

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03181

研究課題名(和文) 骨格筋におけるPGC-1 の発現増加が動脈硬化の進展を抑制する機序

研究課題名(英文) Increased expression of PGC-1alpha in skeletal muscle suppresses the development of atherosclerosis

研究代表者

三浦 進司 (MIURA, Shinji)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10342932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：持久運動トレーニングやエネルギー制限は動脈硬化進展を抑制する。このメカニズムに筋肉の変化が関与することを考え、運動やエネルギー制限による筋肉の変化を引き起こす転写因子PGC-1 およびFOXO-1に着目し、本研究では、骨格筋特異的なPGC-1 過剰発現やFOXO-1過剰発現が動脈硬化進展に与える影響を検討した。その結果、骨格筋特異的なPGC-1 あるいはFOXO-1の過剰発現は動脈硬化の進展を抑制すること、それには骨格筋から分泌される生理活性物質である β -aminoisobutyric acidやIrisinなどの生理活性物質が関与する可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、持久運動トレーニングとエネルギー制限による動脈硬化進展抑制機序の一端を、PGC-1 やFOXO-1といった骨格筋機能に着目して明らかにした。本研究で得られた成果により、骨格筋から分泌される生理活性物質(マイオカイン)に着目した動脈硬化を予防するためのバイオマーカー開発や、マイオカインを豊富に含む食品を摂取することによる動脈硬化性疾患の予防法開発に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Endurance exercise training and calorie restriction suppress the development of atherosclerosis. Considering that characteristic changes of skeletal muscle are involved in this mechanism, we focused on the transcription factors PGC-1 and FOXO-1 that cause the changes of muscles due to exercise and energy restriction. In this study, we focused on skeletal muscle-specific PGC-1 or FOXO-1 overexpression on the progression of atherosclerosis was investigated. As a result, overexpression of skeletal muscle-specific PGC-1 or FOXO-1 suppresses the progression of atherosclerosis. The physiology of bioactive substances secreted from skeletal muscle, such as β -aminoisobutyric acid and Irisin, might be involved in the suppression.

研究分野：分子栄養学

キーワード：動脈硬化 PGC-1 FOXO-1 運動トレーニング エネルギー制限 マイオカイン

1. 研究開始当初の背景

運動などによる身体活動量増加が動脈硬化を予防することはよく知られており(*Circulation* 2003; *Arter Thromb Vasc Biol* 2001)、その理由の一つに、運動による血中 HDL コレステロール(HDL-C)濃度の上昇があげられる(*Arch Intern Med* 1995)。一方、血中脂質プロファイルには関係なく、最大酸素摂取量の高い人、すなわち運動によって持久力を向上させている人では、冠動脈疾患による死亡リスクが低いことがわかっており(*N Eng J Med* 1993)、血中 HDL-C 以外の動脈硬化抑制因子の存在が強く示唆されている。我々はこれまでに、運動によって骨格筋で発現量が増加する転写共役因子 PGC-1 α が、持久力を向上させることを明らかにした(*J Biol Chem* 2003; *Am J Pathol* 2006; *Endocrinology* 2008; *PLoS ONE* 2011 & 2014 & 2015; *J Appl Physiol* 2014)。また、骨格筋からはマイオカインと呼ばれる生理活性物質が分泌される。マイオカインの一つである Irisin が骨格筋で PGC-1 α 依存的に産生されること、血中に放出された Irisin は白色脂肪組織を褐色脂肪組織に類似した性質に変化させることが報告された(*Nature* 2012)。この報告は、骨格筋における PGC-1 α の発現増加がマイオカインを介して他臓器機能に影響を及ぼすという新概念を提示しており、血管内皮に作用して動脈硬化の進展を抑制するマイオカインが存在する可能性も示唆している。以上の学術的背景より、運動によって持久力を向上させている人では血中脂質プロファイルの変化を伴わないのに冠動脈疾患による死亡リスクが低いのは、運動による骨格筋 PGC-1 α の発現増加が動脈硬化を抑制する生理活性物質(マイオカイン)の産生と分泌を促進させること、そしてこの物質が血管内皮に作用することにより動脈硬化進展を抑制しているためではないかとの「問い」に至った。

2. 研究の目的

持久運動トレーニングやエネルギー制限は動脈硬化の進展を抑制する。持久運動トレーニングは骨格筋において転写共役因子 peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) の発現量を増加させる。一方エネルギー制限は転写因子 forkhead box protein-1 (FOXO-1) の発現量を骨格筋で増加させる。近年、骨格筋からマイオカインと呼ばれる生理活性物質が分泌されることが報告され、骨格筋機能変化が多臓器機能を調節することが示唆されている。そこで、持久運動トレーニングやエネルギー制限による動脈硬化進展抑制の機序として、PGC-1 α や FOXO-1 といった転写調節因子による骨格筋機能変化を介した機序が存在するのではないかと考え、本研究では、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現や FOXO-1 過剰発現が動脈硬化進展に与える影響を、動脈硬化易発症モデルマウスである Apolipoprotein E 欠損マウス「ApoE-KO マウス」や、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs)を用いた実験系を用いて解明することに取り組んだ。

3. 研究の方法

本研究では、PGC-1 α を骨格筋特異的に過剰発現させた「筋 PGC-1 α マウス」、FOXO-1 を骨格筋特異的に過剰発現させた「筋 FOXO-1 マウス」、動脈硬化易発症モデルマウスである ApoE 欠損マウス(「ApoE KO マウス」)、「筋 PGC-1 α マウス」と「ApoE KO マウス」を交配させて得た「筋 PGC-1 α / ApoE KO マウス」、「筋 FOXO-1 マウス」と「ApoE KO マウス」を交配させて得た「筋 FOXO-1 / ApoE KO マウス」を作成し、実験に用いた。

3-1: 骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現が動脈硬化進展に与える影響

「ApoE KO マウス」および「筋 PGC-1 α / ApoE KO マウス」を 21 週齢で解剖し、心臓大動脈弁動脈硬化巣面積、動脈硬化巣中の単球接着遊走因子タンパク質発現量、血中リポタンパク質プロファイル調べた。次に、腫瘍壊死因子 α (TNF α)で処理した HUVECs に、「筋 PGC-1 α マウス」由来血清、Irisin、 β -アミノイソ酪酸 (BAIBA) を添加し、単球接着遊走因子などの動脈硬化関連因子の mRNA およびタンパク質発現量を測定した。

3-2: PGC-1 α 依存的な既知マイオカイン BAIBA による動脈硬化進展への影響

6 週齢の「ApoE KO マウス」に、BAIBA (170 mg/kg 体重)を飲水より 20 週齢まで投与し、12 時間の絶食後解剖した。心臓大動脈弁動脈硬化巣面積、動脈硬化巣中の単球接着遊走因子タンパク質発現量、血中リポタンパク質プロファイル調べた。

3-3: 骨格筋特異的な FOXO-1 過剰発現による動脈硬化進展への影響

「ApoE KO マウス」および「筋 FOXO-1 / ApoE KO マウス」を 21 週齢で解剖し、心臓大動脈弁動脈硬化巣面積、動脈硬化巣中の単球接着遊走因子タンパク質発現量、血中リポタンパク質プロファイル調べた。次に、TNF α で処理した HUVECs に、「筋 FOXO-1 マウス」由来血清を添加し、単球接着遊走因子などの動脈硬化関連因子の mRNA およびタンパク質発現量を測定した。

3-4: 骨格筋由来動脈硬化抑制候補因子の探索と動脈硬化予防作用の評価

「筋 PGC-1 α マウス」および「筋 FOXO-1 マウス」の骨格筋で発現が増加した遺伝子をマイクロ

アレイにより調べ、その中から先行研究で分泌性タンパク質として性質のある分子を選んだ。分泌タンパク質の推定は、コードアミノ酸情報より、検出された遺伝子がシグナルペプチド配列および膜貫通領域(疎水性領域・ α ヘリックス構造)を保持するか否かにより行った。さらに、それら因子の中から骨格筋から分泌される可能性があるかと報告されている分子を選び出した(*Proteins Struct Funct Genet* 2006)。このうち、タンパク質 X については pET32 にサブクローニング後、ECOS Competent 大腸菌 JM109 を用いてリコンビナントタンパク質を合成した。その後、リコンビナントタンパク質を抽出後、ニッケルカラムおよびゲルろ過カラムを用いて精製した。次に、TNF α で処理した HUVECs に、精製リコンビナントタンパク質 X を添加し、単球接着遊走因子などの動脈硬化関連因子の mRNA 発現量を測定した。

4. 研究成果

4-1: 骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現が動脈硬化進展に与える影響

持久運動トレーニングが動脈硬化進展を抑制することは疫学研究と動物実験の両面から明らかになっている。一方で持久運動トレーニングは転写共役因子 PGC-1 α の発現量を骨格筋で増加させる。骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現は、ミトコンドリア合成や脂肪酸酸化の促進、筋線維タイプの変化を介して、筋持久力の向上を引き起こす。一方、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現により、Irisin や BAIBA といったマイオカインが分泌され、白色脂肪組織の褐色化などの多臓器機能調節を引き起こす。そこで、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現が動脈硬化進展を抑制する可能性を考え、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現が動脈硬化進展を抑制するか否かを「筋 PGC-1 α / ApoE KO マウス」(「ApoE-KO マウス」の骨格筋で PGC-1 α を過剰発現させたモデルマウス)を用いて検討した。その結果、「筋 PGC-1 α / ApoE KO マウス」では、「ApoE-KO マウス」と比較して、動脈硬化巣面積が約 40% 有意に減少していた。加えて、動脈硬化巣における vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) といった動脈硬化進展に関係するタンパク質発現量も有意に減少していた。しかし、high-density lipoprotein-cholesterol や low-density lipoprotein-cholesterol といったリポタンパク質プロファイルに二群間で有意な差異はなかった。次に、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現による動脈硬化進展の抑制機序を明らかにするために、「筋 PGC-1 α マウス」の血清を TNF α と共に HUVECs に添加し、動脈硬化進展に関連する遺伝子の発現量を測定したところ、野生型マウスの血清添加と比較して HUVECs における TNF α 誘導的な炎症関連因子の発現増加は抑制された。さらに、PGC-1 α 依存的なマイオカインである Irisin や BAIBA は HUVECs において TNF α 誘導的な VCAM-1 のタンパク質発現量を有意に抑制した。以上より、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現は動脈硬化の進展を抑制し、Irisin、BAIBA は血管内皮細胞における VCAM-1 の発現を抑制することを明らかにした。

4-2: PGC-1 α 依存的な既知マイオカイン BAIBA による動脈硬化進展への影響

4-1 では、Irisin や BAIBA が動脈硬化進展を抑制する可能性を見出した。Irisin の投与は「ApoE-KO マウス」の動脈硬化進展を抑制することが報告されているが、BAIBA については報告がない。そこで、BAIBA の経口投与が「ApoE-KO マウス」の動脈硬化進展を抑制するか否かを検討した。その結果、BAIBA を投与した「ApoE-KO マウス」(「ApoE-KO + BAIBA 群」)では、対照群(「ApoE-KO 群」)に比して動脈硬化巣面積が約 30% 減少した。加えて MCP-1 の動脈硬化巣中タンパク質発現量が有意に減少していた。血中リポタンパク質プロファイルは二群間で差異は認められなかった。血中 BAIBA 濃度は、野生型マウスで検出限界以下だったが、「ApoE-KO + BAIBA 群」では 3.4 μ M まで増加した。以上より、マイオカイン BAIBA の経口投与は動脈硬化進展を抑制することを明らかにした。

4-3: 骨格筋特異的な FOXO-1 過剰発現による動脈硬化進展への影響

エネルギー制限は動脈硬化進展を抑制することが疫学研究や動物実験より明らかになっている。FOXO-1 はエネルギー制限により骨格筋での発現が増加し、筋蛋白質分解や、リポタンパクリパーゼの発現増加を介してエネルギー恒常性維持を担う。4-1 では骨格筋 PGC-1 α による抗動脈硬化作用を明らかにしていることから、骨格筋特異的な FOXO-1 過剰発現でも同様に動脈硬化進展抑制が起こるのではないかと考えた。そこで、エネルギー制限による動脈硬化進展の抑制機序を骨格筋 FOXO-1 に着目して検討することとした。その結果、「筋 FOXO-1 / ApoE KO マウス」では、「ApoE-KO マウス」に比して動脈硬化巣面積がおよそ 65% 減少していた。加えて「筋 FOXO-1 / ApoE KO マウス」の動脈硬化巣では VCAM-1 と Mac-2 (マクロファージのマーカー) の動脈硬化巣中タンパク質発現量が有意に減少していた。血中リポタンパク質プロファイルは「筋 FOXO-1 / ApoE KO マウス」マウスで改善していなかった。次に、骨格筋特異的な FOXO-1 過剰発現による動脈硬化進展の抑制機序を明らかにするために、「筋 FOXO-1 マウス」の血清を TNF α と共に HUVECs に添加し、動脈硬化進展に関連する遺伝子の発現量を測定した。野生型マウスの血清添加と比較して「筋 FOXO-1 マウス」の血清添加では、HUVECs における TNF α 誘導的な VCAM-1、MCP-1 の発現増加は抑制され、TNF α 誘導的な eNOS の発現低下は改善されていた。以上より、骨格筋特異的な FOXO-1 過剰発現は動脈硬化進展を抑制し、その機序として、FOXO-

1 依存的なマイオカインが血管内皮細胞における動脈硬化関連因子の遺伝子発現量を抑制する可能性が示唆された。

4-4：骨格筋由来動脈硬化抑制候補因子の探索と動脈硬化予防作用の評価

骨格筋特異的な PGC-1 α および FOXO-1 の過剰発現により骨格筋から分泌される新規マイオカイン候補(以下、「候補因子」)の探索と、その候補因子が HUVEC における動脈硬化関連遺伝子の発現変化に与える影響を検討した。その結果、候補因子として 16 種類のタンパク質が該当し、そのうち抗炎症作用や抗酸化作用をもち、心臓を保護するはたらきをもつことが報告されているタンパク質 X を選択した。X 遺伝子発現量は野生型と比較して PGC-1 α マウスの骨格筋で有意に増加していた。組み換え X タンパク質を HUVEC に添加することにより、TNF α 誘導性の VCAM-1、ICAM-1 の遺伝子発現量が減少した。以上の結果より、X の遺伝子発現量は骨格筋での PGC-1 α 過剰発現に伴い増加したことから、骨格筋特異的な PGC-1 α 過剰発現による動脈硬化進展抑制機序には X が関与する可能性が考えられた。X は HUVEC において VCAM-1、ICAM-1 遺伝子発現量を抑制したことから、単球の血管内皮細胞への接着を抑制することで動脈硬化の進展を抑制する可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimba Yuki, Senda Rena, Katayama Keigo, Morita Akihito, Ikeda Masahiko, Kamei Yasutomi, Miura Shinji	4. 巻 540
2. 論文標題 Skeletal muscle-specific forkhead box protein-01 overexpression suppresses atherosclerosis progression in apolipoprotein E-knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 61 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimba Yuki, Katayama Keigo, Miyoshi Noriyuki, Ikeda Masahiko, Morita Akihito, Miura Shinji	4. 巻 43
2. 論文標題 -Aminoisobutyric Acid Suppresses Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1016 ~ 1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimba, Y., Togawa, H., Senoo, N., Ikeda, M., Miyoshi, N., Morita, A., and Miura, S.	4. 巻 9
2. 論文標題 Skeletal muscle-specific PGC-1 overexpression suppresses atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40643-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 三浦進司、榛葉有希、池田雅彦
2. 発表標題 動脈硬化性疾患を運動が抑制する新規メカニズム～骨格筋でのPGC-1 の発現増加が動脈硬化の進展を抑制する～
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山桂吾、榛葉有希、妹尾奈波、池田雅彦、守田昭仁、三浦進司
2. 発表標題 運動が動脈硬化性疾患を抑制する新規メカニズム～BAIBAの関与～
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会中部支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榛葉有希、片山桂吾、妹尾奈波、十河華子、池田雅彦、三好規之、大橋典男、守田昭仁、三浦進司
2. 発表標題 持久運動トレーニングによる動脈硬化抑制機序の解明とマイオカインBAIBAの関与
3. 学会等名 第8回食品薬学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山桂吾、榛葉有希、妹尾奈波、池田雅彦、守田昭仁、三浦進司
2. 発表標題 骨格筋特異的PGC-1 過剰発現による動脈硬化進展の抑制
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miura, S.
2. 発表標題 The novel mechanism for exercise training induced prevention of atherosclerosis.
3. 学会等名 The 4th International Conference on Pharma and Food (ICPF2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimba, Y., Togawa, H., Senoo, N., Ikeda, M., Miyoshi, N., Morita, A., and Miura, S.
2. 発表標題 Skeletal Muscle-specific PGC-1 Overexpression Prevents Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice.
3. 学会等名 18th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 V C A M - 1 発現抑制剤、M C P - 1 発現抑制剤、炎症性疾患改善用組成物、加工食品又は飲料	発明者 三浦進司、守田昭仁、榛葉有希、山本俊佑、加藤重城	権利者 静岡県公立大学法人、プリマハム(株)
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-013063	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

筋線維特性変化が疾病発症におよぼす影響 http://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/nutrbioc/index3.html/ResearchTheme3.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------