

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591145

研究課題名（和文）発達障害に対する神経内分泌ホルモン「グレリン」の関与とその治療効果

研究課題名（英文）Clinical and basic studies on the dynamics of ghrelin in Rett syndrome (RTT) together with a pilot-study on the clinical implication of ghrelin for the treatment of RTT-patients.

研究代表者：西 芳寛 (NISHI YOSHIHIRO), 久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20352122

研究成果の概要（和文）：Rett 症候群（RTT）は代表的な発達障害疾患である。本研究では RTT 症例と RTT モデルマウス（RTT マウス）における神経内分泌ホルモン「グレリン」の産生・分泌動態と、グレリン投与による RTT マウスへの治療効果について検討した。結果、摂食・消化管運動障害をもつ RTT 症例で血中グレリン濃度が低下しており、RTT マウスでもグレリンの産生低下が確認された。RTT マウスへのグレリン投与で一定期間内での身体症状の改善が確認された。RTT 症例に対するグレリン投与療法の有効性が推定された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the dynamics of ghrelin production in patients with Rett syndrome (RTT) together with that in mecp2-null mouse model of RTT (RTT-mouse). We also examined the effectiveness of “ghrelin-injection” on several clinical symptoms of RTT by using this RTT-mouse. Plasma levels of ghrelin were significantly lower in RTT patients with eating disorder or patients with insufficiency in gastro-intestinal movement. Deregulation of ghrelin production was also noted in the RTT-mouse. Daily injection of ghrelin into the RTT-mouse ameliorated the clinical symptom of them including “tremor”, “gait disturbance”, “hindlimb clasping” and “malnutrition” (body weight loss) from 6-9 weeks age. These findings of us support the future implication of “ghrelin-treatment” against several clinical symptoms typically seen in RTT patients.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：発達小児科学, Rett 症候群, グレリン, 神経内分泌調節

1. 研究開始当初の背景

Rett 症候群（RTT）は、生後一定期間の正常発育の後に身体・精神機能を喪失する疾患で、メチル化による遺伝子発現に関連した転写調節因子「mecp2」の異常が、その発症原因の 80%を占める。脳の発達障害、てんかん、

呼吸運動の調節障害など、典型的な身体症状に加えて、多くの RTT 症例には発育障害、摂食障害、消化管運動障害、自律神経障害が認められ、その一部は、神経内分泌ホルモン「グレリン」の生理作用である「摂食調節」、「発育調節」、「自律神経調節」、「消化管運動

調節」等と重複しており、RTT 症例における「グレリン作用の障害」が推測される。

2. 研究の目的

Rett 症候群 (RTT) の症例と RTT モデルマウス (RTT マウス) におけるグレリンの産生・分泌異常の有無を検討し、グレリン補充による RTT 症例への治療効果の有無を検討する。具体的には以下の4点について検討する。

- ①. RTT 症例におけるグレリンの産生・分泌調節異常の有無について検討する
- ②. RTT 症例の血中グレリン濃度と、各症例の臨床症状との相関を検討する。
- ③. RTT マウスにおけるグレリン産生・調節異常の有無について検討する。
- ④. グレリン補充が RTT マウスの生命予後、病状を改善するか否か検討する。

3. 研究の方法

①. RTT 症例の血中グレリン濃度の検討 : RTT 女児 32 症例から早朝空腹時に採血して、血中グレリン濃度 (活性型グレリン, 総グレリン濃度) を RIA にて測定。症例の血中濃度は性別・年齢を一致させたコントロール (健康者) の血中濃度と比較・検討した。年齢に伴う血中グレリン濃度の推移について、RTT 症例とコントロール間で比較・検討した。RTT 症例の遺伝子異常 (*mecp2* の蛋白コード領域) について解析し遺伝子異常のタイプと血中グレリン濃度との相関を検討した。

②. RTT 症例の臨床症状と血中グレリン濃度の相関 : 早朝空腹時血中濃度を測定した RTT 症例の各々について、呼吸リズム障害, 睡眠障害, 自律神経障害 (手先の血管反射), てんかん, 摂食行動障害, 消化管運動障害 (排泄障害) について調査して、各症状の有無と血中グレリン濃度の関連を検討した。

③. RTT マウスのグレリン産生・分泌動態の検討 : RTT マウスの血中・胃内・脳内グレリン濃度を測定し、コントロール (同腹兄弟の野生型マウス) と比較・検討した。RTT マウスの脳内のグレリン遺伝子, グレリン活性・不活性化酵素遺伝子の発現量について、RT-PCR 法で解析し、コントロールと比較・検討した。

④. RTT マウスの生命予後, 病状へのグレリン投与の影響 : 6 週齢の RTT マウスに 3.0 $\mu\text{g}/\text{body}$ でオクタン酸修飾型グレリンを連日投与 (腹腔内) して、マウスの身体症状 (歩行, 歩幅, 振戦, 呼吸リズム, 後脚反射)、体重変化、生存日数について記録。各身体症状をスコア化して、1 週間単位で総スコアを計測し、グレリン投与群・非投与群 (生食群) で比較・検討した (各群 $n=25$)。

4. 研究成果

①. RTT 症例の血中グレリン濃度 : RTT 症例の血中グレリン濃度は、活性型グレリン ($p<0.01$), 総グレリン ($p<0.05$) とともに、性別・年齢を揃えたコントロールより有意に低値であった。年齢に伴う血中濃度の変化についても、活性型・総グレリンとともに RTT とコントロール群の間に有意な違いが確認された。採血した RTT32 症例中の 28 症例 (87.5%) で *mecp2* 蛋白の遺伝子異常が確認されたが、遺伝子異常のタイプと血中グレリン濃度の相関は確認できなかった。

②. RTT 症例の臨床症状と血中グレリン濃度の相関 : 摂食障害 ($p<0.01$) と消化管運動異常 ($p<0.05$) を有する RTT 症例の血中グレリン濃度 (総グレリン濃度) は、上記の症状を認めない RTT 症例の血中濃度より有意に低値であった。呼吸リズム異常, てんかん, 睡眠障害, 自律神経症状の有無と血中グレリン濃度の間には、明らかな相関はなかった。

③. RTT マウスのグレリン産生・分泌動態の検討 : RTT マウス (7-8 週齢♂) の血中総グレリン濃度は、同週齢の野生型マウス (同腹兄弟) の血中濃度より有意 ($P<0.05$) に低下していた。胃内の総グレリン含量には差を認めなかったが、脳内の活性型グレリン含量 (デカン酸修飾型グレリン) は RTT マウスで有意に ($p<0.01$) 低下していた。グレリン脱アシル化・不活性化酵素 (APT-1) の遺伝子発現量が RTT マウスの脳内で有意に上昇 ($p<0.05$) していた。グレリン不活性化 (脱アシル化) の亢進が、脳内の活性型グレリン量の低下に影響すると推定された。

④. RTT マウスの生命予後, 病状へのグレリン投与の影響 : グレリン投与による生命予後の有意な改善は認めなかったが、生後 6 週齢からのグレリン連日腹腔内投与で、RTT マウスの身体症状 (総スコア) は、投与開始後から 3 週間に渡り有意 ($p<0.05$) に改善した。計測に用いた RTT マウスの平均寿命は 9-10 週齢であり、全生存期間の 1/3 程度の期間で病状 (身体所見) が改善されたことになる。さらに、身体スコアの変化から推定される「突然死」の割合が、グレリン投与によって低下する傾向が確認された (χ 自乗解析)。

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 10 件)

①. Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y, Yabuki A. : Different A-type Natriuretic Peptide Level in Five Strains of Mice., *The Journal of Veterinary*

Medical Science 74; 499-50 (2012). (査読あり)

②. Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y, Taku M, Hosoda H, Kangawa K and Kojima M. Increased production of active ghrelin is relevant to hyperphagia in nonobese spontaneously diabetic torii rats. *Metabolism (clinical and experimental)* 61; 491-495 (2012). (査読あり)

③. Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y and Yabuki A. : A-type natriuretic peptide level in angiotensin II type 1a-receptor knockout mice. *Experimental Animals* 62; 31-38 (2012). (査読あり)

④. Hamada N, Nishi Y, Tajiri Y, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M and Mifune H: Disrupted regulation of ghrelin production under anti-hypertensive treatment in spontaneously hypertensive rats. *Circulation Journal* 76: 1423-1429 (2012). (査読あり)

⑤. Nishi Y, Mifune H, Kojima M, Ghrelin acylation by Ingestion of Medium-Chain Fatty Acids. *Methods in Enzymology* 514, 303-315 (Sep. 2012) (Elsevier press. Edited by Kojima M and Kangawa K). (査読あり)

⑥. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Yoh J, Takahashi S, Nagamitsu S, Kakuma T, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T.: Ghrelin levels are reduced in Rett syndrome with eating difficulties. *International Journal of Developmental Neuroscience* 29; 899-902 (2011). (査読あり)

⑦. Nishi Y, Yoh J, Hiejima H and Kojima M.: Structures and molecular forms of ghrelin family peptides. *Peptides (an International Journal)* 32 (11) ; 2175-2182 (2011). (査読あり)

⑧. Satou M, Nishi Y, Yoh J, Sugimoto H et.al, Identification and characterization of acyl-protein thioesterase-1/lysophospholipase-1 as a ghrelin deacylation enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinology* 151 (10); 4765-4775 (2010). (査読あり)

⑨. Qiu Y, Yanase T, Hu H, Tanaka T, Nishi Y et al., Dihydrotestosterone suppresses foam cells formation and attenuates atherosclerosis development. *Endocrinology* 151 (7); 3307-3316 (2010). (査読あり)

⑩. Nonoshita A, Nishi Y, Takushima S, Dynamics of placental ghrelin production and

its receptor expression in a Dahl salt-sensitive rat model of intrauterine growth restriction. *Placenta* 31 (3); 358-364 (2010). (査読あり)

【学会発表】(計 16 件)

①. 田尻祐司, 西 芳寛, 原 健人, 平田留美子, 御船弘治, 肥満糖尿病モデル SDT fatty ラットにおける過食とグレリン分泌動態、第 27 回日本糖尿病肥満動物学会 (2013.2.22-23、東京)

②. 松石豊次郎, 西 芳寛、グレリン補充によるレット症候群への治療効果の検討、厚生労働省障害者総合対策事業「レット症候群の早期診断と治療をめざした総合的研究」・伊藤班 第 2 回班会議 (2012.12.15、大阪)

③. 松石豊次郎, 角間辰之, 西 芳寛, 原 宗嗣、レット症候群の臨床研究と生物マーカーの確立、厚生労働省障害者総合対策事業「レット症候群の早期診断と治療をめざした統合的研究」H24 年度第 1 回班会議 (2012.8.26、東京)

④. 西 芳寛, 平田留美子, 御船弘治, 細田洋司, 寒川賢治, 馬田敏幸, 田中永一郎, 児島将康, 松石豊次郎、レット症候群モデルマウスにおけるグレリンの産生分泌動態とグレリンの治療応用、第 39 回 日本神経内分泌学会学術集会 (2012.9.28-29、北九州)

⑤. 濱田直和, 西 芳寛, 田尻祐司, 細田洋司, 寒川賢治, 児島将康, 御船弘治、自然発症高血圧ラットにおける血圧調節とグレリン産生分泌調節の相互作用の障害について、第 12 回 日本内分泌学会九州地方会 (2012.8.25、久留米)

⑥. 佐藤元康, 杉本博之, 西 芳寛、血中グレリン切断酵素の精製と分解産物の生理活性、第 54 回日本脂質生化学会、(2012.6.7-6.8、福岡)

⑦. Hara M, Nishi Y, Hirata R, Yoh J, Matsuishi T., Plasma ghrelin and serum IGF-1 levels in patients with Rett syndrome and its relationship to the head growth. 12th International Child Neurology Congress. (2012.5.27-6.1、Australia)

⑧. Nishi Y.: The role of ghrelin in patients with RTT and mecp2-null mouse model of RTT.、
Rett Syndrome Symposium in Fukuoka 第 115
回 日本小児科学会学術総会サテライトシン
ポジウム (2012.4.22、福岡)

⑨. 西 芳寛, 原 宗嗣, 松石豊次郎、レット
症候群の臨床的・基礎的研究、レット症候群
シンポジウム 2011: レット症候群の基礎・臨
床研究から治療へ (厚労省科学研究費難治性
疾患克服研究事業) (2011.12.4、大阪)

⑩. 原 宗嗣, 西 芳寛, 山下裕史朗, 田中永一
郎, 児島将康, 松石豊次郎、レット症候群の
低グレリン血症と臨床症状との関連、
第 111 回 九州医師会総会・医学会 (2011.
11.19-20、佐賀)

⑪. 田尻祐司, 御船弘治, 西 芳寛、2 型糖尿
病モデル spontaneously diabetic Torii
(SDT) ラットの食行動異常における活性型
グレリン産生過剰の関与、第 19 回 西日本肥
満研究会 (2011.7.16-17、福岡)

⑫. 原 宗嗣, 葉 純子, 西 芳寛, 松石 豊次郎
ほか、Mecp2 遺伝子変異をもつレット症候群
患者の血漿中グレリン濃度の検討、
第 53 回 日本小児神経学会総会 (2011.5.26、
横浜)

⑬. 西 芳寛, 原 宗嗣, 葉 純子, 細田洋司,
御船弘治, 松石豊次郎 ほか、Plasma
concentrations of ghrelin in patients with Rett
syndrome, together with their relationship to
clinical manifestations.、第 84 回 日本内分泌
学会学術総会 (2011.4.21-23, 神戸)

⑭. Satou M, Sugimoto H, Nishi Y.、
Induction of early growth response ghne-1
expression by ligand activated ghrelin
receptor with LY294002-dependent but
PI3K/AKT-independent manner.、第 33 回
日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学
大会合同大会 (2010.12.7-10、神戸)

⑮. Hara M, Nishi Y, Yoh J et.al.、Plasma
concentrations of ghrelin in patients with
Rett syndrome and its relationship to the
clinical manifestations.、33rd Annual
Meeting of the Japan Neuroscience Society
(Neuro2010) (2010.7.24-27、神戸)

⑯. 原 宗嗣, 葉 純子, 西 芳寛 ほか、
レット症候群における血漿中グレリン濃度
の検討、第 52 回 日本小児神経学会総会

(2010.5.20-22、福岡)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/read0212158/>

<http://research.kurume-u.ac.jp/>

<http://profile.kurume-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 芳寛 (NISHI YOSHIHIRO)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20352122

(2) 研究分担者

松石 豊次郎 (MATSUISHI TOYOJIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60152122

河原 幸江 (KAWAHARA YUKIE)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10279135

御船 弘治 (MIFUNE HIROHARU)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：70174117

田中 永一郎 (TANAKA EIICHIRO)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：80188284

山下 裕史朗 (YAMASHITA YUSIHIRO)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：90211630

(3) 連携研究者

児島 将康 (KOJIMA MASAYASU)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20202062

高橋 知之 (TAKAHASHI TOMOYUKI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：20332687