

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16607

研究課題名(和文)慢性心不全の骨格筋萎縮治療を見据えた炎症制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of Inflammation Mechanism for Muscle Wasting Treatment in Chronic Heart Failure

研究代表者

門口 智泰 (Kadoguchi, Tomoyasu)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：10762049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アンジオテンシンII(Ang II)誘発性の筋萎縮におけるNADPH Oxidase (NOX4)の役割を検討した。

B6マウスおよびNOX4欠損(KO)マウスを用い、生理食塩水(WTV)およびAng II(WTA)を4週間投与したところ、体重、筋重量、筋横断面積はWTV群に比較しWTA群で有意に低下した。その結果に一致し、有意なタンパク分解亢進および合成低下が観られた。さらに核内Nrf2低下と下流因子も有意に低下した。これらの変化は、KOマウス(KOA)で有意に改善した。これらのことから、NOX4によるNrf2制御が筋萎縮を調節する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、NOX4由来のROSは肺疾患および腎疾患の病態発症・進展における役割が示されてきたが、心不全による骨格筋萎縮におけるNOX4およびNrf2の役割は明らかではなかった。本研究では、NOX4欠損マウスを用いることにより、心不全における骨格筋萎縮に対するNOX4およびNrf2の役割が明らかとなる。NOX4由来のROSによるNrf2低下が、心不全における骨格筋萎縮に関与する可能性に着目した研究は、国内外では取り組みがない。したがって、骨格筋におけるNOX4由来のROS適正化は、心不全における骨格筋萎縮の治療の可能性を模索するものである。

研究成果の概要(英文)：We examined whether NADPH oxidase 4 (NOX4) is associated with muscle wasting in Ang II-infusion mice. Either saline or Ang II was infused into WT and Nox4 KO mice via osmotic minipump for 4 weeks. At 4 weeks after Ang II-infusion, body and skeletal muscle weight, and myocyte cross-sectional area significantly decreased in WTA mice compared to WTV mice. These changes were significantly attenuated in KOA mice. Protein degradation and synthesis markers in skeletal muscle significantly increased and decreased in WTA mice compared to WTV mice, respectively. Moreover, NF-E2-related factor 2 (Nrf2) regulated genes and protein expression level of Nrf2 in nuclear fraction significantly decreased in WTA mice compared to WTV mice. These parameters were significantly ameliorated in KOA mice (all p values <0.05). NOX4 induces muscle wasting by Ang II via downregulation of Nrf2 pathway, suggesting that the NOX4-Nrf2 axis plays an essential role in the development of muscle wasting.

研究分野：健康科学

キーワード：筋萎縮 酸化ストレス NADPH oxidase アンジオテンシンII 心不全 骨格筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における心不全死は持続的に増加しており、未だに生命予後が不良の病態である。心不全患者では著明な運動能力 (運動耐容能) 低下が認められるが、近年、その低下には心機能低下に独立した骨格筋機能の異常や骨格筋萎縮が重要な役割を担っていることが明らかになってきている。特に、骨格筋萎縮は心不全患者における強力な予後規定因子でもあることから、その改善は急務である。しかしながら、心不全における骨格筋萎縮の分子機序およびその治療法は未だ確立されていないのが現状である。

神経体液性因子であるレニン・アンジオテンシン (RAS) 系の主要分子であるアンジオテンシン II (Ang II) は生体の恒常性維持において必須であるが、その亢進は心不全の病態発症・進展に重要な役割を果たしている。研究代表者は以前、Ang II 投与モデルマウスの骨格筋で NADPH oxidase (NOX) 由来の酸化ストレス (ROS) が亢進すること、また骨格筋萎縮が引き起こされることを明らかにした (Exp Physiol 2015)。また心筋梗塞マウスの骨格筋においても NOX 由来の ROS 亢進および Akt リン酸化低下を来したが、NOX 阻害薬によりそれらが改善することも明らかにした (Am J Physiol 2011, 2014)。これらの知見は、NOX 由来の ROS が心不全の病態発症のみならず、骨格筋萎縮においても中心的な役割を果たしていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、NOX4 欠損 (KO) マウスを用い、NOX4 由来の ROS 亢進が慢性心不全における骨格筋萎縮に関連するとの仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

8~12 週齢の雄性 C57BL/6J (WT) マウスおよび NOX4 KO マウス (Jackson Lab) 用い、生理食塩水 (Vehicle) および Ang II (1000 ng/kg/min) (Vehicle により溶解) を皮下に植込んだ浸透ポンプにて 4 週間持続的に投与した。Vehicle 群をコントロール群とした。投与から 4 週後、麻酔科にて腓腹筋を採取し、遺伝子発現解析、タンパク発現解析、色素染色など各種解析に用いた。実験グループは WT + Vehicle 群、NOX4 KO + Vehicle 群、WT + Ang II 群および NOX4 KO + Ang II 群の 4 群とした。

4. 研究成果

ベースラインにおいて、WT + Vehicle 群と NOX4 KO + Vehicle 群では体重、腓腹筋湿重量、横断面積および各種臓器重量に違いはなく、表現型の大きな相違は見られなかった。Vehicle および Ang II 投与から 4 週後、体重、腓腹筋湿重量およびヘマトキシリン・エオジン染色にて定量評価した筋横断面積は、WT + Ang II 群では WT + Vehicle 群に比較し有意に低下した。一方、NOX4 KO + Ang II 群では、WT + Vehicle と値がほぼ同等であり、その低下が有意に抑制された (図 1)。

次に、タンパク合成および分解に関する因子が筋萎縮に関わっているか調べるため、それらの主要な因子を検討した。タンパク分解の主要因子であるユビキチン E3 リガーゼ (Muscle RING finger-1 および atrogenin-1/MAFbx)、Nuclear factor-kappa B および p38 Mitogen-activated protein kinase タンパク発現は、WT + Ang II 群では WT + Vehicle 群に比較し有意に増加した。一方、タンパク合成主要因子である Akt リン酸化 (Ser473) タンパク発現は、対照的に有意に低下した。これら因子の変化は、NOX4 KO + Ang II 群で有意に改善した (図 2)。

さらに、NOX4 がどのような酸化ストレス調節を行っているかを調べるため、レドックス制御因子として重要である NF-E2-related factor 2 (Nrf2) とその下流因子に注目した解析を実施した。Nrf2 は核内にて転写調節を受けることから、骨格筋組織を細胞質分画および核分画に分けライセートを調製し、各々の分画における

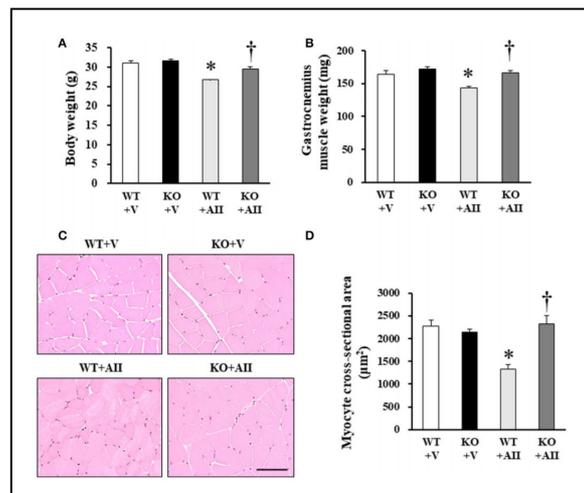


図 1. 体重 (A)、腓腹筋湿重量 (B)、代表的なヘマトキシリン・エオジン染色画像 (C) および筋横断面積 (D) を示す。

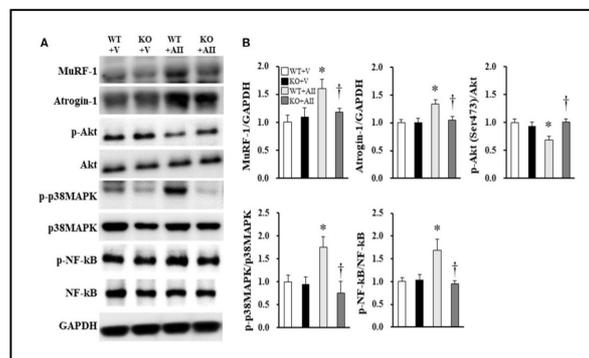


図 2. タンパク合成および分解の指標の代表的な Western blotting データ (A) および定量結果 (B) を示す。

Nrf2 タンパク発現を調べた。その結果、細胞質分画においては、Nrf2 タンパク発現に全群で違いがなかった。興味深いことに、核分画においては WT + AII 群では WT + Vehicle 群に比較し有意に低下した。実際の転写活性の評価は行っていないが、この結果は、核内での Nrf2 の活性が低下している可能性を示唆している。また Nrf2 の下流因子を遺伝子発現解析により評価したところ、中でもチオレドキシシンレダクターゼ 1 (*Txnrd1*) およびグルタチオンレダクターゼ (*Gsr*) 遺伝子発現が有意に低下した。AII 投与による上記の一連の変化は、NOX4 KO マウスで有意に改善した (図 3)。一方、ヘムオキシゲナーゼ 1 (HO1)、NADPH デヒドロゲナーゼキノン 1 (*Nqo1*)、グルタチオン S トランスフェラーゼ (*Gsta2*)、ペルオキシレドキシシン 1 (*Prx1*)については、WT + AII 群では WT + Vehicle 群に比較し低下傾向が認められた。またグルタミン酸システインリガーゼサブユニット (*Gclc*)には全群で違いがなかった。

これらの結果から、AII による筋萎縮には NOX4-Nrf2 を中心とした酸化ストレス制御が重要であることが示唆された。

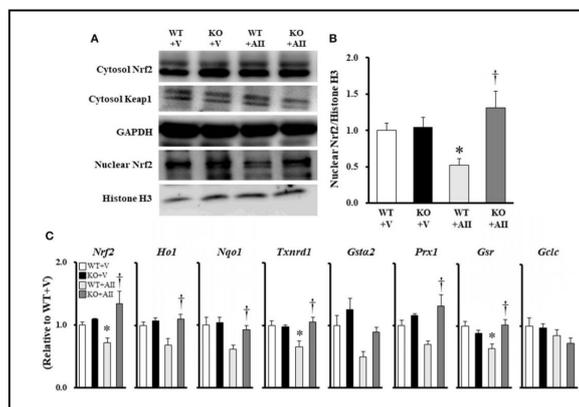


図 3. 細胞質・核分画における Nrf2 の代表的な Western blotting データ (A)、定量結果 (B) および下流因子の遺伝子発現を示す (C)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Possible Role of NADPH Oxidase 4 in Angiotensin II-Induced Muscle Wasting in Mice. Kadoguchi T, Shimada K, Koide H, Miyazaki T, Shiozawa T, Takahashi S, Aikawa T, Ouchi S, Kitamura K, Sugita Y, Hamad Al Shahi, Kunimoto M, Sato-Okabayashi Y, Akita K, Isoda K, Daida H. *Front Physiol.* 2018; 9: 1-9.
2. Deletion of NAD(P)H Oxidase 2 Prevents Angiotensin II-Induced Skeletal Muscle Atrophy. Kadoguchi T, Takada S, Yokota T, Furihata T, Matsumoto J, Tsuda M, Mizushima W, Fukushima A, Okita K, Kinugawa S. *BioMed Res Int.* 2018; 3194917: 1-11.
3. Correlation of Nutritional Indices on Admission to the Coronary Intensive Care Unit with the Development of Delirium. Sugita Y, Miyazaki T, Shimada K, Shimizu M, Kunimoto M, Ouchi S, Aikawa T, Kadoguchi T, Kawaguchi Y, Shiozawa T, Takasu K, Hiki M, Takahashi S, Sumiyoshi K, Iwata H, Daida H. *Nutrients.* 2018; 10: 1-12.
4. Inhibition of interleukin-1 suppresses angiotensin II-induced aortic inflammation and aneurysm formation. Isoda K, Akita K, Kitamura K, Sato-Okabayashi Y, Kadoguchi T, Isobe S, Ohtomo F, Sano M, Shimada K, Iwakura Y, Daida H. *Int J Cardiol.* 2018; 270: 221-227.
5. An Interleukin-6 Receptor Antibody Suppresses Atherosclerosis in Atherogenic Mice. Akita K, Isoda K, Sato-Okabayashi Y, Kadoguchi T, Kitamura K, Ohtomo F, Shimada K, Daida H. *Front Cardiovasc Med.* 2017; 4: 1-7.

〔学会発表〕(計 25 件)

1. Angiotensin II-dependent Activation of NADPH Oxidase 4 Contributes to Muscle Wasting in Mice via Downregulation of NF-E2-related Factor 2. Kadoguchi T, Shimada K, Miyazaki T, Aikawa T, Ouchi S, Kitamura K, Kunimoto M, Sugita Y, Shiozawa T, Isoda K, Daida H. European Society of Congress 2018. Oral Presentation. 2018. Munich. Germany.
2. 筋萎縮における NADPH Oxidase 4 および NF-E2-related factor 2 の役割の検討。 門口智泰, 島田和典, 喜多村健一, 相川達郎, 大内翔平, 國本充洋, 横山美帆, 杉田有里那, 宮崎哲朗, 代田浩之. 第 24 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会. 2018. 口頭発表.
3. Deletion of NADPH Oxidase 4 Ameliorates Skeletal Muscle Atrophy in Angiotensin II-Infusion Mice. Kadoguchi T, Shimada K, Shiozawa T, Takahashi S, Hamad Al Shahi, Aikawa T, Ouchi S, Sugita Y, Kitamura K, Akita K, Miyazaki T, Isoda K, Daida H. Cell Symposia 2017. Poster Presentation. Sweden, Gothenberg.
4. 酸化ストレス産生源である NADPH Oxidase 4 はアンジオテンシン II 誘発性の筋萎縮を制御する。 門口智泰, 島田和典, 駒野悠太, 代田浩之. 第 72 回日本体力医学会大会. 2017. 口頭発表.
5. NAD(P)H oxidase 4 plays a key role in Angiotensin II-induced protein degradation in skeletal muscle cells. Kadoguchi T, Shimada K, Shiozawa T, Takahashi S,

Hamad Al Shahi, Aikawa T, Ouchi S, Sugita Y, Kitamura K, Akita K, Miyazaki T, Isoda K, Daida H. European Society of Cardiology Congress 2016. Poster Presentation. Rome. Italy.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。