

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461082

研究課題名(和文) グレリンの生理作用を応用した新しい循環器疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy of cardiac disease utilizing physiological effect of ghrelin

研究代表者

徳留 健 (TOKUDOME, TAKESHI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：00443474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：グレリンは国立循環器病研究センターの寒川賢治所長らによって発見された胃から産生される摂食亢進ホルモンである。我々はこれまでにグレリンを心筋梗塞モデルに投与することで病態が改善することを報告した。我々は今回の研究で、内因性グレリンの心筋梗塞モデルにおける病態改善作用・グレリンが交感神経抑制・副交感神経賦活化を介して心筋梗塞・心肥大の病態を改善すること・グレリン受容体アゴニストであるヘキサレリンが心筋梗塞の病態を改善すること明らかにした。これらの知見は、グレリンのみならずグレリン受容体アゴニストも循環器疾患治療薬となり得る可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Ghrelin is a food intake promotion peptide that was discovered in the stomach by the group of Kenji kangawa (Director General, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute). We previously reported that ghrelin administration improves pathogenesis of myocardial infarction model. In the present study, we found that endogenous ghrelin improves pathogenesis of myocardial infarction and cardiac hypertrophy model, ghrelin protect the heart from remodeling after myocardial infarction and cardiac hypertrophy by inhibiting sympathetic nervous activity and activating parasympathetic nervous activity, and also ghrelin receptor agonist; hexarelin improves pathogenesis of myocardial infarction model. These findings suggest that not only ghrelin but also hexarelin can be a therapeutic agent of cardiac diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：グレリン 心筋梗塞 心肥大 交感神経 副交感神経

1. 研究開始当初の背景

グレリンは国立循環器病研究センター研究所の寒川賢治所長らによって発見された、成長ホルモン分泌刺激作用を持つ内因性ペプチドホルモンである。グレリンは主として胃内分泌細胞で産生され、摂食亢進・体重増加・消化管機能調節・エネルギー代謝調節に重要な作用を持つ。胃から分泌されたグレリンの情報は、迷走神経求心路を介して視床下部に伝達され、上記の生理作用発現に至る。グレリンの発見により、胃が消化機能だけではなく、エネルギー代謝や成長ホルモン分泌調節にも機能していることが明らかになり、肥満や摂食障害の病因・病態における意義も解明されつつある。さらに種々の疾患におけるカヘキシア・胃切除後の体重減少・神経性食思不振症などの治療に対するグレリンの臨床応用を念頭に置いた研究が、日本を中心に急速に進展しつつある。その後、グレリンが自律神経調節作用を有することが明らかとなったことから、申請者らは循環器疾患モデル動物におけるグレリン投与の治療的効果を検討した。その結果、冠動脈結紮直後にグレリンを単回皮下注射することで致死性不整脈が減少し、急性期死亡が明らかに抑制されること、さらに慢性期心機能が顕著に改善することを論文報告した。グレリンの受容体は、間脳の摂食中枢や下垂体の他、心臓迷走神経終末にも存在することから、申請者らは心筋梗塞急性期のグレリン投与が、心臓迷走神経求心路を介して交感神経抑制に働いた結果、致死性不整脈出現が抑制された機序を提唱している。このほかにも申請者らは、グレリンが有する生理作用に注目して基礎的検討を行い、4編の原著論文を発表した。しかし、内因性グレリンは心筋梗塞の病態にどのように関与しているのか、グレリンの循環器疾患モデルにおける治療的効果が交感神経抑制作用ですべて説明可能か否か、グレリン受容体を刺激するアゴニストではグレリン同様の治療的効果が得られないのか、等については研究の余地が残されており、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点である。

内因性グレリンは心筋梗塞の病態にどのように関与しているのか明らかにする。

グレリンの循環器疾患モデルにおける治療的効果が交感神経抑制作用ですべて説明可能か否か明らかにする。

グレリン受容体を刺激するアゴニストではグレリン同様の治療的効果が得られないのか明らかにする。

3. 研究の方法

内因性グレリンは心筋梗塞の病態にどのように関与しているのか明らかにする実験の方法については、C57BL/6J backgroundのグレリンノックアウトマウス(KO)および野生型マウス(WT)を用いた。イソフルラン吸入にて麻酔し、気管内挿管して人工呼吸管理とした。左第二～第三肋間にて開胸し、冠動脈前下降枝を結紮した後閉胸した。術中および術後30分間は心電図モニターおよび記録を行った。術後2週間観察し、死亡率および死亡原因を調べた。生存個体については心エコーによる評価・圧容積カテーテルによる心機能評価・心拍変動解析による自律神経活性評価・血中カテコラミン濃度測定・定量PCR法による遺伝子発現検討を行った。

グレリンの循環器疾患モデルにおける治療的効果が交感神経抑制作用ですべて説明可能か否かについては、このモデルにおいて遮断薬であるメトプロロールを飲水投与し、KOの死亡率・慢性期心機能がどの程度改善するかを評価した。またWTおよびKOに横行大動脈結紮による心肥大モデル(TAC)を作製し、心肥大形成における副交感神経活性の関与を調べるため、7nアセチルコリン受容体アゴニストであるニコチンを飲水投与した。モデル作製12週間後に心エコーで心機能・心臓形態を評価したほか、術後経時的に炎症性サイトカインであるIL-6とIL-1の血中濃度を測定した。

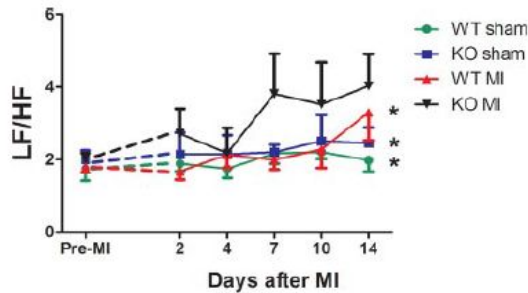
グレリン受容体を刺激するアゴニストではグレリン同様の治療的効果が得られないのかについては、グレリン受容体の合成アゴニストであるヘキサレリンを、心筋梗塞モデルを作製したグレリンノックアウトマウスに皮下投与して、生存率・心機能評価・自律神経活性評価等を行い、グレリンを投与した場合との病態の差異について比較検討を行った。

4. 研究成果

内因性グレリンは心筋梗塞の病態を改善する

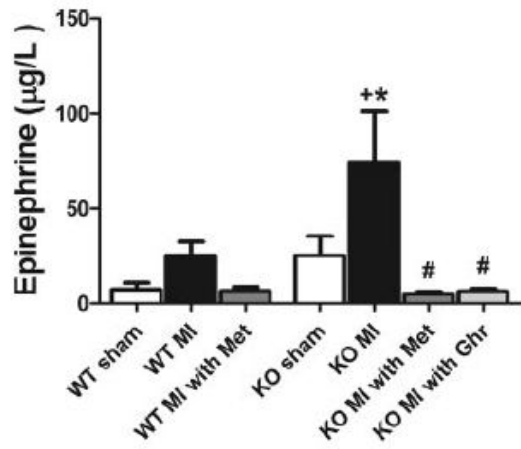
実験の結果、心筋梗塞作製後2週間の死亡率は、WT:51.2%、KO:73.9%と、KOで有意に高かった。死亡原因の内訳としては、KOにおいて不整脈死と心不全死が有意にWTを上回った。Sacrificeの結果、左室重量/脛骨長比がKOで有意に大であった。心エコーの観察では、左室内径短縮率が、KOにおいてWTより有意に低値であった。圧容積カテーテルによる血行動態評価では、左室拡張末期容積がKOでWTより有意に大きく、左室駆出率がKOでWTよりも有意に小であった。定量PCRによる遺

伝子発現検討では、ANP, BNP, α -skeletal actin の発現が KO において WT より有意に増加していた。心拍変動解析による自律神経活性評価では、下図のように KO で WT より有意に交感神経の指標である LF/HF が高値を示した。



n = 8. Mean \pm SEM; *P < .05 vs KO MI group.

血中カテコラミン濃度測定の結果では、下図のようにモデル作製後2週間における血中アドレナリン濃度が、KO では WT に比べ有意に高値であった。



n = 8. Mean \pm SEM; +P < .05 vs WT MI group

以上の結果より、外因性のみならず内因性グレリンも、心筋梗塞の病態に対して保護的に作用していることが示唆された。

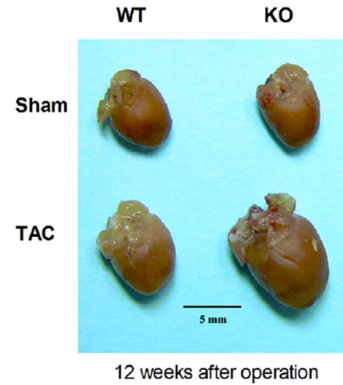
-1, 内因性グレリンは副交感神経活性賦活化を介して心肥大の病態を改善する

の結果より、内因性グレリンが交感神経抑制を介して心筋梗塞の病態を改善することは明らかになったが、グレリンの作用が全て交感神経抑制で説明可能かは疑問が残った。そこでグレリン KO に 遮断薬であるメトプロロールを飲水投与し、KO の死亡率・慢性期心機能がどの程度改善するかを評価した。結果、慢性期心機能はメトプロロール投与によりグレリン投与と同程度に改善したが、死亡率はメトプロロール投与により改善したものの、グレリン投与には及ばなかった。特に心破裂による死亡率には、メトプロロール投与群とグレリン投与群で顕著な差があっ

た。以上のことから、内因性グレリンの心筋梗塞病態改善作用には交感神経抑制のみでなく、他の作用(副交感神経活性賦活化など)も寄与していると考えられた。

-2, 内因性グレリンは副交感神経活性賦活化を介して心肥大の病態を改善する

下図に示すように、グレリン KO では WT に比較し TAC モデルにおいて顕著な心肥大を呈した(心エコーでも同様の結果が見られた)。



近年、心肥大は心臓の慢性炎症であるとの考え方が定着しつつあり、我々も炎症性サイトカインである IL-6 や IL-1 β の血中濃度を測定した。結果、モデル作製 2 日・2 週・12 週のいずれの時点においても、グレリン KO の IL-6・IL-1 β の血中濃度は WT のそれらより有意に高かった。一方で心拍変動解析により求めた自律神経活性においては、交感神経活性に両群で差を認めなかったが、副交感神経活性はグレリン KO で WT より有意に低下していた。そこで副交感神経活性低下と炎症性サイトカイン血中濃度の関連を調べる為、グレリン KO に 7n アセチルコリン受容体アゴニストであるニコチンを飲水投与したところ、グレリン KO の血中 IL-6・IL-1 β 濃度は有意に低下した。以上のことから、内因性グレリンは副交感神経活性賦活化を介した炎症反応抑制作用により、肥大から心臓を保護していると考えられた。

グレリン受容体アゴニスト(ヘキサレリン)は、心筋梗塞モデルの病態を改善する

グレリン受容体(GHS-R)合成アゴニストであるヘキサレリンを、心筋梗塞モデルを作製したグレリンノックアウトマウスに皮下投与して、グレリン投与群と生存率・心機能・自律神経活性について比較検討したところ、生存率は両者とも同程度に改善した。心機能についてはヘキサレリンがグレリン投与よりも有意に改善した。自律神経活性については、交感神経抑制・副交感神経活性賦活化の程度は両群で同程度であった。心機能改善効果がヘキサレリンで強かった点については、ヘキサレリンは GHS-R 以外に CD36 を活性化することから、CD36 を介したものと考察した。

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)

Mao Y, Tokudome T, Otani K, Kishimoto I, Miyazato M, Kangawa K. Excessive Sympathoactivation and deteriorated heart function after myocardial infarction in male ghrelin knockout mice. *Endocrinology*. 154(5):1854-1863; 2013. (査読あり)

Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I, Otani K, Hosoda H, Nagai C, Minamino N, Miyazato M, Kangawa K. Hexarelin treatment in male ghrelin knockout mice after myocardial infarction. *Endocrinology*. 154(10):3847-3854; 2013. (査読あり)

徳留 健、岸本一郎、宮里幹也、寒川賢治「グレリンによる循環器疾患治療の可能性」**循環器研究の進歩** 第34巻第1号 P58-68; 2013. (査読無)

Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I, Otani K, Miyazato M, Kangawa K. One dose of oral hexarelin protects chronic cardiac function after myocardial infarction. *Peptides*. 56:156-162; 2014. (査読あり)

Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I. Ghrelin as a treatment for cardiovascular diseases. *Hypertension*. 64 (3): 450-454; 2014. (査読あり)

Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I. The cardiovascular action of hexarelin. *J Geriatr Cardiol*. 11(3):253-8; 2014. (査読あり)

Mao Y, Tokudome T, Kishimoto I, Otani K, Nishimura H, Yamaguchi O, Otsu K, Miyazato M, Kangawa K. Endogenous ghrelin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy via a cholinergic anti-inflammatory pathway. *Hypertension*. 65(6): 1238-1244; 2015. (査読あり)

〔学会発表〕(計3件)

徳留 健「Ghrelin as a treatment for cardiovascular diseases」The Conference of Bioactive Peptides for Cell-Cell Communication 2014年9月11日 京都

徳留 健「生理活性ペプチドを応用した心血管疾患の新規治療法開発に関する研究」第18回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 高峰譲吉研究奨励賞受賞講演 2014年11月21日 横浜

徳留 健「グレリンによる循環器疾患治療の可能性」第18回日本心血管内分泌代謝学会学術総会(2014年11月21日)

〔図書〕(計3件)

Kishimoto I, Tokudome T, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K. 「Ghrelin」. Handbook of Biologically Active Peptides. 1408-1414; 2013.

Tokudome T, Kishimoto I, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin and the cardiovascular system. *Front Horm Res*. 43:125-33; 2014.

宮里幹也、徳留 健、岸本一郎、寒川賢治「生理活性ペプチド グレリンの循環器疾患治療への応用の可能性」**生命科学から創薬へのイノベーション**. P23-29. 2014

〔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
徳留 健(TOKUDOME TAKESHI)
国立研究開発法人 国立循環器病研究センター・研究所・室長
研究者番号：00443474

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし