

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 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590899

研究課題名（和文）グレリンの自律神経作用を介した新しい不整脈治療法の開発

研究課題名（英文）A new treatment for arrhythmia with ghrelin via the modulation of autonomic nerve activity

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

研究成果の概要（和文）：ラット虚血再灌流モデルに対しグレリンあるいは生理食塩水（生食）を投与した。生食群と比べ、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た。リン酸化 Connexin 43 の発現量は、心筋虚血後の生食群では正常群と比べ著明に減少していたが、グレリン投与により有意に改善した。しかしながら、グレリンの抗不整脈作用並びに Connexin 43 に対する効果は、アトロピン投与の併用あるいは迷走神経求心性線維ブロックにより明らかに減弱した。また、心電図の心拍変動スペクトル解析を行ったところ、グレリンの急性投与により、副交感神経活性の指標は増強し、交感神経活性の指標は低下していた。

研究成果の概要（英文）：Male Sprague-Dawley rats were exposed to a 30 minutes of ischemia following ligation of the left coronary artery. Animals were then randomized to receive either ghrelin or saline during the period of coronary ligation. Power spectral analysis of heart rate variability revealed that the administration of ghrelin increased the high-frequency (HF) power and decreased the low-frequency (LF)/HF ratio. Ventricular tachyarrhythmias were less frequent in rats after MI who received ghrelin in comparison to rats who received saline. Immunoblotting and immunohistochemistry revealed that rats given saline alone during MI exhibited a marked reduction in phosphorylated connexin 43 within the left ventricle, whereas those that received ghrelin displayed only minor reductions in comparison to sham-operated rats. These effects of ghrelin were diminished by the co-administration of atropine or the blockade of vagal afferents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：①循環器・高血圧 ②生理活性 ③薬理学 ④心臓病

1. 研究開始当初の背景

グレリンは、国立循環器病センター研究所の寒川らが 1999 年に胃組織から精製・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: 656-660, 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やエネルギー代謝改善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、拡張型心筋症などの心疾患に対する特異的治療効果は不明であり、申請者ら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、その抗心臓リモデリング効果を調べるとともに、心臓交感神経系あるいは副交感神経系の活性を調べた。その結果、心筋梗塞ラットにおいて、グレリン(200 μ g/kg/日にて2週間投与、皮下注)は心拍数を減少させ、最大および最小dP/dtといった指標を改善し、左室のリモデリングを抑制した。さらに、グレリンは心筋梗塞後の血中ノルアドレナリン濃度の上昇を有意に抑制した。しかしながら、グレリンの投与によって血漿insulin like growth factor-1 (IGF-1)濃度の上昇はみられず、これらの効果がgrowth hormone非依存性のものであることが示唆された。また、意識下の心筋梗塞ラットにおいて、グレリンの急性投与(100 μ g/kg、皮下注)を行ったところ、梗塞により増加していた(交感神経活性の指標である)low-frequency power / high-frequency power (LF/HF)比を低下させた(Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: H426-32, 2008)。これらの結果より、グレリンは交感神経抑制作用を有し、心筋梗塞後早期の抗心臓リモデリング薬として有用であると考えられた。また、申請者らは虚血心筋においてグレリンが抗アポトーシス作用を介して心保護効果を有することも見出しており、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も心保護作用を有する可能性がある。

一方、わが国では心臓突然死が年間約5万件発生しているとされ、その主な原因は頻脈性心室性不整脈である。自律神経系の活動が心室性不整脈の発生に関与することは、心臓突然死との関連において以前から注目されており、 β 遮断薬が心筋梗塞後の頻脈性心室性不整脈の発生を抑え突然死発生を抑制することが報告されている。また、近年心臓における細胞間コミュニケーションに重要な役割を演じているConnexin 43の障害が、虚血性心疾患などにおける不整脈の発生に深く関わっていることが明らかにされ、心室性不整脈に対する保護作用はConnexin 43の発現に強く依存していることが示された(Nature 450: 819-824, 2007)。さらに、興味深いことに、急性心筋梗塞における機械的

な迷走神経刺激はリン酸化したConnexin 43の消失を防ぐことにより抗不整脈効果を示したという報告(Circulation 112: 164-170, 2005)や交感神経 β 受容体刺激は梗塞後心筋細胞におけるConnexin 43を分解したという報告(Arch Med Res 39: 647-654, 2008)がなされている。

2. 研究の目的

グレリンは心臓交感神経活性抑制あるいは副交感神経活性亢進作用により心筋細胞におけるConnexin 43の発現を保持し心筋虚血後の頻脈性心室性不整脈を抑制するという仮説を立て検証する。これにより、生理活性ペプチドのグレリンを用いた新しい難治性不整脈治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

ラット心筋虚血再灌流モデルを作成し、グレリンの投与を行う(100 μ g/kg)。同様にグレリン+副交感神経遮断薬(アトロピン)、およびプラセボの投与も行う。グレリン、プラセボ等を急性投与した際、心電図記録を行い心室性不整脈の発生をみる(AD Instruments社製PowerLab system)。同記録を用い心拍変動スペクトル解析等の心臓自律神経活性についても評価を行う。そして、生理学的急性効果を心臓超音波検査(ラット・マウス用の12MHzプローブを使用)および心臓カテーテル法(AD Instruments社製PowerLab system、Millar社製SPR-407等を用いたカテーテル検査)により評価する。次に、取り出した心臓において免疫組織化学(IHC)およびin situ hybridization (ISH)法を用いてConnexin 43, 40, 45並びにグレリンとその受容体(GHS-R)の局在を検討する。同時に、Western blotting (WB)法及び定量PCR法(Applied Biosystems 7500)によりConnexin 43、グレリン、およびGHS-Rの定量を行う。さらに、上記モデルにおいて迷走神経切断および迷走神経求心線維を特異的に遮断するカプサイシン投与を行い、その上でグレリンの抗不整脈効果を検討する。

4. 研究成果

雄Sprague-Dawleyラットの左冠動脈を結紮し30分間の心筋虚血を起こし、その間にグレリン(100 μ g/kg)あるいは生理食塩水(生食群)を投与した。また、グレリンに加えアトロピンを投与した群を作成し、カプサイシン塗布による迷走神経求心性線維を特異的にブロックした群も作成した。その間心電図的に心室性不整脈の頻度を調べ、その後摘出心の生化学的・病理学的検討を行った。

なお、対照として正常ラットの摘出心を用意した。生食群と比べ、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た。しかしながら、グレリンの抗不整脈作用はアトロピン投与の併用あるいは迷走神経求心性線維ブロックにより明らかに減弱した(図1)。

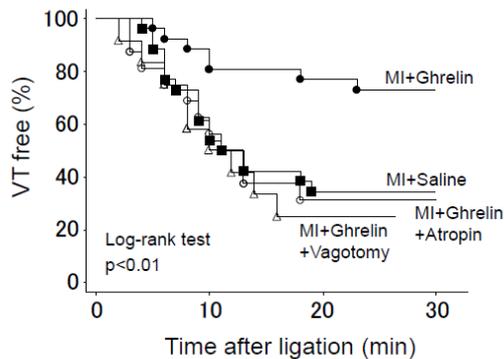


図1 心筋虚血後の心室性不整脈の発生

Western blotting 法による左室心筋でのリン酸化 Connexin 43 の発現量は、心筋虚血後の生食群では正常群と比べ著明に減少していたが、グレリン投与により有意に改善した(図2)。免疫組織染色でも、グレリン投与により心筋虚血後のリン酸化 Connexin 43 の発現低下が明らかに抑制されていた(図3)。しかしながら、グレリンの抗不整脈作用並びに Connexin 43 に対する効果は、アトロピン投与の併用あるいは迷走神経求心性線維ブロックにより明らかに減弱した(図2、図3)。

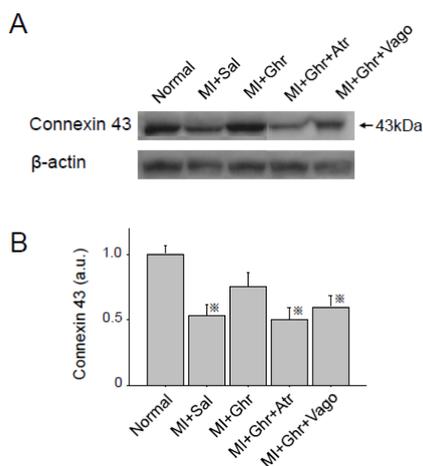


図2 リン酸化 Connexin43 の発現 (Western blotting)

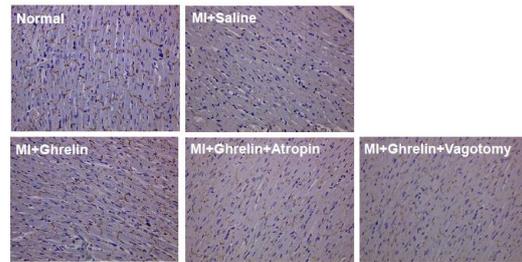


図3 リン酸化 Connexin43 の発現 (免疫組織染色)

また、心電図の心拍変動スペクトル解析を行ったところ、グレリンの急性投与により、副交感神経活性の指標である high-frequency power (HF) は増強し、交感神経活性の指標である low-frequency power / high-frequency power (LF/HF) 比は低下していた。そして、この効果についても、アトロピン投与の併用あるいは迷走神経求心性線維ブロックにより明らかに減弱していた(図4)。

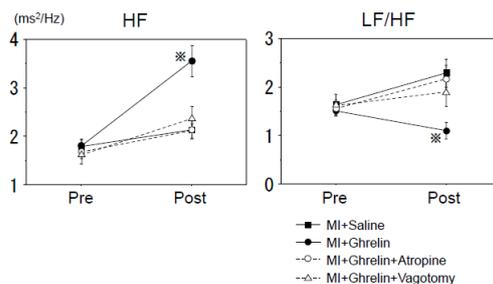


図4 グレリンの心臓自律神経への効果

これらの結果より、グレリンは副交感神経亢進並びに交感神経抑制作用を有し、その直接効果並びに心臓での Connexin 43 の発現調節などを介して虚血心筋に対し抗不整脈効果を発揮する可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 添木武ほか. グレリンによる自律神経および Connexin43 発現調節を介した抗不整脈作用の検討. 第 59 回日本心臓病学会学術集会 2011. 9. 23-25 神戸国際会議場 (神戸)

- ② Soeki T, et al. Ghrelin Protects Heart Against Ischemia-Induced Arrhythmias by Preserving Connexin43 Protein. American Heart Association Scientific Sessions 2010 2010.11.13-17 シカゴ
- ③ Soeki T, et al. Ghrelin protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin43 protein. The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2010.3.4-6 国立京都国際会館(京都)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

なし

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