

## 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 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：37104  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22500361  
 研究課題名（和文） 摂食促進ホルモン・グレリンによる自律神経機能の体温・血圧調節メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） The role of ghrelin in thermo and blood pressure regulation by the autonomic nervous system  
 研究代表者  
 御船 弘治（MIFUNE HIROHARU）  
 久留米大学・医学部・准教授  
 研究者番号：70174117

研究成果の概要（和文）：本研究は、摂食促進ホルモンのグレリンについて、自律神経機能の調節メカニズム（体温および血圧調節）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た。本研究により、胃から分泌されたグレリンは、摂食促進作用以外に中枢レベルで自律神経の機能を調節して体温・血圧・心拍などのトーンバランスを制御することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Ghrelin, the only circulating orexigenic hormone, increases appetite and food intake by stimulating the hypothalamic arcuate nucleus through vagal afferent neurons. Although ghrelin has been reported to play a crucial role in the regulation of the autonomic nervous system, its precise mechanisms or physiological relevance is not completely elucidated yet. Here we explored the existence of an abnormal circadian rhythm of blood pressure (BP), heart rate (HR) and body temperature (BT) in ghrelin knockout (*ghr1<sup>-/-</sup>*) mice using telemetric automatic analysis system. It has been demonstrated that ghrelin, secreted from stomach, controls the tone balance of BP, HR, and BT through the regulation of central autonomic nervous system. Thus, ghrelin is a hormone to maintain the homeostasis of the autonomic nervous system as well as an accelerating factor of food intake.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経，筋肉生理学

 キーワード：グレリン，自律神経機能，血圧調節機構，グレリン遺伝子欠損マウス，  
 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）に關与する代表的な血管拡張因子の一つである心房性Na利尿ペプチドと血管収縮因子であるレニン・アンギオテンシン系（RAS）に關する研究を展開し、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。生体内の体温や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年に本研究課題の連携研究者である児島ら<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体温・血圧調節機構にどのように關与しているかはわからなかった。

一方、これまでに海外の2研究グループからグレリン遺伝子欠損（GKO）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GKOマウスを作出・維持しており、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、GKOマウスでは血圧・心拍数の日内リズムに異常が認められ、交感・副交感神経活動のリズムが消失し、自律神経系による血圧制御にグレリンが關与していることを見出した[平成19～20年度基盤研究(C), 課題番号19590840]。しかし、その詳細な調節機構は未だ不明の

点もあり、グレリンによる自律神経を介した体温・血圧調節機構の詳細な解析は急務な研究課題である。

## 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) グレリンによる体温日内リズム調節機構における自律神経活動：

GKOマウスの血圧・心拍数の日内リズムの異常は自律神経活動リズムの消失が血圧・心拍数の日内リズムのみ限局しているのか、それとも他のパラメータの日内リズムにも同様に認められるのか不明のままである。一般的に自律神経活動の生体内リズムが生じるパラメータとしては、体温の日内リズムが広く知られているが、我々は現時点で、本GKOマウスでは体温の日内リズムにも異常を来していることを見出した。そこで、GKOマウスに認められる自律神経活動リズムの消失が血圧・心拍数の日内リズム以外の自律神経活動にどのように關与しているのかを明確にするため、合成グレリン投与後、迷走神経胃枝切除後、および絶食時におけるGKOマウスの体温リズムの異常の有無や変動をテレメトリー自動計測システムにて詳細に解析し、自律神経活動の日内リズムの中核的な統御システムにおけるグレリンの關与を検討した。

### (2) グレリンによる自律神経機能を介した血圧調節機構：

前記のように我々は、自律神経系による血圧制御にグレリンが關与していることを見出したが、生体内の血圧調節機構において、神経因子としてのグレリンの血圧調節以外に、グレリンが末梢においても血管調節因子として機能しているのか不明である。そこで、GKOマウスの血圧・心拍数の日内リズムの異常が、迷走神経胃枝切除後および絶食時においても認められるのかをテレメトリー自動計測システムにて詳細に解析し、自律神経機能による血圧制御機構におけるグレリンの役割が神経あ

るいは体液性の因子なのかをより明確にする。また、アドレナリン作動性薬物やアドレナリン作動性効果遮断薬投与後のGK0マウスの血圧調節機構の変化も明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) グレリンによる自律神経活動の日内リズム調節メカニズムの解析：

##### ①体温・自発運動量の測定・解析法；

当研究機関内にて維持しているグレリン遺伝子欠損(GK0)マウス；Ghrelin(-/-)を用い、麻酔下にてテレメトリー自動計測システム(データ・サイエンス社)用送信器(マウス体温測定用)の体内埋め込み術を施し、本マウスの体温・自発運動量を以下の項目について経時的かつ経日的に測定した。尚、対照群としてグレリン遺伝子発現が正常個体である野生型(WT)マウスを用いた。

##### ②体温の日内リズムの解析；

1) 日内変動；GK0マウス・体温の日内リズムの異常が明期に生じていることは既に確認済みであったので、長期の明・暗リズム(7~14日間)および長期恒常暗(21日間)でのGK0マウス・体温の生体内リズムをWTマウスと詳細に比較検討した。

2) 合成グレリン投与後の変化；GK0マウスに合成グレリンを末梢性(腹腔内にて浸透圧ミニポンプを用いて持続投与)に投与し、1)にて認められたGK0マウス・体温の日内リズムの異常が改善されるのかを検討した。

3) 生理学的血中グレリン濃度上昇時における体温の変動；グレリンは摂食ホルモンであるために、血中濃度が絶食時において急激に上昇し、制限給餌時には摂食リズムがパターン化する。従って、生体内でのエネルギー代謝に変化を生じる絶食時や制限給餌時におけるGK0マウスの体温の変動を解析し、体温の日内リズムと摂食リズムの関係を検討した。

##### ③グレリンの自律神経系による体温調節機構の解析；

1) 交感神経機能解析；交感神経を興奮さ

せる代表的神経伝達物質であるノルアドレナリン投与後のWTマウスに認められる体温の変動が、GK0マウスにも同様に認められるのか、さらに、ノルアドレナリン投与後の体温の変動が合成グレリンを持続投与したGK0マウでも認められるかなどを比較検討し、交感神経活動におけるグレリンの役割を解析した。

2) 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WTマウスと無処置マウスの体温の日内リズムを比較検討し、GK0マウスに認められる体温の日内リズムの異常が迷走神経を介したグレリンによるものかを明らかにした。また、エネルギー代謝に急激な変化が生じる絶食時におけるGK0マウスの体温の変化が、迷走神経胃枝を切除したWTマウスの絶食時と差があるのかどうかを比較検討し、副交感神経機能を解析した。

#### (2) グレリンによる自律神経機能を介した血圧調節機構の解析：

##### ①血圧・心拍数・自発運動量の測定・解析法；

当研究機関内にて維持しているGK0マウスを用い、麻酔下にてテレメトリー自動計測システム(データ・サイエンス社)用送信器(マウス血圧・心拍数測定用)の体内埋め込み術を施し、本マウスの血圧・心拍数・自発運動量を以下の項目について経時的かつ経日的に測定し、血圧・心拍波形を精査する(波形データのVariability解析など)。

##### ②血圧・心拍数の変動・日内リズムの解析；

GK0マウスに認められる血圧・心拍数の日内リズムの異常が、視床下部-SCNの体内時計の異常によるのか、それとも中枢性と末梢性摂食リズムとのトーンバランスの不調和の一つとして生じているのかを確認する必要があるため、生体内のサーカディアン発現リズムを調べた。

1) 日内変動；GK0マウスの日内リズムの

異常が明期に生じていることは既に確認済みであったので、長期恒常暗(21日間)におけるGKOマウスの血圧・心拍数の生体リズムを野生型マウスと詳細に比較検討した。

- 2) 生理学的血中グレリン濃度上昇時における血圧変動;グレリンは摂食ホルモンであるために、血中濃度が絶食時において急激に上昇し、制限給餌時には摂食リズムがパターン化する。従って、生体内でのエネルギー代謝に変化を生じる絶食時や制限給餌時におけるGKOマウスの血圧・心拍数の変動を解析し、血圧・心拍数の日内リズムと摂食リズムの関係を検討した。

### ③グレリンの交感神経を介した血圧調節機構の解析;

- 1) 交感神経を興奮させる代表的神経伝達物質であるノルアドレナリン投与後の野生型マウスに認められる血圧・心拍数の上昇が、GKOマウスにも同様に認められるのか、さらに、ノルアドレナリン投与後の血圧・心拍数の変動が合成グレリンを持続投与したグレリンKOマウスでも認められるかなどを比較検討し、交感神経活動による血圧調節機構におけるグレリンの役割を解析した。

- 2) グレリンの自律神経を介した血圧調節機構が交感神経の $\alpha$ 作用のものなのか $\beta$ 作用のものかを明確にするために、代表的なアドレナリン作働薬( $\alpha$ および $\beta$ 作用)や抗アドレナリン薬( $\alpha$ および $\beta$ 遮断薬)を複合投与後のGKOマウスの血圧・心拍数の変化をテレメトリー自動計測システムにて詳細に解析した。

### ④グレリンの副交感神経を介した血圧調節機構の解析;

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(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・心拍数の日内リズムを比較検討し、GKOマウスに認められる血圧・心拍数の日内リズムの異常が迷走神経を介したグレリンによるものかを

解析した。また、エネルギー代謝に急激な変化が生じる絶食時におけるGKOマウスの血圧・心拍数の変化が、迷走神経胃枝を切除した野生型マウスの絶食時と差があるのかどうかを比較検討し、グレリンの副交感神経活動における血圧制御機構を解析した。

## 4. 研究成果

(1) グレリンによる自律神経活動の体温日内リズム調節メカニズム:

- ①GKOマウスでは体温の日内リズムが不安定であり、明期における平均体温が高かった。
- ②48時間絶食下において、WTマウスではtorporと呼ばれる著しい体温の低下が見られたが、GKOマウスでは観察されなかった。さらに、GKOマウスにGHRP-6を連続投与するとtorporが誘導された(図1)。

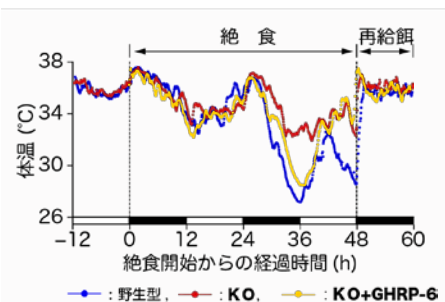


図1. 絶食時におけるtorpor発現

- ③迷走神経切除後のWTマウスでは、体温の日内リズムが消失していた。
- ④48時間絶食下におけるWTマウスとGKOマウスの行動量に差がなかったことから、グレリンは自律性体温調節に関与すると考えられた。

以上から、胃から分泌されたグレリンは、中枢レベルで自律神経の機能を調節して体温を制御する。

(2) グレリンによる自律神経活動の血圧・心拍数日内リズム調節メカニズム:

- ①GKOマウスに認められた血圧・心拍数の日内リズムの異常(血圧・心拍波形のVariability)解析から、GKOマウスのLF/HF比が明・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;図2)は、

長期恒常暗 (21 日間) 条件下では, 明暗周期と無関係な不安定な血圧・心拍数変動として観察され, GKO マウスにはサーカディアンリズムに同調した血圧・心拍数リズムの異常が存在することが明らかとなった。

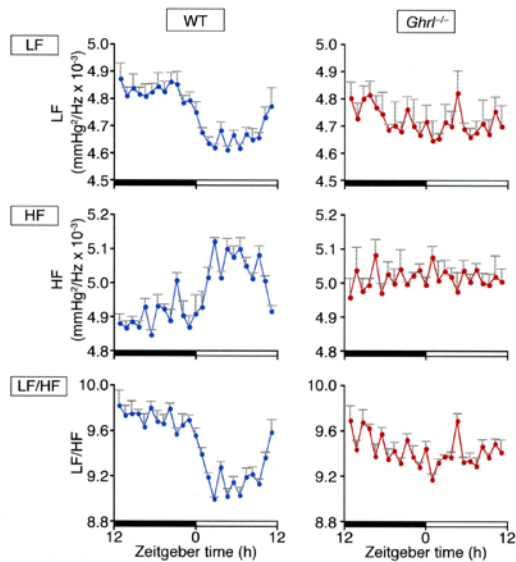


図 2. 交感・副交感神経活動の日内変動

グレリン遺伝子欠損マウス (*Ghrl*<sup>-/-</sup>) 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。

②絶食時や制限給餌時の血中グレリン濃度の上昇と共に, 野生型マウスでは血圧・心拍数の上昇が認められ, 血圧・心拍数, 空腹時グレリン濃度は有意な正の相関が存在したが, GKO マウスにはそのような変動は観察されなかった。

以上の結果から, GKO 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, 中枢性と末梢性摂食リズムとのトーンバランスの不調和の一つとして生じていることが示唆された。

(3) グレリンの交感・副交感神経を介した血圧調節機構

①グレリンの交感神経を介した血圧調節機構の解析: 野生型 (WT) マウスにおけるノルアドレナリン投与後の血圧・心拍数の上昇は, GKOマウスでは軽度であり, 合成グレリンを持続投与したGKOマウスでは無処置のGKOマウスに比べ大きかったが, WTに比べ小さかった。また, ノルアドレナリン投与後の血圧・心拍数の上昇

は,  $\alpha$ ,  $\beta$  遮断薬にて抑制され, グレリンが交感神経に抑制的に作用する可能性が示唆された。

②グレリンの副交感神経を介した血圧調節機構の解析: ; 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ことから, 迷走神経切除後のWTマウスでは, GKOマウスと同様の血圧・心拍数のリズムの消失が認められ, GKOマウスにおける血圧・心拍数の日内リズムの異常は, 迷走神経を介したグレリンにより生じる可能性が示唆された。

本研究により, 胃から分泌されたグレリンは, 摂食促進作用以外に中枢レベルで自律神経の機能を調節して体温・血圧・心拍などのトーンバランスを制御し, GKO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, 中枢性と末梢性摂食リズムとのトーンバランスの不調和の一つとして生じていることが示唆された。

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)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Naokazu Hamada, Yoshihiro Nishi, Yuji Tajiri, Kentaro Setoyama, Ryoza Kamimura, Kenkichi Miyahara, Norihito Nuruki, Hiroshi Hosoda, Kenji Kangawa, Masayasu Kojima, Hiroharu Mifune: Disrupted Regulation of Ghrelin Production Under Antihypertensive Treatment in Spontaneously Hypertensive Rats. Circulation Journal (査読有) 76, 1423-1429, 2012.

[学会発表] (計6件)

- ① 西 芳寛, 御船弘治, 矢吹 映, 田尻祐司, 平田留美子, 田中永一郎, 細田洋司, 寒川賢治, 児島将康: 分泌顆粒内でのアシル化グレリンの分布・動態: 免疫電顕を用いた解析. 第86回日本内分泌学会学術総会, 2013. 4. 25~4. 27, 仙台市.
- ② 浜田直和, 西芳寛, 田尻祐司, 瀬戸山健太郎, 上村亮三, 宮原健吉, 塗木徳人, 細田洋司, 寒川賢治, 児島将康, 御船弘治: 自然発症高血圧ラットにおける血圧調節とグレリン産生分泌調節の相互作用の障害について. 第12回日本内分泌学会九州地方会, 2012. 8. 25, 久留米市.
- ③ 御船弘治, 佐藤貴弘, 寒川賢治, 児島将康: 摂食促進ホルモン・グレリンによる自律神経機能の体温調節メカニズム. 第59回日本実験動物学会総会, 2012. 5. 24~5. 26, 別府市.
- ④ 西 芳寛, 濱田直和, 田尻祐司, 田中永一郎, 細田洋司, 寒川賢治, 児島将康, 宮原

健吉, 御船弘治: グレリンの産生・分泌に対する降圧剤の影響: SHR, WKYラットを用いた検討. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012. 4. 19~4. 21, 名古屋市.

- ⑤ 佐藤貴弘, 中村祐樹, 椎村祐樹, 御船弘治, 寒川賢治, 児島将康: 時間制限給餌に伴うグレリンの分泌動態と体温変動について. 第85回日本内分泌学会学術総会, 2012. 4. 19~4. 21, 名古屋市.

- ⑥ 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29回九州実験動物研究会総会, 2011. 11. 12, 鹿児島市.

## 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・准教授  
研究者番号: 70174117

### (2) 研究分担者

佐藤 貴弘 (SATO TAKAHIRO)  
久留米大学・分子生命科学研究所・准教授  
研究者番号: 50368883

### (3) 連携研究者

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