



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	心不全における骨格筋異常の発症にキサンチンオキシダーゼが果たす役割の解明 [全文の要約]
Author(s)	南部, 秀雄
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：2473 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13459号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74723
Type	doctoral thesis
File Information	Hideo_Nambu_summary.pdf



学位論文 (要約)

心不全における骨格筋異常の発症に
キサンチンオキシダーゼが果たす役割の解明

**(Elucidating the role of xanthine oxidase
in the development of skeletal muscle abnormality
in heart failure)**

2019 年 3 月

北海道大学

南部 秀雄

学位論文 (要約)

心不全における骨格筋異常の発症に
キサンチンオキシダーゼが果たす役割の解明

**(Elucidating the role of xanthine oxidase
in the development of skeletal muscle abnormality
in heart failure)**

2019 年 3 月

北海道大学

南部 秀雄

【背景と目的】

心不全は予後不良の症候群で、原因の多くは心筋梗塞（MI）などの虚血性心疾患による。心不全の独立した予後の規定因子として運動耐容能が知られている。心不全患者およびモデルマウスの骨格筋ではミトコンドリア機能を含むエネルギー代謝異常、筋萎縮が生じ、運動耐容能の低下に大きく関わっている。現在、骨格筋異常に対する治療法は運動療法のみであるが、重症な心不全患者はその重症度から十分な運動療法を行うことができない。したがって、運動療法の代替となる新規薬物治療法の確立が必要である。

これまで当研究室では、MI 後心不全モデルマウスの慢性期における骨格筋で活性酸素種（ROS）が増加し、骨格筋異常に関与することを報告してきた。しかし、ROS の増加が骨格筋異常の発症にどのように関与するかは不明なままである。

Xanthine oxidase（XO）は xanthine dehydrogenase と共に xanthine oxidoreductase（XOR）の一つの形態である。XOR は尿酸生成の最終代謝酵素であるが、XO のみ、その酵素反応で ROS を産生する。また、心筋組織等で XO は低酸素曝露で活性化することが知られている。さらに、糖尿病モデルや悪性腫瘍によるカヘキシアモデルマウスでは骨格筋で XO 由来の ROS 産生（XO-ROS）が増加し、ミトコンドリア障害や筋萎縮に関連することが報告されているが、心不全の骨格筋異常との関連は明らかではない。

以上の知見から、「MI 後の低酸素による XO-ROS の増加が骨格筋異常を発症させ、それを抑制することで骨格筋異常を予防もしくは治療できる」と仮説を立てた。

本研究は慢性期に運動耐容能の低下をきたす MI 後心不全モデルマウスを用いて、①「骨格筋が MI 後に低酸素状態になっているか、XO-ROS が増加しているか」、②「MI マウスにおける XO-ROS の抑制が骨格筋異常および運動耐容能の低下を改善ができるか」、③「骨格筋機能や運動耐容能を改善することができた場合に、どのような機序であるか」の 3 点を明らかにすることを目的とし、検証した。

【方法および結果】

10-12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの左冠動脈を結紮することにより MI を作成し、心不全モデル（MI 群）とした。また、偽手術をしたコントロール群（Sham 群）を設定し、以下 3 つの実験を行った。

実験 1 として、MI 後の骨格筋 XO-ROS の検討を行った。まず、MI 後に骨格筋が低酸素状態になっているかどうかを評価するため、低酸素の代表的なマーカーである carbonic anhydrase 9（Car9）の mRNA レベルを real time-PCR 法により測定し、術後の経時的変化の検討を行った。MI 群の Car9 mRNA 発現は Sham 群と比較し、術後 12 時間の時点で有意に増加していた。次に、MI 後の骨格筋における XO-ROS の経時的変化を評価した。XO-ROS 産生は基質であるキサンチン添加時の過酸化水素

の産生量を測定した。MI 群における XO-ROS は Sham 群と比較し、術後 1 日から 7 日までの急性期で有意に増加した。一方で、術後 14 日から 28 日の慢性期には MI 群と Sham 群の間に差はなかった。また、急性期における XO-ROS は遅筋線維で速筋線維と比較し有意に増加していた。

実験 2 として、MI 後に XO-ROS が増加する急性期のみの XO 阻害薬 (febuxostat) の投与が骨格筋異常および運動耐容能の低下に及ぼす影響を検討した。Sham+vehicle (Sham+Ve) と MI+vehicle (MI+Ve), MI+febuxostat (MI+Feb) の 3 群において、febuxostat (5 mg/kg 体重/日) もしくは vehicle を手術 24 時間前、1 時間前と手術後 1 日から 7 日に強制飲水法で投与した。その後、MI 後の慢性期である術後 4 週に心機能、運動能力、骨格筋ミトコンドリア機能等を測定した。左室重量や心エコーで評価した左室内径は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し有意に増加し、左室内径短縮率は有意に減少したが、MI+Feb 群と MI+Ve 群とでは左室重量や心エコー指標に差はなかった。トレッドミルテストで評価した運動耐容能は MI+Ve 群で Sham+Ve 群に比較して有意に低下したが、MI+Feb 群では MI+Ve 群に比較し有意に改善した。高感度オキシグラフィーを用いて評価した骨格筋ミトコンドリア呼吸能は MI+Ve 群で Sham+Ve 群で有意に低下したが、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し有意に改善した。透過型電子顕微鏡で評価した骨格筋ミトコンドリアの形態的損傷は、MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し損傷ミトコンドリア面積が増加したが、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し有意に改善した。

また、遅筋線維の代表であるヒラメ筋重量や遅筋線維の筋横断面積が MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し減少し、MI+Feb 群では MI+Ve 群と比較し有意に増加した。筋タンパク合成に関わる mTOR-p70S6 kinase シグナルを評価したところ、術後 1 日の骨格筋におけるリン酸化 mTOR の発現は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し有意に低下し、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し有意に増加した。術後 3 日の骨格筋におけるリン酸化 p70S6 kinase の発現は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し、低下傾向にあり、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し有意に増加した。

実験 3 として、慢性期のみの XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋異常および運動耐容能の低下に及ぼす影響を検討した。MI マウスを術後 2 週の時点で febuxostat もしくは vehicle を術後 6 週まで強制飲水法で 4 週間投与した。術後 6 週の左室重量や肺重量、心エコー指標やトレッドミルテスト指標、骨格筋ミトコンドリア呼吸能は両群で差はなかった。

実験 4 として、骨格筋培養細胞 (C2C12 筋管細胞) を用いた実験を行った。まず、低酸素と XO-ROS の関連を調べるため、1%O₂ の低酸素ワークステーションを用いて、C2C12 筋管細胞をそれぞれ 1 時間、3 時間、6 時間、24 時間培養し、XO-ROS, Xor mRNA 発現, XOR タンパク発現, ミトコンドリア呼吸能の評価を行った。XO-ROS

産生量はコントロールと比較し、低酸素曝露 6 時間以降で有意に増加した。XormRNA 発現はコントロールと比較し、低酸素曝露 6 時間で有意に増加し、XOR タンパク発現もコントロールと比較し 6 時間で有意に増加した。ミトコンドリア呼吸能は、コントロールと比較し、低酸素曝露 24 時間で有意に低下した。

次に、C2C12 細胞の低酸素曝露における XO 阻害薬の効果を検討するため、C2C12 細胞をそれぞれ febuxostat 0.3 μ M, 3 μ M を添加した培養液を低酸素曝露 24 時間前から培養し、その後に 1%O₂ 低酸素ワークステーション内で 24 時間培養し、ミトコンドリア呼吸能を測定した。ミトコンドリア呼吸能はコントロールと比べ、未治療群で有意に低下したが、Feb 3 μ M 群で未治療群と比較し、有意に増加した。

さらに、尿酸とミトコンドリア機能の関連を調べるため、尿酸をそれぞれ 0.2 mM, 0.6 mM, 2 mM を添加し、24 時間後にミトコンドリア呼吸能の評価を行った。尿酸のいずれの濃度においてもコントロールを比較し、ミトコンドリア呼吸能に有意差はなかった。

【考察】

本研究では、先行研究と同様に MI 後心不全モデルマウスは慢性期にミトコンドリア機能障害、筋萎縮といった骨格筋障害と運動耐容能の低下を呈した。MI 後の急性期における骨格筋は低酸素状態にあり、XO-ROS が増加した。MI 後急性期における XO 阻害薬の投与は左室機能やリモデリングを変化させず、慢性期の運動耐容能の低下を改善した。また、XO 阻害薬の投与は MI における XO-ROS による骨格筋ミトコンドリア損傷を軽減することでミトコンドリア酸化リン酸化能の低下を改善した。さらに、XOR 阻害薬の投与は mTOR-p70S6 kinase シグナルを活性化することで、MI 後の遅筋線維の骨格筋萎縮を改善した。慢性期のみの XO 阻害薬の投与は運動耐容能やミトコンドリア酸化リン酸化能を改善せず、XO-ROS が増加する急性期への介入が骨格筋異常の改善には必要であることが示唆された。骨格筋培養細胞を用いた実験では、低酸素曝露により XO-ROS が増加し、ミトコンドリア呼吸能が低下し、*in vivo* の MI モデルと同様の結果を再現した。さらに、*in vivo* の MI モデルと同様に、低酸素による XO-ROS の増加が引き起こすミトコンドリア機能低下を、XO 阻害薬を投与することにより改善することができた。尿酸を添加した実験からは MI 後や低酸素モデルの骨格筋ミトコンドリア呼吸能の低下はプリン代謝の最終代謝産物である尿酸によるものではない可能性が示唆された。

【結論】

MI 後急性期の XO-ROS が慢性期の骨格筋ミトコンドリア機能および形態的障害、骨格筋萎縮、運動耐容能の低下に関与することを明らかにした。心筋梗塞後急性期の XO 阻害薬の投与が慢性期の運動耐容能の改善する可能性が示唆された。