

研究テーマ**骨格筋より分泌される新規心不全治療因子の同定****1. はじめに**

慢性心不全患者では進行性の骨格筋萎縮が高頻度に発生し、これが死亡の独立した予測因子であることが明らかにされている。一方慢性心不全患者の非薬物療法の一つとして心臓リハビリの有用性が広く認識されている。従来は歩行やランニングを中心とした有酸素運動が推奨されてきたが、近年はそれらに加えて骨格筋量の増大を目的としたレジスタンストレーニングを行うことの有用性が報告され重要な構成要素の一つとなっている。慢性心不全患者に対する運動療法は自覚症状、運動耐容能、骨格筋萎縮を改善するのみならず左室収縮能も改善することが報告されているがそのメカニズムについてはほとんどわかっていない。

我々は骨格筋細胞の肥大が誘導できる遺伝子改変マウス(骨格筋特異的-Akt1 コンディショナルトランスジェニック)を使用し骨格筋の発育・肥大が他の臓器に与える影響について研究を行い、骨格筋細胞からの分泌因子がパラクライン因子として肝細胞や脂肪細胞に作用し高脂肪食により惹起されたメタボリックシンドロームを改善することを報告した⁽¹⁾。しかしながら現在のところ、それらを仲介する骨格筋由来の分泌因子の同定までには至っていない。本研究の目的はマウス心不全モデルおよび骨格筋発育モデルマウスの骨格筋での遺伝子発現を網羅的に解析し、新たな心不全治療薬となりうる骨格筋から心臓へのパラクライン因子を同定し、さらにその生体における機能解析を行うことである。

2. 方法**1. 骨格筋量の増大の心筋梗塞後のリモデリングに与える影響の検討**

野生型(WT)マウス及び骨格筋特異的-Akt1 コンディショナルトランスジェニック (TG)マウスを使用し、骨格筋量の増大が心筋梗塞後のリモデリングにどのような影響を与えるかを検討した。骨格筋細胞の肥大はTGマウスに doxycycline を飲水投与し骨格筋特異的にAkt1の過剰発現することで再現性を持って誘導することができる⁽¹⁾。冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを作製し心エコー、観血的血行動態測定および組織学的手法を用いて心機能および心リモデリングの評価を行った。

2. 骨格筋由来の新規分泌因子候補の検索

マイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に検索し、心筋梗塞モデルマウスの骨格筋で発現が低下し、TGマウスで発現が亢進していた遺伝子の中から、分泌シグナルを有するものでかつ細胞膜貫通ドメインを持たないものを新規分泌因子の候補とした。

3. 培養細胞系における新規分泌因子候補の機能解析

新規分泌因子候補のアデノウイルスベクターを作製し、その機能を培養心筋細胞及び培養内皮細胞を用いた in vitro の実験系で検討した。

4. In vivo での新規分泌因子候補の機能解析

アデノウイルスベクターを用いて新規分泌因子を in vivo で遺伝子導入し、その心血管系における役割

を検討した。病態モデルとして心筋虚血再還流モデルを作成し梗塞領域や心筋細胞のアポトーシスについて比較検討した。またマウス下肢虚血モデルの虚血肢に遺伝子導入し血管新生能を評価した。

3. 研究成果

1. 骨格筋量の増大の心筋梗塞後のリモデリングに与える影響の検討

心筋梗塞モデル作製2日後より doxycycline 飲水投与を開始し、骨格筋での Akt1 遺伝子の過剰発現を誘導した。術後2日目に行った心エコーでは心筋梗塞領域は WT マウスと TG マウスで同程度であったが、2週間後の心エコーでは左室内空の拡大や左室収縮力の低下は TG マウスで有意に抑制された。組織学的検討にて TG マウスでは梗塞境界領域の毛細血管密度の増加、非梗塞領域での心筋間質の線維化と心筋細胞のアポトーシスの抑制が認められた。以上のデータから Akt1 過剰発現による骨格筋の肥大は遠隔臓器である心筋のリモデリングを制御する可能性が示唆された。

2. 骨格筋由来の新規分泌因子候補の検索

マイクロアレイによるスクリーニングの結果いくつかの新規代謝調節因子の候補をリストアップすることができた。候補遺伝子のひとつ Follistatin like-1 (Fstl-1) のタンパク発現は Akt1 の活性化により骨格筋で著明に増加し、それに伴い血中濃度も有意な増加を認めた⁽²⁾。また近年代謝調節因子として注目されている FGF-21 や、心保護効果が報告されている Factor-X も骨格筋肥大に伴い発現が亢進することが確認された。

3. 培養細胞系における新規分泌因子候補の機能解析

アデノウイルスベクターを用いて Fstl-1 を培養心筋細胞で過剰発現すると、低酸素・再酸素化刺激や doxycyclin による細胞傷害を著明に抑制した⁽³⁾。また Fstl-1 を培養血管内皮細胞で過剰発現すると、血管内皮細胞の遊走・分化を促進し、血清除去によるアポトーシスを著明に抑制した。これら Fstl-1 の血管内皮細胞保護効果は PI3-kinase 阻害薬・優勢抑制型 Akt1 の過剰発現および NO 合成阻害薬によりブロックされたことから、Fstl-1 の心筋細胞や血管内皮細胞に対する作用は Akt-eNOS 経路を介していることが示唆された。

4. In vivo での新規分泌因子候補の機能解析

アデノウイルスベクターを経静脈的に投与し Fstl-1 を過剰発現させると、心筋虚血/再灌流による梗塞領域や心筋細胞のアポトーシスを著明に抑制した⁽³⁾。また下肢虚血手術を施行したマウスの骨格筋で Fstl-1 を遺伝子導入することにより、骨格筋での Akt と eNOS の活性化を認め、レーザードップラーでの血流改善及び組織学的に CD31 陽性細胞の増加を認めた。さらに Fstl-1 による血流改善効果は eNOS ノックアウトマウスでは認められなかったことから、Fstl-1 の血管内皮細胞に対する作用は Akt-eNOS 経路を介していることが示唆された。

4. 考察 まとめ

本研究で新規骨格筋由来分泌因子として同定された Fstl-1 のように骨格筋から種々の分泌因子が様々な外的刺激により分泌され、心血管系細胞へ作用することが明らかとなってきた。我々は代謝調節因子として注目されている FGF-21 も Fstl-1 と同様に骨格筋細胞から分泌され、Akt1 の活性化により著明に分泌が亢進することを報告した⁽⁴⁾。これら骨格筋由来分泌因子を介した骨格筋と他臓器のコミュニケーショ

ンの分子機序を明らかにすることは心疾患患者に対する心臓リハビリテーションやメタボリックシンドローム患者に対する運動療法を行うことの理論的根拠を与えるものとなりうる。さらに骨格筋由来分泌因子の作用機序を分子レベルで解明することで新たな治療ターゲットの発見へとつながる可能性がある。

今後は現在解析を進めているFactor-Xに対するペプチド抗体を作製しELISAシステムを構築し、組織発現プロファイルやマウス心疾患モデルにおける発現の変化、血中濃度の推移について検討する予定である。さらに、ヒトに対する抗体も同時に作製し心疾患患者における血中濃度を測定しさらに薬剤介入後の変化についてもモニタリングを行いその臨床的意義を検討する予定である。

最後に本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました財団法人 病態代謝研究会に深く感謝いたします。

5. 発表論文, 参考文献

1. Izumiya Y, Hopkins T, Morris C, Sato K, Zeng L, Viereck J, Hamilton JA, Ouchi N, LeBrasseur NK, Walsh K. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab.* 2008;7:159-72. Accompanied by editorial.
2. Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, Higuchi A, Ikegami C, Izumiya Y, Walsh K. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric oxide synthesis-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32802-11.
3. Oshima Y, Ouchi N, Sato K, Izumiya Y, Pimentel DR, Walsh K. Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. *Circulation.* 2008;117:3099-108.
4. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitononkov A, Walsh K. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.* 2008;582(27):3805-3810.