

主論文の要旨

Myonectin Is an Exercise-Induced Myokine That Protects the Heart From Ischemia- Reperfusion Injury

運動誘発性マイオカインであるマイオネクチンは
虚血再灌流障害に対して心臓を保護する

名古屋大学大学院医学系研究科 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)

大高 直也

【背景】

先進国において、急性冠症候群を代表とする虚血性心疾患は主要な死因の一つである。運動療法は心血管系を含む様々な臓器に保護的効果を示す。持続性運動は、心血管疾患のリスクを軽減させるだけでなく、虚血性心疾患においては、心機能や生命予後を改善することが知られている。しかし、その分子メカニズムに関しては、十分に解明されていない。

近年、骨格筋はマイオカインと称される生理活性物質を分泌し、近傍や遠隔臓器に影響を与える内分泌臓器として、注目されている。代謝あるいは心血管病に影響するマイオカインとして、Interleukin-6 (IL-6)や Follistatin-like 1 等の報告があるが、持続性運動にて発現が上昇し、心血管保護的に働くマイオカインは未だ報告されていない。

マイオネクチン/C1q/TNF-related protein 15 は、コラーゲン様ドメインと C1q ドメインを有するアディポネクチンパラログである CTRP ファミリーに属する。アディポネクチンをはじめとする CTRP ファミリーメンバーの多くは脂肪組織において高発現を示すが、マイオネクチンは骨格筋（特にタイプI筋線維）に高発現し、持続性運動にて骨格筋および血中で発現が上昇する。これまでに、マイオネクチンは、脂肪細胞や肝細胞での遊離脂肪酸の取り込み促進や鉄代謝に関与していることが報告されているが、心血管疾患における役割についての報告はない。本論文では、心筋虚血再灌流障害に対するマイオネクチンの効果を検討した。

【結果】

マイオネクチン欠損マウスは心筋虚血再灌流障害の悪化を示す (Fig1)

野生型マウスとマイオネクチン欠損マウスの左前下行枝を 60 分間結紮し、再灌流 24 時間後に評価した。マイオネクチン欠損マウスは、野生型マウスに比して再灌流後の梗塞範囲の増加と血中トロポニンの有意な上昇を認めた。また、術後 7 日目の心臓超音波検査では、マイオネクチン欠損マウスにおいて、左室短縮率が有意に低値を示した。心筋梗塞巣形成に重要であるアポトーシスへの効果を評価するため、心筋組織の TUNEL 染色を行ったところ、マイオネクチン欠損マウスでは、野生型マウスに比して虚血心筋において有意に TUNEL 陽性細胞が増加を示した。さらに、マイオネクチン欠損マウスでは、虚血再灌流後の心筋組織の TNF α や IL6 などの炎症性サイトカインの発現も増加していた。

持続性運動による虚血心筋障害改善作用へのマイオネクチンの関与 (Fig2)

持続性運動による心筋虚血再灌流後の梗塞範囲縮小効果にマイオネクチンが関与しているかを検討するため、野生型マウスとマイオネクチン欠損マウスに 4 週間のトレッドミル運動を行い、その後、心筋虚血再灌流手術を行った。野生型マウスの運動群では、非運動群と比して、マイオネクチンの血中濃度が約 2.5 倍に上昇し、虚血再灌流後の梗塞範囲の有意な減少を認めた。一方、マイオネクチン欠損マウスでは野生型マウスで認められたトレッドミル運動後の梗塞範囲の縮小効果は消失していた。また、

マイオネクチン欠損マウスでは野生型マウスに比して、運動後の虚血心筋組織での TUNEL 陽性細胞数と炎症性サイトカイン発現の抑制効果が消失していた。

マイオネクチン過剰発現マウスは心筋虚血再灌流障害の改善を示す (Fig3)

骨格筋由来のマイオネクチンの心筋虚血障害への影響を検討するため、MCK プロモーターを用いて、骨格筋特異的なマイオネクチン過剰発現マウスを作成した。マイオネクチン過剰発現マウスの血中マイオネクチン濃度は、野生型マウスに比し約 3 倍に上昇していた。マイオネクチンの心臓での発現はほとんど認めなかった。マイオネクチン過剰発現マウスに虚血再灌流障害手術を行うと、野生型マウスと比較して梗塞範囲が著明に減少し、虚血領域のアポトーシス陽性細胞数と炎症性サイトカインの発現も減少していた。

マイオネクチンの cAMP/Akt 経路を介した抗アポトーシスおよび抗炎症効果 (Fig4,5)

培養心筋細胞を用いて TUNEL 染色を行ったところ、低酸素/再酸素化刺激に伴い増加するアポトーシスを、マイオネクチン蛋白の添加が用量依存的に抑制した。また、マイオネクチン添加により、Akt と GSK および cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化の亢進を認めた。ドミナントネガティブ Akt を用いて Akt シグナルを阻害したところ、マイオネクチンの抗アポトーシス作用は解除された。また、アデニルシクラーゼ阻害剤である SQ22536 による前処置を行うと、マイオネクチンの Akt のリン酸化亢進作用は減弱し、心筋細胞に対する抗アポトーシス作用も解除された。

培養マクロファージにおけるマイオネクチン添加の前処置は LPS (リポ多糖類) 刺激により増加した TNF α や IL6 の発現を用量依存的に抑制した。マイオネクチンは、LPS 添加に伴う NF κ B のリン酸化亢進も有意に抑制した。また、心筋細胞同様、マクロファージにおいても Akt、CREB のリン酸化を亢進し、Akt シグナルの阻害は、マイオネクチンの LPS 添加に伴う TNF α 発現抑制作用を解除した。さらに、SQ22536 による前処置は、マイオネクチンの Akt リン酸化亢進作用を減弱させ、マクロファージに対する抗炎症作用を解除した。

マイオネクチンのスフィンゴシン 1 リン酸を介した抗アポトーシスおよび抗炎症効果 (Fig6,7,8)

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、虚血心筋障害におけるアポトーシスと炎症応答を抑制することが報告されているため、S1P の関与について検討した。培養マクロファージおよび培養心筋細胞にマイオネクチンを添加したところ、培養上清中の S1P が有意に上昇した。また、S1P レセプター阻害剤である VPC23019 の前処置は、マイオネクチン添加に伴う Akt と CREB のリン酸化亢進を抑制し、マイオネクチンの抗炎症作用と抗アポトーシス作用を解除した。siRNA を用いてスフィンゴシンから S1P を合成する酵素であるスフィンゴシンキナーゼを阻害したところ、マイオネクチンの抗炎

症作用と抗アポトーシス作用は解除された。

マイオネクチンの S1P 経路の関与を *in vivo* で確認するため、野生型マウスとマイオネクチン過剰発現マウスに、VPC23019 の腹腔内投与を行い、虚血再灌流障害手術を作成したところ、マイオネクチン過剰発現マウスで見られる虚血に伴う Akt、CREB のリン酸化亢進は抑制され、マイオネクチン過剰発現マウスで認められた心筋梗塞範囲の減少効果は消失した。

【考察】

今回我々は、持続運動誘発性マイオカインであるマイオネクチンが心筋保護的に働くことを初めて明らかにした。マイオネクチンは持続運動により骨格筋より分泌され、内分泌的に心臓に作用し心保護効果をもたらすものと考えられた。マイオネクチンは心筋細胞およびマクロファージにおいて、S1P の分泌を促進し、オートクラインあるいはパラクライン的に S1P レセプターに作用して cAMP/Akt 経路を活性化することで、心筋細胞において抗アポトーシス作用を、マクロファージにおいては抗炎症効果を発揮すると考えられた。

マイオネクチンは運動を模倣する心血管病の治療開発に対する標的分子となり得ると考えられた。

【結論】

マイオネクチンは、持続運動誘発性のマイオカインであり、S1P/cAMP/Akt 経路を介して心筋細胞のアポトーシスとマクロファージの炎症を抑制し、心筋虚血障害を抑制すると示唆された。