

## 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11日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790172

研究課題名（和文） 生理活性ペプチドキスペプチンのバイオマーカーとしての開発

研究課題名（英文） Evaluation of bioactive peptide kisspeptin as a biomarker

## 研究代表者

片桐 文彦（KATAGIRI FUMIHIKO）

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60420642

研究成果の概要（和文）：キスペプチンは、がんや性腺機能低下症、周産期疾患との関連が示唆されている生理活性ペプチドである。報告者らは血液中キスペプチン濃度を高感度に測定できる酵素免疫測定法を確立し、血液中濃度を測定することで、病態評価や早期診断に用いることができる疾患を評価した。健常人や病態別の患者の血液中濃度を測定し、評価したところ、依然症例の集積と詳細な解析が必要ではあるが、周産期疾患の早期診断に用いることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Kisspeptin is a bioactive peptide, which has been suggested to relate with cancers, hypogonadism, and perinatal disease. The author developed a sensitive enzyme immunoassay, which could measure blood kisspeptin concentrations, and tried to we identify diagnosable disease by plasma kisspeptin levels as a biomarker. Measuring and analysis of plasma/serum kisspeptin levels in healthy subjects and patients suggests that plasma kisspeptin levels are expected to be a good biomarker for perinatal complication.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ペプチド、バイオマーカー、がん、性腺機能低下症、周産期疾患

## 1. 研究開始当初の背景

2001年にヒトの胎盤から発見されたキスペプチン（メタスチン）は、54個のアミノ酸からなるペプチドで、オーファンGタンパク共役型受容体 GPR54 の内因性リガンドとして報告された。

(1) キスペプチンをコードする遺伝子は既

に腫瘍転移抑制遺伝子として発見されており、*KISS1* と名付けられていた。キスペプチンの受容体である GPR54 を強制発現させた悪性黒色腫細胞の転移を抑制したことから、キスペプチン自体の転移抑制作用が示唆されていた。現在までに、膵臓がんや乳がんなど複数のがん種に関して、病態と *KISS1*、

GPR54 遺伝子発現量との関連が報告されている。

(2) また、末梢組織では *KISS1* は胎盤に最も多く発現していることが報告され、血漿中キスペプチン濃度は妊娠の経過とともに上昇し、出産後は妊娠前と同程度まで低下することが明らかとなった。また、妊娠高血圧症候群患者では健常妊婦と比較して *KISS1* の発現量が少ないことが報告されている。

(3) さらに、GPR54 を欠損する個体を有するヒトの家系が発見され、GPR54 を欠損する個体では性成熟に達しないこと、さらに GPR54 をノックアウトしたマウスでも性成熟を示さないことが示され、キスペプチン-GPR54 系が性成熟において、きわめて重要な役割を持つことが示唆された。この他、いくつかのグループにより、ラット、マウス、サルなどでキスペプチンの投与によりゴナドトロピンの分泌が強力に促進されることがわかり、生殖内分泌学の分野でもキスペプチンの役割が注目されている。なかでも発情前期の GnRH サージには内因性のキスペプチンが必要不可欠であることが明らかされ、このペプチドが脳内では視床下部弓状核 (ARC) と前腹側室周囲核 (AVPV) に明瞭な 2 つの細胞集団を持つことも明らかになった。GnRH の分泌には、卵胞発育に必要な基底レベルの分泌であるパルスと、排卵を引き起こすための大量放出であるサージの 2 つがあり、ARC、AVPV はそれぞれ GnRH パルスとサージの中核であることが知られている。GnRH パルスとサージは各々卵巣から分泌されるエストロジェンの負及び正のフィードバックにより調節されているが、GnRH ニューロンにはエストロジェン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) が存在せず、GPR54 が発現している。一方、キスペプチンニューロンには ER $\alpha$  が存在していることから、キスペプチンは GnRH のパルスとサージ分泌の成立の鍵を握るペプチドであると考えられている。GnRH が視床下部から 1960 年代に発見されて以来、パルスとサージが卵巣の機能を調節していると考えられ、キスペプチンの中核での機能解明が、その分泌メカニズムを明らかにできるものと期待されている。

## 2. 研究の目的

キスペプチンは、がん転移抑制作用だけでなく、性分化・性成熟に関与している生理活性ペプチドである。また、視床下部において GnRH の分泌を制御することから、生殖機能を制御する事が推察されている。しかしながら、がんだけでなく、性分化異常・性成熟不全、周産期疾患といった病態との関連は十分には明らかにされていない。本研究課題では、各疾患患者におけるキスペプチンの血中濃度と病態との関連を明らかにし、バイオマー

カーとしての確立を目指すとともに、各疾患におけるキスペプチンの作用機序を探った。

## 3. 研究の方法

研究期間中、対象患者または対照被検者の血漿中キスペプチン濃度を測定し、病態との関連を解析する。

対象疾患は大別して (1) がん (膵臓がん)、(2) 周産期疾患 (妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病、多嚢胞性卵巣症候群など)、(3) 性成熟障害 (Kallmann 症候群など) とし、診断は臨床上汎用されている方法を採用した。

## 4. 研究成果

(1) 33 名 (男性 17 名、女性 16 名) の膵臓がん患者の血漿中キスペプチン濃度を測定した。手術施行症例 (8 例) について切除前と切除後の血漿中キスペプチン濃度を比較したところ (図 1)、手術前後での血漿中キスペプチン濃度は有意な差を認めなかった ( $P=0.110$ )。全症例中から手術後に再発した症例 (6 例) と、手術後再発が確認されていない症例 (7 例) に分類し、再発未確認症例については手術前後、再発症例については再発確認前後 (手術後および再発確認時) の血漿中キスペプチン濃度を比較したところ、いずれも有意差を示さなかった (図 2)。報告者らは以前、膵臓がん患者の血漿中キスペプチン濃度は健常人と比較して高値を示すこと、特に、病態別分類で手術不可能症例が有意に高値を示すことを明らかにしている。今回の症例を同年代の健常人と比較すると、手術前の値は健常人と同等の値を示すのに対し ( $P=0.082$ )、手術後の値は有意に高値を示した ( $P=0.006$ )。また、再発の有無で分類して比較すると、再発未確認症例は健常人と比較して、手術前後でいずれも有意に高値を示し (手術前  $P=0.014$ 、手術後  $P=0.024$ )、再発症例については再発確認前では健常人と同等の値を示したが ( $P=0.157$ )、再発確認時では有意に高値を示した (図 2) ( $P=0.046$ )。以前の研究で、膵臓がん患者において血漿中キスペプチン濃度が高値 (28.0 fmol/mL 以上) の群が、低値の群に比べて生存率が高いことを報告している。手術前の値が健常人と比較して同等であることは以前の報告と合致するが、手術により病巣を摘出したにも関わらず、健常人と比較して高値を示すことは以前の報告と矛盾するように思われる。術後の経過期間なども含めてさらなる検討が必要である。Dhillon らは、妊娠性トロホプラスト腫瘍の患者の血漿中キスペプチン濃度を測定し、化学療法施行後は施行前と比較して、有意に低下することを報告している。著者らも放射線治療前後での血漿中キスペプチン濃度を比較したが (20 症例)、有意差は認められなかった (結果未掲載)。患者背景、治療

効果判定が複雑で、解析が不十分であることは否めないが、キスペプチンは妊娠との関連も指摘されており、病変部位による影響も大きいと考えられる。血漿中キスペプチンが膵臓がん組織より分泌されていると仮定し、病理学的分類による血漿中キスペプチン濃度を比較した。例数のバラつきが大きく、いずれも極めて少数であったためか、いずれも有意差は認められなかった（未分化型1例、低分化型3例、中分化型14例、高分化型5例）。さらなる症例の集積が必要であると思われるが、今後の解析が期待される。

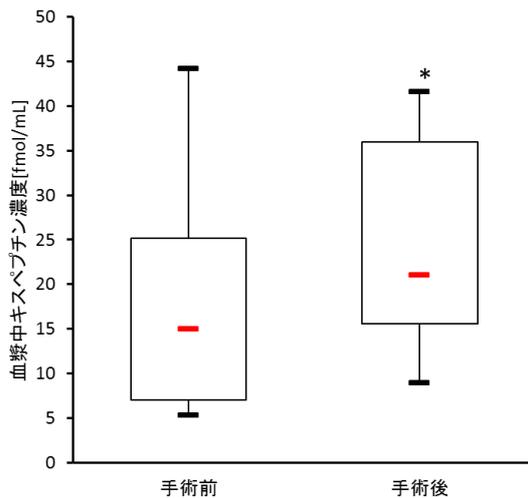


図1 手術前後におけるキスペプチン濃度

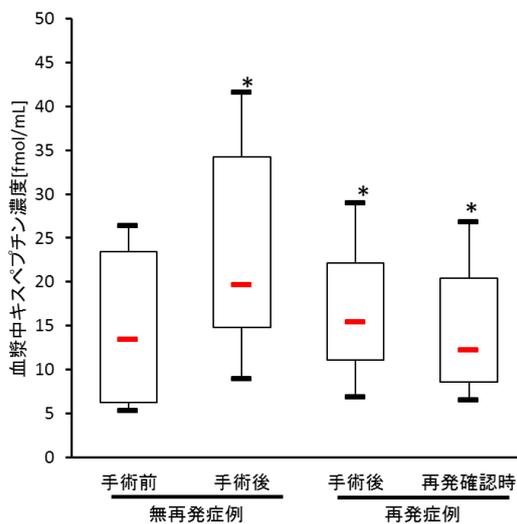


図2 再発症例におけるキスペプチン濃度

(2) 健常妊婦 (HPW、120 検体)、妊娠高血圧症候群患者 (PIH、26 検体)、妊娠糖尿病患者 (GDM、6 検体) の血清中キスペプチン濃度を測定した。血清中キスペプチン濃度は妊娠週数に比例して増加し、第3三半期には有意に高値を示した (図3)。PIH群の血清中キス

ペプチン濃度は健常妊婦同様、妊娠週数と有意な相関をもって増加したが、健常妊婦と比べて有意に低値を示した。(図4) 一方、GDM群の血清中キスペプチン濃度は妊娠週数と有意な相関がなく、健常妊婦と比べて有意に高値を示した。(図5)

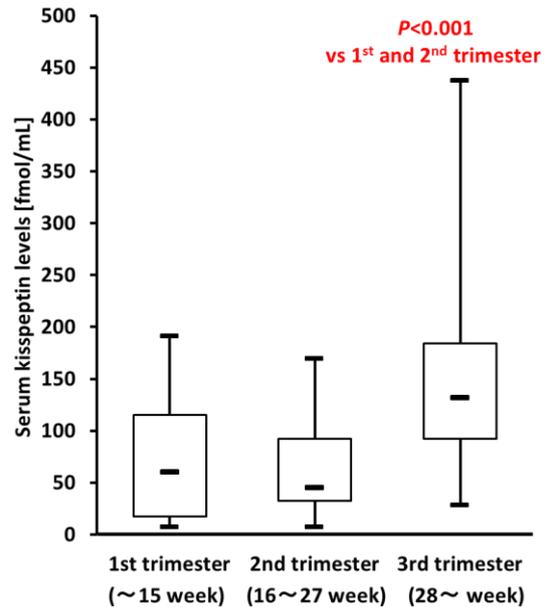


図3 妊娠週数とキスペプチン濃度

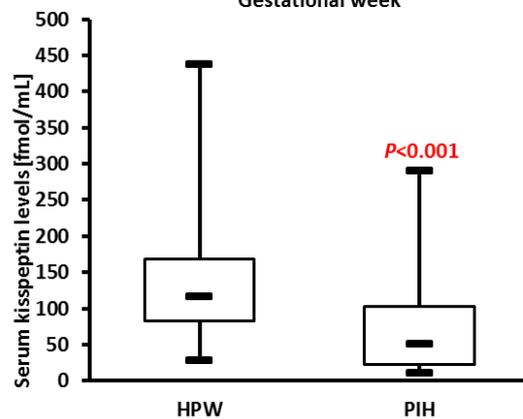
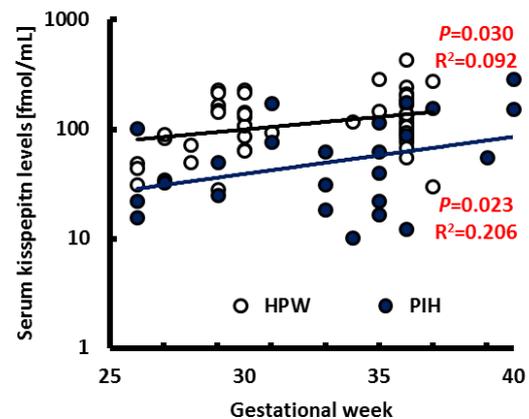


図4 妊娠高血圧症候群とキスペプチン濃度

胎盤絨毛において、キस्पепチンは合胞体栄養細胞 (syncytio-trophoblast) で産生され、絨毛細胞の浸潤抑制に関与することが示唆されている。絨毛細胞の浸潤が活発である妊娠初期には血清中キस्पепチン濃度は低値を示し、増殖が低下する末期に向かって高値を示すことが確認され、キस्पепチンが胎盤の増殖をコントロールする因子の1つであることが示唆された。妊娠高血圧症候群では絨毛が産生する、増殖・浸潤に関与する様々な因子が変化することが知られている。Farinaらは妊娠高血圧症候群での*KiSS1*の発現が低下することを報告している。本結果は血清中タンパク質レベルでも低下することが確認された。妊娠糖尿病患者では血清中キस्पепチン濃度は妊娠週数にかかわらず、健康妊婦に比べ高値を示すことが明らかになった。中枢において、*KiSS* neuronの上流にはレプチンと呼ばれる摂食に関与するホルモンが存在していることが報告されており、レプチンによってキस्पепチンの分泌が促進されることが示唆されている。糖尿病との関連は明らかになっていないが、レプチンが高値を示す症例で、肥満が多いとの報告もあり、糖尿病-レプチン-キस्पепチン系の解明が求められる。より早期の症例の集積が必要であるが、血中キस्पепチン濃度を指標にした早期診断の可能性が期待される。

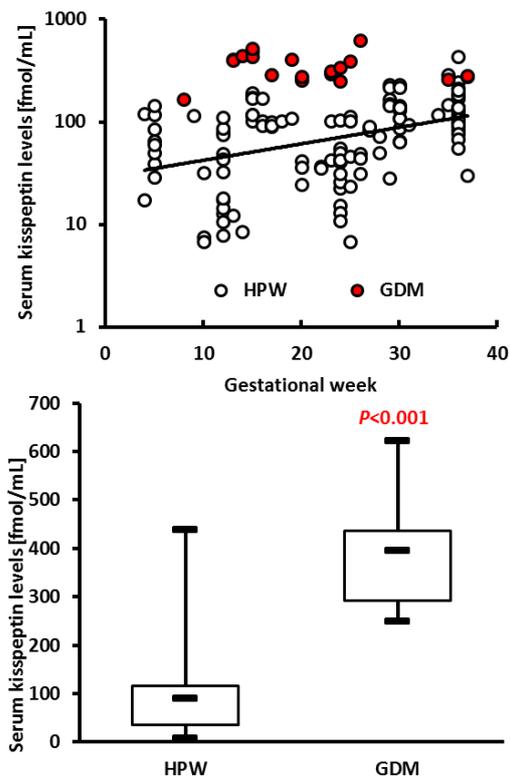


図5 妊娠糖尿病とキस्पепチン濃度

(3) 4名の性腺機能低下症患者の血漿中キス

ペプチン濃度を測定した。20歳代の男性先天性性腺機能低下症患者は、いずれもLH、FSH、testosteroneは感度以下であった。各種不可試験を行ったところ、視床下部負荷試験ではLH、FSHは未反応であったが、下垂体副腎系負荷試験では低反応性が認められた。(尿中cortisolは高値であったため分泌は維持されていると思われる。)血漿中キस्पепチン濃度は、初期値、負荷試験時いずれも正常下限付近を推移していた。(正常値  $10 \pm 6$  fmol/mL)視床下部性ゴナドトロピン分泌不全、または視床下部性(もしくは下垂体性)重症型GH分泌不全が疑われ、hCG+hMG療法を開始したところtestosteroneは回復傾向を示したが、血漿中キस्पепチン濃度は不変のままであった。一方、出生時に短い陰茎様の外性器を認めた月齢3か月男児の血漿中キस्पепチン濃度を測定したところ、1034.7 fmol/mLと極めて高値を示した。染色体異常は認められず、各種ホルモン負荷試験より、機能的卵巣は存在しないこと、成長ホルモン、testosteroneの分泌能は維持されていること、アンドロゲン合成過程は正常であることが明らかとなり、矮小陰茎の原因は、アンドロゲン不応症、陰茎の先天性構造異常が示唆された。新生児におけるキस्पепチンの正常値、生理作用については不明であり、臨床的意義も今後の検討を要する。また、20歳代の男性Kallmann症候群患者の血漿中キस्पепチン濃度を測定したところ、45.2 fmol/mLと健康人に比べて高値を示した。本症例により、視床下部性性腺機能低下症には、キस्पепチンが高値を示す症例と増加していない症例が明らかとなった。今後症例を蓄積することで、「キस्पепチン濃度からみた性腺機能低下症の分類」ができるものと期待される。

##### 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)

[学会発表] (計7件)

- ① F. Katagiri, M. Nomizu. Searching diagnosable disease using plasma kisspeptin levels as a biomarker. The 32nd European Peptide Symposium 2012.09.02 (Athens, Greece)
- ② 片桐文彦、野水基義 血中キस्पепチン濃度をバイオマーカーとして評価可能な疾患の探索 第32回日本臨床薬理学会年会 2011.12.01 (浜松)
- ③ F. Katagiri, H. Mochiduki, N. Hirahara, K. Kawai, M. Kotani, M. Nomizu. The worthiness of measurement of circulating kisspeptin levels in hypogonadism patients. 10th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology 2011.06.26

(Budapest, Hungary)

- ④ 望月晴子、川合弘太郎、平原直子、小谷仁人、片桐文彦、沖隆、中村浩淑 Kisspeptin の低下を認めた持続性性腺機能低下症の1例 第20回臨床内分泌代謝 Update 2011.01.28 (札幌)
- ⑤ F. Katagiri, J. Yoshimatsu, Y. Furukawa, H. Narahara, M. Nomizu. Usefulness of plasma kisspeptin levels as a biomarker in the diagnosis of perinatal complication. 5th International Peptide Symposium 2010.12.04 (京都)
- ⑥ 片桐文彦、望月晴子、平原直子、川合弘太郎、小谷仁人、野水基義 性腺機能低下症患者における血中キスペプチン濃度測定の意義 第31回日本臨床薬理学会年会 2010.12.01 (京都)
- ⑦ 片桐文彦、古川雄一、檜原久司、野水基義 周産期疾患患者における血清中 kisspeptin 濃度測定の意義 第20回日本医療薬学会年会 2010.11.13 (千葉)

[図書] (計2件)

- ① F. Katagiri, *et al.*, The European Peptide Society, PEPTIDES 2012, 2012, 2.
- ② F. Katagiri, *et al.*, The Japanese Peptide Society, Peptide Science 2010, 2011, 1.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片桐 文彦 (KATAGIRI FUMIHIKO)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60420642