

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

| | | | | | | | |
|--|---------------------------|--|--------|-----------------------------|--------|-------------------|--|
| ローマ字 | | KANGAWA KENJI | | | | | |
| ①研究代表者氏名 | | 寒川 賢治 | | ②所属研究機関・部局・職 | | 国立循環器病センター研究所・副所長 | |
| ③研究課題名 | 和文 | オーファン受容体アッセイ系を用いた新規生理活性ペプチドの探索とその機能解明 | | | | | |
| | 英文 | Studies for identification and physiological functions of novel endogenous ligands for G-protein coupled orphan receptors. | | | | | |
| ④研究経費 金額単位：千円 | 平成13年度 | 平成14年度 | 平成15年度 | 平成16年度 | 平成17年度 | 総合計 | |
| | 28,200 | 19,000 | 19,000 | 14,300 | 14,300 | 94,800 | |
| ⑤研究組織（研究代表者および研究分担者） *平成18年3月31日現在 | | | | | | | |
| 氏名 | 所属研究機関・部局・職 | 現在の専門 | | 役割分担（研究実施計画に対する分担事項） | | | |
| 寒川 賢治 | 国立循環器病センター研究所・副所長 | 生化学 ペプチド化学 内分泌学 | | 研究全般・新規生理活性ペプチド探索 | | | |
| 児島 将康 | 久留米大学分子生命科学研究所・遺伝子情報部門・教授 | 生化学 分子生物学 内分泌学 | | グレリン・NMU ノックアウト・マウスの作製とその解析 | | | |
| 宮里 幹也 | 国立循環器病センター研究所・生化学部・室長 | 生化学 ペプチド化学 内分泌学 | | 新規生理活性ペプチド探索 | | | |
| ⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。） | | | | | | | |
| <p>ヒトゲノム・プロジェクトがほとんど完了し、21世紀初頭にはゲノムの構造解析からポストゲノムの蛋白質の機能解析が次の重要な研究課題と予想される。現在明らかになったヒト・ゲノム情報によるとヒト遺伝子にはG蛋白共役型受容体が600～650種類存在し、その中でもリガンド不明な、いわゆるオーファン受容体が300～400種類存在すると予想される。これらのオーファン受容体の内因性リガンドは先端的創薬の重要な候補である。これらのオーファン受容体は新薬開発の魅力的な標的であり、内因性リガンドの同定をもとにスーパーアゴニスト（作用薬）やアンタゴニスト（阻害薬）の開発を行うことは、新しい薬剤や治療法に結びつく重要な研究課題である。</p> <p>本研究では、最近申請者らが発見した新規内因性リガンドの生理的な機能解析を行うとともに、オーファン受容体の未知の内因性リガンド探索も並行して進める。研究期間中の主要なサブテーマとして、次のような研究を行った。</p> | | | | | | | |
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 成長ホルモン分泌促進および摂食促進ペプチド、グレリン（Ghrelin）の生理作用の解明 2. 摂食抑制ペプチド、ニューロメジンU（Neuromedin U, NMU）の生理作用の解明 3. オーファン受容体発現細胞のアッセイ系を用いた新規内因性リガンドの探索 | | | | | | | |

⑦研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

5年間にわたる本研究において、1) グレリンに関しては非常に大きな進展を見せた。また、2) ニューロメジンUについても、遺伝子欠損マウスの作製、解析などにより、これまで全く予期していなかった新たな生理作用が明らかになった。3) 新規内因性リガンドの探索に関しても、新規ペプチドとしてニューロメジンSの発見に成功し、いずれのサブテーマについても極めて順調に進展し、大きな成果を得ることが出来た。

以下に3つのサブテーマに関する、主要な研究成果について述べる。

1. 成長ホルモン分泌促進および摂食促進ペプチド、グレリン (Ghrelin) の生理作用の解明— グレリンは成長ホルモン (GH) 分泌促進ペプチドとして胃より発見され、主に胃において産生・分泌されることが明らかになっていった。その後、本研究において、脳の視床下部や胃以外の末梢組織での産生も明らかになり、中枢性および末梢性に摂食調節、消化管機能、エネルギー代謝系や循環器系の調節、さらには組織保護や再生など、非常に多彩な機能を担うことが明らかになってきた。1) 発現および分泌調節機序については、①胃のグレリン産生部位はそれまで機能が不明であったX/A like cellと呼ばれる細胞であること、②膵臓では α 細胞 (グルカゴン細胞) で産生されることを明らかにした。また、③胃での遺伝子発現・分泌は絶食によって亢進、④血中グレリン濃度は食前に増加、食後に低下し、拒食症・ガンや重症心不全の悪液質 (カヘキシア) では増加、肥満症では低下し、急性および慢性の生体のエネルギー状態や病態と深く関連することを明らかにした。一方、⑤グレリンプロモーターは極めて細胞および組織特異的であること、および、ヒト遺伝子プロモーター領域の解析では、翻訳開始点より-193~-349bpおよび1010~-1409bpの領域が重要であることを示した。2) グレリンは3番目のSer残基が脂肪酸修飾されており、またその修飾は活性発現に必須であることから生合成機序の解析は重要である。胃組織よりグレリンおよび関連分子の精製・構造決定を行った結果、多種類のグレリン分子型が存在することを明らかにした。すなわち①主要分子型である28残基のオクタノイル化されたグレリン (octanoyl ghrelin, C8:0) 以外に、グレリンと同等の活性を有する関連分子として、脂肪酸修飾の異なるdecanoyl ghrelin (C10:0)、decenoyl ghrelin (C10:1)、C-末端のArgの欠落した27残基のoctanoyl ghrelin[1-27]、decanoyl ghrelin[1-27]が存在すること、また、非活性型であるdes-acyl ghrelinおよびdes-acyl ghrelin[1-27]が存在し、さらにこれらの分子が血漿中にも存在することを明らかにした。②経口投与した中鎖脂肪酸が、グレリンの脂肪酸修飾に利用されることを明らかにした。一方、③脂肪酸修飾に関与する酵素については、現在までに同定するに至っていないが、アシル転移酵素とホモロジーを有する候補分子をクローニングしており、現在解析を進めている。3) グレリンの機能解析については、本研究において多くの生理作用が明らかになった。既に、グレリンの中枢投与 (ICV) は強力な摂食促進作用を示すことは明らかにしていたが、本研究では、①グレリンは末梢 (静脈内) 投与によっても摂食促進作用を有し、中枢への情報伝達は迷走神経を介することを証明した。また、②GH分泌促進作用、胃酸分泌や胃の運動促進作用も迷走神経を介すること、③GH分泌に関してグレリンはGHRHと相乗的に作用することを明らかにした。④一方、グレリンは循環器系にも作用し、血管拡張や心機能の改善、血管内皮の保護作用を示す。⑤心不全モデルラットおよび心不全患者へのグレリンの長期 (3週間) 投与により、左心不全を改善し、左室リモデリングの進行を減弱した。さらに、⑥重症心不全やCOPDにより生じる悪液質 (カヘキシア) の進行を減弱したことから、グレリン投与がこれらの疾患に対する新しい治療的アプローチとなり得ると考えられた。最近の研究では、グレリンの新しい生理作用として、⑦骨形成に直接作用を有すること、⑧膵臓のラ氏島の増殖・再生に関わること、⑨胎児皮膚や神経細胞の増殖作用を有すること、などを明らかにすることができた。また、⑩非活性型と考えられていたデアシルグレリン (des-acyl ghrelin) が、GHS-Rとは異なる未知の受容体を介して、細胞増殖などの生理作用を有することを明らかにした。

2. 摂食抑制ペプチド、ニューロメジンU (NMU) の生理作用の解明— NMUは、我々が1985年に子宮筋収縮アッセイを用いてブタ脊髄より発見した神経ペプチドであるが、その受容体および生理作用の詳細については長期間不明であった。2000年になりオーファン受容体FM3 (NMU1R) とFM4 (NMU2R) に対する内因性リガンドがこのNMUであることを同定し、また、NMUが中枢性の摂食抑制作用を有することを明らかにしたことから、その生理的意義が注目されていた。

本研究では、①NMUのラット脳室内 (ICV) 投与はストレス反応を誘発し、NMUが中枢でのストレス反応の制御に重要であること、②この反応がCRH (Corticotropin-Releasing Hormone) を介することを明らかにした。また、③NMUのICV投与は、交感神経系を介して血圧上昇、心拍数の増加など循環器系にも働くこと、⑤CRHを介して胃酸分泌や胃排出の抑制など消化管機能の制御にも働くことを明らかにした。一方、これまで予測されていない作用も明らかになった。①NMUを明期にラットにICV投与したところ覚醒状態を呈し、サーカディアンリズムの位相変化を認めた。また、②ラット視交叉上核 (SCN) でのNMUの産生およびNMU受容体発現を示した。

⑦研究成果の概要（続き）

さらに機能解析の一環としてNMU遺伝子欠損マウス（NMU-KO）の作製・解析を進めた結果、①NMUは摂食抑制ホルモンであるレプチンとは異なる新しい作用機構で摂食抑制効果を発揮することが明らかになった。②このNMU-KOマウスでは正常マウスに比べ、摂食リズムの消失と摂食量の増加が認められ、また明らかな運動量の減少が観察された。③これに伴い高度の肥満、著しい体脂肪率の増加、脂肪肝、糖尿病の発症などを呈し、生活習慣病のモデルともいえる表現型を示すことを明らかにした。さらに最近、④肥満細胞を介した炎症の発症に関わることを明らかにした。

3. オーフアン受容体発現細胞のアッセイ系を用いた新規内因性リガンドの探索- 本研究では新規ペプチド探索の為、内因性リガンドが不明のオーファンG蛋白共役型受容体（GPCR）として、GPR7、HLWAR77、ETBR-LP2、GPR37、GPR39、GIR、BRS-3、FM-4/TGR-1（NMU2R）など20種類以上の受容体安定発現細胞株を樹立した。また、アッセイ法もFLIPRを用いた細胞内Caイオン濃度の測定やアルファスクリーンによるcAMPの新たな高感度測定法を確立して探索を進めた。その結果、①NMUの受容体でもあるFM-4/TGR-1（NMU2R）の内因性リガンドとして、ラット脳抽出物中のNMUより分子量が大きく疎水性の高い分画に新たな内因性リガンドが存在することを見いだした。精製・構造決定した結果、本リガンドは36残基からなる新規ペプチドであることが判明した。また本ペプチドは、視交叉上核（Suprachiasmatic nucleus）で特異的に発現していることからニューロメジンS（NMS）と命名された。②NMSのN末部のアミノ酸配列は、既知のペプチドまたはタンパク質と相同性を示さなかったが、アミド化されたC末端7アミノ酸残基はNMUと完全に一致する構造であった。さらに機能解析により、③NMSが概日リズムの調節に関与していること、④NMSの脳室内投与はNMUに比べ明らかに強力な摂食抑制効果を引き起こし、NMUと同様にNMSも摂食およびエネルギー代謝調節に関与していることなどを明らかにした。

⑧特記事項 (この研究において得られた獨創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野および関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

○ 研究代表者の寒川および研究分担者の児島は、グレリンに関する研究で、2000-2001年の2年間における Hot Paper (注目論文) 数が世界ランキング第1位との評価を受けた (2002年4月に米国トムソン ISI 社(Citation Index)より発表)。また、それに関する記事が Nature Medicine 2002年5月号の News の Bioprofile 欄に紹介された。

【グレリンに関する研究】

- 1) グレリンは、GHS-Rの内因性リガンドとして発見され、当初は成長ホルモン (GH) の分泌調節が主とした生理作用と考えられたが、本研究により、摂食調節、循環器系の調節や保護、さらには、組織の再生や胎児期の細胞増殖など極めて多彩な生理作用を有することが明らかになってきた。すなわち、循環ホルモンや中枢における神経ペプチドとしてのみならず、局所因子としての機能も有することが明らかになってきた。
- 2) さらにごく最近の研究で、これまで非活性型と考えられてきた脂肪酸修飾のないデスアシルグレリンがGHS-Rとは異なる未知の受容体を介して、細胞増殖などの生理作用を有することを明らかにすることが出来た。
- 3) グレリンは既存の摂食促進ペプチドとは異なり、脳室内投与のみならず末梢投与によっても強力な摂食促進効果を発揮すること、また、末梢からのグレリン (胃から分泌されたグレリン) による空腹情報が、血流を介して脳内に移行することなく末梢に存在する求心性の迷走神経系を介して中枢に伝達されることを明らかにしたことは、特筆すべき成果である。すなわち、拒食症などの中枢性摂食障害に対して、グレリン投与による治療も可能と考えられ、実際、ごく最近臨床研究が開始されている。
- 4) 一方、グレリンが血管拡張や心機能の亢進、心血管系の保護作用など、これまで全く予測されていなかった循環器系の調節においても重要な機能を有すること、また、心不全などの循環器疾患の治療応用にも大きな期待がもてることを示したことも極めて大きな成果であると言える。実際、国立循環器病センターにおいて、倫理委員会の承認のもとに、「グレリン投与による重症心不全における心機能および栄養状態の改善効果の臨床的評価」について循環器疾患における臨床応用を目指した臨床研究が実施され、有効性を示す結果が得られている。また、グレリンのGH分泌促進、摂食およびエネルギー代謝改善効果に基づいての慢性閉塞性肺疾患 (COPD) に対する治療効果のパイロット臨床研究も実施され、有効性を示す結果が得られたことから、現在、多施設 (5施設) における二重盲検試験が開始されている。
- 5) 寒川は、2001年より京大医学部附属病院に新設された探索医療センター (Translational Research Center) の公募プロジェクトに採用され、「グレリン創薬プロジェクト」のプロジェクトリーダーを併任している。京大においては、国立循環器病センターでは実施できない分野である、拒食症などの摂食障害の治療や内分泌・代謝疾患に関するグレリンの臨床応用研究を推進している。現在、「摂食不振患者に対するグレリンの臨床効果に関する臨床第II相試験- Functional dyspepsiaなどの機能性摂食不振を対象に」および「人工股関節置換術周術期患者に対するグレリンの臨床効果に関する第II相ランダム化プラセボ対照比較臨床試験」が実施されている。
- 6) 上記のように、グレリンは基礎研究の成果がすぐさま臨床研究へと引き継がれ、トランスレーショナルリサーチが極めてスムーズに展開されている。このようなケースは世界的にも他には見あたらず、特筆すべき例であると言える。

【ニューロメジン U に関する研究】

- 1) NMUは、研究代表者の寒川らが1985年に発見した子宮筋収縮活性を持つ神経ペプチドであるが、その生理作用の詳細については永らく不明であった。本研究で、NMUの中枢でのストレス反応や代謝昂進における役割など新しい生理作用が次第に明らかになってきたが、特筆すべきことは、NMUがサーカディアンリズムの調節因子であるという新たな機能を有することを発見したことである。生体内時計については、これまで転写因子などの時計遺伝子を中心に解析されてきたが、これまで全く予測されていなかったペプチド性因子としてNMUの関与が明らかになったことは、今後この分野の研究の大きなブレークスルーに繋がることが期待できる。
- 2) また、NMUがレプチンとは異なる機序で摂食抑制に働くことを示すことが出来た点も、肥満や摂食調節機序解明への大きな手掛かりになるものと考えられる。
- 3) さらに、NMUが肥満細胞を介した炎症の発症に関わることを示すことが出来た点も、今後神経ペプチドと炎症性疾患との関連の解析を含めて大きな成果であると言える。

【新規内因性リガンドの探索に関する研究】

- 1) 受容体の内因性リガンドの探索においても、非常に困難な研究であったがニューロメジンS (NMS) と名付けた新規ペプチドの発見に成功し、大きな成果を得ることが出来た。
- 2) NMSは中枢では視交叉上核 (SCN) に特異的に発現し、NMUとは異なる機序でサーカディアンリズムの調節に関わること、NMUよりも強力な摂食抑制作用を示すことなど、非常に興味深い知見が得られている。NMUとNMSという兄弟とも言える2つのペプチドについて、今後対比した研究を進めることにより、サーカディアンリズムや摂食の調節において大きな進展に繋がる可能性を有する。

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、および国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

(本研究成果に関する英文論文は142編であるが、ここでは主要論文のみを記載した。)

【Ghrelinに関する論文】

- ① K. Kojima and K. Kangawa: Drug Insight: the functions of ghrelin and its potential as a multitherapeutic hormone. *Nat. Clin Pract Endocrinol Metab* 2: 80-88, 2006.
2. T. Irako, T. Akamizu, H. Hosoda, H. Iwakura, H. Ariyasu, K. Tojo, N. Tajima and K. Kangawa: Ghrelin prevents development of diabetes at adult age in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetologia*, 29: 29, 2006.
3. K. Toshinai, H. Yamaguchi, Y. Sun, R. G. Smith, A. Yamanaka, T. Sakurai, Y. Date, M. S. Mondal, T. Shimbara, T. Kawagoe, N. Murakami, M. Miyazato, K. Kangawa and M. Nakazato: Des-acyl Ghrelin Induces Food Intake by a Mechanism Independent of the Growth Hormone Secretagogue Receptor. *Endocrinology*, 16: 16, 2006.
4. T. Ida, M. Miyazato, K. Naganobu, K. Nakahara, M. Sato, X. Z. Lin, H. Kaiya, K. Doi, S. Noda, A. Kubo, N. Murakami and K. Kangawa: Purification and characterization of feline ghrelin and its possible role. *Domest Anim Endocrinol*, 23: 23, 2006.
5. N. Nagaya, T. Itoh, S. Murakami, H. Oya, M. Uematsu, K. Miyatake and K. Kangawa: Treatment of cachexia with ghrelin in patients with COPD. *Chest*, 128: 1187-1193, 2005.
6. H. Kaiya, B. C. Small, A. L. Bilodeau, B. S. Shepherd, M. Kojima, H. Hosoda and K. Kangawa: Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen Comp Endocrinol.*, 143: 201-210, 2005.
7. Y. Date, K. Toshinai, S. Koda, M. Miyazato, T. Shimbara, T. Tsuruta, A. Niiijima, K. Kangawa and M. Nakazato: Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology*, 146: 3518-3525, 2005.
8. I. Yokota, S. Kitamura, H. Hosoda, Y. Kotani and K. Kangawa: Concentration of the n-octanoylated active form of ghrelin in fetal and neonatal circulation. *Endocr J*, 52: 271-276, 2005.
9. M. Kojima and K. Kangawa: Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*, 85: 495-522, 2005.
10. Y. Nishi, H. Hiejima, H. Mifune, T. Sato, K. Kangawa and M. Kojima: Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology*, 146: 2709-2715, 2005.
11. Y. Nishi, H. Hiejima, H. Hosoda, H. Kaiya, K. Mori, Y. Fukue, T. Yanase, H. Nawata, K. Kangawa and M. Kojima: Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology*, 146: 2255-2264, 2005.
12. T. Hashizume, M. Horiuchi, S. Nonaka, E. Kasuya, M. Kojima, H. Hosoda and K. Kangawa: Effects of ghrelin on growth hormone secretion in vivo in ruminants. *Regul Pept*, 126: 61-65, 2005.
13. M. Kojima, H. Hosoda and K. Kangawa: Clinical endocrinology and metabolism. Ghrelin, a novel growth-hormone-releasing and appetite-stimulating peptide from stomach. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 18: 517-530, 2004.
14. T. Akamizu, T. Shinomiya, T. Irako, M. Fukunaga, Y. Nakai and K. Kangawa: Separate measurement of plasma levels of acylated and desacyl ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 6-9, 2005.
15. H. Ariyasu, K. Takaya, H. Iwakura, H. Hosoda, T. Akamizu, Y. Arai, K. Kangawa and K. Nakao: Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*, 146: 355-364, 2005.
16. N. Nagaya, J. Moriya, Y. Yasumura, M. Uematsu, F. Ono, W. Shimizu, K. Ueno, M. Kitakaze, K. Miyatake and K. Kangawa: Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 110: 3674-3679, 2004.
17. K. Dezaki, H. Hosoda, M. Kakei, S. Hashiguchi, M. Watanabe, K. Kangawa and T. Yada: Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes*, 53: 3142-3151, 2004.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、および国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

18. H. Kaiya, I. Sakata, M. Kojima, H. Hosoda, T. Sakai and K. Kangawa: Structural determination and histochemical localization of ghrelin in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gen Comp Endocrinol*, 138: 50-57, 2004.
19. Y. Nakai, H. Hosoda, K. Nin, C. Ooya, H. Hayashi, T. Akamizu and K. Kangawa: Short-term secretory regulation of the active form of ghrelin and total ghrelin during an oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 150: 913-914, 2004.
20. H. Hosoda, K. Doi, N. Nagaya, H. Okumura, E. Nakagawa, M. Enomoto, F. Ono and K. Kangawa: Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples. *Clin Chem*, 50: 1077-1080, 2004.
21. N. Kanamoto, T. Akamizu, T. Tagami, Y. Hataya, K. Moriyama, K. Takaya, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa and K. Nakao: Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology*, 145: 4144-4153, 2004.
22. T. Akamizu, K. Takaya, T. Irako, H. Hosoda, S. Teramukai, A. Matsuyama, H. Tada, K. Miura, A. Shimizu, M. Fukushima, M. Yokode, K. Tanaka and K. Kangawa: Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. *Eur J Endocrinol*, 150: 447-455, 2004.
23. T. Hanada, K. Toshinai, Y. Date, N. Kajimura, T. Tsukada, Y. Hayashi, K. Kangawa and M. Nakazato: Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. *Metabolism*, 53: 84-88, 2004.
24. Y. Shimizu, N. Nagaya, Y. Teranishi, M. Imazu, H. Yamamoto, T. Shokawa, K. Kangawa, N. Kohno and M. Yoshizumi: Ghrelin improves endothelial dysfunction through growth hormone-independent mechanisms in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 310: 830-835, 2003.
25. H. Kaiya, M. Kojima, H. Hosoda, S. Moriyama, A. Takahashi, H. Kawauchi and K. Kangawa: Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology*, 144: 5215-5226, 2003.
26. H. Kaiya, M. Kojima, H. Hosoda, L. G. Riley, T. Hirano, E. G. Grau and K. Kangawa: Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 135: 421-429, 2003.
27. Y. Nakai, H. Hosoda, K. Nin, C. Ooya, H. Hayashi, T. Akamizu and K. Kangawa: Plasma levels of active form of ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol*, 149: R1-3, 2003.
28. M. Enomoto, N. Nagaya, M. Uematsu, H. Okumura, E. Nakagawa, F. Ono, H. Hosoda, H. Oya, M. Kojima, K. Kanmatsuse and K. Kangawa: Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans. *Clin Sci (Lond)*, 105: 431-435, 2003
29. N. Nagaya and K. Kangawa: Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Curr Opin Pharmacol*, 3: 146-151, 2003.
30. H. Kaiya, M. Kojima, H. Hosoda, L. G. Riley, T. Hirano, E. G. Grau and K. Kangawa: Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol*, 176: 415-423, 2003.
31. K. Choi, S. G. Roh, Y. H. Hong, Y. B. Shrestha, D. Hishikawa, C. Chen, M. Kojima, K. Kangawa and S. Sasaki: The role of ghrelin and growth hormone secretagogues receptor on rat adipogenesis. *Endocrinology*, 144: 754-759, 2003.
32. H. Hosoda, M. Kojima, T. Mizushima, S. Shimizu and K. Kangawa: Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem*, 278: 64-70, 2003.
33. M. Kojima and K. Kangawa: Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol*, 2: 665-668, 2002.

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、および国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

34. A. Ikezaki, H. Hosoda, K. Ito, S. Iwama, N. Miura, H. Matsuoka, C. Kondo, M. Kojima, K. Kangawa and S. Sugihara: Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes*, 51: 3408-3411, 2002.
35. Y. Date, N. Murakami, K. Toshinai, S. Matsukura, A. Niiijima, H. Matsuo, K. Kangawa and M. Nakazato: The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 123: 1120-1128, 2002.
36. H. Kaiya, S. Van Der Geyten, M. Kojima, H. Hosoda, Y. Kitajima, M. Matsumoto, S. Geelissen, V. M. Darras and K. Kangawa: Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology*, 143: 3454-3463, 2002.
37. E. Nakagawa, N. Nagaya, H. Okumura, M. Enomoto, H. Oya, F. Ono, H. Hosoda, M. Kojima and K. Kangawa: Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. *Clin Sci (Lond)*, 103: 325-328, 2002.
38. N. Murakami, T. Hayashida, T. Kuroiwa, K. Nakahara, T. Ida, M. S. Mondal, M. Nakazato, M. Kojima and K. Kangawa: Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats. *J Endocrinol*, 174: 283-288, 2002.
39. F. Yoshihara, M. Kojima, H. Hosoda, M. Nakazato and K. Kangawa: Ghrelin: a novel peptide for growth hormone release and feeding regulation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 5: 391-395, 2002.
40. H. Okumura, N. Nagaya, M. Enomoto, E. Nakagawa, H. Oya and K. Kangawa: Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39: 779-783, 2002.
41. T. Shiiya, M. Nakazato, M. Mizuta, Y. Date, M. S. Mondal, M. Tanaka, S. Nozoe, H. Hosoda, K. Kangawa and S. Matsukura: Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 240-244, 2002.
42. Y. Date, M. Nakazato, S. Hashiguchi, K. Dezaki, M. S. Mondal, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, T. Arima, H. Matsuo, T. Yada and S. Matsukura: Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*, 51: 124-129, 2002.
43. N. Nagaya, K. Miyatake, M. Uematsu, H. Oya, W. Shimizu, H. Hosoda, M. Kojima, N. Nakanishi, H. Mori and K. Kangawa: Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5854-5859, 2001.
44. N. Nagaya, M. Uematsu, M. Kojima, Y. Date, M. Nakazato, H. Okumura, H. Hosoda, W. Shimizu, M. Yamagishi, H. Oya, H. Koh, C. Yutani and K. Kangawa: Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation*, 104: 2034-2038, 2001.
45. N. Nagaya, M. Uematsu, M. Kojima, Y. Ikeda, F. Yoshihara, W. Shimizu, H. Hosoda, Y. Hirota, H. Ishida, H. Mori and K. Kangawa: Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation*, 104: 1430-1435, 2001.
46. M. Matsumoto, H. Hosoda, Y. Kitajima, N. Morozumi, Y. Minamitake, S. Tanaka, H. Matsuo, M. Kojima, Y. Hayashi and K. Kangawa: Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 287: 142-146, 2001.
47. H. Kaiya, M. Kojima, H. Hosoda, A. Koda, K. Yamamoto, Y. Kitajima, M. Matsumoto, Y. Minamitake, S. Kikuyama and K. Kangawa: Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J Biol Chem*, 276: 40441-40448, 2001.
48. N. Nagaya, M. Kojima, M. Uematsu, M. Yamagishi, H. Hosoda, H. Oya, Y. Hayashi and K. Kangawa: Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280: R1483-1487, 2001.

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、および国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

【Neuromedin Uおよび新規ペプチド Neuromedin Sに関する論文】

1. M. Moriyama, T. Sato, H. Inoue, S. Fukuyama, H. Teranishi, K. Kangawa, T. Kano, A. Yoshimura and M. Kojima: The neuropeptide neuromedin U promotes inflammation by direct activation of mast cells. *J Exp Med*, 202: 217-224, 2005.
2. T. Ida, K. Mori, M. Miyazato, Y. Egi, S. Abe, K. Nakahara, M. Nishihara, K. Kangawa and N. Murakami: Neuromedin S is a novel anorexigenic hormone. *Endocrinology*, 146: 4217-4223, 2005.
3. S. Shousha, K. Nakahara, M. Miyazato, K. Kangawa and N. Murakami: Endogenous neuromedin U has anorectic effects in the Japanese quail. *Gen Comp Endocrinol*, 140: 156-163, 2005.
- ④ K. Mori, M. Miyazato, T. Ida, N. Murakami, R. Serino, Y. Ueta, M. Kojima and K. Kangawa: Identification of neuromedin S and its possible role in the mammalian circadian oscillator system. *EMBO J.*, 24: 325-335, 2005.
- ⑤ R. Hanada, H. Teranishi, J. T. Pearson, M. Kurokawa, H. Hosoda, N. Fukushima, Y. Fukue, R. Serino, H. Fujihara, Y. Ueta, M. Ikawa, M. Okabe, N. Murakami, M. Shirai, H. Yoshimatsu, K. Kangawa and M. Kojima: Neuromedin U has a novel anorexigenic effect independent of the leptin signaling pathway. *Nat Med.*, 10: 1067-1073, 2004.
6. K. Nakahara, M. Kojima, R. Hanada, Y. Egi, T. Ida, M. Miyazato, K. Kangawa and N. Murakami: Neuromedin U is involved in nociceptive reflexes and adaptation to environmental stimuli in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 323: 615-620, 2004.
7. K. Nakahara, R. Hanada, N. Murakami, H. Teranishi, H. Ohgusu, N. Fukushima, M. Moriyama, T. Ida, K. Kangawa and M. Kojima: The gut-brain peptide neuromedin U is involved in the mammalian circadian oscillator system. *Biochem Biophys Res Commun*, 318: 156-161, 2004.
8. T. Hanada, Y. Date, T. Shimbara, S. Sakihara, N. Murakami, Y. Hayashi, Y. Kanai, T. Suda, K. Kangawa and M. Nakazato: Central actions of neuromedin U via corticotropin-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun*, 311: 954-958, 2003.
9. M. S. Mondal, Y. Date, N. Murakami, K. Toshinai, T. Shimbara, K. Kangawa and M. Nakazato: Neuromedin U acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via CRH system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284: G963-969, 2003.
10. C. Chu, Q. Jin, T. Kunitake, K. Kato, T. Nabekura, M. Nakazato, K. Kangawa and H. Kannan: Cardiovascular actions of central neuromedin U in conscious rats. *Regul Pept*, 105: 29-34, 2002.

【特許】

特願 2004-374029 PCT/JP2005/024188

発明の名称：新規ポリペプチドおよびその用途

出願日：平成16年12月24日

発明者：寒川賢治、森健二、宮里幹也、児島将康

出願人：国立循環器病センター総長 北村惣一郎、武田薬品工業株式会社