

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790761

研究課題名(和文)生理活性ペプチド Ghrelin の特異性を生かした新しい心筋炎治療法の開発

研究課題名(英文)The new specific therapy for myocarditis with ghrelin

研究代表者

植松 悦子 (UEMATSU, Etsuko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教務補佐員

研究者番号：10352080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性心筋炎モデルを作製し、4週目より3週間グレリンの投与を行った。超音波検査にて左室リモデリングの評価を行い、グレリンの投与終了時に心内圧を測定し、摘出心筋の生化学的評価を行った。超音波検査では、グレリン投与群において左室径の拡大並びに左室内径短縮率の減少が有意に抑制された。また、左室拡張末期圧の上昇は有意に抑制され、dP/dtは増加していた。組織学的にはグレリンは心筋炎に伴うコラーゲン密度の増加を抑制した。さらに、グレリン投与の心筋ではinterferon- $\gamma$ やinterleukin(IL)-2のmRNAの発現が減少し、IL-4とIL-10の発現が増加していた。

研究成果の概要(英文)：Methods: Male Lewis rats were immunized and autoimmune myocarditis was induced. From the 3 weeks after the first myosin injection, ghrelin or vehicle were administered for 3 weeks. Six weeks after the first immunization, the severity of myocarditis was evaluated by echocardiography, hemodynamics, pathology, and gene expressions in myocardium. Ghrelin improved the deteriorated left ventricular (LV) fractional shortening and LV enlargement. In a hemodynamic study, there was a substantial decrease in LV end-diastolic pressure in ghrelin-treated rats. Ghrelin markedly attenuated an increase in morphometrical collagen volume fraction in LV. Interestingly, the treatment of ghrelin decreased the mRNA expression of interferon- $\gamma$  and interleukin (IL)-2 and increased the mRNA expression of IL-4 and IL-10 in the heart of rats with myocarditis. In conclusion, administration of ghrelin improved LV dysfunction in rats with myocarditis probably via the modulation of helper T cell activation.

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：分子心臓学

### 1. 研究開始当初の背景

(1) グレリン (Ghrelin) は、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 $\mu$ g/kg/日にて投与、皮下注) は心拍数を減少させ、最大および最小 dP/dt といった指標も改善した。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。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 $\mu$ 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、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は、申請者はラット虚血再灌流モデルにおいて、グレリンの投与が extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 並びに phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (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 (2007 年欧州心臓病学会、2008 年日本循環器学会総会にてその一部を発表、論文投稿中)。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も心保護作用を有する可能性があると考えられた。後者 (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、interleukin (IL)-1 $\beta$ 、IL-6 および tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  といった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最近報告された (Gastroenterology 130: 1707-1720, 2006)。

(2) 一方で、急性心筋梗塞 (急性冠症候群) に対するグレリンの臨床応用に関しては、冠血行再建術という劇的効果を有する治療法が確立されていることからグレリンは補助的な薬剤として期待されるにとどまっている。これに対し、急性心筋炎は死亡率が約 10% と言わ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。心筋炎の原因にはウイルス感染とアレルギー・自己免疫があるが、ウイルス性心筋炎でも直接細胞障害よりは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、interferon (IFN)- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  などを産生し細胞性免疫反応を促進) と 2 型ヘルパー T 細胞 (IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 などを分泌し液性免疫を促進) のバランスであることが認識されるようになった。これらの自己免疫性心筋炎の発生機序に対し、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。さらに、グレリンは上記のように心筋細胞における抗アポトーシス効果も有しており、心筋炎においても心筋細胞での抗アポトーシス効果が期待できる。このようなことから、本研究では、難治性心筋炎に対するグレリンの効果を検討し、そのメカニズムを解明することを最大の目的とする。さらに、将来的な臨床応用を視野に、心筋炎をはじめとするヒト心臓病における血漿グレリン濃度を調べることにより、グレリンの診断的有用性についても検討する。

### 2. 研究の目的

ラットの自己免疫性心筋炎 (experimental autoimmune myocarditis: EAM) モデルにグレリンを投与しその効果を検討するとともにメカニズムの解明を行う。特にグレリンの抗炎症作用 (Th1/Th2 バランス等) に注目して研究を行い、難治性心筋炎に対する新しい治療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

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。ミオン感作後 2 から 3 週目に自己免疫性心筋炎 (ヒトにおける巨細胞性心筋炎に相当) が発症したラットを対象とした。なお、同週齢のラットで免疫化しなかったものを Control とした。

まず、本モデルに対し心臓超音波検査 (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、第4週目よりグレリン (100 $\mu$ g/kg 皮下、1日2回) または溶媒のみの投与を3週間行った (EAM+Ghrelin 群および EAM+Vehicle 群)。その後、超音波による心機能並びに形態の経時的評価を行った。6週間後に心臓カテテルによる心内圧の測定を行った (AD Instruments 社製 PowerLab system を使用)。(図1) 安楽死処置後心臓を摘出し、Masson-trichrome 染色により形態学的コラーゲン密度を定量評価した。同時に、線維化関連因子 (collagen I&III, transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1)、炎症関連因子 (monocyte chemotactic protein 1 (MCP1), TNF $\alpha$ ) の遺伝子発現を定量 PCR 法 (Applied Biosystems 7500) により解析した。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) が関与し治療には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- $\gamma$ , IL-2; Th2: IL-4, IL-10 等) についても定量 PCR 法で評価した。

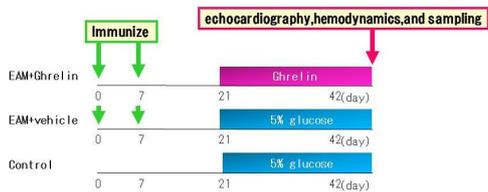


図1 研究計画

#### 4. 研究成果

自己免疫性心筋炎ラット (EAM) は Control 群のラットに比べ体重増加が有意に抑制されていたが、EAM+vehicle 群に比べ EAM+Ghrelin 群の方が体重増加抑制は軽減されていた。心筋重量/体重比は Control 群に比べ EAM+Vehicle 群において増加したが、EAM+Ghrelin 群では Control 群と同じ程度まで低下していた (図2)。

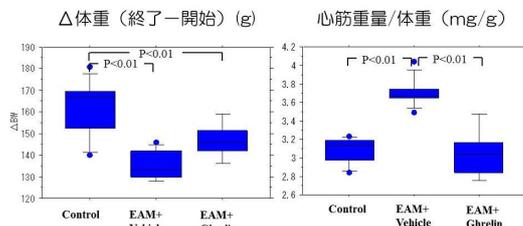


図2 体重変化心筋重量

心臓超音波検査では、EAM+Vehicle 群は Control 群と比べ左室拡張末期径の拡大が経時的に大きくなったが、グレリン投与

(EAM+Ghrelin) 群では左室径の拡大進展が有意に抑制されていた。そして、左室内径短縮率の関しても、EAM+Ghrelin 群では心筋炎発症後徐々に低下していったが、EAM+Ghrelin 群ではその程度が有意に抑制されていた (図3、4)。また、心臓カテテル検査では、グレリン投与により EAM+Vehicle 群と比べ左室拡張末期圧の上昇が有意に抑制され、dP/dt は増加していた。

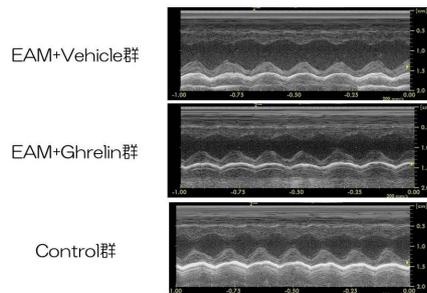


図3 心臓超音波検査 M モード代表図

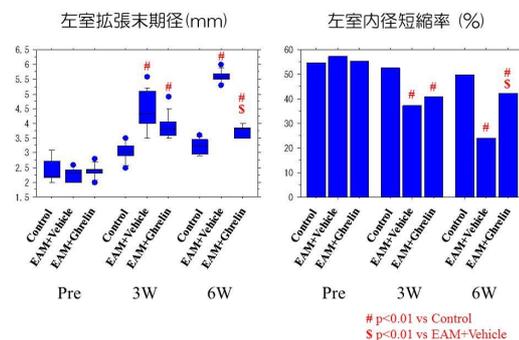


図4 心臓超音波検査結果

心筋の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 サイトカインである IFN- $\gamma$  や IL-2 の mRNA の発現が増加し、2型ヘルパーT細胞からの Th2 サイトカインである IL-4 と IL-10 の mRNA の発現が低下していた。グレリン投与 (EAM+Ghrelin 群) により、IFN- $\gamma$ 、IL-2 の mRNA の発現は減少し、IL-4、IL-10 の mRNA の発現は増加していた (ただし統計学的有意差に至らず) (図5)。TNF- $\alpha$  および MCP1 の mRNA も心筋炎により増加していたが、グレリン投与により著明に減少していた (図5)。

線維化関連因子である Collagen の mRNA 発現も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。しかしながら、Collagen I および TGF- $\beta$ 1 については大きな変動はみられなかった (図6)。

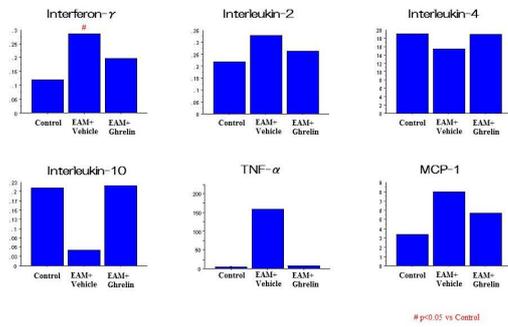


図5 心筋での遺伝子発現(1)

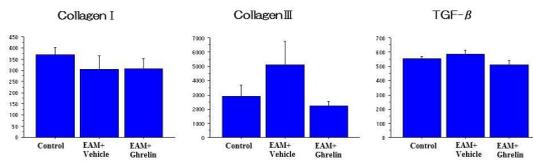


図6 心筋での遺伝子発現(2)

組織学的評価においては、Masson-trichrome染色でのコラーゲン密度は、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)タに減少していた(図7)

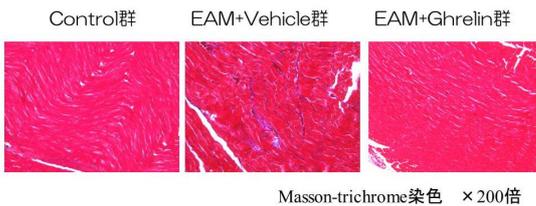


図7 コラーゲン密度

これらの結果より、グレリン投与はTh1/Th2 バランス修飾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。

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 1件)

ESC Congress 2013, Congress center Amsterdam RAI, (Amsterdam, Netherlands), 31 Aug- 4 Sep 2013  
Bando S, Soeki T, Uematsu E, Matsuura 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：  
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

植松 悦子(UEMATSU, Etsuko)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教務補佐員  
研究者番号：10352080

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：