



Title	心不全における骨格筋異常を標的とした脳由来神経栄養因子による新規治療法の開発 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	松本, 純一
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13032号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70560
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2411
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Junichi_Matsumoto_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 松本 純一

学位論文題名

心不全における骨格筋異常を標的とした脳由来神経栄養因子による新規治療法の開発
(Development of novel treatment targeting skeletal muscle abnormalities in heart failure by
brain-derived neurotrophic factor)

【背景と目的】心不全患者の運動耐容能は低下しており、心不全の重症度および予後と密接に相関する。運動耐容能は心機能、肺機能、骨格筋機能によって規定されるが、運動においては特に骨格筋機能が重要な役割を果たしている。筋運動のエネルギー源である ATP はミトコンドリアで主に産生され、心不全患者における骨格筋ミトコンドリア機能の維持が不可欠である。運動トレーニングは運動耐容能および末梢骨格筋異常を改善することで予後の改善に寄与する唯一の治療法であるが、重症心不全患者では身体活動が高度に制限されて十分な運動トレーニングを行えない場合が多くあり、薬物治療の開発が必要とされている。骨格筋は動作を生み出すだけでなく、全身性の代謝調節に関わっていることが明らかになりつつある。骨格筋は種々の液性因子を放出しており、これらはマイオカインと総称されている。マイオカインと骨格筋ミトコンドリア機能との関連を報告した研究はこれまでになく、これまでに提唱されているマイオカインの候補の中で、ミトコンドリアが豊富な遅筋線維に多く発現している脳由来神経栄養因子 (BDNF) に着目した。BDNF は運動により血中に一過性に発現されることからマイオカインとして提唱されているが、骨格筋細胞から直接分泌していることを示した研究はこれまでに存在しない。また BDNF は骨格筋培養細胞レベルで脂肪酸酸化を亢進することが報告されているが、生体における役割は不明であり、BDNF が骨格筋ミトコンドリア機能を制御できるかはこれまでに検証されていない。本研究は、「マイオカインである BDNF が運動耐容能および骨格筋ミトコンドリア機能の制御に重要な役割を果たしている」という仮説を立て、実験を行った。

【材料と方法】C2C12 骨格筋細胞にカフェインを添加し、筋小胞体からのカルシウム放出を活性化することにより骨格筋収縮を誘発した。対照群およびカフェイン添加群の培養上清を回収して濃縮し、質量分析を行った。また、対照群およびカフェイン添加群の時間経過解析を行い、骨格筋細胞の BDNF タンパクおよび mRNA 発現、培養上清の BDNF タンパク発現を評価した。次に、雄性 C57BL/6J マウスを全身麻酔、人工呼吸器使用下で開胸し、左冠動脈結紮による心筋梗塞 (MI) を作成した。対照群として、冠動脈結紮のみを行わない sham 手術を行った。手術から 2 週後に心エコーによる心機能評価、トレッドミルによる運動能力評価、免疫組織化学染色、高感度ミトコンドリア呼吸能解析装置によるミトコンドリア機能解析、免疫ブロット法による骨格筋 BDNF タンパク発現の観察を行った。次に MI および sham 手術 2 週後から組換えヒト BDNF (rhBDNF) の皮下投与を 2 週間行い、手術から 4 週時点で心エコー、トレッドミル、ミトコンドリア機能解析、電子顕微鏡によるミトコンドリアの量および大きさの観察、免疫ブロット法による AMPK α 、PGC1 α 、脂

脂肪酸代謝に関連するタンパク発現の評価を行った。

【結果】骨格筋細胞の培養上清を質量分析で解析したところ、カフェイン添加群の培養上清から BDNF が検出された。BDNF が骨格筋細胞から直接分泌していることを定量評価するために、カフェインを添加した培地で最大 24 時間まで培養した。培養上清および細胞を回収して解析したところ、カフェイン添加群の培養上清では対照群と比較して有意に BDNF タンパク発現が増加した。骨格筋細胞の *Bdnf* mRNA も同様の時間経過で増加しており、転写レベルで分泌が制御されている可能性が示唆された。抗 BDNF 抗体を用いた蛍光免疫染色で、細胞の端で BDNF が環状に存在しており、エキソサイトーシスによる分泌、エンドサイトーシスによる取り込みの可能性が示唆された。これらの結果より、BDNF が骨格筋収縮によってマイオカインとして分泌されることが示され、このことを外因的に模擬するために骨格筋細胞に rhBDNF を添加したところ、リン酸化 AMPK α および PGC1 α のタンパク発現が増加し、BDNF が生体でミトコンドリア機能を制御しうる可能性が示唆された。

次に、心不全モデルマウスの運動能力および骨格筋機能評価を行うため、MI 手術から 2 週後に評価を行った。トレッドミルで評価した MI マウスの運動能力は sham マウスと比較して低下しており、また MI マウスの腓腹筋でミトコンドリア呼吸能の低下、BDNF タンパク発現の低下を認めた。これらの結果を踏まえて、手術から 2 週後の MI マウスに rhBDNF 投与を 2 週間行ったところ、骨格筋 BDNF タンパク発現が増加し、運動能力の改善を認めた。この機序として、骨格筋でのリン酸化 AMPK α および PGC1 α のタンパク発現の改善、ミトコンドリア生合成の亢進による骨格筋ミトコンドリア量の改善、骨格筋線維のミトコンドリア呼吸能改善、骨格筋内中性脂肪のターンオーバー改善、骨格筋での脂肪酸取り込み関連タンパクおよび電子伝達フラビンタンパクの改善による脂肪酸酸化の亢進が関与していることが明らかとなった。

【考察】本研究において、骨格筋培養細胞を用いて質量分析およびウェスタンブロット法を行い、筋収縮により合成された BDNF がマイオカインとして骨格筋から分泌されることが初めて明らかとなった。

疾患モデルの骨格筋でマイオカインが発現変化していることを示した報告はほとんどなく、MI マウスの骨格筋で BDNF の発現が低下していることを初めて証明した。MI マウスの心筋で BDNF の発現が亢進しており、先行研究でも心筋 *Bdnf* mRNA が低下しているにも関わらず、BDNF タンパク発現が亢進していると報告されている。MI マウスの骨格筋で BDNF タンパク発現が低下する機序は明らかにできなかったが、身体活動量の低下やカルシウムハンドリング異常による BDNF 発現低下の可能性、もしくは骨格筋から心筋へと BDNF が内分泌されて取り込まれて、心筋に対して保護的に働いている可能性がある。

マイオカインを用いて疾患モデルの治療を行った報告はこれまで存在しない。マウス骨格筋で BDNF はミトコンドリアが豊富な遅筋線維に多く発現していた。BDNF が骨格筋でミトコンドリア機能を制御するという仮説を基に、MI 後心不全モデルマウスに rhBDNF を全身投与し、身体活動度の増加なしに運動能力の改善、骨格筋ミトコンドリア機能を改善することができた。この機序として AMPK α -PGC1 α 経路の活性化によるミトコンドリア生合成および脂肪酸酸化の亢進が関わることが明らかとなった。

【結論】BDNF は骨格筋から分泌されるマイオカインであり、MI 後心不全モデルマウスに rhBDNF を投与することで、骨格筋での AMPK α -PGC1 α 経路の活性化によりミトコンドリア生合成および脂肪酸酸化が亢進し、運動能力の改善を認めた。BDNF は心不全に伴う運動能力低下、骨格筋異常に対する治療標的となる可能性が示唆された。