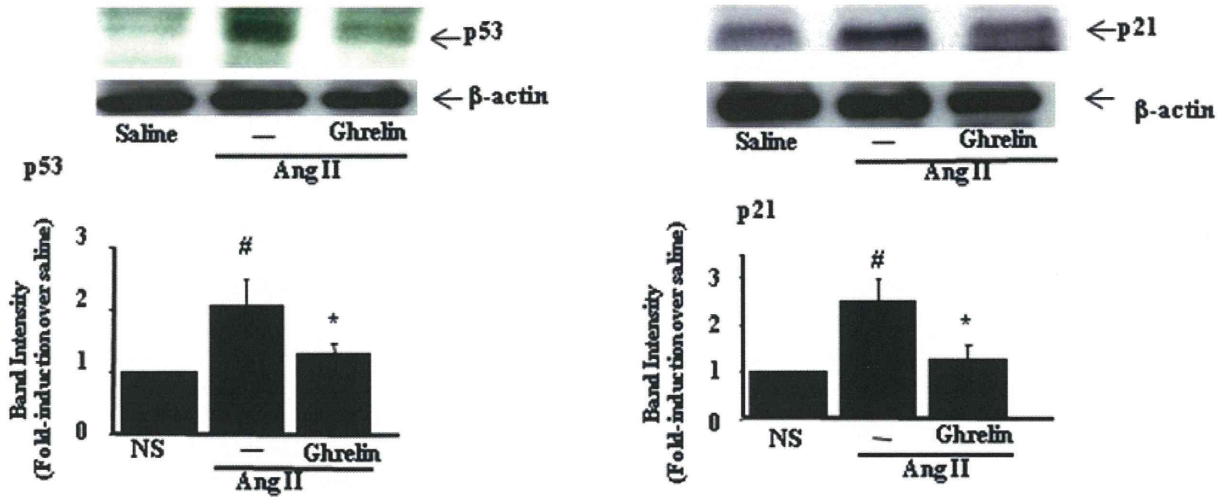


图6.

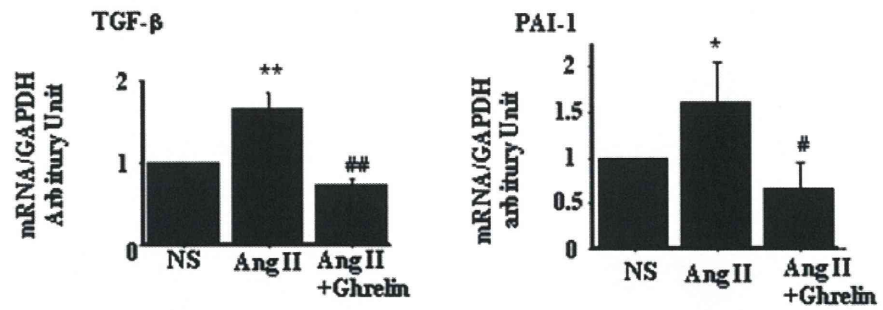


图7.

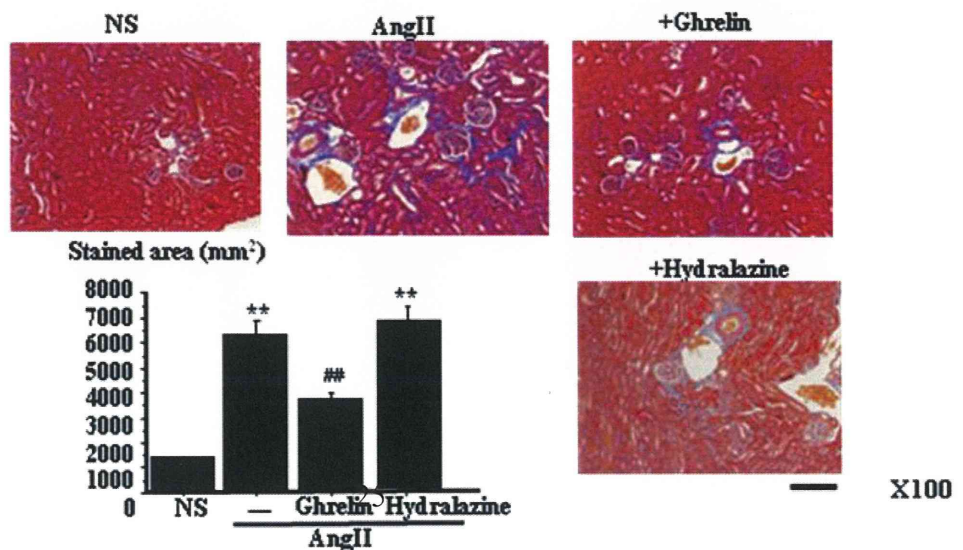
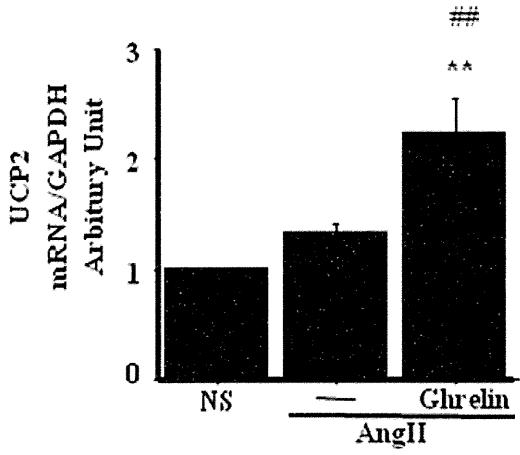
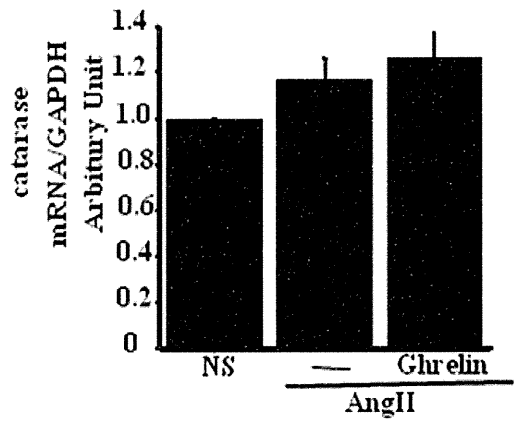


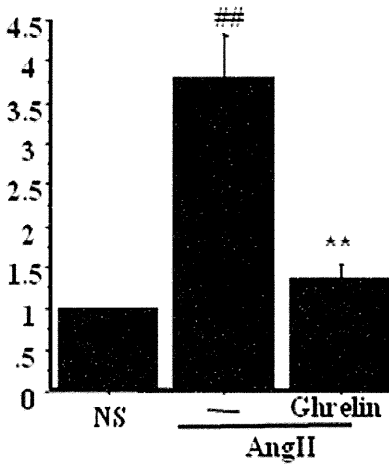
図8.  
UCP2



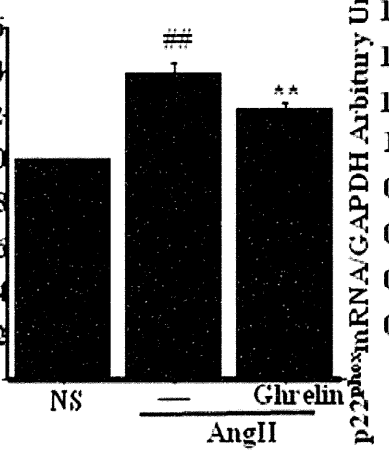
catalase



NOX1  
NOX1 mRNA/GAPDH Arbitrary Unit



NOX4  
NOX4 mRNA/GAPDH Arbitrary Unit



p22<sup>phox</sup>  
p22<sup>phox</sup> mRNA/GAPDH Arbitrary Unit

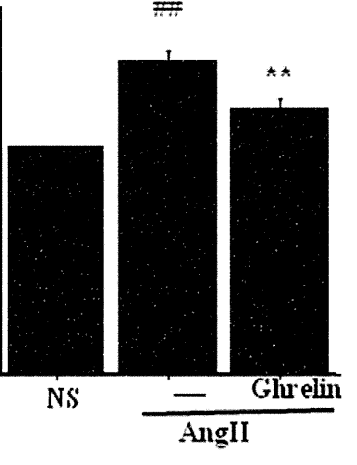
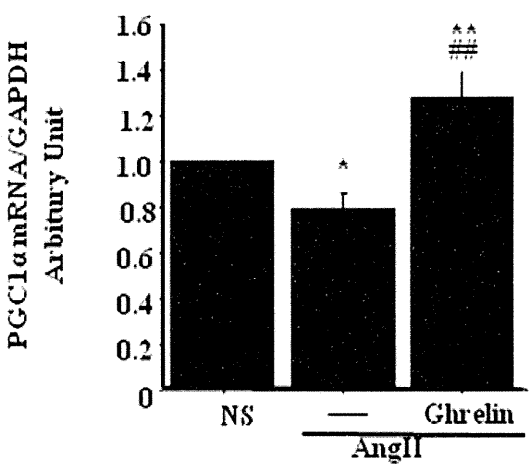
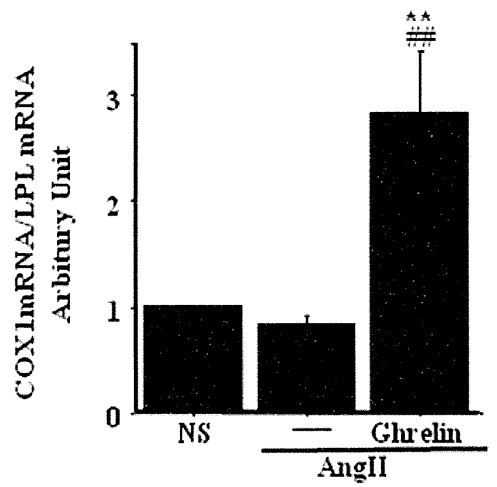
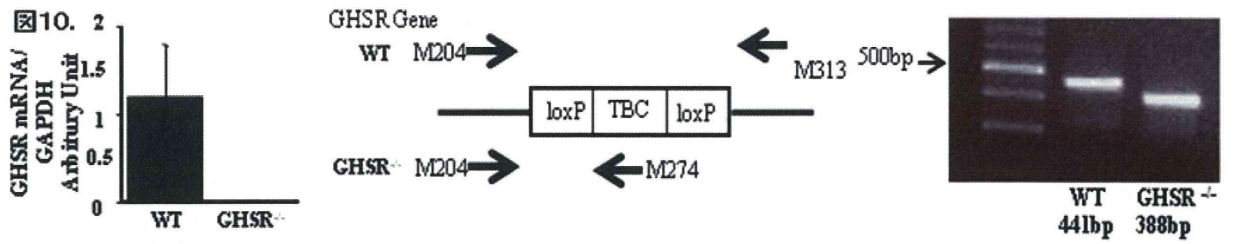


図9 PGC1α

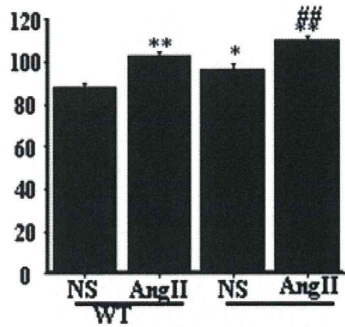


ミトコンドリア数

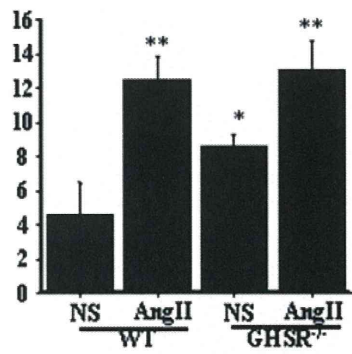




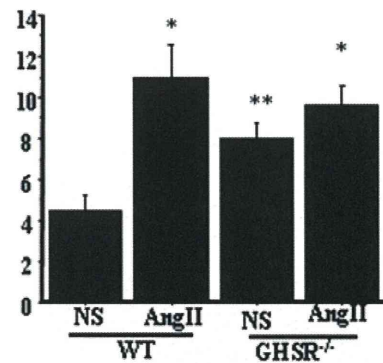
**图11. Blood Pressure (mmHg)**



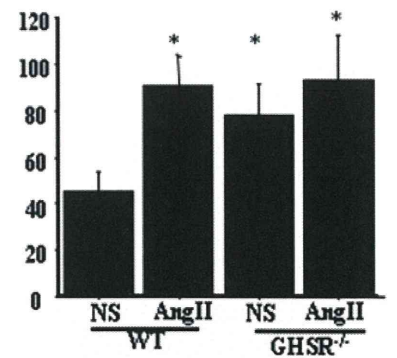
**图12. Urinary TP/Cr**



**Urinary NAGL/Cr**



**Urinary NAG/Cr**



**图13. 4HNE染色**

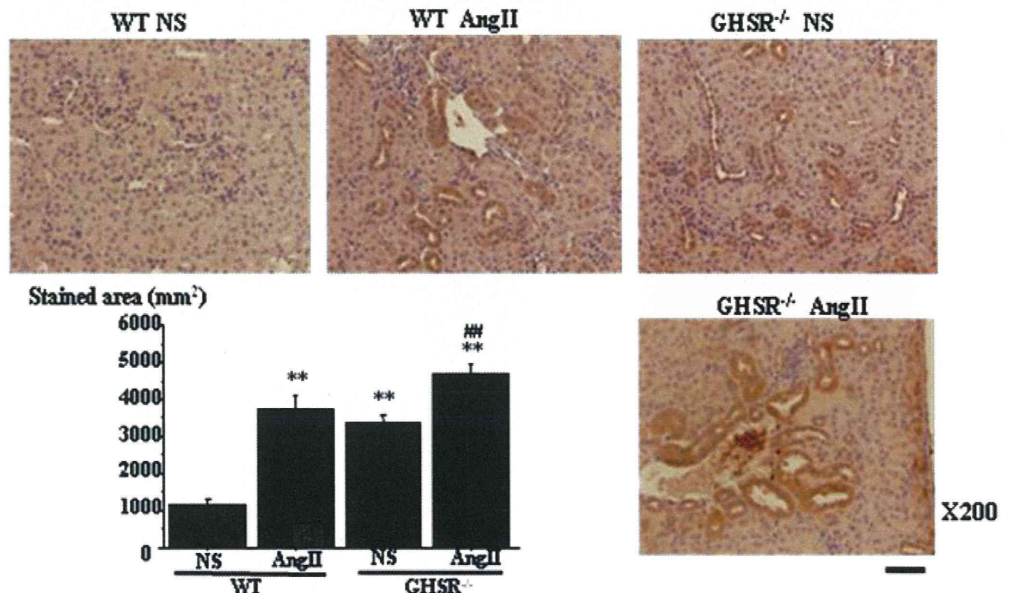
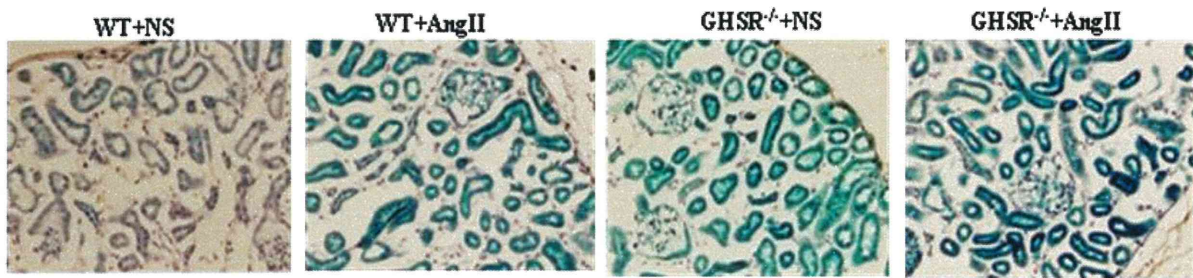
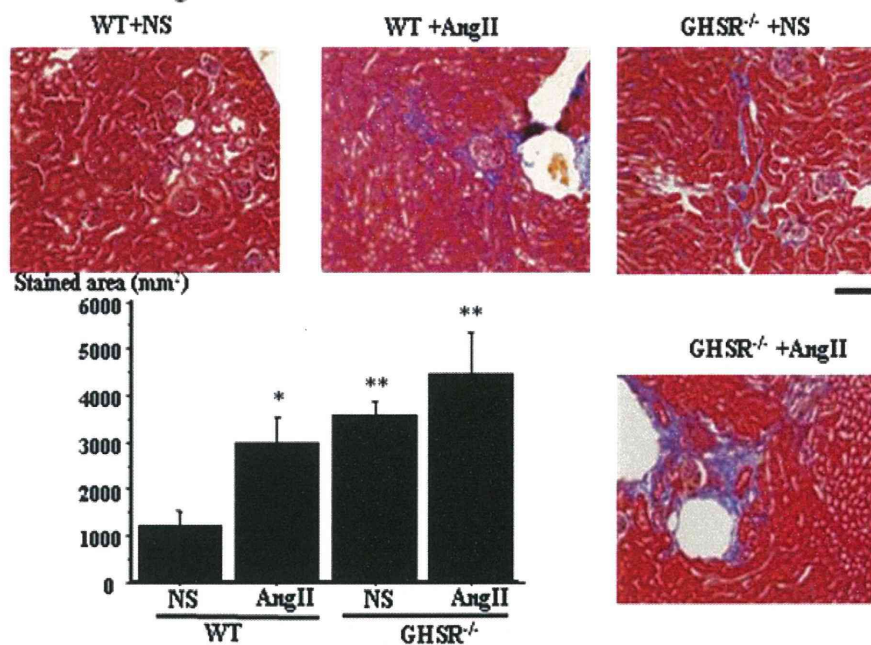


図14. SA-β Gal staining



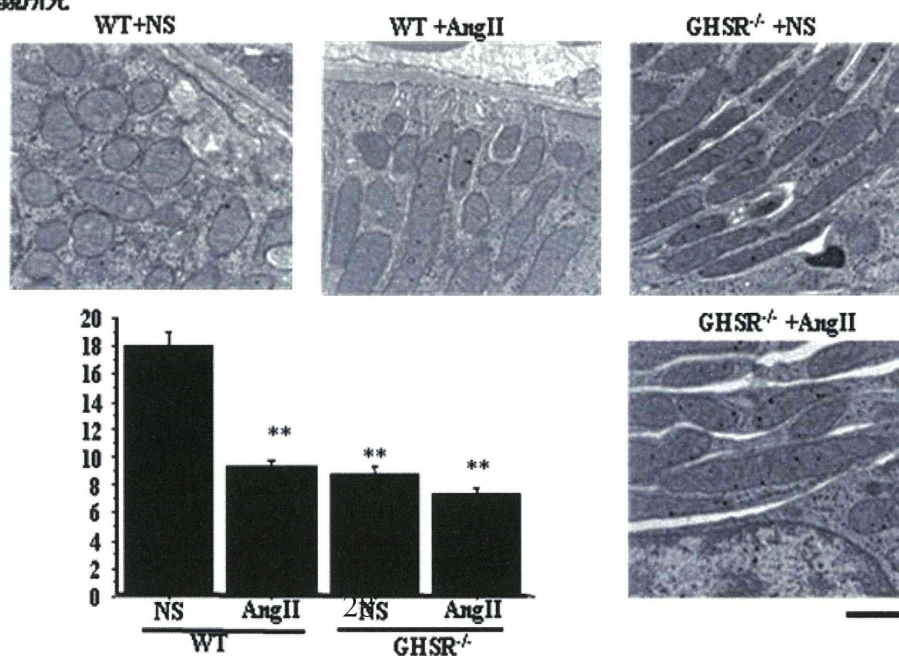
X200

図15. Masson Tricrome staining



X100

図16. 電子顕微鏡所見



X18400

図17. GHSR の免疫染色

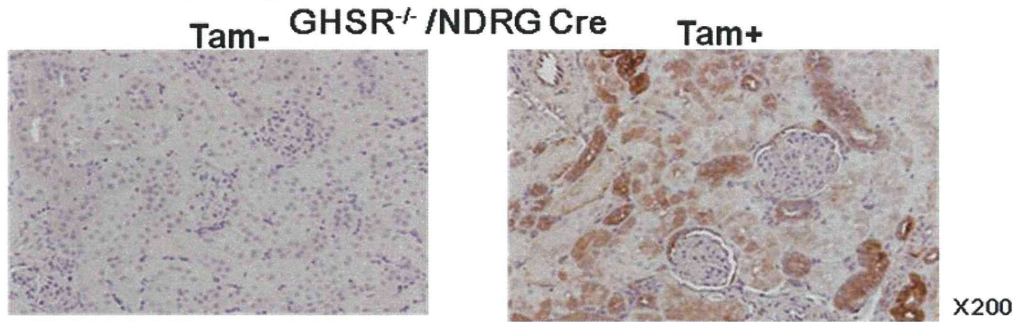


図18. 収縮期血圧

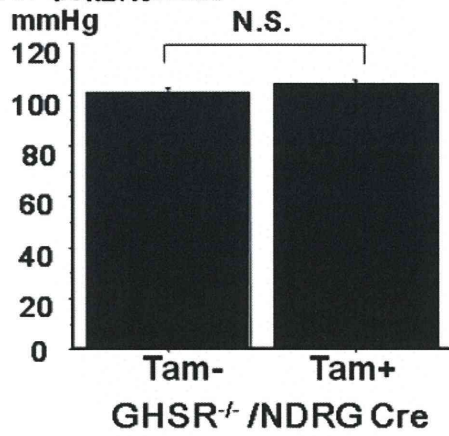


図19. 体重

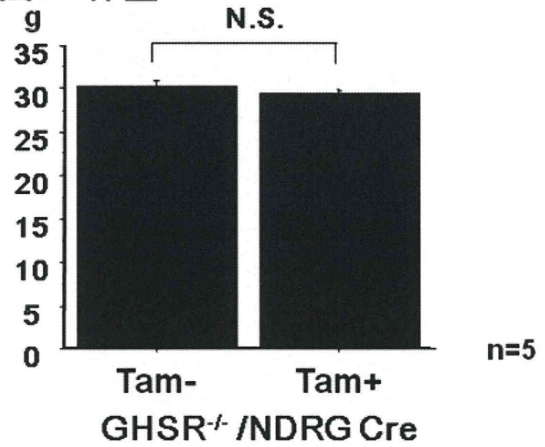


図20. 血清BUN

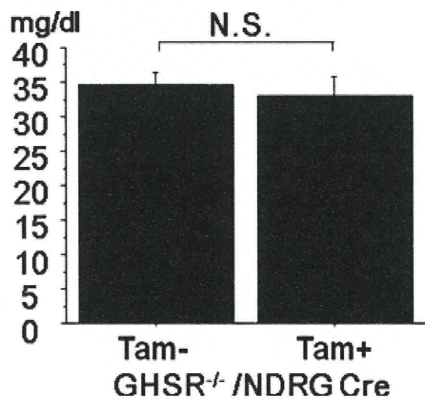


図21. 血清Cr

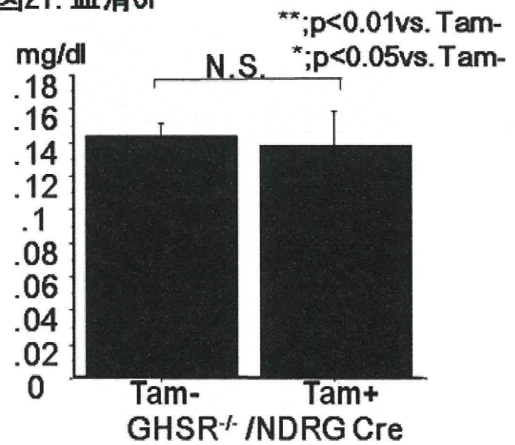


图22. 尿 TP/Cr

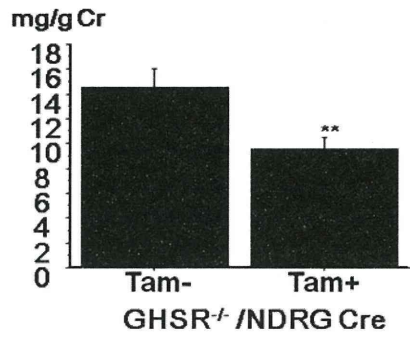


图23. 尿 NAG/Cr

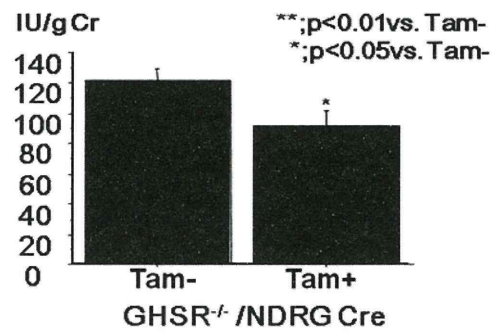


图24. 4HNE 染色

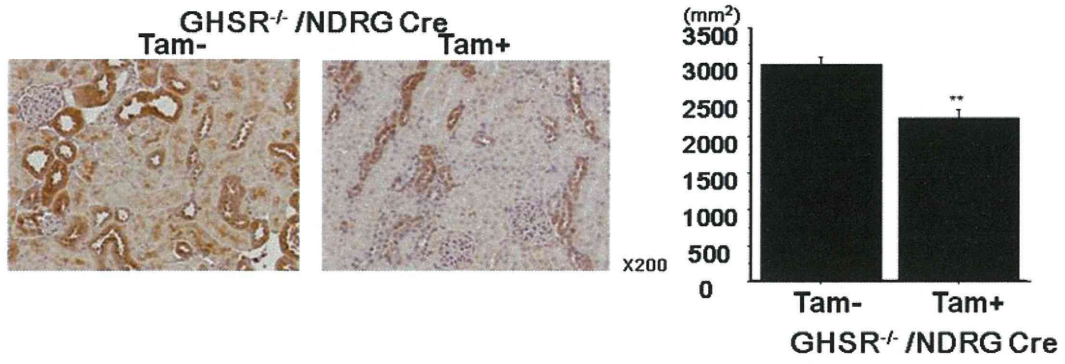
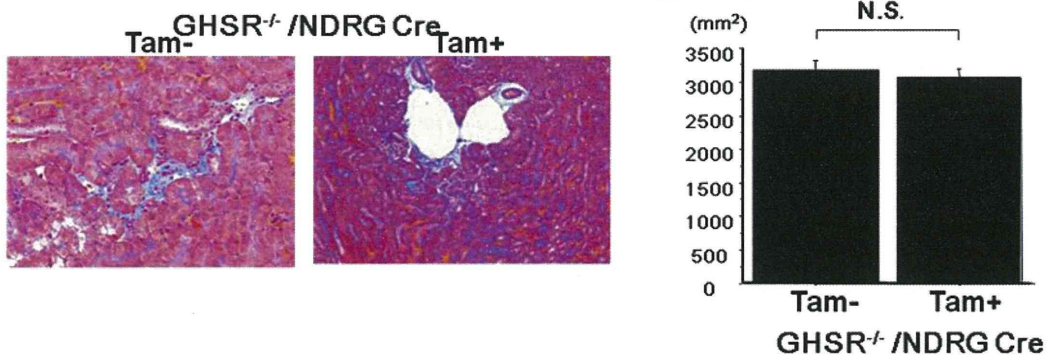


图25. Masson Tricrome 染色



GHSR<sup>-/-</sup>; GHSR-null mice

GHSR<sup>-/-</sup>/NDRG Cre; GHSR-null/NDRG Cre mice  
; p<0.01vs. Tam-

图24. 4HNE 染色

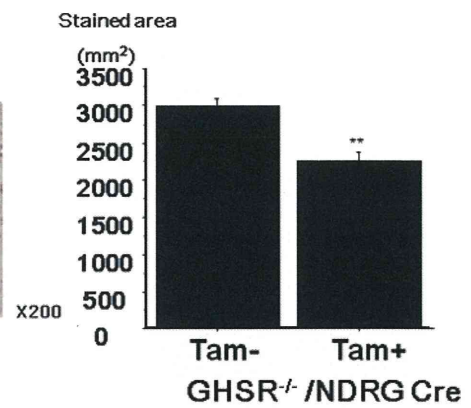
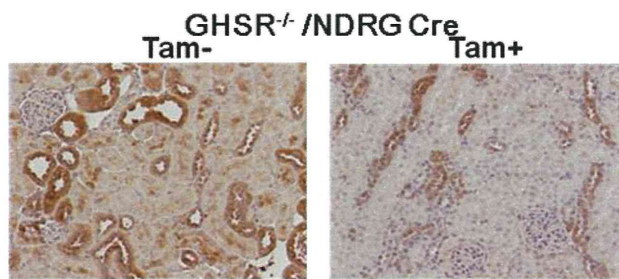
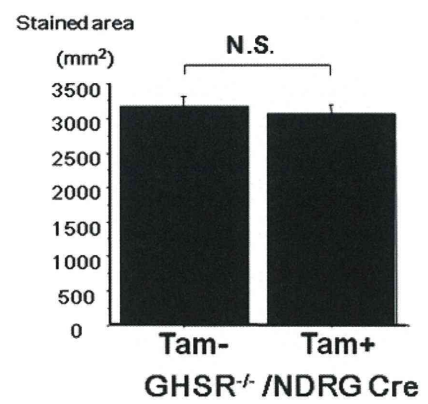
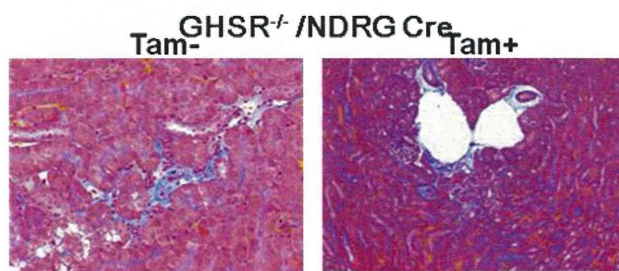


图25. Masson Tricrome 染色



\*\*; $p < 0.01$  vs. Tam-

分担研究報告書

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」

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耗状態である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

( $eGFR < 30 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ) 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 ( $eGFR < 30 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ) 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  $3 \mu\text{g/kg}$  体重を生理食塩水に溶解したものを入院の上 1 回投与し、安全性を確認する。

## 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（ $200 \mu\text{g}/2 \text{ ml}$ /バイアル）を作る。  
 $3 \mu\text{g/kg}$  体重になるようにグレリン注射液（ $200 \mu\text{g}/2 \text{ ml}$ /バイアル）必要量を生理食塩水 50 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

入院の上、1 回のみ朝食前にシリンジポンプを用いて 30 分かけて点滴静注する。

## 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。

亢進、腹部違和感、下痢、顔面紅潮、不眠)の発現率

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	○		

1.9 計画研究協力者数

パイロット study としてグレリン投与群 6 名

1.10 試験実施期間

2013 年 12 月から 2014 年 6 月まで(登録期間 2013 年 12 月から 2014 年 6 月)

1.8 主たる評価項目および評価指標

主要評価項目:グレリンの血中濃度の経時的変化

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 β2M、尿中 α1 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-OH<sub>2</sub> DG)、尿中 イソプロスタノール (15-Isoprostane F<sub>2</sub>)、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

D. 考案

過去には健常者と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かったが、今回保存期腎不全患者に投与したところ、有害事象は認められず、安全性が確認できた。保存期腎不全患者と透析患者に対する安全性が確認できたことから腎機能低下患者に対して投与が可能と考えられた。

E. 結論

今回腎不全患者に対しグレリン投与を行った。保存期腎不全患者における有害事象は確認されず、グレリンの安全性が確認された。

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（腎疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

グレリンの糖尿病性腎症に対する保護効果  
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 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、摂食増進作用に加え、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減少させるなどの作用があることがわかっている。これまで急性腎障害や老化のモデルマウスにおいて Ghr 投与により腎保護の作用があることが報告されてきた。今回我々は Ghr の慢性腎疾患への効果について、主にミトコンドリアを介した作用に注目し検討した。〈方法〉in vitro では腎近位尿細管細胞 HK-2 細胞へ Ghr を投与し、同時投与の効果を検討した。また in vivo では、2 型糖尿病のモデルマウスである db/db マウスに Ghr(100 $\mu$ g/kg/day)を 8 週間連日投与し、Ghr の腎保護効果を検討した。〈結果〉HK-2 細胞への Ghr 投与では、ミトコンドリアダイナミクスに関する代表的な因子である DRP1 および Mfn2 において、realtimePCR でも western blotting でも、有意差を認めなかった。db/db マウスでの Ghr 投与の検討では、Ghr 投与群において長期的な摂食量が変わらないが体重増加を認めたが、血清 BUN、Cr、尿タンパク、アルブミンなどの腎評価項目において有意差を認めなかった。腎組織での realtime PCR でもミトコンドリアダイナミクスの因子に有意差は認めなかった。[結論]今回の研究において Ghr 投与は腎臓において、2 型糖尿病のモデルマウスへの影響は認めなかったが、体重増加は認め、代謝への影響は示唆された。

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細胞の他、様々な

部位で発現している。

グレリン受容体は腎臓にも発現が認められている。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などの急性腎障害モデルマウスにおいて腎機能悪化を予防することが報告されている。また、我々はグレリン受容体ノックアウトマウスにおいて、腎近位尿細管細胞においてミトコンドリアが形状変化し、伸展していることを報告した。

一方、慢性腎障害を含めた慢性消耗性疾患

の患者が、体重減少および筋量減少を伴い、身体が衰弱化していく protein energy wasting(PEW)の状態となると、生命予後が悪いことが報告されている。PEW 患者への介入として摂食増進作用のあるグレリン期待されている。

我々は、グレリンの腎障害に対する効果について in vitro および in vivo で検討した

## B. 研究方法

in vivo(マウス)での検討では、レプチン受容体異常により 2 型糖尿病様の状態となる db/db マウスと、コントロールとしての BKS.Cg-m+/+ マウス(m/m マウス)を、7 週齢から 15 週齢にわたり、Ghr 群には Ghr を 100 $\mu$ g/kg/day を、生理食塩水群には同量の生理食塩水を連日腹腔注射し、4 群で糖尿病性腎症における Ghr の効果を検討した。さらに in vitro(ヒト尿細管細胞株)では、Ghr のミトコンドリアへの作用を Ghr 受容体の発現が証明されている尿細管の細胞株である Human kidney-2 細胞(HK-2 細胞)でも検討した。

## C. 研究結果

In vivo(マウス)のデータ

摂食量に関して、m/m マウスに比して、db/db マウスにおいて摂食量を増加させたが、Ghr 投与による長期的な摂食量増加は見られなかった。(図 1)

体重に関して、m/m マウスに比して、db/db マウスでは体重は増加した。m/m マウスにおいてはグレリン投与による体重変化は認めなかったが、db/db マウスではグレリン投与により体重増加を認めた。(図 2)

慢性腎障害抑制効果に関して、投与 8 週後

の尿タンパクは db/db マウスにおいて Ghr 投与による変化は認めなかった。尿アルブミンは m/m マウスに比して db/db マウスで増加したが、Ghr 投与による変化は認めなかった。また、血清 BUN、Cr には 4 群で差を認めなかった。(図 3)

腎組織での realtimePCR では、ミトコンドリアダイナミクスの因子である DRP1、Mfn2 の発現に有意差は認めなかった。(図 4)

in vitro(ヒト尿細管細胞株)のデータ

ミトコンドリアダイナミクスに関する代表的な因子である DRP1 および Mfn2 において、realtimePCR でも western blotting でも、有意差を認めなかった。(図 5)

## D. 考案

2 型糖尿病モデルマウスに Ghr を長期投与し、体重は増加したが、腎機能に差は見られなかった。また、ミトコンドリアダイナミクスに関わる因子にも有意差は認めなかった。体重増加に関しては、db/db マウスのみで認められており、Ghr の作用に拮抗するレプチンの作用が阻害されたモデルであるため、表現型として顕在化したと考えられる。しかし、Ghr 投与により摂食量増加は認めておらず、Ghr の投与によりエネルギー消費減少による体重増加が示唆された。Ghr は飢餓時に分泌亢進するホルモンであり、エネルギー貯蓄の方向へ働くのは現象として矛盾しないと考える。また、腎機能に差は認められなかったが、Ghr 投与により体重増加を認めた分、腎保護効果が相殺された可能性もある。今後は体重減少を伴うような慢性腎障害のモデル動物で Ghr 投与の効果があるか検討する必要があると考える。

また、2型糖尿病モデルマウスでも HK-2 細胞でも、ミトコンドリアダイナミクスに関する因子に変化は見られなかった。in vitro においては、平常時には Ghr 作用は弱く、何らかの侵襲的な刺激への暴露があった際に、Ghr の作用が顕在化してくる可能性がある。また、心筋細胞や肝細胞、腎足突起細胞では、高血糖時にミトコンドリアが分裂、断片化する傾向にあるのに対し、老化した細胞や腎尿細管細胞ではミトコンドリアが拡大する傾向があることが報告されている。In vitro において、realtimePCR や western blotting による解析では腎組織全体での傾向しか捉えられないため、組織切片の観察など直接的な評価が必要であると考ええる。

#### E. 結論

今回の研究において Ghr 投与は腎臓において、2 型糖尿病のモデルマウスへの影響は認めなかったが、体重増加は認め、代謝へ

の影響は示唆された。慢性腎障害患者に対する Ghr 投与の効果を確認なものにするため、体重減少を伴う腎疾患モデルへの Ghr 投与での検討を今後進めていく予定である。

#### 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

## 食事摂取量

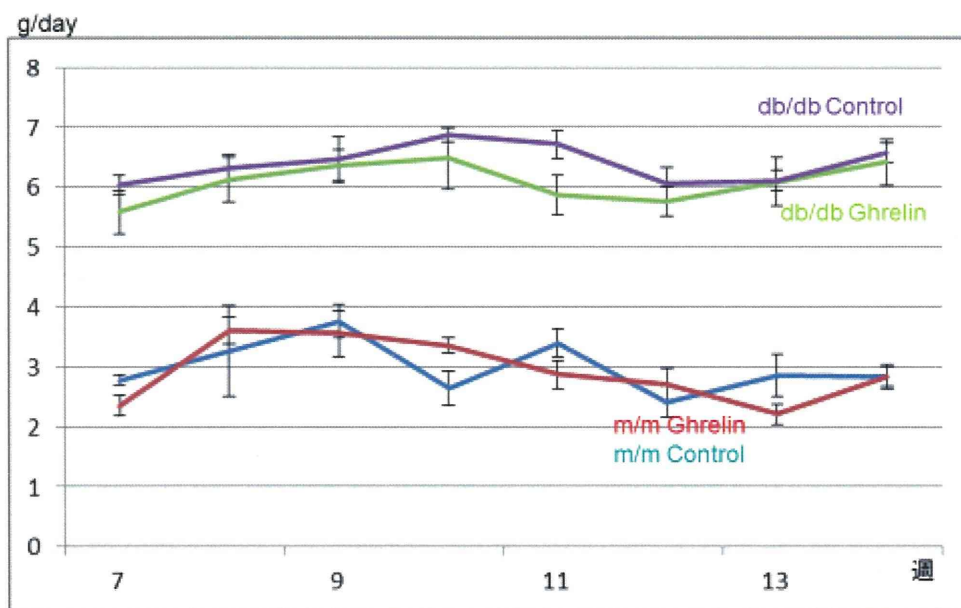


図 2

## 体重

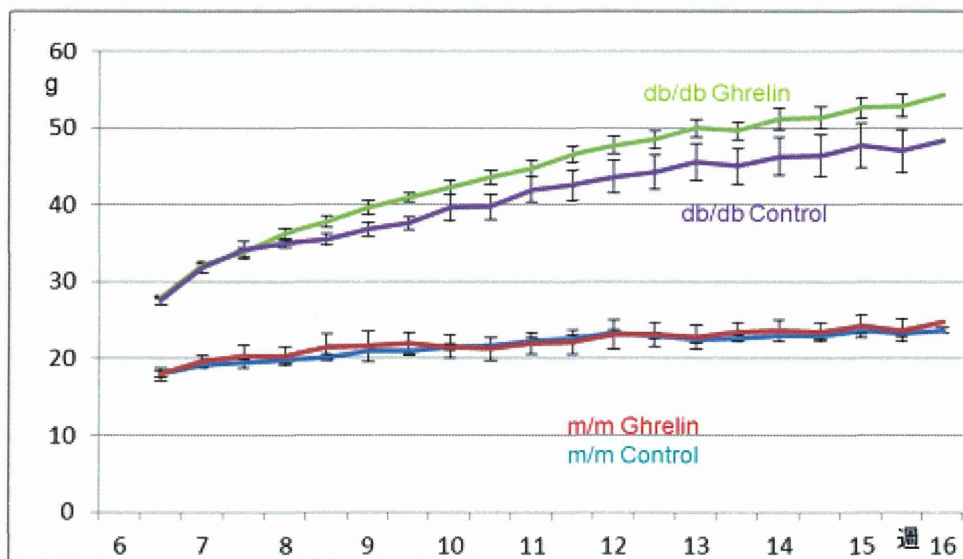
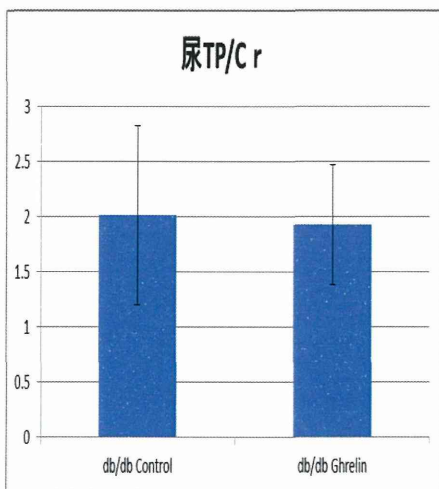
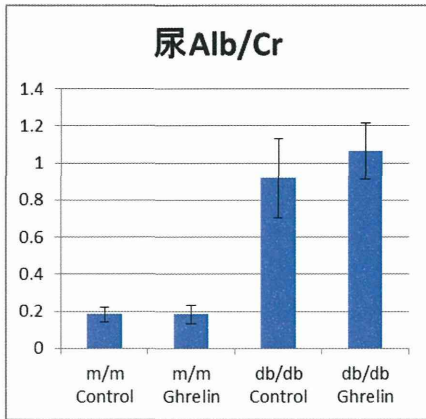


図 3







\* \* P<0.1 vs m/m Control

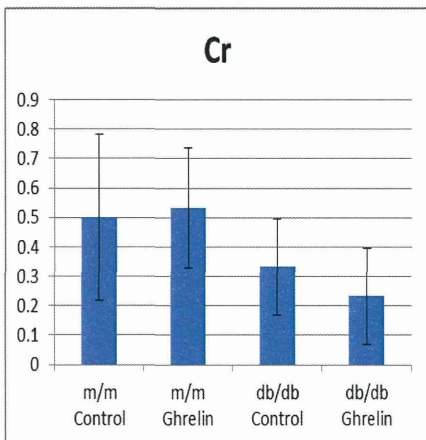
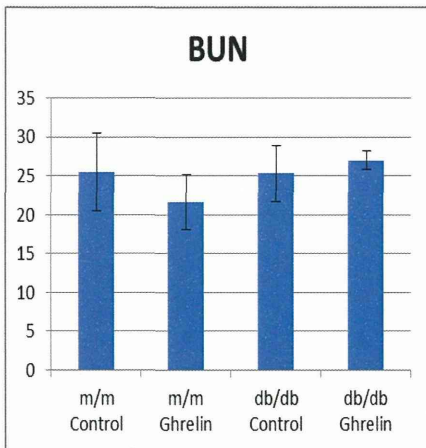


図 4

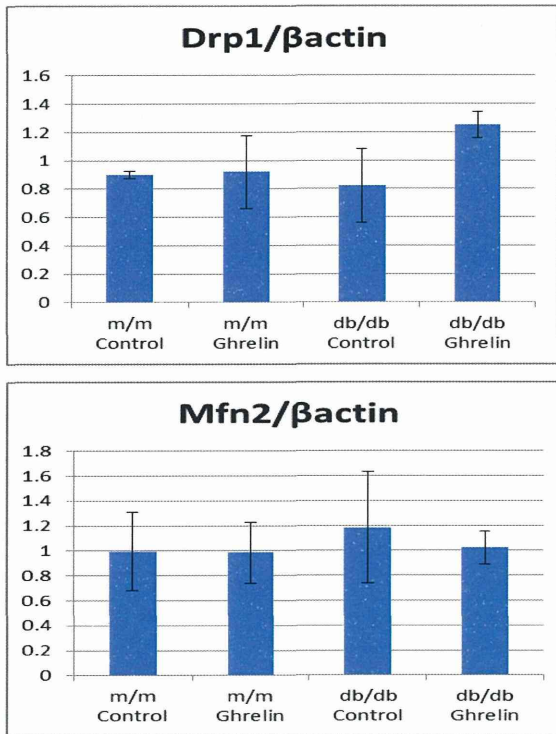


図 5

C: Control

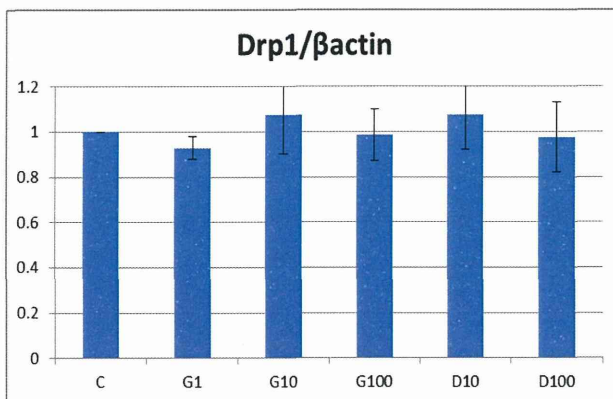
G1 : Ghrelin 1nM 投与

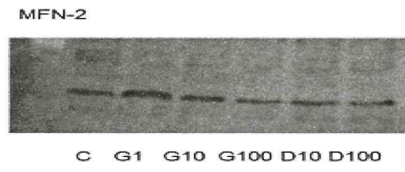
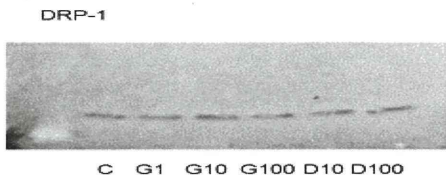
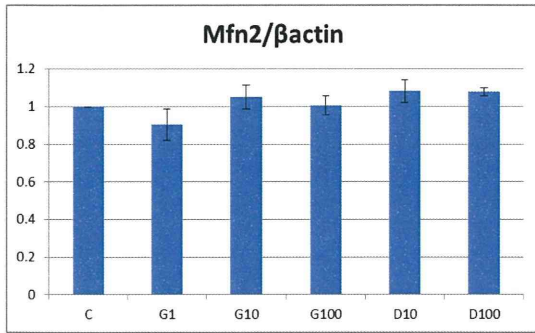
G10 : Ghrelin 10nM 投与

G100 : Ghrelin 100nM 投与

D10 : Desacyl Ghrelin 10nM 投与

D100 : Desacyl Ghrelin 100nM 投与





### III.研究成果の刊行に関する一覧表