

## 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：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790891

研究課題名（和文）生理活性ペプチドホルモンの特異性を生かした新しい心血管病治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new therapy of cardiovascular disease utilizing specificity of biologically active peptide hormones

研究代表者

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：00443474

研究成果の概要（和文）：

最近我々は食欲亢進ペプチドである「グレリン」の投与が、心筋梗塞急性期の致死性不整脈死を抑制することを論文発表した。本研究では、心筋梗塞急性期の単回グレリン投与が、死亡率を低下させるのみならず心臓リモデリングを抑制すること、内因性グレリンが交感神経抑制・副交感神経活性化を介し、急性心筋梗塞に伴う不整脈死を抑制していることを明らかにした。これらの知見は、グレリンが新しい心筋梗塞治療薬となり得ることを示す。

研究成果の概要（英文）：

We recently published that ghrelin (an orexigenic peptide) administration was able to improve malignant arrhythmia-induced mortality in acute myocardial infarction. The present study demonstrated that one dose of ghrelin improves death rate in acute phase and also prevents cardiac remodeling in myocardial infarction. Furthermore, also demonstrated that endogenous ghrelin suppressed arrhythmia-induced death through inhibition of sympathetic nerve activity and activation of parasympathetic nerve activity in acute myocardial infarction. These findings suggest potential usefulness of ghrelin as a therapeutic agent in myocardial infarction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、内分泌学

キーワード：内分泌学、グレリン、ナトリウム利尿ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞は循環器疾患のなかでも死亡率が高い疾患であるが、急性期に救命し得た後も、慢性期における心不全や不整脈の発生に

より継続的な治療が必要になることも多く、これが医療費の増大に繋がっている。

一方、近年数多くの生理活性ペプチドが発見され、その中には国立循環器病研究センタ

一の寒川賢治研究所長らが単離・同定したANP・BNPのように心不全の治療薬・診断ツールとして使用されているものや、グレリンのように慢性閉塞性肺疾患・拒食症への臨床応用に向けた治験が進行中のものもある。申請者は最近グレリンの新たな生理作用として、心筋梗塞に伴う致死性不整脈の抑制作用を発見した。生理活性ペプチドは生体内で産生されており、治療薬として用いる場合、生理的濃度範囲内での使用であれば比較的安全であることが、これまでのANPの使用経験から明らかになっている。申請者はこれらの点をふまえ、生理的濃度におけるグレリンの心臓保護作用について、臨床応用を念頭に置いた検討を行いたいと考えた。

## 2. 研究の目的

グレリンは胃組織から単離・精製された生理活性ペプチドであり、成長ホルモン分泌促進作用を有する。グレリンに関しては、このほかにも食欲亢進作用、心血管に対する多彩な作用を有することが報告されている。以前申請者らは、グレリンの慢性投与が心筋梗塞後の心臓リモデリングを抑制し、心不全を予防することを明らかにした。さらに最近の検討で、グレリンを心筋梗塞急性期に単回皮下投与すると、致死性不整脈発生の原因となる心臓交感神経活性上昇が抑制され、死亡率が有意に低下することも確認した。

申請者は上記結果を受けて、以下についてさらに研究したいと考えた。

(1) グレリンを心筋梗塞急性期に単回皮下投与することで、慢性期心臓リモデリングが抑制できるか？

(2) 生体内で恒常的に産生されているグレリンにも、心筋梗塞に伴う急激な心臓交感神経活性上昇を抑制する効果があるか？

グレリンの単回投与で、急性期死亡率低下のみならず慢性期心臓リモデリングが改善されれば、コスト面から考えても効率的に心筋梗塞治療が行えると考える。また内因性に存在するグレリンの量に不整脈抑制作用が存在すれば、副作用等の面から考えても安全に心筋梗塞治療が行えると考える。

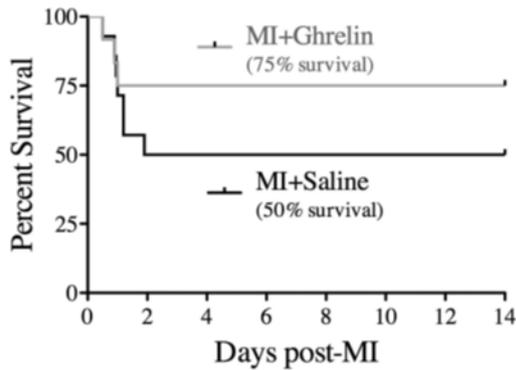
## 3. 研究の方法

(1) グレリン単回皮下投与実験については、8週齢オスSDラットを用いた。麻酔は、ketamin/dormitor (75/0.5 mg/kg)を腹腔内注射して行った。体温を37°Cに保ち、気管内挿管して人工呼吸管理とし、左第二～第三肋間で開胸後、冠動脈左前下行枝を結紮した。Sham群では冠動脈を結紮せずに閉胸した。その後30分以内に、グレリン(150 $\mu$ g/kg)、対照群に生理食塩水を皮下注射した。14日後、ラットをurethane (1.5g/kg)にて麻酔後、左第一～第二肋間で開胸し、星状神経節を露出させ、心臓交感神経遠心性線維を単離した。心臓交感神経活動は白金電極で記録し、増幅・フィルタリングを行った。また右頸動脈より圧・容積カテーテル(1.5F, Miller社製)を挿入し、心機能を評価した。さらに深麻酔下でラットを安楽死させた後、心臓を取り出して重量測定およびRNA抽出を行った。抽出したRNAはノーザンブロット法による遺伝子発現解析に使用した。

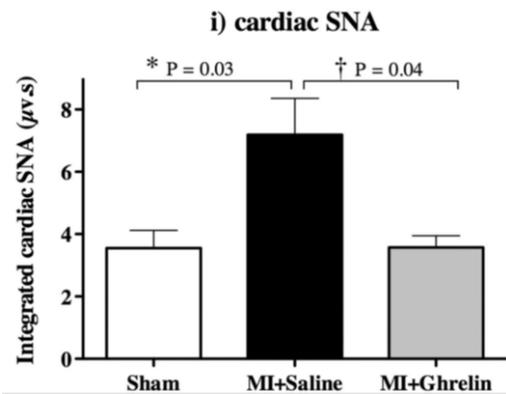
(2) 内因性グレリンの生理機能評価については、久留米大学の児島らが作製したグレリン欠損マウス(グレリンKO)および野生型マウス(WT)を用いた。マウスは12-14週齢のものを実験に使用した。イソフルレン吸入麻酔後、気管内挿管して人工呼吸管理とし、体温を37°Cに保ちつつ、開胸して冠動脈左前下行枝を結紮した。Sham群では冠動脈を結紮せずに閉胸した。一部のマウスでは、ベースラインおよび冠動脈結紮後15分および30分にて、カテコラミン濃度測定用に血漿・心筋組織を回収した。自律神経活性は、心拍変動のパワースペクトル解析にて評価した。Urethane-chloralose (750/35 mg/kg)にて麻酔後、心拍数が安定したのち15分間の心電図記録を行い、ベースラインのサンプルとした。次に冠動脈結紮後30分間の心電図記録を行った。心拍変動パワースペクトルの高周波数成分(HF, 1.5-5Hz)の、総成分に占める割合(nHF)を副交感神経活性指標とし、低周波成分(LF, 0.4-1.5Hz)と高周波数成分の比(LF/HF)を交感神経活性指標とした。なお、心電図記録をサンプルとした心拍変動のパワースペクトル分析は、AD Instruments社製、LabChart Pro 7.0を用いて行った。

#### 4. 研究成果

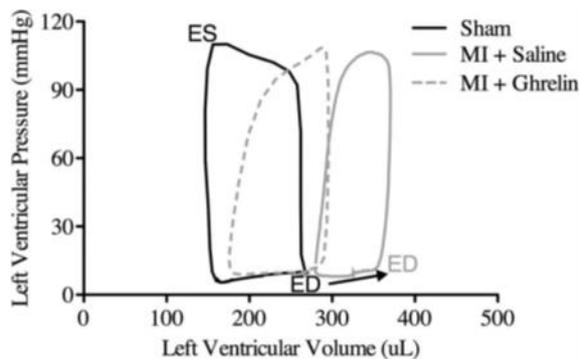
##### (1) グレリン単回皮下投与実験



上図のように、心筋梗塞モデル作製後の死亡は、術後1日以内に集中していた。グレリン投与群では、対照群に比べ術後の死亡率が低い傾向にあった。



また、術後14日目で評価した心臓交感神経活性 (cardiac SNA) は、上図のように梗塞+生食投与群で sham 群と比較し有意に上昇していたが、梗塞+グレリン投与群では梗塞+生食投与群に比べ、有意に活性が抑制されていた。



圧・容積カテーテルを用いた心機能解析では、上図のように、梗塞+生食投与群で圧・容積曲線が右に移動し、左室の顕著なリモデリングが生じていることを起草させたが、梗塞+

グレリン投与群では右へのシフトは抑制されていた。

	Sham	MI+Saline	MI+Ghrelin
EF (%)	57.9 $\pm$ 3.8	27.5 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	43.2 $\pm$ 1.3 <sup>a,c</sup>
SV ( $\mu\text{l}$ )	148 $\pm$ 7	96 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	126 $\pm$ 6 <sup>d</sup>
HR (/min)	383 $\pm$ 13	387 $\pm$ 15	383 $\pm$ 14
CO (ml/min)	56.2 $\pm$ 1.5	36.8 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	48.8 $\pm$ 4 <sup>d</sup>
LVESP (mm Hg)	122 $\pm$ 5	105 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	114 $\pm$ 2
LVEDP (mm Hg)	4.07 $\pm$ 1.61	6.22 $\pm$ 1.26	3.12 $\pm$ 1.17 <sup>d</sup>
dP/dt <sub>max</sub> (mm Hg/msec)	11.3 $\pm$ 0.9	7.4 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	9.4 $\pm$ 0.7
dP/dt <sub>min</sub> (mm Hg/msec)	-7.6 $\pm$ 0.8	-5.4 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	-5.8 $\pm$ 0.2
LVEDV ( $\mu\text{l}$ )	262 $\pm$ 14	351 $\pm$ 19 <sup>a</sup>	291 $\pm$ 8
LVESV ( $\mu\text{l}$ )	113 $\pm$ 14	254 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	165 $\pm$ 4 <sup>b,c</sup>
Heart weight per 100g (mg)	279 $\pm$ 8	352 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	311 $\pm$ 8 <sup>b,d</sup>

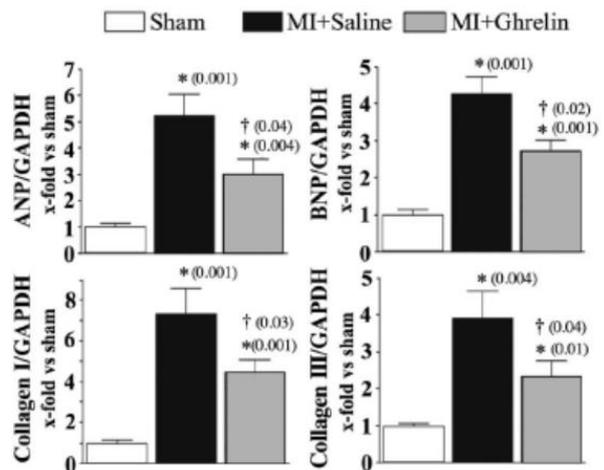
<sup>a</sup> Significantly different from sham rats ( $P < 0.01$ ).

<sup>b</sup> Significantly different from sham rats ( $P < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Significant difference between MI+Saline and MI+Ghrelin rats ( $P < 0.01$ );

<sup>d</sup> Significant difference between MI+Saline and MI+Ghrelin rats ( $P < 0.05$ );

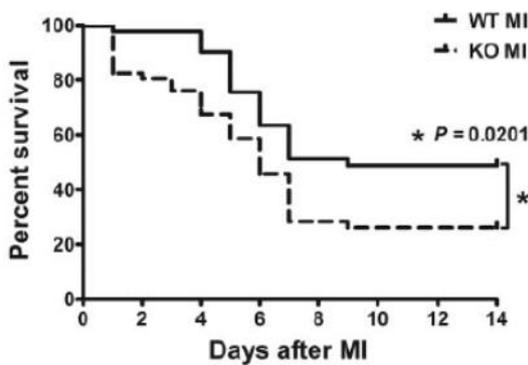
実際の圧・容積計測値は、上の表に示すように、梗塞+グレリン投与群では、左室駆出率 (EF)、一回心拍出量 (SV)、心拍出量が梗塞+生食投与群と比較して有意に増加し、逆に左室拡張末期圧は有意に低下していた。心臓重量は、梗塞+グレリン投与群では、梗塞+生食投与群より有意に軽かった。



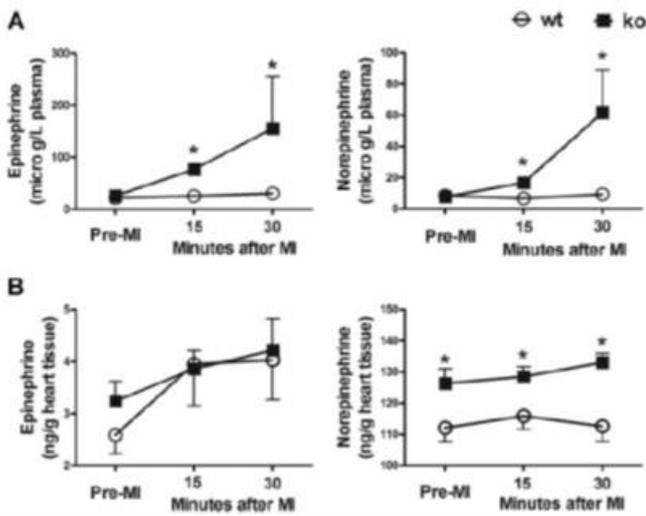
心臓から抽出した RNA を用いたノーザンブロット法による遺伝子発現解析では、梗塞+生食投与群で顕著な ANP・BNP・Collagen I・Collagen III 遺伝子の発現増加を認めたが、これらはグレリン投与により有意に抑制されていた。

以上の結果は、心筋梗塞急性期のグレリン投与が、急性期死亡を抑制するだけでなく、慢性期交感神経活性増加および心臓リモデリングを抑制することを示す。なぜ1回のグレリン投与で慢性期心機能が改善されたかについては検討する余地が残されているが、「生体の緊急適応反応」と考えられてきた心筋梗塞急性期の交感神経活性増加は、長期的視野に立てば必ずしも生体に有益でない過剰な反応であり、結果的に慢性期心機能低下・心臓リモデリングを招いているのかもしれない。

(2) 内因性グレリンの生理機能評価

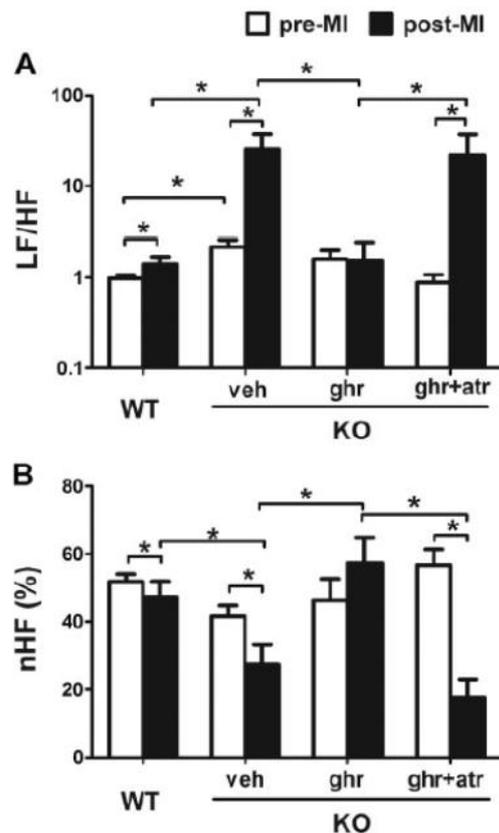


WTおよびグレリンKOに心筋梗塞モデルを作製し、14日間経過を追ったところ、上図のようにグレリンKOではWTに比較し有意に生存率が低かった。特記すべきは、WTでは死亡した21匹のうち、モデル作製当日に不整脈死したのは1匹だけであったが、グレリンKOでは34匹中8匹が当日に不整脈死している点である。このことが心筋梗塞急性期の交感神経活性増加を反映しているかどうか調べるため、血漿中および心筋組織中のカテコラミン濃度を測定した。結果、下図のように、WTではモデル作製後、血漿中のカテコラミン濃度は不変であったが、グレリンKOでは経時的にカテコラミン濃度の顕著な増加を認めた。一方心筋組織においては、モデル作製に関わらず、交感神経神経伝達物質であるノルアドレナリン濃度が、グレリンKOでWTに比べ高値を示した。



上記データより、グレリンKOでは梗塞モデル作成後に急激な交感神経活性増加が起こり、それが致死性不整脈誘発に起因していることが示唆された。

梗塞モデル作成前後の自律神経活性についてさらに詳細に調べるため、心拍変動解析を行った。結果、下図のように、グレリンKOではベースラインの交感神経活性 (LF/HF) がWTよりも有意に高く、逆に副交感神経活性 (nHF) は有意に低いことが分かった。梗塞モデル作成後、その傾向はさらに強まり、グレリンKOでは著しい交感神経活性増加および副交感神経活性低下を認めた。なお、このような傾向はグレリン投与により完全に消失したことから、内因性グレリンがベースラインおよび心筋虚血時の自律神経活性を制御していることが証明された。



以上の結果から、内因性に産生・分泌されているグレリンが、心筋梗塞急性期の急激な交感神経活性増加・副交感神経活性低下を抑制することで、致死性不整脈による死亡を抑制していることが分かった。このことは生理的濃度のグレリン投与により、心筋梗塞の予後改善が期待できることを示すもので、その意義は非常に大きいと考える。

心筋梗塞は年間4万人超の国民の生命を奪う大変重篤な疾患であり、画期的治療法の開発が求められている。本研究成果は、生体内で産生されているペプチドを生理的濃度で用い、自律神経活性を制御することで心筋梗塞の予後改善が期待できるという、これまでにない、新しい発想の治療法を提案した。

## 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 13 件)

- ① Ogawa Y, Mukoyama M, Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Kato Y, Kuwabara T, Imamaki H, Kawanishi T, Koga K, Ishii A, Tokudome T, Kishimoto I, Sugawara A, Nakao K. Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase-A Protects Podocytes from Aldosterone-Induced Glomerular Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2012, in press. (査読有)  
DOI:10.1681/ASN.2011100985
- ② Mao Y, Tokudome T, Otani K, Kishimoto I, Nakanishi M, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin Prevents Incidence of Malignant Arrhythmia after Acute Myocardial Infarction through Vagal Afferent Nerves. *Endocrinology*. 2012, in press. (査読有)  
DOI: 10.1210/en.2012-1065
- ③ Schwenke DO, Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, Cragg PA, Shirai M, Kangawa K. One dose of ghrelin prevents the acute and sustained increase in cardiac sympathetic tone after myocardial infarction. *Endocrinology*. 2012, 153(5):2436-2443 (査読有)  
DOI:10.1210/en.2011-2057
- ④ Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest*. 2012, 122(4):1416-1426 (査読有)  
DOI:10.1172/JCI60746
- ⑤ Kishimoto I, Tokudome T, Hosoda H, Miyazato M, Kangawa K. Ghrelin and cardiovascular diseases. *J Cardiol*. 2012, 59(1):8-13 (査読有)  
DOI:10.1016/j.jjcc.2011.11.002
- ⑥ Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sonobe T, Kamiya A, Shishido T, Tokudome T, Hosoda H, Shirai M, Kangawa K, Sugimachi M. Centrally administered ghrelin activates cardiac vagal nerve in anesthetized rabbits. *Auton Neurosci*. 2011, 162(1-2):60-65 (査読有) DOI:10.1016/j.autneu.2011.04.001
- ⑦ Nishida H, Horio T, Suzuki Y, Iwashima Y, Tokudome T, Yoshihara F, Nakamura S, Kawano Y. Interleukin-6 as an independent predictor of future cardiovascular events in high-risk Japanese patients : comparison with C-reactive protein. *Cytokine*. 2011, 53(3):342-346 (査読有)  
DOI:10.1016/j.cyto.2010.12.005
- ⑧ 徳留 健、岸本一郎、寒川賢治、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、治療、2011, 93(4):686-688 (査読有)
- ⑨ 岸本一郎、徳留 健、榎野久士、寒川賢治、ナトリウム利尿ペプチドと肥満・インスリン抵抗性、実験医学増刊、2011, 29(5):194-201 (査読無)
- ⑩ Horio T, Iwashima Y, Kamide K, Tokudome T, Yoshihara F, Nakamura S, Kawano Y. Chronic kidney disease as an independent risk factor for new-onset atrial fibrillation in hypertensive patients. *J Hypertens*. 2010, 28(8):1738-1744 (査読有)  
DOI:10.1097/HJH.0b013e32833a7dfe
- ⑪ Hori T, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Miwa Y, Matayoshi T, Yoshihara F, Nakamura S, Tokudome T, Miyata T, Kawano Y. Association of insulin-like growth factor-1 receptor gene polymorphisms with left ventricular mass and geometry in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. 2010, 24(5):320-326 (査読有)  
DOI:10.1038/jhh.2009.73
- ⑫ 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、Spring-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、循環器研究の進歩、2010, 30(1):70-82 (査読無)
- ⑬ 徳留 健、岸本一郎、寒川賢治、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、脈管学、2010, 50(2):169-174 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 徳留 健 心脈管作動物質に関連した、次世代研究者による今後の研究展開 第 41 回日本心脈管作動物質学会 2012 年 2 月 11 日 秋田
- ② 徳留 健 血管恒常性維持における ANP・BNP の多彩な作用 第 15 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2011 年 11 月 25~26 日 大阪
- ③ 徳留 健 心血管病を内分泌・代謝面から考察する 第 84 回日本内分泌学会学

- 術総会 2011年4月22日 神戸
- ④ 徳留 健 Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates anti-hypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. XX<sup>th</sup> World Congress International Society for Heart Research 2010年5月13~16日 京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/biochemistry/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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: 00443474

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

Daryl O. Schwenke

オタゴ大学教官

Yuanjie Mao

独立行政法人国立循環器病研究センター・生化学部・流動研究員