

- M.A., and Bloom, S.R. (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5992
82. Zhang, W., Lin, T.R., Hu, Y., Fan, Y., Zhao, L., Stuenkel, E.L., and Mulholland, M.W. (2004) Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J. Physiol.* **559**, 729–737
 83. Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001) Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* **50**, 2438–2443
 84. Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosoda, K., Kojima, M., Kangawa, K., and Nakao, K. (2001) Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* **50**, 227–232
 85. Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillon, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri, S., Stanley, S.A., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2001) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* **50**, 2540–2547
 86. Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P., Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., and Horvath, T.L. (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**, 649–661
 87. Flier, J.S. (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* **116**, 337–350
 88. Masuda, Y., Tanaka, T., Inomata, N., Ohnuma, N., Tanaka, S., Itoh, Z., Hosoda, H., Kojima, M., and Kangawa, K. (2000) Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 905–908
 89. Nagaya, N., Kojima, M., Uematsu, M., Yamagishi, M., Hosoda, H., Oya, H., Hayashi, Y., and Kangawa, K. (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**, R1483–R1487
 90. Nagaya, N., Miyatake, K., Uematsu, M., Oya, H., Shimizu, W., Hosoda, H., Kojima, M., Nakanishi, N., Mori, H., and Kangawa, K. (2001) Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5854–5859
 91. Lin, Y., Matsumura, K., Fukuhara, M., Kagiya, S., Fujii, K., and Iida, M. (2004) Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in rats. *Hypertension* **43**, 977–982
 92. Matsumura, K., Tsuchihashi, T., Fujii, K., Abe, I., and Iida, M. (2002) Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. *Hypertension* **40**, 694–699
 93. Adeghate, E. and Ponery, A.S. (2002) Ghrelin stimulates insulin secretion from the pancreas of normal and diabetic rats. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 555–560
 94. Lee, H.M., Wang, G., Englander, E.W., Kojima, M., and Greeley, G.H. Jr. (2002) Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* **143**, 185–190
 95. Reimer, M.K., Pacini, G., and Ahren, B. (2003) Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* **144**, 916–921
 96. Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J., Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2001) Ghrelin, a natural Gh secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5083–5086
 97. Dezaki, K., Sone, H., Koizumi, M., Nakata, M., Kakei, M., Nagai, H., Hosoda, H., Kangawa, K., and Yada, T. (2006) Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes* **55**, 3486–3493
 98. Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fougelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J., and Kahn, B.B. (2004) Amp-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428**, 569–574
 99. Shuto, Y., Shibasaki, T., Otagiri, A., Kuriyama, H., Ohata, H., Tamura, H., Kamegai, J., Sugihara, H., Oikawa, S., and Wakabayashi, I. (2002) Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J. Clin. Invest.* **109**, 1429–1436
 100. Barazzoni, R., Bosutti, A., Stebel, M., Cattin, M.R., Roder, E., Visintin, L., Cattin, L., Biolo, G., Zanetti, M., and Guarneri, G. (2005) Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **288**, E228–E235
 101. Nagaya, N. and Kangawa, K. (2003) Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr. Opin. Pharmacol.* **3**, 146–151
 102. Date, Y., Nakazato, M., Murakami, N., Kojima, M., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001) Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 904–907
 103. Fukushima, N., Hanada, R., Teranishi, H., Fukue, Y., Tachibana, T., Ishikawa, H., Takeda, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kangawa, K., Nagata, K., and Kojima, M. (2005) Ghrelin directly regulates bone formation. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 790–798

● 成因と病態: 遺伝子・病態・標的分子の面から

病因・病態解明のためのグレリンの基礎知識

* 久留米大学 分子生命科学研究所 ** 同 教授

佐藤 貴弘* 大楠 英子* 三浦 芳樹*
児島 将康**

要旨

グレリン (GHRL) は胃から分泌されるホルモンで、成長ホルモン放出、摂食亢進、脂肪蓄積、インスリン分泌調節、血圧低下など、多彩な作用を持つ。これら生理作用の多くはメタボリックシンドロームの発症や進展にかかわるものであり、特徴的な構造を有する GHRL の生化学的あるいは生理学的知識に基づいて、病因・病態の理解につなげることが重要である。本稿では、臨床研究に携わる際に必要な GHRL の基礎的な知識を述べる。

グレリン (GHRL) 発見の歴史

重要な創薬ターゲットである G タンパク共役型受容体 (GPCR) は、細胞間シグナル伝達や細胞増殖・分化などの生命現象に幅広く関与し、イオンからタンパクまで種々のリガンドに対する受容体となっている。GPCR は 7 回膜貫通型の受容体で、ヒトの遺伝子全体の数 % を占め、4 番目に大きなタンパクファミリーを形成している。GPCR のうち、リガンドが不明なものを、オーファン GPCR と呼ぶ。約 300 種類存在すると言われるオーファン GPCR の内因性リガンドは、新たな生体情報系の解明や創薬開発の切り口となる可能性があること

キーワード: グレリン, グレリン受容体,

グレリン-O-アシルトランスフェラーゼ

から、1990年代を中心に積極的な探索が進められた。

一方で、1976年に、オピオイドペプチドのあるものが、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）とは異なる受容体を介して弱い成長ホルモン（GH）分泌活性を示すことが報告された¹⁾。GHRHのシグナルはサイクリックアデノシン 3', 5'-リン酸（cAMP）を介するのに対し、この受容体のセカンドメッセンジャーは Ca^{2+} であった。その後、1996年には、発現クローニング法によってこの受容体の1次構造が明らかにされ、GH分泌促進物質受容体（GHSR）と呼ばれるようになった²⁾。この受容体は典型的なGPCRであったことから、存在が疑問視されていたGHSRの内因性リガンド探索が世界中で進められた。そしてついに、1999年、国立循環器病センターの児島（筆者の一人）と寒川らによって、ラットとヒトの胃からGHSRを活性化する内在性ペプチドとして、GHRLが発見された³⁾。

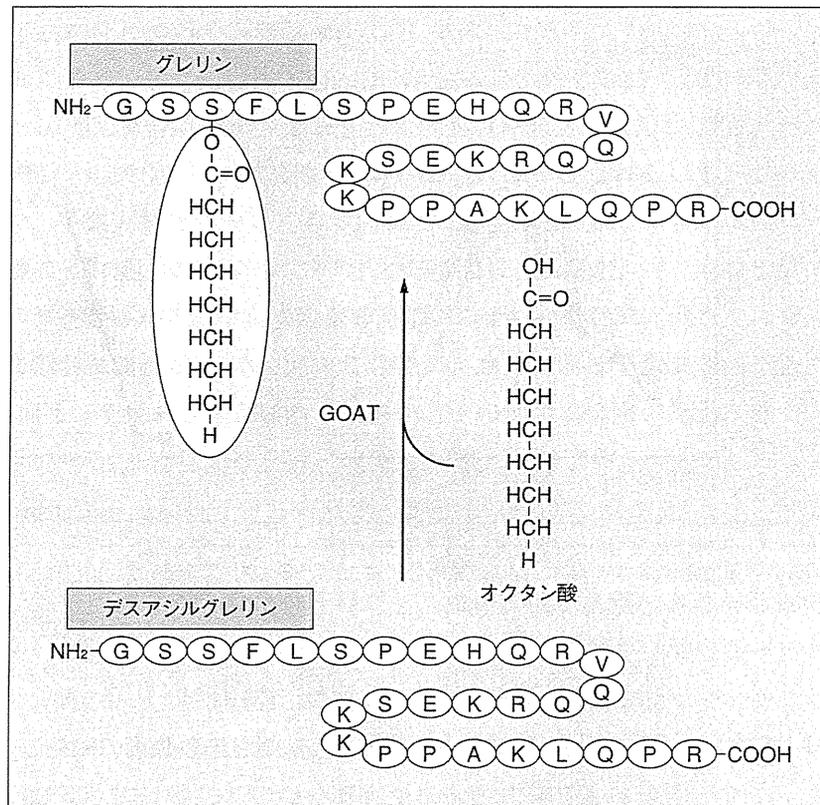
グレリン（GHRL）とその関連物質

1. GHRL

ヒトのGHRL遺伝子は、第3染色体の3p25-26に存在する。ヒトのGHRL遺伝子は5つのエクソンから成り、28アミノ酸から成るGHRLは第2および第3エクソンにコードされている。GHRLは、N末端から3番目のセリン残基の側鎖が炭素原子数8個の脂肪酸であるオクタン酸によってエステル化されるという特徴を持っているが（図1）、このような脂肪酸修飾を受けている生理活性ペプチドの存在は、ほ乳類においてGHRL以外知られていない。また、ほ乳類のGHRL前駆体のアミノ酸配列は非常に良く保存されている。GHRLは、多くのほ乳類を始め、鳥類、魚類、両生類で同定されており、いずれも3番目のセリンまたはスレオニン残基に脂肪酸が付加されている⁴⁾。なお、ヒトGHRLの分子量は3,370.9である。

一方、脂肪酸が付加されていないGHRL分子はデスアシルグレリンと呼ばれる（以後、“GHRL”とはオクタン酸で修飾されたGHRLを指す）（図1）。デスアシルグレリンは、GHSRへ結合することはなく、かつ主要なGHRLの機能であるGH分泌促進活性を持たない。このため、デスアシルグレリンには中枢性の摂食亢進作用があるとい

図1 グレリン (GHRL) の構造模式図



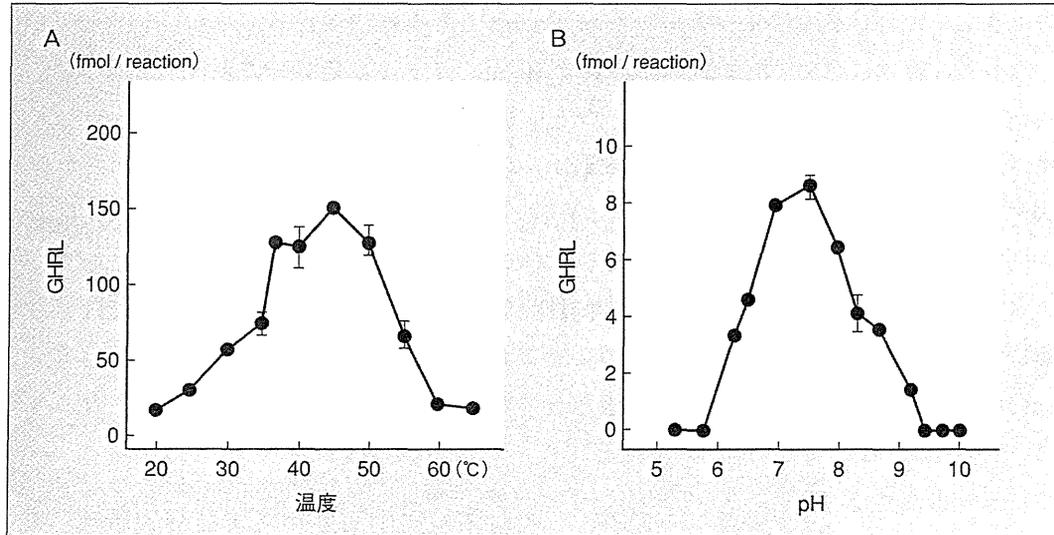
上段は、*n*-オクタノイル基で修飾を受けた、GH 放出活性を持つグレリン。オクタン酸修飾基を丸で囲んである。下段は GH 放出活性を持たないデスアシルグレリン。グレリン-*O*-アシルトランスフェラーゼ (GOAT) により、デスアシルグレリンにオクタン酸が付加される。アミノ酸は一文字表記してある。

GH: 成長ホルモン

う報告もあるが⁵⁾、これは GPCR を介さない機構で働いている可能性があり、さまざまな検討が必要だと考えられる。

2. グレリン-*O*-アシルトランスフェラーゼ (GOAT)

GHRL の活性発現には脂肪酸修飾が必須であることから、脂肪酸を付加する酵素の探索が積極的に進められ、2008 年、GOAT として同定された⁶⁾。この酵素の発見は、ポーキュパイン (porcupine) というアシル基転移酵素の発見が引き金となっている。ポーキュパインは、胚発生やがんに関与する Wnt に脂肪酸修飾を行う酵素である。この発見を機に、データベース上から膜結合型-*O*-アシル基転移酵素ファミリーの構造的特徴を持つタンパクを解析して 16 個の候補分子に

図2 グレリン-O-アシルトランスフェラーゼ (GOAT) の反応至適条件 (文献⁷⁾より引用改変)

GOAT の至適温度は 37~50°C (A), 至適 pH は pH7~8 (B) である.

GHRL: グレリン

絞り, その中から, 実際, GHRL に *n*-オクタン酸を結合できる酵素として GOAT が発見された. この酵素の局在は, GHRL を分泌する細胞と非常に良い一致をしている. また, この酵素反応の至適温度は 37~50°C, 至適 pH は pH7~8 と報告されている (図 2)⁷⁾.

3. GHRL 受容体

ヒトの GHRL 受容体遺伝子は, GHRL と同じ第 3 染色体の 3q26-27 に存在する. ヒトの GHRL 受容体遺伝子は 2 つのエクソンから成り, 第 1 エクソンに第 1~5 までの膜貫通領域が, 第 2 エクソンに第 6~7 までの膜貫通領域が存在する. GHRL 受容体遺伝子からは, 選択的スプライシング反応によって GHS-R1a と GHS-R1b という 2 つのメッセンジャー RNA (mRNA) が生じる. このうち, GHS-R1a は 7 回膜貫通型の GPCR で GHRL 受容体として機能するが, GHS-R1b は第 1 エクソンのみから成るために GHRL 受容体としては機能しない. GHRL 受容体は, 消化管運動促進作用を持つペプチドのモチリン (motilin) 受容体と 52% のアミノ酸配列の相同性を有している. GHRL 受容体には 3 量体 Gq タンパクが共役しており, ホスフォリパーゼの活性化とイノシトール三リン酸の産生を介して小

胞体からの Ca^{2+} 放出を促進し、GHRL のシグナルが伝達される。

4. オベスタチン (obestatin)

スタンフォード大学の Hsueh 博士らのグループは、2005 年、Science 誌にオベスタチンというペプチドホルモンを報告した⁸⁾。オベスタチンは、GHRL 前駆体から切り出されて産生されるにもかかわらず、摂食抑制という GHRL とは逆の生理作用を示すと言う。発見当初こそ新規の摂食抑制ペプチドとして注目されたが、さまざまなグループが行った実験で再現性が確認できなかったために、現在ではその報告が疑問視されている⁹⁾。このため、オベスタチン酵素免疫測定法 (EIA) キットも市販されているが、その利用は慎重に検討されるべきである。

グレリン (GHRL) の分布と血中濃度、および分泌調節

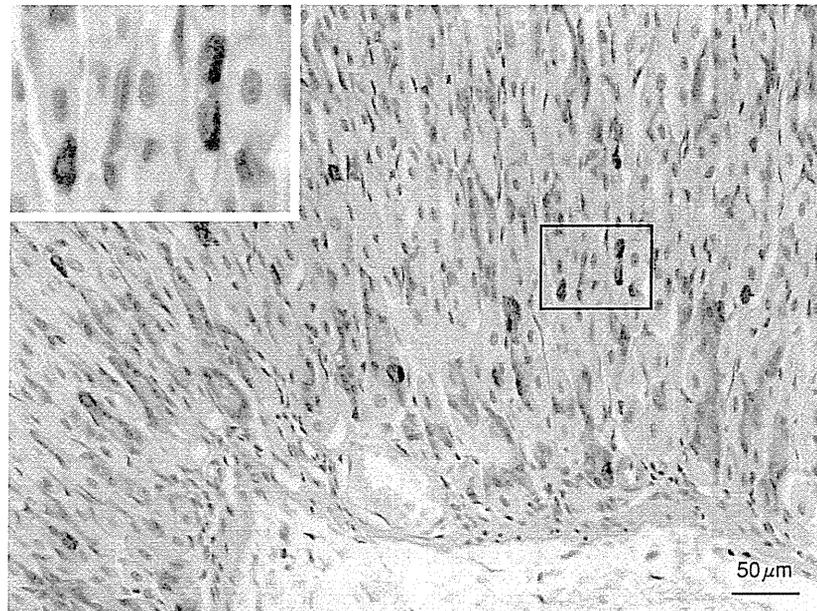
GHRL の主たる産生部位は胃で、特に、酸分泌腺のある胃体部に多い (図3)。これは、ヒトやラットなどのほ乳類だけではなく、非ほ乳類のいずれの種属においても同様である。複胃を持つウシやヒツジなどの反芻動物では、腺胃で GHRL が産生される。胃の GHRL 細胞は管腔には接していない閉鎖型内分泌細胞で、ほぼ均一なサイズ (直径 120 nm) の電子密度の高い分泌顆粒を多く含む¹⁰⁾。ラットでは胃粘膜細胞の約 2% が内分泌細胞で、このうちの約 20~25% が GHRL 細胞であり、これはヒスタミンを分泌する腸クロム親和性細胞様細胞 (ECL cells) に次ぐ規模である。

このほかに GHRL は、非常に低濃度ながら、十二指腸、小腸、膵臓、視床下部、胎盤、腎臓などにも存在する。このうち、中枢の GHRL 産生ニューロンは弓状核外側部に存在し、神経線維は正中隆起や視床下部のほかの核に投射している。

胃から分泌された GHRL はホルモンとして血液中を循環し、標的組織へ作用する。ヒト血漿中の GHRL 濃度は 10~20 fmol/ml、GHRL とデスアシルグレリンを合わせた総 GHRL 量は 100~150 fmol/ml である。このように、GHRL 濃度はデスアシルグレリン濃度の 10 分の 1 程度である。

GHRL の分泌は低エネルギー状態で亢進するが、どのような機構

図3 ラットの胃におけるグレリン (GHRL) 細胞の分布



GHRL 細胞（茶褐色）は，酸分泌腺のある胃体部に多く，散在して存在する．管腔には接していない閉鎖型内分泌細胞で，卵形，球形，ないし細長い楕円形を呈する（左上）．

で調節されているのかは，今なお不明な点も多い．飲水によって胃を拡張させても血中 GHRL 濃度は変化しないことから，胃の伸展刺激では GHRL の分泌は変化しない．一方，血漿中の GHRL 濃度は，グルコース投与によって低下し，空腹時に上昇するが食事を摂取すると減少することから，GHRL 分泌の調節に血漿中のグルコース濃度が重要であると考えられている¹¹⁾¹²⁾．また，GHRL が生理活性を持つためには GOAT による脂肪酸修飾が必須であることから，一般的なペプチドホルモンにみられる，合成，貯蔵，放出といった分泌過程だけではなく，GOAT の動態にも留意しなければならない．

グレリン (GHRL) の生理機能と病態

メタボリックシンドロームは，過剰なエネルギーが内臓脂肪として蓄積することから開始される．エネルギー代謝は，摂食や糖脂質代謝の調節により制御されているが，GHRL はこのいずれにも関与している．また，メタボリックシンドロームの危険因子の1つであるⅡ型糖尿病にも GHRL が寄与しており，動物実験を中心に検証が進んで

いる。ここでは GHRL の主要な生理機能を示し、病態とのかかわりについても述べる。

1. GH 分泌促進作用

GHRL は、*in vitro* および *in vivo* で強力な GH 分泌促進活性を示す⁹⁾。GHRL を健常者の静脈に投与すると 15～20 分で最高値の GH 放出が起き、血中 GH レベルの増加は 60 分以上も持続する。さらに、単独では GH 分泌を刺激しない用量の GHRL も、GHRH と共投与することで極めて強い GH 放出刺激作用を示す。このように GHRL は、単独で GH 細胞からの GH 分泌を強力に誘導するとともに、GHRH との相乗作用によって GH 分泌を刺激する。GHRL を高濃度で投与するとプロラクチン (PRL) に対する分泌刺激作用もみられる。下垂体前葉には GH と PRL を同一細胞内に持つマンモソマトトロフ (mammosomatotrophs) という細胞が存在しているため、GHRL 刺激による PRL 放出はこの細胞によるものであろうと考えられる。

このように、GH 細胞機能に対する GHRL の主な作用は、GH 放出を促すものであり、GHRL が GH 遺伝子発現や GH 細胞の発生・分化へ関与する可能性は小さいと考えられている。

2. 摂食調節作用

GHRL を、ラットやマウスに中枢および末梢投与すると、摂食亢進と体重増加作用を示す。GHRL による摂食亢進は、GH 分泌促進作用とは関連していない。これまで知られている、ニューロペプチド Y (NPY) やアグーチ関連タンパク (AgRP) などの摂食亢進物質は、中枢投与でのみ効果を示す。一方、GHRL は、脳室内投与のほか、静脈内や腹腔内投与でも摂食亢進作用を示し、唯一の末梢性空腹信号として摂食調節を行う。視床下部は摂食調節に関与する中枢で、多くの情報が統合され、エネルギー代謝が制御されている。脳室内に投与された GHRL は、GHRL 受容体を持つ NPY / AgRP ニューロンを活性化して両ペプチドの産生と分泌を促進し、摂食亢進作用を示す¹⁰⁾。また、経静脈的に投与された GHRL も NPY / AgRP ニューロンを活性化して、摂食を促進させる。これは、消化管からの情報を、脳幹を経て間脳や新皮質に伝達する脳神経である胃の迷走神経に依存する。GHRL 受容体は迷走神経求心性ニューロンで産生され、求心線維末端

へ輸送されるが、GHRLはこの受容体に結合して迷走神経求心線維の電気活動を抑制する。この情報は延髄孤束核に伝達され、その後、ニューロンを変えて視床下部のNPY/AgRPニューロンとGHRHニューロンへ運ばれ、摂食亢進作用とGH分泌作用を示す¹⁴⁾。脂肪細胞から分泌されるレプチン(leptin)は、NPY/AgRPニューロンを抑制して摂食抑制作用を示すことから、GHRLと拮抗するホルモンである¹⁵⁾。

血漿中GHRL濃度は体格指数(BMI)と負の相関を示し、肥満者で低く、やせ型の人では高い傾向にある。例えば、肥満になりやすいピマインディアンの血漿中GHRL濃度は低く、神経性食思不振症患者の血漿中では高い。また、重症心不全や肺癌で悪液質の強い症例も、血漿GHRL濃度は高値を示す。第15染色体の遺伝子異常が原因のPrader-Willi症候群では、過食を示すとともに血漿中のGHRL濃度が高値であることが示されており¹⁶⁾、その根底にはどのようなメカニズムが存在するのか興味深い。

3. 糖脂質代謝に対する作用

GHRLは、膵臓でも合成され、血中に分泌されている。インスリンと同じように、膵動脈よりも膵静脈で高い¹⁷⁾。GHRLは、膵ランゲルハンス島でグルカゴンを産生する α 細胞に存在し、GHRL受容体遺伝子は α 細胞と β 細胞に発現する。生理的濃度($10^{-12} \sim 10^{-11}$ M)のGHRLは、高血糖下でラット単離膵 β 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ、インスリン分泌を促進する。一方、低血糖下では、GHRLは β 細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度とインスリン分泌を変化させない。また、GHRL遺伝子欠損マウスにおける解析から、GHRL欠損によって、膵島からのグルコース誘導性インスリン分泌の亢進することが示されている¹⁷⁾。

最近、GO-CoA-Tatと呼ばれるGOATの選択的拮抗薬が設計された¹⁸⁾。高脂肪食を与えた野生型マウスにGO-CoA-Tatを注射すると耐糖能が改善し、体重増加が減少する。肥満に伴う代謝疾患は公衆衛生の課題であり、臨床応用できればその意義は大きい。GO-CoA-Tatは繰返し注射する必要のあるペプチドをベースとする薬剤なので、現時点での応用は難しいと考えられる。しかしながら、将来

の薬剤開発にとって GOAT は潜在的に有用な標的の1つである。

4. 心機能に対する作用

健常者へ GHRL を静脈内投与すると、心拍数を変化させずに平均動脈圧が低下し、拍出量が増加する¹⁹⁾。心筋梗塞後心不全モデルラットに GHRL を連続投与すると、血清 GH の上昇とともに左室駆出率の増加、左室リモデリング進展の抑制、カヘキシアの是正が認められ、心機能改善および低栄養状態の是正による GHRL の心不全治療薬としての有用性が示唆されている²⁰⁾。慢性心不全患者への GHRL 投与でも心係数の増加や血行動態の改善が報告されている。

おわりに

GHRL の発見により、胃が消化機能だけでなく GH の分泌やエネルギー代謝の調節にも重要な器官であることが明らかになった。GHRL は、末梢から摂食を亢進することが初めて証明されたペプチドであり、GHRL による摂食調節機構の解明は、肥満や摂食障害などの病因・病態の解明にも重要な意味を持つ。摂食障害やカヘキシアに対する治療薬としての GHRL の臨床研究も始まっており、GHRL の持つ幅広い生理作用から、薬剤としての臨床応用研究へと発展しつつある。

文 献

- 1) Bowers C Y, et al: Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 106 (3): 663-667, 1980.
- 2) Howard A D, et al: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273 (5277): 974-977, 1996.
- 3) Kojima M, et al: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402 (6762): 656-660, 1999.
- 4) Kojima M, et al: Ghrelin: Structure and function. *Physiol Rev* 85 (2): 495-522, 2005.
- 5) Toshinai K, et al: Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147 (5): 2306-2314, 2006.
- 6) Yang J, et al: Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132 (3): 387-396, 2008.

- 7) Ohgusu H, et al: Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun* 386 (1): 153-158, 2009.
- 8) Zhang J V, et al: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310 (5750): 996-999, 2005.
- 9) Seoane L M, et al: Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *J Endocrinol Invest* 29 (8): RC13-15, 2006.
- 10) Date Y, et al: Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141 (11): 4255-4261, 2000.
- 11) Cummings D E, et al: A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50 (8): 1714-1719, 2001.
- 12) Tschöp M, et al: Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24 (6): RC19-21, 2001.
- 13) Nakazato M, et al: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409 (6817): 194-198, 2001.
- 14) Date Y, et al: The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123 (4): 1120-1128, 2002.
- 15) Flier J S: Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116 (2): 337-350, 2004.
- 16) Cummings D E, et al: Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nature Med* 8 (7): 643-644, 2002.
- 17) Dezaki K, et al: Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes* 55 (12): 3486-3493, 2006.
- 18) Barnett B P, et al: Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science* 330 (6011): 1689-1692, 2010.
- 19) Nagaya N, et al: Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 104 (17): 2034-2038, 2001.
- 20) Nagaya N, et al: Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol* 3 (2): 146-151, 2003.



Association analysis of the GDNF gene with methamphetamine use disorder in a Japanese population

Tomoko Yoshimura ^{a,1}, Hinako Usui ^{b,*}, Nagahide Takahashi ^c, Akira Yoshimi ^d, Shinichi Saito ^e, Branko Aleksic ^{b,n}, Hiroshi Ujike ^{f,m}, Toshiya Inada ^{g,m}, Mitsuhiro Yamada ^{h,m}, Naohisa Uchimura ^{i,m}, Nakao Iwata ^{j,m,n}, Ichiro Sora ^{k,m}, Masaomi Iyo ^{l,m}, Norio Ozaki ^{b,m,n}

^a Division of Clinical Science and Neuropsychopharmacology, Graduate School of Pharmacy, Meijo University, Aichi, Japan

^b Department of Psychiatry, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi, Japan

^c Laboratory of Molecular Neuropsychiatry, Department of Psychiatry, Mount Sinai School of Medicine, NY, USA

^d Neuropsychopharmacology and Hospital Pharmacy, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi, Japan

^e Matuzakakousei Hospital, Mie, Japan

^f Department of Neuropsychiatry, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan

^g Seiwa Hospital, Institute of Neuropsychiatry, Tokyo, Japan

^h National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan

ⁱ Department of Psychiatry, Kurume University Graduate School of Medicine, Kyushu, Japan

^j Department of Psychiatry, Fujita Health University School of Medicine, Aichi, Japan

^k Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

^l Department of Psychiatry, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

^m Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA), Japan

ⁿ CREST, Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2010

Received in revised form 7 March 2011

Accepted 2 April 2011

Available online 14 April 2011

Keywords:

Association study

Dopamine

GDNF

Genetic disorders

Methamphetamine

Single nucleotide polymorphism

ABSTRACT

Methamphetamine (MAP) dependence is a highly heritable and aberrant dopaminergic signaling that has been implicated in the disease. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), which plays an important role in the survival of dopaminergic neurons, may be involved in this disorder. In this study, we examined the association between GDNF and MAP dependence using a Japanese population-based sample.

We selected eight single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the GDNF locus for the association analysis. When patients with MAP dependence were divided into two subgroups consisting of multi-substance and MAP-only users, we detected a significant association between these two groups and the tagging SNP, rs2910704 (after Bonferroni's correction; allele $P = 0.034$). Thus, GDNF is likely to be related to the severity of MAP use in the Japanese population.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Methamphetamine (MAP) dependence is a serious public health problem that has reached epidemic proportions worldwide (Elkashaf et al., 2008). Repeated use of MAP induces a strong psychological

Abbreviations: MAP, methamphetamine; GDNF, Glial cell line-derived neurotrophic factor; DA, dopamine; UTR, untranslated region; SNP, single nucleotide polymorphism; GFRA, GDNF family receptor alpha; RET, rearranged during transfection; JGIDA, Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse; S.D., standard deviation; MAF, minor allele frequency; HW, Hardy–Weinberg equilibrium; LD, linkage disequilibrium; DAT, dopamine transporter.

* Corresponding author at: Department of Psychiatry and Psychobiology, Nagoya University, Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan. Tel.: +81 52 744 2282; fax: +81 52 744 2293.

E-mail address: hinako@v001.vaio.ne.jp (H. Usui).

¹ These authors contributed equally to this work.

dependence and results in the development of psychotic symptoms such as psychosis, attempted suicide, craving, and depression (Aoyama et al., 2006; Nakama et al., 2008). Numerous family and twin epidemiological studies have suggested that MAP dependence is a highly heritable disorder (the estimated heritability is 30–60%) (Kendler et al., 2005; Aoyama et al., 2006; Lichtenstein et al., 2009). Thus, a number of molecular genetic studies have been conducted worldwide to elucidate the vulnerable genes associated with this disorder (Aoyama et al., 2006; Kishi et al., 2010; Okochi et al., 2009).

Aberrant dopaminergic transmission has long been implicated in the development of MAP dependence (Freedman, 2003; Yui et al., 2000). It is well known that glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is one of the most potent neurotrophic factor influencing the dopaminergic function. (Carnicella and Ron, 2009). Indeed GDNF plays an important role in the survival and neurite outgrowth of midbrain dopaminergic neurons (Kriegstein et al., 1995; Lin et al.,

1993). Furthermore, GDNF modulates the activity/excitability of midbrain dopamine (DA) neurons (Yang et al., 2001; Wang et al., 2003) as well as DA uptake (Lin et al., 1993). These observations suggest that GDNF is important for the development and maintenance of DA signaling.

An animal study has provided direct evidence of the involvement of GDNF in MAP dependence. Reduction in the expression of GDNF potentiates MAP self-administration, enhances motivation for mice to take MAP, increases vulnerability to drug-primed reinstatement, and prolongs cue-induced reinstatement of MAP-seeking behavior that had been previously suppressed (Yan et al., 2007). Of note, GDNF is implicated not only in the control of MAP intake and seeking but also in drug abuse in general (Ghitza et al., 2010; Carnicella and Ron, 2009). Manipulations that modulate the amount of GDNF in the brain decrease cocaine-induced conditioned place preference and reduce cocaine and ethanol self-administration in rats (Carnicella et al., 2008; Messer et al., 2000; Green-Sadan et al., 2003, 2005).

Thus, changes in the expression or function of GDNF may affect dopaminergic signaling, favoring the development of MAP-seeking behaviors.

MAP-induced psychosis and schizophrenia (the paranoid type in particular) show very similar symptoms (Sato et al., 1992), and genetic association between GDNF and schizophrenia have been repeatedly reported (Lee et al., 2001; Michelato et al., 2003). To the best of our knowledge, however, the association of GDNF with MAP dependence has not been investigated. Therefore, our current study aimed to examine the possible association of SNPs in GDNF with susceptibility for MAP dependence in Japanese population.

2. Materials and methods

2.1. Participants

This study was approved by the ethics committees of each institution of the Japanese Genetics Initiative for Drug Abuse (JGIDA) including the Nagoya University Graduate School of Medicine and Fujita Health University. All patients were unrelated to each other and were ethnically Japanese. Written informed consent was obtained from each patient.

A total of 219 patients with MAP dependence (178 males, 41 females and mean age \pm standard deviation (S.D.), 37.1 ± 11.8 years) and 383 normal controls (160 males, 223 females and mean age \pm S.D., 40.0 ± 14.6 years) were genotyped. Patients with MAP dependence were diagnosed according to the ICD-10-DCR criteria, with the consensus of at least two experienced psychiatrists on the basis of empirical diagnostic interviews and review of medical records. Along with the case-control comparison, associations of five clinical features of the patients with MAP dependence were also examined, including

age of first use, latency of psychosis, multi-substance use, prognosis of psychosis, and spontaneous relapse of psychotic symptoms (Morita et al., 2005).

A total of 106 patients (48.4%) consumed MAP before the age of 20 years, and 109 patients (49.8%) first consumed MAP after they were 20 years old. The latency of psychosis was less than 3 years after the first MAP consumption in 95 patients (43.4%), and 3 or more years in 82 patients (37.4%). A total of 60 patients (27.4%) abused only MAP during their lifetime, and 152 patients (69.4%) abused drugs in addition to MAP in the past or present. A total of 107 patients (48.9%) were diagnosed as the transient type, and 81 patients (37.0%) were diagnosed as the prolonged type. The numbers of patients with and without a history of spontaneous relapse were 80 (36.5%) and 130 (59.4%), respectively.

2.2. Tagging SNP selection

GDNF is a trophic factor for dopaminergic neurons. The genomic structure of the GDNF locus covers a 24-kb interval at 5p12–p13.1. The locus contains three exons coding for a cDNA of 4.6 kb including large 5'- and 3'-UTRs (Grimm et al., 1998).

We first consulted the HapMap database (release #22/phase II; population: Japanese in Tokyo) to obtain SNPs throughout the entire coding region of GDNF as well as in the flanking regions 500 bp upstream and 500 bp downstream of the coding regions. Twenty-three SNPs were found in the HapMap Japanese sample.

The longest isoform was selected from the three alternately spliced isoforms of GDNF. We chose representative SNPs with the criteria of minor allele frequency (MAF) >0.10 and $r^2 > 0.80$, using Haploview version 3.32 software (<http://www.broadinstitute.org/mpg/haploview>) (Barrett et al., 2005), and defined these as tagging SNPs.

As a result, eight tagging SNPs were chosen. The gene structure of GDNF and the position of each SNP are shown in Fig. 1.

2.3. SNP genotyping

Genotyping of tagging SNPs was carried out using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA). TaqMan probes and Universal PCR Master Mix were obtained from Applied Biosystems. A 5- μ l total reaction volume was used, and allelic-specific fluorescence was measured using the ABI PRISM 7900 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Sequences of the individual primer pairs are available upon request. To exclude low-quality DNA samples or genotyping probes, data sets were filtered on the basis of tSNP genotype call rates (100% completeness) or deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P = 0.05$) in the control sample. Participants whose percentage of missing genotypes was more than 10% or who had

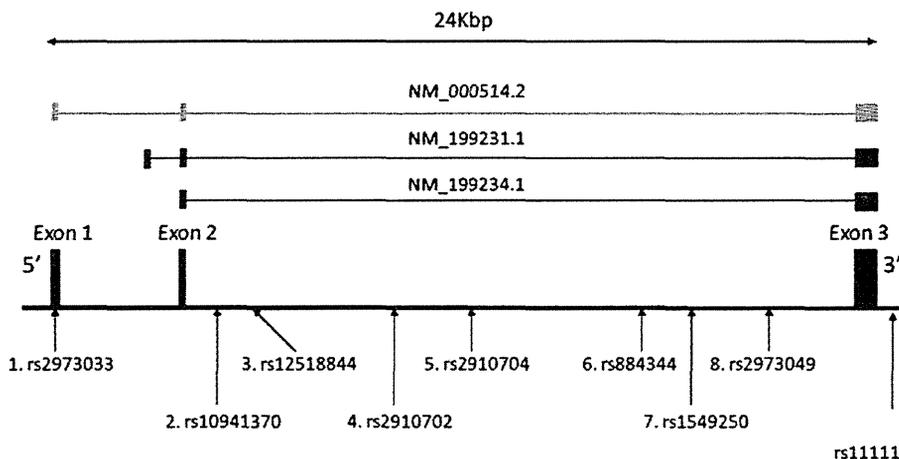


Fig. 1. Genomic structure of GDNF and the SNPs used in our association analysis. Vertical bars represent exons in GDNF, and the number under each arrow is the SNP ID.

Table 1
Association analysis of tagSNPs in *GDNF* with MAP dependence.

No.	SNP ID	M/m	Phenotype	N	Genotype			MAF	P-value		Global P-value
					M/M	M/m	m/m		Genotype	Allele	
1	rs2973033 exon1	A/G	MAP	Case	205	112	72	21	0.28	0.14	0.67
				Control	381	202	155	24	0.27		
2	rs10941370 intron2	T/C	MAP	Case	204	78	94	32	0.39	0.82	0.79
				Control	381	145	183	53	0.38		
3	rs12518844 intron2	G/A	MAP	Case	205	85	91	29	0.36	0.57	0.79
				Control	381	154	183	44	0.36		
4	rs2910702 intron2	A/G	MAP	Case	206	85	101	20	0.34	0.55	0.93
				Control	382	164	172	46	0.34		
5	rs2910704 intron2	G/C	MAP	Case	206	88	94	24	0.34	0.47	0.25
				Control	381	143	190	48	0.38		
6	rs884344 intron2	A/C	MAP	Case	205	128	69	8	0.21	0.40	0.18
				Control	381	219	140	22	0.24		
7	rs1549250 intron2	G/T	MAP	Case	205	95	90	20	0.32	0.25	0.10
				Control	381	198	158	25	0.27		
8	rs2973049 intron2	G/A	MAP	Case	205	51	111	43	0.48	0.24	0.96
				Control	380	109	178	93	0.48		

M: major allele and m: minor allele.

MAF: minor allele frequency.

evidence of possible DNA contamination were excluded from the subsequent analyses. Finally, the clustering performance of the allelic discrimination assay was visually inspected for all SNPs.

2.4. Statistical analysis

Genotype deviation from HWE was evaluated with the χ^2 -test. Genotypic association of SNPs that deviated from HWE was analyzed using Cochran–Armitage trend tests for the multiplicative model of inheritance (Balding, 2006). Genotypic and allelic associations were performed with SPSS version 14.0J (Tokyo, Japan) and Haploview software version 3.32, respectively. The significance level for all statistical tests was set at 0.05. Bonferroni's corrections were used for multiple comparisons; MAP P corrected = 0.05/48 [eight SNPs \times two genetic analyses \times three phenotypes (age of first use, multiple substance abuse and prognosis of psychosis)]. The linkage disequilibrium (LD) block was defined by Haploview 3.32. When the haplotype frequency in each block was over 5%, haplotypic analysis was performed with Unphased version 3.1.3 (Dudbridge, 2008), which was not a tagging SNP as defined by the Tagger program. Power calculations were performed using the genetic statistical package on a Genetic Power Calculator (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>) (Purcell et al., 2003).

3. Results

The genotypic and allelic frequencies of each SNP in patients with MAP dependence and normal controls are summarized in Table 1. The observed genotypic frequencies of all SNPs were within the distribution expected according to HWE. Neither the genotypic nor the allelic frequencies of the eight tagging SNPs for *GDNF* differed significantly between patients with MAP dependence and controls. As a result of LD analysis of 383 normal controls, one LD block was defined. The distribution of haplotypic frequencies at this block did not differ significantly between patients with MAP dependence and normal controls (global P value = 0.46). More than 80% power in detecting association was obtained when the prevalence of MAP dependence was set at 0.3% and the genotype relative risk was set at 1.40–1.45 under a multiplicative model of inheritance.

Next, we analyzed these cohorts based on the five clinical features of MAP dependence. First, a significant association was observed for rs2910704 (genotype, P = 0.01) between MAP-dependent patients whose age at first MAP consumption was younger than 20 years old and those who were older than 20 years at their first MAP consumption (Table 2). When patients with MAP dependence were divided into two subgroups of multi-substance and MAP-only users, a significant difference was observed between these two groups for the

Table 2
Genotype and allele frequencies of *GDNF* in the age of first use.

No.	SNP ID	M/m	Group	N	Genotype			MAF	P-value	
					M/M	M/m	m/m		Genotype	Allele
1	rs2973033 exon1	A/G	≥ 20 years	97	50	40	7	0.28	0.14	0.91
			<20 years	104	59	31	14	0.28		
2	rs10941370 intron2	T/C	≥ 20 years	97	41	42	14	0.36	0.65	0.44
			<20 years	103	37	50	16	0.40		
3	rs12518844 intron2	G/A	≥ 20 years	97	42	43	12	0.35	0.83	0.60
			<20 years	104	43	45	16	0.37		
4	rs2910702 intron2	A/G	≥ 20 years	97	39	49	9	0.35	0.91	0.96
			<20 years	105	44	50	11	0.34		
5	rs2910704 intron2	G/C	≥ 20 years	97	38	53	6	0.34	0.01	0.64
			<20 years	105	48	39	18	0.36		
6	rs884344 intron2	A/C	≥ 20 years	97	57	37	3	0.22	0.49	0.63
			<20 years	104	67	32	5	0.20		
7	rs1549250 intron2	G/T	≥ 20 years	97	45	43	9	0.31	0.90	0.97
			<20 years	104	50	43	11	0.31		
8	rs2973049 intron2	G/A	≥ 20 years	97	28	49	20	0.46	0.55	0.41
			<20 years	104	23	58	23	0.50		

Bold numbers represent significant P-values.

M: major allele and m: minor allele.

MAF: minor allele frequency.

Table 3
Association analysis of tagSNPs in *GDNF* in the multi substance use.

No.	SNP ID	M/m	Group	N	Genotype			MAF	P-value	
					M/M	M/m	m/m		Genotype	Allele
1	rs2973033 exon1	A/G	No	57	26	21	10	0.36	0.09	0.03
			Yes	141	82	48	11	0.25		
2	rs10941370 intron2	T/C	No	57	22	23	12	0.41	0.46	0.53
			Yes	140	54	66	20	0.38		
3	rs12518844 intron2	G/A	No	57	24	23	10	0.38	0.67	0.82
			Yes	141	57	65	19	0.37		
4	rs2910702 intron2	A/G	No	57	34	19	4	0.24	0.007	0.01
			Yes	142	50	77	15	0.38		
5	rs2910704 intron2	G/C	No	57	15	30	12	0.47	0.003	0.0007
			Yes	142	70	60	12	0.30		
6	rs884344 intron2	A/C	No	57	30	23	4	0.27	0.12	0.04
			Yes	141	94	43	4	0.18		
7	rs1549250 intron2	G/T	No	57	26	28	3	0.30	0.38	0.59
			Yes	141	65	60	16	0.33		
8	rs2973049 intron2	G/A	No	57	18	28	11	0.44	0.49	0.33
			Yes	141	33	77	31	0.49		

Bold numbers represent significant P-values.

M: major allele and m: minor allele.

MAF: minor allele frequency

tagging SNPs, rs2973033 (allele, $P=0.03$), rs2910702 (genotype, $P=0.007$ and allele, $P=0.01$), rs2910704 (genotype, $P=0.003$ and allele, $P=0.0007$), and rs884344 (allele, $P=0.04$) (Table 3). In addition, there was a significant difference between the transient type and the prolonged type for rs2973033 (allele, $P=0.02$) (Table 4). No significant differences were found in the latency of psychosis or spontaneous relapse of psychotic symptoms (data not shown). After Bonferroni's correction, three SNPs were no longer significant, but rs2910704 remained significant (allele, $P=0.034$) between multi-substance and MAP-only users (Table 3).

4. Discussion

Our results of the association analysis of MAP dependence suggest that *GDNF* may be related to the severity of MAP dependence in the Japanese population. There was no significant difference in the frequency of any of the tagging SNPs between MAP users and normal controls. However, when patients with MAP dependence were divided into two subgroups consisting of multi-substance and MAP-only users, a significant difference was observed between these two groups in the tagging SNP, rs2910704, even after Bonferroni's correction (allele, $P=0.034$). Multi-substance users in our study

primarily used organic solvents and marijuana in addition to MAP, and the mechanism of action of these drugs is different from that of MAP (Aoyama et al., 2006). In our current study, we observed that the MAF of rs2910704 in MAP-only users (0.47) was higher than that of multi-substance users (0.30), and a similar trend was seen for the age of first use. In other words, rs2910704 may be associated with the severity of substance dependency, as we detected association with earlier age of onset (Table 2) and multiple substance abuse (Table 3). Interestingly, we found a significant association with this SNP that differed between MAP-only users and normal controls, suggesting the involvement of this SNP in MAP dependence. Further, this SNP was in strong LD with rs11111 ($r^2=1$), which is located 1.6 kb downstream of *GDNF* in the predicted 3'-UTR (ENCODE Gencode Manual Gene Annotations (level 1+2) (Feb., 2009)). The rs11111 SNP is associated with lower expression of *GDNF* in the brain but not in peripheral monoclonal blood cells as seen with SNPExpress (<http://people.genome.duke.edu/~dg48/SNPExpress/>) (Fig. 2, $P=0.0026$). Thus, patients with these SNPs may exhibit lower expression of *GDNF* and be more vulnerable to MAP abuse. This hypothesis is consistent with a report showing that reduction in the expression of *GDNF* potentiates MAP self-administration and enhances motivation for mice to take MAP (Yan et al., 2007).

Table 4
Genotype and allele frequencies of *GDNF* in the prognosis of psychosis.

No.	SNP ID	M/m	Group	N	Genotype			MAF	P value	
					M/M	M/m	m/m		Genotype	Allele
1	rs2973033 exon1	A/G	Transient	100	61	30	9	0.24	0.08	0.02
			Prolonged	75	33	31	11	0.35		
2	rs10941370 intron2	T/C	Transient	99	36	47	16	0.40	0.67	0.38
			Prolonged	75	31	35	9	0.35		
3	rs12518844 intron2	G/A	Transient	100	42	42	16	0.37	0.43	0.40
			Prolonged	75	33	35	7	0.33		
4	rs2910702 intron2	A/G	Transient	101	40	48	13	0.37	0.12	0.30
			Prolonged	75	31	41	3	0.31		
5	rs2910704 intron2	G/C	Transient	101	50	40	11	0.31	0.10	0.052
			Prolonged	75	25	39	11	0.41		
6	rs884344 intron2	A/C	Transient	100	66	31	3	0.19	0.37	0.16
			Prolonged	75	42	29	4	0.25		
7	rs1549250 intron2	G/T	Transient	100	47	39	14	0.34	0.17	0.27
			Prolonged	75	37	34	4	0.28		
8	rs2973049 intron2	G/A	Transient	100	26	50	24	0.49	0.39	0.76
			Prolonged	75	17	45	13	0.47		

Bold numbers represent significant P-values.

M: major allele and m: minor allele.

MAF: minor allele frequency.

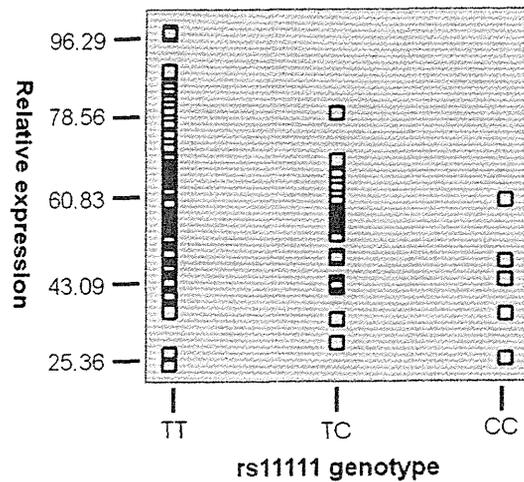


Fig. 2. Relationship between *GDNF* expression in the frontal cortex of human brain and the rs11111 genotype.

In addition, other associated SNPs were in strong LD with rs2910704, and reduced expression of *GDNF* may therefore be implicated in the prognosis of MAP use disorder. Recently, Boger et al. (2007) suggested that long-term consequences of MAP exposure in mice are exacerbated in *GDNF* heterozygous mice, which may explain the significant association of these SNPs with age of onset or prognosis of MAP use disorder. This group also found elevated dopamine transporter (DAT) activity in *GDNF* heterozygous mice, suggesting that examination of DAT binding in our patients may be of interest.

Our results had several limitations in terms of interpreting positive associations. A potential concern was population admixture, which is a known confounding factor for association. The Japanese population has rather low genetic diversity (Haga et al., 2002). However, even in such a genetically homogeneous population, a small amount of stratification may produce a spurious genetic association signal (Yamaguchi-Kabata et al., 2008). Another potential concern is the relatively small sample size and that the gender ratio in the MAP group was not replicated in the control group. This type of discrepancy may introduce a gender-specific effect that could have resulted in inflated *p* values. Thus, larger numbers of gender-matched samples and genomic controls are required.

5. Conclusion

We suggest that *GDNF* may be related to the severity of MAP use. Further studies using independent replication will be required to clarify the relationship between *GDNF* and MAP use disorder.

Acknowledgments

We thank the patients and healthy volunteers for their participation in our study. This work was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, a Grant-in-Aid for Scientific Research on Pathomechanisms of Brain Disorders from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, MEXT Academic Frontier, and the Core Research for Evolutional Science and Technology.

References

- Aoyama N, Takahashi N, Kitaichi K, Ishihara R, Saito S, Maeno N, et al. Association between gene polymorphisms of SLC22A3 and methamphetamine use disorder. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30(10):1644–9.
- Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006;7(10):781–91.

- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21(2):263–5.
- Boger HA, Middaugh LD, Patrick KS, Ramamoorthy S, Denehy ED, Zhu H, et al. Long-term consequences of methamphetamine exposure in young adults are exacerbated in glial cell line-derived neurotrophic factor heterozygous mice. *J Neurosci* 2007;27(33):8816–25.
- Carnicella S, Ron D. GDNF—a potential target to treat addiction. *Pharmacol Ther* 2009;122:9–18.
- Carnicella S, Kharaznia V, Jeanblanc J, Janak PH, Ron D. GDNF is a fast-acting potent inhibitor of alcohol consumption and relapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(23):8114–9.
- Dudbridge F. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 2008;66(2):87–98.
- Elkashf A, Vocci F, Hanson G, White J, Wickes W, Tiihonen J. Pharmacotherapy of methamphetamine addiction: an update. *Subst Abus* 2008;29(3):31–49.
- Freedman R. Schizophrenia. *N Engl J Med* 2003;349(18):1738–49.
- Ghitza UE, Zhai H, Wu P, Airavaara M, Shaham Y, Lu L. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;35(2):157–71.
- Green-Sadan T, Kinor N, Roth-Deri I, Geffen-Aricha R, Schindler CJ, Yadid C. Transplantation of glial cell line-derived neurotrophic factor-expressing cells into the striatum and nucleus accumbens attenuates acquisition of cocaine self-administration in rats. *Eur J Neurosci* 2003;18(7):2093–8.
- Green-Sadan T, Kuttner Y, Lublin-Tennenbaum T, Kinor N, Boguslavsky Y, Margel S, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor-conjugated nanoparticles suppress acquisition of cocaine self-administration in rats. *Exp Neurol* 2005;194(1):97–105.
- Grimm L, Holinski-Feder E, Teodoridis J, Scheffer B, Schindelhauer D, Meitinger T, et al. Analysis of the human *GDNF* gene reveals an inducible promoter, three exons, a triplet repeat within the 3'-UTR and alternative splice products. *Hum Mol Genet* 1998;7(12):1873–86.
- Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet* 2002;47(11):605–10.
- Kendler KS, Gardner C, Jacobson KC, Neale MC, Prescott CA. Genetic and environmental influences on illicit drug use and tobacco use across birth cohorts. *Psychol Med* 2005;35(9):1349–56.
- Kishi T, Tsunoka T, Ikeda M, Kitajima T, Kawashima K, Okochi T, et al. Serotonin 1A receptor gene is associated with Japanese methamphetamine-induced psychosis patients. *Neuropharmacology* 2010;58(2):452–6.
- Kriegstein K, Suter-Crazzolara C, Unsicker K. Development of mesencephalic dopaminergic neurons and the transforming growth factor-beta superfamily. *J Neural Transm Suppl* 1995;46:209–16.
- Lee K, Kunugi H, Nanko S. Glial cell line-derived neurotrophic factor (*GDNF*) gene and schizophrenia: polymorphism screening and association analysis. *Psychiatry Res* 2001;104(1):11–7.
- Lichtenstein P, Yip BH, Bjork C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF, et al. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet* 2009;373(9659):234–9.
- Lin LF, Doherty DH, Lille JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993;260(5111):1130–2.
- Messer CJ, Eisch AJ, Carlezon Jr WA, Whisler K, Shen L, Wolf DH, et al. Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse. *Neuron* 2000;26(1):247–57.
- Michelato A, Bonvicini C, Ventriglia M, Scasellati C, Randazzo R, Bignotti S, et al. 3' UTR (AGG)_n repeat of glial cell line-derived neurotrophic factor (*GDNF*) gene polymorphism in schizophrenia. *Neurosci Lett* 2003;357(3):235–7.
- Morita Y, Ujike H, Tanaka Y, Uchida N, Nomura A, Ohtani K, et al. A nonsynonymous polymorphism in the human fatty acid amide hydrolase gene did not associate with either methamphetamine dependence or schizophrenia. *Neurosci Lett* 2005;376(3):182–7.
- Nakama H, Chang L, Cloak C, Jiang C, Alicata D, Haning W. Association between psychiatric symptoms and craving in methamphetamine users. *Am J Addict* 2008;17(5):441–6.
- Okochi T, Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Kinoshita Y, Kawashima K, et al. Genetic association analysis of NRG1 with methamphetamine-induced psychosis in a Japanese population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33(5):903–5.
- Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 2003;19(1):149–50.
- Sato M, Numachi Y, Hamamura T. Relapse of paranoid psychotic state in methamphetamine model of schizophrenia. *Schizophr Bull* 1992;18(1):115–22.
- Wang J, Chen G, Lu B, Wu CP. GDNF acutely potentiates Ca²⁺ channels and excitatory synaptic transmission in midbrain dopaminergic neurons. *Neurosignals* 2003;12(2):78–88.
- Yamaguchi-Kabata Y, Nakazono K, Takahashi A, Saito S, Hosono N, Kubo M, et al. Japanese population structure, based on SNP genotypes from 7003 individuals compared to other ethnic groups: effects on population-based association studies. *Am J Hum Genet* 2008;83(4):445–56.
- Yan Y, Yamada K, Niwa M, Nagai T, Nitta A, Nabeshima T. Enduring vulnerability to reinstatement of methamphetamine-seeking behavior in glial-cell-line-derived neurotrophic factor mutant mice. *FASEB J* 2007;21(9):1994–2004.
- Yang F, Feng L, Zheng F, Johnson SW, Du J, Shen L, et al. GDNF acutely modulates excitability and A-type K(+) channels in midbrain dopaminergic neurons. *Nat Neurosci* 2001;4(11):1071–8.
- Yui K, Ikemoto S, Ishiguro T, Goto K. Studies of amphetamine or methamphetamine psychosis in Japan: relation of methamphetamine psychosis to schizophrenia. *Ann NY Acad Sci* 2000;914:1–12.



シンポジウム：チーム医療における心身医学的アプローチ

摂食障害の治療におけるチーム医療と医療連携

鈴木(堀田)眞理*

抄録：摂食障害の治療は心理的な治療が主体である。しかし、生命の危機に陥るような低栄養や重篤な合併症、特徴的な食行動異常による家庭生活でのトラブル、就学や就労などの社会生活での障害を伴いやすく、救急、内科・小児科、婦人科、心療内科、精神科、栄養士、心理、ソーシャルワーカー、プライマリ・ケア医、学校関係者、職場の関係者など多くの部門の連携した支援が年単位で必要である。ところが、摂食障害患者は病識が希薄で、スプリットングや飢餓に伴う精神症状に基づくコミュニケーション障害があり、チーム医療や医療連携のトラブルの原因になる。電子カルテなどの情報伝達方法を用いる、治療方針を統一させる、主治医は他部門には目的と責任範囲を明確にして依頼することがチーム医療を有効なものにする。また、主治医が、摂食障害患者についての正確な知識や困難さに配慮した対応方法を指導をすることで、外部協力者との医療連携を円滑にする。たとえ異なった施設間でもチームを組んだり、連携したりすることは、患者家族のみならず医療者の心身の負担を軽減する。

Key words：摂食障害，チーム医療，医療連携

はじめに

摂食障害の治療は心理的な治療が主体である。しかし、生命危機に陥るような低栄養や重篤な合併症、特徴的な食行動異常による家庭生活でのトラブル、就学や就労などの社会生活での障害を伴いやすく、救急、内科・小児科、婦人科、心療内科、精神科、栄養士、心理、ケースワーカー、学校関係者、職場関係者など多くの部門の支援が年単位で必要になる。ここでは、摂食障害治療におけるチーム医療や連携の必要性、当院での実際と問題点への対策について述べたい。

摂食障害におけるチーム医療や連携の必要性

摂食障害が多様な身体的、精神的症状を呈する心身症で、生活全体を支援しなければならない病気なので、複数の専門職がかかわらざるをえない。慢性化すればするほどさらに必要になる。

1. 医療機関内のチーム医療

摂食障害の治療の最終目標は、患者がストレスを適切に処理して、やせや過食・嘔吐に逃避しないことである。やせ願望や過食・嘔吐だけを消失させることはできない。現実的で柔軟な考え方ができるようになり、コーピングスキルが向上すると、それらも緩和されるという両輪のようなものである。ゆえに、心理的な治療が主体で、精神科医、臨床心理士がかかわる。

*政策研究大学院大学保健管理センター（連絡先：鈴木(堀田)眞理，〒106-8677 東京都港区六本木7-22-1）

Table 1 摂食障害でみられる臨床症状と検査所見

症状と徴候		検査所見
皮膚	うぶ毛の密生, 脱毛, カロチン症, 低体温, 凍瘡, 吐きだこ	
耳鼻咽喉	耳閉感, 唾液腺の腫脹	耳管閉塞, 唾腺症
循環器	低血圧, 徐脈, 心雑音, 不整脈, 浮腫	心陰影の縮小, 心電図異常, 僧帽弁逸脱症
口腔	歯肉炎, エナメル質障害, う歯	唾液腺型アミラーゼ上昇
消化器	味覚障害 腹部膨張感, 嘔気, 腹痛, 便秘, 下痢, 痔核	血中亜鉛の減少 内臓下垂, 胃排出能低下, 萎縮性胃炎 イレウス, 上腸間膜症候群
腎・尿路	乏尿, 蛋白尿, 血尿, 失禁, 夜尿, 浮腫	膀胱筋力低下, 腎希釈・濃縮能障害, 腎不全
肝・膵		トランスアミナーゼ上昇, 膵型アミラーゼ上昇 総蛋白・アルブミン・rapid turnover proteins の低下
脂質代謝		高あるいは低コレステロール血症
血液		貧血, 白血球減少, 血小板減少症
電解質	不整脈, 意識障害, けいれん	低 Na, Cl, K, Ca, Mg 血症 血中微量元素低下
内分泌系	無月経, 低身長	T3 低下, GH 上昇, IGF-I 低下, 性ホルモン低下
骨・筋肉系	側弯, 骨折, 筋力低下, 筋肉痛, 末梢神経麻痺	横紋筋融解症, 骨密度低下 (骨粗鬆症)
中枢神経系	不眠, 思考・判断・集中力の低下, 認知障害	脳萎縮像, 異常脳波

しかし、摂食障害は心身症であり、身体症状の治療の役割も大きい。神経性過食症はやせがないので、低栄養による身体的合併症は少ないが、自己誘発性嘔吐や下剤・利尿剤の乱用者では内科的治療が必要になる。神経性食欲不振症は低栄養による多彩な臨床症状や検査値異常を呈し、死亡率が5~10%と高い。低栄養で心身の機能が低下していると飢餓に伴う精神症状が強くなり、心理的治療が奏効しにくいので、心理的治療に先んじて、内科、心療内科、小児科などで身体管理や専門的な栄養療法が行われることが多い。本人が無月経を主訴にしている場合は、婦人科医が体重増加と月経誘発の治療を担うこともある。食行動異常が主症状の疾患であるから、食事内容や食べ方の指導は本人だけでなく調理する家族にニーズが高い。神経性過食症は衝動的な過食を抑制するための方法を、神経性食欲不振症では、消化器症状や精神状態に合わせた実際的な指導が望まれる。近年、医療行政の入院期間の短縮化に伴い、摂食障害患者においても在宅経管栄養法、在宅経静脈性高カロ

リー栄養法を導入している患者では、在宅医療部門の支援が必須である。

社会復帰に際して、自己主張や断るスキルなど適切な対人関係を築くスキルを訓練する必要がある。また、会食ができない、宴会に出られないなどの行動制限がある場合、実情に合わせた就職活動の援助も有効である。

2. 他の診療科の診療協力

摂食障害には Table 1 に示すような多彩な身体症状や検査異常がある。骨粗鬆症には整形外科が、腎不全が進行すれば腎臓内科がかかわる。あまり知られていないが、極度のやせでは耳管閉塞症を発症しやすく、嘔吐や低栄養による歯や歯肉の障害も多い。全身の筋力低下に伴い ADL (activity of daily living) が低下したり、脂肪量の減少と疎血で容易に末梢神経麻痺を呈したりして、理学療法を行うこともある。

このように、摂食障害は、多くの専門業種の協力を必要とする疾患である¹⁾。

3. 地域医療連携

日本では、ここ30年間で摂食障害患者は著増している。しかし、専門医や専門治療施設は限られており、その施設も予約は飽和状態、初診は数カ月待ちで、新しい患者を断っている施設もある。地方によっては通院できる範囲に専門医がいないこともある。そこで、非専門医がプライマリ・ケアを担当しているのが実情である。救命救急が最初の受診科になることもある。

専門医療施設が自宅から遠い場合は、日常の内科的診察や点滴は近くのプライマリ・ケア医で行うことを逆紹介し、協力して診療することもある。

4. 家族、学校、職場との連携

当面の大きな心理ストレスがないこと、安心して療養できる環境は、早期回復の条件である。家族の理解と有効な援助や環境の変化だけで、症状が軽減することはよく経験される。今の自分をそのまま受け入れてほしいという欲求(safety needs)が満たされて初めて、治したいという欲求(growth needs)が起こるのである。患者は、家族に食行動だけは叱責や干渉しないでほしい、と希望しているが、家族は、どうすればもっと食べさせられるのか、過食を阻止できるのかと苦悩して疲労困憊している。欧米では家族への心理教育が本人の治療と同等に行われているが、日本では数少ない。患者が受診を拒否する場合でも、家族だけが相談に来院して患者への対応を変えるにつれて患者が回復することは多い。家族の資源を治療に生かすことと、家族が病気に巻き込まれて疲弊することを防ぐために連携が重要である。

学校の問題は、やせに気づいても重労働の体育をさせたり、反対に、学校の責任問題を危惧して軽症にもかかわらず学校行事への参加を認めないこともある。いずれも情報不足である。学校は就学患者が1日の半分を過ごすところであり、学業・進路、交友関係などはストレス源

である。校医や養護教諭などの学校関係者に連絡し、当面のストレスを減らして、安心して療養できる環境を調整することも必要である。職場も産業医や上司に対して同様である。

摂食障害治療のチーム医療や連携を困難にする患者側の問題点

一般的にチーム医療や連携を行う場合、連絡の不備などの問題は起こりやすい。しかし、摂食障害には本症特有の、チーム医療や連携を困難にする要因がある。

患者とは治療意欲をもって医療機関を訪れ、医療者と協力関係を結ぶ。しかし、摂食障害患者は「治りたくない」気持ちをもっていること、飢餓による精神症状を呈することが、本症の治療を難しくし、医療者や連携しようとする者の苦痛になりうる。

神経性食欲不振症患者は、やせるとつらい現実を遠ざけられるような気分になり、不快なことに対する感受性が鈍くなる。治さなければいけないと思いつつも、やせを治されたくないという気持ちがあり、やせ、病氣、空腹、疲れを否認する。何も困っていないと言い張り、体重を増やそうとする人とは敵対する。自らの意思で問題行動を起こしていると誤解されているが、自ら抑制できない。神経性過食症患者は過食発作や排出行為が病的であるという病識があり、自ら受診する。しかし、治療動機の本音は、手っとり早く過食だけを止めてやせを維持したいのである。また、過食が憎いと言いながら、過食の有効性も認め、「過食を治したいけれど、続けたい」という、相反する気持ちがある。つまり、摂食障害患者は治療の主体性をもたせにくい。

特に、神経性食欲不振症の患者が、食事量や体重で平然と虚偽の申告をすることは有名だ。自分のおかずを減らすために他人のお皿に移したり、体重測定時に錘を隠していたり、やせたいがゆえに問題行動をするが、みつけたその現

Table 2 神経性食欲不振症の治療とサポートの資源と問題点

	サポートの資源	問題点
1. 早期発見	学校 (校医, 養護教諭, 教員) 職場 (産業医, 上司)	患者数の増加 低い認識と病識 遅い家族の対応, 医療施設探し
2. プライマリ・ケア	一般医	受診, 医師・患者関係形成の困難さ, プライマリ・ケアの徹底不足, 偏見 高い死亡率
3. 診療	主治医	専門機関・治療者の不足 公立の摂食障害センターがない 何科が診療するか 医療経済問題
身体的治療での連携	心療内科, 内科, 小児科, 栄養サポートチーム, 紹介医, 在宅栄養療法支援部門	体重増加への抵抗 問題行動
心理的治療での連携	心療内科, 精神科, 臨床心理士	精神科的併存症, 発達障害の合併 治療からのドロップアウト
栄養指導	栄養士, 栄養サポートチーム	栄養指導の疾患特異性
合併症・後遺症の治療	救命救急, 産婦人科, 整形外科, 歯科, 外科, 腎臓内科, 消化器内科など	多岐にわたる合併症 低い病識, 問題行動
4. 療養環境の整備	家族, 学校, 職場, 訪問看護	知識不足, 支援不足
5. 社会復帰	就学・進学相談 (サポート校, 予備校), ヤングハローワーク, キャリアカウンセラー, 患者の会, 作業所	心身の重症度に合わせた進路指導 特殊な病態や心理を配慮した就労 引きこもり, 社会不安障害の表面化
6. 生活支援	ソーシャルワーカー, 公的機関 (福祉・保護)	経済的, 家族問題
7. 家族の支援	家族会	数が少ない

場で指摘してもそれを認めないことがある。本来の自分が認めたくない部分を意識外にすることをスプリッティングと呼ぶ。自分に都合のよいことしか覚えていなかったり、都合がよいように把握したりする。平然と嘘をついているように見え、自分の問題行動を認めないし、謝らないし、再発することから、医療スタッフを困惑させ、入院病棟では他の患者に迷惑をかけ、「摂食障害患者は引き受けたくない」という感情をもたせる。

さらに、飢餓による精神症状が加わる。飢餓によって、思考も行動も嗜好も、生活すべてが食に振り回されるだけでなく、集中力や判断力や記憶力が低下し、認知の歪みや強迫性は増強され、情緒や社会性や人格も変化し、抑うつ、不安、過敏性、怒り、気分不安定、不眠が出現する。これらは、1940年代に行われた健常人の飢餓実験で証明されている。

東京女子医科大学附属女性生涯健康センターにおける摂食障害治療のチーム医療や連携

Table 2 に神経性食欲不振症の治療とサポートの資源と問題点を示した。筆者が診療を行っている施設での実際を紹介し、問題点への対策も述べたい。

1. センター内のチーム医療

当センターは、メンタルケア（精神科・心身医療科）を中心に、皮膚科、婦人科、内科、小児科、漢方の各科の中堅以上の経験ある女性医師と看護師、臨床心理士、栄養士、ケースワーカーなどのコ・メディカルスタッフが共同し、女性の心身の健康促進に特化した専門性の高い医療を行っている。そして、圧倒的に女性に生じやすい疾患である摂食障害の治療にも力を入れ、積極的に連携してチーム医療を行っている。