

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19590840  
研究課題名（和文） グレリンノックアウトマウスの心・血管系における病態生理機能解析  
研究課題名（英文） The pathophysiological study of cardiovascular function in ghrelin knockout mice  
研究代表者  
御船 弘治（MIFUNE HIROHARU）  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号：70174117

## 研究成果の概要：

本研究課題は摂食促進ホルモンの一つであるグレリンについて、血圧調節機構におけるその病態生理学的機能を明らかにすることを目的とし、グレリン遺伝子欠損マウスの循環動態（血圧・心拍数）の経時的な変動および日内リズムの異常の有無をテレメトリー自動計測システムにて解析し、さらに血中心房性Na利尿ペプチド及びアンギテンシンⅡ動態を精査した。本研究により、グレリンが摂食促進作用以外に自律神経の機能を調節して血圧・心拍などのトーンバランスを制御する可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：グレリン、自律神経機能、血圧調節機構、グレリン KO マウス、日内リズム、  
テレメトリー自動計測システム

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでに生体内の血圧調節機構（体液性因子）に関与する代表的な血管拡張因子の一つである心房性Na利尿ペプチド（ANP）と血管収縮因子であるレニン・アンジオテンシン系（RAS）に関する研究を展開し、それらの病態生理学的意義を高血圧モデル動物にて明らかにしてきた。生体内の血圧調節機構には神経によるもの（中枢性）と体液性因子によるもの（末梢性）とに大別されるが、それらは複雑・巧妙に調節因子として相互・相補的に働く。これら神経および体液性因子による調節機構を統合調節する因子は現在まで不明のままであり、新規物質の探求が必須研究課題である。

グレリンは、1999年に本研究課題の研究分担者である児島ら<sup>1)</sup>によりラットおよびヒトの胃から発見された28個のアミノ酸からなるペプチドであり、その生理活性として強力な成長ホルモン分泌促進作用を有するだけでなく、摂食促進作用、脂肪蓄積など代謝系に対する様々な作用がみられる。最近では、循環器系に対する生理作用として降圧作用<sup>2)</sup>や心筋保護作用<sup>3)</sup>などが報告されているが、何れも断片的な報告であり、グレリンの心・血管系における病態生理学的意義については不明な点が多く、グレリンが生体内の血圧調節機構にどのように関与しているかは皆無である。

一方、我々はグレリン・ノックアウトマウス（グレリンKOマウス）を作出・維持しており、本KOマウスは生体内のグレリン遺伝子を完全に欠損するために生体内にグレリンが存在しない。これまでに海外の二研究グループからグレリンKOマウスの解析が報告されているが、目立った表現型は見つかっていない<sup>4)</sup>。我々は本KOマウスの特性をはじめその病態を現在精査中であり、摂

餌量や体重増加などのエネルギー代謝系において野生型マウスと相違が認められないものの、自発運動量や体温・血圧・心拍数の日内リズムに異常が認められ（図1）、グレリン欠損マウスにおいて自律神経機能に障害が生じていることを見つけた（未発表）。以上のように自律神経系による血圧調節機構にグレリンが関与している可能性が示唆されることから、本KOマウスにおける血圧・心拍数などの調節機構を早急に解明することは重要な研究課題である。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、以下の二つの目的にて遂行した。

### (1) 自律神経機能における血圧調節機構の解析：

グレリンの自律神経機能を介する血圧・心拍数の調節機構を明らかにすることを目的とし、グレリンKOマウスの循環動態（血圧・心拍数）の経時的な変動および日内リズムの異常の有無をテレメトリー自動計測システムにて解析した。さらに、合成グレリン投与後や交感神経遮断薬投与後のグレリンKOマウスの循環動態および迷走神経胃枝切除後の絶食時における循環動態の変化を詳細に検討し、グレリンの血圧・心拍数調節機構における生理学的意義を解析し、生体内における血圧および心拍数の自律神経によるトーンバランスにグレリンがいかなる役割を担っているかを検討した。

### (2) 心血管作動性ペプチドによる血圧調節機構の解析：

心血管作動性ペプチドによる血圧調節におけるグレリンの病態生理学的役割を明らかにすることを目的とし、生体内の代表的な血管拡張因子の一つであるANPと血管収縮因子であるRASに及ぼすグレリンの

影響をグレリンKOマウスにて精査し、グレリンKOマウスへのグレリン投与後の生体内の血圧調節機構に關与する液性因子の変化を生理学的ならびに分子生物学的に解析し、体液性因子による血圧調節機構におけるグレリンの生理学的役割を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) グレリンKOマウスの自律神経機能による血圧調節機構の解析：

##### テレメトリー自動計測システムによる解析

①合成グレリン投与後の変化；本KOマウスに合成グレリンを浸透圧ミニポンプにて腹腔内に持続投与し、血圧・心拍数の経時的な変動や日内リズム（48時間）を解析した。さらに、血圧・心拍波形のVariability解析により、合成グレリン投与後の変化が自律神経系の交感神経あるいは副交感神経優位な反応なのかを検討した。

②迷走神経胃枝切除による副交感神経機能解析；一般に胃内のグレリン分泌は、迷走神経胃枝を介して摂食中枢に作用する。従って、迷走神経胃枝を（求心性もしくは遠心性に）切除した野生型マウスと無処置マウスの血圧・心拍数の変動を比較検討し、迷走神経を介したグレリンの血圧調節機構を解析した。

#### (2) グレリンKOマウスの心血管作動性ペプチドによる血圧調節機構の解析：

##### 心房性Na利尿ペプチド (ANP) 及びアンギテンシンII (AII) 動態

①日内リズム；グレリンKOマウスの明期と暗期における血中ANPおよびAII濃度をラジオイムノアッセイにより定量し、本KOマウスのANPおよびAII動態（日内

リズム）を野生型マウスと比較解析した。

②合成グレリン投与後の変化；本KOマウスに合成グレリンを浸透圧ミニポンプにて腹腔内に持続投与し、明期と暗期における血中ANPおよびAII濃度をラジオイムノアッセイにより定量し、合成グレリン投与後の本KOマウスのANPおよびAII動態（日内リズム）を野生型マウスと比較解析した。

③迷走神経胃枝切除後の変化；迷走神経胃枝を（求心性もしくは遠心性に）切除した野生型マウスの明期と暗期における血中ANPおよびAII濃度を上記方法と同様に定量し、迷走神経を介したグレリンがANPおよびAIIによる血圧調節機構に關与しているのか否かを解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) グレリンKOマウスの血圧・心拍数変動：

①自発運動量；グレリンKOマウスと野生型マウスの明期と暗期の自発運動量は、両マウス共に明期に少なく、暗期に多い日内リズムが見られ、グレリンKOマウスと野生型マウスとの差は認められなかった。

②血圧・心拍数の日内リズム；野生型マウスの血圧・心拍数は、明期において低下し、暗期に上昇する傾向にあり、顕著な日内リズムが存在したが、グレリンKOマウスでは日内リズムがみられず、明・暗期をとおして不安定な変動パターンが認められた（図1）。また、血圧・心拍波形のVariability解析では、野生型マウスのLF/HF比は、明期に減少し暗期に増加し、明期では副交感神経活動が、暗期では交感神経活動が優位になる自律神経活動の日内リズムが存在したが、グレリ

ン KO マウスの LF/HF 比は、明・暗期をとおし高いレベルのまま推移しており、明・暗期共に交感神経活動が優位になっていた (図 2)。

図 1. 収縮期血圧の日内変動

野生型マウスの血圧は、明期において低下し、暗期に上昇する傾向にあり、顕著な日内リズムが存在したが、グレリン KO マウスでは日内リズムがみられなかった。

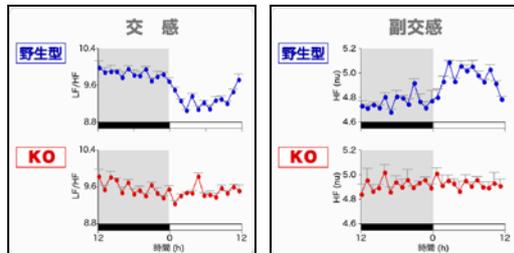
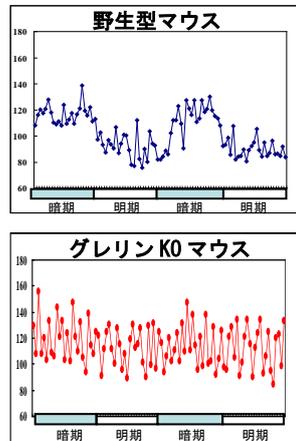


図 2. 交感・副交感神経活動の日内変動

グレリン KO マウスでは、交感および副交感神経活動の日内リズムが消失している。

- ③合成グレリン投与後の血圧・心拍数の日内リズム；合成グレリン投与後の本 KO マウスでは、野生型マウスと同様の明期において低下し、暗期に上昇する傾向にあり、顕著な日内リズムが存在した。また、血圧・心拍波形の Variability 解析では、合成グレリン投与後の本 KO マウスの LF/HF 比は、野生型マウスと同様の明期に減少し暗期に増加しており、自律神経活動の日内リズムが存在した。
- ④迷走神経胃枝切除後の野生型マウスの血圧・心拍数の日内リズム；迷走神経胃枝切除後の野生型マウスでは、KO マウスに認められた血圧・心拍数の日内リズムと同様の不安定な変動パターンを示した。

また、血圧・心拍波形の Variability 解析では、迷走神経胃枝切除後の野生型マウスの LF/HF 比は、明・暗期を通し高いレベルのまま推移しており、明・暗期共に交感神経活動が優位になっていた。

- (2) グレリン KO マウスの心血管作動性ペプチド動態：

- ①血中 ANP・A II 動態の日内リズム；野生型マウスでは明暗周期に同調した日内リズムが認められたが、本 KO マウスの血中 ANP・A II 動態は明暗周期と無関係な不安定な変動を示した。
- ②合成グレリン投与後の血中 ANP・A II 動態；グレリン投与後の KO マウスでは、血中 ANP 及び A II 動態共に明暗周期に伴う日内リズムは認められなかった。
- ③迷走神経胃枝切除後の血中 ANP・A II 動態；迷走神経胃枝切除後の野生型マウスの血中 ANP 及び A II 動態は、明暗周期と無関係な不安定な日内変動を示した。

以上の結果から、グレリン KO マウスに認められた血圧・心拍数の日内リズムの消失は、明期における自律神経活動の異常によることが考えられ、グレリンが摂食促進作用以外に自律神経の機能を調節して血圧・心拍などのトーンバランスを制御することが示唆された。さらに、胃から分泌されたグレリンは、迷走神経胃枝を介し中枢レベルで自律神経機能を調節して血圧・心拍などのトーンバランスを制御し、心房性 Na 利尿ペプチド及びアンギテンシン II などの末梢性の血圧調節因子の制御機構に関与する可能性が考えられ、今後さらに詳細な検討が必要である。

## 文献

- 1) Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K.  
Ghrelin is a

growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 402, 656-60 (1999).

- 2) Shinde U.A., Desai K.M., Yu C., Gopalakrishnan V. Nitric oxide synthase inhibition exaggerates the hypotensive response to ghrelin: role of calcium-activated potassium channels. J Hypertens 23, 779-784(2005)
- 3) Makino Y., Hosoda H., Shibata K., Makino I., Kojima M., Kangawa K., Kawarabayashi T. Alteration of plasma ghrelin levels associated with the blood pressure in pregnancy. Hypertension 39, 781-784(2002)
- 4) De Smet B., Depoortere I., Moechars D., Swennen Q., Moreaux B., Cryns K., Tack J., Buyse J., Coulie B., Peeters T.L. Energy homeostasis and gastric emptying in ghrelin knockout mice. J Pharma Exp Therap 316, 431-439(2005)

#### 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3件)

- ① 御船弘治, 佐藤貴弘, 寒川賢治, 児島将康 グレリンによる自律神経機能の調節メカニズムの解明. 第26回九州実験動物研究会総会, 2008. 11. 15
- ② 佐藤貴弘, 御船弘治, 井田隆徳, 中島義基, 高橋知子, 寒川賢治, 児島将康 グレリンによる自律神経機能の調節メカニズムの解明. 第81回日本内分泌学会学術総会, 2008. 5. 16
- ③ 佐藤貴弘, 黒川衛, 井田隆徳, 寒川賢治, 児島将康 グレリンノック

アウトマウスにおける摂食行動, 摂食リズム, 学習記憶能の解析. 第80回日本内分泌学会学術総会, 2007. 6. 15

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

御船 弘治 (MIFUNE HIROHARU)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号: 70174117

##### (2) 研究分担者

児島 将康 (KOJIMA MASAYASU)

久留米大学・分子生命科学研究所・教授

研究者番号: 20202062

佐藤 貴弘 (SATO TAKAHIRO)

久留米大学・分子生命科学研究所・講師

研究者番号: 50368883