

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871236

研究課題名(和文)生理活性ペプチドを用いた拡張型心筋症の新規治療法の開発

研究課題名(英文)The treatment benefit of ghrelin on a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation

研究代表者

戦 冬雲 (ZHAN, DONGYUN)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：30616941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトにおいて致死的な拡張型心筋症(DCM)を引き起こす心筋トロポニンT遺伝子欠失突然変異 K210を導入したノックインマウスに対するグレリンの治療効果を調べた。生後1ヶ月のDCM KI マウスに対し、グレリン(150 µg/kg)を1回/日・1ヶ月間を投与することによって、心臓副交感神経の活性化と交感神経活動の抑制と同時に、突然死と左心室リモデリングの改善が認められた。以上の結果から、DCMマウスに対するグレリンの有益効果には、心臓交感神経活性の抑制および心臓迷走神経の活性化が最も強く関与したと推測される。

研究成果の概要(英文)：We examined whether ghrelin is beneficial for the treatment of inherited dilated cardiomyopathy (DCM) with a deletion mutation K210 in the cardiac troponin T gene using a knock-in mouse model. We found that ghrelin administration for one month suppressed the excessive cardiac sympathetic nerve activity and recovered the cardiac parasympathetic nerve activity and then prevented sudden death and left ventricular remodeling of DCM mice. These results suggested that cardiovascular benefits of ghrelin are likely linked to the suppression of CSNA and recovery of cardiac parasympathetic nerve activity.

研究分野：循環器内科学、薬理学

キーワード：拡張型心筋症 ノックインマウス 生理活性ペプチド 心臓自律神経活動 心拍変動

1. 研究開始当初の背景

拡張型心筋症(DCM)は、心筋の収縮機能の低下により心内腔の著明な拡大を呈し、不整脈や心不全を来す疾患である。日本で 17,700 人(平成 11 年)の患者が推定されている。重症例では心臓移植が必要で、日本における心臓移植対象例の 80%以上が本症である。これまでヒト DCM の特徴を有する適切な動物モデルがなかったため、DCM の病態解明と新たな治療法の開発は遅れているのが現状である。

我々は、DCM 患者で見つかった心筋トロポニン T (cTnT)のアミノ酸残基 K210 をコードする三つの塩基対を欠失した突然変異 (Δ K210)を内在性ゲノム遺伝子に導入したノックイン(KI)マウスを作製し、詳細な解析を行うことで、DCM の病態発生メカニズムを明らかにすることに成功した(Circ. Res., 2007)。この DCM KI マウスは、心収縮能の低下、心拡大、突然死の頻発等、ヒト DCM 患者と非常に良く似た表現型をしており、ヒト DCM 患者に対する治療薬評価モデルとして有用である。

グレリンは、胃から分泌される成長ホルモン分泌促進ペプチドで、1999 年 12 月に児島・寒川らによって発見された。国内外の研究者らによって、グレリンは成長ホルモンの分泌促進作用以外にも、摂食促進作用、消化管運動促進作用、胃酸分泌促進作用、

心機能の改善作用等様々な生理作用を有することが明らかになっている。

国立循環器病研究センター研究所心臓生理機能部では、グレリンの心臓自律神経活動に対する効果を研究してきており、ラット急性心筋梗塞モデルにおいて、グレリンは心臓交感神経活動を抑制することにより死亡率を低下させることを報告した(Endocrinology, 2008)。また、麻酔下ウサギにおいて、グレリンの脳室内投与により、心臓迷走神経活動が増大することを報告した(Auton Neurosci,

2011)。さらに、研究代表者は、心臓迷走神経活動を activate することで、DCM KI マウス死亡率を低下させ、心臓リモデリングを抑制させることが可能であることを報告した(Cardiovasc. Res., 2009)。

以上を総合すると、グレリンはヒト DCM 患者に対して極めて有効な治療薬となり得ると推察される。今回ヒト DCM 患者に対する有効な治療法確立のために、我々は、グレリンの DCM KI (Δ K210/ Δ K210)マウスの生命予後と心臓リモデリングに対する治療効果を調べ、その作用機序を解析することを計画した。

2. 研究の目的

本研究は、 Δ K210 DCM KI マウスに対する生理活性ペプチド・グレリンの治療効果を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1). 生命予後改善の検証

グレリン皮下注射群と生理食塩水注射群に分け、1回/日注射することによって、DCM KIマウス生存率に対するグレリンの長期治療効果を調べた。

(2). 生体における心機能解析

M モード心エコーを用いて、DCM KI マウス心機能に対するグレリンの治療効果を検証した。

(3). 摘出心臓の肉眼的および病理組織学的な検証

下記の評価方法を用いて、グレリンの治療効果を摘出心臓の肉眼的および病理組織学的に検証を行った。

- 心臓を摘出し、治療による心重量及び心重量/体重の変化を確かめた。
- 病理組織標本を作成し、治療による組織病変の変化を評価した。

(4). 心臓の生化学的解析

Western blotting 法を用いて、マウスの左心室における心不全マーカー

(BNP 発現量) を調べることによって、グレリン投与による分子レベルの変化を明らかにした。

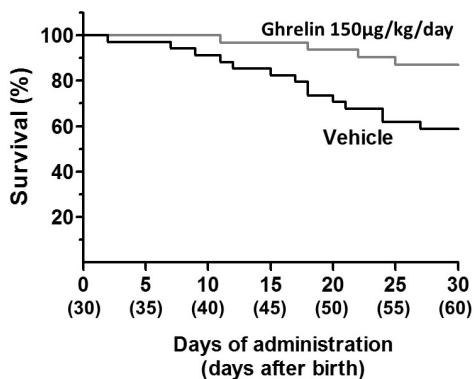
(5). DCM KI マウスに対するグレリン作用機序の解明

覚醒下において、マウス体内にテレメトリー送信器を埋め込み、心電図を長期間モニターし、心拍変動のパワースペクトル解析することによって、グレリンを投与した DCM KI マウスにおける心臓自律神経活動の変化を評価した。

4. 研究成果

(1) 生後 1 ヶ月の DCM KI マウスに、グレリン(150 μ g/kg)を 1 回/日・1 ヶ月間皮下注射は DCM KI マウスの生命予後と心臓機能・リモデリングを改善することが分かった。

生命予後：グレリンは DCM KI マウスの生存率を約 60%から 85%に大きく改善した。



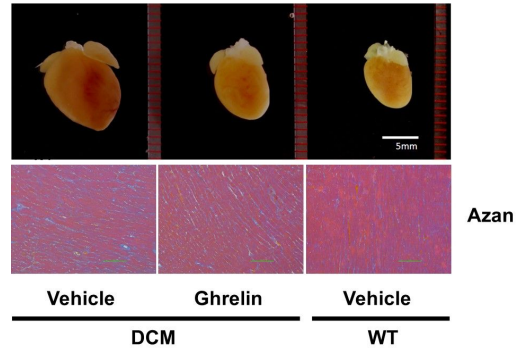
心臓収縮機能(心エコー): グレリンは DCM KI マウスの左心室拡張末期径 5.42 ± 0.12 mm から 4.88 ± 0.11 mm まで減少させると同時に、左室駆出率を $25.0 \pm 1.6\%$ から $42.5 \pm 2.1\%$ まで上昇させた。摘出心臓の肉眼的および病理組織

学的所見:

a. グレリンは DCM KI マウスの心重量及び心重量/体重を低下させた。

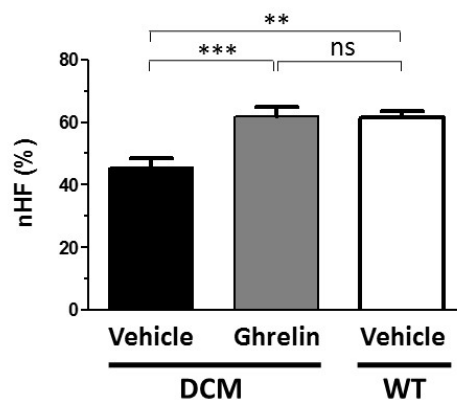
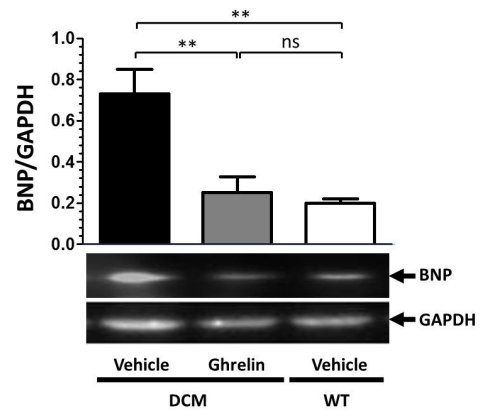
b. グレリンは DCM KI マウスの心室線維化を抑制した。

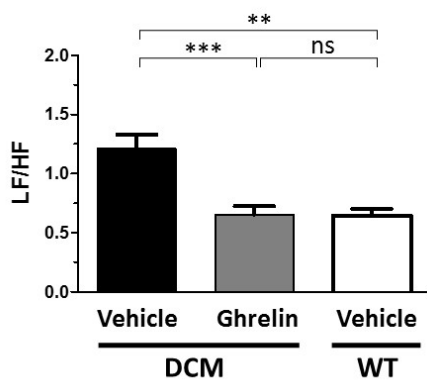
心臓の生化学的所見: グレリンは DCM KI マウスの左心室の BNP (心不



全マーカー) 発現量を低下させた。

(2) DCM マウスでは、WT と比べ、交感神経活動の亢進と迷走神経活動の低下が認められたが、グレリン投与により DCM マウスの交感神経活動と迷走神経活動は WT マウスとほぼ同じレベルに回復した。





以上のことから、DCM KI マウスに対するグレリンの有益効果は心臓交感神経活性の抑制および心臓迷走神経の活性化が最も強く関与したと推測されるが、今後、心臓迷走神経活動の中枢性制御機構に対するグレリンの効果調べ、より直接的な証拠を得たいと考えている。

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 6 件)

1. Du CK, Zhan DY, Morimoto S, Akiyama T, Schwenke DO, Hosoda H, Kangawa K Shirai M. Survival benefit of ghrelin in the heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Pharmacol Res Perspect.* 2(5):e00064, Oct, 2014. doi: 10.1002/prp2.64, (査読有).
2. Du CK, Zhan DY, Akiyama T, Sonobe T, Inagaki T, Shirai M. Myocardial interstitial serotonin and its major metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid levels determined by microdialysis technique in rat heart. *Life Sci.* 117(1): 33-9, Nov, 2014. doi: 10.1016/j.lfs.2014.09.019, (査読有).
3. Du CK, Zhan DY, Morimoto S. In vivo effects of propyl gallate, a novel Ca⁽²⁺⁾ sensitizer, in a mouse model of dilated cardiomyopathy caused by cardiac troponin T mutation. *Life Sci.* 109(1):15-9, Jul, 2014. doi: 10.1016/j.lfs.2014.06.004, (査読有).
4. Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M. Contribution of calpain to myoglobin efflux from cardiomyocytes during ischaemia and after reperfusion in anaesthetized rats. *Acta Physiol (Oxf).* 210(4): 823-31, Apr 2014. doi:

10.1111/apha.12205, (査読有).

5. Zhan DY, Du CK, Akiyama T, Sonobe T, Tsuchimochi H, Shimizu S, Kawada T, Shirai M. In vivo monitoring of acetylcholine release from cardiac vagal nerve endings in anesthetized mice. *Auton Neurosci.* 176(1-2): 91-4, Jun, 2013. doi: 10.1016/j.autneu.2013.02.014, (査読有).
6. Sonobe T, Akiyama T, Du CK, Zhan DY, Shirai M. Contribution of serotonin uptake and degradation to myocardial interstitial serotonin levels during ischaemia-reperfusion in rabbits. *Acta Physiol (Oxf).* 207(2): 260-8, Feb, 2013. doi: 10.1111/j.1748-1716.2012.02461.x, (査読有).

[学会発表](計 14 件)

1. Zhan DongYun, Du ChengKun, Morimoto Sachio, Akiyama Tsuyoshi, Schenke Daryl O, Hiroshi Hosoda, Kenji Kangawa Mikiyasu Shirai. Survival benefit of ghrelin in the heart failure due to dilated cardiomyopathy. The 92th annual meeting of the physiological society of Japan. 21-23 March, 2015, Kobe, Japan.
2. Du ChengKun, Zhan DongYun, Morimoto Sachio, Shirai Mikiyasu. Knock-in mouse model of hypertrophic cardiomyopathy caused by troponin T mutation. The 92th annual meeting of the physiological society of Japan. 21-23 March, 2015, Kobe, Japan.
3. Inagaki Tadakatsu, Akiyama Tsuyoshi, Zhan DongYun, Du ChengKun, Shirai Mikiyasu. Role of monoamine oxidase on hydroxyl radical production during ischemia/reperfusion in anesthetized rats. The 92th annual meeting of the physiological society of Japan. 21-23 March, 2015, Kobe, Japan.
4. 戦 冬雲, 杜 成坤, 秋山 剛, 白井 幹康. 中枢を介した迷走神経活性化による拡張型心筋症治療薬. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 18 日 ~ 20 日, 名古屋国際会議場.
5. 杜 成坤, 戦 冬雲, 森本 幸生, 白井 幹康. 心筋トロポニン T 突然変異による肥大型心筋症ノックインマウスモデル. 2015 年 3 月 18 日 ~ 20 日, 名古屋国際会議場.
6. Dong-Yun Zhan, Cheng-Kun Du, Sachio Morimoto, Tsuyoshi Akiyama, Daryl O.

Schwenke, Hiroshi Hosoda, Kenji Kangawa Mikiyasu Shirai. The treatment benefit of ghrelin on a mouse model of inherited dilated cardiomyopathy caused by troponin mutation. Biophysical society 59th annual meeting. Feb. 7~11, 2015. Baltimore, Maryland, USA.

7. Cheng-Kun Du, Dong-Yun Zhan, Tsuyoshi Akiyama, Takashi Sonobe, Tadakatsu Inagaki, Mikiyasu Shirai. Myocardial interstitial serotonin and its major metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid levels determined by microdialysis technique in in vivo rat heart. Biophysical society 59th annual meeting. Feb. 7~11, 2015. Baltimore, Maryland, USA.
8. 戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、森本 幸生、清水 秀二、川田 徹、白井 幹康 . DCM ノックインマウスにおける心臓迷走神経調節機構 .第 87 回日本薬理学会年会 . 2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日、仙台 .
9. 杜 成坤、戦 冬雲、秋山 剛、稲垣 克薫、白井 幹康 . 虚血/再灌流における心筋間質セロトニンの動態 .第 87 回日本薬理学会年会 . 2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日、仙台 .
10. 戦 冬雲、杜 成坤、秋山 剛、森本 幸生、清水 秀二、川田 徹、白井 幹康 . DCM ノックインマウスにおける心臓迷走神経調節機構 .第 91 回日本生理学会年会 . 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日、鹿児島 .
11. 杜 成坤、戦 冬雲、秋山 剛、稲垣 克薫、白井 幹康 . 虚血/再灌流における心筋間質セロトニンの動態 .第 91 回日本生理学会年会 . 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日、鹿児島 .
12. 稲垣 克薫、秋山 剛、戦 冬雲、杜 成坤、白井 幹康 . 4-HB を用いた心筋虚血再灌流のヒドロキシラジカル測定 . 第 91 回日本生理学会年会 . 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日、鹿児島 .
13. 杜 成坤、戦 冬雲、森本 幸生、秋山 剛、寒川 賢治、白井 幹康 . 拡張型心筋症ノックインマウスに対するグレリンの治療効果 .第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 . 2013 年 11 月 22 日 ~ 23 日、大阪 .
14. 李 蕾、森本 幸生、武 幸子、戦 冬

雲、杜 成坤、王 媛媛、範 雪麗、吉原 達也、高橋 富美、片淵 俊彦、笹栗 俊之 . うっ血性心不全の病態生理学における脳セロトニン機能障害の役割 . 2013 年 11 月 22 日 ~ 23 日、大阪 .

6 . 研究組織

研究代表者

戦 冬雲 (ZHAN DONGYUN)

国立循環器病研究センター・研究所・流動
研究員

研究者番号 : 30616941