

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20890170
 研究課題名（和文）
 骨格筋由来分泌因子による慢性心不全の新しい治療戦略
 研究課題名（英文）
 Identification and characterization of novel muscle-derived cardio protective factors
 研究代表者
 泉家 康宏（IZUMIYA YASUHIRO）
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
 研究者番号：10515414

研究成果の概要（和文）：

骨格筋発育に伴い分泌が増加する因子を網羅的に解析した。候補遺伝子のうち Fibroblast growth factor-21 (FGF-21)や Follistatin-like 1 (Fstl-1)の発現が骨格筋細胞において増加し、培養細胞やマウスモデルにおいて血管新生作用や心保護作用を有することを発見した。以上の結果から FGF-21 や Fstl-1 は骨格筋より分泌される心血管保護因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We screened to identify novel muscle-derived factors that act on cardiovascular systems. We found that fibroblast growth factor-21 (FGF-21) and follistatin-like 1 (Fstl1) are a novel myokine that confers cardiovascular protection. Increasing in skeletal muscle mass, such as resistance training exercise, could be a useful treatment for cardiovascular diseases through production of cardiovascular protective myokines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

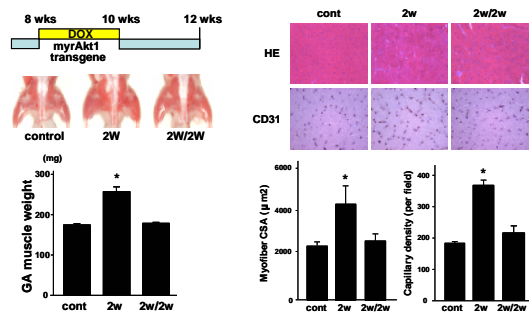
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：骨格筋、心血管保護、分泌因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性心不全では進行性の骨格筋萎縮が高頻度に発生し、これが死亡の独立した予測因子であることが明らかにされている。一方、慢性心不全患者において運動トレーニングは自覚症状、運動耐容能や骨格筋萎縮を改善するのみならず左室収縮能も改善することが報告されているが、そのメカニズムについてはほとんどわかっていない。

(2) 近年、骨格筋において運動トレーニングによる筋肥大効果が、トレーニングを施していない他の筋に対しても影響を及ぼすことが報告されている。さらに最近申請者らは骨格筋細胞の肥大が肝臓や脂肪組織に影響を及ぼし、高カロリー食により惹起されたメタボリックシンドローム様の代謝異常を改善することを報告した。



同様の骨格筋からの”パラクライン効果”が心臓に対しても生じていることを証明することができれば、運動トレーニングによる慢性心不全の予後改善効果に関する新たな機序を提供するものとなりうる。

2. 研究の目的

骨格筋由来の分泌因子を同定するためにマウスモデルの骨格筋での遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。その中で分泌タンパクに焦点を絞り、慢性心不全に伴う骨格筋萎縮

で発現が減少している因子を補充する、あるいは発現が亢進している因子を阻害することで心機能に対しどのような影響があるかを検討し、新たな心不全治療薬のターゲットを探索する。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋由来の新規分泌因子の探索、同定: 慢性心不全に伴う骨格筋萎縮モデルとして心筋梗塞後心不全モデルマウスの骨格筋における遺伝子発現を、また骨格筋肥大モデルとして Akt1 遺伝子過剰発現マウスの骨格筋における遺伝子発現をそれぞれのコントロールマウスの骨格筋サンプルとともにジーンチップにて網羅的に解析する。心不全モデルマウスの骨格筋で発現が低下し、骨格筋肥大モデルマウスで発現が亢進していた遺伝子の中から新規分泌因子の候補を同定する。

(2) 培養心筋細胞を用いた実験系における新規分泌因子の機能解析: 心筋細胞に候補分泌因子の組み換えタンパクを加え、心肥大、ストレス刺激に対する生存能(バイアピリティ)に及ぼす影響を検討し、さらにそのメカニズムを解明する。

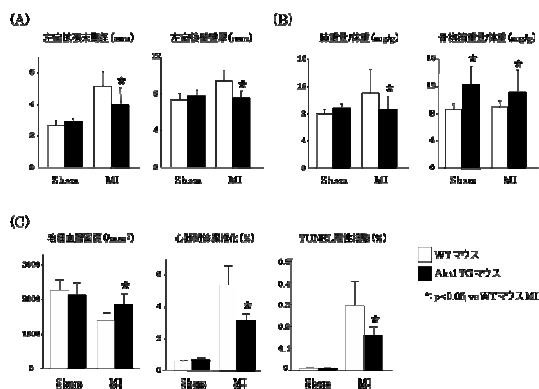
(3) 骨格筋特異的トランスジェニックマウス、ノックアウトマウスの作製: 上記のスクリーニングにて心筋細胞に対して作用することが確認された候補分泌因子の生体における gain-of function のモデルとして、Tet-on システムを利用した骨格筋特異的誘導型トランスジェニックマウスを、loss-of function のモデルとして、Cre-LoxP システムを利用した骨格筋特異的ノックアウトマウスを作製し、圧負荷

による心肥大・心不全モデル、冠動脈結紮による心筋梗塞モデルなどの病態モデルにおける役割を検討する。

- (4) 病態モデルにおける新規分泌因子の発現プロファイリング: 候補分泌因子に対するペプチド抗体および ELISA システムを確立し、発現プロファイルやマウス病態モデルにおける発現の変化、血中濃度の推移について検討する。さらに、ヒトに対する抗体も同時に作製しヒトの各種心疾患における血中濃度の変化をモニターする。

4. 研究成果

(1) 骨格筋量の増大の心筋梗塞後のリモデリングに与える影響の検討: 心筋梗塞モデル作製後 2 日目に行った心エコーでは、心筋梗塞領域は WT マウスと TG マウスで同程度であった。経過中の死亡率に両群で有意差を認めなかった。しかしながら 2 週間後の心エコーでは左室内腔の拡大や健常部位の壁肥厚は TG マウスで有意に抑制された。2 週間経過後に TG マウスでは骨格筋重量の有意な増加が確認された。また肺重量も TG マウス群で有意に抑制され肺うっ血の軽減が示唆された。組織学的検討にて TG マウスでは梗塞境界領域の毛細血管密度の増加、非梗塞領域での心筋間質の線維化と心筋細胞のアポトーシスの抑制が認められた。以上のデータから Akt1 過剰発現による骨格筋の肥大は遠隔臓器である心筋のリモデリングを制御する可能性が示唆された。



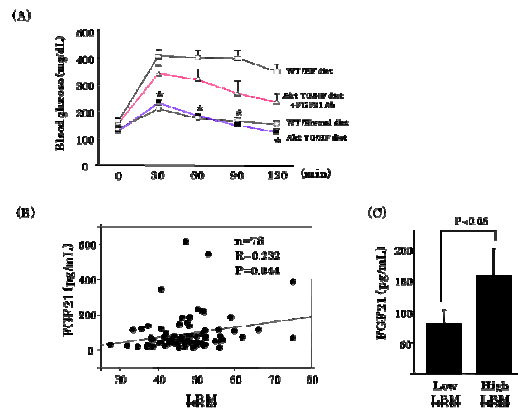
(2) 骨格筋由来の新規分泌因子候補の検索: マイクロアレイによるスクリーニングの結果いくつかの新規代謝調節因子の候補をリストアップすることができた。候補遺伝子のひとつ Follistatin like-1 (Fstl-1) のタンパク発現は Akt1 遺伝子の活性化により骨格筋で著明に増加し、それに伴い血中濃度も有意な増加を認めた。アデノウイルスベクターを用いて Fstl-1 を培養血管内皮細胞で過剰発現すると、血管内皮細胞の遊走・分化を促進し、血清除去によるアポトーシスを著明に抑制した。これら Fstl-1 の血管内皮細胞保護効果は PI3-kinase 阻害薬・優勢抑制型 Akt1 の過剰発現および NO 合成阻害薬によりブロックされた。同様にアデノウイルスベクターを用いて Fstl-1 を培養心筋細胞で過剰発現すると、低酸素・再酸素化刺激や doxycyclin による細胞傷害を著明に抑制した。

また近年代謝調節因子として注目されている FGF-21 も骨格筋肥大に伴い発現が亢進することが確認された。培養心筋細胞に対する FGF-21 の作用を検討したところ、FGF-21 のシグナル伝達のコファクターと考えられている Klotho は心筋細胞や内皮細胞では発現が認められなかったが、FGF-21 刺激は Klotho 非依存的に心筋細胞で ERK, Akt シグナルを活性化することが明らかになった。またアデノウイルスベクターを用いて FGF-21 を

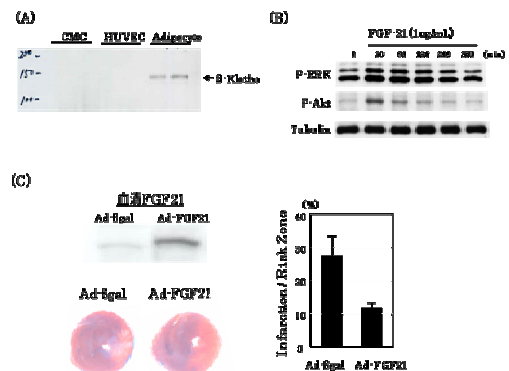
培養心筋細胞で過剰発現すると、低酸素・再酸素化刺激や doxycyclin による細胞傷害を著明に抑制したことから、FGF-21 はこれらシグナルの活性化を介して低酸素刺激によるアポトーシスの抑制に寄与している可能性が示唆された。

(3) In vivo における新規分泌因子候補の機能解析: 下肢虚血手術を施行したマウスの骨格筋にアデノウイルスベクターを用いて Fstl-1 を遺伝子導入することにより、骨格筋での Akt と eNOS の活性化を認め、レーザー Doppler での血流改善及び組織学的に CD31 陽性細胞の増加を認めた。さらに Fstl-1 による血流改善効果は eNOS ノックアウトマウスでは認められなかったことから、Fstl-1 の血管内皮細胞に対する作用は Akt-eNOS 経路を介していることが示唆された。アデノウイルスベクターを経静脈的に投与し Fstl-1 を過剰発現させると、心筋虚血/再灌流による梗塞領域や心筋細胞のアポトーシスを著明に抑制した。

FGF-21 に対する中和抗体を骨格筋特異的 Akt1 過剰発現マウスに投与すると、骨格筋肥大に伴う体重・脂肪量の減少効果が有意に減弱した。高蔗糖/高脂肪食負荷 14 週間後にグルコース負荷試験を行ったところ、負荷後の血糖値の低下は中和抗体投与群で有意に増悪した。骨格筋特異的 Akt1 過剰発現マウスのメタボリックパラメーター改善効果が中和抗体にてブロックされたことから、FGF-21 は骨格筋肥大に伴い発現・分泌が亢進する機能性の内因性代謝調節因子であることが示唆された。



また臨床サンプルを用いて FGF-21 の血中濃度の検討を行ったところ、FGF-21 の血中濃度は Lean body Mass(除脂肪体重)と有意な相関があることが明らかとなった。アデノウイルスベクターを経静脈的に投与し FGF-21 を過剰発現させると、心筋虚血/再灌流による梗塞領域や心筋細胞のアポトーシスを著明に抑制した。



以上の結果から FGF-21 は骨格筋より分泌される心血管保護因子である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 5 件)

1. Wilson RM, De Silva DS, Sato K, Izumiya Y, Sam F. Effects of Fixed-Dose

Isosorbide Dinitrate/Hydralazine on Diastolic Function and Exercise Capacity in Hypertension-Induced Diastolic Heart Failure. Hypertension. 2009 Sep;54(3):583-90. 査読あり.

2. Peter AK, Ko CY, Kim MH, Hsu N, Ouchi N, Rhie S, Izumiya Y, Zeng L, Walsh K, Crosbie RH. Myogenic Akt signaling upregulates the utrophin-glycoprotein complex and promotes sarcolemma stability in muscular dystrophy. Hum Mol Genet. 2009;18(2):318-327. 査読あり.
3. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitonov A, Walsh K. FGF21 is an Akt-regulated myokine. FEBS Lett. 2008;582(27):3805-3810. 査読あり.
4. Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, Higuchi A, Ikegami C, Izumiya Y, Walsh K. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric oxide synthesis-dependent mechanism. J Biol Chem. 2008;283(47):32802-11. 査読あり.
5. Oshima Y, Ouchi N, Sato K, Izumiya Y, Pimentel DR, Walsh K. Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. Circulation. 2008;117:3099-108. 査読あり.

[学会発表](計 3 件)

1. 泉家康宏
Coronary Plaque is Stabilized by Daily Use of Oral Nicorandil Independent of Statin-use in Patients with Stable Angina

Pectoris.

第 74 回 日本循環器学会総会・学術集会.
2010 年 3 月 7 日. 国立京都国際会館

2. 泉家康宏

FGF-21 is an Akt1-Regulated Skeletal Muscle-Derived Factor.

第 73 回 日本循環器学会総会・学術集会.
2009 年 3 月 22 日. 大阪国際会議場

3. 泉家康宏

Akt1-Mediated Skeletal Muscle Growth Leads to the Secretion of Cardiovascular Protective Cytokines.

第 73 回 日本循環器学会総会・学術集会.
2009 年 3 月 21 日. 大阪国際会議場

[図書](計 1 件)

1. 泉家康宏

中外医学社

Annual Review 2010 循環器

骨格筋由来液性因子による代謝制御

2010, 29-36.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

泉家 康宏 (IZUMIYA YASUHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号 : 10515414