

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461147

研究課題名(和文) 骨格筋由来ホルモンによる心腎連関の新たな治療介入

研究課題名(英文) Identification and characterization of muscle-derived renal 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(医)・助教

研究者番号：10515414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は運動療法の臓器保護作用を骨格筋由来ホルモンの観点から検討した。筋肥大が誘導できる遺伝子改変マウスでは腎疾患モデル後の組織障害が減弱しており、機序として腎臓でのeNOSの活性化が関与していた。骨格筋由来ホルモンを網羅的に探索し、Heme oxygenase-1 (HO-1)とThrombospondin-2 (TSP-2)をスクリーニングした。骨格筋特異的HO-1欠損マウスの解析から、HO-1は血管内皮細胞やマクロファージ由来である可能性が示唆された。TSP-2は心不全患者のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。本研究成果は骨格筋を中心とした臓器連関の機序解明に寄与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Muscle wasting is frequently observed in patients with cardiovascular and renal disease. We investigated the mechanism by which maintaining muscle mass protects these diseases. We utilized skeletal muscle-specific, inducible Akt1 transgenic (Akt1 TG) mouse that promotes the growth of functional muscle. Tissue damages induced by renal injury were decreased in Akt1 TG mice compared to WT mice. The attenuation of renal damage by myogenic Akt1 activation was accompanied by the activating phosphorylation of eNOS in the kidney. We comprehensively analyzed muscle-derived factors by proteome analysis. We identified Heme oxygenase-1 (HO-1) and Thrombospondin-2 (TSP-2) as a potential factor. We found that endothelial cells and macrophage was a major source of HO-1. We also found that TSP-2 could be a potential biomarker in patients with heart failure. Our data support the concept that maintaining muscle mass may improve clinical outcome in patients with cardiovascular and kidney disease.

研究分野：循環器内科

キーワード：骨格筋 分泌因子 腎保護作用 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病(CKD)患者や心不全患者は、高頻度でやせ・るいそう・骨格筋委縮を呈する。これらは患者のQOLを悪化させるのみならず、死亡の独立した危険因子であることが明らかにされている。また、骨格筋量と強い相関がある握力の低下したCKD患者は、握力が保たれた患者と比較して予後が悪いことも報告されている。これらのエビデンスに基づき、CKD診療ガイド2012においても骨格筋量を維持するための積極的な運動が推奨されている。CKDが骨格筋委縮を引き起こすことは広く認識されているが、逆もまた真なりか？つまり骨格筋量の増加が腎障害を改善しうるかという疑問はこれまで明らかにされていない。

運動能力の低下したCKD患者に対する監視下運動療法の有用性は保存期CKD患者のみならず透析患者においても証明されている。運動療法はウォーキングやランニングを主体とした有酸素運動と骨格筋量を維持・増加させるレジスタンストレーニングに分けることができる。レジスタンストレーニングは有酸素運動よりも炎症性サイトカインの低下作用を有することや、骨格筋のミトコンドリアを有酸素運動よりも増加させることが報告されている。これらの結果はCKD患者に対するレジスタンストレーニングの有用性を示しているが、その分子メカニズムは不明である。

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ということが明らかになってきた。我々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モデル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。また

我々はこのマウスモデルを使用して循環器病態における役割を検討し、骨格筋の肥大・発育は骨格筋由来の血管新生因子の分泌亢進を介して心筋梗塞後のリモデリングを抑制することを報告してきた。

## 2. 研究の目的

- 1) 骨格筋肥大が腎障害に与える影響を検討すること。
- 2) 骨格筋から分泌され腎臓へ作用する液性因子の網羅的スクリーニングと機能解析を行うこと。

## 3. 研究の方法

### 1) 骨格筋肥大の腎疾患モデルに及ぼす影響の検討

骨格筋特異的Akt-1過剰発現マウス及び野生型マウスに対し、片側の尿管を結紮し尿細管障害・間質線維化を誘導する片側尿管結紮(UUO)モデル、シスプラチンによる腎障害モデルを作成し、腎障害の程度、炎症や間質線維化の程度を過剰発現マウスと野生型マウスで比較検討し、その機序を骨格筋組織のプロテインアレイ解析により検討した。

### 2) 骨格筋由来腎保護因子のスクリーニング

Akt-1過剰発現マウス骨格筋のRNAサンプルをマイクロアレイにて、タンパクサンプルをプロテオーム解析し、骨格筋由来分泌因子のスクリーニングを行った

### 3) 骨格筋由来腎保護ホルモンのバイオマーカーとしての可能性検討

スクリーニングした骨格筋由来分泌因子の臨床サンプルでの検討を行い臨床的バイオマーカーとなりうるかを検討した。

### 4) 骨格筋特異的ノックアウトマウスの作製と表現系の解析

Cre-LoxPシステムを利用し、骨格筋特異的ノックアウトマウスを作製し、病態モデルを作

成し表現型の解析を進めた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 骨格筋肥大の腎疾患モデルに及ぼす影響の検討

われわれは骨格筋特異的 Akt-1 過剰発現マウス及び野生型マウスに対し、UUO モデルを作成し、腎障害の程度、炎症や間質線維化の程度を過剰発現マウスと野生型マウスで比較検討した。UUO による腎臓の線維化、炎症、尿細管障害は Akt1 トランスジェニックマウスで有意に減弱した。シスプラチンによる腎障害モデルにおいても、クレアチニンクリアランスの低下、尿素窒素値の上昇も骨格筋特異的 Akt1 トランスジェニックマウスで有意に減弱した。Akt1 による骨格筋肥大が腎障害を減弱する機序として腎臓での eNOS リン酸化の増強が関与していることを証明した(図1)。

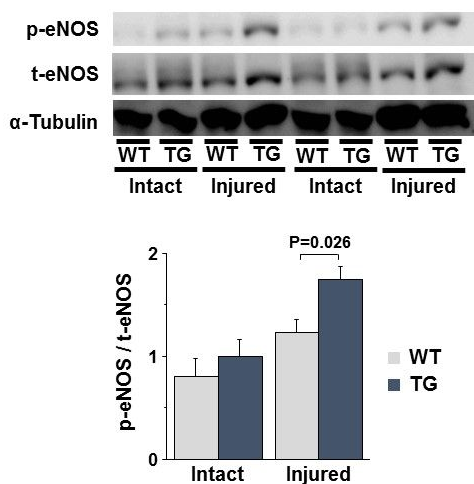


図1: Akt1による骨格筋肥大は腎臓でのeNOSリン酸化を増強した。

我々はこれらの結果を平成26年度に J Am Soc Nephrol. 誌に報告した。

##### 2) 骨格筋由来腎保護因子のスクリーニング

我々は Akt-1 過剰発現マウスの骨格筋サンプルを用いて、骨格筋肥大に伴い分泌が亢進するタンパクのスクリーニングを進め、以下の2つの候補遺伝子に着目し検討を進めた。

##### 1. Heme oxygenase-1 (HO-1)

HO-1 はヘムの分解酵素であるが、骨格筋で過剰発現することで心筋梗塞後の梗塞領域を縮小することが報告されており、分泌因子として作用する可能性も示唆されている。そこで我々はコントロールマウスと骨格筋肥大マウスに対して片側尿管結紮モデルを作成し、HO-1 阻害薬の投与が骨格筋肥大による腎保護作用にどのような影響を与えるかを検討したが、腎臓の炎症・線維化には差を認めなかった。しかし下肢モデルで検討したところ、骨格筋肥大マウスで認められた血流改善効果は HO-1 阻害薬の投与により、完全にキャンセルされた(図2)。

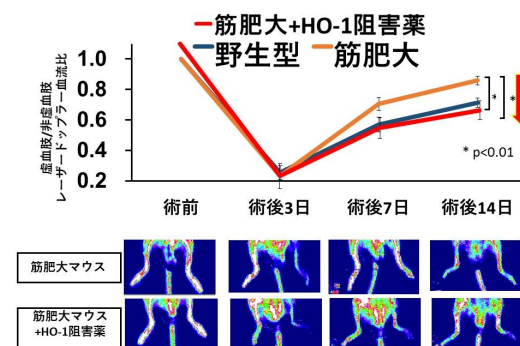


図2: Akt-1過剰発現マウスの血流改善促進効果はHO-1阻害薬によって消失する

HO-1 の骨格筋組織特異的ノックアウトマウスを作成し、血流改善の程度を評価したが、コントロールマウスと差を認めなかった。組織を詳細に評価すると、HO-1 の発現は内皮細胞とマクロファージで増加していることが明らかとなった(図3)。

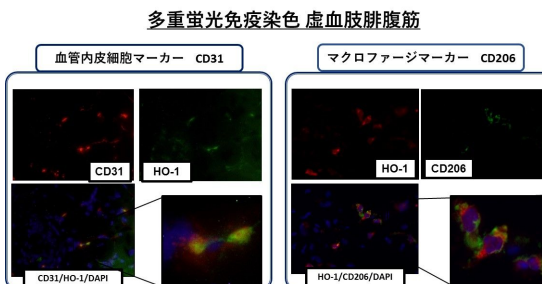


図3:骨格筋組織で増加しているHO-1は血管内皮細胞及びマクロファージ由来である

このことから骨格筋肥大は周囲の内皮・マクロファージ内の HO-1 の発現増加を介して、血管新生を促進することが明らかとなった。

## 2. Thrombospondin-2 (TSP-2)

TSP-2 も骨格筋で過剰発現することで、腎保護作用を発揮することが報告されている。我々は TSP-2 が骨格筋肥大モデルマウスの骨格筋組織のみならず、血中でも増加していることを確認した(図 4)。

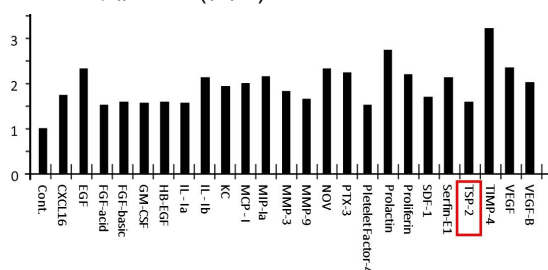


図4: TSP-2はAkt-1過剰発現マウスの骨格筋組織のみならず、血中でも増加している。

また Akt1 を過剰発現した培養骨格筋細胞の上清でも TSP-2 が増加していることを確認した。

### 3) 骨格筋由来腎保護ホルモンのバイオマーカーとしての可能性検討

H0-1 及び TSP-2 の血中濃度が心血管疾患患者においてどのような挙動を示すか、臨床サンプルで検証を行った。H0-1 の血中濃度は CKD 患者と正常腎機能患者の間で有意な差を認めなかった。一方 TSP-2 は拡張不全心不全患者で血中濃度が有意に高く、心不全患者のバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

### 4) 骨格筋特異的ノックアウトマウスの作製と表現系の解析

H0-1 Flox マウスと骨格筋細胞に特異的に cre リコンビナーゼを発現する Acta1-cre マウスを交配し、骨格筋特異的 H0-1 ノックアウトマウスを作製し、骨格筋細胞由来 H0-1 の生体での役割を検討した。腎障害モデル及び下肢虚血モデルを作成し表現型を比較検討したが、いずれも差を認めなかった。2) の実験結果と併せて、Akt1 による骨格筋肥大は、周囲の血管内皮細胞やマクロファージの H0-1 の活性化を介して、血管新生を促進している

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. Yamamura S, Izumiya Y\*, Ishida T, Onoue Y, Kimura Y, Hanatani S, Araki S, Fujisue K, Sueta D, Kanazawa H, Takashio S, Usuku H, Sugamura K, Sakamoto K, Yamamoto E, Yamamuro M, Yasuda H, Kojima S, Kaikita K, Hokimoto S, Ogawa H, Tsujita K. Reduced trans-mitral a-wave velocity predicts the presence of wild-type transthyretin amyloidosis in elderly patients with left ventricular hypertrophy. *Heart Vessels*. 2016. (\*Corresponding author). 査読あり.
2. Onoue Y, Izumiya Y\*, Hanatani S, Tanaka T, Yamamura S, Kimura Y, Araki S, Sakamoto K, Tsujita K, Yamamoto E, Yamamuro M, Kojima S, Kaikita K, Hokimoto S. A simple sarcopenia screening test predicts future adverse events in patients with heart failure. *Int J Cardiol*. 2016;215:301–306. (\*Corresponding author). 査読あり.
3. 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. (\*Corresponding author). 査読あり.
4. Onoue Y, Izumiya Y\*, Hanatani S, Kimura Y, Araki S, Sakamoto K, Yamamoto E, Tsujita K, Tanaka T, Yamamuro M, Kojima

- S, Kaikita K, Hokimoto S, Ogawa H.  
Fragmented QRS complex is a diagnostic tool in patient with left ventricular diastolic dysfunction. *Heart Vessels*. 2016;31:563-7. (\*Corresponding author). 査読あり.
5. 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- $\beta$  signaling pathway. *Circulation*. 2015;132:1081-1093. (\*Corresponding author). 査読あり.
  6. **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. (\*Corresponding author). 査読あり.
  7. 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; in press. (\*Corresponding author). 査読あり.

[学会発表](計 7 件)

1. **泉家康宏**, 尾上喜郎, 花谷信介, 山村智, 木村優一, 荒木智, 辻田賢一  
Akt1 による骨格筋肥大はヘムオキシゲナーゼ 1 を介して下肢虚血後の血管新生を促進する。  
Cardiovascular and Metabolic Week 2016  
12.16.2016  
東京コンベンションホール, 東京
2. **泉家康宏**, 尾上喜郎, 花谷信介, 木村優一

- Akt1-mediated Skeletal Muscle Growth Enhances Blood Flow Recovery after Hind Limb Ischemia by Activating Heme Oxygenase-1 in Macrophage  
19<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (国際学会)  
10.30.2016  
Sheraton Boston Hotel, 米国
3. **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  
Identification of muscle-derived factors contributing to beneficial effect of cardiac rehabilitation  
第 21 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会 (招待講演)  
7.19.2015  
福岡国際会議場, 福岡
  4. **泉家康宏**, 尾上喜郎, 木村優一, 花谷信介, 荒木智, 小川久雄  
骨格筋由来ホルモンという観点から見た運動療法の有用性  
第 32 回小倉ライブデモンストレーション心臓リハビリテーションコース (招待講演)  
5.17.2015  
西日本総合展示場, 福岡
  5. **泉家康宏**, 尾上喜郎, 花谷信介, 六反田拓, 荒木智, 小川久雄  
骨格筋由来分泌因子を介した骨格筋-腎連関による新規腎保護戦略の探索  
日本腎臓リハビリテーション学会学術集会 (招待講演)  
3.21.2015  
都市センターホテル, 東京
  6. **泉家康宏**, 尾上喜郎, 木村優一, 花谷信介, 荒木智, 小川久雄  
骨格筋由来ホルモンという観点から見た運動療法の有用性  
ARIA 2014 心臓リハビリテーションコース (招待講演)

11.23.2014

電気ビル共創館, 福岡

7. 泉家康宏, 花谷信介, 木村優一, 荒木智,  
小川久雄  
骨格筋からみた循環器疾患治療戦略  
日本循環制御医学会総会 (招待講演)

7.4.2014

九州大学医学部 百年講堂, 福岡

## 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