

令和元年5月24日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19412

研究課題名(和文)新規マイオカインを用いた大動脈弁狭窄症患者における包括的手術リスク評価法の確立

研究課題名(英文) Comprehensive assessment of risk of surgery with novel myokine in patients with aortic valve stenosis

研究代表者

花谷 信介 (Hanatani, Shinsuke)

熊本大学・大学病院・非常勤診療医師

研究者番号：40755443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋サンプルを用いたプロテオーム解析にて、骨格筋肥大モデルであるAkt1TGマウスで有意に発現が増加していたheme oxygenase-1(HO-1)に着目した。Akt1TGマウスでは下肢虚血誘導後の血流改善が有意に大きかったが、これはHO-1の阻害剤でキャンセルされた。一方で骨格筋特異的HO-1ノックアウトマウスでは同じ下肢虚血モデルにおいて特定の表現型を示さず、また下肢虚血誘導後のAkt1TGマウス腓腹筋にて、HO-1は内皮細胞やマクロファージに一致して発現が認められ、血管新生促進的に作用したHO-1の供給源は骨格筋における内皮やマクロファージであるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋重量が増加することで発現が増加しかつ遠隔臓器に保護的に作用する因子として、今回heme oxygenase-1(HO-1)の血管新生に対する作用について明らかにした。申請者の以前の報告でも骨格筋重量が増加することで起こる遠隔臓器への保護作用は血管新生を介したものが多く、今回着目したHO-1もその一部を担っているものと推測される。このような因子が明らかになることで、本研究の当初の動機であるフレイルの診断マーカーとしての応用や新規の治療ターゲットとしての有用性も考慮される。

研究成果の概要(英文)：We performed proteomic analysis using skeletal muscle samples from Akt1 TG and wild type mice, and identified that heme oxygenase-1(HO-1) was upregulated protein in Akt1 TG mice. Akt1-mediated muscle growth enhanced blood flow recovery after hindlimb ischemia. Treatment with HO-1 inhibitor SnMP abolished the angiogenic effect of skeletal muscle Akt1 activation. On the other hand, blood flow recovery after hindlimb ischemia was similar between wild type and skeletal muscle-specific HO-1-knockout mice. Furthermore, immunohistochemistry showed that HO-1 expression was not increased in muscle cells, but it was increased in macrophages and endothelial cells. These data suggest that Akt1-mediated muscle growth improves blood flow recovery after hindlimb ischemia by enhancing HO-1 expression in neighboring cells.

研究分野：循環器内科学

キーワード：マイオカイン フレイル サルコペニア heme oxygenase 1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、経カテーテル大動脈弁留置術(TAVI)の登場などもあり、外科的大動脈弁置換術(AVR)を含めた手術目的で専門施設を紹介される高齢大動脈弁狭窄症(AS)患者が増加している。TAVIも考慮されるような高齢者は併存症のみならず、心身機能の低下を示す“フレイル”を併発していることが多く、またフレイルはそれ自体が開心術のリスクとなることも報告されている。フレイルも含めた評価を行い、手術リスクを予測することがガイドライン上も推奨されているが、これまで簡便かつ一般化されたフレイルの評価法はなかった。

2. 研究の目的

フレイルの病態の中心には骨格筋量と筋力の低下があり、この骨格筋の状態を簡便に評価する指標が確立出来ればフレイルの予測にも応用できると考えられる。近年、骨格筋由来の液性因子が“マイオカイン”と総称され注目を集めており、本研究では骨格筋から分泌される新規マイオカインを同定し、その血中濃度を測定することでフレイルの適切な評価につながる新たな指標の確立を目指す。さらに、その血中濃度測定がAVRやTAVI周術期の併発症発生を予測する新たなマーカーとならないかについても検討する。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋重量と関連する新規マイオカインの探索

初めにサルコペニアと関連する骨格筋由来液性因子のスクリーニングを行うこととした。骨格筋肥大モデルとして以前我々のグループが確立した骨格筋特異的 Akt1 トランスジェニックマウス(Akt1TGマウス)を用い、このマウスと野生型マウスの骨格筋における発現に差のあるタンパクをプロテオーム解析にて網羅的に解析した。

プロテオーム解析の結果、野生型マウスと比較して Akt1TG マウスの骨格筋では多くの因子の発現が増加していることが確認されたため、それらの因子それぞれについて、Akt1を過剰発現した培養骨格筋細胞およびその培養上清中の蛋白発現をウエスタンブロット法にて確認した。培養骨格筋細胞は C2C12 筋芽細胞を用い、細胞増殖を促した後に骨格筋細胞への分化を誘導し、その後アデノウイルスベクターを用いて Akt1 を過剰発現させ、この細胞および培養上清をそれぞれ回収した。

(2) 新規マイオカイン候補 heme oxygenase-1 の心血管疾患における役割検討

今回の研究では、遠隔臓器に対して保護的に作用する“善玉”マイオカインを検索する、という観点から候補の絞り込みを行い、その過程で心臓や腎臓などの遠隔臓器へ臓器保護的な作用が報告されていた heme oxygenase-1(HO-1)に着目して研究を進めることとした。HO-1 は比較的ユビキタスに発現する因子であることから、骨格筋細胞における HO-1 の役割を検討するため、骨格筋特異的に HO-1 を欠損する遺伝子改変マウスを作製し、表現型を解析することとした。臓器特異的にノックアウトマウスは HO-1 flox マウスと、骨格筋特異的に Cre リコンビナーゼを発現する ACTA1-Cre マウスを交配することで作製した。

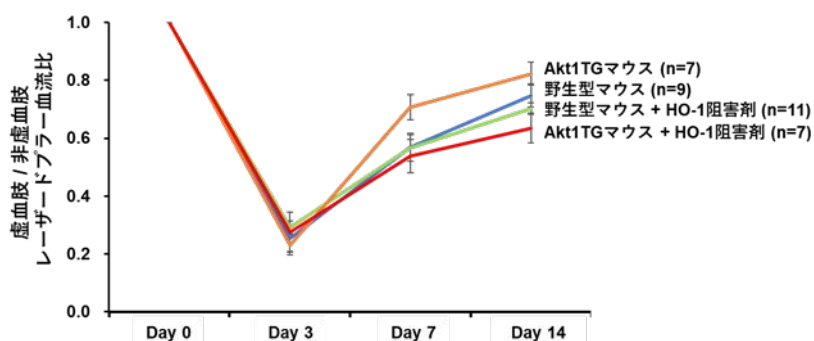
(3) ヒト血液サンプルでの HO-1 血中濃度測定

HO-1 が肥大した骨格筋から血中に分泌されるという仮説の元、ヒトの血液サンプルを用いた血中濃度測定を行った。HO-1 血中濃度測定には市販の ELISA キットを用いた(ENZO)。

4. 研究成果

Akt1TG マウスおよび野生型マウス腓腹筋サンプルを用いたプロテオーム解析の結果、Akt1TG マウスで野生型マウスの2倍以上発現が上昇しているタンパクは429個確認できた。骨格筋から分泌されるタンパクという観点から、そのうちで上昇の程度が強くかつ分泌シグナルを有することが報告されているものを優先的にピックアップした。腓腹筋サンプル中には、骨格筋細胞のみならず内皮細胞や炎症細胞、線維芽細胞など雑多な細胞が含まれており、ピックアップした因子が真に骨格筋細胞に由来する“マイオカイン”であることを確認するため、Akt1を過剰発現した C2C12 筋管細胞およびその培養上清を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、Akt1を過剰発現した筋管細胞において複数の因子のタンパク発現が増加し、かつその培養上清でも発現が確認できたことから、骨格筋肥大により発現が増加し、骨格筋細胞から分泌されるマイオカイン

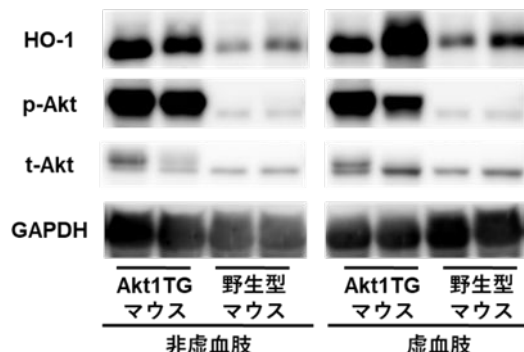
図1: Akt1TGマウスは下肢虚血後の血流改善の程度が大きい



であることが示された。

我々は、これらの候補因子のうち、過去に心保護作用や腎保護作用を有することが示されている heme oxygenase 1(HO-1)に着目し、まずはその血管新生に及ぼす影響を検討することとした。これは、以前我々が報告した、“Akt1TG マウスでは野生型マウスと比べ心筋梗塞モデルや腎臓病モデルにおける臓器障害が抑制され、その機序の一つに血管新生が関与する”という研

図2：Akt1TGマウス腓腹筋においてHO-1の発現が増加する



究結果からの着想であり、これを評価するためにマウス下肢虚血モデルを利用した。まず、Akt1TG マウスおよび野生型マウスに下肢虚血を誘導し、その後の血流改善の程度を群間で比較した。その結果、下肢虚血の誘導後は両群共に一旦低下した血流が改善していたが、その程度は Akt1TG マウスで有意に大きいことが明らかとなった。なお、虚血を誘導していない対側肢の血流には有意な群間差を認めなかった(図1)。この下肢虚血誘導 14 日後の腓腹筋サンプルの組織像を免疫組織化学染色にて評価したところ、Akt1TG マウス腓腹筋では有意に内皮細胞の数が多く、HO-1 陽性細胞も増加していた。また、虚血肢および非虚血肢の腓腹筋サンプルを用いたウエスタンブロットにおいても、Akt1TG マウスで HO-1 のタンパク発現が増加していることが示された(図2)。なお、前述の下肢虚血プロトコールに HO-1 阻害剤である SnMP を追加投与した阻害実験では、Akt1TG マウスで認められた下肢血流改善効果および虚血肢での内皮細胞増加効果はキャンセルされており(図1)、このことから、骨格筋肥大による血管新生作用の少なくとも一部は HO-1 を介したものであると考えられた。

次に我々は、骨格筋組織で増加した HO-1 の供給源を同定するため、骨格筋組織を用いた免疫組織化学染色を行った。その結果、HO-1 は骨格筋細胞ではなくマクロファージや内皮細胞のマーカーに一致して発現していることが明らかとなった。また、骨格筋特異的 HO-1 KO マウスと野生型マウスの 2 群に前述の下肢虚血手術を施したところ、下肢虚血誘導後の血流改善の程度に群間差がないことも明らかとなり、このことは骨格筋肥大による血流改善作用を担う HO-1 は、骨格筋細胞以外の内皮細胞やマクロファージといった細胞群によって供給されることを示すものと考えられた。

さらに申請者は、骨格筋細胞での Akt1 過剰発現によって近傍の細胞における HO-1 発現が上昇する機序について、C2C12 筋管細胞を用いた in vitro にて検討を行った。in vivo の結果と同様に、Akt1 を過剰発現した C2C12 筋管細胞中では HO-1 の発現が増加しないことが示された一方で、その培養上清を添加した培養内皮細胞において HO-1 の発現が増加することが明らかとなり、このことは骨格筋細胞における Akt1 の過剰発現が、骨格筋細胞から分泌されるサイトカインを介して近傍に存在する内皮細胞中の HO-1 発現を増加させることを示すものと考えられた。

また、申請者は前述の通り HO-1 を新規のマイオカイン候補と考え、ヒト血液サンプルを用いた臨床研究も併行して行った。予備検討ではあるが心血管疾患患者 11 名を対象として血中 HO-1 濃度を測定したところ、他施設より提唱されていた簡便に測定可能なサルコペニア予測スコアの数値と血中 HO-1 濃度の間に負の相関関係があることが示された(スピアマンの $r = -0.6$, $p = 0.054$)。その後 HO-1 のソースが骨格筋細胞ではないことが明らかとなったため、当初考えていたストーリーとは異なるものの、骨格筋重量の変化を反映し得るバイオマーカーとしてその有用性を評価する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Pavasini R, Serenelli M, Celis-Morales CA, Gray SR, Izawa KP, Watanabe S, Colin-Ramirez E, Castillo-Martínez L, Izumiya Y, **Hanatani S**, Onoue Y, Tsujita K, Macdonald PS, Jha SR, Roger VL, Manemann SM, Sanchis J, Ruiz V, Bugani G, Tonet E, Ferrari R, Volpato S, Campo G. Grip strength predicts cardiac adverse events in patients with cardiac disorders: an individual patient pooled meta-analysis. *Heart*. in press. (2018). 査読有
doi: 10.1136/heartjnl-2018-313816.
- (2) **Hanatani S**, Izumiya Y, Onoue Y, Tanaka T, Yamamoto M, Ishida T, Yamamura S, Kimura Y, Araki S, Arima Y, Nakamura T, Fujisue K, Takashio S, Sueta D, Sakamoto K, Yamamoto E, Kojima S, Kaikita K, Tsujita K. Non-invasive testing for sarcopenia predicts future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *Int J Cardiol*. 268, 216-21. (2018). 査読有
doi: 10.1016/j.ijcard.2018.03.064.

- (3) Onoue Y, Izumiya Y, **Hanatani S**, Ishida T, Arima Y, Yamamura S, Kimura Y, Araki S, Ishii M, Nakamura T, Oimatsu Y, Sakamoto K, Yamamoto E, Kojima S, Kaikita K, Tsujita K. Akt1-Mediated Muscle Growth Promotes Blood Flow Recovery After Hindlimb Ischemia by Enhancing Heme Oxygenase-1 in Neighboring Cells. *Circ J.* 82, 2905-12. (2018) 査読有
doi: 10.1253/circj.CJ-18-0135.
- (4) Onoue Y, Izumiya Y, **Hanatani S**, Tanaka T, Yamamura S, Kimura Y, Araki S, Sakamoto K, Tsujita K, Yamamoto E, Yamamuro M, Kojima S, Kaikita K, Hokimoto S. A simple sarcopenia screening test predicts future adverse events in patients with heart failure. *Int J Cardiol.* 215, 301-6. (2016) 査読有
doi: 10.1016/j.ijcard.2016.04.128.

〔学会発表〕(計 5件)

- (1) **花谷信介**, 泉家康宏, 山本正啓, 石田俊史, 山村智, 木村優一, 荒木智, 辻田賢一、簡便に算出可能なサルコペニアスクリーニングスコアは慢性腎臓病患者において将来の心不全イベントを予測する 第66回日本心臓病学会学術集会、2018年
- (2) **Hanatani S**, Izumiya Y, Yamamoto M, Ishida T, Yamamura S, Kimura Y, Araki S, Tsujita K.、Noninvasive Testing for Sarcopenia Can Predict Future Heart Failure Events in Patients with Chronic Kidney Disease. 第82回日本循環器学会学術集会、2018年
- (3) **花谷信介**, 泉家康宏, 山本正啓, 石田俊史, 山村智, 木村優一, 荒木智, 辻田賢一、慢性腎臓病患者における非侵襲的サルコペニアスクリーニングスコアの心血管イベント予測能の検討 第8回日本腎臓リハビリテーション学会学術集会、2018年
- (4) **Hanatani S**, Yamamoto M, Ishida T, Yamamura S, Kimura Y, Araki S, Izumiya Y, Tsujita K.、Non-invasive Screening Test for Sarcopenia is a Useful Predictor of Future Cardiovascular Events in Patients with Chronic Kidney Disease. 67th Annual Scientific Session & Expo the American College of Cardiology、2018年
- (5) Izumiya Y, Onoue Y, **Hanatani S**, Tsujita K.、Akt1-Mediated Skeletal Muscle Growth Promotes Angiogenesis by Enhancing Heme Oxygenase-1 Expression in Surrounding Endothelial Cells. 67th Annual Scientific Session & Expo the American College of Cardiology、2018年

〔図書〕(計 2件)

- (1) **花谷信介**, 他、日本臨牀社、日本臨牀増刊 心不全(第2版)上、2018、341-345
- (2) **花谷信介**, 他、科学評論社、循環器内科 第85巻第3号、2018、448-453

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。