

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～ 2012  
 課題番号：23791483  
 研究課題名（和文）  
 病的肥満症・単純性肥満の原因解明：胃グレリン細胞と食欲・体重増加との関係  
 研究課題名（英文） Clinical significance of ghrelin expression in the gastric mucosa of morbidly obese patients  
 研究代表者  
 宮崎 安弘（MIYAZAKI YASUHIRO）  
 大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任研究員  
 研究者番号：00571390

## 研究成果の概要（和文）：

病的肥満患者は非肥満患者より血中グレリン値は低いが，胃内グレリン細胞数は多いことが見出された。また，グレリン細胞数は肥満手術（袖状胃切除術）効果と関連していた。肥満患者では血中グレリン値はフィードバックの結果を見ている可能性があり，胃内グレリン発現状況は，より正確な個別グレリンプロファイルを現している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In obese patients, the number of GPCs (ghrelin positive cells) was greater than in non-obese patients. This study showed that the number of GPCs could be a prognostic factor for the surgical results of LSG and represent an individual ghrelin profiles more accurately than circulating ghrelin levels.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：代謝栄養外科学、胃十二指腸外科学

## 1. 研究開始当初の背景

内科的治療抵抗性単純性肥満が外科療法の適応であるが，単純性肥満における消費カロリーを超える過食行動・食欲について，食欲関連ホルモンであるグレリンに関する研究は進んでいない。血中グレリン値はBMIに逆相関するため，病的肥満症患者において血中グレリン値が低いことがすでに証明されている一方，病的肥満症患者の食欲は旺盛であることも周知である。外科療法における術式の多くは胃バイパス術や胆膵路バイパス術，胃バンディング術など，胃切除を伴わない術式であり，肥満患者の胃組織が研究される機会はなかった。一方，最近注目を浴びている袖状胃切除術（腹腔鏡下袖状胃切除術 laparoscopic sleeve gastrectomy:LSG）は胃切除を伴う術式であり，我々はその切除検体に着目した。肥満患者切除胃には非常に多数のグレリンペプチド陽性細胞を認め，一方

でこれらの患者は血液検査で低グレリン血症を呈することを発見した。これらの所見，乖離機序の解明は，他ならぬ単純肥満の異常食欲の原因につながる可能性が高いと考えた。さらに単純性肥満症の原因解明は，新たな治療薬の開発につながる可能性がある。○これまでの研究成果一：ヒトのグレリンは胃にもっとも多く90%を占め，グレリン産生細胞は胃では酸分泌腺のある胃体部に多く，管腔とは接していない閉鎖型内分泌細胞であることはすでに報告されている。グレリン細胞は胃底腺，壁細胞近傍に存在するとされているが，実際グレリン細胞の存在領域と胃底腺領域との一致程度や胃病変（胃炎，ピロリ感染，胃癌）が存在する場合グレリン細胞がどのように存在するかはわかっていない。欧米では胃癌が少なく胃切除例が本邦と比べて少ないことも原因の一つと思われる。よって，ヒト胃におけるグレリン細胞の存在

領域の確認および胃病変とグレリン細胞との関係を調べる目的で、当科において胃癌に対して行われた胃切除検体を用いて、これをホルマリン固定・全割し、抗グレリン抗体による免疫染色（グレリン細胞の Mapping）を行った。光学顕微鏡 100 倍視野において平均グレリン細胞数をカウントし、エリア分類（Extra rich area:40 個以上，Rich area:20-40，Middle :1-20，Poor1 未満）したところ、胃体部大彎および穹窿部にグレリン細胞数が多いことが確認できた。またピロリ感染や胃炎があるとグレリン細胞数が少ないことが確認できた。同様の免疫染色を病的肥満症患者袖状胃切除検体 2 例に対して施行したところ、全領域が Extra Rich area と診断され、またその細胞数は胃癌切除検体よりも明らかに多かった。一方で、報告されている通り、血中グレリン値は極めて低く（Total グレリン値:14.0fmol/mL，active グレリン値 2.9fmol/mL），胃全摘後とほぼ同程度であった（当科ですでに胃切除後における血中グレリン値の推移については報告している :Gastroenterology 2010;138:1312 - 1320）。袖状切除を受けた肥満症患者は両者とも食欲が極めて旺盛であり、血中グレリン値、食欲との間に乖離があり、また血中グレリン値と胃内グレリン細胞数との間にも乖離があることを発見した。

## 2. 研究の目的

(1) 単純性肥満患者におけるグレリン細胞数の多寡の検証：現段階では単純性肥満患者 2 症例はいずれも若年かつ胃疾患がない状態であり、同一背景での非肥満患者の胃検体と比較し、グレリン細胞数の検証が必要である。袖状胃切除によって得られた検体と、背景因子が類似した胃癌胃切除検体とグレリン細胞数の比較を行う。背景因子として、ピロリ感染、慢性胃炎の有無、胃内視鏡上の萎縮変化の程度をあげ、同様に標本においてもそれらの程度を評価し、単純性肥満患者においてグレリン細胞数が異常に多いのかどうかを検証する。

(2) 単純性肥満患者における血中グレリン値、食欲、グレリン細胞数の関係の検証：血中グレリン値ではなく、グレリン細胞数が食欲に相関するかどうかを検証する。

(3) 単純性肥満患者における血中グレリン値、グレリン細胞におけるグレリンペプチドと迷走神経求心路刺激の機序解明：上記(1),(2)が明らかになったとき、肥満患者においては胃内グレリンペプチドが局所的に摂食亢進に影響している可能性がある。胃から分泌されるグレリンによる摂食亢進は迷走神経末端に存在するグレリン受容体にグレリンが結合し、迷走神経求心路の電気活動を抑制することにより、空腹の情報が中枢へ

伝達されることで起こることがわかっている。この神経末端グレリン受容体に結合するグレリンは全身循環している血中グレリンペプチドが影響しているのか、それとも胃局所に存在するグレリン細胞から局所的に結合するルートがあるのか、その両者が影響するのかどうかを検証する

(4) 肥満手術としての迷走神経切断術の臨床効果

：上記(3)研究において、局所ルートが証明できるのであれば、胃袖状切除に迷走神経切断術を負荷し、肥満手術の臨床成績の改善効果が期待できるため、これを検証する

## 3. 研究の方法

(1) 病的肥満患者のグレリン細胞数の評価および臨床像評価

臨床像評価として、術前後の食欲評価、体重評価、腹囲評価、ピロリ感染の有無、萎縮評価を内視鏡にて木村・竹本分類にて全例行う。標本はホルマリン固定、全割し、グレリン抗体による免疫染色を行い、細胞数を顕微鏡学的に評価する。病的肥満患者のグレリン細胞数はかなり多いことが予想されるため、当科ですでに行われた Mapping におけるエリア分類（論文投稿中）を変更する。つまり、100 倍視野にて平均 120 個以上のグレリン細胞が存在する領域を Extra Rich area と定義し、60~120 個までは Rich area，20-60 個までは Middle area，それ以下を Poor area とする。また組織サンプルの一部にて凍結標本作製し、ここからグレリン mRNA およびグレリンペプチドを抽出する。組織サンプルの粘膜部の面積は固定する。一方で、胃癌切除患者における組織サンプルの採取、抽出も同様に行う。臨床像、グレリン細胞数、mRNA 量、ペプチド量の相関関係を検証し、病的肥満患者胃におけるグレリン産生能の亢進について評価する。血液サンプルについては、active グレリン、des-acyl グレリン値の測定を行う。同時に患者栄養評価指標としてヘモグロビン、総タンパク質、アルブミン、コレステロール、中性脂肪などと、食欲、グレリンに関係するホルモンとして、GH, Cortisol, レプチン、インスリンなどの測定を行う。

(2) 若年者における胃グレリン細胞数の評価

病的肥満患者は食欲旺盛であり、ピロリ感染や粘膜萎縮が少ない可能性が高い。このような状態のヒト胃標本は実際には手に入りにくい、病的肥満患者胃に対する Control として、当科で胃癌に対して胃切除が行われた患者のうち、35 歳以下の患者の胃標本が、もっとも Control に適していると考えられる。過去における若年性胃癌患者の切除胃で利用できるパラフィン固定切片を収集し、こちらに対しても抗グレリン抗体による免疫染

色を行い、細胞数を上記新エリア分類にて評価する。

(3) 胃内グレリンペプチド機能評価：グレリン作用機序について、以下の(図)のような経路が証明されている(胃から分泌されるグレリンによる摂食亢進は迷走神経末端に存在するグレリン受容体にグレリンが結合し、迷走神経求心路の電気活動を抑制することにより、空腹の情報が中枢へ伝達されることにより起こる)。一方図中に?で示す通り、迷走神経末端受容体に結合するグレリンペプチドは血中グレリンペプチドなのか、胃内グレリン細胞で産生されたペ



図1 グレリンのGH分泌刺激・摂食促進の作用機序

プチドが直接結合するののかについては不明である。病的肥満患者においては血中グレリン値が低いにも関わらず、食欲は極めて旺盛なため、局所的なグレリンペプチド刺激が予想される。切除胃検体を用いて、グレリン細胞集簇部を電子顕微鏡で評価し、迷走神経終末枝の存在評価を行う。つまり、グレリン細胞から分泌されたペプチドが、直接迷走神経終末枝に結合する可能性を検証する。

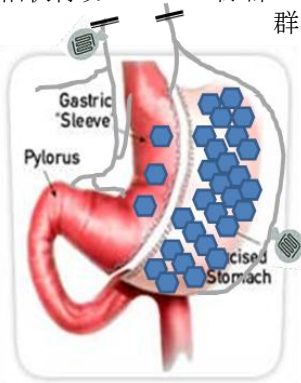
(4) 新しい肥満手術の検討：腹腔鏡下迷走神経切断袖状胃切除術(Laparoscopic Sleeve Gastrectomy with Vagotomy:LSGV) (図)：袖状切除のみで胃グレリン細胞領域が完全切除されないと考えられる。局所グレリン刺激の抑制、活性型グレリンの食前後変動の抑制、消化管運動抑制による吸収障害などを目的とし、迷走神経切断術を加えた袖状胃切除術の臨床効果(体重減少、食欲低下など)を検討する((a), (b))。

(a) レプチン遺伝子異常による肥満モデルラットに対して、(1) 袖状胃切除群

(2) 迷走神経切断(迷切群) (3) 袖状切除+迷切群の3群における臨床効果、血中グレリン値評価を行う。

(b) (a)で迷切追加による臨床効果を確認できた場合、ヒトにおける臨床試験

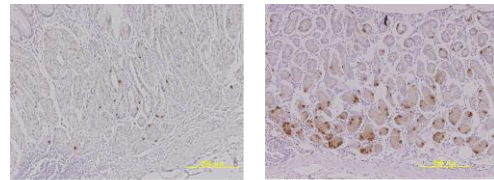
(LSG vs LSGV)を予定する。



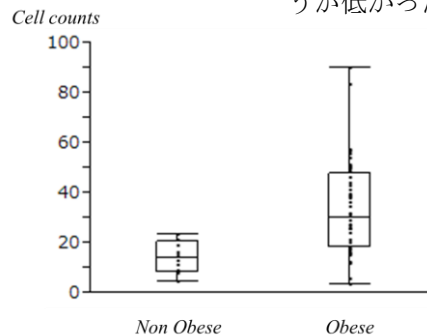
#### 4. 研究成果

(1) 肥満患者におけるグレリン細胞数の多寡の検証

腹腔鏡下袖状胃切除術(LSG)あるいは腹腔鏡下袖状胃切除バイパス手術(LSGB)を施行された52名の患者を対象に、切除胃標本に対して、抗ヒトグレリン抗体を用いた免疫染色を施行し、100倍視野におけるグレリン細胞数をランダムに10視野カウントし、その1視野あたりの平均数をグレリン細胞数(GPC数)と定義した。対照群として、胃癌に対して胃切除を施行され、肥満患者群と年齢・性別を揃えた14名の患者を設定した。結果、患者背景、グレリン細胞数の差異は図に示すとおりで、肥満患者は統計学的優位に非肥満患者よりグレリン細胞数が多いことが証明された。一方で、血中グレリン値は、肥満患者  $90.0 \pm 48.7 \text{ fmol/L}$  に対し、非肥満患者



127.6  $\pm$  70.2 fmol/L であり、肥満患者のほうが低かった。



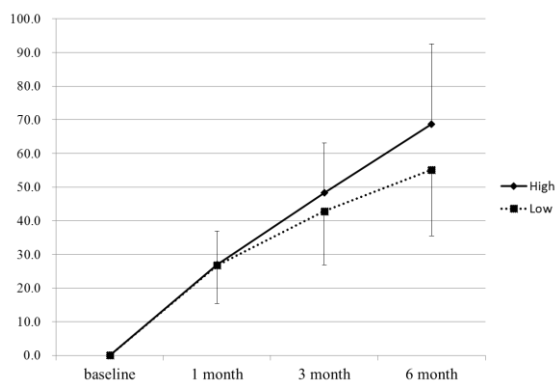
(2) 胃内グレリン発現量(グレリン細胞数)と肥満患者プロフィールの比較

肥満患者においても、グレリン細胞数には多寡がみられたことから、グレリン細胞数中央値で、肥満患者を二分化し、その患者背景および手術による臨床効果を比較検討した。結果、グレリン細胞数の多寡で、患者背景に差は認められなかった(表)。

	Ghrelin cell counts level		P value
	High	Low	
Number of patients	26	26	
Sex, male / female	9 / 17	16 / 10	0.051
Age, (years)	43.0 (23-62)	43.5 (25-65)	0.71
BMI, (kg/m <sup>2</sup> )	39.7±7.5	41.5±8.0	0.40
Excess body weight, (kg)	47.3±20.3	53.9±23.8	0.28
Infantile obesity, +/-	14 / 12	16 / 10	0.57
History of diabetes mellitus, +/-	15 / 11	19 / 7	0.24
Hyperlipidemia, +/-	15 / 11	21 / 5	0.07
hyperuricemia, +/-	11 / 15	10 / 16	0.78
LSG / LSGB	18 / 8	17 / 9	0.76

	Ghrelin cell counts level		P value
	High	Low	
Total cholesterol, mg/dL	192.5±38.2	190.4±50.5	0.65
Triglycerides, mg/dL	153.3±95	135.2±56.0	0.65
Fasting glucose, mg/dL	115.8±28.5	124.2±31.0	0.27
HbA1c, %	6.4±1.2	6.6±1.4	0.52
Urinic acid, mg/dL	6.8±1.3	6.4±1.2	0.16

一方で、手術に伴う体重減少効果は有意に、グレリン細胞数が多い群で高く、胃内グレリン細胞数が多い群は、袖状切除により体重減少効果が大きいことが示された(図: 超過体重減少率推移)。間接的ではあるが、グレリンペプチド刺激は血中を介さずに、胃内で局所的に迷走神経に伝達されている可能性が示唆された。今後、電子顕微鏡を用いた基礎評価も行っていく予定である。



(超過体重減少率推移)

### (3) 手術効果予測因子としての胃内グレリン発現量

研究成果(2)のように、胃内グレリン発現量が多いほど、体重減少効果が大きいことから、術前胃内グレリン発現量を評価することにより手術効果を予測できる可能性が存在する。今回の研究において、利用可能な22検体については、グレリン mRNA を抽出し、mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。mRNA 発現量は、グレリン細胞数と関連したことから、術前に上部消化管内視鏡にて胃粘膜を採取できれば、ここからグレリン mRNA 発現量を測定することで、袖状切除術の臨床効果予測につながる可能性が示唆された。今後、これらの結果に加えて、迷走神経切離術を追

加することによる、さらなる臨床効果の改善を期待した臨床研究を検討中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- (1) Takiguchi S, Adachi S, Yamamoto K, Morii E, Miyata H, Nakajima K, Yamasaki M, Kangawa K, Mori M, Doki Y. Mapping analysis of ghrelin producing cells in the human stomach associated with chronic gastritis and early cancers. *Dig Dis Sci*. 2012 May; 57(5):1238-46.
- (2) Takiguchi S, Hiura Y, Miyazaki Y, Takata A, Murakami K, Doki Y. Clinical trial of ghrelin synthesis administration for upper GI surgery. *Methods Enzymol*. 2012;514:409-31

[学会発表] (計2件)

- (1) 宮崎 安弘 他。腹腔鏡下袖状胃切除術とグレリン。第30回日本肥満症治療学会学術集会。2012/6/2
- (2) 宮崎 安弘 他。腹腔鏡下袖状胃切除術における2型糖尿病改善効果とグレリンホルモン。第67回日本消化器外科学会総会。2012/07/20

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 安弘 (MIYAZAKI YASUHIRO)

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任研究員

研究者番号: 00571390