



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	松本, 純一
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2411 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13032号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70561
Type	doctoral thesis
File Information	Junichi_Matsumoto_summary.pdf



学位論文（要約）

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)

2018 年 3 月

北海道大学

松本 純一

1. 緒言

慢性疾患を有する患者は運動耐容能が低下しており、運動耐容能の低下と予後不良は密接に相関する。特に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は ATP であるが、生体内に蓄積されている ATP は少なく常に合成される必要があり、ミトコンドリアが重要な役割を果たしている。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はなく、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 は元々神経成長因子として報告され、神経系の成長や発達、意地に関与するとされている。骨格筋と BDNF との関連を報告した研究は少数であり、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。血液中の BDNF 発現増加は運動直後の一過性のみであり、急性運動による血中 BDNF の増加がどの組織から放出されたものかは不明であり、運動により BDNF が増加することの生理作用も不明である。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。

2. 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 、脂肪酸代謝に関連するタンパク発現の評価を行った。

3. 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、骨格筋細胞の端で 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。MI 手術後 2 週での生存率は 52% で、ほとんどが心不全や心破裂で死亡していた。MI 後 2 週の心不全マウスの心重量および肺重量は対照群と比較して有意に増加していた。MI マウスの骨格筋重量は対照群と比較して低下傾向にあるものの有意な差ではなかった。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いた。MI マウスの腓腹筋で対照群と比較して有意にミトコンドリア呼吸能および BDNF タンパク発現の低下を認めた。また、ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE) で評価した BDNF タンパク複合体のタンパク発現も MI マウスの骨格筋で有意に低下していた。

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。MI+rhBDNF 群のマウスは、sham+vehicle 群および MI+vehicle 群と比較して有意に体重が減少した。MI+rhBDNF 群では MI+vehicle 群と比較して、骨格筋 BDNF タンパク発現が有意に増加し、運動能力が有意に改善した。この機序として、骨格筋でのリン酸化 AMPK α および PGC1 α のタンパク発現が改善し、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。

4. 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。この原因は今回の研究では明らかにできなかったが、他の臓器との内分泌連関による発現変化や、本研究では検出できなかった身体活動量や筋収縮の差による可能性などが考えられる。

マイオカインを投与することで疾患モデルの治療を行った報告はこれまで存在しない。マウスの骨格筋で 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、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。本研究の問題点として、マウスでの内因性血中 BDNF を検出できなかったこと、骨格筋特異的 BDNF ノックアウトマウスを用いた研究が行えなかったこと、rhBDNF 長期投与による有害事象の検討ができなかったことなどがあげられる。

5. 結論

BDNF が骨格筋から分泌されるマイオカインであることを示し、MI 後心不全モデルマウスで骨格筋の BDNF タンパク発現が低下することを証明した。この 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 経路の活性化によるミトコンドリア生合成および脂肪酸酸化の亢進を介して、骨格筋ミトコンドリア呼吸能および運動能力が改善した。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。