

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861188

研究課題名(和文) グレリン活性化制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Perturbation of acyl ghrelin profile following liver transplantation

研究代表者

村上 剛平 (Murakami, Kohei)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60621612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食欲増進作用を有するグレリンは、アシルグレリン(活性型グレリン：AG)とデアシルグレリン(不活性型グレリン：DG)が存在する。肝移植後早期の食欲不振や低栄養に、周術期のグレリン代謝の変化が関与していると仮説し、肝移植前後の患者サンプルを用いてAG値を測定した。また同患者血清を用いてin vitroでAG代謝について検討した。

移植前はAG値が有意に上昇し、移植後にAG値が減少した。移植前患者の血清サンプル中では有意にAG代謝が低下していた。コリンエステラーゼ値がA/T比(アシル/トータルグレリン比)と逆相関しており、AG代謝に関わる酵素である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A significant problem to be solved for patients after liver transplantation (LT) is malnutrition with anorexia in the early post-transplant period. We hypothesized that this problem was due to the change in ghrelin metabolism during LT. We examine the balance of acyl- and desacyl ghrelin (AG, DG) and the dependence of the regulation mechanism on hepatic-related enzymes in patients during LT. AG, DG, and Acyl-/total ghrelin (A/T) concentrations in blood samples were measured in patients with liver failure (LF) and patients after LT. In vitro assays using synthetic AG for assessment of de-acylation activity in serum were performed.

The AG levels and A/T ratios significantly increased in the patients with liver failure and decreased after LT because of changes in the de-acylating activity in peripheral blood. Cholinesterase (BuChE) could be an important enzyme responsible for de-acylation of AG in blood.

研究分野：消化器外科

キーワード：アシルグレリン アシルグレリン 肝移植

### 1. 研究開始当初の背景

グレリンは成長ホルモン(GH)分泌促進因子受容体の内因性リガンドとしてヒトとラットの胃より同定された 28 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである。グレリンは様々な生理作用を有するペプチドホルモンで、GH 分泌促進作用だけではなく、食欲亢進作用、胃排出機能促進作用、心拍出量増加作用、抗炎症作用などの作用を有する(図 1)。このような本来の生理作用を有するのはアシルグレリン(活性型グレリン)であるが、グレリンは 3 番目のセリン残基の側鎖が脂肪酸のオクタン酸で修飾(アシル化)されることではじめて活性のあるアシルグレリンとなる。

グレリンは主に胃に存在するグレリン細胞で産生される。グレリン前駆体の一部は GOAT(オクタン酸を結合する酵素)によりアシル化されアシルグレリンとして血中に放出される(アシル化されないものは非活性型のデスアシルグレリンとして放出される)。しかしながら、末梢血中でのアシルグレリンは約 10%に過ぎず、大部分は脂肪酸が外れた非活性型のデスアシルグレリンに代謝されている。

我々は六君子湯の投与により活性型グレリンが上昇するという報告をしているが(Gastric Cancer 2013)、これはグレリンの脱アシル化(非活性化)の阻害作用が関与している。また、肝機能障害患者においてグレリン値が異常をきたす報告がなされており、さらに我々の臨床検体から肝不全患者は高アシルグレリン血症状態であるという知見を得ており、肝臓由来の脱アシル化を促す分解酵素阻が存在するのではないかと考えた。以上のことから末梢血中でのグレリンの脱アシル化を抑制することにより、生理作用を有する活性型のアシルグレリンを増加させることができるのではないかと仮説した。グレリンの脱アシル化には何らかの酵素(エステラーゼなど)の関与が想定されるが、現在まで創薬に至るような具体的な標的は明らかではない。我々はこれまでに上部消化管とグレリンについて、アシルグレリンの投与を行い、その有用性と効果を確認している。胃全摘術後、食道亜全摘術後において食事量と体重減少抑制効果を認めたこと(Gastroenterology 2010, Surgery 2010)、食道癌化学療法有害事象を抑制したこと(Cancer 2012)、食道癌周術期に抗炎症作用を認めたこと(Annals of surgery 2014 accept)を報告している。しかしながらグレリン創薬については、リコンビナントには安定した製剤化、グレリン類似低分子作動薬には副作用などの問題がある。グレリンの非活性化を抑制するという新しいメカニズムは内因性グレリンを用いた新たなグレリン関連治療に応用できると考えられ、本研究を行うことを提案した。

### 2. 研究の目的

肝臓は様々な物質の代謝に関与しており、グレリンの代謝にも関与していると考えられる。そこで、臨床上問題とされている、肝移植後早期の食欲不振や低栄養に、グレリン代謝の変化が関与していると仮説し、肝機能障害患者(肝移植前後の患者)を対象として、グレリンの脱アシル化(非活性化)メカニズムを解明することとした。とくに、肝臓由来の脱アシル化酵素やその阻害作用がグレリン活性制御機構にどのように関わるかを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 対象とサンプルの採取

肝機能障害患者におけるグレリン動体の検討をおこなった。肝移植待機症例含む肝不全(肝移植前)症例(n=15)、肝移植後症例(n=15)、コントロールとして大腸癌術前症例(n=10)を対象とした。空腹時の血液を採取し、採血直後に遠心分離を行い、血漿は塩酸を加えアシルグレリンの失活を抑制したのち凍結保存した。血清は遠心分離後に凍結保存した。

#### グレリンおよび肝機能指標の測定

ELISA(Ghrelin ELISA Kit: SCETI company)によりアシルグレリン、デスアシルグレリンを測定した。肝機能指標となる生化学検査も同時に行った。

なお、トータルグレリンと A/T 比(トータルグレリンに対するアシルグレリンの割合)は以下の方法で計算した。

トータルグレリン = アシルグレリン + デスアシルグレリン

A/T 比 = (アシルグレリン / トータルグレリン) × 100

#### 血中におけるグレリン脱アシル化酵素の検討

本研究では脱アシル化酵素として、文献的な考察および、肝機能と相関する代謝酵素としてコリンエステラーゼに着目して検討を行った。対象症例のコリンエステラーゼを測定し、肝機能との関連を評価した。また、コリンエステラーゼとアシルグレリン、デスアシルグレリン、A/T 比との関連について検討を行った。

#### 肝臓移植前後でのグレリン値の変動

肝臓移植前後でのグレリンと酵素の変動についても検討を行った。肝不全症例の 15 例中 5 例において肝臓移植前後で血液サンプルを採取した。移植前、移植後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月の血液サンプルを用いて、アシルグレリン、デスアシルグレリンを測定した。コリンエステラーゼの測定も同時に行った。

#### グレリン脱アシル化試験(in vitro)

肝不全症例とコントロール症例の血清を用いて、血清中でのアシルグレリンの脱アシル化について検討した。各血清中にアシルグレリン(グレリン製剤)を加え、一定時間(0 分、30 分、90 分)インキュベーションを行い、

アシルグレリンをELISAにて測定し、アシルグレリンの脱アシル化(代謝)される割合を測定した。

脱アシル化酵素阻害薬によるグレリン安定性試験 (in vitro)

コリンエステラーゼ阻害剤を用いて、アシルグレリンの非活性化(代謝)が抑制される割合を検討した。健常人(肝機能が正常)の血清にアシルグレリンを加え、さらにコリンエステラーゼ阻害剤を加えた。コントロールにはコリンエステラーゼは加えずに、両群を一定時間(120分)インキュベートした。アシルグレリンをELISAにて測定し、アシルグレリンの非活性化(代謝)される割合(残存する割合)を測定した。

#### 4. 研究成果

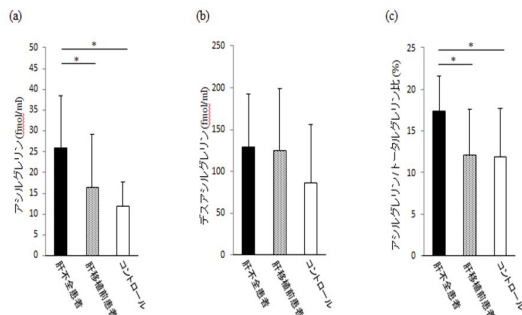
肝不全(移植前)患者、肝移植後患者、コントロールのグレリン濃度

対象の肝不全(移植前)患者、肝移植後患者、コントロールの全症例においてサンプル採取可能であった。BMIが肝移植後患者において低かった。肝不全患者は他の2群に比べ肝機能が悪く、肝移植後患者において肝機能が改善していた。また、肝不全患者は他の2群に比べGH(成長ホルモン)が高く、IGF-1が低値であった。

|                           | 肝不全患者<br>(n=15) | 肝移植後患者<br>(n=15) | コントロール<br>(n=10) |
|---------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 年齢                        | 54±7.1          | 56±8.3           | 63±10.9*         |
| 性(M/F)                    | 9/6             | 8/7              | 4/6              |
| BMI                       | 25.4±4.4        | 21.4±2.9*        | 23.4±3.7         |
| 肝機能                       |                 |                  |                  |
| Plt (10 <sup>3</sup> /μl) | 96.1±76.5       | 156.8±90.5*      | 217.2±68.2*      |
| PT (%)                    | 43.5±12.7       | 86.6±14.1*       | 99.9±7.2*        |
| ALT (U/L)                 | 26.1±11.9       | 44.5±58.2        | 18.2±11.1        |
| T-bil (mg/dl)             | 4.4±3.5         | 0.9±0.7*         | 0.6±0.22*        |
| Alb (g/dl)                | 2.6±0.5         | 3.9±1.1*         | 4.1±0.32*        |
| Cr (mg/dl)                | 1.1±0.6         | 1.4±1.5          | 0.8±0.2          |
| GH(ng/ml)                 | 3.7±2.4         | 1.72±1.9*        | 0.6±0.7*         |
| IGF-1(ng/ml)              | 36.9±41.9       | 142.0±77.3*      | 134.9±44.9*      |
| Child-Pugh A/B/C          | 0/3/12          |                  |                  |
| MELD scor                 | 18±5.9          |                  |                  |

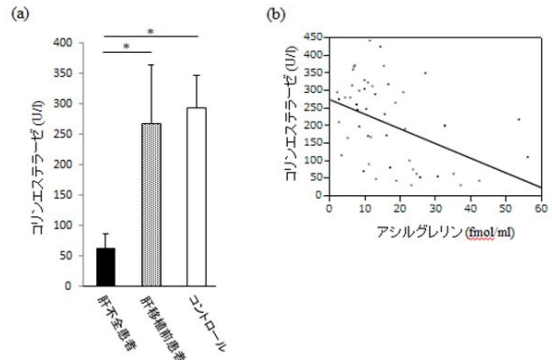
肝不全患者は他の2群に比べアシルグレリンとA/T比が有意に高値であった。肝移植後患者とコントロールで差は認めなかった。デスアシルグレリンは3群間で差は認めなかった。

これらの結果から、重度の肝不全の状態ではアシルグレリンの割合が著明に上昇し、肝機能が改善すると低下することが示され、グレリンの代謝に肝臓が関与していることが示唆された。



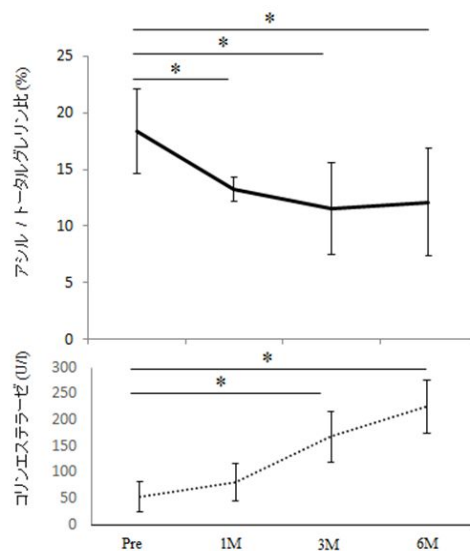
#### 脱アシル化酵素とグレリン

脱アシル化(代謝)酵素としてコリンエステラーゼとグレリンの関係を検討した。コリンエステラーゼは肝不全患者において他の2群に比べ有意に低値であった。また、コリンエステラーゼはアシルグレリンとA/T比に逆相関を示した。デスアシルグレリンとは相関を示さなかった。



また、肝移植前・後でサンプルを採取した5例で、グレリン(A/T比)とコリンエステラーゼの推移を検討すると、肝移植前に比べ肝移植後にはA/T比は有意に低下し、コリンエステラーゼは有意に上昇するという経過を示した。

これらの結果から、肝不全患者の血中では脱アシル化酵素であるコリンエステラーゼが低下しており、アシルグレリンの脱アシル化が低下していることが示唆された。

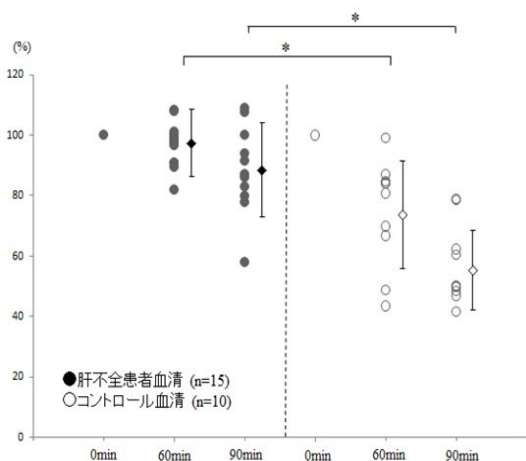


#### 血中での脱アシル化作用

上記結果をふまえ、コリンエステラーゼ濃度が低下した肝不全患者血清を用いて、アシルグレリンの脱アシル化作用をin vitroで検討した。

肝不全患者、コントロールの両血清中で継続的に脱アシル化を認めたが、インキュベート60分後、90分後ともに肝不全患者の血清中での脱アシル化が有意に抑制されていた。

これらの結果から、肝不全患者の血清中でアシルグレリンは脱アシル化（非活性化）されにくいことが示された。



脱アシル化酵素阻害薬によるアシルグレリン安定性の向上

健常人の血清にアシルグレリンを加えてインキュベートしただけのコントロールに比べ、さらにコリンエステラーゼ阻害薬（Physostigmine）を加えてインキュベートした方では、有意にアシルグレリン値が高く、デスアシルグレリン値が低かった。

これらの結果から、アシルグレリンがデスアシルグレリンへと脱アシル化される割合が抑制された、つまりアシルグレリンの安定性が向上したことが示された。

#### 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 7 件)

1. Takiguchi S, Takata A, Murakami K, Miyazaki Y, Yanagimoto Y, Kurokawa Y, Takahashi T, Mori M, Doki Y. Clinical application of ghrelin administration for gastric cancer patients undergoing gastrectomy. *Gastric Cancer* 17(2):200-205, 2014
2. Takiguchi S, Murakami K, Yanagimoto Y, Takata A, Miyazaki Y, Mori M, Doki Y. Clinical application of ghrelin in the field of surgery. *Surg Today* [Epub ahead of print], 2014
3. Takata A1, Takiguchi S, Murakami K, Miyazaki Y, Miyata H, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Nakajima K,

Mori M, Kangawa K, Doki Y. Effects of ghrelin administration on the early postoperative inflammatory response after esophagectomy. *Surg Today* [Epub ahead of print], 2014

4. Takata A1, Takiguchi S, Miyazaki Y, Miyata H, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Nakajima K, Mori M, Kangawa K, Doki Y. Randomized Phase II Study of the Anti-inflammatory Effect of Ghrelin During the Postoperative Period of Esophagectomy. *Ann Surg.* [Epub ahead of print], 2014

5. 瀧口修司、宮崎安弘、村上剛平、柳本喜智、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、宮田博志、森正樹、土岐祐一郎 胃切除とグレリン 胃癌 perspective 2014.10/ Vol.7-No.3: 162-169, 2014

6. 柳本喜智、宮崎安弘、瀧口修司、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、宮田博志、中島清一、森正樹、土岐祐一郎 食道切除術後体重減少患者に対するグレリン投与の臨床試験 外科と代謝・栄養 Vol. 48 (2014) No. 5 p. 159-164

7. 宮崎安弘、瀧口修司、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、宮田博志、中島清一、森正樹、土岐祐一郎 腹腔鏡下スリーブ状胃切除術とグレリン 月刊糖尿病 2014/5 Vol.6 No.4: 54-59, 2014

〔学会発表〕(計 5 件)

村上剛平、瀧口修司、宮崎安弘、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、宮田博志、中島清一、森正樹、土岐祐一郎：肝移植患者を含む肝機能障害患者におけるグレリンの検討 第114回日本外科学会定期学術集会、京都、4月3日 2014年

村上剛平、瀧口修司、宮田博志、高田晃宏、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、中島清一、森正樹、土岐祐一郎：食道癌周術期におけるグレリンの侵襲抑制効果に関するランダム化第II層臨床試験 第68回日本食道学会学術集会、東京、7月3日 2014年

宮崎安弘、瀧口修司、関洋介、笠間和典、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、宮田博志、中島清一、森正樹、土岐祐一郎：肥満症患者における胃内局所グレリン発現状況の臨床的意義 第114回日本外科学会定期学術集会、京都、4月3日 2014年

宮崎安弘、瀧口修司、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、宮田博志、中島清一、森正樹、土岐祐一郎：胃切除患者に対するグレリン補充療法臨床試験 第22回日本消化器関連学会週間、

神戸、10月23日 2014年

高田晃宏、瀧口修司、山本和義、宮崎安弘、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、宮田博志、中島清一、森正樹、土岐祐一郎：食道癌手術におけるグレリンの侵襲抑制効果 日本外科代謝栄養学会第53回学術集会、大阪、7月4日 2014年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上剛平 (Murakami Kohei)  
大阪大学医学部附属病院・医員  
研究者番号：60621612

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：