

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19541

研究課題名(和文)新規骨格筋由来分泌因子の同定と心血管病における役割の解明

研究課題名(英文)Role of the novel myokine in cardiovascular disease

研究代表者

大内 乗有(Ouchi, Noriyuki)

名古屋大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：00595514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス持久性運動(トレッドミル運動)モデルを用いて、運動により発現変化を示す遺伝子群の中で、運動誘発性の骨格筋由来分泌因子「マイオカイン」をスクリーニングした結果、Netrin(Ntn)ファミリーメンバーであるNtn5を運動誘発性のマイオカインとして見出した。マウス下肢虚血モデルにおいて、アデノウイルスベクター発現系によるNtn5の骨格筋へ過剰発現は血管新生を促進していた。従って、Ntn5は血管新生を促進する持久性運動誘発性マイオカインであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、持久性運動により誘発され、血管新生を促進する新たな骨格筋由来分泌因子「マイオカイン」が明らかとなった。本研究は血管新生の病態解明につながる可能性があり学術的意義は高いと考えられる。また、このマイオカインは運動による心血管保護作用にも関わり、運動すれば何故体にいいのか?という疑問に対する解決の糸口になり得る可能性があり、さらなる研究の発展も期待され、社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that the Netrin (Ntn) family member/Ntn5 acts as an exercise-inducible muscle-derived secretory factor “myokine” in mice after screening of novel myokines which are upregulated in skeletal muscle by treadmill exercise training. Intramuscular injection of adenoviral vectors expressing Ntn5 significantly enhanced blood flow recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. Thus, Ntn5 may be a pro-angiogenic myokine induced by endurance exercise.

研究分野：血管生物学

キーワード：心血管病 運動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において、肥満を基盤としたメタボリックシンドロームやその終末像である動脈硬化や虚血性心疾患などの心血管病を含む生活習慣病対策は重要な健康課題であり、生活習慣病の発症予防と重症化予防の徹底は厚生労働省の「健康日本 21」に健康政策としても掲げられている。運動療法は、一般的に推奨されているジョギングやウォーキングを主体とした I 型骨格筋の線維数増加を伴う持久性運動と II 型骨格筋の筋肥大を伴うレジスタンス運動に分類できる。これら運動療法は、肥満を基盤とした代謝異常や心血管病をはじめとした多くの疾患の予防と治療に対して有効性が示されているが、その分子機序については十分には明らかにされていない。

骨格筋は運動機能やエネルギー代謝調節において重要な役割を果たしていることが知られている。近年の研究成果によると、骨格筋は「マイオカイン(Myokine)」と総称すべき液性因子を産生する内分泌臓器としての役割を果たし、マイオカインが近傍あるいは遠隔臓器に影響を与え、代謝系や心血管系を制御していることが明らかになってきた。代謝性疾患や心血管疾患に関わるマイオカインがいくつか同定されているが、マイオカインを介した運動療法による生活習慣病改善機序については十分には解明されておらず、未知のマイオカインを介した筋肉と他の臓器間での相互作用の存在が示唆されている。特に、持久性運動により制御を受けて心血管疾患に直接影響するマイオカインについての報告は少ない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、持久性運動により制御される機能未知のマイオカインを同定し、マイオカインの心血管疾患における生理病態学的意義を解析することにより、運動療法による心血管系保護作用の機序解明のみならず、心血管病をはじめとする生活習慣病の疾患制御機構の解明と創薬を含む予防・治療戦略の開発につなげることである。

### 3. 研究の方法

#### (1)マイオカインのスクリーニング

マウス持久性運動モデルの作成：野生型マウス(C57BL/6)に対してトレッドミル運動負荷(22 cm/秒のスピード、4度の傾斜)を4週間(1時間を週に5回)施行した。

発現遺伝子プロファイルの解析：運動群と非運動群のヒラメ筋における発現遺伝子プロファイルをマイクロアレイ(SurePrint G3 Mouse Gene Expression, Agilent Technologies Inc. CA. USA)解析にて比較検討し、発現増加を示す遺伝子を選び出した。定量的PCRにて遺伝子の発現変化を確認した。

分泌因子の予測：シグナルペプチド(SignalP4.0プログラム)を持つと予想され、膜貫通ドメイン(TMHMM2.0プログラム)を有しないと予想される遺伝子を分泌蛋白と想定した。

以上のスクリーニングの結果、Netrin(Ntn)ファミリーメンバーであるNtn5を運動誘発性のマイオカインとして着目した。

臓器分布の検討：野生型マウス(C57BL/6)の主要臓器のcDNAを用いて、定量的PCRにてNtn5の臓器分布を解析した。

## (2)Ntn5 の血管新生に対する作用の評価

マウス下肢虚血モデルの作成：野生型マウス(C57BL/6)の大腿動脈を結紮、除去することにより作成した。手術前、手術後、3日、7日、14日後にレーザードップラー法にて血流(LDBF)を解析した。虚血下肢の血流は虚血(Ischemic)と非虚血(Normal)の血流比にて評価した。アデノウイルス発現系を用いて、Ntn5ベクターと対照ベクターを野生型マウスの内転筋に注射し、Ntn5を過剰発現させてNtn5の虚血状態における血管新生に対する効果を評価した。また、Ntn5欠損マウスと対照マウスに対して下肢虚血モデルを作成した。

## 4. 研究成果

### (1) Ntn5 は運動誘発性マイオカインである。

マウス持続性運動モデルであるトレッドミル運動群と非運動群でのヒラメ筋での発現遺伝子をマイクロアレイ法を用いて比較検討し、運動群のヒラメ筋で発現増加を示し、バイオインフォマティクス手法(SignalP4.0プログラムとTMHMM2.0プログラム)にて分泌因子であると予測される分子をスクリーニングした。スクリーニングの結果、Netrin(Ntn)ファミリーメンバーであるNtn5に着目した。運動群のヒラメ筋でのNtn5の発現は非運動群と比較して有意に増加していた(図1A)。また、持続性運動で増加することが報告されているPGC-1の発現も運動群のヒラメ筋で上昇していた(図1B)。次に、マウスの主要臓器におけるNtn5の発現を解析した。Ntn5は持続性運動に関連しているI型骨格筋が主であるヒラメ筋(Soleus)に高発現を示し、以前に発現が報告されている脳(brain)と同程度に多く発現していた(図2)。従って、Ntn5は持続性運動によって誘導され、骨格筋に高発現を示すマイオカインであると示唆された。

### (2) Ntn5 は血管新生を促進する。

Ntn familyは分泌型(Ntn1、Ntn5など)と膜結合型が存在しており、神経の軸索誘導因子として同定された。神経以外での役割も明らかになってきており、特にNtn1は血管内皮細胞に対する作用や、動脈硬化や糖尿病におけるマクロファージの炎症応答にも関与することが報告されている。一方で、Ntn5については神経細胞での発現と中枢神経系の発生に関与することが報告されているが、機能解析についての報告はない。

Ntn5が内皮機能に影響するかを検討するためにマウス下肢虚血モデルにおけるNtn5の血流に対する作用を解析した。アデノウイルス発現系を用いて、Ntn5を野生型マウスの骨格筋に過剰発現させ、下肢虚血モデルを作成した。Ntn5ベクターの投与は対照ベクターと比べて、手術後7日目と14日目において下肢血流を有意に増加させた(図3)。一方、Ntn5欠損マウスと対照マウスに対して下肢虚血モデルを作成したところ、Ntn5欠損マウスは対照マウスと比べて、下肢血流の回復に有意な差を認めなかった。従って、過剰発現系においてNtn5は血管新生を促進する可能性が考えられた。以上より、Ntn5は内皮機能を調節する運動誘発性マイオカインであると示唆された。また、Ntn5は血管病の予防法において標的分子になりうる可能性があるだけでなく、運動における血管保護作用にも関与する可能性が示唆された。

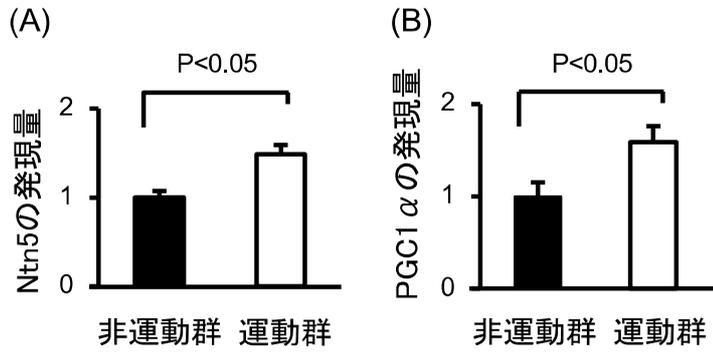
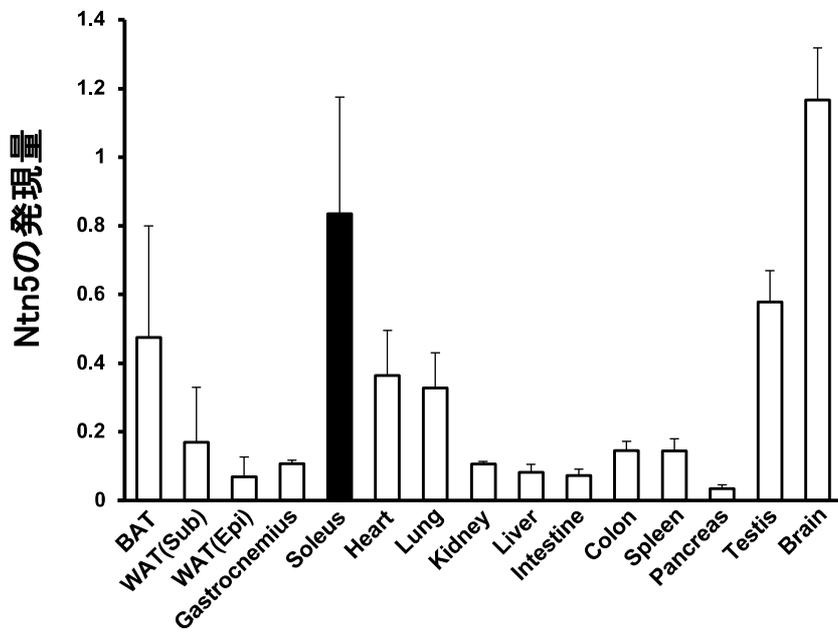


図1. 運動によるヒラメ筋 (Soleus)における遺伝子発現変化



BAT, brown adipose tissue; WAT, white adipose tissue; Sub, subcutaneous; Epi, epididymal.

図2. Ntn5のマウスでの組織分布

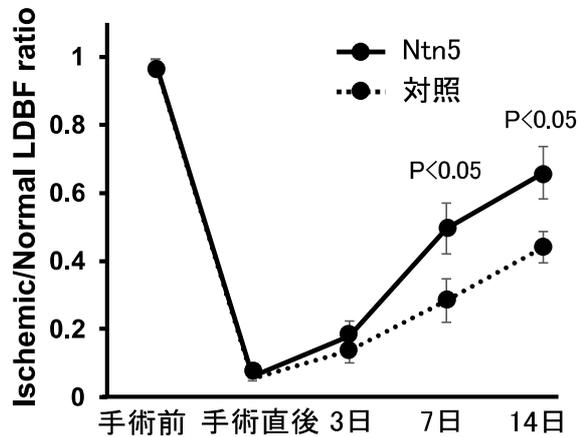


図3. Ntn5による下肢血流増加作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawanishi H, Ohashi K, Ogawa H, Otaka N, Takikawa T, Fang L, Ozaki Y, Takefuji M, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 15
2. 論文標題 A novel selective PPAR modulator, pemafibrate promotes ischemia-induced revascularization through the eNOS-dependent mechanisms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0235362
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0235362.	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 -

1. 著者名 Yamaguchi S, Shibata R, Ohashi K, Enomoto T, Ogawa H, Otaka N, Hiramatsu-Ito M, Masutomi T, Kawanishi H, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 11
2. 論文標題 C1q/TNF-Related Protein 9 Promotes Revascularization in Response to Ischemia via an eNOS-Dependent Manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2020.01313.	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 -

1. 著者名 Takikawa T, Ohashi K, Ogawa H, Otaka N, Kawanishi H, Fang L, Ozaki Y, Eguchi S, Tatsumi M, Takefuji M, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Adipolin/C1q/Tnf-related protein 12 prevents adverse cardiac remodeling after myocardial infarction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0243483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0243483.	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 -

1. 著者名 Aikawa T, Shimada K, Miyauchi K, Miyazaki T, Sai E, Ouchi S, Kadoguchi T, Kunimoto M, Joki Y, Dohi T, Okazaki S, Isoda K, Ohashi K, Murohara T, Ouchi N, Daida H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Associations among circulating levels of follistatin-like 1, clinical parameters, and cardiovascular events in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0216297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0216297.	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 -

1. 著者名 Eguchi S, Takefuji M, Sakaguchi T, Ishihama S, Mori Y, Tsuda T, Takikawa T, Yoshida T, Ohashi K, Shimizu Y, Hayashida R, Kondo K, Bando YK, Ouchi N, Murohara T.	4. 巻 294
2. 論文標題 Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 11665-11674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007537.	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 Hara A, Kobayashi H, Asai N, Saito S, Higuchi T, Kato K, Okumura T, Bando YK, Takefuji M, Mizutani Y, Miyai Y, Saito S, Maruyama S, Maeda K, Ouchi N, Nagasaka A, Miyata T, Mii S, Kioka N, Worthley DL, Murohara T, Takahashi M, Enomoto A.	4. 巻 125
2. 論文標題 Roles of the Mesenchymal Stromal/Stem Cell Marker Mefflin in Cardiac Tissue Repair and the Development of Diastolic Dysfunction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ Res.	6. 最初と最後の頁 414-430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.119.314806.	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 Sakaguchi T, Takefuji M, Wettschureck N, Hamaguchi T, Amano M, Kato K, Tsuda T, Eguchi S, Ishihama S, Mori Y, Yura Y, Yoshida T, Unno K, Okumura T, Ishii H, Shimizu Y, Bando YK, Ohashi K, Ouchi N, Enomoto A, Offermanns S, Kaibuchi K, Murohara T.	4. 巻 140
2. 論文標題 Protein Kinase N Promotes Stress-Induced Cardiac Dysfunction Through Phosphorylation of Myocardin-Related Transcription Factor A and Disruption of Its Interaction With Actin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation.	6. 最初と最後の頁 1737-1752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041019.	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 Ogawa H, Ohashi K, Ito M, Shibata R, Kanemura N, Yuasa D, Kambara T, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Otaka N, Kawanishi H, Yamaguchi S, Enomoto T, Abe T, Kaneko M, Takefuji M, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 116
2. 論文標題 Adipolin/CTRP12 protects against pathological vascular remodeling through suppression of smooth muscle cell growth and macrophage inflammatory response.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovasc Res.	6. 最初と最後の頁 237-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvz074.	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 Otaka N, Shibata R, Ohashi K, Uemura Y, Kambara T, Enomoto T, Ogawa H, Ito M, Kawanishi H, Maruyama S, Joki Y, Fujikawa Y, Narita S, Unno K, Kawamoto Y, Murate T, Murohara T, Ouchi N.	4. 巻 123
2. 論文標題 Myonectin is an exercise-induced myokine that protects the heart from ischemia-reperfusion injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ Res.	6. 最初と最後の頁 1326-1338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.118.313777.	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Koji Ohashi, Noriyuki Ouchi, Hayato Ogawa, Toyooki Murohara
2. 発表標題 Role of a novel anti-inflammatory adipokine adipolin in cardiovascular and metabolic regulation.
3. 学会等名 第84回日本循環器学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大内乗有 大橋浩二 室原豊明
2. 発表標題 抗炎症性アディポサイトカイン「アディポリン」と心血管病
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大内乗有 大橋浩二 室原豊明
2. 発表標題 運動誘発性マイオカイン「マイオネクチン」の虚血性心疾患における役割
3. 学会等名 第26回日本心臓リハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomonobu Takikawa, Koji Ohashi, Lixin Fang, Hiroshi Kawanishi, Naoya Otaka, Hayato Ogawa, Toyoaki Murohara, Noriyuki Ouchi
2. 発表標題 Adipolin/C1q/Tnf-related protein 12 attenuates adverse cardiac remodeling in a mouse model of myocardial infarction.
3. 学会等名 ESC Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大内乗有 大高直也 室原豊明
2. 発表標題 運動誘発性マイオカイン「マイオネクチン」の虚血性心疾患における役割
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大内乗有、大橋浩二、室原豊明
2. 発表標題 アディポサイトカイン「アディポリン」の心血管病における役割
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内乗有
2. 発表標題 Role of the adiponectin paralogs C1q/TNF-related proteins in cardiovascular disease.
3. 学会等名 6th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism (SICEM 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内乗有
2. 発表標題 Role of the novel adipokine in cardiovascular disease.
3. 学会等名 International Academy of Cardiology, Annual Scientific Sessions 2018, 23rd World Congress on Heart Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	大橋 浩二 (Ohashi Koji)  (10595515)	名古屋大学・医学系研究科・特任准教授  (13901)	
研究分担者	柴田 玲 (Shibata Rei)  (70343689)	名古屋大学・医学系研究科・特任教授  (13901)	

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
---------	---------