

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293186

研究課題名(和文) 骨格筋由来分泌因子を用いた新規心不全治療法の開発とその臨床応用研究

研究課題名(英文) Identification of cardio protective factors secreted from growing skeletal muscle

研究代表者

小川 久雄(Ogawa, Hisao)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：50177135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は様々な臓器保護作用を有するタンパク質を分泌することが明らかとなってきた。私たちは骨格筋肥大に伴い発現が増加する遺伝子をプロテオミクス解析し、いくつかのタンパクが筋肉肥大に伴い分泌が亢進することを見出した。それらの中には血管新生作用を有するものや、慢性心不全の重症度や生命予後のバイオマーカーになる可能性があることが明らかとなった。また、骨格筋からはタンパク質だけでなくマイクロRNAと呼ばれる遺伝子発現の調節に重要な役割を果たす物質が分泌されることが明らかとなってきた。私たちは骨格筋肥大に伴い増加するマイクロRNAも探索し、いくつかの骨格筋由来マイクロRNA候補を同定した。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that skeletal muscle is not only a motor organ but also endocrine organ that secretes various cardio-renal protective factors. We demonstrated that skeletal muscle growth reduces renal damage in a mouse model of obstructive kidney disease. This improvement appears to be mediated by an increase in eNOS signaling in the kidney. Base on proteomic approach, we identified that several factors are secreted from growing skeletal muscle. We found that the Factor-1 served as a muscle-derived angiogenic factor, and Factor 2 and 3 could be a biomarker for the patients with heart failure. We also performed comprehensive analysis of muscle-derived miRNAs. We found that miR-215, miR-9, miR-96 are potential factors which secreted from growing muscle.

研究分野：循環器内科

キーワード：骨格筋 分泌因子 血管新生 腎臓病

1. 研究開始当初の背景

慢性心不全や腎不全患者では進行性の骨格筋萎縮が高頻度に発生し、死亡の独立した危険因子であることが知られており、それらの患者に対する非薬物療法の一つとしてリハビリテーションの有用性が確立されてきている。運動療法の内容に関しても従来はウォーキングやランニングを中心とした有酸素運動が推奨されてきたが、近年はそれらに加えて骨格筋量の増大を目的としたレジスタンストレーニングを行うことの有用性、安全性が報告され、運動トレーニングの重要な要素の一つとなっている。これらの運動トレーニングは運動耐容能と骨格筋萎縮を改善するのみならず予後を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不明な点が多い。

我々はこれまで心筋から分泌される液性因子、特にナトリウム利尿ペプチドファミリーの臨床病態における意義について世界に先駆けて研究を行ってきた。血管拡張作用と利尿作用を有する ANP・BNP は心筋に病的ストレスが加わるような病態で産生・分泌が亢進し、結果として心不全の重症度と相関し心筋梗塞後の予後の独立した予測因子となることなどを明らかにしてきた。現在、臨床の現場で BNP は心不全マーカーとして広く利用されているが、我々の研究成果はナトリウム利尿ペプチドファミリーのバイオマーカーとしての地位の確立に大きな貢献を果たしたと考えられる。

心筋細胞が液性因子を分泌するという概念は骨格筋細胞にも適応することが可能で、近年骨格筋は“マイオカイン”と称される様々な生理活性物質を分泌しうることが明らかになってきた。われわれはこれまで任意の時期に骨格筋肥大が誘導可能な骨格筋特異的誘導型 Akt1 遺伝子過剰発現マウス (AKT1 TG マウス) を使って骨格筋の発育、肥大が他の臓器に与える影響について研究

を行い、代謝調節因子である FGF-21、血管新生作用を有する Fstl-1、骨格筋再生を促進する InsI-6 が骨格筋より分泌されていることを報告してきた。

2. 研究の目的

“心臓は内分泌臓器である”というわれわれが提唱してきたコンセプトをさらに発展させ、骨格筋からの“パラクライン因子”の同定とそれらの心血管系への作用を解明することを目的として、以下の3つの研究を並行して行った。

- A 腎臓病モデルマウスにおける骨格筋量増加の影響についての検討
- B 骨格筋由来分泌因子のプロテオミクスによる網羅的検索
- C 骨格筋由来の miRNA の網羅的解析

3. 研究の方法

A 腎臓病モデルマウスにおける骨格筋量増加の影響についての検討：腎障害モデルとして片側尿管結紮モデル(UUO)とシスプラチンによる薬剤性腎障害モデルを作成した。骨格筋肥大を1週間誘導した後これらの腎障害モデルを作成し、筋肥大の腎障害に与える影響について比較検討した。

B プロテオミクス解析による骨格筋由来分泌因子の網羅的検索：骨格筋特異的誘導型 Akt1 遺伝子過剰発現マウスの筋肉サンプルをマイクロアレイと iTRAQ 法にて網羅的に解析し、新規骨格筋由来分泌タンパクをスクリーニングした。Akt1 により発現が亢進していた遺伝子のうち、分泌シグナルを有するものでかつ細胞膜貫通ドメインを持たないものを、骨格筋由来分泌因子の候補としてリストアップした。

C 骨格筋由来マイクロ RNA(miRNA)の網羅的解析：Akt1 を2週間過剰発現した後の骨格筋および血清から miRNA を抽出し、PCR array を用いて miRNA 発現をコントロール

マウスと網羅的に比較検討した。さらに Exosome isolation kit を用いて血清からエクソソーム分画の抽出を行い、その後エクソソーム由来の miRNA を抽出した。骨格筋と血清とともに発現が亢進していたものを骨格筋組織由来分泌型 miRNA 候補とした。また培養骨格筋細胞 (L6 myoblast) を使用し、細胞培地中のエクソソームを回収し、エクソソーム由来の miRNA を抽出した。

4. 研究成果

A 腎臓病モデルマウスにおける骨格筋量増加の影響についての検討

野生型マウスおよび AKT1 TG マウス両群で腎臓組織の PAS 染色を行い、半定量的スコアリングを行ったところ、AKT1 TG マウス結紮腎における尿細管障害の程度は野生型マウスと比較して有意に軽減していた。UUO による結紮腎の線維化も野生型マウスと比較して AKT1 TG マウスで有意に抑制されていた。腎臓組織をウエスタンブロットと定量的リアルタイム PCR で評価したところ、UUO により惹起される線維化関連遺伝子の発現上昇が AKT1 TG マウスでは有意に減弱していることが確認された。

次に腎機能低下を誘導するモデルとしてシスプラチン腎症モデルを作製した。野生型マウスではシスプラチンの投与により著明な BUN の上昇を認めしたが、AKT1 TG マウスではこの上昇が有意に抑制されていた。さらに、クレアチンクリアランスは野生型マウスと比較し、AKT1 TG マウスで保たれる傾向が確認された。

我々は、UUO 手術を行った野生型マウスおよび AKT1 TG マウスの骨格筋を用いてサイトカインアレイを行い、発現の変化を網羅的に解析した。その結果、多くのサイトカイン発現が野生型マウスと比較し AKT1 TG マウス骨格筋で有意に上昇していることが確認された。増加したサイトカインに

は腎臓保護的に作用するもの(IL-2 や IL-10 など)のみならず、腎疾患に負に作用する可能性のあるもの(TNF- など)も含まれていた。心臓や腎臓に保護的に作用することが知られている新規骨格筋由来液性因子である follistatin like-1(Fstl-1)は UUO7 日後の骨格筋で AKT1 TG マウスで野生型マウスと比較して有意な上昇を認めた。

AKT1 TG マウス結紮腎において血管新生シグナルのひとつである eNOS のセリン 1177 のリン酸化による活性化が有意に亢進していることが明らかとなった。腎臓での eNOS 活性化が UUO による腎障害の抑制に直接的に関与しているかを検討するため、野生型マウスと AKT1 TG マウスに NOS 阻害薬である L-NAME (1mg/ml) を 2 週間飲水投与し、投与開始の 7 日目に UUO 手術を行った。UUO7 日後の腎臓における線維化関連遺伝子、炎症関連遺伝子の mRNA 発現評価では、骨格筋での Akt1 過剰発現による腎保護効果が L-NAME の投与により消失していた。これらの結果から Akt1 による骨格筋量増加の腎保護作用は Fstl-1 などの eNOS の活性化作用を有する分泌因子による NO 産生を介している可能性が示唆された(発表論文 4)。

B プロテオミクス解析による骨格筋由来分泌因子の網羅的検索

我々はマイクロアレイ及び iTRAQ 法を用いて新規骨格筋由来分泌タンパクを網羅的に検索し、候補タンパクとして 3 つの factor をスクリーニングした。Factor-1 は様々なストレス刺激により誘導され生体防御反応に関与することが報告されている。我々は Factor-1 が Akt1 過剰発現マウスにおいてタンパクレベルで 7.4 倍増加していること、また Akt1 を過剰発現した細胞培地において増加していることを見出した。

Akt1 過剰発現マウスでは下肢虚血後の血

管新生が増加するが、この作用は Factor-1 の阻害薬で完全にキャンセルされたことから、骨格筋での Akt1 過剰発現による血管新生作用は Factor-1 を介している可能性が示唆された。

我々は Factor-1 flox マウスを Acta1-Cre マウスと交配し、骨格筋特異的 Factor-1 ノックアウトマウスを作成した。このマウスに対し、下肢虚血モデルを作製し、虚血後の血管新生に与える骨格筋由来 Factor-1 の影響を検討した。骨格筋特異的 Factor-1 ノックアウトマウスはコントロールマウスと比較して下肢虚血後の血流回復が遅延したが、その程度は Factor-1 の阻害薬投与時と比較して軽度であった。以上の結果から骨格筋以外の組織に由来する Factor-1 の関与も示唆された。

Factor-2 は細胞-細胞外マトリックス間の相互作用に関与するマトリセルラー蛋白の一種である Thrombospondin-2(TSP-2)であった。我々は、心肥大や線維化に関与する TSP-2 の血中濃度が、拡張不全心不全(HFpEF)患者において有用なバイオマーカーと成り得るかを検討した。心臓カテーテル検査目的に当院へ入院した HFpEF 患者を対象とした。全対象患者における血清 TSP-2 値の中央値は 19.2(四分位範囲 14.4-26.0)ng/mL であった。血清 TSP-2 値は NYHA 分類と有意に相関していた ($p < 0.001$)。全対象患者を TSP-2 の中央値で 2 群に分類したところ、血漿 BNP 値、血清高感度トロポニン T 濃度、および右心カテーテル検査による肺動脈楔入圧が TSP-2 高値群で低値群に比べ有意に高値であった。平均 727 日の観察期間において、24 例(16%)に心血管イベントの発生を認めた。イベントの内訳は、死亡 6 例、非致死性心筋梗塞 0 例、脳卒中 6 例、心不全入院 15 例であった。 Kaplan-Meier 曲線にて、TSP-2 高値群で低値群と比べ有意に無

事故生存率が低いことが示された(ログランク検定: $p = 0.006$)。同様の結果は収縮不全心不全(HFrEF)患者でも認められた(発表論文 1, 6)。現在 TSP-2 の骨格筋組織特異的ノックアウトマウス作成を進めている。

Factor-3 は近年様々な心血管疾患の診断や予後評価に有用であると報告されている Growth differentiation factor 15(GDF-15)であった。GDF-15 は心臓のみならず骨格筋からも発現し、Akt1 の過剰発現により mRNA 発現が増加することが明らかとなった。我々は、GDF-15 が拡張 HFpEF 患者の予後予測因子として有用か否かを検証した。左室拡張障害患者 150 名の血清サンプルを用い、GDF-15 値を測定したところ、血清 GDF-15 値は New York Heart Association 機能分類や血漿 BNP 値、血清高感度トロポニン T 値と有意に相関していた。次に、心不全の有無で HFpEF 群および心不全のない拡張障害患者群(LVDD 群)の 2 群に分けたところ、HFpEF 群の血清 GDF-15 値は LVDD 群と比較し有意に高値であった。 Kaplan-Meier 法にて主要心血管イベントのリスクを評価したところ、GDF-15 高値群で有意にイベントリスクが増加していた。 HFpEF 群のみで解析した場合も同様の結果であった。Cox 比例ハザード解析を行ったところ、GDF-15 を含むいくつかの因子が有意な予後予測因子として同定され、多変量解析においても年齢、心房細動の存在、BNP、心エコーでの E/e' 値と共に GDF-15 が独立した予後予測因子であった。また GDF-15 は肥大型心筋症と高血圧性心肥大の鑑別にも有用であった(発表論文 5, 7)。今後、GDF-15 に関しても骨格筋特異的ノックアウトマウスを作成し、心血管疾患制御の分子機序を解明する方針である。

C 骨格筋由来の miRNA の網羅的解析

AKT1 TG マウスとコントロールマウスの腓

腹筋から miRNA を抽出し PCR Array にて発現を網羅的に比較検討した(n=4)。網羅的解析を行った 940 個の miRNA のうち、AKT1 TG マウスの骨格筋組織で統計学的に有意に発現が上昇していたものは 9 つの miRNA であった。Akt1 の過剰発現により発現が増加した miRNA が骨格筋局所のみならず、遠隔臓器で作用を発揮するためには血中での発現量も増加している必要がある。血中の miRNA はエクソソームに内包されて血中へ分泌されるため、われわれは AKT1 TG マウスとコントロールマウスの血中からエクソソームを抽出し、その中の miRNA 発現を比較検討した。その結果、骨格筋内で発現上昇を認めた 9 つの miRNA のうち、miR-215 は 2.0 倍、miR-9 は 3.7 倍、miR-96 は 5.2 倍 AKT1 TG マウスの血中での発現量が増加していることが明らかとなった。

これらは Akt1 を過剰発現した L6 myoblasts の培養上清でも発現が増加していたことから、miR-215、miR-9、miR-96 の 3 つの miRNA は骨格筋肥大に伴い発現が増加し、エクソソームに包まれ分泌され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 7 件)

1. Kimura Y, Izumiya Y, Hanatani S, Yamamoto E, Kusaka H, Tokitsu T, Takashio S, Sakamoto K, Tsujita K, Tanaka T, Yamamuro M, Kojima S, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Ogawa H. High serum levels of thrombospondin-2 correlate with poor prognosis of patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Heart Vessels*. 2016;31:52-9. 査読あり.
2. Araki S, Izumiya Y, Rokutanda T, Ianni A, Hanatani S, Kimura Y, Onoue Y, Senokuchi T, Yoshizawa T, Yasuda O, Koitabashi N, Kurabayashi M, Braun T, Bober E, Yamagata K, Ogawa H. Sirt7 contributes to myocardial tissue repair by maintaining TGF- signaling pathway. *Circulation*. 2015;132:1081-1093. 査読あり.
3. Izumiya Y, Jinnin M, Kimura Y, Wang Z, Onoue Y, Hanatani S, Araki S, Ihn H, Ogawa H. Expression of Let-7 family microRNAs in skin correlates negatively with severity of pulmonary hypertension in patients with systemic scleroderma. *IJC Heart & Vasculature*. 2015;8:98-102. 査読あり.
4. Hanatani S, Izumiya Y, Araki S, Rokutanda T, Kimura Y, Walsh K, Ogawa H. Akt1-Mediated Fast/glycolytic Skeletal Muscle Growth Attenuates Renal Damage in Experimental Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25:2800-11. 査読あり.
5. Izumiya Y, Hanatani S, Kimura Y, Takashio S, Yamamoto E, Kusaka H, Tokitsu T, Rokutanda T, Araki S, Tsujita K, Tanaka T, Yamamuro M, Kojima S, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Ogawa H. Growth differentiation factor-15 is a useful prognostic marker in patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Can J Cardiol*. 2014;30:338-44. 査読あり.
6. Hanatani S, Izumiya Y, Takashio S, Kimura Y, Araki S, Rokutanda T, Tsujita K, Yamamoto E, Tanaka T, Yamamuro M, Kojima S, Tayama S,

Kaikita K, Hokimoto S, Ogawa H.
Circulating thrombospondin-2
reflects disease severity and
predicts prognosis of patients with
heart failure with reduced ejection
fraction. *Circ J.* 2014;78:903-10. 査
読あり.

7. Hanatani S, Izumiya Y, Takashio S,
Kojima S, Yamamuro M, Araki S,
Rokutanda T, Tsujita K, Yamamoto E,
Tanaka T, Tayama S, Kaikita K,
Hokimoto S, Sugiyama S, Ogawa H.
Growth differentiation factor 15 can
distinguish between hypertrophic
cardiomyopathy and hypertensive
hearts. *Heart Vessels.* 2014;29:231-7.
査読あり.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 泉家康宏、尾上喜郎、木村優一、花谷
信介、荒木智、田中朋子、小川久雄
骨格筋由来因子という観点から見た心
臓リハビリの有用性
第21回日本心臓リハビリテーション学
会学術集会 2015年7月19日
福岡国際会議場 福岡
2. 泉家康宏、花谷信介、荒木智、木村優
一、尾上喜郎、小川久雄
Type II fast/glycolytic skeletal
muscle growth attenuates
cardio-renal injury by activating
eNOS signaling in remote tissue via
endocrine fashion
第79回日本循環器学会学術集会
2015年4月24日、ABCホール、大阪
3. 木村優一、泉家康宏、花谷信介、尾上
喜郎、荒木智、小川久雄
High Serum Levels of
Thrombospondin-2 Correlate with Poor
Prognosis of Patients with Heart

Failure with Preserved Ejection
Fraction.

AHA Scientific Session 2014.

2014年11月15日 マコーミックプレ
イス、シカゴ、米国

4. 花谷信介、泉家康宏、木村優一、尾
上喜郎、荒木智、小川久雄
Akt1 過剰発現による骨格筋肥大は腎臓
病モデルマウスの腎障害を軽減する
第18回日本心血管内分泌代謝学会学術
集会 YIA 候補講演 2014年11月21日、
横浜市開港記念会館、横浜
5. 泉家康宏、花谷信介、荒木智、六反田
拓、木村優一、小川久雄.

Akt1-Mediated Fast/Glycolytic
Skeletal Muscle Growth Reduces
Pathological Renal Damages in
Experimental Kidney Disease.

2013年11月16日 グラスコンベンシ
ョンセンター、グラス、米国

6. 泉家康宏、花谷信介、荒木智、六反田
拓、木村優一、小川久雄.
Akt1-Mediated Skeletal Muscle Growth
Attenuates Renal Damage in
Experimental Kidney Disease.
2014年3月21日、日本循環器学会学術
集会、東京国際フォーラム、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 久雄 (OGAWA HISAO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号 : 50177135

(2)研究分担者

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

荒木 智 (ARAKI SATOSHI)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号 : 20706717