

主論文の要旨

**Omentin Prevents Myocardial Ischemic Injury
Through AMP-Activated Protein Kinase- and
Akt-Dependent Mechanisms**

（ オメンチンは AMP 活性化プロテインキナーゼ-及び
Akt-依存性メカニズムを介して虚血性心筋障害を抑制する ）

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）

片岡 義之

【背景】

虚血性心疾患は世界中の主要な死因である。肥満合併症は虚血性心疾患の重症度と関連するが、肥満が心疾患の進展にどのように作用するかその分子機構は完全には解明されていない。脂肪組織はアディポカインと呼ばれる様々な生理活性物質を分泌している内分泌器官であり、オメンチンはヒト内臓脂肪に豊富に発現している新規アディポカインとして同定された。血中オメンチン濃度は肥満関連疾患の患者において抑制されており、またその低下は冠動脈疾患の有病率とも関連することからオメンチンは肥満に関連した心血管病に関与することが示唆される。しかし、虚血性心疾患に対する役割については解明されておらず、ここに急性心筋梗塞におけるオメンチンの臨床的意義について評価し、急性虚血性障害に対するヒトオメンチンの作用を検討した。

【結果】

心筋梗塞患者におけるオメンチンと心筋サルベージ及び機能との関連(図 1)

急性心筋梗塞後再灌流療法に成功した 20 人の患者について、急性期 123I-BMIPP と慢性期 99mTc-tetrofosmin を用いたシンチグラムにて心機能と血流欠損を評価したところ心筋梗塞 7 日目の血中濃度は myocardial salvage index 及び慢性期の EF 改善と相関を示した。

ヒトオメンチンのアデノウィルス全身投与はマウス虚血再灌流後の心筋梗塞領域とアポトーシスを減少させる(図 2)

オメンチンの急性虚血性障害への影響を検討するために、野生型マウスにヒトオメンチンアデノウィルス(Ad-Om)を投与し左冠動脈を 60 分間閉塞、その後 24 時間再灌流したところ梗塞領域(IA)/責任領域(AAR)比は著しく減少し、CK 値も低下していた。

次にアポトーシスにおける作用を検討するために虚血再灌流(I/R)24 時間後の心臓組織切片を TUNEL 染色したところ Ad-Om により TUNEL 陽性細胞の減少を認めた。

さらに細胞レベルでの効果を検討するために新生児ラット心筋細胞を用いて心筋細胞に 12 時間の低酸素暴露を行ったところ生理的濃度のオメンチン投与により TUNEL 陽性細胞の減少と、活性型 caspase-3 の抑制を認めた。

虚血心及び心筋細胞においてオメンチンは AMP-Activated Protein Kinase 及び Akt を活性化する(図 3)

AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)及び Akt は虚血性障害に対し保護的に作用することが報告されているため、I/R 手術後の心臓でリン酸化について評価した。I/R により AMPK 及び Akt のリン酸化亢進を認めたが、Ad-Om によりその反応はさらに増強した。また心筋細胞にオメンチンを添加したところ AMPK 及び ACC、Akt のリン酸化が亢進した。

AMPK 及び Akt はオメンチンの心筋障害抑制効果に関与する(図 4・5)

AMPK の抗アポトーシス効果への関与を検討するために、培養心筋細胞に dominant-negative mutant AMPK(Ad-dnAMPK)を導入した。Ad-dnAMPK により Akt のリン酸化には影響を及ぼすことなくオメンチン刺激による ACC のリン酸化と

アポトーシス抑制効果の減弱をみせた。さらにマウスに AMPK 阻害剤である compound C を腹腔内投与したところ Akt のリン酸化に影響を及ぼすことなく Ad-Om による ACC リン酸化亢進と梗塞範囲、アポトーシスの減少効果を阻害した。

次に Akt についても検討するために心筋細胞に dominant-negative mutant Akt(Ad-dnAkt)を導入した。Ad-dnAkt の導入により AMPK のリン酸化には影響を及ぼすことなくオメンチン刺激による GSK-3 のリン酸化とアポトーシス抑制効果の減弱をみせた。さらにマウスに PI3-kinase 阻害剤である LY294002 を腹腔内投与したところ AMPK のリン酸化に影響を及ぼすことなく Ad-Om による GSK-3 リン酸化亢進を抑制した。また、梗塞範囲と心筋細胞のアポトーシス減少作用も阻害した。

インテグリン $\alpha V\beta 3$ は心筋細胞に発現している主要なインテグリンの一つであり、様々な細胞において Akt 依存的 survival pathway を活性化する。そこで心筋細胞をインテグリン $\alpha V\beta 3$ の中和抗体とともに培養したところオメンチンによる Akt リン酸化亢進は抑制されたが、AMPK 活性化には影響を及ぼさなかった。また、低酸素暴露におけるアポトーシス抑制効果も阻害された。

リコンビナントオメンチンタンパクは I/R 後の心筋梗塞範囲を減少させる(図 6)

マウスに対して虚血 5 分前または再灌流 5 分後にリコンビナントタンパクの血管内単回投与を行ったところ虚血前にオメンチンを投与することで I/R 後の心筋梗塞範囲と心筋細胞のアポトーシスは減少した。同様に再灌流後の投与においても梗塞範囲は減少した。さらに、虚血前後のどちらにおいても AMPK 及び Akt のリン酸化は亢進していた。

脂肪特異的オメンチン過剰発現マウスは心筋虚血再灌流障害に保護的である(図 7)

ヒトオメンチンは内臓脂肪に豊富に発現しているが、マウスでは主に小腸で検出される。そこで脂肪由来のオメンチンの効果を検討するためにヒトオメンチン遺伝子を過剰発現させたマウスを作成した(脂肪特異的 TG マウス)。このマウスにおいても IA/AAR 比は著しく減少し、アポトーシス細胞も減少した。

【考察】

この研究はアディポカインであるオメンチンの心臓急性虚血への保護作用に関する最初の報告である。臨床においては急性心筋梗塞後の患者における血中オメンチン濃度はその後の心筋障害及び機能の改善と関連していた。マウスにおいてアデノウィルスまたは遺伝子過剰発現、タンパク投与によるオメンチン濃度の増加により再灌流後の心筋障害は減少する。これらの結果からオメンチン濃度を増加させることは急性心筋障害の予防及び治療に有益であると考えられる。

心筋細胞のアポトーシス抑制は虚血性心疾患の重要な治療標的である。今回の研究においてオメンチンは I/R による心筋アポトーシスを抑制し、また in vitro においてストレス誘導性の心筋細胞のアポトーシスを抑制した。従って、オメンチンの I/R 後の心筋梗塞範囲の減少能力は少なくとも一部には心臓におけるアポトーシスの減少に依存している。

AMPK 及び Akt は細胞のアポトーシスを調節するシグナル分子である。オメンチンは培養心筋細胞及びマウス虚血心において AMPK 及び Akt の活性化を促進したが、それらは相互に影響を及ぼすことなく作用したことからオメンチンは AMPK 及び Akt を介した 2 つの独立した **pro-survival pathway** を促進することにより虚血性傷害から心臓を保護していると考えられる。

オメンチンは当初ガラクトフラノース結合レクチンとして同定されているが、ヒトとマウスでは糖鎖結合特異性が異なる。ヒトオメンチンは三量体を形成するが、マウスでは単量体として存在する。またヒトでは内臓脂肪に豊富に発現しているがマウスでは小腸に特異的に発現している。これらより、ヒトオメンチンはマウスとは異なる機能を有する可能性がある。我々の研究では、脂肪特異的ヒトオメンチン過剰発現により虚血性心筋障害及びアポトーシスは効果的に抑制された。マウス脂肪細胞由来のヒトオメンチン血中濃度は健常人におけるそれと類似しており、さらに生理的濃度のヒトオメンチンは *in vitro* での心筋細胞のアポトーシスの減少に効果的であった。これらより、ヒトオメンチンは傷害心筋に対し有益な反応を及ぼす重要なアディポカインとしてふるまい、肥満状態によるオメンチンの減少は心臓における虚血性傷害を悪化させるものとする。

【結語】

今回オメンチンが AMPK-及び Akt 依存性メカニズムを介して I/R によるアポトーシスを抑制し、急性心筋障害に対し保護的に作用することを見出した。またマウスモデルにおいて虚血による心筋傷害へのヒトオメンチン単回投与の有効性を示し、これは、オメンチンの臨床応用の可能性を示唆する。さらに我々はこれまでに冠動脈疾患の患者において血中オメンチンレベルが減少していることを示しており、これらの結果からオメンチンは虚血性心疾患の予防及び治療の新規標的分子であると考えられる。