

主論文の要旨

**C1q/Tumor Necrosis Factor-Related Protein 9
Protects against Acute Myocardial Injury through an
Adiponectin Receptor I-AMPK-Dependent Mechanism**

急性心筋傷害に対する、AdipoR1-AMPKメカニズムを介した
C1q/Tumor Necrosis Factor-Related Protein 9の
保護的効果に関する検討

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)

神原 貴博

【緒言】

我が国では、心臓病は罹患率、死亡率ともに高く、その病態解明及び有効な治療法の確立は最重要課題である。また、肥満症、特に内臓脂肪の過剰蓄積は心血管病の重要な発症基盤であることが知られている。肥満状態では、生活習慣病を引き起こすアディポサイトカインの産生が増加し、一方で、アディポネクチンなどの生活習慣病に防御的に作用するアディポサイトカインの産生は低下し、これらの分泌異常が、生活習慣病の病態において、中心的役割を果たしていると考えられるようになってきた。我々は、アディポネクチンが強力な抗炎症作用を有し、虚血性心疾患などの心血管病に防御的に働くことやその分子メカニズムを明らかにしてきた。

今回、機能未知であるアディポサイトカインの同定と機能解析に関わる研究の過程で、分子構造上、C末端領域に collagen like domain と c1q like domain を持ち、アディポネクチンパラログとして分類されている C1q/TNF-related protein (CTRP) family に注目した。中でも、アディポネクチンとアミノ酸配列の相同性が最も高い CTRP9 に着目した。これまで、CTRP9 は糖代謝改善作用や血管内皮保護作用 (vasorelaxation) を有することが報告されている。私は、心臓の虚血再灌流障害において、CTRP9 がアポトーシスを抑制し保護的作用を発揮することを報告した。しかしながら、生体内での CTRP9 の役割について、いまだ不明な点が多い。このため、CTRP9 ノックアウト(KO) マウスを用いて、詳細に検討することとした。

【方法および結果】

本実験では、12 週齢の CTRP9-KO マウスと C57BL/6 を用いて検討を行った。これらのマウスは、12 週齢時点で形態的・血行動態的に有意な差を認めなかった。マウスの腹腔内に炎症惹起作用を有する lipopolysaccharide (LPS) を投与すると、腹腔内脂肪の CTRP9 遺伝子発現レベルと血中 CTRP9 濃度は有意に低下した。また、LPS 投与 6 時間後の心臓超音波検査による検討では、LPS 投与により有意な収縮障害を認め、この変化は CTRP9-KO で有意に悪化した(Fig.1-C)。アデノウィルスを用い CTRP9 過剰発現させたマウスでは、LPS 投与による心筋収縮障害が有意に抑制された(Fig.1-E)。心筋組織中の炎症性変化や酸化ストレスを確認するため、TNF- α や IL-6、gp91phox などを含む NADPH oxidase components の mRNA 発現レベルを、RT-PCR 法を用いて検討したところ、CTRP9-KO において有意に発現が亢進していた(Fig.1-F)。また、CTRP9-KO の心臓に虚血再灌流障害を加えたところ、C57BL/6 に比べ、心筋梗塞範囲が有意に拡大した(Fig.2-A)。これらの心筋組織中の TNF- α の mRNA 発現は、CTRP9-KO で有意な上昇を示した(Fig.2-D)。私は、過去に CTRP9 の抗アポトーシス作用が AdipoR1-AMPK シグナルを介することを報告していたため、CTRP9-KO における AMPK シグナルをウェスタンブロット法によって検討したところ、LPS 刺激によって心筋組織中で認められる AMPK シグナルの亢進が、CTRP9-KO 心筋組織中では減弱していた(Fig.5-A)。また、CTRP9 を過剰発現させることによって、LPS 刺激による AMPK シグナルの亢進が有意に増強された(Fig.5-B)。ドミナントネガティブ AMPK を筋肉特

異的に過剰発現させたマウス(dnAMPK-TG)では、LPS 心筋障害に対する CTRP9 の保護的効果は減弱された(Fig.5-D)。dnAMPK-TG では、CTRP9 による炎症系サイトカインの mRNA 発現レベルの抑制効果は解除された(Fig.5-E)。AdipoR1-KO マウスを用いて同様の実験を行ったところ、LPS 心筋収縮障害に対する CTRP9 の保護的効果は得られなかった(Fig.6-E)。また、AdipoR1-KO マウス傷害心筋組織中の AMPK シグナルを確認したところ、CTRP9 によるシグナル亢進が減弱していた(Fig.6-D)。また、LPS 投与に伴う心筋組織の炎症系サイトカイン mRNA 発現を抑制する CTRP9 の作用は、AdipoR1-KO マウスでは認められなかった(Fig.6-F)。

In vivo で認められた CTRP9 のこれらの作用が、心筋細胞に対する直接的な作用なのかを検討するため、ラット胎児心筋細胞を用いた。LPS 刺激によって、心筋細胞の炎症系サイトカイン mRNA 発現レベルは上昇するが、CTRP9 によってこの上昇は有意に抑制された(Fig.3-A)。次に、CTRP9 の抗炎症効果は、ドミナントネガティブ AMPK を発現したアデノウイルスを用いて AMPK シグナルを遮断したり、SiRNA を用いて AdipoR1 を抑制したりすることで、減弱することが明らかになった(Fig.4-B、6-B)。また、SiRNA を用いて AdipoR1 を抑制することで、CTRP9 による、心筋細胞内の AMPK シグナル亢進作用は減弱することが示された(Fig.6-A)。これらの結果から、心筋障害における CTRP9 の保護的効果は、AdipoR1-AMPK メカニズムを介して発揮される抗炎症効果を介して発揮されることが示唆された。

【考察】

本研究は、内在性のCTRP9が急性心筋障害に対して保護的作用を発揮することを示した初めての報告である。CTRP9の遺伝子欠損は、LPS投与に伴う心筋傷害を悪化させることを示した。また、虚血再灌流障害に伴う心筋梗塞範囲を拡大させることを示した。これらの急性心筋傷害に伴う炎症性変化がCTRP9の遺伝子欠損によって悪化することを示した。一方で、CTRP9の過剰発現モデルを用いて、これらの急性心筋傷害が抑制され、これらの心筋組織中の炎症性変化が抑制されることを示した。これらのことから、様々な急性心筋傷害に対する、CTRP9の保護的効果は、過去に行ったアポトーシスを抑制する作用に加えて、炎症性変化を抑制することによっても発揮されると考えられる。

私は、過去の報告において傷害に伴うアポトーシス抑制作用がAdipoR1-AMPKシグナルを介することを報告している。このため、AdipoR1-AMPKシグナルに注目した。まず、AMPKシグナルを抑制することで、CTRP9のもつ抗炎症効果が減弱することを示した。また、AdipoR1遺伝子発現の抑制は、CTRP9によるAMPKシグナル亢進作用を抑制し、CTRP9による抗炎症効果を減弱することを示した。これらのことから、CTRP9はAdipoR1-AMPKシグナルを介して、抗炎症作用を発揮することが示唆された。

【結語】

CTRP9の遺伝子欠損によって、急性心筋傷害に伴う、心筋組織の炎症性変化は増悪

し、心筋傷害が悪化することが明らかになった。CTRP9の保護的作用は、AdipoR1-AMPKシグナルを介して発揮されることが示された。これらのことから、様々な心筋傷害に対し、CTRP9を増加させる治療戦略が有用である可能性が示唆された。