

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461105

研究課題名(和文)新規心臓由来分泌因子による慢性腎臓病の制御機構

研究課題名(英文) Cardiac myocyte-derived follistatin like 1 protects the kidney after subtotal nephrectomy

研究代表者

大橋 浩二 (Ohashi, Koji)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：10595515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：心臓特異的Follistatin like (Fstl) 1欠損マウス(cFstl1-KO)に5/6腎摘手術を施行し、新規カルディオカインFstl-1の慢性腎臓病における役割を解析した。cFstl1-KOマウスは対照マウスと比較して、尿中アルブミン排泄の増加、遺残腎での糸球体障害の増悪、炎症反応、酸化ストレスの上昇を認めた。一方アデノウイルスを用いてFstl1の血中濃度を上昇させることによりこれらの腎障害を全て改善しており、Fstl1は慢性腎臓病の新たな治療ターゲットになりうると思われた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the role of cardiac Follistatin like (Fstl) 1 in a mouse model of subtotal (5/6) nephrectomy. cFstl1-KO mice showed exacerbation of urinary albumin excretion, histological glomerular damage after subtotal nephrectomy compared with control mice. cFstl1-KO mice also exhibited the increased mRNA levels of proinflammatory cytokines and oxidative stress markers in the remnant kidney. Conversely, systemic administration of adenoviral vectors expressing Fstl1 ameliorates these renal damage. In cultured human mesangial cells, FSTL1 protein attenuated TNF-alpha-stimulated expression of proinflammatory cytokines. Treatment of mesangial cells with FSTL1 protein augmented the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK), and inhibition of AMPK activation abrogated the anti-inflammatory effects of FSTL1. These data suggest that Fstl1 functions in cardiorenal communication, and that the lack of Fstl1 production by myocytes promotes renal damage.

研究分野：循環器内科学

キーワード：Follistatin like 1 カルディオカイン 慢性腎臓病 AMPキナーゼ 炎症性サイトカイン 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)が2003年の米国 National Kidney Foundation (NKF)及び Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI)により、心血管疾患発症の独立した危険因子であることが発表されて以来、腎臓の心血管病に与える影響について多くの研究がなされてきた。一方、心機能が腎臓に及ぼす影響に関しても、心不全が腎臓の増悪因子であることが明らかとなってきており、この悪循環は心腎連関として広く認識されてきている。

近年、心臓は心房利尿ペプチド(ANP)、脳性利尿ペプチド(BNP)、アドレノメドリン等の様々な生理活性物質を産生し、心臓、腎臓やその他の臓器に影響を及ぼすことが明らかになりつつある。申請者等は新規心臓由来因子として Fstl1 を見出し、マウスモデルにおいて Fstl1 が心臓の虚血再灌流傷害(Ogura Y, Ohashi K et al. *Circulation* 2012)、心臓圧負荷(Shimano M, Ohashi K et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011)の際にその発現が上昇し、心保護作用を発揮することを報告した。また臨床的にも急性冠症候群や慢性心不全患者で Fstl1 の血中濃度が上昇することが報告されており、心血管病のバイオマーカーとしても確立しつつある。心臓病と慢性腎臓病は強い関連を示すことより、心不全や心筋障害で上昇する Fstl1 が心腎連関により慢性腎臓病の病態に関与することが示唆される。これらより申請者等は慢性腎臓病においても、心臓由来の Fstl1 が腎保護作用を発揮するという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

我が国において、慢性腎臓病は増加の一途をたどり、その病態解明と治療法の開発は重要課題である。また心不全が腎臓の増悪因子であることが明らかとなってきており、心臓由来分泌蛋白による腎機能調節機序が示唆される。本研究では、申請者らが見いだした心保護作用を有する新規心臓由来分泌因子 Follistatin-like1(Fstl1)に着目し、慢性腎臓病に対する Fstl1 の作用を遺伝子改変マウスを用いて個体レベルで明らかにする。さらに、その分子機序を細胞レベルでも明らかにする。本研究の目的は、Fstl1 の機能解析により、慢性腎臓病の病態を解明し、Fstl1 を標的とした慢性腎臓病の治療応用へと展開することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 心臓特異的 Fstl1 欠損マウスの作製。

Cre-LoxP システムを用いて作製した Fstl1 Flox マウスに心筋細胞特異的な  $\alpha$ MHC をプロモーターとした Cre トランスジェニックマウスを交配し、心臓特異的な Fstl1 欠損

マウス(cFstl1-KO)を作製する。

### (2) 5/6 腎摘モデルの作製

8~12 週齢の cFstl1-KO マウスと対照マウスをペントバルビタールにて麻酔後、背部より左側の腎臓を露出させクリップにて腎動静脈を阻血する。その後左腎上下極を 1/3 ずつ切除し、指圧にて圧迫止血後クリップを外し阻血解除する。1 週間後に今度は右側腎臓を露出させ、腎動静脈、尿管を結紮し右腎を全摘する。術後 8 週目に解剖し解析に用いる。また野生型マウスに 5/6 腎摘術後 4 週目に Fstl1 を過剰発現するアデノウイルス(Ad-Fstl1)とコントロールベクター(Ad- $\beta$ -galactosidase)を右頸静脈から投与し、Fstl1 の血中濃度を上昇させ、治療効果も解析する。

### (3) 腎臓病モデルにおける腎機能、腎臓の解析

血中 BUN, Cr, 尿中 Cr, Alb 測定: 解剖前に随時尿を採取し、ELISA システムにて Alb 濃度を測定する。BUN, Cr 濃度は SRL に委託し測定し、尿中 Alb 濃度は尿中 Cr 濃度で補正して(mg/gCr)として評価する。

遺残腎での糸球体傷害解析: 解剖後腎臓を取り出し 4%パラホルムアルデヒドで 24 時間固定する。パラフィン切片を作成後、Periodic acid-Schiff 染色 (PAS)、Masson-Trichrome 染色を施行する。PAS 染色ではメサンギウム細胞増殖を反映する糸球体面積と有核細胞数を解析する。線維化は Masson-Trichrome 染色を施行し、青色の線維化部分の面積を測定する。

### (4) 腎臓病モデルにおける、AMP キナーゼシグナルの関与

遺残腎において、AMP キナーゼのリン酸化抗体で免疫染色を行う。

### (5) 腎臓病モデルにおける、心臓での Fstl1 発現調節機構の解明

野生型マウス(WT)に対して 5/6 腎摘手術を作製し、心臓組織での Fstl1 の発現調節を Western Blot 法にて検討する。また血液中の Fstl1 濃度に関しても Western Blot 法にて検討する。

### (6) リコンビナント Fstl1 蛋白(rFstl1)作製

昆虫細胞(sf9細胞)にヒト Fstl1 cDNA を高発現した安定細胞株を用い無血清培地で培養し、培養液中のヒト Fstl1 蛋白をアフィニティーカラムを用いて精製する。精製後の Fstl1 蛋白の溶解液を透析膜を用いて PBS に置換し実験に使用する。

### (7) 腎臓組織での炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカー、線維化マーカー発現解析

腎臓病モデルの腎臓から RNA を抽出後、RT-PCR 法にて炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ ,

IL-6)、NADPH oxidase, TGF- $\beta$ 1, Collagen I, III の発現を測定し評価する。

(8) 培養メサンギウム細胞における Fstl1 の炎症反応に対する作用とそのメカニズムの解析

TNF- $\alpha$  刺激によるメサンギウム細胞の炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-6)を RT-PCR 法にて評価する。またシグナルとして AMP キナーゼ(AMPK)シグナルを Western blot 法にて評価する。Dominant negative mutant AMPK を産生するアデノウイルスを用い、シグナルパスウェイを検討する。

#### 4. 研究成果

cFstl1-KO マウスの心臓特異的な Fstl1 欠損に関しては、既報 (Shimano M, Ohashi K et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2011)にて、マウス心臓組織から心筋細胞を単離して、Western blot 法にて確認済みである。今回 cFstl1-KO マウスは対照マウスと比較して 50%程度 Fstl1 の血中濃度が低下していた。また cFstl1-KO マウスは Basal において対照マウスと比較して、体重、摂食量、腎臓重量、収縮期血圧、脈拍とも差を認めなかった。

対照マウスでは 5/6 腎摘手術 1 週後の血漿 Fstl1 濃度は、偽手術群と比較して  $2.0 \pm 0.3$  倍に上昇していた。一方、cFstl1-KO マウスでは 5/6 腎摘 1 週目で Fstl1 の血中濃度上昇を認めなかった。このことより、心筋細胞は腎障害時に上昇する Fstl1 の主たるソースであることが明らかとなった。

5/6 腎摘術 8 週目に、採尿と採血後に解剖し、遺残腎を採取し、組織学的検討を行った。尿中のアルブミン排泄は、5/6 腎摘により、対照マウスでは 2 倍程度に上昇したが、cFstl1-KO マウスでは 4 倍程度まで著明に増加していた。血漿 UN, Cre は 5/6 腎摘により 2 倍程度に増加していたが、対照マウスと cFstl1-KO マウスでは差を認めなかった。組織学的評価として、PAS 染色にてメサンギウム領域の増加を示唆する、糸球体面積と、糸球体内の細胞数を解析した。5/6 腎摘後の糸球体面積と糸球体内細胞数は、対照マウスと比較して cFstl1-KO マウスで有意に増加していた。また Masson-Trichrome 染色により評価した間質の線維化面積も、対照マウスと比較して cFstl1-KO マウスで有意に増加していることが明らかとなった。また遺残腎での炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL6, IL1 $\beta$ , MCP-1)、酸化ストレスマーカー (P40<sup>phox</sup>, P67<sup>phox</sup>, P47<sup>phox</sup>, P22<sup>phox</sup>)、線維化マーカー(Collagen I, Collagen III, TGF- $\beta$ 1, CTGF)とも全て cFstl1-KO マウスで有意に高値を示した。これらの結果より、心筋細胞での Fstl1 は慢性腎障害に対して、炎症反応、酸化ストレスを抑制することで、防御的に作用していることが示唆された。

次に Fstl1 の治療効果を解析するため、5/6

腎摘後 4 週目に Ad-Fstl1 もしくはコントロールベクター(Ad- $\beta$ gal)を全身投与し、さらに 4 週後、術後 8 週目に採血、採尿の後、解剖した。Ad-Fstl1 群は投与後 4 週目の段階で血中濃度は Ad- $\beta$ gal 群と比較して、 $2.6 \pm 0.2$  倍に増加していた。Ad-Fstl1 の全身投与は尿中のアルブミン排泄を Ad- $\beta$ gal 群と比較して 1/3 程度にまで低下させた。また組織学的検討として、PAS 染色における糸球体面積、糸球体内細胞数、Masson-Trichrome 染色における線維化面積とも、Ad-Fstl1 群では Ad- $\beta$ gal 群と比較して有意に抑制していた。遺残腎における炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL6, MCP-1)、酸化ストレスマーカー (P40<sup>phox</sup>, P47<sup>phox</sup>, P22<sup>phox</sup>)、線維化マーカー(Collagen I, Collagen III, TGF- $\beta$ 1, CTGF)とも全て、Ad-Fstl1 群でその発現が有意に低下していた。この結果より、Fstl1 の血中濃度を上昇させることは慢性腎障害において、炎症反応、酸化ストレスを抑制することにより腎保護作用を発揮することが示唆された。

詳細なメカニズムの解明のため、ヒトメサンギウム細胞を用いた in vitro の検討も行った。メサンギウム細胞に TNF- $\alpha$ (10ng/ml)を添加することにより、炎症性サイトカイン(IL6, TNF- $\alpha$ )の発現は著明に上昇するが、リコンビナント Fstl1 蛋白を前投与(100, 250ng/ml)しておくことで、Fstl1 の濃度依存性に炎症反応を抑えていた。

最後に、Fstl1 による腎保護作用のメカニズムの解析を行った。メサンギウム細胞に Fstl1 蛋白(250ng/ml)を添加すると、5 分をピークに AMP キナーゼとその下流であるアセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)のリン酸化が亢進した。In vivo でも 5/6 腎摘後の遺残腎において、AMP キナーゼのリン酸化を免疫染色で評価したところ、対照マウスでは糸球体内でその発現を認めたが、cFstl1-KO マウスではほとんど認めなかった。さらに Ad-Fstl1 群では Ad- $\beta$ gal 群と比較して、AMP キナーゼのリン酸化を糸球体内で強く認めた。定量的評価のため、遺残腎から蛋白を抽出し、Western blot 法にて AMP キナーゼのリン酸化を評価したところ、偽手術群と比較して、5/6 腎摘群の対照マウスでは、AMP キナーゼのリン酸化が 2.5 倍程度まで上昇していたが、cFstl1-KO マウスでは対照群と比較して 60%程度まで減少しており、in vivo でも in vitro でも Fstl1 は AMP キナーゼのリン酸化を亢進することが示唆された。

最後に Fstl1 の腎保護作用に AMP キナーゼシグナルが関与するか見るために、ドミナントネガティブタイプの AMP キナーゼを過剰発現するアデノウイルス(Ad-dn-AMPK)を用いた検討を行った。まず Ad-dn-AMPK の AMPK シグナル阻害に関して、ヒトメサンギウム細胞に Ad-dn-AMPK を添加 24 時間後に Fstl1 蛋白を添加し 5 分後に細胞を回収し、Western blot 法にて AMP キナーゼの下流シグナルである ACC のリン酸化を見たところ、

Ad-dn-AMPK により、Fstl1 添加による ACC のリン酸化亢進は完全に阻害されていた。

メサンギウム細胞にて、Ad-dn-AMPK 投与し、AMPK シグナルを阻害した状態で、TNF- $\alpha$  による炎症性サイトカイン(IL6, TNF- $\alpha$ )の上昇を解析したところ、Fstl1 蛋白投与による抗炎症作用は完全にキャンセルされており、Fstl1 による抗炎症作用は AMPK シグナルを介していることが示された。

今回我々は、心臓から分泌される Fstl1 が慢性腎障害に対して、炎症反応、酸化ストレスを抑制することで腎保護作用を発揮することを初めて見出し、論文発表 (J Am Soc Nephrol. 2016)した。

#### 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 19 件)

1. Hayakawa, S., Ohashi, K., Shibata, R., Takahashi, R., Otaka, N., Ogawa, H., Ito, M., Kanemura, N., Hiramatsu-Ito, M., Ikeda, N., Murohara, T., and Ouchi, N. 2016. Association of Circulating Follistatin-Like 1 Levels with Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Healthy Men. *PLoS One* 11:e0153619. 査読有
2. Hiramatsu-Ito, M., Shibata, R., Ohashi, K., Uemura, Y., Kanemura, N., Kambara, T., Enomoto, T., Yuasa, D., Matsuo, K., Ito, M., Hayakawa, S., Ogawa, H., Otaka, N., Kihara, S., Murohara, T., and Ouchi, N. 2016. Omentin attenuates atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* 110:107-117. 査読有
3. Yuasa, D., Ohashi, K., Shibata, R., Mizutani, N., Kataoka, Y., Kambara, T., Uemura, Y., Matsuo, K., Kanemura, N., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., Ito, M., Ogawa, H., Murate, T., Murohara, T., and Ouchi, N. 2016. C1q/TNF-related protein-1 functions to protect against acute ischemic injury in the heart. *FASEB J* 30:1065-1075. 査読有
4. Kambara, T., Shibata, R., Ohashi, K., Matsuo, K., Hiramatsu-Ito, M., Enomoto, T., Yuasa, D., Ito, M., Hayakawa, S., Ogawa, H., Aprahamian, T., Walsh, K., Murohara, T., and Ouchi, N. 2015. C1q/Tumor Necrosis Factor-Related Protein 9 Protects against Acute Myocardial Injury through an Adiponectin Receptor I-AMPK-Dependent Mechanism. *Mol Cell Biol* 35:2173-2185. 査読有
5. Ohashi, K., Yuasa, D., Shibata, R., Murohara, T., and Ouchi, N. 2015. Adiponectin as a Target in Obesity-related Inflammatory State. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 15:145-150. 査読有
6. Joki, Y., Ohashi, K., Yuasa, D., Shibata, R., Ito, M., Matsuo, K., Kambara, T., Uemura, Y., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., Kanemura, N., Ogawa, H., Daida, H., Murohara, T., and Ouchi, N. 2015. FGF21 attenuates pathological myocardial remodeling following myocardial infarction through the adiponectin-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 459:124-130. 査読有
7. Joki, Y., Ohashi, K., Yuasa, D., Shibata, R., Kataoka, Y., Kambara, T., Uemura, Y., Matsuo, K., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., Kanemura, N., Ito, M., Ogawa, H., Daida, H., Murohara, T., and Ouchi, N. 2015.

- Neuron-derived neurotrophic factor ameliorates adverse cardiac remodeling after experimental myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 8:342-351. 査読有
8. Matsuo, K., Shibata, R., Ohashi, K., Kambara, T., Uemura, Y., Hiramatsu-Ito, M., Enomoto, T., Yuasa, D., Joki, Y., Ito, M., Hayakawa, S., Ogawa, H., Kihara, S., Murohara, T., and Ouchi, N. 2015. Omentin functions to attenuate cardiac hypertrophic response. *J Mol Cell Cardiol* 79:195-202. 査読有
  9. Uemura, Y., Shibata, R., Kanemura, N., Ohashi, K., Kambara, T., Hiramatsu-Ito, M., Enomoto, T., Yuasa, D., Joki, Y., Matsuo, K., Ito, M., Hayakawa, S., Ogawa, H., Murohara, T., and Ouchi, N. 2015. Adipose-derived protein omentin prevents neointimal formation after arterial injury. *FASEB J* 29:141-151. 査読有
  10. Hayakawa, S., Ohashi, K., Shibata, R., Kataoka, Y., Miyabe, M., Enomoto, T., Joki, Y., Shimizu, Y., Kambara, T., Uemura, Y., Yuasa, D., Ogawa, H., Matsuo, K., Hiramatsu-Ito, M., van den Hoff, M.J., Walsh, K., Murohara, T., and Ouchi, N. 2015. Cardiac myocyte-derived follistatin-like 1 prevents renal injury in a subtotal nephrectomy model. *J Am Soc Nephrol* 26:636-646. 査読有
  11. Watanabe, Y., Shibata, R., Ouchi, N., Kambara, T., Ohashi, K., Jie, L., Inoue, Y., Murohara, T., and Komori, K. 2014. Adiponectin ameliorates endotoxin-induced acute cardiac injury. *Biomed Res Int* 2014:382035. 査読有
  12. Shibata, R., Ohashi, K., Murohara, T., and Ouchi, N. 2014. The potential of adipokines as therapeutic agents for cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 25:483-487. 査読有
  13. Yuasa, D., Ohashi, K., Shibata, R., Takeshita, K., Kikuchi, R., Takahashi, R., Kataoka, Y., Miyabe, M., Joki, Y., Kambara, T., Uemura, Y., Matsuo, K., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., Ito, M., Ikeda, N., Murohara, T., and Ouchi, N. 2014. Association of circulating C1q/TNF-related protein 1 levels with coronary artery disease in men. *PLoS One* 9:e99846. 査読有
  14. Kataoka, Y., Shibata, R., Ohashi, K., Kambara, T., Enomoto, T., Uemura, Y., Ogura, Y., Yuasa, D., Matsuo, K., Nagata, T., Oba, T., Yasukawa, H., Numaguchi, Y., Sone, T., Murohara, T., and Ouchi, N. 2014. Omentin prevents myocardial ischemic injury through AMP-activated protein kinase- and Akt-dependent mechanisms. *J Am Coll Cardiol* 63:2722-2733. 査読有
  15. Ohashi, K., Shibata, R., Murohara, T., and Ouchi, N. 2014. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends Endocrinol Metab* 25:348-355. 査読有
  16. Miyabe, M., Ohashi, K., Shibata, R., Uemura, Y., Ogura, Y., Yuasa, D., Kambara, T., Kataoka, Y., Yamamoto, T., Matsuo, K., Joki, Y., Enomoto, T.,

- Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., Ito, M., Van Den Hoff, M.J., Walsh, K., Murohara, T., and Ouchi, N. 2014. Muscle-derived follistatin-like 1 functions to reduce neointimal formation after vascular injury. *Cardiovasc Res* 103:111-120. 査読有
17. Ohashi, K., Enomoto, T., Joki, Y., Shibata, R., Ogura, Y., Kataoka, Y., Shimizu, Y., Kambara, T., Uemura, Y., Yuasa, D., Matsuo, K., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., Murohara, T., and Ouchi, N. 2014. Neuron-derived neurotrophic factor functions as a novel modulator that enhances endothelial cell function and revascularization processes. *J Biol Chem* 289:14132-14144. 査読有
18. Enomoto, T., Ohashi, K., Shibata, R., Kambara, T., Uemura, Y., Yuasa, D., Kataoka, Y., Miyabe, M., Matsuo, K., Joki, Y., Hayakawa, S., Hiramatsu-Ito, M., Ito, M., Murohara, T., and Ouchi, N. 2013. Transcriptional Regulation of an Insulin-Sensitizing Adipokine Adipolin/CTRP12 in Adipocytes by Kruppel-Like Factor 15. *PLoS One* 8:e83183. 査読有
19. Shimizu, Y., Shibata, R., Ishii, M., Ohashi, K., Kambara, T., Uemura, Y., Yuasa, D., Kataoka, Y., Kihara, S., Murohara, T., and Ouchi, N. 2013. Adiponectin-mediated modulation of lymphatic vessel formation and lymphedema. *J Am Heart Assoc* 2:e000438. 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

(1) 早川智子、大橋浩二、柴田玲、室原豊明、大内乗有  
Cardiac myocyte-derived follistatin-like 1 protects against renal injury  
2014年、日本循環器学会  
東京国際フォーラム、東京都千代田区、2014/3/21~3/23

(2) 早川智子、大橋浩二、柴田玲、室原豊明、大内乗有  
Follistatin-like 1 functions as a cardiokine that plays a protective role in renal injury  
2013年 アメリカ心臓病学会  
アメリカ、ダラス、2013/11/16~11/20

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

大橋 浩二 (OHASHI, Koji)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附  
講座助教  
研究者番号：10595515

##### (2)研究分担者

大内 乗有 (OUCHI, Noriyuki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附  
講座教授  
研究者番号：00595514  
柴田 玲 (SHIBATA, Rei)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附  
講座准教授  
研究者番号：70343689  
室原 豊明 (MUROHARA, Toyoaki)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90299503