

運動制御性骨格筋由来分泌蛋白の 心血管病予防における役割

名古屋大学大学院 大内 乗有

Role of The Muscle-Derived Secretory Factor in Preventing the Development of Cardiovascular Disease

by

Noriyuki Ouchi

*Department of Molecular Medicine and Cardiology,
Nagoya University Graduate School of Medicine*

ABSTRACT

It is crucial to establish the strategies that prevent the development of lifestyle diseases including cardiovascular disease. It is well known that exercise training including endurance training is beneficial for prevention or treatment of cardiovascular disease. However, its molecular mechanism is incompletely understood. Accumulating evidence indicates that skeletal muscle produces various bioactive secretory molecules, also known as myokines, which can affect the pathogenesis of cardiovascular disease. Here, we sought to identify the myokine that is regulated by endurance exercise and investigate its role in the development of cardiovascular disease. After screening of gene expression profiles and predicted secretory proteins in skeletal muscle in sedentary versus treadmill exercised mice, we found that myonectin was a myokine that was upregulated by treadmill exercise. Myonectin protected the heart from ischemia-reperfusion injury. Myonectin reduced apoptotic activity and inflammatory response in cultured cardiac myocytes. These data suggest that myonectin acts as an exercise-induced myokine that has protective effects on heart disease.

要 旨

心血管病を含む生活習慣病の予防法の確立は重要課題である。持久性運動を含む運動療法は心血管病の予防と治療に対して有効性が示されているが、その分子機序については十分には明らかにされていない。近年の研究成果によると、骨格筋は「マイオカイン (Myokine)」と総称すべき分泌因子を産生する内分泌臓器としての役割を果たし、マイオカインが近傍あるいは遠隔臓器に影響を与え、心血管病の病態に関わることが明らかになってきた。今回の研究では、持久性運動により制御されるマイオカインを同定し、その心血管病における役割を解析した。マウストレッドミル運動モデルを用いて、骨格筋の発現遺伝子を解析し、分泌因子をスクリーニングした。運動によって発現の増加するマイオカインとしてマイオネクチンを同定した。マイオネクチンは心筋虚血再灌流障害に防御的に作用していた。培養心筋細胞においてマイオネクチンはアポトーシスと炎症反応を抑制した。従って、マイオネクチンは運動誘発性のマイオカインであり、心筋保護的に作用すると示唆された。

緒 言

肥満を基盤としたメタボリックシンドロームとその終末像とも言える動脈硬化や虚血性心疾患などの心血管病はいわゆる生活習慣病であり、これらの発症予防と重症化予防の徹底は重要な健康課題である¹⁾。運動療法は、持久性運動とレジスタンス運動に分類でき、共に代謝性疾患や心血管疾患を代表とする生活習慣病の予防と治療に対して有効性が示されている²⁾。しかし、その分子機序については十分には明らかにされていない。

骨格筋は運動機能やエネルギー代謝調節において重要な役割を果たしていることが知られている。近年の研究成果によると、骨格筋は「マイオ

カイン (Myokine)」と総称すべき分泌因子を産生する内分泌臓器としての役割を果たし、マイオカインが近傍あるいは遠隔臓器に影響を与え、代謝性疾患や心血管疾患を代表とする生活習慣病の発症や進展を制御することが明らかになってきた^{3, 4)}。IL-6は運動により産生が増加するマイオカインとして初めて報告され、運動中の脂肪酸代謝や糖代謝を制御することが知られている⁵⁾。また、Irisinは運動によって血中濃度が上昇するマイオカインであり、白色脂肪組織の褐色化を促進し、脂肪組織のエネルギー代謝を調節することが報告されている⁶⁾。我々は、Follistatin-like 1 (Fstl1)が骨格筋肥大で誘導され、血管内皮保護作用を有することを明らかにした⁷⁾。また、Fstl1は虚血性心疾患、血管障害や慢性腎臓病に対して保護的に作用することも報告されている⁸⁻¹⁰⁾。

このように、代謝性疾患や心血管疾患に関わるマイオカインがいくつか同定されているが、マイオカインを介した運動療法による生活習慣病改善機序については十分には解明されていない。本研究では、持久性運動により制御されるマイオカインを同定し、そのマイオカインの虚血性心疾患における役割を解析した。

1. 研究方法

1. 1 マウス持久性運動モデル

野生型マウス (C57BL/6) に対してトレッドミル運動負荷 (22cm/秒のスピード, 4度の傾斜) を4週間 (1時間を週に5回) 施行した。

1. 2 マイオカインのスクリーニング

以下のように、マイクロアレイ法・バイオインフォマティクス手法を用い、培養細胞への遺伝子導入による分泌確認実験を施行してマイオカインを同定した。

(a) 発現遺伝子プロファイルの解析；運動群と非運動群のヒラメ筋における発現遺伝子プロファ

イルをマイクロアレイ法 (SurePrint G3 Mouse Gene Expression, Agilent Technologies Inc.) を用いて比較検討し, 発現増加を示す遺伝子を選び出した。

(b) 分泌因子の予測: シグナルペプチド (SignalP4.0プログラム) を有し, 膜貫通ドメイン (TMHMM2.0プログラム) を有さないものを分泌蛋白と予測した。

(c) 分泌の確認: マウス骨格筋のRNAより作成したcDNAを用いてPCR法にてマイオネクチンの全長cDNAを得た。C端部にFLAGを付加したマイオネクチンcDNAをpcDNA3.1ベクターにサブクローニングした。マイオネクチンを発現するpcDNA3.1ベクターあるいは空のpcDNA3.1ベクターをLipofectamin 2000を用いてCOS-7細胞に発現させた。細胞及びメディウムを回収し, FLAG抗体を用いてWestern blot法にてマイオネクチンが検出できるかを検討した。

1. 3 マイオネクチン欠損マウス

マイオネクチン欠損マウスはLexicon Pharmaceuticals, Inc.により作製され, Taconic Biosciences, Inc.より購入した。

1. 4 心筋虚血再灌流モデル作製

野生型マウスあるいはマイオネクチン欠損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時間後に心臓摘出を行った。心筋障害の評価は組織学的にEvans Blue/2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (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。

1. 5 リコンビナントマイオネクチン蛋白の作製

293F細胞にFLAGを付加したマウスマイオネクチン全長cDNAを遺伝子導入し, 無血清培地で培養した。培養液中に分泌されたマイオネクチン

蛋白をFLAGアガロースを用いて精製した。精製後のマイオネクチン蛋白の溶解液は透析膜を用いてPBSに置換して細胞実験に用いた。

1. 6 心筋細胞の表現型への影響

ラット胎児培養心筋細胞を用いた。低酸素再酸素化状態 (12時間の低酸素状態の後に24時間の再酸素化) でアポトーシスを誘導した。低酸素状態はAnaeroPack (三菱ガス化学) を用いて誘導した。マイオネクチン蛋白の添加濃度は $5\mu\text{g/ml}$ を用いた。In Situ Cell Death detection kit (Roche Diagnostics) を用いた terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) 染色でアポトーシスを評価した。DAPIを用いて核染色を行なった。3視野でのTUNEL陽性細胞をランダムにカウントして, 全核の数のパーセンテージで表した。

心筋細胞の炎症反応への影響はリポポリサッカライド (LPS) (Sigma-Aldrich, St. Louis) (100ng/ml) で刺激し, 6時間後のサイトカイン (TNF- α , IL-6) 発現で評価した。サイトカインのmRNAレベルを定量的PCR法で評価した。マイオネクチン蛋白 ($5\mu\text{g/ml}$) はLPS刺激の1時間前より添加した。

1. 7 定量的PCR法

RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いてラット胎児心筋細胞から全RNAを抽出した。ReverTra Ace (東洋紡ライフサイエンス) を用いてcDNAを作成し, SYBR Green I を用いてPCRを行なった。遺伝子発現レベルを36B4に対する相対的発現量として評価した。プライマー配列: ラットTNF- α ; forward 5'-CCAATCTGTGTCCTTCTAAC-3', reverse 5'-GTTTCTGAGCATCGTAGTTG-3', ラットIL-6; forward 5'-AAGGTCATATGAGGTCTAC-3', reverse 5'-CATATTGCCAGTTCTTCGTA-3', ラット36B4;

forward 3'-ACTGGCTGAAAAGGTCAAGG -5,
reverse 3'-TTGGTGTGAGGGGCTTAGTC-5'

1. 8 統計学的解析

データは平均値 ± 標準誤差で示した. 2群間比較は Student's t-test を用い, 3群間以上の比較は Tukey-Kramer 法による多重比較検定を用いた. P<0.05 を統計学的な有意差を認めると判断した.

2. 研究結果

2. 1 運動誘発性マイオカインの同定

トレッドミル運動群と非運動群でのマウスヒラメ筋での発現遺伝子をマイクロアレイ法を用いて比較検討し, 運動群のヒラメ筋で発現増加を示し, バイオインフォマティクス手法にて分泌因子であると予測される分子をスクリーニングした. スクリーニングの結果, マイオネクチン/C1q/TNF-related protein 15 に着目した. マイオネクチンはシグナルペプチド, コラーゲン様ドメインと C1q 様ドメインを持ち, C1q/TNF-related protein ファミリーに属する分子であった (図1). マイクロアレイ解析では運動群 (n=4) と非運動群 (n=4) を比べると運動群で 1.7±0.2 倍のマイオネクチンの発現が増加していた (P<0.05). COS-7 細胞を用いたマイオネクチンの発現実験では, FLAG を付加したマイオネクチンを遺伝子導入すると細胞内のみならずメディウム中にもマイオネクチンが検出された (図2). 従って, マイオネクチンは分泌因子であると考えられた. マイオネクチンは骨格筋に高発現を示すことが報告されている¹¹⁾. 以

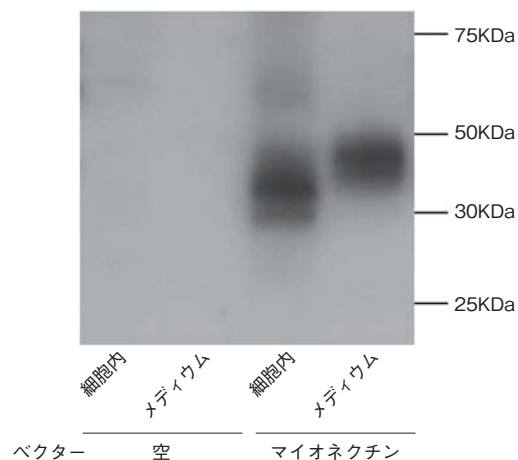


図2 マイオネクチンは分泌される
C端部に FLAG を付加したマイオネクチン cDNA を含む pcDNA3.1ベクターあるいは空の pcDNA3.1ベクターを COS-7細胞に発現させた. 細胞及びメディウムを回収し, FLAG抗体を用いて Western blot法にて解析した.

上より, マイオネクチンは運動誘発性のマイオカインであると考えられた. これまでにリコンビナント蛋白を用いた実験系で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¹²⁾. また, マイオネクチンは鉄代謝や造血に関与する分子であることも報告されている¹³⁾. しかし, 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, 心血管病における役割についても不明な点が多い.

2. 2 マイオネクチンは心筋虚血再灌流障害を防御する

マイオネクチンの虚血性心疾患における役割を解明するため, マイオネクチン欠損マウスと野生型マウスに対して心筋虚血再灌流モデルを作製し

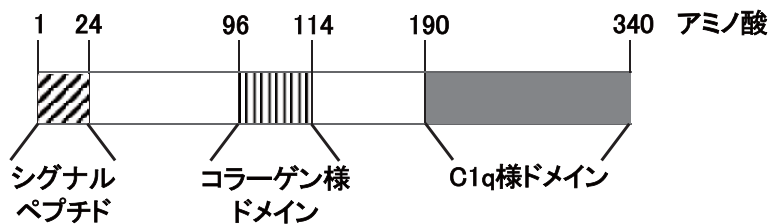


図1 マイオネクチンのアミノ酸構造
マイオネクチンはシグナルペプチド, コラーゲン様ドメインと C1q 様ドメインを持つ

表 1

| | 虚血/左室エリア (%) | 梗塞/虚血エリア (%) | 梗塞/左室エリア (%) |
|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 野生型マウス | 48.7±1.8 | 52.5±1.4 | 25.8±0.7 |
| マイオネクチン欠損マウス | 48.0±1.2 | 61.1±1.2* | 29.3±1.0* |

野生型マウス (n=10) マイオネクチン欠損マウス (n=10) *p<0.05 versus 野生型マウス

た。マイオネクチン欠損マウスは野生型マウスに比し、虚血再灌流後の梗塞エリア/虚血エリア (%) と梗塞エリア/左室エリア (%) は有意に増加していた (表1)。虚血エリア/左室エリア (%) は野生型マウスとマイオネクチン欠損マウスで有意な差を認めなかった。従って、マイオネクチン欠損マウスでは虚血再灌流後の心筋障害が悪化していると考えられた。

2. 3 マイオネクチンは心筋細胞のアポトーシスを抑制する

心筋細胞のアポトーシスは虚血再灌流障害の進展に重要であると報告されている¹⁴⁾。マイオネクチンが心筋細胞のアポトーシスに影響するかを検討するために、ラット胎児心筋細胞を用いてリコンビナントマイオネクチン蛋白の存在下と非存在下で培養し低酸素再酸素化によりアポトーシスを誘導した。マイオネクチン蛋白の添加は低酸素再酸素化状態でのTUNEL陽性心筋細胞の数を有意に抑制した (図3)。従って、マイオネクチンは抗アポトーシス作用を有すると考えられた。

2. 4 マイオネクチンは心筋細胞の炎症反応を抑制する

心筋の炎症は虚血再灌流障害の進展に関与することが報告されている¹⁵⁾。マイオネクチンが心筋細胞の炎症応答に影響するかを検討するために、ラット胎児心筋細胞を用いてリコンビナントマイオネクチン蛋白の存在下と非存在下で培養し、LPS添加により炎症を誘導した。炎症応答を炎症性サイトカインの発現にて評価した。マイ

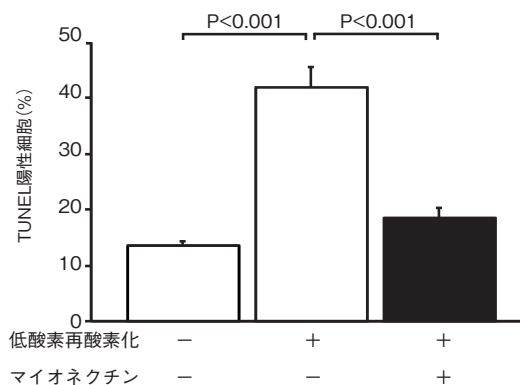


図3 マイオネクチンは心筋細胞のアポトーシスを抑制する
ラット胎児心筋細胞を低酸素再酸素化状態 (12時間の低酸素状態の後に 24時間の再酸素化) あるいは酸素正常状態で、マイオネクチン蛋白 (5 μg/ml) 存在あるいは非存在下で培養した。TUNEL染色を用いてアポトーシスを評価した (n=5)。

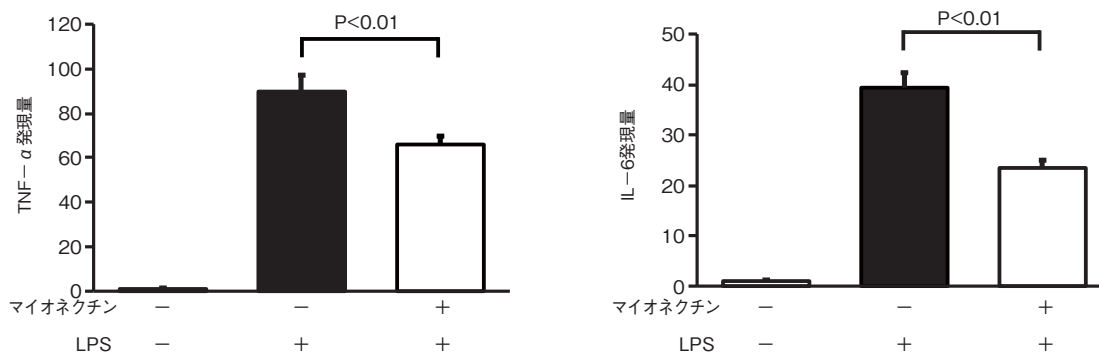


図4 マイオネクチンは心筋細胞の炎症応答を抑制する

ラット胎児心筋細胞をマイオネクチン蛋白 (5 μg/ml) 存在あるいは非存在下で培養し、リボポリサッカライド (LPS) (100ng/ml) で6時間刺激した。サイトカイン (TNF-α, IL-6) 発現 (mRNAレベル) を定量的PCR法で評価した (n=4)。

オネクチン蛋白の添加はLPS誘導性のTNF- α とIL-6の発現を有意に抑制した(図4)。従って、マイオネクチンは抗炎症作用を有すると考えられた。

3. 考 察

本研究では、マウス持久性運動モデルを用いて骨格筋において発現増加を示すマイオネクチンを見出した。マイオネクチンはC1q/TNF-related proteinファミリーに属する分子である。アディポネクチンを含む多くのC1q/TNF-related proteinメンバーが脂肪組織に高発現を示すのに対して、マイオネクチンは骨格筋に高発現しているユニークな蛋白である。培養細胞を用いた分泌実験においてマイオネクチンは分泌蛋白であると考えられた。従って、マイオネクチンは運動誘発性のマイオカインであると示唆された。また、遺伝子欠損マウスを用いた解析により、マイオネクチンは心筋虚血再灌流障害に防御的に作用していた。以上より、マイオネクチンは心保護作用を有するマイオカインであると考えられた。

持久性運動やレジスタンス運動などの運動療法は、虚血性心疾患を含む心血管疾患患者における心血管系機能、代謝系機能、QOLと予後を改善すると考えられている。これまで運動により発現制御されるマイオカインが同定されている。IL-6やIL-15は骨格筋収縮により誘導され、代謝機能を調節するマイオカインとして知られている^{5, 16)}。Fstl1はレジスタンス運動に伴う骨格筋肥大により発現が増加するマイオカインであり、内皮細胞機能障害や心筋虚血障害を改善することが知られている⁸⁻¹⁰⁾。これらのマイオカインと比べて、マイオネクチンは持久性運動により誘導され、心筋虚血障害を改善する特徴を持つマイオカインである。従って、骨格筋でのマイオネクチンの産生を増加させる方法は持久性運動による虚血性心疾患保護作用を模倣できる可能性が示唆された。

培養系の解析により、マイオネクチンが低酸素再酸素化による心筋細胞のアポトーシスを軽減していることから、心筋虚血再灌流障害抑制作用機序の一つとして、抗アポトーシス作用が考えられる。さらには、マイオネクチンは心筋細胞の炎症応答を抑制していたため、マイオネクチンは虚血心筋の炎症反応を阻害して心筋虚血障害を抑制した可能性も考えられる。急性心筋梗塞による心筋障害の抑制にはアポトーシスや炎症反応を軽減することが有用であることが知られている。従って、マイオネクチンは少なくとも心筋細胞に直接作用することにより、アポトーシスや炎症を抑制し、心保護的に作用すると示唆された。また、心筋組織での細胞死や炎症性反応を抑制することは、急性心筋障害のみならず慢性期の心疾患にも有効であると報告されているため、マイオネクチンは、虚血性心疾患の急性期、慢性期の総合的な治療戦略における標的分子になりうると示唆された。

4. 結 論

本研究において、マイオネクチンが持久性運動によって誘発され、心筋保護作用を有するマイオカインであることが明らかとなった。マイオネクチンは心血管病発症の予防戦略における標的分子になりうるだけでなく、マイオネクチン産生増加法は運動を模倣したアプローチとして期待できる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました、公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Matsuzawa Y., Funahashi T., Nakamura T., The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism, *J. Atheroscler. Thromb.*, 18(8) :629-39

- (2011)
- 2) Kodama S., Saito K., Tanaka S., Maki M., Yachi Y., Asumi M., et al., Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis, *JAMA.*, **301** (19) :2024-35(2009)
 - 3) Pedersen B.K., Febbraio M.A., Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **8**(8) :457-65(2012)
 - 4) Ouchi N., Ohashi K., Shibata R., Murohara T., Protective Roles of Adipocytokines and Myokines in Cardiovascular Disease, *Circ. J.*, **80**(10) :2073-80 (2016)
 - 5) Petersen A.M., Pedersen B.K., The anti-inflammatory effect of exercise, *J. Appl. Physiol.*, **98** (4) :1154-62(2005)
 - 6) Bostrom P., Wu J., Jedrychowski M.P., Korde A., Ye L., Lo J.C., et al., A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis, *Nature*, **481** (7382) :463-8 (2012)
 - 7) Ouchi N., Oshima Y., Ohashi K., Higuchi A., Ikegami C., Izumiya Y., et al., Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.*, **283** (47) :32802-11 (2008)
 - 8) Hayakawa S., Ohashi K., Shibata R., Kataoka Y., Miyabe M., Enomoto T., et al., Cardiac myocyte-derived follistatin-like 1 prevents renal injury in a subtotal nephrectomy model, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **26**(3) :636-46(2015)
 - 9) Miyabe M., Ohashi K., Shibata R., Uemura Y., Ogura Y., Yuasa D., et al., Muscle-derived follistatin-like 1 functions to reduce neointimal formation after vascular injury, *Cardiovasc. Res.*, **103**(1) :111-20(2014)
 - 10) Ogura Y., Ouchi N., Ohashi K., Shibata R., Kataoka Y., Kambara T., et al., Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models, *Circulation*, **126**(14) :1728-38 (2012)
 - 11) Seldin M.M., Peterson J.M., Byerly M.S., Wei Z., Wong G.W., Myonectin(CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **287** (15) :11968-80 (2012)
 - 12) Seldin M.M., Lei X., Tan S.Y., Stanson K.P., Wei Z., Wong G.W., Skeletal muscle-derived myonectin activates the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway to suppress autophagy in liver, *J. Biol. Chem.*, **288**(50) :36073-82(2013)
 - 13) Kautz L., Jung G., Valore E.V., Rivella S., Nemeth E., Ganz T., Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism, *Nat. Genet.*, **46**(7) :678-84(2014)
 - 14) MacLellan W.R., Schneider M.D., Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease, *Circ. Res.*, **81**:137-44(1997)
 - 15) Zuidema M.Y., Zhang C., Ischemia/reperfusion injury: The role of immune cells, *World J. Cardiol.*, **2** (10) :325-32(2010)
 - 16) Nielsen A.R., Mounier R., Plomgaard P., Mortensen O.H., Penkowa M., Speersneider T., et al., Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle effect of exercise and muscle fibre type composition, *J. Physiol.*, **584**(Pt 1) :305-12(2007)