

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659406

研究課題名(和文)急性肺損傷に対するグレリンの肺保護作用機構の解析と臨床応用

研究課題名(英文) Investigation of the protective effects of ghrelin on the disease progression of acute lung injury and its clinical application

研究代表者

中里 雅光 (Nakazato, Masamitsu)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10180267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではグレリンの急性肺損傷における病態生理学的意義を解析した。プレオマイシン気管内投与モデルを用い、グレリン発現を誘導する六君子湯による急性肺損傷進展抑制効果を評価した。六君子湯投与群は対照群と比較し肺損傷後の生存率が高く、急性肺水腫、肺線維化の軽減がみられた。急性肺損傷患者において、血漿グレリン濃度は血清CRP値とAPACHEIIスコアと相関しており、血漿グレリン濃度が急性肺損傷患者の重症度を反映している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin, an acylated peptide produced in the stomach, increases food intake and growth hormone secretion, suppresses inflammation. Rikkunshito (RKT) is known to stimulate ghrelin secretion. In this study, we examined the effects of RKT on acute lung injury (ALI) by using a ALI model in mice. The RKT-treated mice showed a definitively higher survival rate than control mice after injury. The amelioration of neutrophil alveolar infiltration, pulmonary vascular permeability, induction of proinflammatory cytokines, activation of the NF-kappa B pathway and lung fibrosis were notable in the RKT-treated mice. Our results indicate that RKT administration exerts protective effects against ALI. We also investigate the relationship between ghrelin levels and disease severity in ALI patients. Plasma ghrelin concentrations positively correlated with serum CRP levels and APACHEII scores in ALI patients. These data suggest that plasma ghrelin levels might reflect disease severity in ALI patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学・非閉塞性肺疾患癌、肺線維症、呼吸器感染症、その他

キーワード：急性肺損傷 トレンスレーショナルリサーチ グレリン

1. 研究開始当初の背景

急性肺損傷(acute lung injury; ALI)は、敗血症や重症肺炎など種々の病態を誘因として発症し、急速に重篤な呼吸不全に陥る難治性疾患である。ALIの特徴は、好中球集簇に伴う肺胞上皮細胞損傷と、それに引き続く非心原性肺水腫である。最終的に肺線維化に陥り、非可逆性の肺構築荒廃に至る。ALIの発症機序は不明で、既存の薬物療法の有効性は実証されていない。ALIは死亡率40%以上と高い致死率を呈することから、その発症機序の解明と新規治療法の開発は、急務の医療課題である。申請者を含む研究グループは、1999年にヒトとラットの胃からグレリンを発見し、グレリンが強力な摂食および成長ホルモン分泌作用を有することを報告した。さらに、グレリンの生合成調節、抗炎症作用、遺伝子操作マウスの作出と解析、摂食亢進作用の情報伝達系の同定などに関する業績を次々と明らかにし、ネイチャー、サイエンス等を含む69編の欧米論文に発表してきた。申請者はこれらの成果を、呼吸器疾患への新規治療法を開発する「橋渡し研究」に展開し、三つの用途特許として申請済である。スーパー特区 第五分野「医薬費・医療機器の研究開発」の分担研究課題として、グレリンの創薬研究にも着手している。また2011年に、ALIモデル動物を用いて、グレリン投与が抗炎症、抗線維化ならびに肺上皮細胞保護に作用し、対照群と比較して生存期間を有意に延長した成果を報告した。本研究は、ALIに対する肺上皮細胞保護という新しい観点から、胃で産生される内因性物質を応用し、難治性病態に対する有効な治療法の創出を目指す挑戦的な研究である。

2. 研究の目的

申請者が発見から機能解析まで世界をリードして研究を推進してきた新規の生理活性ペプチドグレリンの急性肺損傷における病態生理学的意義を基礎と臨床の両面から解析し、医療展開することが本研究の目的である。グレリンは、ヒトへの投与により食欲亢進、抗炎症、抗酸化ストレス、心血管保護、エネルギー消費の抑制などの効果を齎す。ALIは急速に重篤な呼吸不全に陥る予後不良の疾患である。肺胞上皮細胞損傷に伴う非心原性肺水腫を特徴とし、死亡率は40%以上にも達するが、有効な治療法がなく、新たな観点からの治療法の開発が切望されている。申請者は2011年に、ALIモデル動物におけるグレリン治療の有効性を世界に先駆けて報告した。本研究は肺上皮細胞保護という観点から、ヒトの胃で産生される内因性物質をALI治療へ応用するという、全く新しい挑戦的萌芽研究である。ALIにおけるグレリンの役割を解明し、グレリン治療の有効性と安全性を実証し、医療応用へのトランスレーションを推進する。最終的には、難治性病態であるALIに対するグレリンを用いた有効な治療法を創出する。

3. 研究の方法

(1)ALI患者のグレリンの病態生理学的意義の解明

グレリンの生理作用として炎症制御作用と抗アポトーシス作用が示されており、申請者はグレリン血中濃度がALIの予後予測因子になり得る成績を示している。ALI患者を対象に、入院時の血中グレリンを測定し、60日死亡率、28日人工呼吸器離脱率、PaO₂/FiO₂比、多臓器不全合併率、血清KL-6値、炎症性サイトカイン(IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-6)との関連性を解析する。

(2)ALI進展制御におけるグレリンの機能解析

既に作出しているグレリン欠損マウスとグレリン受容体欠損マウスを用い、プレオマイシン気管内投与(6単位/kg)してALIのモデルを作成する。投与前、7日後、14日後の肺を摘出し、組織学的評価(肺水腫、肺内への炎症細胞集簇、肺線維化)、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数と蛋白濃度、肺コラーゲン含有量を対照マウスと比較する。

(3)六君子湯によるALI進展制御機構の解析

六君子湯によるグレリン発現の誘導を評価するため、マウスに六君子湯1.0g/kgもしくは蒸留水を連日14日間経口投与する。投与14日後のグレリン濃度と胃組織中グレリンmRNA量を定量する。ALIモデルマウスに六君子湯1.0g/kgを投与し、投与前、7日後、14日後の肺水腫や肺線維化を解析し、六君子湯によるALI進展制御の有無を評価する。また、六君子湯群と対照群との生存曲線、摂食量、体重変化を比較する。さらに、六君子湯によるALI制御機構がグレリン依存性がどうかを評価するため、グレリン欠損マウスを用いてALIモデルを作成し、六君子湯もしくは蒸留水を連日14日間経口投与し、生存曲線と肺線維化を評価する。

4. 研究成果

ALI患者のグレリンの病態生理学的意義の解明

ALI/ARDS患者34例の血漿グレリン濃度を測定し、重症度との関連を解析した。ALI/ARDS症例において血漿グレリン濃度は血清CRP値とAPACHEIIスコアと正相関があった(各々R = 0.46, R = 0.28)。血漿グレリン濃度と予後には相関がなかったが、死亡例においてグレリン値が高い症例がみられた。以上の結果からALI/ARDS症例において血漿グレリン濃度は重症度を反映している可能性が示唆された。

ALI進展制御におけるグレリンの機能解析

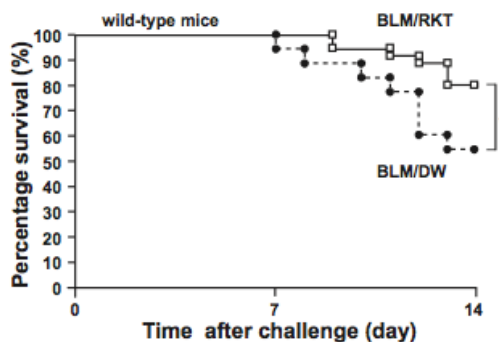
グレリン欠損マウスとグレリン受容体欠損マウスと野生型マウスにプレオマイシン気管内投与した結果、急性肺水腫、肺炎細胞浸潤、肺線維化、および生存率に各群間で差は無かった。グレリン投与による血漿グレリン濃度の著明な上昇がみられることから、薬理量のグレリンはALI進展抑制に機能するものの、内因性グレリン発現はALI進展抑制

に關与しないことが示唆された。

六君子湯(RKT)によるALI進展制御機構の解析

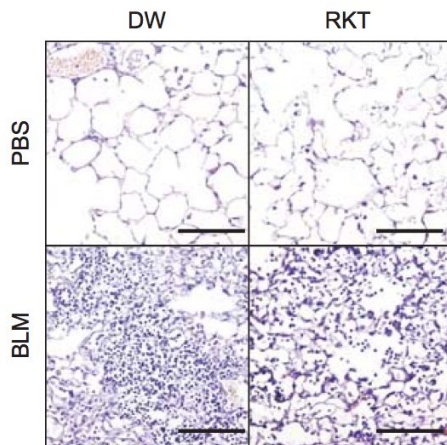
(1) RKT投与はプレオマイシン気管内投与ALIモデルにおいて体重減少と摂食量低下を軽減し、生存率を改善する。

プレオマイシン気管内投与ALIモデルを用い、グレリン発現誘導効果のある六君子湯(RKT)によるALI進展抑制機構を評価した。RKT群は対照群と比較し肺損傷14日後の生存率が高かった(対照群: 19/35, 54%, RKT群: 28/35, 80%, log-rank, $P = 0.018$, 図)。RKT投与は用量依存性にALIモデルにおける体重減少と摂食量低下を軽減した。



(2) RKT投与はプレオマイシン気管内投与ALIモデルの肺実質炎症細胞浸潤、上皮細胞アポトーシス細胞数、急性肺水腫、肺線維化を軽減する。

プレオマイシン気管内投与7日目の対照群は好中球浸潤を伴う著明な肺水腫がみられたのに対し、RKT投与群ではそれらの所見が軽減していた。RKT投与群では対照群と比較して、肺損傷後の気管支肺胞洗浄液中のIL-1 β , TNF- α , CXCL2/MIP2, TGF- β 1濃度が低下していた。RKT投与群では対照群と比較して、肺損傷後の肺組織での核内NF- κ B発現と細胞質内phospho-NF- κ B発現が低下していた。RKT投与群では対照群と比較して肺損傷後の肺胞上皮細胞アポトーシス細胞数が減少し、肺損傷14日目の肺線維化が軽減していた。



5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計13件)

Miki K, Nakazato M, Matsumoto N, Arimura A, 他(総17名, 4番目): Ghrelin treatment of cachectic patients with chronic obstructive pulmonary disease: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. PLoS One, 査読有, 7, 2012, e35708

DOI: 0.1371/journal.pone.0035708.

Moin AS, Nakazato M, 他(総12名, 12番目): Neuroendocrine regulatory peptide-2 stimulates glucose-induced insulin secretion in vivo and in vitro. Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 428, 2012, 512-517.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.073.

Tsuchimochi W, Nakazato M, 他(総7名, 7番目): Ghrelin prevents the development of experimental diabetic neuropathy in rodents. Eur J Pharmacol, 査読有, 702, 2013, 187-193.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.01.035.

Tamaki N, Nakazato M, 他(総5名, 5番目): Ezetimibe ameliorates atherosclerotic and inflammatory markers, atherogenic lipid profiles, insulin sensitivity, and liver dysfunction in Japanese patients with hypercholesterolemia. J Atheroscler Thromb, 査読有, 19, 2012, 532-538.

Ogawa N, Nakazato M, 他(総8名, 8番目): Intestinal fatty acid infusion modulates food preference as well as calorie intake via the vagal nerve and midbrain-hypothalamic neural pathways in rats. Metabolism, 査読有, 61, 2012, 1312-1320.

DOI: 10.1016/j.metabol.2012.02.011.

Matsumoto N, Nakazato M, (総2名, 2番目): Clinical application of ghrelin for chronic respiratory diseases. Methods Enzymol, 査読有, 514, 2012, 399-407.

DOI: 10.1016/B978-0-12-381272-8.00025-8.

Arimura A, Yanagi S, Matsumoto N, Nakazato M, 他(総8名, 8番目): Clinical usefulness of the two-question assessment tool for depressive symptoms in Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease. Lung, 査読有, 191, 2013, 101-107.

DOI: 10.1007/s00408-012-9437-1.

Miyoshi K, Yanagi S, Tsubouchi H, Matsumoto N, Nakazato M, 他(総12名, 12番目): Epithelial Pten controls acute lung injury and fibrosis by regulating alveolar epithelial cell integrity. Am J Respir Crit Care Med, 査読有, 187, 2013, 262-275.

DOI: 10.1164/rccm.201205-08510C.

Yano Y, Nakazato M, 他(総13名, 13番目): Nighttime blood pressure, nighttime glucose values, and target-organ damages

in treated type 2 diabetes patients. Atherosclerosis, 査読有、227, 2013, 135-139.
DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2012.12.006.

Matsumoto N, Yanagi S, Arimura A, Nakazato M, 他(総8名, 8番目): A possible role of galectin-9 in the pulmonary fibrosis of patients with interstitial pneumonia. Lung, 査読有、191, 2013, 191-198.

DOI: 10.1007/s00408-012-9446-0.

Koshinaka K, Nakazato M, 他(総6名, 5番目): Elevation of muscle temperature stimulates muscle glucose uptake in vivo and in vitro. J Physiol Sci, 査読有、63, 2013, 409-418.

DOI: 10.1007/s12576-013-0278-3.

Tsubouchi H, Yanagi S, Nakazato M, 他(総8名, 8番目): Rikkunshito ameliorates bleomycin-induced acute lung injury in a ghrelin-independent manner. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 査読有、306, 2014, L233-45.

DOI: 10.1152/ajplung.00096.2013.

Ueno H, Nakazato M, 他(総8名, 8番目): Exploratory trial of intranasal administration of glucagon-like peptide-1 in Japanese patients with type 2 diabetes. Diabetes Care, 査読有、2014, in press

〔学会発表〕(計11件)

中里 雅光, 消化管ホルモンから糖尿病治療戦略を考える ～摂食調節機構を視野に入れて～、第85回日本内分泌学会学術総会 ランチョンセミナー18、2012年4月20日、名古屋

中里 雅光, 中枢と末梢を結ぶエネルギー代謝調節機構、第85回日本内分泌学会学術総会、2012年4月21日、名古屋

中里 雅光, 摂食亢進ペプチドグレリンのトランスレーショナルリサーチ、第53回日本心身医学会 教育講演 29、2012年5月26日、鹿児島

中里 雅光, 消化管ペプチドの発見によるエネルギー代謝調節機構の新たな理解とその臨床応用、第20回西日本肥満研究会、2012年7月15日、愛媛

中里 雅光, ヒトから初めて見つかった食欲亢進ホルモン: グレリンの機能と臨床応用展開、第69回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部・秋季学術講演会、2012年10月17日、北九州

中里 雅光, 高脂肪食負荷マウスにおけるグレリン抵抗性の解析、第27回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2013年2月23日、東京

中里 雅光, DPP-4 阻害薬の登場で糖尿病治療が変わったこと、第5回福岡県病院薬剤師会学術大会ランチョンセミナー、2013年3

月3日、福岡

柳 重久, 肺胞上皮細胞 Pten の上皮バリア統合性に対する役割の解析、第53回日本呼吸器学会学術講演会、2013年4月21日、東京

坪内 拓伸, プレオマイシン急性肺傷害モデルによる六君子湯投与の効果、第53回日本呼吸器学会学術講演会、2013年4月21日、東京

柳 重久, Lung epithelial Pten controls epithelial barrier integrity in vitro and in vivo, European Respiratory Society、2013年9月11日、バルセロナ

坪内 拓伸, Ghrelin ameliorates cachectic status in the mouse model of lung cancer model. European Respiratory Society、2013年9月11日、バルセロナ

〔図書〕(計8件)

中里 雅光, シーエムシー出版、ペプチド医薬の最前線、2012、150

中里 雅光 他、中外医学社、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌、2013、229

中里 雅光, 医学書院、総編: 今日の治療指針 2013年版、2013、1955

中里 雅光 他、日経メディカル開発、今日の診療のためにガイドライン外来診療 2013、2013、658

中里 雅光 他、先端医学社、分子消化器病、2014年、108

柳 重久, 診断と治療社、内科救急のファーストタッチ、2014、455

柳 重久, 先端医学社、分子呼吸器病、2014、176

有村 保次, 他、医歯薬出版、グレリン・栄養・運動で予防するサルコペニア、2013、168

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中里 雅光 (NAKAZATO, Masamitsu)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号: 10180267

(2) 研究分担者

松元 信弘 (MATSUMOTO, Nobuhiro)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 70418838

柳 重久 (YANAGI, Shigehisa)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 60404422

坪内 拓伸 (TSUBOUCHI, Hironobu)

宮崎大学・医学部・医員
研究者番号：60573988

有村 保次 (ARIMURA, Yasuji)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：70534080