主論文の要旨

Muscle-derived follistatin-like 1 functions to reduce neointimal formation after vascular injury

（骨格筋由来の follistatin-like 1 は、血管傷害後の新生内膜形成を低下させる）

名古屋大学大学院医学系研究科　分子総合医学専攻
病態内科学講座　循環器内科学分野
（指導：室原 豊明　教授）
宮部 愛

【目的】

我が国において、心血管病は主要な死亡原因の一つである。病的な血管壁のリモデリングは動脈硬化や冠動脈形成術後の再狭窄の進展に重要な役割を果たしている。心血管病における運動の防御的な作用については多くの報告がなされているが、その詳細なメカニズムに関しては明らかではない。近年、骨格筋は様々な生理活性物質、マイオカインを分泌し、近傍あるいは遠隔の臓器に影響を与えることが報告されている。我々は follistatin-like 1 (Fstl1) が骨格筋肥大によってその発現が上昇するマイオカインであり、心臓や血管内皮機能に有益な作用を発揮する事を示してきた。しかし、Fstl1 の血管リモデリングに対する作用については明らかでなく、今回我々は骨格筋由来の Fstl1 の血管傷害後の血管リモデリングにおける作用を検討した。

【方法】

マウス血管傷害モデル

骨格筋特異的 Fstl1 ノックアウトマウス (Fstl1-KO)は、Cre-lox システムを用いて Fstl1 flox マウスと、骨格筋特異的プロモーターである MCK-Cre トランスジェニックマウスを交配することで作成した。また骨格筋特異的 Fstl1 トランスジェニックマウス(Fstl1-TG)は MCK プロモーターを用いて作成した。

マウス血管傷害モデルは 8 から 12 週齢マウスの左腸骨動脈をワイヤーで擦過して作成した後、3 週間後に解剖し組織学的評価を行った。新生内膜の評価は、ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色により、内膜面積と中膜面積の比（I/M 比）を評価した。

In vivo での細胞増殖の解析

血管傷害モデル作成 1 週間後にマウスの腹腔内に BrdU を投与し、24 時間後に解剖して傷害血管新生内膜中の BrdU 陽性増殖細胞を解析した。

平滑筋細胞増殖と遊走の解析

増殖因子(PDGF-BB, HB-EGF)刺激による大動脈血管平滑筋細胞(HASMCs)増殖に対する FSTL1 蛋白の作用を、細胞数を反映する MTS アッセイと、DNA 合成を反映する BrdU アッセイにて評価した。遊走能分析は、スクラッチアッセイとトランスウェルを透過した細胞をギムザ染色で染色しその数を定量するトランスウェルアッセイにより解析した。

【結果】

生体で Fstl1 の血管傷害後の新生内膜肥厚に対する作用を解明する為に骨格筋特異的 Fstl1-KO マウスと対照マウスに血管傷害モデルを作成した。Fstl1-KO マウスは対照マウスより骨格筋での Fstl1 は 90%低下しており、それに伴いプラズマ Fstl1 レベルも 52%減少していた(図 1A)。術後 3 週目の大腿動脈 H-E 染色像において、Fstl1-KO マウスは対照マウスと比較して I/M 比は有意に上昇していた(図 1B)。また Fstl1-KO マウスは BrdU 陽性細胞も有意に増加していた(図 1C)。

次に Fstl1 の高発現が血管傷害後の血管リモデリングに及ぼす影響を解析する為、

骨格筋特異的 Fstl1-TG マウスと WT マウスに血管傷害モデルを作成した。術後３週目の大腿動脈の H-E 染色像において、Fstl1-TG マウスは WT マウスと比較して I/M 比が著明に低下していた(図 2B)。また Fstl1-TG マウスでは新生内膜中の BrdU 陽性細胞も著明に低下していた。

これらの結果より、骨格筋由来の Fstl1 は、平滑筋細胞増殖を抑制することで、血管傷害後の新生内膜肥厚抑制作用を発揮することが示唆された。

Fstl1 が血管傷害後の新生内膜増殖を抑制する詳細なメカニズム解明のため、新生内膜増殖の主体である血管平滑筋細胞(HASMCs)を用いた in vitro の検討を行った。増殖因子(PDGF-BB, HB-EGF)による HASMCs の増殖促進作用は、ヒト FSTL1 リコンビナント蛋白を投与することで有意に抑制された (図 3A, B)。FSTL1 蛋白の投与は PDGF-BB 刺激による HASMCs の遊走に関しても有意に抑制した（図 3C, D）。HASMCs の増殖、遊走に関与することが報告されている ERK のリン酸化レベルをウェスタンブロット法で評価したところ、FSTL1 蛋白の投与で PDGF-BB 刺激による ERK のリン酸化亢進が有意に抑制された(図 4)。

AMP キナーゼ(AMPK)シグナルは、平滑筋細胞の増殖抑制作用を有することが報告されている。ウェスタンブロット法で AMPK のリン酸化レベルを評価したところ、FSTL1 蛋白の投与により HASMCs の AMPK とその下流シグナル ACC のリン酸化増強を、FSTL1 刺激後５分を最大として時間依存性に認めた(図 5A, B)。次に FSTL1 による HASMCs の増殖抑制作用が AMPK シグナルを介するかを検討するため、ドミナントネガティブ型 AMPK を過剰発現するアデノウイルス(Ad-dn-AMPK)を用いて、HASMCs の増殖作用を検討した。Ad-dn-AMPK により、FSTL1 による AMPK の下流シグナルである ACC のリン酸化が抑制され（図５C）、細胞増殖抑制作用も完全にキャンセルされることが明らかとなった（図５D,E）。また Ad-dn-AMPK により FSTL1 による ERK リン酸化抑制作用もキャンセルされており(図 5F)、FSTL1 は AMPK シグナルを介して HASMCs の増殖抑制作用を発揮することが示された。最後に in vivo においても Fstl1 が AMPK シグナルを介して新生内膜肥厚抑制作用を発揮するかを検討した。まずマウス血管傷害モデルの傷害血管での AMPK と ACC のリン酸化レベルをウェスタンブロット法にて評価すると、AMPK と ACC のリン酸化が Fstl1-KO マウスで対照マウスより低下し(図 6A)、Fstl1-TG マウスでは WT より増強していた(図 6B)。さらに AMPK 阻害剤のコンパウンド C を WT と Fstl1-TG マウスの腹腔内に投与して血管傷害モデルを作成すると、Fstl1-TG マウスで認められた新生内膜増殖減弱は有意にキャンセルされた(図 6C)。以上より、in vivo においても Fstl1 は AMPK を介して新生内膜肥厚を抑制していることが示された。

【結語】

骨格筋由来分泌因子 Fstl1 は AMPK シグナルを介して平滑筋細胞の増殖を抑制することで、血管傷害モデルにおける新生内膜形成を減少させた。Fstl1 は内皮保護作用、心筋保護作用に加えて、血管リモデリングの抑制作用も明らかとなり、今後の心血管病の治療ターゲットとなりうると考えられる。