

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04175

研究課題名(和文) 骨格筋由来分泌蛋白を標的とした心血管病の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Role of the novel myokine myonectin in regulation of ischemic heart disease

研究代表者

大内 乗有 (OUCHI, Noriyuki)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：00595514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、運動誘発性マイオカインであるマイオネクチンの虚血性心疾患における役割を解析した。マイオネクチン欠損マウスは対照マウスと比べて、虚血再灌流後の心筋梗塞サイズの増加、心収縮能の低下、心筋でのアポトーシスと炎症反応の増悪を認めた。一方、マイオネクチン過剰発現マウスは対照マウスと比べて、心筋虚血再灌流障害が軽減していた。マイオネクチンの虚血心筋保護機序は、心筋細胞とマクロファージにおけるスフィンゴシン1リン酸分泌増加によるcyclicAMP/Akt経路を介したアポトーシス抑制と炎症反応抑制が関与していた。従って、マイオネクチンは心筋保護作用を有するマイオカインであると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国において虚血性心疾患を代表とする心血管病の病態解明及び治療法の確立は最重要課題である。本研究において、運動誘発性の骨格筋由来分泌因子「マイオカイン」であるマイオネクチンが心筋細胞のアポトーシスとマクロファージの炎症反応の抑制を介して心筋虚血再灌流障害を改善することが明らかとなった。従って、マイオネクチンは心筋保護作用を有するマイオカインでありマイオネクチンを標的とした心血管病の創薬開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Here we investigated the role of the exercise-induced myokine myonectin in regulation of ischemic heart disease. We found that myonectin knockout mice had increased myocardial infarct size and reduced cardiac function following ischemia-reperfusion compared with control mice, which were accompanied by enhanced apoptosis and inflammatory response in ischemic heart. In contrast, myonectin transgenic mice had reduced ischemia reperfusion injury compared with control mice. Furthermore, myonectin prevented myocardial ischemic injury by reducing cardiomyocyte apoptosis and macrophage inflammatory response through its ability to promote the sphingosine-1-phosphate/cyclicAMP/Akt signaling pathway. Thus, myonectin can function as an exercise-induced myokine which provides cardioprotection.

研究分野：循環器内科学

キーワード：虚血性心疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において、近年の生活習慣の変化に伴って、肥満を基盤とした糖尿病、高脂血症、高血圧を高率に合併するメタボリックシンドロームやその終末像ともいえる動脈硬化性の心血管病を代表とする生活習慣病は増加の一途をたどり、その病態解明及び治療法の確立は最重要課題である。

運動療法は心血管病に対して有効であるが、その分子機序については十分には解明されていない。最近の研究成果によると、骨格筋が「マイオカイン (Myokine)」と総称される生理活性物質を分泌することで、近傍あるいは遠隔臓器に影響を与え、代謝や心血管系を制御していることが明らかとなりつつある。運動により制御されるマイオカインの生理病態機能を明らかにすることは、運動療法による生活習慣病の改善機序を明らかにするのみならず、代謝性疾患や心血管病の病態生理解明と治療法の開発につながる可能性があると考えられた。

研究代表者は、マウス持久性運動によって制御されるマイオカインスクリーニングの過程で「マイオネクチン」に着目した。マイオネクチンは C1q/TNF-related protein ファミリーに属する骨格筋に非常に高発現する液性因子であった。マイオネクチンが肝臓での脂肪酸代謝やオートファジーに影響すると報告されているが、マイオネクチンの生理機能やその作用機序については十分には解明されておらず、特に、心血管病における役割については未だ不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、運動により発現制御される骨格筋由来分泌蛋白「マイオカイン」であるマイオネクチンに着目し、マイオネクチンによる心血管系制御機構を個体レベルで明らかにし、その分子機構を細胞レベルで解明する。本研究の目的は、マイオネクチンの機能解析により、マイオネクチンを新たな標的分子とした心血管疾患の病態生理解明と治療応用へと展開していくことである。

3. 研究の方法

(1) 虚血性心疾患に対するマイオネクチンの作用の個体レベルでの評価

マイオネクチン欠損マウスの作成：常法により全身アディポリン欠損マウスを作成した。骨格筋特異的発現を示す MCK プロモーターを用いて骨格筋特異的マイオネクチン過剰発現マウスを作成した。

心筋虚血再灌流モデル：マウスの左冠動脈前下行枝を 60 分間血流遮断後に再灌流し 24 時間後に心臓を摘出した。マイオネクチン欠損マウス、マイオネクチン過剰発現マウスと対照マウスに対して心筋虚血再灌流モデルを作成し、心筋虚血障害におけるマイオネクチンの役割を検討した。

摘出心の形態学的、組織学的検討：Evans Blue/TTC 染色を行い、左室エリア、虚血エリア、梗塞エリアを同定し、心筋梗塞サイズの定量化を行った。

心機能評価：心エコーを用いて、左室内径短縮率を評価した。

メカニズム解析：心筋組織におけるアポトーシスへの影響を TUNEL 染色にて検討した。心筋組織における炎症性サイトカイン (TNF, IL-6, MCP-1) の発現を Real-time PCR 法にて定量評価した。

(2) 心筋細胞のアポトーシス反応に対するマイオネクチンの作用の評価

ラット胎児から採取した心筋細胞を培養した。低酸素再酸素化状態でアポトーシスを誘導した。TUNEL 染色でアポトーシスを評価した。リコンビナントマイオネクチン蛋白を培養液中に添加して効果を検討した。また、adenylyl cyclase 阻害剤である SQ22536 や Sphingosine-1-phosphate (S1P: スフィンゴシン 1 リン酸) receptor (S1PR) 1 と S1PR3 に対する拮抗剤である VPC23019 を前処理した。Akt シグナルの阻害のため dominant negative mutant 型 Akt をアデノウイルス発現系を用いて過剰発現させた。

(3) マクロファージの炎症反応に対するアディポリンの作用の評価

RAW264.7 マクロファージを用いた。リコンビナントマイオネクチン蛋白を培養液中に前処理し、リポポリサッカライド (LPS) を添加後に炎症性サイトカイン (TNF, IL-6, MCP-1) の発現を Real-time PCR 法にて定量評価した。

(4) シグナル伝達経路の解析：Akt と cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化をウエスタンブロッティング法により評価した。培養液中 S1P を質量分析にて定量した。

4. 研究成果

(1) マイオネクチンの急性心筋虚血障害に対する作用

マイオネクチン欠損マウスは対照の野生型マウスと比して、体重、摂食状態、骨格筋や心臓を含

めた臓器重量、血糖値などの糖代謝や外観に変化は認めなかった。また、心筋での血管密度や血圧での検討においても、マイオネクチン欠損マウスと対照マウスを比較しても有意差を認めず、非ストレス状態においては、心血管系に異常を認めないと考えられた。

マイオネクチン欠損マウスと対照の野生型マウスに心筋虚血再灌流モデルを作成した。マイオネクチン欠損マウスは対照マウスに比べ、心筋虚血再灌流後の心筋梗塞巣のサイズが有意に増加していた(図1)。従って、内因性マイオネクチンは急性心筋障害に対して保護的に作用することが明らかとなった。

次に、心エコーにて心機能を評価した。心筋虚血再灌流後に対照マウスでは左室内径短縮率が低下するが、マイオネクチン欠損マウスにおいては対照マウスと比べて左室内径短縮率がより低下していた。

心筋のアポトーシスは虚血再灌流障害の進展に重要であるため、マイオネクチンのアポトーシスに対する作用を TUNEL 染色で検討した。マイオネクチン欠損マウスは対照マウスに比べ、虚血心筋での TUNEL 陽性細胞数は有意に増加しており、マイオネクチンは心筋アポトーシスに対して抑制的に作用していると考えられた(図2)。

心筋組織の炎症は虚血再灌流障害の進展に重要であるため、マイオネクチンの炎症反応に対する作用を虚血心筋での炎症性サイトカイン発現で検討した。マイオネクチン欠損マウスは対照マウスに比べ、虚血再灌流後の虚血心筋での TNF、IL-6 と MCP-1 の発現が有意に増加していた(図3)。以上より、マウスにおいて内因性マイオネクチンは心筋組織でのアポトーシスと炎症に対して抑制的に働き、心筋虚血再灌流障害に防御的に作用することが明らかとなった。

次に、マイオネクチン過剰発現マウスと対照マウスに心筋虚血再灌流モデルを作成した。マイオネクチン過剰発現マウスは対照マウスに比べ、心筋虚血再灌流後の心筋梗塞巣のサイズが有意に減少しており、心筋組織でのアポトーシスと炎症反応は抑制されていた。

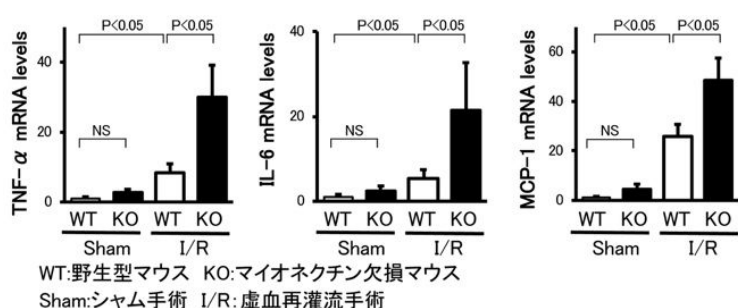


図3. マイオネクチンのマウス心筋における炎症性サイトカイン発現に対する作用

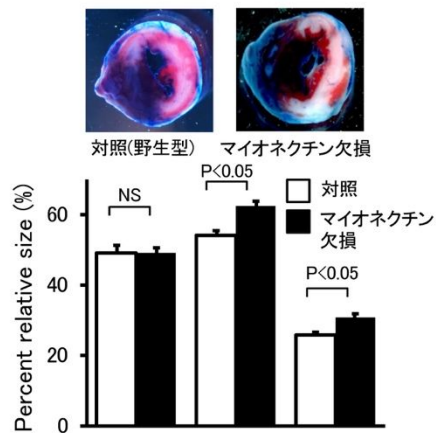
(2) 培養心筋細胞におけるマイオネクチンの抗アポトーシス作用

マイオネクチンが心筋細胞に直接作用し、アポトーシスを制御するかを検討するために、低酸素再酸素化(H/R)刺激によって培養心筋細胞のアポトーシスを誘導した。アポトーシスを TUNEL 染色にて検出すると、マイオネクチン蛋白添加は心筋細胞のアポトーシスを濃度依存的に抑制した。

マイオネクチンによるアポトーシス抑制シグナルの解明のため、抗アポトーシスシグナル分子である Akt の関与を検討した。マイオネクチンを心筋細胞に添加すると Akt のリン酸が促進した。Akt シグナルをブロックするとマイオネクチンによるアポトーシス抑制作用は解除された。また、マイオネクチンを心筋細胞に添加すると cyclicAMP の下流シグナル分子 CREB のリン酸が促進した。心筋細胞に adenylyl cyclase 阻害剤である SQ22536 を前処理するとマイオネクチンによる Akt リン酸の促進作用と抗アポトーシス作用は解除された。従って、マイオネクチンによる心筋細胞におけるアポトーシス抑制作用は cyclicAMP/Akt シグナルを介していると示唆された。

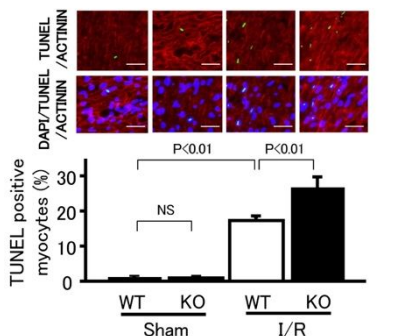
(3) マイオネクチンの抗アポトーシス作用機序

マイオネクチンによる心筋アポトーシス抑制機序の解明のためにスフィンゴシン 1 リン酸



AAR: 虚血エリア, LV: 左室エリア, IA: 梗塞エリア

図1. マウス心筋虚血再灌流障害に対するマイオネクチンの作用



WT: 野生型マウス KO: マイオネクチン欠損マウス

Sham: シヤム手術 I/R: 虚血再灌流手術

図2. マイオネクチンのマウス心筋におけるアポトーシスに対する作用

(Sphingosine-1-phosphate:S1P)シグナルに着目した。心筋細胞へのマイオネクチン添加は培養液中の S1P 濃度を増加させた。心筋細胞には S1P receptor (S1PR) 1 と S1PR3 が発現しているため、S1PR1 と S1PR3 に対する拮抗剤である VPC23019 を培養心筋細胞に前処理した。VPC23019 はマイオネクチンによる Akt と CREB のリン酸促進作用を解除した。さらに、VPC23019 はマイオネクチンによるアポトーシス抑制作用を解除した。従って、マイオネクチンは S1P の分泌を増加させ、S1P シグナルを促進することにより cyclicAMP/Akt 経路を介した心筋細胞保護作用を示すと示唆された。

(4)培養マクロファージにおけるマイオネクチンの炎症抑制作用

マイオネクチンがマクロファージの炎症反応を制御するかを検討するために、培養マウス RAW264.7 マクロファージをマイオネクチン蛋白前処理後に LPS 刺激を行った。LPS 刺激により TNF、IL-6 と MCP-1 の発現は著明に増加したが、マイオネクチン蛋白の前処理により有意に抑制された。従って、マイオネクチンはマクロファージの炎症反応を抑制することが明らかとなった。

マイオネクチンをマクロファージに添加すると Akt のリン酸が促進した。Akt シグナルをブロックするとマイオネクチンによる炎症反応抑制作用は解除された。また、マイオネクチンをマクロファージに添加すると CREB のリン酸が促進した。マクロファージに adenylyl cyclase 阻害剤である SQ22536 を前処理するとマイオネクチンによる Akt リン酸の促進作用と抗炎症作用は解除された。従って、マイオネクチンによるマクロファージにおける炎症応答抑制作用は cyclicAMP/Akt シグナルを介していると示唆された。

マクロファージへのマイオネクチン添加は培養液中の S1P 濃度を増加させた。マクロファージへの VPC23019 の前処理はマイオネクチンによる Akt と CREB のリン酸促進作用を解除した。さらに、VPC23019 はマイオネクチンによる抗炎症作用を解除した。従って、心筋細胞においてと同様に、マクロファージにおいてもマイオネクチンは S1P の分泌増加による S1P シグナルの促進を介した cyclicAMP/ Akt 経路の活性化による抗炎症作用を示すと示唆された。

以上より、マイオネクチンは S1P/cyclicAMP/Akt シグナル経路の活性化による心筋細胞のアポトーシスとマクロファージの炎症反応抑制を介した心筋保護作用を示す運動誘発性マイオカインであると考えられた(図 4)。従って、マイオネクチンは虚血性心疾患の病態生理解明に対する新しい標的分子になる可能性が示唆された。

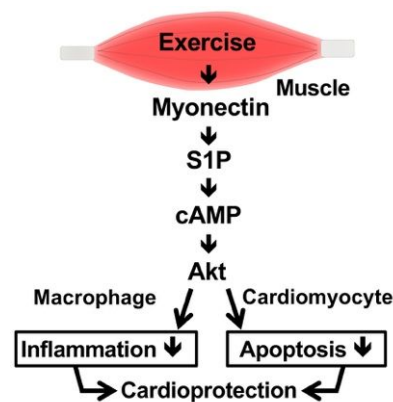


図4. マイオネクチンによる心保護作用

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa H, Ohashi K, Ito M, Shibata R, Kanemura N, Yuasa D, Kambara T, Matsuo K, Hayakawa S, Hiramatsu-Ito M, Otaka N, Kawanishi H, Yamaguchi S, Enomoto T, Abe T, Kaneko M, Takefuji M, Murohara T, Ouchi N	4. 巻 116
2. 論文標題 Adipolin/CTRP12 protects against pathological vascular remodeling through suppression of smooth muscle cell growth and macrophage inflammatory response.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cardiovasc Res.	6. 最初と最後の頁 237-249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cvr/cvz074.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi T, Takefuji M, Wettschureck N, Hamaguchi T, Amano M, Kato K, Tsuda T, Eguchi S, Ishihama S, Mori Y, Yura Y, Yoshida T, Unno K, Okumura T, Ishii H, Shimizu Y, Bando YK, Ohashi K, Ouchi N, Enomoto A, Offermanns S, Kaibuchi K, Murohara T	4. 巻 140
2. 論文標題 Protein Kinase N Promotes Stress-Induced Cardiac Dysfunction Through Phosphorylation of Myocardin-Related Transcription Factor A and Disruption of Its Interaction With Actin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation.	6. 最初と最後の頁 1737-1752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hara A, Kobayashi H, Asai N, Saito S, Higuchi T, Kato K, Okumura T, Bando YK, Takefuji M, Mizutani Y, Miyai Y, Saito S, Maruyama S, Maeda K, Ouchi N, Nagasaka A, Miyata T, Mii S, Kioka N, Worthley DL, Murohara T, Takahashi M, Enomoto A	4. 巻 125
2. 論文標題 Roles of the Mesenchymal Stromal/Stem Cell Marker Mefflin in Cardiac Tissue Repair and the Development of Diastolic Dysfunction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ Res.	6. 最初と最後の頁 414-430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCRESAHA.119.314806.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eguchi S, Takefuji M, Sakaguchi T, Ishihama S, Mori Y, Tsuda T, Takikawa T, Yoshida T, Ohashi K, Shimizu Y, Hayashida R, Kondo K, Bando YK, Ouchi N, Murohara T	4. 巻 294
2. 論文標題 Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 11665-11674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.007537.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aikawa T, Shimada K, Miyauchi K, Miyazaki T, Sai E, Ouchi S, Kadoguchi T, Kunimoto M, Joki Y, Dohi T, Okazaki S, Isoda K, Ohashi K, Murohara T, Ouchi N, Daida H	4. 巻 14
2. 論文標題 Associations among circulating levels of follistatin-like 1, clinical parameters, and cardiovascular events in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0216297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216297.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otaka N, Shibata R, Ohashi K, Uemura Y, Kambara T, Enomoto T, Ogawa H, Ito M, Kawanishi H, Maruyama S, Joki Y, Fujikawa Y, Narita S, Unno K, Kawamoto Y, Murate T, Murohara T, Ouchi N	4. 巻 123
2. 論文標題 Myonectin is an exercise-induced myokine that protects the heart from ischemia-reperfusion injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ Res.	6. 最初と最後の頁 1326-1338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCRESAHA.118.313777.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lau WB, Ohashi K, Wang Y, Ogawa H, Murohara T, Ma XL, Ouchi N	4. 巻 81
2. 論文標題 Role of Adipokines in Cardiovascular Disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circ J.	6. 最初と最後の頁 920-928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-17-0458.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Piao L, Zhao G, Zhu E, Inoue A, Shibata R, Lei Y, Hu L, Yu C, Yang G, Wu H, Xu W, Okumura K, Ouchi N, Murohara T, Kuzuya M, Cheng XW	4. 巻 6
2. 論文標題 Chronic Psychological Stress Accelerates Vascular Senescence and Impairs Ischemia-Induced Neovascularization: The Role of Dipeptidyl Peptidase-4/Glucagon-Like Peptide-1-Adiponectin Axis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc.	6. 最初と最後の頁 e006421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.117.006421.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 大内乗有、大高直也、室原豊明
2. 発表標題 運動誘発性マイオカイン「マイオネクチン」の虚血性心疾患における役割
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大内乗有、大橋浩二、室原豊明
2. 発表標題 アディポサイトカイン「アディポリン」の心血管病における役割
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内乗有
2. 発表標題 Role of the adiponectin paralogs C1q/TNF-related proteins in cardiovascular disease.
3. 学会等名 6th Seoul International Congress of Endocrinology and Metabolism (SICEM 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内乗有
2. 発表標題 Role of the novel adipokine in cardiovascular disease.
3. 学会等名 International Academy of Cardiology, Annual Scientific Sessions 2018, 23rd World Congress on Heart Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大内乗有、大橋浩二、柴田玲、小川隼人、室原豊明
2. 発表標題 アディポネクチンパラログの心血管病における役割
3. 学会等名 第38回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大内乗有
2. 発表標題 Role of the adipokine omentin in cardiovascular disease.
3. 学会等名 International Academy of Cardiology, Annual Scientific Sessions 2017, 22nd World Congress on Heart Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大内乗有
2. 発表標題 Role of the novel adipocytokines in cardiovascular disease.
3. 学会等名 2017 International Congress on Obesity and Metabolic Syndrome in conjunction with the 47th Annual Scientific Meeting of the KSSO（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大橋 浩二 (OHASHI Koji) (10595515)	名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴田 玲 (SHIBATA Rei) (70343689)	名古屋大学・医学系研究科・寄附講座教授 (13901)	
研究分担者	室原 豊明 (MUROHARA Toyoaki) (90299503)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	