

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591056

研究課題名(和文) グレリンの多面的効果による難治性非虚血性心疾患治療法の開発

研究課題名(英文) A new treatment for refractory non-ischemic heart disease with ghrelin via multifaceted effects

研究代表者

添木 武 (SOEKI, Takeshi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：60393211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性心筋炎モデル並びに心房細動モデルのラットを作製し、3週間グレリンの投与を行った。心筋炎モデルでは、グレリン投与により左室径の拡大並びに左室内径短縮率の低下が改善された。また、左室拡張末期圧の上昇も抑制された。グレリンは心筋炎に伴う形態学的コラーゲン密度および組織学的な炎症の増加を軽減した。そして、グレリン投与は心筋でのTh1系サイトカインの遺伝子発現の増加を抑制し、TNF- α やMCP-1などの炎症性サイトカインの遺伝子発現も抑制していた。また、心房細動モデルでは、グレリン投与は心拍数減少効果を示し、心房細動の誘発率を著明に減少させた。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune myocarditis was induced by immunization in male Lewis rats. After the treatment of ghrelin or vehicle for 3 weeks, left ventricular (LV) enlargement and the deteriorated LV fractional shortening were improved. There was a significant decrease in LV end-diastolic pressure in ghrelin-treated rats. In addition, ghrelin markedly attenuated an increase in morphometrical collagen volume fraction and histological inflammation in LV. Ghrelin also attenuated the enhanced expression of Th1 cytokines and ameliorated the mRNA expression of TNF- α and MCP-1 in the heart of rats with myocarditis. In addition, spontaneously hypertensive rats were treated with ghrelin or vehicle for 3 weeks as atrial fibrillation (AF) model after 8-hour right atrial rapidly pacing. The administration of ghrelin significantly reduced heart rate and AF inducibility compared with vehicle.

研究分野：医歯薬学

キーワード：循環器 生理活性 薬理学 心臓病

1. 研究開始当初の背景

グレリン (Ghrelin) は、1999年に寒川らにより胃組織から精製・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 (Nature 402:656-60,1999)。グレリンは GH 分泌促進活性を有し、ほかに、摂食調節、糖および脂質代謝、骨代謝および心血管などに対する多彩な生理活性を有することが明らかにされている。心血管作用については、GH を介した蛋白同化作用や強心作用、GHS-R を介した血管拡張作用などが報告されており、寒川らにより慢性心不全に伴い心悪液質に陥った患者を対象に臨床試験が推し進められている。

しかしながら、急性心筋梗塞などの虚血性心疾患に対する特異的治療効果は不明であり、申請者はこれまでの研究において、心筋梗塞ラットにグレリンを投与し、心保護作用と心臓自律神経への影響を調べた。その結果、グレリンは心拍数を減少させ、最大および最小 dP/dt といった指標も改善し、血中ノルアドレナリン濃度の上昇を有意に抑制した。また、グレリンは梗塞により増加していた交感神経活性の指標である LF/HF 比を低下させた (Am J Physiol Heart Circ Physiol 294:H426-32,2008)。さらに、申請者は心筋虚血モデルラットに対するグレリンの抗不整脈効果を検討したところ、グレリン投与群では心室性頻拍性不整脈の出現頻度は有意に抑制されていた。この作用機序のひとつとして、グレリンの自律神経調節 (特に副交感神経系への作用) による心筋細胞でのリン酸化 Connexin 43 の発現保持が関与していることが判明した (Heart Vessels 2013 Nov;28:795-801.)。これらの結果より、グレリンは交感神経抑制と副交感神経亢進作用などにより虚血性心疾患の抗心臓リモデリング薬あるいは抗不整脈薬として有用であると考えられた。

また、一方で、グレリンの心血管系へのユニークな作用として、培養心筋細胞でのアポトーシス抑制効果や血管内皮細胞、T リンパ球、およびマクロファージでの抗炎症作用などが報告されているが、ヒト心疾患または動物の心臓病モデルにおいてこれらの効果を立証した報告はない。抗アポトーシス効果について、申請者はラット心筋虚血モデルにおいて、グレリンの投与が ERK 1/2 並びに PI3K/Akt を介して心機能を改善し心臓リモデリングを抑制することを見出した (2010年 AHA 学術集会にて発表)。このことから、グレリンは GH や自律神経を介する作用と並んで直接的に心保護作用を有する可能性があると考えられた。抗炎症作用については、グレリンとその受容体 (GHS-R) は T リンパ球およびマクロファージに発現しており、グレリンは GHS-R を介して、炎症誘発性サイトカインの発現を抑制することが報告されており (J Clin Invest 114: 57-66,2004)

in vivo においてもこの抗炎症作用を活かした応用が期待される。実際、大腸炎モデルマウスへのグレリン投与が 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1) を介する自己免疫性の反応を抑制することにより治療効果を示したことが報告された (Gastroenterology 130:1707-20,2006)。

一方で、急性心筋炎は死亡率が約 10%とされており予後不良であるにもかかわらず、未だ確立された根本的治療法がない疾患である。また、拡張型心筋症の 5 年生存率は近年改善しているとはいえ 70~80%とされている。そして、心不全などに伴う心房細動の加療は、ほとんどの抗不整脈薬が (心抑制などの) 重篤な副作用を伴いやすいことなどから難渋するケースが多い。心筋炎の原因にはウイルス感染と自己免疫があるが、ウイルス性心筋炎でも感染した心筋細胞に対する宿主の自己免疫が病態の中心であると考えられている。そして、自己免疫性心筋炎の発症、遷延、治癒を制御するのは 1 型ヘルパー T 細胞 (IL-1、IL-2、IFN- γ などを産生) と 2 型ヘルパー T 細胞 (IL-4、IL-10 などを分泌) のバランスであることが認識されるようになった。これらの心筋炎発生機序に対し、上記のようなグレリンの特徴を重ね合わせると本疾患に対するグレリンの効果が期待される。グレリンは前述のように抗アポトーシス効果も有しておりこの効果も期待できる。また、拡張型心筋症の病態形成、進行に関してもアポトーシスによる心筋細胞脱落の関与が報告されており、グレリンの抗アポトーシス効果が期待できる。さらに、グレリンの自律神経調節作用 (交感神経抑制並びに副交感神経活性化) も本疾患でエビデンスを有する遮断薬と同等あるいはそれ以上の効果が期待できる。心房細動においては、グレリンの自律神経調節作用による抗不整脈効果と抗炎症作用による抗心房リモデリング効果が期待できる。このように、グレリンは非虚血性心疾患においても虚血性心疾患以上に治療薬として有用である可能性があり、本研究では、難治性非虚血性心疾患に対するグレリンの多面的な効果を検討し、そのメカニズムを解明することを最大の目的とする。

2. 研究の目的

ラット自己免疫性心筋炎モデルおよび心房細動モデルラットを用いて、心筋細胞並びに浸潤細胞でのグレリンの治療効果とそのメカニズムを検討する。まず、自己免疫性心筋炎においては特にグレリンの抗炎症作用に注目して研究を行う。次に、心房細動モデルラットにおいて、グレリンの心房細動抑制効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 自己免疫性心筋炎に対するグレリンの

効果

劇症型を呈しやすいと報告されている自己免疫性心筋炎モデルを対象とする。9 週齢 Lewis ラットの後肢掌に精製ブタミオンを皮下投与する。ミオシン感作後 2 から 3 週目に自己免疫性心筋炎が発症したラットを対象とする。まず、本モデルに対し心臓超音波検査（ラット・マウス用の 12MHz プローブを使用）を行い、ベースラインの心機能を評価する。次に、グレリンの投与（200 μg/kg/日、皮下注）を 3 週間行う。その後、超音波による心機能並びに形態の評価を行い、心臓カテーテルによる心内圧の測定を行う（AD Instruments 社製 PowerLab system を使用）。安楽死処置後心臓を摘出し、Hematoxylin-eosin 染色により炎症の程度をスコア化する。次に Sirius Red 染色により形態学的コラーゲン密度を定量する。また、線維化関連因子、炎症関連因子の遺伝子発現を定量 PCR 法（Applied Biosystems 7500）により解析する。また、前述のように自己免疫性心筋炎の発症・進展には 1 型ヘルパー T 細胞（Th1）が関与し治癒には 2 型ヘルパー T 細胞（Th2）が関与しているとされており、それらに関連したサイトカイン（Th1: IFN- γ , IL-2; Th2: IL-4, IL-10 等）についても詳しく調べる。（図 1）

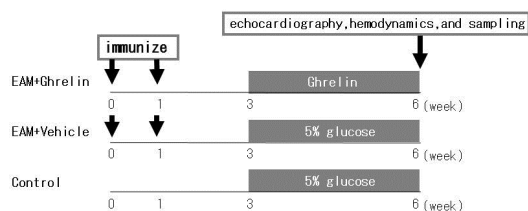


図 1 心筋炎モデル作成とグレリン投与期間

(2) 心房細動に対するグレリンの効果

高血圧自然発症ラット（SHR）に心房高頻度ペーシング（1200bpm、8 時間）を行い心房内皮障害を生じさせ、Vehicle またはグレリンの投与（200 μg/kg/日、皮下注）を 3 週間行う。3 週間後に血圧、心拍数を調べ、高頻度心房頻拍ペーシングにて心房細動の誘発を行う。

4. 研究成果

(1) 自己免疫性心筋炎に対するグレリンの効果

自己免疫性心筋炎ラット（experimental autoimmune myocarditis: EAM）で Vehicle のみ投与した群（EAM+vehicle 群: n=18）は Control 群（n=15）に比べミオシン感作後 3 ~ 6 週間での体重増加が抑制されていた。この EAM+Vehicle 群に比べグレリンを投与した群（EAM+Ghrelin 群: n=18）の方が体重増加の抑制が軽減されていた。感作 6 週間後

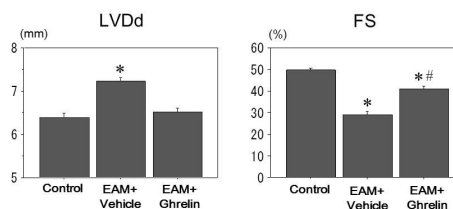
の心筋重量/体重比（Heart weight/Body weight 比）は Control 群に比べ EAM+Vehicle 群において増加したが、EAM+Ghrelin 群は Control 群と差がみられなかった（表 1）。

表 1 体重変化と心筋重量

	Body weight (Pre)	Body weight (3W)	Body weight (6W)	Δ Body weight (6W-Pre)	Heart weight/Body weight (6W)
Control	180.1 \pm 1.7	285.8 \pm 4.0	342.1 \pm 4.0	161.9 \pm 3.5	3.08 \pm 0.04
EAM+Vehicle	181.3 \pm 1.8	256.8 \pm 3.0*	317.4 \pm 2.8*	136.2 \pm 1.7*	3.68 \pm 0.01*
EAM+Ghrelin	181.5 \pm 1.6	259.9 \pm 2.2*	325.9 \pm 1.9*#	143.9 \pm 2.2*#	3.09 \pm 0.07*#

* p<0.05 vs Control; # p<0.05 vs EAM+Vehicle

心臓超音波検査では、感作 6 週間後には EAM+Vehicle 群は Control 群と比べ左室拡張末期径が有意に大きくなったが、グレリン投与（EAM+Ghrelin）群では左室径は Control 群と同程度まで抑制されていた。そして、左室内径短縮率（fractional shortening: FS）の関しても、EAM+Vehicle 群は Control 群と比べ明らかに低下していたが、EAM+Ghrelin 群では有意に改善していた。しかし、Control 群と比べ低値を示していた（図 2）。



* p<0.05 vs Control; # p<0.05 vs EAM+Vehicle

LVDd: left ventricular end-diastolic dimension; FS: fractional shortening; EAM: experimental autoimmune myocarditis

図 2 心臓超音波検査

また、心臓カテーテルによる心内圧検査では、グレリン投与により EAM+Vehicle 群と比べ左室拡張末期圧（left ventricular end-diastolic pressure: LVEDP）の上昇が有意に抑制されていた。血圧に関しては、グレリン投与により有意な変化はみられなかった（図 3）。

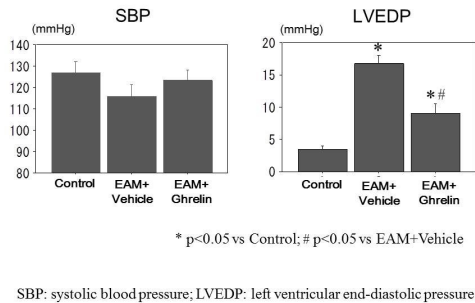


図3 心内圧

心筋の mRNA 遺伝子発現に関しては、EAM+Vehicle 群は Control 群と比べ、1 型ヘルパー T 細胞より分泌される Th1 系サイトカインである interferon(IFN)- γ や interleukin(IL)-2 の mRNA の発現が Control と比べて有意に増加していたが、2 型ヘルパー T 細胞からの Th2 系サイトカインである IL-4 と IL-10 の mRNA の発現は有意な変化はみられなかった。グレリン投与 (EAM+Ghrelin 群) により、IFN- γ 、IL-2 の mRNA の発現は Control と同じレベルまで低下した。また、有意差はないものの IL-10 の mRNA 発現はグレリン投与により増加傾向を示した。tumor necrosis factor(TNF)- α および monocyte chemotactic protein(MCP)-1 の mRNA も心筋炎により EAM+Ghrelin 群で増加していたが、グレリン投与により著明に減少していた。線維化関連因子については、Collagen の mRNA 発現が心筋炎により増加しており、グレリン投与により減少していた。Collagen I および transforming growth factor(TGF)- β については有意な変化はみられなかった (図 4)。

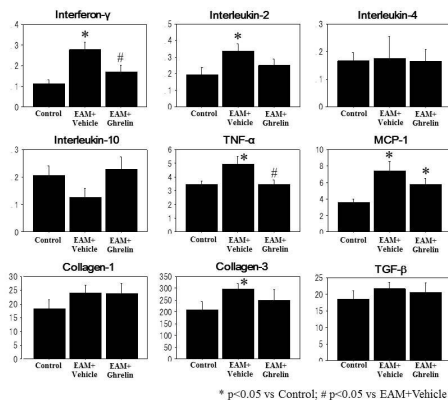


図4 心筋での遺伝子発現

組織学的評価では、形態学的コラーゲン密度は、心筋炎を生じた群 (EAM+Vehicle 群) が Control 群と比べ明らかに増大していたが、

グレリン投与により (EAM+Ghrelin 群) 有意に減少していた (図 5)。炎症スコアについても同様の傾向がみられた。

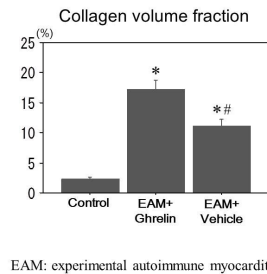


図5 形態学的コラーゲン密度

これらの結果より、グレリン投与は Th1/Th2 バランス調節や抗炎症効果などにより自己免疫性心筋炎の進展を抑制した可能性が示唆された。

(2) 心房細動に対するグレリンの効果

高血圧自然発症ラット (SHR) に上述の心房高頻度ペーシング実施後、グレリンまたは Vehicle (Control) を 3 週間投与した後、高頻度心房頻拍ペーシングにて心房細動の誘発を行った。Control 群では 10/15 (66.7%) で心房細動が誘発されたが、グレリン群では 2/16 (12.5%) に心房細動が誘発されたのみであり、有意に心房細動の誘発率が抑制された (図 6)。また、血圧は両群で有意な変化はみられなかったが、心拍数はグレリン投与により有意に減少しており (図 7)、グレリンの交感神経抑制作用が心房細動抑制効果の要因のひとつである可能性が示唆された。これらの結果より、グレリン投与は心房細動の治療薬として有用である可能性が示唆された。

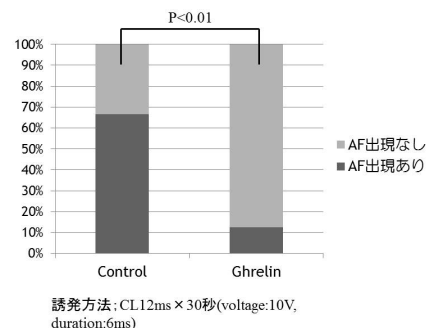
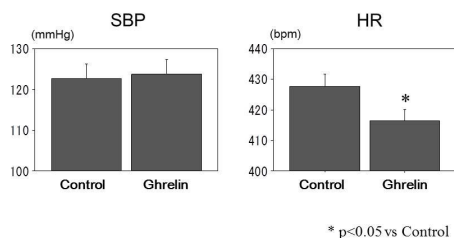


図6 心房細動誘発率



SBP: systolic blood pressure; HR: heart rate

図7 血行動態

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)
 は下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第78回日本循環器学会学術集会(東京国際フォーラム(東京都・千代田区):2014年3月21-23日) Bando S, Soeki T, Hara T, Takashima A, Bando M, Ogasawara K, Saito Y, Matsuura T, Hotchi J, Kimura E, Ise T, Tobiume T, Yamaguchi K, Yagi S, Iwase T, Fukuda D, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Kangawa K, Sata M. Ghrelin Ameliorates the Progression of Experimental Autoimmune Myocarditis.

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
 出願年月日：
 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

添木 武 (SOEKI, Takeshi)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
 研究部・講師
 研究者番号：60393211

(2) 研究分担者

佐田 政隆 (SATA, Masataka)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
 研究部・教授
 研究者番号：80345214

(3) 連携研究者

寒川 賢治 (KANGAWA, Kenji)
 国立循環器病研究センター・研究所・所長
 研究者番号：00112417