

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 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390252

研究課題名（和文）摂食促進ホルモンの自律神経系を介した心臓保護機序の解明

研究課題名（英文）The therapeutic potentials of ghrelin in cardiovascular diseases-roles of the autonomic nervous system.

研究代表者

岸本 一郎（KISHIMOTO ICHIRO）

独立行政法人国立循環器病研究センター・糖尿病・代謝内科・医長

研究者番号：80312221

研究成果の概要（和文）：

グレリンは、その発見以来、成長ホルモン分泌亢進や摂食、エネルギー代謝における作用が精力的に研究されているが、生体における役割は未だ不明な点が多い。本研究では、心筋梗塞モデル作成直後にグレリンを単回皮下注射することで、急性期の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を明らかにした。また、グレリン投与群では慢性期心不全の有意な改善を認めた。これらは、グレリンの急性心筋梗塞とその後の心不全における治療的意義を明らかにしたものであり、循環器疾患においてグレリンの臨床的有用性とそのユニークな作用機序を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：

Ghrelin is an endogenous ligand for the growth-hormone secretagogues receptor (GHS-R). In addition to its role in the regulation of growth hormone (GH) release, the 28-amino acid peptide also stimulates food intake and induces adiposity. Since GHS-R is detected in the heart and blood vessels, the role of this peptide in the regulation of cardiovascular function has been suggested. Recently, we investigated the effect of daily peripheral ghrelin administration for 2 weeks in a rat model of myocardial infarction and found that ghrelin significantly attenuated cardiac dysfunction and remodeling induced by infarction. Interestingly, chronic administration of ghrelin dramatically suppressed the increase in heart rate and plasma noradrenaline concentration after infarction to the levels similar to sham-operated controls. The effects of ghrelin were accompanied by a decrease in the ratio of the low-to-high frequency spectra of heart rate variability. Moreover, we have also shown that one-shot subcutaneous administration of ghrelin in the very acute phase following infarction effectively rescues cardiac dysfunction/remodeling, prevents arrhythmias and significantly improves mortality. By the direct recording of cardiac sympathetic nerve activity, it is demonstrated that early ghrelin administration suppresses cardiac sympathetic nerve activity excessively activated after infarction. Surprisingly, one-shot ghrelin administration in the acute phase of myocardial infarction improved cardiac dysfunction and sympathetic hyperactivity in the chronic phase. It is, therefore, suggested that ghrelin is potentially useful as a novel therapy for heart failure, arrhythmia and death in myocardial infarction, with its unique mechanism of action.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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、心臓保護、自律神経

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、寒川らが胃組織から世界に先駆けて精製・構造決定することに成功した Growth hormone secretagogue 受容体 (GHS-R) の内因性リガンドである。グレリンはアミノ酸 28 個からなり、3 番目のセリン残基が脂肪酸 (n-オクタン酸) でアシル化修飾された特徴的な構造のペプチドであるが、この脂肪酸修飾は受容体との結合および生物作用の発現に必須であることが証明されている。グレリンは主として胃内分泌細胞で産生され、摂食亢進や体重増加、消化管機能調節などエネルギー代謝調節に重要な作用を持ち、今まで知られている中で唯一の末梢で産生される摂食促進ペプチドである。胃から分泌されるグレリンの情報は、求心性迷走神経を介して摂食や成長ホルモン分泌調節の中樞である視床下部に伝達され、これらの促進作用を発現することが考えられている。グレリンの発見により、胃が消化機能だけでなく、エネルギー代謝や成長ホルモンの分泌調節にも機能していることが明らかになり、肥満や摂食障害などの病因におけるグレリンの意義も解明されつつある。カヘキシア (悪液質) の治療に合成グレリンを用いる臨床研究も、わが国ですでに始まっており、グレリンの持つ幅広い生理作用の解明や薬剤としての臨床応用研究が本邦を中心として急速に進展しつつある。

2. 研究の目的

グレリンの研究はその発見以来成長ホルモン分泌亢進や摂食、エネルギー代謝に焦点が当たってきており、循環器系における役割も主に重症心不全時の悪液質改善を主眼とした研究がなされてきた。そこで、われわれは循環器疾患に対するグレリンの治療効果を検討する目的で、まず、低酸素による肺高血圧に対する投与効果を検討した。この結果、グレリン投与群では明らかに肺高血圧が改善されており、グレリンが循環器疾患におい

ても重要な治療的意義を有することを明らかにした。次に、グレリンの投与が心筋梗塞慢性期の心不全を改善することを見出した。この効果は、血圧の有意な変化を伴わなかったことから血行動態の改善以外の作用機序の存在が考えられ、それまで摂食促進ホルモンと考えられてきたグレリンが、心臓にも作用を及ぼしているという意外な事実が示された。そこで本研究ではグレリンの心臓保護効果をさらに詳細に検討し、その機序を明らかにする。

3. 研究の方法

心筋梗塞急性期および慢性期におけるグレリンの投与効果を検討する目的で、心筋梗塞モデルに対してグレリンを連日 2 週間または急性期単回投与した。ラットの冠動脈前下行枝を結紮し実験的に急性心筋梗塞モデルを作成した。グレリン慢性投与実験では、心筋梗塞後にグレリン 100 μg/日を 2 週間皮下注射した後の血行動態・心機能・血中カテコラミン濃度および心拍変動解析における自律神経指標を検討した。グレリン単回投与実験では、心筋梗塞モデル作成直後にグレリン 150 μg を単回皮下注射した後、急性期の致死性不整脈発症頻度と急性期死亡率を検討した。また、心臓交感神経遠心路の電気活動を測定した。さらに、慢性期における心機能の改善効果を検討した。

4. 研究成果

慢性投与効果

心筋梗塞後の心機能低下と左室リモデリングはしばしば心不全を引き起こし予後不良である。われわれは、心筋梗塞におけるグレリン投与の治療効果を検討する目的で、冠動脈を結紮した実験的心筋梗塞モデルラットに翌日からグレリンを連日皮下投与し 2 週間後の心機能と形態を生食投与対照群と比較検討したところ、グレリン投与群では心筋梗

塞後の左室拡張末期径の増加が有意に抑制されていた。また、グレリン投与は、心筋梗塞後の左室拡張末期圧上昇を有意に抑制（対照群 21 mmHg vs グレリン投与群 15 mmHg）し、短縮率や LV dP/dt で評価した左室収縮能や拡張能の低下も改善した。これらの効果は残存心筋の線維化抑制を伴っていた。よって、グレリンの慢性投与は心筋梗塞後の心機能低下と心臓リモデリングを改善することが明らかとなった。

急性心筋梗塞後の交感神経活性化に対する抑制効果

ラットに心筋梗塞モデルを作成すると心拍数は著明に増加するが、グレリン投与群ではシャム群と同程度にまで完全に抑制されており、この効果は心機能改善やリモデリング抑制効果と比較して顕著であった。またグレリン投与は心筋梗塞後の血中ノルアドレナリン濃度を顕著に抑制していた（血中ノルアドレナリン濃度は、生食投与群では心筋梗塞後約4倍に増加するが、グレリン投与群では約1.2倍の増加にとどまっていた）。これらの事実より、グレリン投与群で交感神経系が抑制されている可能性に着目し、次に心拍変動解析を用いた検討を行った。心筋梗塞後1週間のラットにグレリン(100 μg/kg)を皮下投与した後1, 2時間の心拍変動をパワースペクトラム解析し、高周波成分(HF)と低周波成分(LF)に分け、HFを副交感神経活性の指標、LF/HFを交感神経活性の指標として自律神経機能の評価した。心筋梗塞ラットではシャム手術をしたラットと比較して明らかに交感神経活性が上昇しており、生食投与群では観察期間中上昇したままであったが、グレリン投与群では時間依存性に交感神経活性化が抑制されていた。このことより、投与したグレリンはなんらかの機序を介して交感神経を抑制的に調節していることが考えられた。

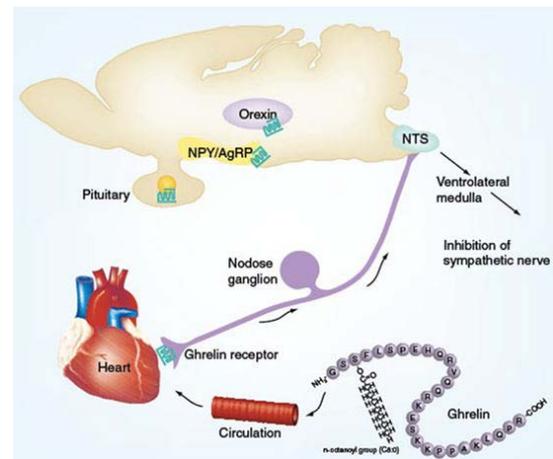
グレリンによる交感神経抑制作用とその機序

次に、グレリンの作用部位を明らかにするため、心筋梗塞3日後の心臓におけるグレリン受容体(GHS-R)の局在を免疫組織染色を用いて検討したところ、グレリン受容体は、心筋細胞や血管細胞、繊維細胞などには、ほとんど認められず、主に末梢神経終末に証明されることが判明した。先行研究から、1) グレリン受容体は迷走神経求心性ニューロンで産生され、求心線維末端へ輸送されること、2) 心筋にも末梢神経求心繊維が豊富に分布していること、3) グレリンの食欲亢進作用と成長ホルモン分泌促進作用が、末梢における迷走神経求心繊維の電気活動を抑制することによりもたらされること、が明らかとな

っている。これらを考え合わせると、投与したグレリンは、心臓などの末梢臓器に分布する迷走神経求心路(nodose ganglionをその細胞体とする)の神経終末に局在する受容体に結合し、その情報が延髄孤束核(NTS)に伝達され、ニューロンを変えて延髄の血管運動中枢を介して自律神経機能に影響していることが想像される。下図にグレリンの交感神経抑制機序に関するわれわれの仮説を模式的に示している(Expert Rev Endocrinol Metab. 2009 vol14 no3 pp283-289より引用)。

急性投与効果

急性心筋梗塞時の交感神経活性の過亢進は、心筋酸素消費量の増大や致死性不整脈を引き起こすことが知られている。そこで、心筋梗塞直後にグレリンを投与することの交感神経活性や不整脈に及ぼす効果を検討した。心筋梗塞直後にグレリンを単回投与したラットにおける心臓交感神経活性を直接測定したところ、グレリンを投与した群では心筋梗塞後の交感神経活性の時間依存的上昇が



ほとんど認められなかった。また、(直後ではなく)2時間後にグレリンを投与した群においても心臓交感神経活性はその後有意に抑制されていた。さらに、心筋梗塞後6時間までの死亡率を検討したところ、生食対照群では62%であったが、グレリン投与群では23%と有意な差を認めた。詳細な検討により死因を検討したところ心筋梗塞後の急性期死亡の原因は大部分が不整脈死であったが、グレリン投与群では不整脈死の頻度が、生食投与対照群の約6分の1に減少していた。また、心室性不整脈の出現頻度もグレリン投与により抑制されていた。これらの事実より、グレリンは急性心筋梗塞後に過緊張した交感神経活性を効果的に抑制し、心室性不整脈頻度を減少させ、死亡率を低下すると考えられ、早期の単回投与が有効である可能性が示唆されている。

急性期単回投与の慢性効果

さらに最近、心筋梗塞発症直後にグレリンを単回皮下注射することで、急性期のみならず慢性期にまで効果が持続することを示唆するデータを得ている。急性心筋梗塞後にグレリンまたは対照も生存した動物を慢性期まで追跡すると、対照群と比較して、グレリン投与群では心不全の有意な改善を認めた。下図にその左室圧容量曲線(P-V loop)を示しているがシャム手術群(sham)に比較して心筋梗塞群(MI+Saline)ではP-V loopが明らかに右方移動しており心機能の低下が示されている。一方心筋梗塞後グレリン単回投与群(MI+Ghrelin)ではP-V loopの右方移動の程度が軽減していた。シャム群、心筋梗塞群、心筋梗塞後グレリン投与群の左室駆出率はそれぞれ58%, 28%, 43%であり、グレリン単回投与は有意に心機能を改善した(P = 0.014)。

次に心臓交感神経遠心路の電気活動を測定することにより、これらの動物における交感神経活性を検討したところ、心筋梗塞後グレリン投与群では交感神経活性がシャム群と同程度まで抑制されていた(心筋梗塞群ではシャム群に比較して交感神経活性が2倍に亢進していた)。これらの事実は、心筋梗塞におけるグレリンの急性期単回投与が、慢性期の心機能を改善し、交感神経活性を抑制するという予想外の結果である。

以上の研究は、グレリンの循環器疾患における治療的意義を初めて明らかにしたものであり、このペプチドホルモンの投与がこれら循環器疾患の臨床応用に対して有用である可能性を強く示唆するものである。

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)

[雑誌論文] (計21件)

① Reduced ghrelin production induced anorexia after rat gastric ischemia and reperfusion. Mogami S, Suzuki H, Fukuhara S, Matsuzaki J, Kangawa K, Hibi T. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 査読無. 302(3):G359-64. 2012.

[<http://ajpgi.physiology.org/content/early/2011/11/18/ajpgi.00297>. 2011]

② Ghrelin and cardiovascular diseases. Kishimoto I, Tokudome T, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K. **J Cardiology**. 査読無. 59:8-13. 2012.

[DOI : 10.1016/j.jjcc.2011.11.002]

③ Transgenic overexpression of intralyslet ghrelin does not affect insulin secretion or glucose metabolism in vivo. Bando M,

Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Adachi S, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 査読無. 302(4):E403-8. 2012.

[DOI : 10.1152/ajpendo.00341.2011]

④ Natriuretic peptide system: an overview of studies using genetically engineered animal models. Kishimoto I, Tokudome T, Nakao K and Kangawa K. **FEBS Journal**. 査読有. 278:1830-1841. 2011.

[DOI : 10.1111/j.1742-4658.2011.08116.x]

⑤ Roles of guanylyl cyclase-A signaling in the cardiovascular system. Saito Y, Kishimoto I, Nakao K. **Can J Physiol Pharmacol**. 査読無. 89(8):551-556. 2011.

[DOI : 10.1139/y11-022]

⑥ 摂食・エネルギー調節に関わる生理活性ペプチドの機能と糖尿病やメタボリックシンドロームを標的とした創薬展開. 岸本一郎, **実験医学増刊 代謝・内分泌ネットワークと医薬応用**. 査読無. 29(5). 2011.

[<http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758103138/>]

⑦ 内因性ナトリウム利尿ペプチドの虚血組織血管新生促進作用. 徳留健, 岸本一郎, 寒川賢治. **治療**. 査読無. 93:686-688. 2011.

[http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=201102206638182146]

⑧ Association of plasma B-type natriuretic peptide levels with obesity in a general urban Japanese population: the Suita Study. Sugisawa T, Kishimoto I, Kokubo Y, Makino H, Miyamoto Y, Yoshimasa Y. **Endocr J**. 査読有. 57(8):727-733. 2010.

[DOI : 10.1507/endocrj.K10E-067]

⑨ Visceral fat is negatively associated with B-type natriuretic peptide levels in patients with advanced type 2 diabetes. Sugisawa T, Kishimoto I, Kokubo Y, Nagumo A, Makino H, Miyamoto Y, Yoshimasa Y. **Diabetes Research and Clinical Practice**. 査読有. 89:174-180. 2010.

[DOI : 10.1016/j.diabres.2010.03.012]

⑩ Vasodilator therapy with hydralazine induces angiotensin AT receptor-mediated cardiomyocyte growth in mice lacking guanylyl cyclase-A. Li Y, Saito Y, Kuwahara K, Rong X, Kishimoto I, Harada M, Horiuchi M, Murray M, Nakao K. **Br J Pharmacol**. 査読有. 159:1133-1142. 2010.

[DOI : 10.1111/j.1476-5381.2009.00619.x]

⑪ 内因性ナトリウム利尿ペプチドの虚血組織血管新生における役割. 徳留健, 岸本一郎, 寒川賢治. **The Journal of Japanese College of Angiology**. 査読無. 50:169-174. 2010.

[<http://www.jc-angi-ology.org/journal/>]

pdf/2010/169.pdf]

⑫内因性 ANP・BNP による血管新生, 血管恒常性維持機構. 徳留健, 岸本一郎, 山原研一, 新藤隆行, 川上速人, 白井幹康, 寒川賢治. **血管**. 査読無. 33:75-80. 2010.

[http://pgx.medic.mie-u.ac.jp/upload/p4_zf20110201144112.pdf]

⑬グレリンの心血管作用とその機序. 岸本一郎, 徳留健, 寒川賢治. **循環器内科**. 査読無. 67:171-177. 2010.

[<http://www.kahyo.com/item/J201002-672>]

⑭SPring-8 高輝度放射光を用いた小動物の心臓・血管機能の画像解析. 白井幹康, James Pearson, Daryl Schwenke, 曾野部崇, 藤井豊, 吉本光佐, 徳留健, 清水壽一郎, 寒川賢治, 梅谷啓二, 八木直人. **循環器研究の進歩**. 30(1):70-82, 2010.

[<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201002296524328312>]

⑮Decreased circulating CD34+ cells are associated with progression of diabetic nephropathy. Makino H, Okada S, Nagumo A, Sugisawa T, Miyamoto Y, Kishimoto I, Kikuchi-Taura A, Soma T, Taguchi A, Yoshimasa Y. **Diabet Med**. 査読有. 26(2):171-173. 2009

[DOI: 10.1111/j.1464-5491.2008.02638.x]

⑯Guanylyl cyclase-A inhibits angiotensin II type 2 receptor-mediated pro-hypertrophic signaling in the heart. Li Y, Saito Y, Kuwahara K, Rong X, Kishimoto I, Harada M, Adachi Y, Nakanishi M, Kinoshita H, Horiuchi M, Murray M, Nakao K. **Endocrinology**. 査読有. 150(8):3759-3765. 2009

[DOI: 10.1210/en.2008-1353]

⑰Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. Tsukamoto O, Fujita M, Kato M, Yamazaki S, Asano Y, Ogai A, Okazaki H, Asai M, Nagamachi Y, Maeda N, Shintani Y, Minamino T, Asakura M, Kishimoto I, Funahashi T, Tomoike H, Kitakaze M. **J Am Coll Cardiol**. 査読有. 53(22):2070-2077, 2009.

[DOI: 10.1016/j.jacc.2009.02.038]

⑱Natriuretic Peptide Signaling via Guanylyl Cyclase (GC)-A: An Endogenous Protective Mechanism of the Heart. Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Garbers DL, Nakao K and Kangawa K. **Current Cardiology Reviews**. 査読無. 5:45-51. 2009.

[DOI: 10.2174/157340309787048068]

⑲Impaired Recovery of Blood Flow After Hind-Limb Ischemia in Mice Lacking Guanylyl Cyclase-A, a Receptor for Atrial

and Brain Natriuretic Peptides. Tokudome T, Kishimoto I, Yamahara K, Osaki T, Minamino N, Horio T, Sawai K, Kawano Y, Miyazato M, Sata M, Kohno M, Nakao K, Kangawa K. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 査読有. 29(10):1516-1521. 2009.

[DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.187526]

⑳Therapeutic potentials of ghrelin in cardiac diseases. Kishimoto I, Tokudome T, Schwenke DO, Soeki T, Hosoda Y, Nagaya N and Kangawa K. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**. 査読無. 4:283-289. 2009.

[DOI: 10.1586/eem.09.7]

㉑グレリン. 宮里幹也, 岸本一郎, 寒川賢治. **Heart View**. 査読無. 13(12):99-104. 2009.

[<http://www.medicalview.co.jp/catalog/MAGA17542-09-11-0.html>]

[学会発表] (計9件)

①発表者: 岸本一郎

発表標題: Cardiovascular significance of the natriuretic peptide system

学会等名: 第16回世界心臓病学会議

発表年月日: 2011年7月26日

発表場所: Hyatt Regency Vancouver

②発表者: 岸本一郎

発表標題: 2型糖尿病患者の血中B型ナトリウムペプチド(BNP)に及ぼす体格指数(BMI)と腹部脂肪面積の影響

学会名: 第47回日本臨床分子医学会学術集会

発表年月日: 2010年4月11日

発表場所: 東京国際フォーラム

③発表者: 岸本一郎

発表標題: The role of natriuretic peptide/GC-A in obesity-related diseases.

学会名: 国際心血管内分泌代謝

シンポジウム

発表年月日：2010年4月1日

発表場所：奈良県新公会堂

④発表者：岸本一郎

発表標題：肥満関連疾患におけるナトリウム利尿ペプチド/GC-Aの役割

学会名：第14回日本心血管内分泌代謝学会学術総会

発表年月日：2010年3月31日

発表場所：奈良県新公会堂

⑤発表者：岸本一郎

発表標題：The cardiac natriuretic peptides/guanylyl cyclase-A signaling path way in cardiovascular/metabolic disease.

学会名：第14回国際内分泌学会

発表年月日：2010年3月29日

発表場所：国立京都国際会館

⑥発表者：岸本一郎

発表標題：The therapeutic potentials of ghrelin in cardiovascular diseases.

学会名：グレリン国際シンポジウム2009

発表年月日：2009年11月20日

発表場所：東京国際フォーラム

⑦発表者：岸本一郎

発表標題：メタボリックシンドロームとその関連腎症におけるナトリウム利尿ペプチド情報伝達系の関与

学会名：第45回高血圧関連疾患モデル学会学術総会

発表年月日：2009年9月4日

発表場所：東京ステーションコンファレンス

⑧発表者：岸本一郎

発表標題：グレリンの心臓保護作用とその機序－自律神経系の関与

学会名：第6回GPCR研究会

発表年月日：2009年5月8日

発表場所：日本科学未来館

⑨発表者：岸本一郎、徳留健、寒川賢治

発表標題：内因性ナトリウム利尿ペプチド系の血管形成における新たな意義とその機序

学会名：第82回日本内分泌学会学術総会

発表年月日：2009年4月23日

発表場所：群馬県民会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 一郎 (KISHIMOTO ICHIRO)

独立行政法人国立循環器病研究センター・糖尿病代謝内科・医長

研究者番号：80312221

(2) 研究分担者

徳留 健 (TOKUDOME TAKESHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・室長

研究者番号：00443473

寒川 賢治 (KANGAWA KENJI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・所長

研究者番号：00112417

(3) 連携研究者

なし