

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390207

研究課題名(和文) 心筋由来分泌蛋白を標的とした虚血性心疾患の病態解明

研究課題名(英文) Role of the myocyte-derived secreted factor in 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(研究院)・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) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：心筋由来分泌蛋白であるフォリスタイン関連蛋白の虚血性心疾患に対する作用を解析した結果、フォリスタイン関連蛋白は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。マウスに対するフォリスタイン関連蛋白投与は心筋虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを縮小させ、心筋組織での炎症反応とアポトーシスの抑制を伴っていた。フォリスタイン関連蛋白の心筋保護機序は、心筋細胞におけるAMPキナーゼ活性化とBone morphogenetic protein-4シグナル阻害による炎症抑制とアポトーシス抑制を介していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We found that follistatin-like 1 (Fstl1) is protective against acute cardiac injury following ischemia-reperfusion (I/R). Administration of Fstl1 led to reduction of myocardial infarct size following I/R in vivo, which was accompanied by attenuation of inflammatory response and apoptosis in the ischemic heart. Furthermore, Fstl1 attenuated inflammatory reaction and apoptosis in cardiac myocytes by its ability to activate AMP-activated protein kinase pathway and inhibit bone morphogenetic protein-4 signaling pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学 虚血性心疾患

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患をはじめとする心血管病は3大死因の一つとなっており、病態解明と新しい予防法、治療法の開発は最重要課題である。

心筋は分泌蛋白を産生することで、ホメオスタシス維持やストレス適応に関与していることが国内外で注目されている。特に、心筋から分泌されるサイトカインや成長因子(TGFファミリー蛋白, BNP, VEGFなど)がオートクライン的、パラクライン的に心筋組織に作用することで、虚血や高血圧を基盤とした心筋リモデリングを制御していることが明らかとなってきた。

申請者らは、心血管系に作用する心筋由来分泌蛋白を同定する研究プログラムに着手した。そして、シグナル伝達物質であるAkt1が生理的な心筋肥大を引き起こすと共に心筋保護作用を有するため、Akt1に着目し、Akt1活性化により心筋や骨格筋から分泌される蛋白質としてFollistatin-like 1 (Follistatin-related protein: フォリスタチン関連蛋白) (Fstl1)を見いだした(Oshima, Ouchi et al. *Circulation* 2008, Ouchi et al. *JBC*. 2008)。

フォリスタチン関連蛋白はフォリスタチンファミリーに属する蛋白であるが、心血管疾患における機能や意義は明らかにされていない。そこで、申請者らは、アデノウイルスベクターによる発現系を用いて、フォリスタチン関連蛋白が心筋虚血再灌流障害を抑制すること(Oshima, Ouchi et al. *Circulation* 2008)、フォリスタチン関連蛋白が血管新生促進作用を有することを明らかにした(Ouchi et al. *JBC*. 2008, 2010)。従って、フォリスタチン関連蛋白は、虚血性心疾患の発症・進展過程における、急性心筋障害に対し防御作用があると示唆され、この分子のさらなる機能とそのメカニズムの解明は心血管病の病態解明だけでなく治療への応用につながると考えられる。しかし、フォリスタチン関連蛋白の生理機能、特に、虚血性心疾患の病態における役割は十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

虚血性心疾患の病態解明と有効な治療法の確立は急務を要する。本研究においては、心筋由来分泌蛋白であるフォリスタチン関連蛋白による虚血状態での心筋リモデリング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。そして、フォリスタチン関連蛋白の機能解析により、虚血性心疾患の病態を解明し、フォリスタチン関連蛋白を分子標的とした新たな虚血性心疾患の診断・治療応用へと展開することを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1)心筋虚血に対する個体レベルでの評価

マウス作成：フォリスタチン関連蛋白(Fstl1)は筋肉に発現が多いため、フォリスタチン関連蛋白(flox/flox)マウスと筋肉特異的発現を示すMCKをプロモーターに持つCre過剰発現マウスを交配し、筋肉特異的フォリスタチン関連蛋白欠損マウスを作成した。対照として、フォリスタチン関連蛋白(flox/flox)マウスを用いた。また、野生型マウスに対してリコンビナントフォリスタチン関連蛋白(100ng/BW(g))あるいはコントロールとしてPBSを血流遮断直前に頸静脈より全身投与して虚血心筋に対する作用を評価した。

心筋虚血再灌流モデル：マウスの左冠動脈を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。

心機能の検討：心エコーを用いて、心拍数、左室拡張末期径、収縮末期径、左室心筋壁厚、左室内径短縮率などの比較検討を行った。

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。アポトーシスへの影響をTUNEL染色にて検討した。

メカニズム解析：摘出心筋を用いて、シグナル伝達系物質(AMPK, SMAD)をウエスタンブロットング法により評価した。心筋組織におけるサイトカイン(TNF- α , IL-6)の発現をReal-time PCR法にて定量評価した。

(2)心筋細胞に対する細胞レベルでの評価

心筋細胞培養：ラット胎児から採取した心筋細胞を培養した。フォリスタチン関連蛋白のリコンビナント蛋白を培養液中に添加(100-250 ng/ml)して効果を検討した。また、siRNAを用いてbone morphogenetic protein-4 (BMP-4)をノックダウンした。

リコンビナント蛋白作成：申請者らが確立した昆虫細胞(sf9細胞)にヒトフォリスタチン関連蛋白cDNAを高発現した安定細胞株を用いて、無血清培地で培養し、培養液中に分泌されたヒトフォリスタチン関連蛋白をアフィニティーカラムを使って精製した。精製後のフォリスタチン関連蛋白の溶解液を透析膜を用いてPBSに置換し実験に使用した。

アポトーシスの解析：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。

炎症性反応の解析：リポ多糖類(LPS)やBMP-4刺激後のサイトカイン(TNF- α , IL-6)をReal-time PCR法にて定量した。

シグナル伝達経路の解析：シグナル伝達系

物質 (AMPK, SMAD) をウエスタンブロッティング法により評価した。AMPK に対しては、アデノウイルスを用いたドミナントネガティブ AMPK (dn-AMPK) の過剰発現系を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) フォリスタチン関連蛋白の急性心筋虚血障害に対する作用。

筋肉特異的フォリスタチン関連蛋白欠損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。フォリスタチン関連蛋白欠損マウスは対照に比べ、心筋虚血再灌流後の心筋梗塞のサイズが増加していた。従って、内因性のフォリスタチン関連蛋白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、ヒトフォリスタチン関連蛋白投与のマウス心筋虚血再灌流障害に対する作用の検討のため、野生型マウスにヒトフォリスタチン関連蛋白あるいはコントロールである PBS を静脈内全身投与し、心筋虚血再灌流モデルを作成した。マウスへのヒトフォリスタチン関連蛋白投与はコントロールに比し虚血再灌流後の心筋梗塞サイズを著明に縮小させた (図 1)。それに伴い、フォリスタチン関連蛋白投与群では左室内径短縮率も有意に改善した。

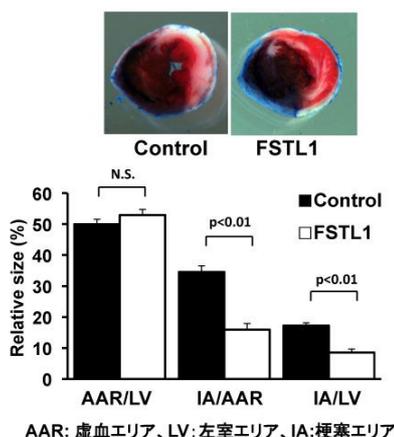


図1. フォリスタチン関連蛋白(FSTL1)のマウス心筋虚血再灌流障害に対する効果

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、フォリスタチン関連蛋白のアポトーシスに対する作用を TUNEL 染色で検討した。ヒトフォリスタチン関連蛋白の全身投与は虚血心筋の TUNEL 陽性細胞数を有意に減少させ、アポトーシスを抑制していると考えられた (図 2A)。さらに、フォリスタチン関連蛋白の心筋組織における炎症反応に対する作用を検討した。フォリスタチン関連蛋白投与群では、心筋組織における TNF- α と IL-6 の発現が有意に低下していた (図 2B)。以上より、マウスにおいてヒトフォリスタチン関連蛋白投与は心筋組織での

アポトーシスと炎症を抑制し、心筋虚血再灌流障害を改善することが明らかとなった。

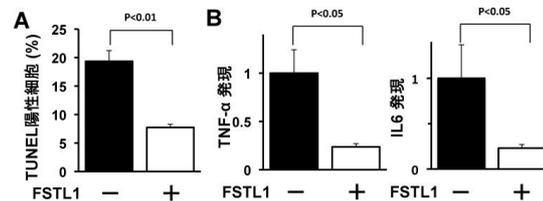


図2. フォリスタチン関連蛋白(FSTL1)のマウス心筋におけるアポトーシスと炎症性サイトカイン発現に対する抑制効果

(2) 培養心筋細胞におけるフォリスタチン関連蛋白の抗アポトーシス作用。

フォリスタチン関連蛋白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、フォリスタチン関連蛋白添加は心筋細胞のアポトーシスを抑制していた (図 3A)。フォリスタチン関連蛋白によるアポトーシス抑制作用の機序解明のため、抗アポトーシスシグナルである AMPK の関与を検討した。フォリスタチン関連蛋白を心筋細胞に添加すると AMPK のリン酸化とその下流のシグナル伝達物質である ACC のリン酸化が亢進した (図 3B)。また、フォリスタチン関連蛋白の全身投与により、マウス虚血心筋においても AMPK と ACC のリン酸化が促進していた。さらに、アデノウイルス発現系を用いて培養心筋細胞にドミナントネガティブ AMPK (dn-AMPK) を過剰発現させ AMPK シグナルを阻害するとフォリスタチン関連蛋白の抗アポトーシス作用は部分的に解除された (図 3C)。従って、フォリスタチン関連蛋白による心筋細胞におけるアポトーシス抑制作用の一部は AMPK シグナルを介していると考えられた。

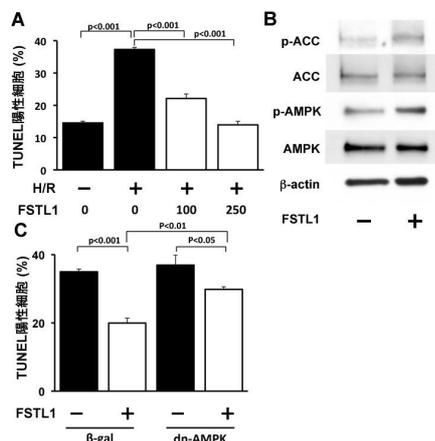


図3. フォリスタチン関連蛋白(FSTL1)はAMPKを介して培養心筋細胞のアポトーシスを抑制する

フォリスタチン関連蛋白が bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) と結合しその活性を阻害することが報告されていたため、心筋細胞におけるフォリスタチン関連蛋白

の BMP-4 シグナルに対しての作用を検討した。H/R 刺激により培養心筋細胞において BMP-4 発現の増加を認めた (図 4A)。心筋細胞において H/R 刺激により Smad1/5/8 のリン酸化が亢進するが、フォリスタチン関連蛋白の添加にて H/R 刺激による Smad1/5/8 のリン酸化亢進が抑制された (図 4B)。また、フォリスタチン関連蛋白投与は、マウス虚血心筋における Smad1/5/8 のリン酸化を抑制していた。さらに、正常酸素圧培養にて BMP-4 添加により心筋細胞のアポトーシスは増加したが、フォリスタチン関連蛋白前処理により抑制された (図 4C)。一方で、AMPK シグナルを阻害しても、フォリスタチン関連蛋白による BMP-4 が誘導する心筋細胞アポトーシスに対する抑制効果には影響しなかった。また、siRNA を用いて BMP-4 をノックダウンすると H/R による心筋細胞アポトーシスは有意に減少するが、フォリスタチン関連蛋白添加によりアポトーシスはさらに抑制され、この作用は dn-AMPK を用いた AMPK シグナルの遮断により完全に解除された (図 4D)。以上より、フォリスタチン関連蛋白は AMPK シグナルと BMP-4 シグナルの二つの独立した経路を介して心筋細胞のアポトーシスを抑制することが初めて示された。

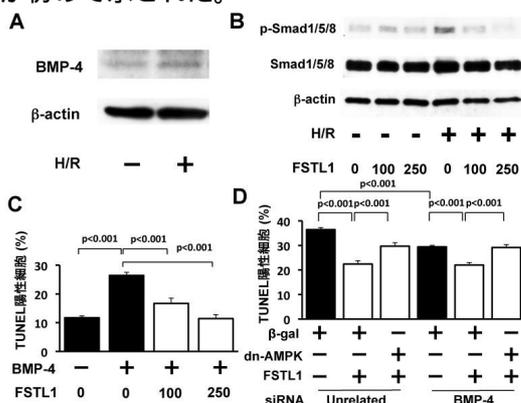


図4. フォリスタチン関連蛋白(FSTL1)によるBMP-4シグナル阻害を介した心筋細胞アポトーシスの抑制効果

(3) 培養心筋細胞におけるフォリスタチン関連蛋白の抗炎症作用。

フォリスタチン関連蛋白が心筋細胞の炎症性変化を制御するかを検討するために、培養心筋細胞をフォリスタチン関連蛋白前処理後に LPS 刺激を行った。LPS 刺激により TNF- α の発現は著明に増加したが、フォリスタチン関連蛋白の前処理により抑制された (図 5A)。また、フォリスタチン関連蛋白は BMP-4 刺激による TNF- α の発現増加も抑制した (図 5B)。同様に、フォリスタチン関連蛋白は LPS あるいは BMP-4 刺激による IL6 の発現増加も抑制していた。さらに、dn-AMPK を用いて AMPK シグナルを遮断するとフォリスタチン関連蛋白による LPS 刺激後の TNF- α 発現

抑制作用が解除された (図 5C)。また、AMPK は LPS 存在下でのフォリスタチン関連蛋白による IL6 発現抑制作用にも関与していた。従って、フォリスタチン関連蛋白は AMPK シグナルと BMP-4 シグナルの二つの経路を介して心筋細胞の炎症反応を抑制することが明らかとなった。

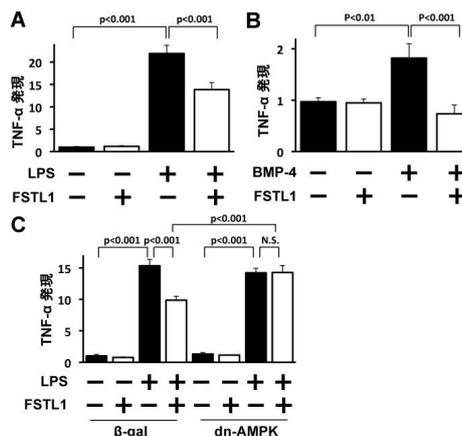


図5. フォリスタチン関連蛋白(FSTL1)はAMPKとBMP-4を介して心筋細胞のTNF- α の発現を抑制する

以上より、フォリスタチン関連蛋白は AMPK シグナルの活性化と BMP-4 シグナルの阻害による心筋細胞のアポトーシスと炎症反応抑制を介した心筋保護作用を示すと考えられた。従って、フォリスタチン関連蛋白は虚血性心疾患の病態生理解明と治療法開発に対する新しい標的分子になる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- 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, Ouchi N. Transcriptional regulation of an insulin-sensitizing adipokine adipolin/CTRP12 in adipocytes by Kruppel-like factor 15. *PLoS One*. 2013;8(12):e83183. doi: 10.1371/journal.pone.0083183. 査読有
- Shimizu Y, Shibata R, Ishii M, Ohashi K, Kambara T, Uemura Y, Yuasa D, Kataoka Y, Kihara S, Murohara T, Ouchi N. Adiponectin-mediated modulation of lymphatic vessel formation and lymphedema. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000438. doi: 10.1161/JAHA.113.000438. 査読有
- Yamamoto T, Shibata R, Ishii M, Kanemura N, Kito T, Suzuki H, Miyake H, Maeda K, Tanigawa T, Ouchi N,

- Murohara T. Therapeutic Reendothelialization by Induced Pluripotent Stem Cells After Vascular Injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2013;33:2218-21. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301313. 査読有
- Kito T, Shibata R, Ishii M, Suzuki H, Himeno T, Kataoka Y, Yamamura Y, Yamamoto T, Nishio N, Ito S, Numaguchi Y, Tanigawa T, Yamashita JK, Ouchi N, Honda H, Isobe K, Murohara T. iPS cell sheets created by a novel magnetite tissue engineering method for reparative angiogenesis. **Sci Rep.** 2013;3:1418. doi: 10.1038/srep01418. 査読有
- Uemura Y, Shibata R, Ohashi K, Enomoto T, Kambara T, Yamamoto T, Ogura Y, Yuasa D, Joki Y, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T, Ouchi N. Adipose-derived factor CTRP9 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. **FASEB J.** 2013;27:25-33. doi: 10.1096/fj.12-213744. 査読有
- Ogura Y, Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, Kito T, Maruyama S, Yuasa D, Matsuo K, Enomoto T, Uemura Y, Miyabe M, Ishii M, Yamamoto T, Shimizu Y, Walsh K, Murohara T. Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical animal models. **Circulation.** 2012;126:1728-38. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115089. 査読有
- Shibata R, Ouchi N, Takahashi R, Terakura Y, Ohashi K, Ikeda N, Higuchi A, Terasaki H, Kihara S, Murohara T. Omentin as a novel biomarker of metabolic risk factors. **Diabetol Metab Syndr.** 2012;4:37. doi: 10.1186/1758-5996-4-37. 査読有
- Kambara T, Ohashi K, Shibata R, Ogura Y, Maruyama S, Enomoto T, Uemura Y, Shimizu Y, Yuasa D, Matsuo K, Miyabe M, Kataoka Y, Murohara T, Ouchi N. CTRP9 protects against myocardial injury following ischemia-reperfusion through AMPK-dependent mechanism. **J Biol Chem.** 2012;287:18965-73. doi: 10.1074/jbc.M112.357939. 査読有
- Maruyama S, Shibata R, Kikuchi R, Izumiya Y, Rokutanda T, Araki S, Kataoka Y, Ohashi K, Daida H, Kihara S, Ogawa H, Murohara T, Ouchi N. Fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. **J Biol Chem.** 2012;287:408-17. doi: 10.1074/jbc.M111.261818. 査読有
- Enomoto T, Ohashi K, Shibata R, Higuchi A, Maruyama S, Izumiya Y, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. Adipolin/C1qdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. **J Biol Chem.** 2011;286:34552-8. doi: 10.1074/jbc.M111.277319. 査読有
- Maruyama S, Shibata R, Ohashi K, Ohashi T, Daida H, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through an Akt dependent mechanism. **J Biol Chem.** 2011;286:32790-800. doi: 10.1074/jbc.M111.245985. 査読有
- Shibata R, Ouchi N, Kikuchi R, Takahashi R, Takeshita K, Kataoka Y, Ohashi K, Ikeda N, Kihara S, Murohara T. Circulating omentin is associated with coronary artery disease in men. **Atherosclerosis.** 2011;219:811-4. doi: 10.1016/j.atherosclerosis. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

- ・ 大内乗有 アディポサイトカインと血管病 第 17 回日本心不全学会学術集会 大宮ソニックシティー(さいたま市)埼玉 2013 年 11 月 29 日
- ・ 大内乗有 柴田玲 大橋浩二 室原豊明 アディポサイトカインと心血管病 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術集会 千里ライフサイエンスセンター(豊中市)大阪 2013 年 11 月 22 日
- ・ 大内乗有 柴田玲 大橋浩二 室原豊明 高血圧合併症とアディポサイトカインの関連 第 21 回日本血管生物医学会学術集会 千里阪急ホテル(豊中市)大阪 2013 年 9 月 28 日
- ・ Ouchi N. Role of adipocytokines in cardiovascular disease. The 2nd International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis Seoul Korea 2013 年 9 月 14 日
- ・ Ouchi N. Role of adipocytokines in the cardiovascular system. The 29th Annual Meeting of the International

Society for Heart Research Japanese
Section Centennial Hall Kyushu
University School of Medicine
(Fukuoka) Fukuoka, Japan, 2012 年 10
月 27 日

- ・ 大内乗有 心血管系における新規アディポサイトカインの役割 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランヴィア京都(京都市) 京都 2012 年 10 月 12 日
- ・ 大内乗有 アディポサイトカインによる炎症調節機構 第 44 回日本動脈硬化学会総会 ヒルトン福岡シーホーク(福岡市) 福岡 2012 年 7 月 20 日
- ・ 大内乗有 アディポサイトカインによる疾患制御 第 49 回日本臨床分子医学会学術集会 みやこめっせ(京都市) 京都 2012 年 4 月 13 日
- ・ Ouchi N. Regulation of inflammatory responses by adipocytokines. 第 19 回日本血管生物医学会学術集会 東京ステーションコンファレンス(東京) 東京 2011 年 12 月 9 日
- ・ 大内乗有 アディポサイトカインと糖代謝異常 第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館(京都市) 京都 2011 年 9 月 21 日

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

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

柴田 玲 (SHIBATA, Rei)
名古屋大学・医学系研究科・特任講師
研究者番号: 70343689

室原 豊明 (MUROHARA, Toyoaki)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 90299503

(3) 連携研究者 なし