



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
Author(s)	南部, 秀雄
Description	配架番号 : 2473
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13459号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13459
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91641
Type	doctoral thesis
File Information	Hideo_Nambu.pdf



学位論文

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

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

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
要旨.....	3
略語表.....	6
1 緒言.....	8
2 実験方法.....	15
2.1 実験材料.....	15
2.2 MI 手術.....	23
2.3 C2C12 骨格筋培養細胞.....	25
2.4 実験 1 MI 後の骨格筋 XO-ROS, XOR タンパク発現の時系列的検討及びその分布の検討.....	26
2.5 実験 2 急性期における XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋に及ぼす影響の検討.....	27
2.6 実験 3 慢性期から XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋異常および運動耐容の低下に及ぼす影響の検討.....	28
2.7 実験 4 骨格筋培養細胞での検討.....	29
2.8 Realtime PCR 法.....	30
2.9 ウェスタンブロット法.....	32
2.10 XO 活性 (XO-ROS) の測定.....	36
2.11 XOR 活性の測定.....	37
2.12 免疫組織化学染色.....	38
2.13 心エコー法.....	38
2.14 トレッドミルテスト.....	39
2.15 自発的身体活動計.....	40
2.16 骨格筋線維の細胞膜透過処理.....	40
2.17 ミトコンドリア呼吸能 (酸化リン酸化能) 測定.....	41
2.18 骨格筋線維からのミトコンドリア単離.....	42
2.19 透過型電子顕微鏡.....	43
2.20 統計学的解析.....	43
3 結果.....	44

3.1 実験1 MI後の骨格筋 XO-ROS, XOR タンパク発現の時系列的検討及びその分布の検討.....	44
3.1.1 低酸素の検討.....	44
3.1.2 骨格筋中の XO-ROS の時系列検討.....	45
3.1.3 骨格筋における XOR タンパクの分布の検討.....	46
3.1.4 左室心筋, 血清の XO-ROS の評価.....	47
3.2 実験2 急性期における XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋に及ぼす影響の検討	48
3.2.1 生存率.....	48
3.2.2 マウスにおける XO 阻害薬の効果の検証	49
3.2.3 動物特性	50
3.2.4 運動耐容能および身体活動量の評価.....	51
3.2.5 骨格筋ミトコンドリア呼吸能 (酸化リン酸化能) 評価	52
3.2.6 骨格筋ミトコンドリア形態および量の評価	53
3.2.7 骨格筋ミトコンドリア生合成の評価.....	54
3.2.8 マイトファジーの評価.....	55
3.2.9 骨格筋量および萎縮の評価.....	56
3.2.10 タンパク合成に関わるシグナルの評価.....	57
3.2.11 タンパク分解に関わるシグナルの評価.....	58
3.2.12 アポトーシスの評価	59
3.2.13 骨格筋における解糖系代謝の評価.....	61
3.2.14 骨格筋における脂肪酸代謝の評価.....	62
3.3 実験3 慢性期から XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋異常および運動耐容の低下に及ぼす影響の検討	63
3.3.1 臓器重量及び心エコー	63
3.3.2 運動耐容能の評価.....	64
3.3.3 骨格筋ミトコンドリア呼吸能 (酸化リン酸化能) の評価.....	65
3.4 実験4 骨格筋培養細胞での検討.....	66
3.4.1 低酸素と XO 活性の関連の検討	66
3.4.2 尿酸とミトコンドリア呼吸能の関連の検討	68
4 考察	69
5 結論	73
謝辞.....	76

利益相反.....	77
引用文献.....	78

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

- 1) Hideo Nambu, Shingo Takada, Satoshi Maekawa, Junichi Matsumoto, Naoya Kakutani, Takaaki Furihata, Ippei Nakano, Ryosuke Shirakawa, Takashi Katayama, Takayuki Nakajima, katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Masaya Tsuda, Akimichi Saito, Arata Fukushima, Takashi Yokota, Junko Nio-Kobayashi, Hironobu, Yasui, Kei Higashikawa, Yuji Kuge, Shintaro Kinugawa, and Toshihisa Anzai. Inhibition of xanthine oxidase in the acute phase of myocardial infarction prevents skeletal muscle abnormalities and exercise intolerance in the chronic phase. *Circulation*.

本研究の一部は以下の学会・研究会において発表・受賞した。

- 1) Hideo Nambu, Shingo Takada, Arata Fukushima, Jyunichi Matsumoto, Naoya Kakutani, Satoshi Maekawa, Ryosuke Shirakawa, Takaaki Furihata, Takayuki Nakajima, Takashi Katayama, Masaya Tsuda, Akimichi Saito, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa, and Toshihisa Anzai. Empaglifrozin improves exercise endurance via the activation of fatty acid oxidation in the skeletal muscle in murine model of post- infarct heart failure. Cell symposia Multifaceted Mitochondria, May 4, 2018, San Diego, USA.
- 2) 南部 秀雄. SGLT2 阻害薬は心筋梗塞後心不全マウスにおける骨格筋脂肪酸酸化の活性化を介して筋持久力を改善する, 第5回 innovative Heart Failure research forum, 2018年8月4日, 大阪.
- 3) Hideo Nambu, Shingo Takada, Arata Fukushima, Jyunichi Matsumoto, Naoya Kakutani, Satoshi Maekawa, Ryosuke Shirakawa, Takaaki Furihata, Takayuki Nakajima, Takashi Katayama, Masaya Tsuda, Akimichi Saito, Takashi Yokota, Shintaro Kinugawa, and Toshihisa Anzai. Empaglifrozin improves exercise endurance via the activation of fatty acid oxidation in the skeletal muscle in murine model of post- infarct heart failure. European Society of Cardiology Congress 2018, Aug 27, 2018, Munich, Germany.
- 4) Hideo Nambu, Shingo Takada, Satoshi Maekawa, Jyunichi Matsumoto, Naoya Kakutani, Shintaro Kinugawa, and Toshihisa Anzai. Inhibition of xanthine oxidase prevents skeletal muscle mitochondrial dysfunction in heart failure. 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム, 2018年9月22日, 奈良.

- 5) Hideo Nambu, Shingo Takada, Satoshi Maekawa, Jyunichi Matsumoto, Naoya Kakutani, Ryosuke Shirakawa, Takashi Katayama, Katsuma Yamanashi, Yoshikuni Obata, Takaaki Furihata, Akimichi Saito, Takashi, Yokota, Shintaro Kinugawa, and Toshihisa Anzai. Inhibition of Xanthine Oxidase in the Acute Phase Preserves Mitochondrial Function in Skeletal Muscle and Exercise Capacity in Heart Failure After Myocardial Infarction. American Heart Association Scientific Sessions 2018, Nov 11, 2018, Chicago, USA.

BCVS International Travel Grant 受賞

要旨

【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ず、運動療法の代替となる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 ROS (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の酸化的リン酸化能は 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酸化的リン酸化能は両群で差はなかった。

【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的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的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。

【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。

略語表

AMPK α : AMP-activated protein kinase α
BAD : Bcl-2 associated death promoter
BCA : Bicinchoninic acid
Bax : Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 : B cell lymphoma 2
BW : Body weight
C I : Mitochondrial respiratory chain complex 1
C II : Mitochondrial respiratory chain complex 2
CBB : Comassie brilliant blue
DAB : Diamino benzidine
FAO : Fatty acid oxidation
Fbx32 : F box protein 32
GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HK : Hexokinase
HRP : Horseradish peroxidase
LEAK : Proton leak
MI : Myocardial infarction
mTOR : mammalia target of rapamycin
MuRF1 : Muscle RING-Finger Protein-1
NADH-TR : NADH-tetrazolium reductase
Nrf1 : Nuclear respiratory factor 1
OXPHOS : Oxidative phosphorylation
p70S6 : Ribosomal protein S6
PBS : Phosphate buffered saline
PGC1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α
PKC : Protein kinase C
PKM : Pyruvate kinase isozyme M
PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride
PPAR α : Peroxisome proliferator-activated receptor α
PVDF : Polyvinylidene difluoride
ROS : Reactive oxygen species
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SOD : Superoxide dismutase
TAC : Transverse aortic constriction

TBS : Tris buffered saline
TBST : Tris buffered saline with Tween 20
TCA : Tricarboxylic acid
TUNEL : TdT-mediated dUTP nick end labeling ;
VCO₂ : Carbon dioxide out put
VDAC : Voltage-dependent anion-channel
VO₂ : Oxygen uptake
XDH : Xanthine dehydrogenase
XO : Xanthine oxidase
XOR : Xanthine oxidoreductase
XO-ROS : XO-derived ROS

1 緒言

「心不全」とは「なんらかの心臓機能障害，すなわち，心臓に器質的および/あるいは機能的異常が生じて心ポンプ機能の代償機転が破綻した結果，呼吸困難・倦怠感や浮腫が出現し，それに伴い運動耐容能が低下する臨床症候群」と定義される (日本循環器学会, 2017). 心不全の病因は心筋虚血や高血圧，弁膜疾患，心筋症と多岐にわたるが，2009年に報告された我が国の大規模観察研究によると，入院治療を要した心不全の原因疾患として，心筋梗塞 (MI) などの虚血性心疾患が 32%と最多となっている (Tsuchihashi-Makaya et al., 2009). また，我が国の死因別死亡総数の順位では，心疾患による死亡は悪性新生物に次ぎ 2 番目に多い. その中でも，心不全による死亡は心疾患の内訳でも 36%と最も死亡数が多い疾患である (厚生労働省, 2014). このように，心不全は予後不良の疾患であるが，その独立した予後規定因子として運動耐容能がある (図 1-1) (Anker and Coats, 1999; Anker et al., 1997; Mancini et al., 1991).

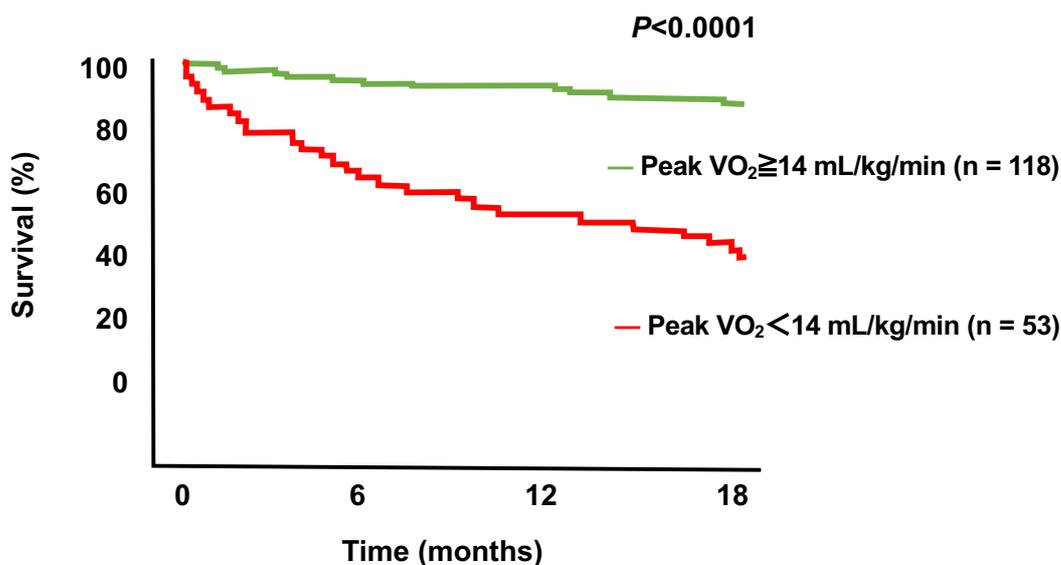


図 1-1. 運動耐容能と予後の関連.

Peak VO₂, 最高酸素摂取量, 運動耐容能の指標である; Anker and Coats, 1999 より引用改変.

運動耐容能を規定するものとして，肺循環，体循環，骨格筋機能がある (図 1-2). 体循環の役割として，肺呼吸で摂取した酸素を末梢臓器へ輸送し，さらに末梢臓器の代謝によって産生された二酸化炭素を肺へ送るというガス輸送を行う役割がある. また，肺循環による酸素と二酸化炭素の運搬が適切に行われることは運動にとって必要な条件ではあるが，運動能力における主規定因子は骨格筋である (Okita et al., 1998; Wilson et al., 1984). 骨格筋において，筋収縮が行われるために ATP が必要とされる.

ATP 合成経路には、酸素を必要としない嫌気的な解糖系と、酸素が必要な酸化的リン酸化があるが、ATP 合成の大部分はミトコンドリアで行われる酸化的リン酸化による (Alberts, 2017).

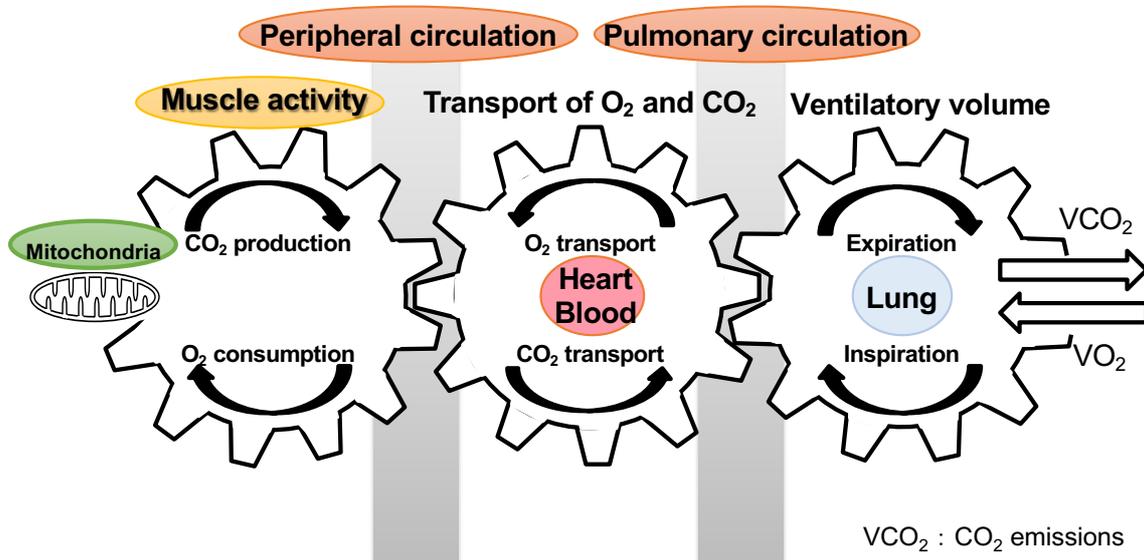


図 1-2. 運動耐容能を規定する因子.

ミトコンドリアはオルガネラの一つで、赤血球以外の全細胞に存在する。外膜と内膜という 2 層の膜構造を有し、外膜と内膜の間を膜間腔スペース、内膜の内側をマトリックスと呼称する。また内膜はヒダ状に折りたたまれてクリステと呼ばれる陥入部分を形成している。ミトコンドリアのクリステは、マトリックスとともにミトコンドリアのエネルギー産生が行われる場である。ミトコンドリアは、解糖系から得られたピルビン酸および脂肪から得られた脂肪酸の両方を基質として使用して、マトリックスにある酵素によって、重要な代謝中間体であるアセチル CoA に変換する。生じたアセチル CoA は TCA 回路によって酸化され、高エネルギーである NADH や FADH₂ が生じる (図 1-3)。ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達鎖は、TCA 回路で生じた NADH や FADH₂ から電子を受け取る。受け取られた電子は電子伝達鎖に沿って移動し、いくつかの中間物質を経て最終的に O₂ 分子と結合し H₂O が生じる。この電子伝達によって複合体 I, III, IV が H⁺ をマトリックスから膜間腔に汲み出すことで H⁺ 勾配が生じ、これを使って ATP 合成酵素 (複合体 V) により ATP が合成される (図 1-4)。

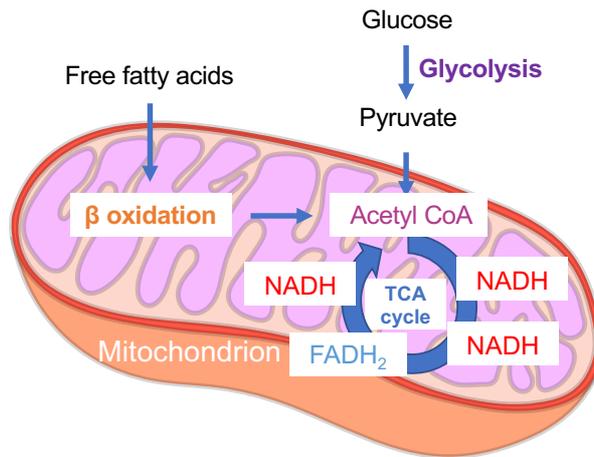


図 1-3. エネルギー代謝経路

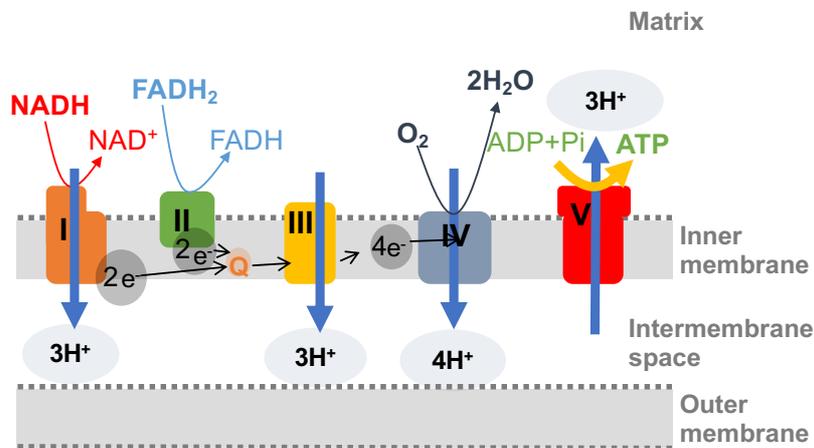


図 1-4. ミトコンドリア電子伝達鎖.

I, ミトコンドリア複合体 I; II, ミトコンドリア複合体 II; III, ミトコンドリア複合体 III, IV, ミトコンドリア複合体 IV, V; ミトコンドリア複合体 V; Q, ユビキノン

心不全においては骨格筋異常が報告されており，①エネルギー代謝異常，②ミトコンドリア機能異常，③有酸素的な骨格筋 I 型線維から解糖系酵素の多い II 型線維への線維型変化，④骨格筋萎縮がある(図 1-5, 6) (Drexler et al., 1992; Kinugawa et al., 2015; Okita et al., 1998; Takada et al., 2016; Vescovo et al., 1996). 骨格筋異常によって運動耐容能が低下した患者に強心薬の投与した研究では，心拍出量や下肢血流が増加しても，運動時間や運動耐容能の指標である最高酸素摂取量は改善しなかった (Wilson et al., 1984). したがって，心不全患者の予後，生活の質，日常活動動作の改善には，不全心への治療だけではなく，骨格筋異常への治療が必要である。しかし，骨格筋異常に対する治療法は運動療法のみである。運動療法は運動耐容能および骨格筋異常を改善するが (図 1-7) (Belardinelli et al., 1999; Piepoli et al., 2004)，心不全患者で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患者が存在し，運動療法の代替となる薬物治療法の確立が課題となっている。

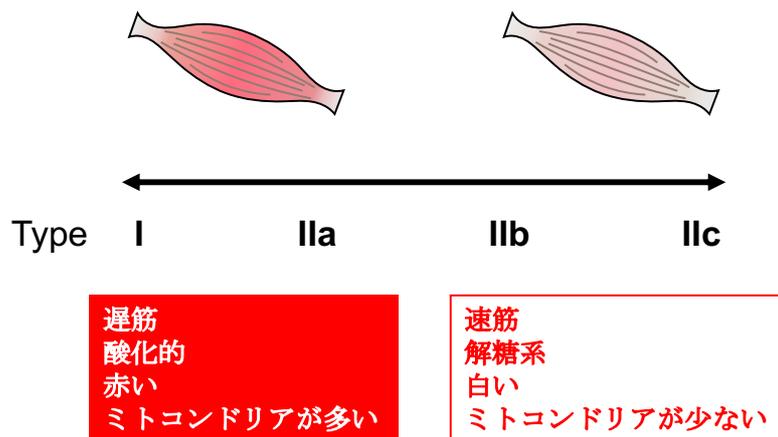
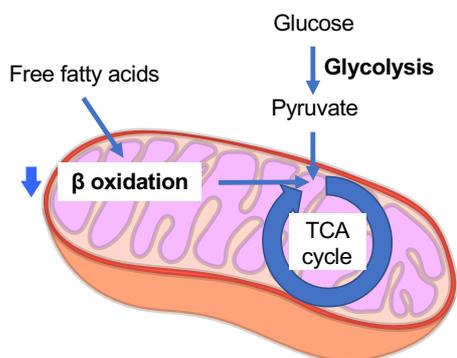
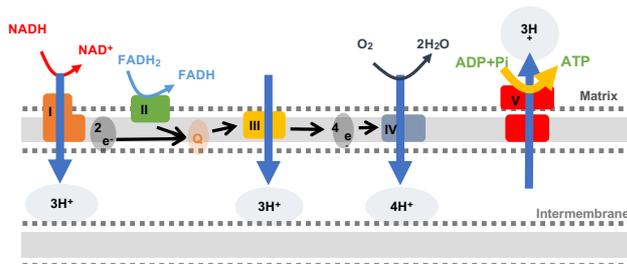


図 1-5. 骨格筋線維型の特徴.

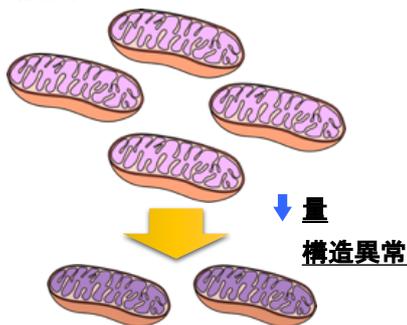
A エネルギー代謝



↓ ミトコンドリア酸化的リン酸化能 (ATP合成能)



B 骨格筋ミトコンドリア



C 筋線維

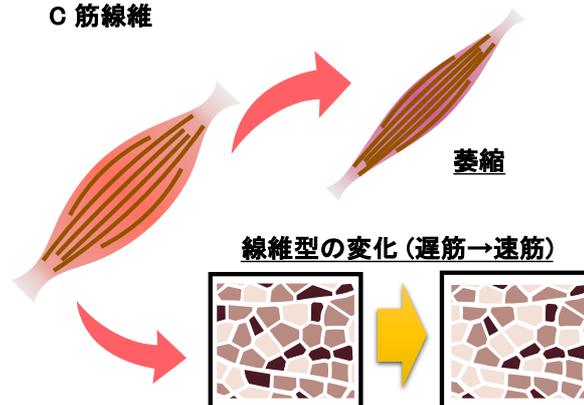


図 1-6. 心不全の骨格筋異常.

(A) 骨格筋エネルギー代謝の異常, (B) 骨格筋ミトコンドリアの異常, (C) 骨格筋線維の変化. Kinugawa et al., 2015 より引用改変.

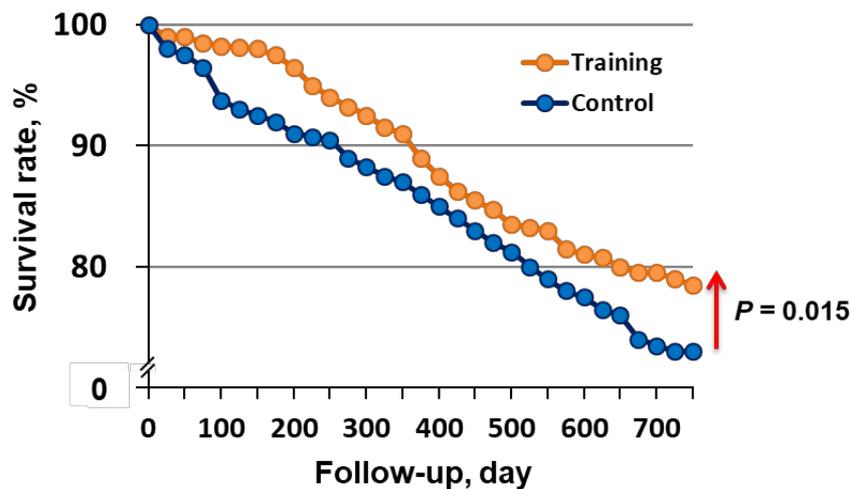


図 1-7. 運動耐容能と予後の関連.

Belardinelli et al, 1999 より引用改変.

これまで当研究室ではMI後心不全モデルマウスの骨格筋で活性酸素種 (ROS) の増加が、骨格筋異常に関わっていることを報告してきた (Fukushima et al., 2014; Ohta et al., 2011). しかし、ROS の増加が骨格筋異常の発症にどのように関わっているかは明らかではない。ROS はスーパーオキシド ($\cdot\text{O}_2^-$), ハイドロゲンペルオキシド (H_2O_2), ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$), 一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)の総称である。それらの多くは反応性が高く、生体内で脂質、タンパク質、核酸、糖質などと反応し、その機能に影響を与える。ROS の主な産生源はミトコンドリアである。他に NADPH oxidase や xanthine oxidase (XO), uncoupled NOS などが知られているが、これらのうち XO は低酸素にて活性化するという特徴を有する (Terada et al., 1992; Terada et al., 1997).

XO は xanthine dehydrogenase (XDH) と共に xanthine oxidoreductase (XOR) の一つの形態である。XOR はヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への代謝酵素であり、分子量 150 kDa からなる二量体である。体液や組織中のほとんどの XOR は XDH の形態で存在している。XDH にタンパク分解や分子内のジスルフィド結合の形成などにより、不可逆的あるいは可逆的に3次構造が変化し XO へ変化する (Nishino et al., 2008). 前述した尿酸への代謝酵素反応にて XO のみ ROS である H_2O_2 や O_2^- を産生する (図 1-8) (Berry and Hare, 2004). また、低酸素により Xor mRNA 発現や XOR タンパク発現, XO 活性が上昇することが知られている (Terada et al., 1992; Terada et al., 1997).

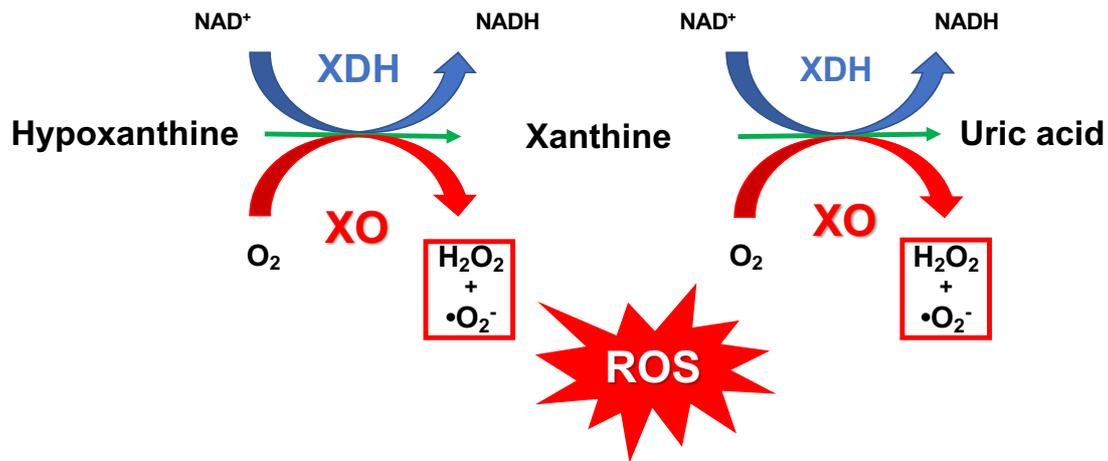


図 1-8. XO は ROS を産生する

循環器領域で XO に着目した研究が多数報告されている。臨床研究では、拡張型心筋症患者の心筋で XO/XDH のタンパク発現が増加し、心筋のエネルギー代謝異常に関与していることが示唆されている (Cappola et al., 2001)。また、心不全患者の血管内皮細胞で XO 活性が増加していることが報告されている (Landmesser et al., 2002)。血清 XOR 活性は心不全の重症度と相関し、心臓死や心不全入院などの心イベントの独立した規定因子であることも報告されている (Otaki et al., 2017)。さらに、XO の代謝産物である尿酸に関しては、高尿酸血症は心不全の予後の独立した規定因子であることが報告されている (Hamaguchi et al., 2011)。以上から、XO が心不全の重症度や予後に関わっていることが示唆されている。しかし、これまで心不全患者に XO 阻害薬を投与した前向き研究が報告されているが、いずれの研究でも患者の予後や運動耐容能を改善できていない (Gavin and Struthers, 2005; Givertz et al., 2015)。

動物実験では、心臓の虚血再灌流モデルラットの心筋で XO 由来の ROS (XO-ROS) が増加することが示唆されている (Wang et al., 2015)。横行大動脈を結紮し狭窄させた心臓の圧負荷モデル (TAC) マウスでも、時間経過と共に心筋が低酸素状態となることが報告されている (Sano et al., 2007)。XO 阻害薬である febuxostat 投与は TAC による左室肥大や左室収縮障害を抑制することが報告された (Xu et al., 2008)。また、MI 後心不全モデルマウスでは、術後 30 日後の心筋で XO タンパク発現や活性の増加、それに伴う ROS の増加が観察され、XO 阻害薬である allopurinol の投与によりこれらが低下し、左室収縮率の低下が抑制されたと報告されている (Engberding et al., 2004)。以上のように、心不全モデルの心筋において XO-ROS が左室機能やリモデリングに関与していることを示唆する報告が多数あるが、心不全の骨格筋に関する研究の報告はない。

骨格筋に関しては、他疾患のモデルマウスで先行研究が報告されている。一型糖尿病モデルマウス及び二型糖尿病モデルマウスでは、骨格筋での XO 活性の増加に伴い、

ROS の増加, ミトコンドリアが障害され, ATP 合成能が低下し, XO 阻害薬である oxypurinol の投与によりこれらが改善したと報告されてる (Bravard et al., 2011). また, 悪性腫瘍によるカヘキシアモデルラットでは febuxostat の投与により減少した骨格筋重量が増加したと報告されている (Konishi et al., 2015). さらに, 後肢懸垂モデルラットに対する allopurinol の投与は遅筋であるヒラメ筋の萎縮を抑制したと報告されている (Derbre et al., 2012). 以上から, XO-ROS の増加が骨格筋ミトコンドリア機能障害や筋萎縮の両方に関与する可能性が考えられる.

以上の知見から, 「MI 後の低酸素により XO-ROS の増加し, 心不全の骨格筋異常の形成に関わっている. 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低下をきたす MI 後心不全モデルマウスを使用し, まず, 骨格筋が低酸素に晒されているかどうか, XO-ROS が増加しているか, 次に, 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どうか, 最後に, 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を明らかにすることを目的とし, 検証した.

2 実験方法

2.1 実験材料

以下に本研究で用いた実験材料の由来及び調整法を示した。

<1> 実験動物

マウス (C57BL/6J) はホクドー株式会社から購入した。

全ての動物実験手技並びに飼育保管は、「北海道大学動物実験に関する規程」を遵守して実施した。

<2> 培養細胞

C2C12 細胞 (ATCC® CRL-1772™, Manassas, USA)

<3> 装置

汎用装置：

- ・超純水製造装置：Milli-Q® Advantage A 10 system (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)
- ・卓上型 pH メーター：LAQUA F-71 (Horiba Ltd., Kyoto, Japan)
- ・オートクレーブ装置：LSX-300 (Tomy Digital Biology Co., Ltd., Tokyo, Japan)
- ・定温恒温乾燥機：NOD-700 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)
- ・ラボシェーカー：BC-740 (Bio Craft, Tokyo, Japan)
- ・マイクロプレート：CELLSTAR 96 穴マイクロプレート (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria), SCREENSTAR 96 穴マイクロプレート (Greiner Bio-One)
- ・マイクロプレートリーダー：SpectraMax Paradigm マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, San Jose, California, USA), Multiskan™ GO マイクロプレート分光光度計 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- ・ボルテックスミキサー：VORTEX-GENIE 2 Mixer (Scientific Industries, Bohemia, New York, USA)
- ・分析用電子天びん：BM-252 (A&D Company Ltd., Tokyo, Japan)

RT-PCR：

- ・自動核酸抽出システム：QuickGene-800 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)
- ・超微量分光光度計：NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)

- iCycler™ Thermal Cycler (170-8720JA, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA)
- Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific)

細胞培養：

- 細胞培養フラスコ：CELLSTAR® 658175 (Greiner Bio-One)
- CO₂ インキュベーター：SCA-165DS (ASTEC, Fukuoka, Japan)
- バイオクリーンベンチ：PCV-1605BRG3 (Hitachi, Japan)
- 遠心式限外ろ過フィルターユニット：Amicon Ultra (Millipore)
- 低酸素ワークステーション：InvivoO₂ 300 (Baker Ruskin, Sanford, ME, USA)

組織学的評価：

- ミクロトーム：リトラトーム REM-710 (Yamato Kohki Industrial, Saitama, Japan)

心筋梗塞 (MI, myocardial infarction) 手術：

- 光源装置：LG-PS2 (Olympus, Tokyo, Japan)
- 従量式実験動物人工呼吸器：SN-480-7x2T (Shinano, Tokyo, Japan)
- 4-0 シルク縫合糸：Sofsilks™ VS-709 (Covidien, Dublin, Ireland)
- 8-0 シルク縫合糸：ELP M6-80B2 (Akiyama-seisakusyo. Co., Ltd., Tokyo, Japan)

介入実験用試薬

- Febuxostat (20130611-4, Teijin Pharma, Osaka, Japan)
- メチルセルロース (131-05042, Wako Pure Chemical Industries)

ウェスタンブロット法：

- ダウンス型ホモジナイザー：BioMasher II (nippi, Tokyo, Japan)
- 電動攪拌器：PowerMasher II (nippi)
- ヒートブロック：MULTI HEATER TYPE MH-36 (WAKAMORI CO.,LTD, Tokyo, Japan)
- 電気泳動槽：Criterion セル (Bio-Rad Laboratories)
- Criterion TGX プレキャストゲル (Bio-Rad Laboratories)
- パワーサプライ：パワーパック 300 (Bio-Rad Laboratories)
- PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜：Trans-Blot Turbo™ PVDF 転写パック (Bio-Rad Laboratories)
- タンク式ブロッキング装置：Criterion™ ブロッター (1704070JA, Bio-Rad)

Laboratories)

- ・イメージングシステム : ChemiDoc XRS+ System (1708265J1NPC, Bio-Rad Laboratories)

遠心器 :

- ・卓上型微量高速遠心器 : Minispin (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- ・微量高速冷却遠心器 : MX-307 (Tomy Digital Biology Co., Ltd.)
- ・ユニバーサル冷却遠心器 : 5911 (Kubota Corporation, Tokyo, Japan)

顕微鏡 :

- ・実体顕微鏡 : SZ61 (Olympus)
- ・蛍光顕微鏡 : BZ-X700 (Keyence, Tokyo, Japan)
- ・透過型電子顕微鏡 : JEM1400 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)

免疫組織化学染色 :

- ・凍結組織切片作製用包埋剤 : Tissue-Tek O.C.T.コンパウンド (4583, Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)
- ・凍結組織切片作製用包埋皿 : Tissue-Tek クリオモルドプラスチック包埋皿 (4566, Sakura Finetek Japan Co., Ltd.)
- ・クリオスタット : HM500-OM (MICROM, Walldorf, Germany)

その他 :

- ・超音波診断装置 : Aplio 300 (Toshiba Medical Systems, Otawara, Japan)
- ・小動物用トレッドミル : Oxyman 2 (Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA)
- ・運動量測定装置 : ACTIMO-10 (Shintech, Fukuoka, Japan)
- ・高感度オキシグラフィー : Oxygraph-2k (O2k) (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria)

<4> 細胞培養関連

ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum) (171012; Gibco-Life Technologies, Carlsbad, California, USA)

ペニシリン-ストレプトマイシン (15070063; Gibco-Life Technologies)

高グルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (D5796; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

ウマ胎児血清 (Horse serum) (16050; Gibco-Life Technologies)

<5> キット

Pierce BCA タンパク質アッセイキット (23225, Thermo Fisher Scientific)

Xanthine Oxidase Activity Assay Kit (ab102522, Abcam, Cambridge, Massachusetts, USA)

<6> XOR 活性測定関連試薬

KH₂PO₄ (166-04255, Wako Pure Chemical Industries)

K₂HPO₄ (164-04295, Wako Pure Chemical Industries)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (09-1320-5, Sigma-Aldrich)

Halt Protease Inhibitor Cocktail (87786, Thermo Fisher Scientific)

Pterin (P1132, Sigma-Aldrich)

Isoxanthopterin (I7388, Sigma-Aldrich)

Methylene blue (M9140, Sigma-Aldrich)

<7> ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE), ウェスタンブロット法関連
10x Cell Lysis Buffer (98035, Cell Signaling Technology [CST], Danvers, Massachusetts, USA)

cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (04693124001, Roche, Mannheim, Germany)

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (P7626, Sigma-Aldrich)

Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (P2850, Sigma-Aldrich)

Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 (P5726, Sigma-Aldrich)

アルブミンスタンダード (23209, Thermo Fisher Scientific)

SDS-PAGE サンプル緩衝液 : SDS-PAGE 用プレミックスタンパク質サンプルバッファー (#161-0737, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA)

タンパク質分子量マーカー (#161-0377, Bio-Rad Laboratories)

Bio-Safe クマシー-G-250 ステイン (#161-0786, Bio-Rad Laboratories)

ポンソーS 溶液 (BCL-PSS-01, Beacle, Kyoto, Japan)

ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232, GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

SuperSignal West Dura (34075, Thermo Fisher Scientific)

<8> 抗体

ウサギ抗 Xanthine Oxidase モノクローナル抗体 (1:1000, ab109235, Abcam)

ウサギ抗 VDAC ポリクローナル抗体 (1:1000, #24866, CST)

ウサギ抗 AMPK α ポリクローナル抗体 (1:1000, #2532, CST)
ウサギ抗 phospho AMPK α モノクローナル抗体 (Thr172) (1:1000, #2532, CST)
ウサギ抗 LC3B ポリクローナル抗体 (1:1000, #2775, CST)
ウサギ抗 mTOR ポリクローナル抗体 (1:1000, #2972, CST)
ウサギ抗 phospho mTOR ポリクローナル抗体 (Ser2448) (1:1000, #2971, CST)
ウサギ抗 p70S6 Kinase ポリクローナル抗体 (1:1000, #9202, CST)
ウサギ抗 phospho p70 S6 Kinase ポリクローナル抗体 (Thr389) (1:1000, #9234, CST)
ウサギ抗 MuRF1 モノクローナル抗体 (1:5000, ab172479, Abcam)
ウサギ抗 Fbx32 (Atrogin1) モノクローナル抗体 (1:5000, ab168372, Abcam)
ウサギ抗 Bcl-2 ポリクローナル抗体 (1:1000, #2876, CST)
ウサギ抗 Bax ポリクローナル抗体 (1:1000, #2772, CST)
ウサギ抗 Caspase3 ポリクローナル抗体 (1:500, ab13847, Abcam)
マウス抗 Hexokinase II モノクローナル抗体 (1:1000, ab76959, Abcam)
ウサギ抗 GAPDH モノクローナル抗体 (HRP Conjugate) (1:5000, #3683, CST)
ウサギ抗 PKM モノクローナル抗体 (1:1000, ab150377, Abcam)
HRP 標識ヤギ抗ウサギ標識 IgG (H+L) 二次抗体 (1:5000, ab97051, Abcam)
HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (1:5000, sc-2302, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA)

<9> PCR 関連試薬

RNAlater Stabilization Solution (AM7021, Invitrogen, Carlsbad, California, USA)
QuickGene RNA cultured cell kit S (Wako Pure Chemical Industries)
QuickGene RNA tissue kit SII (Wako Pure Chemical Industries)
High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific)

<10> Primers

Car9 (Mm00519870_m1, Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
Xor (Mm00442110_m1)
Nrf1 (Mm01135606_m1)

<11> 免疫組織化学染色関連試薬

β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt hydrate (β -NADH) (N8129, Sigma-Aldrich)
Nitro blue tetrazolium (NBT) (D0844, Tokyo Chemical Industry CO., LTD., Tokyo, Japan)
Tris (207-06275, Wako Pure Chemical Industries)

Hydrochloric Acid (7647-01-0, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)
Paraformaldehyde (160-00515, Wako Pure Chemical Industries)
Acetone (00310-95, Nacalai Tesque)
Methanol (131-01826, Wako Pure Chemical Industries)
EnVision+ HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (K4002; Dako, Carpinteria, California)
Dako Liquid DAB substrate-chromagen system (K3466; Dako)

<12> ミトコンドリア呼吸能関連試薬

CaCO₃ (C4830, Sigma-Aldrich)
KOH (P-1767, Sigma-Aldrich)
EGTA (E4378, Sigma-Aldrich)
Na₂ATP (A2383, Sigma-Aldrich)
MgCl₂ (19-0190-5, Sigma-Aldrich)
Taurine (T0625, Sigma-Aldrich)
Na₂Phosphocreatine (P7936, Sigma-Aldrich)
Imidazole (56750, Fluka)
Dithiothreitol (DTT) (D0632, Sigma-Aldrich)
MES hydrate (M8250, Sigma-Aldrich)
KH₂PO₄ (104873, Millipore)
HEPES (H7523, Sigma-Aldrich)
D(+)-Sucrose (4621, Carl-Roth, Karlsruhe, Germany)
Pottasium lactobionate (153516, Sigma-Aldrich)
BSA (A6003, Sigma-Aldrich)
Saponin (S7900, Sigma-Aldrich)
Proteinase (P8038, Sigma-Aldrich)

<13> 調製試薬類

動物麻酔用試薬 (MI 手術用 3 種混合麻酔)

ミダゾラム (ドルミカム®注射液) 0.3 mg/kg (Astellas Pharma, Tokyo, Japan)
塩酸メデトメジン (ドルベネ®注) 0.4 mg/kg (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan)
酒石酸ブトルファノール (ベトルファノール®) 5mg/kg (Meiji Seika Co., Ltd., Tokyo, Japan)

介入実験用試薬

Febuxostat (0.5 mg/ ml) : メチルセルロースを蒸留水に溶解し, 0.5 w/%メチルセルロ

ースを作成した。0.5 w/%メチルセルロースに Febuxostat を加え、0.5 mg/ml の濃度になるように調整した。調整液は遮光した気密容器に入れ、マグネチックスターラーで持続的に攪拌した状態で室温保存した。

XOR 活性測定用調整試薬

pH 7.4 Buffer : 50mM K-phosphate, 0.1mM EDTA, Protease inhibitor cocktail

Pterin stock solution (1 mM) : 3-4 mg の Pterin を 1N NaOH 100 μ L に溶かし、H₂O で適正量に調整した。

Isoxanthopterin (10 μ M) : Pterin 同様に H₂O へ溶解し 1 mM とし、Buffer で 10 μ M へ希釈した。

Methylene blue (1 mM) : H₂O へ溶解した。

タンパク質電気泳動, ウェスタンブロット法

SDS-PAGE 泳動緩衝液 : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS

SDS-PAGE 転写緩衝液 : 25mM Tris, 0.192mM Glycine, 10% Methanol

20×TBS : 0.4 M Tris/HCl (pH 7.6), 3 M NaCl,

1×TBST : 20×TBS を純水で 20 倍に希釈し、0.05%となるように Tween20 を加えた。

10×PBS : 1.37M NaCl, 81mM Na₂HPO₄, 27mM KCl, 15mM KH₂PO₄

1×PBS : 10×PBS を純水で 10 倍に希釈した。

免疫組織化学染色用調製試薬

NADH-テトラゾリウム還元酵素 (NADH-TR) 染色試薬 :

- 0.05 M Tris-Hcl (pH 7.4), 1.2 mM NBT, 1.1 mM β -NADH

ミトコンドリア呼吸能用調製試薬

- BIOPS (pH 7.1) : 2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 5.77 mM Na₂ATP, 6.56 mM MgCl₂/6H₂O, 20 mM Taurine, 15 mM Na₂Phosphocreatine, 20 mM Imidazole, 0.5 mM Dithiothreitol, 50 mM MES hydrate
- MiR05 buffer : 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 20mM Taurine, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM Sucrose, 60mM Pottasium lactobionate, 1 g/L BSA
- Saponin solution : BIOPS 溶液 1 ml に Saponin 5 mg を溶解して、ストック溶液 (5 μ g/ μ l)を作成。Permeabilization 時は BIOPS 溶液 2 ml に上記ストック溶液を 20 μ l 溶解し、最終濃度 0.05 μ g/ μ l とした。(用事調製)

ミトコンドリア単離用調整試薬

- Isolation buffer (pH 7.4) : 100 mM Sucrose, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM KH_2PO_4 , 0.1 mM EGTA, 0.2% bovine serum albumin
- Suspension buffer (pH 7.4) : 225 mM Mannitol, 75 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA

2.2 MI手術

雄 10 週～12 週齢の C57BL/6J マウス (体重 23 g～26 g) に左冠動脈を結紮して MI を作成した。術前にマウスの体重を測定し、塩酸メドトメジン 0.3 mg/kg 体重, ミダゾラム 4.0 mg/kg 体重, 酒石酸ブトルファノール 5.0 mg/kg 体重の 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与し (Kawai et al., 2011), 十分な麻酔深度になったことを確認した。手術台に臥位で四肢と尾をテープで固定し, 気管挿管のために切歯を絹糸で牽引し頸部を進展位で固定した。頸部正中より皮膚切開の後に, 顎下腺と気管前筋を展開し, 気管の直線形状を保ちながら 23 ゲージのポリエチレンチューブが半透明の気管軟骨を通過することを直視下で確認した (図 2-1A)。その後, 従量式実験動物人工呼吸器に接続し, 毎回 110 回, 1 回換気量 0.4 ml で人工呼吸を開始し, 送気時に前胸部が良好に挙上していることを確認した。

70%アルコールで消毒を行い, 実体顕微鏡下で手術を行った。左前胸部を皮切した後に, 大胸筋と小胸筋を牽引して温存し, 肋間筋を露出した (図 2-1B)。第 4 肋間で肋間筋を切開した後に (図 2-1C) 開胸器で視野を展開して心臓を確認した (図 2-1D)。心膜を切開した後に心臓を半時計方向に旋回させて左冠動脈の走行を確認し, 左心耳下縁から 0.5 mm 程度遠位で 8-0 シルク縫合糸を使用して器械結びを行った (図 2-1E)。冠動脈結紮後に結紮部遠位の心筋が赤から白色へ色調変化を確認することで, MI の作成を確認した。4-0 シルク縫合糸で閉創し (図 2-1F) 手術を終了した。

術後は麻酔からの回復が得られるまで 37°Cの保温パッドで保温を継続しながら待機した。抜管までの時間は, 十分に覚醒して自発呼吸が安定して再開し, 術後の急性期死亡が少ない 4 時間とした。手術時間は 15 分, 開胸時間は 5 分前後であった。

上記一連の手技から左冠動脈結紮術を除いた偽手術を行ったコントロール群 (Sham 群) を設定した。

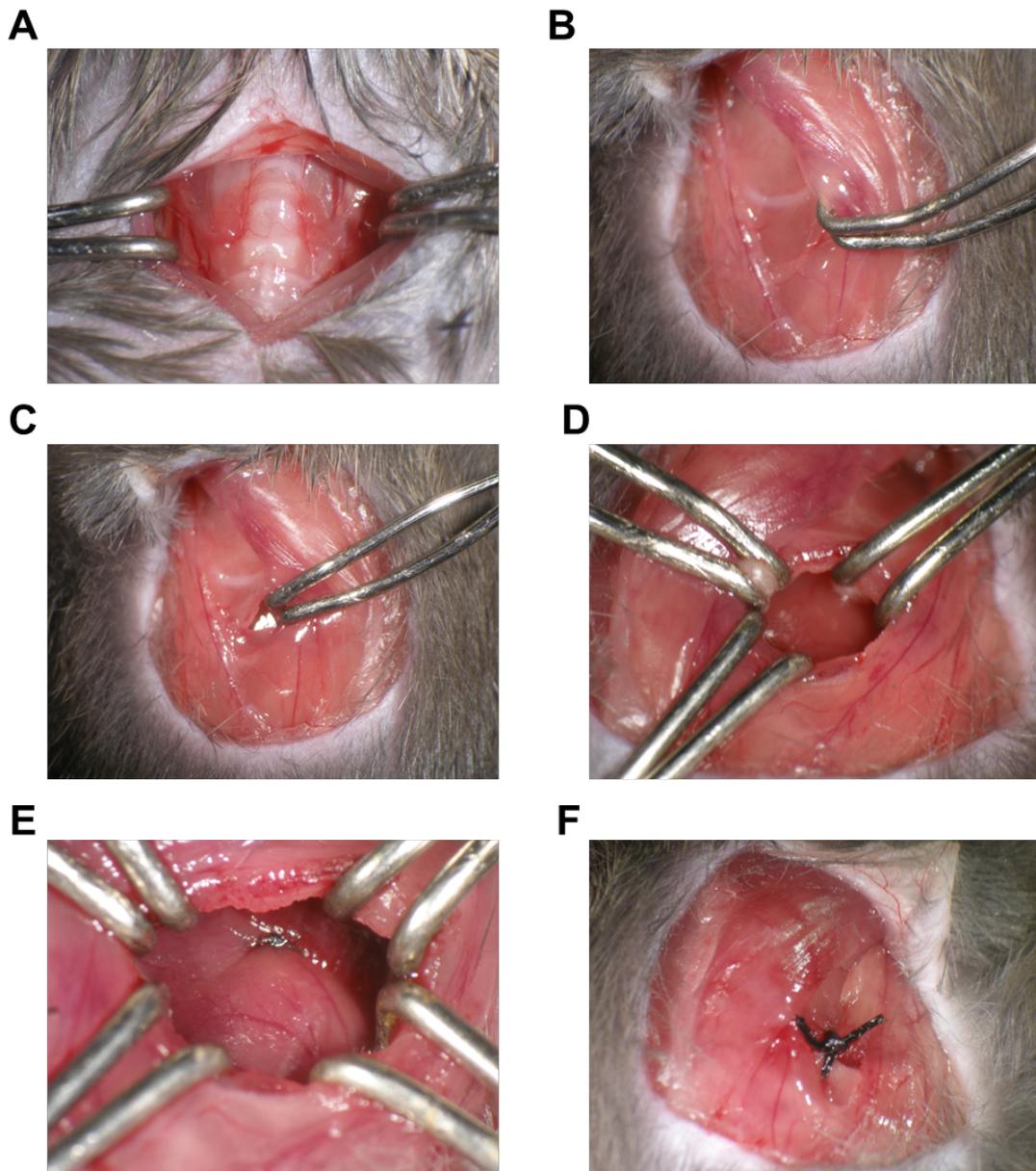


図 2-1. 心筋梗塞手術の術中写真

(A)気管軟骨の露出, (B) 肋間筋の露出, (C) 肋間筋の切開, (D) 開胸器による開窓, (E) 冠動脈の確認, (F) 閉創.

2.3 C2C12 骨格筋培養細胞

本実験にはマウス筋芽細胞株である C2C12 細胞を使用した。C2C12 細胞を 5% CO₂, 37°C に維持された CO₂ インキュベーター内で培養した。全ての作業はバイオクリーンベンチ内で行った。

C2C12 細胞は 10% ウシ胎児血清, 1% ペニシリン/ストレプトマイシンを加えた高グルコース含有ダルベッコ改変イーグル培地で筋芽細胞を増殖させた。75 cm² フラスコに播種した細胞が 90% コンフルエントまで増殖した時点で, 2% ウマ胎児血清に変更した培地で培養し, 筋管細胞へと分化誘導した (図 2-2)。全ての実験には分化誘導開始から 6 日後の筋管細胞を用いた。

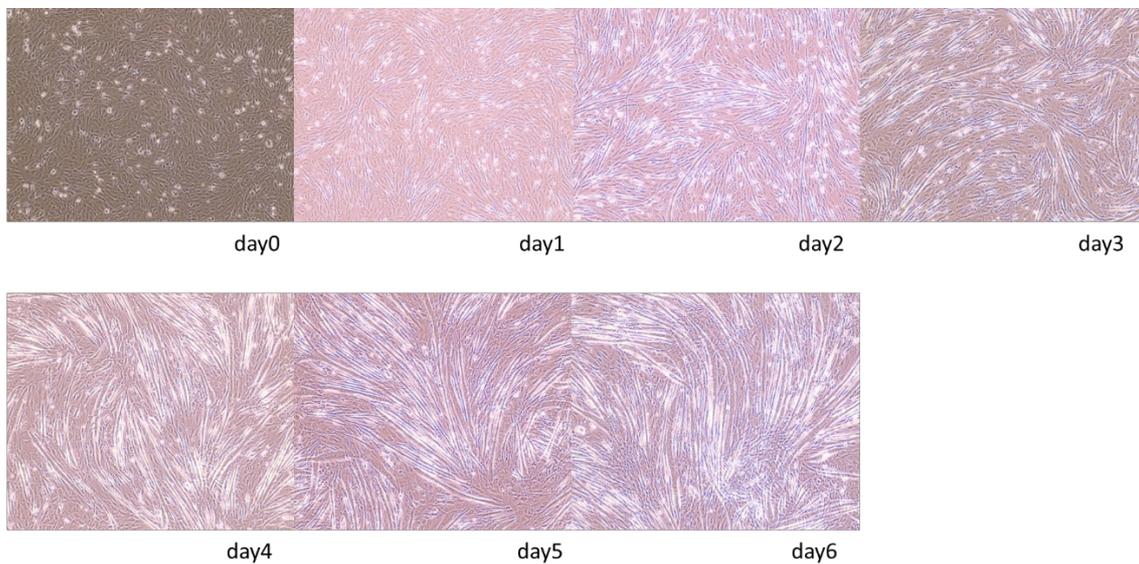


図 2-2. C2C12 分化の経時変化

C2C12 筋芽細胞から筋管細胞へ分化誘導し, 0 日目から 6 日目の細胞形態を示す。

2.4 実験 1 MI 後の骨格筋 XO-ROS, XOR タンパク発現の時系列的検討及びその分布の検討

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に, がん組織の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 (Busk et al., 2011), 術後 6 時間から術後 1 日までの MI 群と Sham 群の検討を行なった. 屠殺は麻酔後 (2.5%トリブromoエタノール 8 μ l/g 体重, 腹腔内投与) に十分な麻酔深度になったことを確認し行なった. その後, 速やかに血液, 骨格筋, 心筋を採取した.

次に, どの時点から XO-ROS が増加しているかを評価するために, XO-ROS を術後 12 時間から術後 28 日まで時系列に評価した.

さらに, 骨格筋中の XO の分布を調べるため, 骨格筋の XOR 免疫染色と骨格筋線維型別に XO-ROS の測定を行なった.

2.5 実験 2 急性期における XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋に及ぼす影響の検討

MI 後に XO-ROS が増加する急性期 (7 日後まで) に XO 阻害薬である febuxostat (5 mg/kg body weight/day, oral gavage) の介入実験を行った。マウスを Sham+vehicle (Sham+Ve; $n = 13$) と MI+vehicle (MI+Ve; $n = 28$), MI+febuxostat (MI+Feb; $n = 31$) の 3 群にわけ, febuxostat および vehicle を手術 24 時間前, 1 時間前と手術後 1 日から 7 日に強制飲水法でマウスに投与した (図 2-3)。その後, MI 後心不全の慢性期である術後 28 日目に心機能, 運動耐容能及び骨格筋ミトコンドリア呼吸能を測定した。

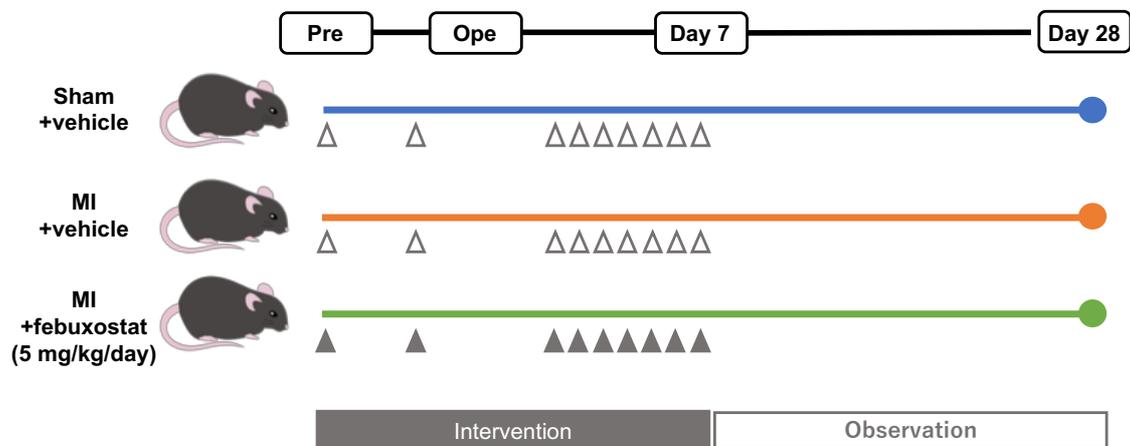


図 2-3. 介入プロトコール 1

2.6 実験 3 慢性期から XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋異常および運動耐容の低下に及ぼす影響の検討

MI における XO 阻害薬の治療効果を検討するため、MI 後心不全の慢性期から febuxostat の介入実験を行った。MI マウスを術後 2 週の時点で無作為に MI+vehicle (MI+Ve; $n=8$), MI+febuxostat (MI+Feb; $n=8$) の 2 群にわけ、febuxostat 5 mg/kg body weight/day および vehicle を術後 6 週まで強制飲水法でマウスに投与した (図 2-4)。術後 6 週に心機能、運動耐容能及び骨格筋ミトコンドリア呼吸能を測定した。

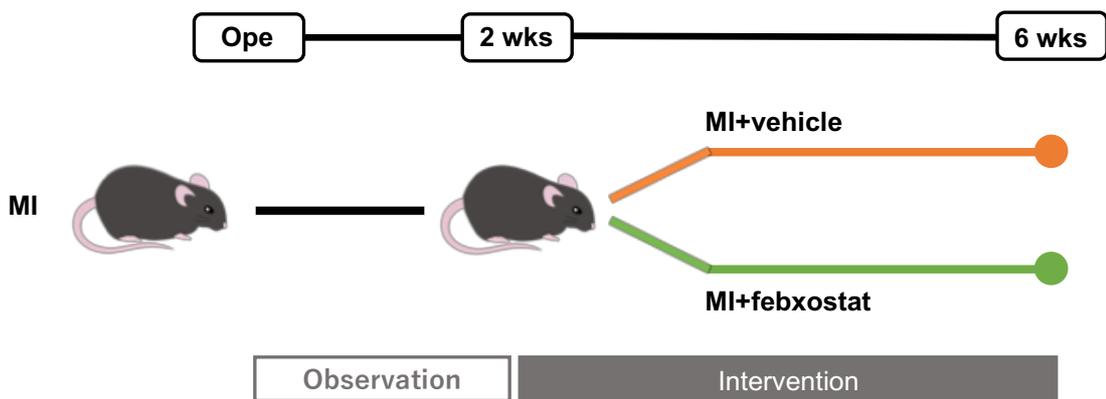


図 2-4. 介入プロトコール 2

2.7 実験4 骨格筋培養細胞での検討

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、低酸素の代表的なマーカーである *Car9* mRNA 発現や 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。コントロール群として、5% CO₂, 37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した細胞を使用した。

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 μM, 3 μM 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。コントロール群として、*febuxostat* を添加せずに 5% CO₂, 37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した細胞を使用した。

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。なお、コントロール群として尿酸を添加していない細胞を使用した。

2.8 Realtime PCR 法

RNA 抽出 (骨格筋)

抽出された骨格筋組織を RNAlater Stabilization Solution に一晩浸し、凍結保存した後に QuickGene RNA tissue kit SII を用いて抽出を行った。

- 1) 腓腹筋から組織重量 12-14 mg を測り取り、5 μ l の 2-メルカプトエタノール入りの lysis バッファー 500 μ l の入ったチューブに移した。ボールミル型ホモジナイザーでホモジナイズを行うため各チューブにはあらかじめ 5 mmφ のジルコニアボールを数個入れた。
- 2) 組織はトミー精工製 Micro Smash MS-100 を用い 3,800 rpm, 300 秒で 3 回 (各インターバルは氷上で 20 秒) ホモジナイズした。
- 3) 組織破片を分離除去するため $\geq 17,000$ g で 3 分間、室温で遠心した。その後、底に沈んだ組織破片を吸い込まないように注意して、ホモジネート上清 385 μ l を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移した。
- 4) Solubilization バッファーを 175 μ l 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行い、遠心分離器で数秒間スピンドウンし、マイクロチューブの蓋や壁に付着したサンプル液を収集した。
- 5) 特級エタノール (>99%) を 140 μ l 添加し再び最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行い、遠心分離器で数秒間スピンドウンしてマイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集した。
- 6) 抽出液完成後、QuickGene-810 を用いて RNA を抽出した。
- 7) 調整した抽出液を全量カートリッジへ添加し、“RNA TISSUE PLUS” ボタンを選択して機械を作動させた。
- 8) 数分後に RNase-Free DNase set (QIAGEN 社) を添加して DNase 処理を行った後に機械を再始動させ RNA 抽出を再開し total RNA を回収した。
- 9) Nanodrop spectrophotometer (ND-1000) を用いて RNA 量を測定した。抽出した RNA は cDNA 化するまで、-80°C で凍結保存した。

RNA 抽出 (培養細胞)

QuickGene RNA cultured cell kit S を用いて抽出を行った。

- 1) C2C12 筋管細胞 約 2×10^6 個に LRC (2-ME 添加済み) 520 μ l を加え、ボルテックスミキサーにて最大回転数で 1 分間サンプル溶液を攪拌した。
- 2) 軽くスピンドウンし、特級エタノール 100 μ l を加えた。
- 3) ボルテックスミキサーにて最大回転数で 10 秒間サンプル溶液を攪拌し、軽くスピンドウンし、特級エタノール 180 μ l を加えた。
- 4) ボルテックスミキサーにて最大回転数で十分にサンプル溶液を攪拌し、軽くスピ

ンダウンして、ライセートを完成させた。

- 5) 自動核酸抽出システム QuickGene-800 上のカートリッジへライセートを全量添加し抽出を開始した。工程の途中で DNase 溶液 40 μ l を添加して、DNase 処理を行った。
- 6) Total RNA を回収した。
- 7) Nanodrop spectrophotometer (ND-1000) を用いて RNA 量を測定した。抽出した RNA は cDNA 化するまで、 -80°C で凍結保存した。

逆転写反応

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit を使用した。

- 1) 抽出した RNA を RNase フリーの滅菌水で溶解し、100 ng/ μ l の溶液となるように調製した。
- 2) 下記の試薬を調整して、2 \times reverse transcription master mix を作成した。

コンポーネント	容量/well (μ l)
10 \times RT Buffer	2.0
25 \times dNTP Mix (100 mM)	0.8
10 \times RT Random Primers	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
RNase Inhibitor	1.0
Nuclease-free H ₂ O	3.2
Total per reaction	10.0

- 3) 2 \times reverse transcription master mix 10 μ l および RNA サンプル 10 μ l (1,000 ng) を各ウェルに添加した。
- 4) 逆転写反応は、以下のサーマルサイクラーの設定で行った。
25 $^{\circ}\text{C}$ (10 分) \rightarrow 37 $^{\circ}\text{C}$ (120 分) \rightarrow 85 $^{\circ}\text{C}$ (5 分) \rightarrow 4 $^{\circ}\text{C}$ (∞)
- 5) 合成した cDNA は使用時まで -20°C で保存した。

Real-time PCR

目的の cDNA を増幅させるため、Taqman™ アッセイによる定量的 PCR を行った。

- 1) qPCR マスターミックスを下記の試薬で調製した。

コンポーネント	容量/well (μl)
Taqman Universal Master Mix (2×)	12.5
Taqman Gene Expression Assay (20×)	1.25
Control Assays (GAPDH)	1.25
Nuclease-free H ₂ O	5.0
Total per reaction	20.0

- 2) 作製したマスターミックスを 20 μl ずつ PCR ウェルに分注した。
3) 蒸留水を用いて希釈した各サンプルの cDNA 溶液を、20 μl ずつ PCR ウェルに添加し、2 回ピペティングを行い混合した。
4) 下記の反応条件でリアルタイム PCR を行った。

Step 1	50°C, 2 分
Step 2	95°C, 10 分
Step 3 (50 サイクル)	95°C, 15 秒 60°C, 1 分

- 5) 内在性コントロールとして 18S rRNA を使い、蛍光標識された PCR 産物の増幅曲線状の閾値線を基にサイクル数 (CT 値) を求め、 Δ CT 法を用いて遺伝子発現を定量化した。

2.9 ウェスタンブロット法

タンパク抽出

- 1) マウスから摘出された下肢骨格筋を液体窒素で凍結し -80°C で保存した。
2) 凍結保存したサンプルを氷上で解凍した。氷冷した 10× Cell Lysis Buffer を蒸留水で 10 倍希釈し、Complete protease inhibitor cocktail, 1 mM PMSF, Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 を添加した。上記の 1×Cell Lysis Buffer に組織サンプルを入れ、ダウンス型ホモジナイザーでホモジナイズした。
3) ホモジナイズしたサンプルを遠心分離し (15,000 g, 10 分, 4°C), ペレットを拾わないように上清を新しいマイクロチューブに移した。長期保存する場合は、-80°C で冷凍保存した。

タンパク濃度測定

- 1) CELLSTAR 96 穴マイクロプレートに Pierce BCA タンパク質アッセイキットの Reagent A と Reagent B を 50:1 の割合で混合した working reagent を作成し、各ウェルに 200 μl ずつ分注した。
- 2) ブランクとして 1 ウェル空白を置き、2 mg/ml のアルブミンスタンダードを 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μl ずつウェルに混合した。
- 3) 測定するサンプルは各 2 μl ずつウェルに注入した。
- 4) 37°C で 30 分間インキュベートした。
- 5) マイクロプレートリーダーで 540 nm 波長の吸光度を計測した。
- 6) スタンダードの吸光度から得られる検量線を元にしてサンプルのタンパク濃度を算出した。

上記のタンパク濃度測定は、スタンダード、サンプルとも同一サンプルを二重で各ウェルに置き、2つの平均値を採用した。

サンプルの調製

- 1) 上記サンプルを 1×Cel Lysis Buffer を用いて、8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように調製した。2-メルカプトノールを添加した SDS-PAGE 用サンプル緩衝液をサンプル溶液と等量加え、4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のサンプル溶液を作成した。ボルテックスミキサーで溶液を攪拌した。
- 2) ヒートブロックを用いて、100°C で 5 分間加熱した。
- 3) 短時間遠心してマイクロチューブの蓋に付着した水滴を落とし、ボルテックスミキサーでサンプル溶液を攪拌した。

SDS-PAGE

- 1) 電気泳動用のタンパク質ゲルは Criterion TGX プレキャストゲルを使用した。使用するゲルの種類は泳動するサンプル数や標的タンパクによって適宜選択し、25-75 kDa のタンパク質を標的とする際は主に AnyKD の濃度ゲルを、75 kDa 以上の高分子量タンパク質を標的とする際は主に 7.5% の濃度ゲルを、25 kDa 以下の低分子量タンパク質を標的とする際は主に 18% の濃度ゲルを使用した。
- 2) 電気泳動槽に SDS-PAGE 泳動緩衝液を注入し、タンパク質ゲルをセットした。サンプルを標的タンパクに応じて各ウェルに 5-10 μl (20-40 μg) を注入し、サンプルレーンの端に分子量マーカーを注入した。
- 3) パワーサプライに接続し、60 V の定電圧で 30 分間、引き続いて 120 V の定電圧でおおよそ 1 時間 30 分泳動し、サンプルがゲルの先端まで移動するのを確認して泳動を終了した。

Comassie brilliant blue (CBB) 染色

泳動後、ゲルを蒸留水で3回、各5分間洗浄した後にCBB溶液に浸し、室温で1時間振とうした。その後、蒸留水で数回洗浄し、背景と比べてタンパク質のバンドが鮮明になるまで洗浄を続けた。

ウェスタンブロットティング

① セミドライ式ブロットティング

- 1) タンパク質ゲルをPVDF転写パックに気泡が入らないようにセットした。
- 2) 1.0 A, 25 V で30分間転写した。

② ウェット式ブロットティング

- 1) PVDF膜をあらかじめメタノールで1-2分間浸した後に、転写緩衝液に濾紙と共に浸した。
- 2) タンパク質ゲルをタンク式ブロットティング装置の陽極から順に、スポンジ→濾紙→PVDF膜→ゲル→濾紙→スポンジとなるように重ね、20 Vの定電圧で16時間転写した。

Ponceau 染色

- 1) タンパク質を転写したメンブレンをタッパーに入れ、メンブレンが十分浸るようにポンソーS染色液を注ぎ、軽く振蕩しながら5分間染色した。
- 2) タッパーの染色液を捨て、メンブレンが十分浸るように1%酢酸溶液を注ぎ、バックグラウンドが十分低下し、タンパク質の染色が明瞭になるまで軽く振蕩した。
- 3) イメージングシステムで撮影した。
- 4) メンブレンが十分浸るように0.1 M NaOH 溶液を注ぎ、目視で確認しながらタンパク質が脱色されるまで軽く振蕩した。
- 5) タッパーの0.1 M NaOH 溶液を捨て、蒸留水で2分間振蕩しブロッキングへ進んだ。

ブロッキング～1次抗体反応～二次抗体反応

- 1) ブロッキング後の PVDF 膜をブロッキング溶液に移して、室温で 1 時間振とうした。ブロッキング溶液には 3% スキムミルクもしくは 5% BSA を用いた。
- 2) 1×TBST で振とうしながら洗浄 (10 分間×3 回) した。
- 3) 1 次抗体希釈液 (ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈) に浸し、4°C で 1 晩抗体反応を行った。
- 4) 1×TBST で振とうしながら洗浄 (10 分間×3 回) した。
- 5) 2 次抗体希釈液 (ブロッキング溶液と同じ溶液で希釈) に浸し、室温で 1 時間抗体反応を行った。
- 6) 1×TBST で振とうしながら洗浄 (10 分間×3 回) した。

検出

- 1) PVDF 膜の全面を覆うように検出試薬をかけ、3 分間室温で静置した。検出試薬には ECL Prime もしくは SuperSignal West Dura を使用した。
- 2) ウェスタンブロッティング撮影用イメージングシステムで可視化されたバンドを検出した。
- 3) 画像解析ソフト Image J (U.S. National Institutes of Health) を用いて集積光濃度を定量して解析した。なお、Ponceau 染色あるいは CBB 染色で評価した総タンパクをコントロールとして補正した。リン酸化抗体については、非リン酸化抗体で目的タンパクの発現量を標準化した。ミトコンドリアタンパクに関しては抗 VDAC 抗体で得られたバンドを用い補正した。

2.10 XO 活性 (XO-ROS) の測定

- 1) 屠殺したマウスから迅速に血液と下肢骨格筋, 左室心筋非梗塞部を摘出した.
- 2) 骨格筋や心筋組織は液体窒素で凍結し -80°C で保存した. 血液は 30 分常温に置いた後に, 4 度で一晩保存した. 遠心分離し ($1,000\times g$, 10 分, 4°C), ペレットを拾わないように上清を新しいマイクロチューブに移し, -80°C で冷凍保存した.
- 3) 凍結保存したサンプルを氷上で解凍し, Xanthine oxidase activity Assay Kit を用いて測定を行った.
- 4) サンプルの準備は以下の通り行った.

✓ 血清

直接 SCREENSTAR 96 ウェルマイクロプレート内へ $5\ \mu\text{l}$ 加え、total $50\ \mu\text{l}$ となるよう蒸留水で調整した.

✓ 組織 (骨格筋, 心筋)

組織 $40\ \text{mg}$ に Assay buffer $200\ \mu\text{l}$ を加え, ダウンス型ホモジナイザーでホモジナイズした. 遠心分離し ($16,000\ g$, 10 分), 上清を上記の方法でタンパク濃度測定を行い, Assay buffer を用いて $4\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるよう調整した. $50\ \mu\text{l}$ を SCREENSTAR 96 ウェルマイクロプレート内へ加えた.

- 5) 検量線は以下の通り作成した.

① H_2O_2 standard $4\ \mu\text{l}$ を蒸留水 $348\ \mu\text{l}$ に加え $10\ \text{mM H}_2\text{O}_2$ standard を作成した.

② $10\ \text{mM H}_2\text{O}_2$ standard $20\ \mu\text{l}$ に蒸留水 $980\ \mu\text{l}$ を加え $0.2\ \text{mM H}_2\text{O}_2$ standard を作成した.

③ $0.2\ \text{mM H}_2\text{O}_2$ standard $50\ \mu\text{l}$ に蒸留水 $950\ \mu\text{l}$ を加え $10\ \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ standard を作成した.

④ $10\ \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ standard $20\ \mu\text{l}$ をそれぞれ $0, 10, 20, 30, 40, 50\ \mu\text{l}$ ウェルに加え、蒸留水で total $50\ \mu\text{l}$ となるよう調整した. 濃度はそれぞれ $0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5\ \text{nmol}/\text{well H}_2\text{O}_2$ となる.

- 6) 下記で調整した Reaction Mix をそれぞれのウェルへ加えた.

	Sample	Control
Assay Buffer	$45.8\ \mu\text{l}$	$47.8\ \mu\text{l}$
Substrate Mix	$2\ \mu\text{l}$	-
Enzyme Mix	$2\ \mu\text{l}$	$2\ \mu\text{l}$
OxiRed Probe	$0.2\ \mu\text{l}$	$0.2\ \mu\text{l}$

- 7) Reaction Mix を加えた後速やかに SpectraMax Paradigm マルチモードマイクロプレートリーダーで測定した ($\text{Ex}/\text{Em} = 535/587\ \text{nm}$). 25°C で 15 分置いた後に再度測定し, 蛍光強度の差分から H_2O_2 の産生量を算出した.

XO 活性は基質であるキサンチンを加えた時の H_2O_2 の産生量を測定しており、XO 活性は "XO-ROS の産生量" を表している。

2.11 XOR 活性の測定

先行研究を参考に骨格筋の XOR 活性の測定を行った (Beckman et al., 1989; Ives et al., 2015; Yisireyili et al., 2017).

- 1) 屠殺後にマウスから下肢骨格筋を迅速に摘出し、液体窒素で凍結し -80°C で保存した。
- 2) 凍結保存したサンプルを氷上で解凍した。腓腹筋 40 mg に pH 7.4 buffer 200 μl を加え、ダウンス型ホモジナイザーでホモジナイズした。
- 3) 遠心し 遠心分離し (15,000 g, 15 分), 上清を上記の方法でタンパク濃度測定を行い, Assay buffer を用いて 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度になるよう調整した。
- 4) 調整したサンプル 50 μl を SCREENSTAR 96 ウェルマイクロプレート内へ加えた。
- 5) コントロールとして 0 μM , 0.1 μM , 0.3 μM , 0.6 μM , 1 μM , 3 μM , 6 μM , 10 μM の isoxanthopterin を加え total 100 μl とした。
- 6) Pterin solution 5 μl (最終濃度 50 μM)と methylene blue 20 μl (最終濃度 200 μM) と buffer 25 μl を加え、室温で 30 分置いた後に SpectraMax Paradigm マルチモードマイクロプレートリーダーで測定した(Ex/Em = 345/390 nm). 25°C で 30 分置いた後に再度測定し、蛍光強度の差分から XOR 活性を算出した。

2.12 免疫組織化学染色

- 1) マウスの屠殺後、直ちに腓腹筋を摘出して速やかに周囲組織をトリミングした、OCT コンパウンドに試料を一度なじませた後、OCT コンパウンドが満たされたクリオモルドプラスチック包埋皿に試料を入れた。イソペンタンを注いだ容器を液体窒素に浮かべ、イソペンタンが十分に冷えた後に試料が入った包埋皿をイソペンタンの上に浮かべて瞬間凍結により包埋した。凍結された腓腹筋組織は、クリオスタットを用いて 10 μm の厚さで連続横断切片を作成した。
- 2) 骨格筋線維型は NADH-TR 染色で評価した。凍結切片を 1.6 mg/ml の NADH と 2 mg/ml の NBT を含む 0.05 M Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) で 37°C, 30 分間インキュベートした。60%→90%→60%アセトン液に入れ、3 回水洗後に脱水・透徹しグリセリンゼリーにて封入した。染色された切片は BZ-X700 蛍光顕微鏡の明視野モードで観察した。
- 3) XOR 染色は、氷冷した 4%パラホルムアルデヒドで 7 分間固定後、PBS で洗浄し、一次抗体である抗 XOR 抗体 (1:300) を 4°Cで一晩反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体である EnVision+ HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit で 30 分間静置し、Dako Liquid DAB substrate-chromagen system で 7 分間静置して発色させ、BZ-X700 蛍光顕微鏡の明視野モードで観察した。

2.13 心エコー法

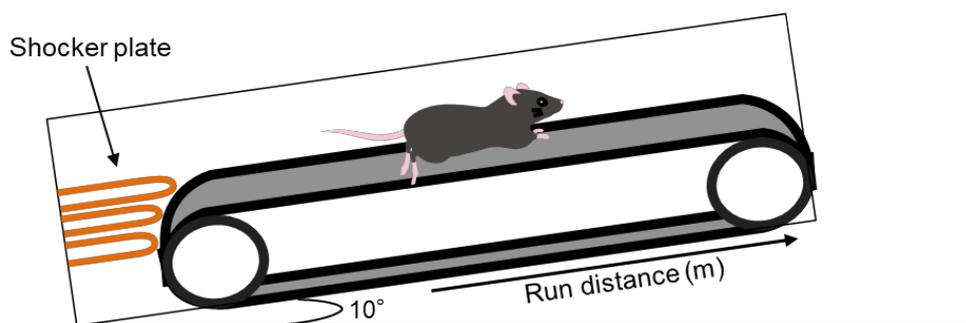
心エコー法は非侵襲的な検査であるが、実験動物の場合には安静を保つことが難しいために麻酔薬を用いることがある。しかし、麻酔薬によって心抑制が生じて正しく心機能を評価できないことが報告されており、手技に習熟していれば非麻酔下での心エコー法が推奨されている (Pachon et al., 2015)。今回は非麻酔下で心エコー法を行った。検査台に臥位で四肢と尾をテープで固定し、除毛クリームでマウスの前胸壁を除毛した。超音波診断装置および 12 MHz リニアプローブを用いて、2D 胸骨傍短軸像乳頭筋レベルで最適な像を描出した。M モード法に切り替え、記録紙スピード 40 mm/sec で記録の上、心拍数、左室拡張末期径、左室収縮末期径、左室前壁壁厚、左室後壁壁厚、左室内径短縮率を計測した。

2.14 トレッドミルテスト

運動能力は小動物用トレッドミル (図 2-5A) を用いた漸増負荷運動での持久能力を評価した (Takada et al., 2015; Takada et al., 2016; Yokota et al., 2009).

トレッドミル上にマウスを置き、トレッドミル傾斜角度を 0 度として 10 分間の安静の後に、速度 6 m/分でウォーミングアップ運動を開始した。10 分後にトレッドミルの傾斜角度を 10 度として、2 分毎に 2 m/分の速度を漸増した。漸増運動負荷中にマウスが途中で休まないようにトレッドミル後方のショッカープレートで電気刺激を与えた。その際、最大の電気刺激を与えても 10 秒以上電気刺激板から動かなくなった時点をマウスが「疲労困憊」に至ったと定義して測定を終了した (図 2-5B)。持久能力の指標として、走行時間と速度の積から走行距離を算出した。また、マウスの体重を考慮した垂直方向の仕事量 (= 体重×重力加速度×垂直方向の走行距離) を算出した。

A



B

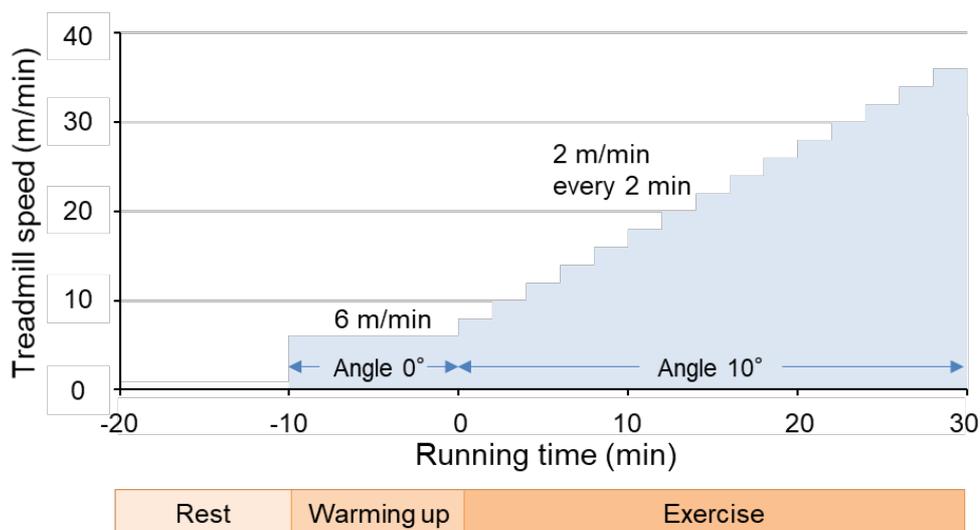


図 2-5. 小動物用トレッドミル (A) と運動プロトコール (B)

2.15 身体活動計

自発的身体活動量は、ケージ内 (測定範囲は 30 cm × 20 cm) のマウスを赤外線ビームセンサーで測定する運動量測定装置を用いて測定した。20 mm 間隔の赤外線センサー (14 個 × 7 個) を 0.5 秒に 1 回スキャンし、マウスの移動をカウントし、連続 2 光軸遮蔽 1 カウントとした。24 時間の総カウント数を計測した。

2.16 骨格筋線維の細胞膜透過処理

- 1) マウスの屠殺後に片脚の腓腹筋を取り出して、直ちに氷冷した組織保存溶液である BIOPS に漬けた。
- 2) BIOPS 内で周辺組織を可及的に除去した。
- 3) BIOPS 内で 18 ゲージの注射針 2 本を用いて骨格筋線維をほぐした。
- 4) サポニンを含む BIOPS 溶液内で 30 分振とうし、細胞膜透過処理を行った (図 2-6)。
- 5) MiR05 溶液で 10 分×2 回洗浄した。
- 6) 腓腹筋 2-3 mg を MiR05 溶液で満たされたチャンバー内に投入し、ミトコンドリア呼吸能を測定した。

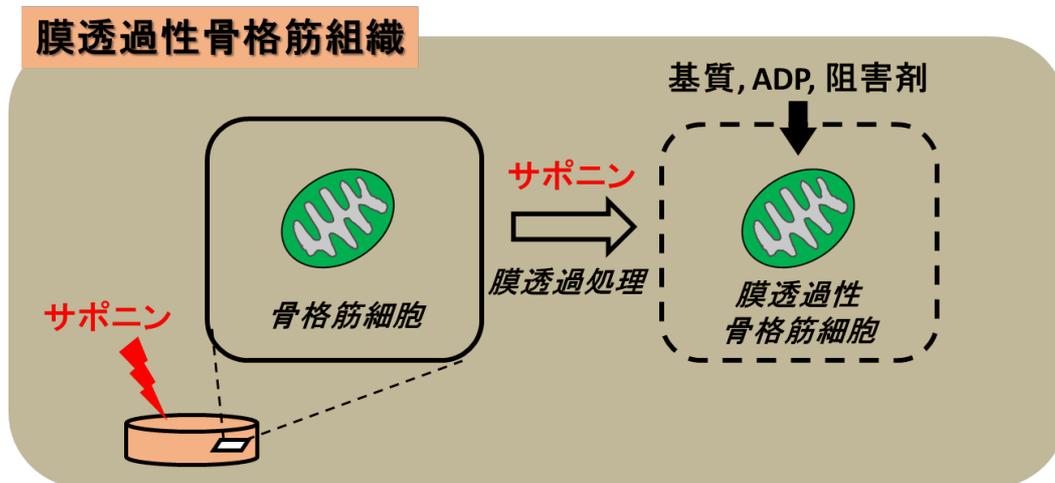


図 2-6. 骨格筋線維の膜透過処理

2.17 ミトコンドリア呼吸能 (酸化リン酸化能) 測定

ミトコンドリア呼吸能は、前述の細胞膜透過処理後の腓腹筋線維組織を用いて、高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置で測定した。測定は、チャンバー内を Mir05 溶液で満たし、37°Cで常時攪拌しながら実施した(Christiansen et al., 2015; Takada et al., 2016)。

骨格筋線維組織のミトコンドリア呼吸能は、ミトコンドリア複合体の基質を加えた際の、複合体 IV で消費される酸素速度 (O_2 flux) を測定している (図 2-7)。測定は下記のプロトコールで行った。

プロトコールに示す基質の濃度は、チャンバー内の最終濃度を示す。得られたデータは Datlab ソフトウェア ver.6 (Oroboros Instruments) で解析し、呼吸能は湿重量で補正した。

✓ プロトコール

- 1) 脂肪酸酸化 (fatty acid oxidation : FAO) の基質であるオクタノイルカルニチン (Octanoylcarnitine 0.2 mM) を加え、クエン酸回路を回すため Complex I に関連する基質であるリンゴ酸 (malate 2 mM) を加えた。FAO に関連するプロトンリークの際に生じる酸素消費を示しており、FAO LEAK と示した。
- 2) ADP (5 mM), $MgCl_2$ (5 mM) を加えた。FAO に関連する酸化リン酸化 (Oxidative phosphorylation; OXPHOS)を示しており、FAO OXPHOS と示した。
- 3) Complex I に関連する基質であるピルビン酸 (pyruvate 5 mM) とグルタミン酸 (glutamate 10 mM) を加えた。
- 4) ミトコンドリア外膜が保たれているかどうかを確認するために Cytochrome c (10 μ M) を加えた。投与前後で呼吸能が 10%以上上昇した場合、ミトコンドリア外膜の構造が保たれていないと判断して、計測は中止とした。
- 5) Complex II に関連する基質であるコハク酸 (succinate 2 mM) を加えた。FAO 及び Complex I, Complex II に関連するプロトンリークの際に生じる酸素消費を示しており、FAO+CI+II OXPHOS と示した。
- 6) Complex V の阻害剤であるオリゴマイシン (oligomycin 2 μ M) を加えた。FAO 及び Complex I, Complex II に関連するプロトンリークの際に生じる酸素消費を示しており、FAO+CI+II LEAK と示した。
- 7) Complex III の阻害剤であるアンチマイシン A (antimycin A 2.5 μ M) を加え、ミトコンドリアに関連する呼吸を停止させた。

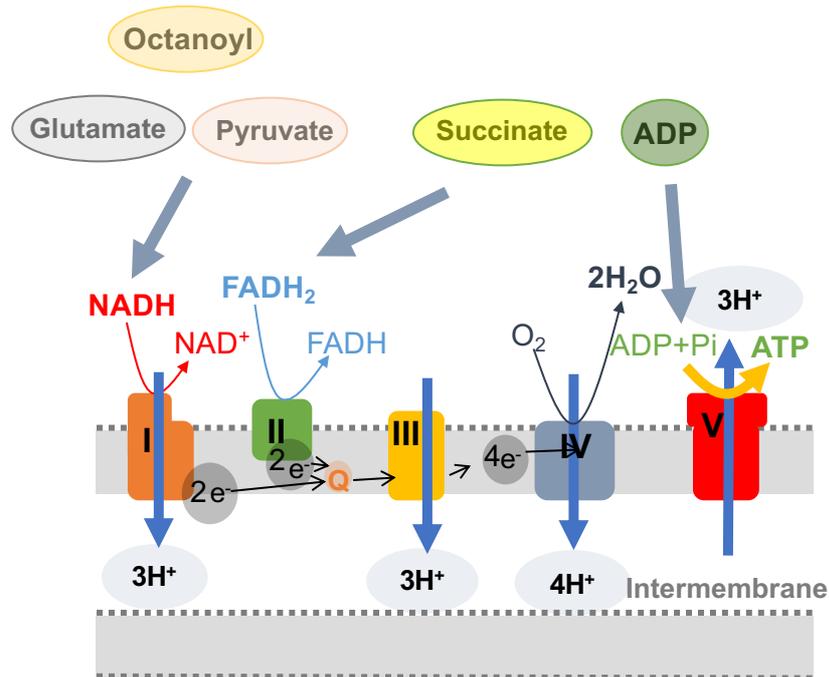


図 2-7. ミトコンドリア複合体とその基質

2.18 骨格筋線維からのミトコンドリア単離

- 1) マウスの屠殺後に片脚の腓腹筋を取り出して、直ちに氷冷した組織保存溶液である BIOPS に浸けた。
- 2) BIOPS 内で周辺組織を可及的に除去した。
- 3) Isolation buffer 1 ml の入ったマイクロチューブへ腓腹筋半分を投入した。
- 4) はさみをエッペン内に挿入し、4 分間 mince をした。
- 5) ピペットを用いて isolation buffer 1 ml を勢いよく入れ、2 分静置した。
- 6) 上清を 1 ml 捨て、新たに isolation buffer 1 ml を加え 2 分静置することを 3 回繰り返した。
- 7) Proteinase (0.2 mg/ml) を含む isolation buffer 1ml を加え、30 秒ごとに転倒混和しながら 2 分間反応させた。
- 8) 電動ドリル付きポッター型ホモジナイザーを用いて、1 回 20 秒かけて計 6 回ホモジナイズした。
- 9) ホモジナイズ溶液に isolation buffer を 1.5 ml 加え、isolation buffer 1.5 ml が入っている 15 ml コニカルチューブへ移した。
- 10) 遠心 (4°C, 750 g, 10 分) した。
- 11) 上清を、2 本の 2 ml マイクロチューブへ分注した。
- 12) 遠心 (4°C, 10,000 g, 10 分) し、上清を破棄した。
- 13) Isolation buffer 650 μ l を加え、ペレット周囲の結合織を分離し、上清を破棄した。

- 14) Isolation buffer 300 μ l を加え、溶液化したペレットを一つにまとめた。
- 15) 遠心 (4°C, 7,000 g, 3 分) し、上清を破棄した。
- 16) Suspension buffer 80 μ l を加え、十分に溶液化した。
- 17) CELLSTAR 96 穴マイクロプレートに Pierce BCA タンパク質アッセイキットの Reagent A と Reagent B を 50:1 の割合で混合した working reagent を作成し、各ウェルに 200 μ l ずつ分注した。
- 18) ブランクとして 1 ウェル空白を置き、2 mg/ml のアルブミンスタンダードを 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ l ずつウェルに混合した。
- 19) 測定するサンプルは各 2 μ l ずつウェルに注入した。
- 20) 37°C で 30 分間インキュベートした。
- 21) マイクロプレートリーダーで 590 nm 波長の吸光度を計測した。
- 22) スタンダードの吸光度から得られる検量線を元にしてサンプルのタンパク濃度を算出した。

上記のタンパク濃度測定は、スタンダード、サンプルとも同一サンプルを二重で各ウェルに置き、2 つの平均値を採用した。

2.19 透過型電子顕微鏡

マウスにソムノペンチルを投与し深鎮静とした後に、2.5%グルタルアルデヒドを含む 0.1 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を左室心尖部から投与して循環固定を行い、腓腹筋を摘出した後に上記と同じ固定液に浸け、4°C で 12 時間置いて前固定を行った。1% 酸化オスミウムを含む 0.1 mM リン酸緩衝液に 1.5 時間浸け、後固定を行い、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。これらの超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し透過型電子顕微鏡 (JEM1400, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) で観察した。

定量評価は、8 μ m \times 8 μ m の関心領域を設定し、画像解析ソフト Image J (U.S. National Institutes of Health) を用いて個々のミトコンドリアをトレースすることで単位面積あたりのミトコンドリア面積、損傷したミトコンドリア面積を測定した。

2.20 統計学的解析

統計処理は、GraphPad Prism 7 software (Graphpad Software, San Diego, California, USA) を用いて行った。データは、平均値 \pm 標準誤差で示した。2 群間の平均値の差の検定はスチューデントの t 検定で行った。多群間の平均値の差の検定は一元配置分散分析を用いて行い、有意差が認められた場合に Tukey 法または Dunnett 法による多重比較検定を行った。生存曲線は Kaplan-Meier 法で作図し、多重比較は Bonferroni 法を用いた。P-values < 0.05 をもって統計学的に有意と判定した。

3 結果

3.1 実験1 MI後の骨格筋 XO-ROS, XOR タンパク発現の時系列的検討及びその分布の検討

3.1.1 低酸素の検討

MI後に骨格筋が低酸素状態にあるかどうかを評価した。術後6時間から術後1日まで時系列検討を行ったところ、MI群の *Car9* mRNA 発現は Sham 群に比較し、術後12時間の時点で有意に増加した。この結果から、急性期におけるMI後の骨格筋は一過性に低酸素状態であることが明らかとなった (図3-1)。

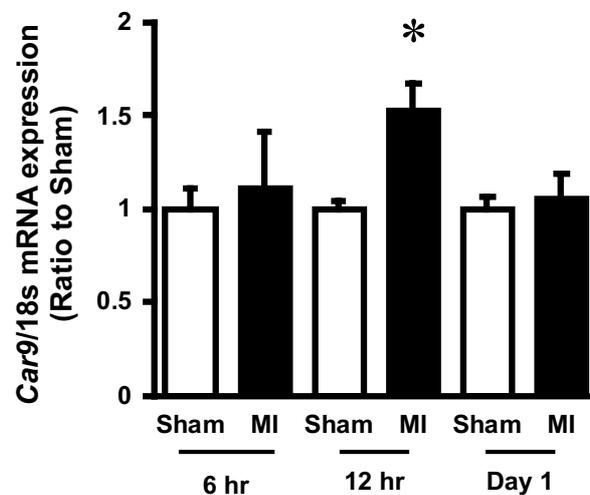


図3-1. 急性期におけるMI後の骨格筋の低酸素評価

術後6時間から術後1日までのSham群とMI群の腓腹筋中 *Car9* mRNA の発現量。データは平均値±標準誤差。各群 $n = 5$ 。* $P < 0.05$ vs. Sham.

3.1.2 骨格筋中の XO-ROS の時系列検討

MI 後の骨格筋で、どの時点から XO-ROS が増加しているかを評価するために、XO-ROS を時系列に評価した。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 日といった慢性期には MI 群と Sham 群の間に有意差はなかった (図 3-2A)。XO-ROS が増加した術後 1 日において、XOR 活性も同様に MI 群で増加していた (図 3-2B)。

次に、最も XO-ROS が増加した術後 1 日に腓腹筋中の *Xor*mRNA や XOR タンパク発現の評価を行った。*Xor* mRNA の発現は Sham 群と比較し MI 群で増加傾向であった (図 3-2C)。また、XOR タンパク発現は Sham 群と比較し MI 群で有意に増加した (図 3-2D)。なお、先行研究で報告されているようなウエスタンブロッティング法で XO と XDH のバンドの鑑別はできなかった (Engberding et al., 2004)。

これらの結果から、MI の急性期における骨格筋は XO-ROS, XOR の遺伝子およびタンパク発現が増加することが明らかとなった。

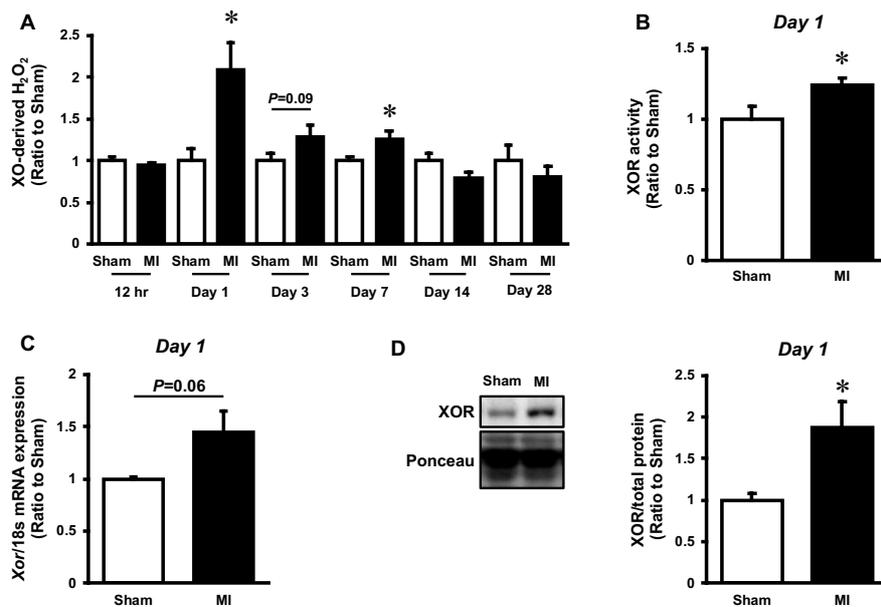


図 3-2. MI 後の急性期における骨格筋 XO 由来活性酸素種 (XO-ROS) の評価

A: 術後 12 時間から術後 28 日までの Sham 群と MI 群の腓腹筋中 XO 由来の過酸化水素 (H₂O₂) 産生量. 各群 $n = 6-16$. **B:** 術後 1 日の XOR 活性. 各群 $n = 8$. **C:** *Xor* mRNA 発現量各群. $n = 5$. **D:** 術後 1 日の XOR タンパク発現の代表的なウエスタンブロッティングバンドと定量解析. $n = 4$. データは平均値±標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Sham.

3.1.3 骨格筋における XOR タンパクの分布の検討

骨格筋線維型における XOR タンパク発現の分布を評価するため、C57BL/6J のマウスの腓腹筋の連続切片を用いて、免疫染色および NADH 染色を行った。NADH 染色で濃く染まる I 型線維や IIa 型線維と一致して、XOR が染色された。このことから、XOR は遅筋線維に多く発現することが示された (図 3-3A)。また、術後 7 日の MI 群の遅筋線維 (ヒラメ筋) と速筋線維 (長趾伸筋) の XO-ROS の評価を行ったところ、遅筋線維の XO-ROS は速筋線維と比較し、有意に高かった (図 3-3B)。

これらの結果より、XO は遅筋線維に多く発現することが明らかとなった。

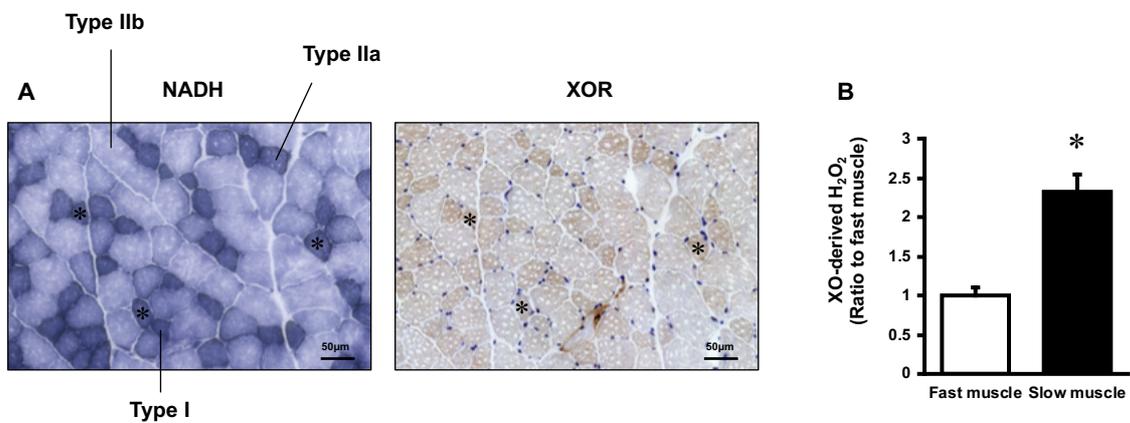


図 3-3. XO タンパクおよび XO-ROS の分布

A: 野生型マウスの腓腹筋切片の NADH 染色 (左) 及び XOR 染色 (右) の代表的な図。Scale bar, 50 μm. **B:** 遅筋 (ヒラメ筋) と速筋線維 (長趾伸筋) の XO 由来の H₂O₂ 産生量。各群 $n = 7$ 。データは平均値 ± 標準誤差。* $P < 0.05$ vs. Fast muscle.

3.1.4 左室心筋, 血清の XO-ROS の評価

上記と同様に, 心筋および血清で MI 後の XO-ROS の評価を行った. 骨格筋の時系列とは異なり, 術後 28 日の慢性期でのみ MI マウスで心筋および血清の XO-ROS が増加することが明らかとなった (図 3-4).

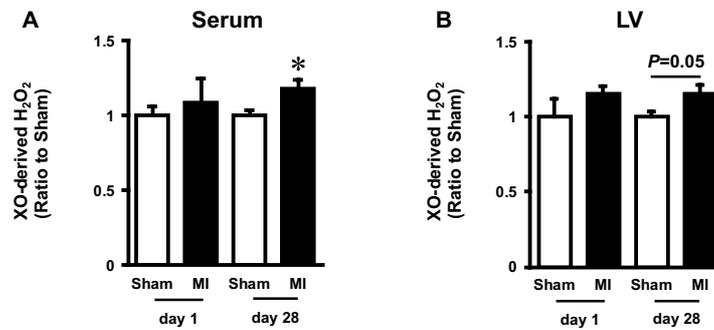


図 3-4. 左室心筋および血清の XO-ROS 評価

MI 術後 1 日と術後 28 日の (A) 血清及び (B) 左室心筋非梗塞部の XO 由来の H₂O₂ 産生量. 各群 $n = 7$. データは平均値 \pm 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Sham

3.2 実験2 急性期における XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋に及ぼす影響の検討

3.2.1 生存率

図 3-2 の実験結果より，XO-ROS の増加は MI の急性期の骨格筋に作用する可能性が示唆された．次に，MI 後に XO-ROS が増加する急性期（7 日後まで）に XO 阻害薬である febuxostat (5 mg/kg body weight/day, oral gavage) の介入実験を行った (図 2-3)．

術後 28 日までの生存率は Sham+Ve 群で 92.3%であった．MI+Ve 群および MI+Feb 群の術後 28 日までの生存率はそれぞれ 42.9%，48.4%と MI+Ve 群と MI+Feb 群に有意差はなかった (図 3-5)．

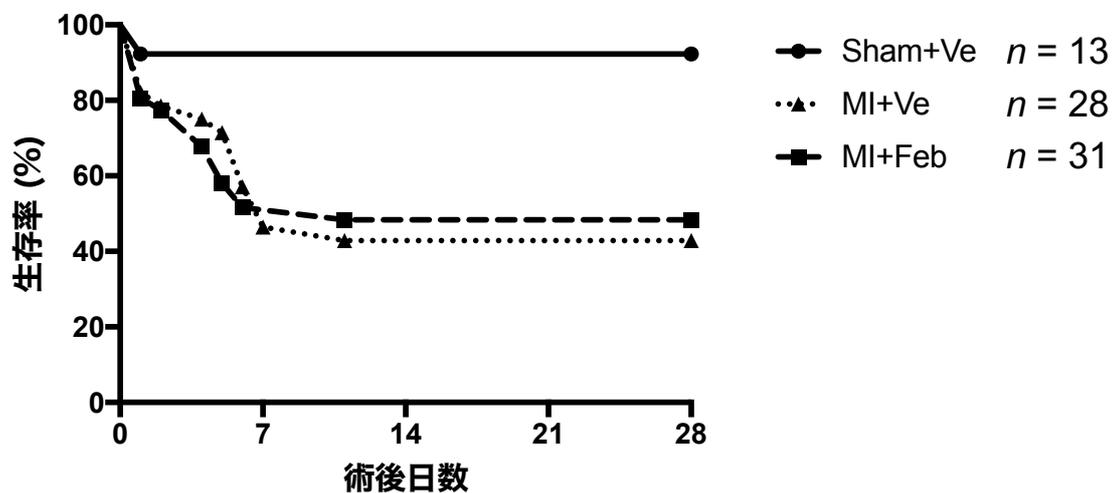


図 3-5. Sham+Ve 群, MI+Ve 群, MI+Feb 群の術後生存曲線
 $n = 13$ (Sham+Ve), $n = 28$ (MI+Ve), $n = 31$ (MI+Feb)

3.2.2 マウスにおける XO 阻害薬の効果の検証

XO-ROS 産生が最も高値であった術後 1 日に XO 阻害薬の効果を確認するため、腓腹筋中の XO-ROS の測定を行った。XO-ROS は Sham+Ve 群と比較し、MI+Ve 群で有意に増加し、MI+Feb 群では MI+Ve 群および Sham+Ve 群と比較し、有意に減少した(図 3-6)。

この結果により、骨格筋における febuxostat 5 mg/kg/day の薬効を確認した。

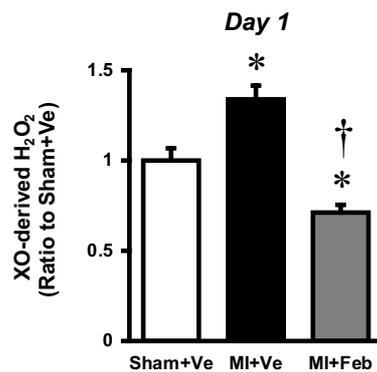


図 3-6. MI 術後 1 日の骨格筋中 XO-ROS 産生における febuxostat 投与の効果

各群 $n = 6-7$. データは平均値 \pm 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Sham+Ve; † $P < 0.05$ vs. MI+Ve.

3.2.3 動物特性

表 3-1 に術後 28 日の体重, 臓器重量, 心エコー指標および心筋梗塞サイズの結果を示す. 体重に各群で差はなかった. 体重で標準化した左室重量や肺重量は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し, 有意に増加した. 心エコーで評価した左室内径や左室後壁厚は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し, 有意に増加し, 左室短縮率は有意に低下した. 心拍数は各群に差はなかった. 以上から, 術後 28 日で MI+Ve 群は左室リモデリング及び心不全を呈するモデルであることが確認された.

MI+Feb 群は MI+Ve 群と比較し, 左室重量や左室内径, 左室短縮率に差はなく, febuxostat は MI の心形態や左室機能に影響しなかった.

表 3-1 術後 28 日の臓器重量や心エコー指標, 組織学的評価

	Sham+Ve n=6	MI+Ve n=6	MI+Feb n=5
体重及び臓器重量			
体重, g	25.3±0.5	25.0±0.1	25.9±0.2
左室重量/体重, mg/g	2.95±0.06	4.11±0.16*	4.08±0.10*
肺重量/体重, mg/g	5.39±0.10	8.49±0.67*	6.50±0.51
心エコー			
心拍数, 回/分	636±25	679±13	615±16
左室拡張末期径, mm	3.4±0.05	5.5±0.1*	5.5±0.1*
左室収縮末期径, mm	1.8±0.1	4.9±0.2*	4.6±0.2*
左室内径短縮率, %	42.3±0.7	12.3±1.4*	16.3±2.9*
左室前壁厚, mm	0.8±0.02	0.3±0.03*	0.5±0.1*
左室後壁厚, mm	0.8±0.03	1.0±0.04*	1.0±0.02*
組織学的評価			
心筋梗塞サイズ, %	NA	48.0±4.4	48.8±4.9

データは平均値±標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Sham+Ve.

3.2.4 運動耐容能および身体活動量の評価

術後 28 日の運動耐容能を評価するため、トレッドミルテストを行った。MI+Ve 群の走行時間、走行距離、仕事量は、Sham+Ve 群に比較して、有意に低下した。MI+Feb 群の走行時間、走行距離、仕事量は、MI+Ve 群と比較し、有意に増加した(図 3-7A)。嫌気性代謝の指標として運動直後の血中乳酸値を測定した。単位仕事量当たりの血中乳酸値は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し、有意に増加し、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し、有意に低下した (図 3-7B)。1 日あたりの自発的身体活動量は各群に差はなかった (図 3-7C)。

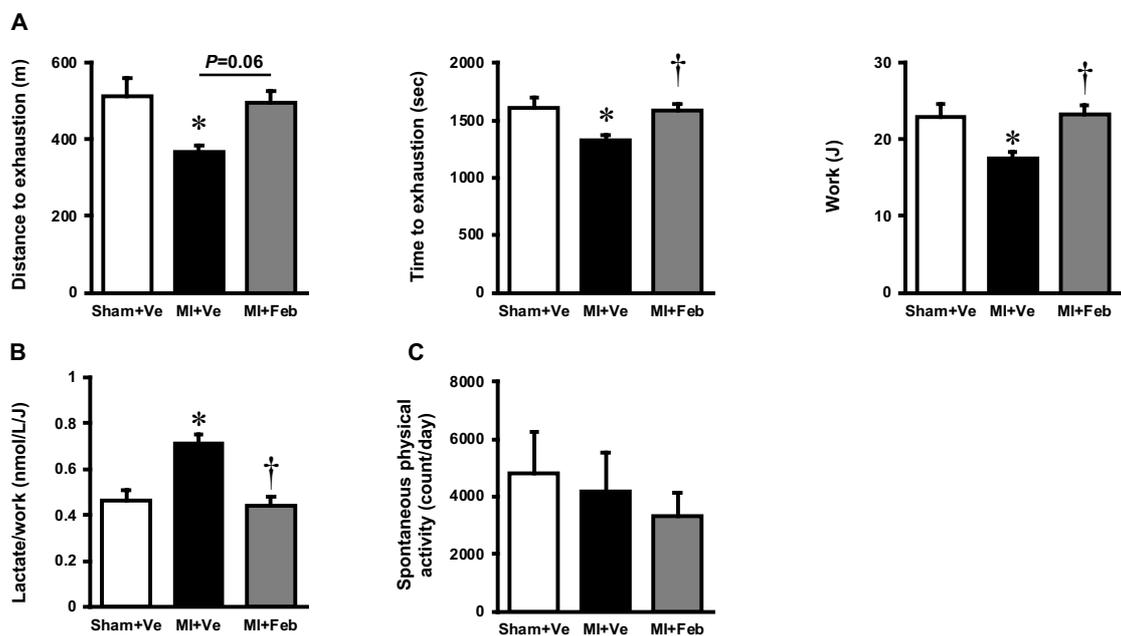


図 3-7 運動耐容能評価および身体活動量評価。

A: 術後 28 日にトレッドミルで評価した走行距離、走行時間、仕事量。各群 $n = 5-6$ 。
B: トレッドミル運動直後の単位仕事当たりの血中乳酸値。各群 $n = 5-6$ 。
C: 身体活動計で測定した自発的身体活動量。各群 $n = 6$ 。データは平均値±標準誤差。* $P < 0.05$ vs. Sham+Ve; $†P < 0.05$ vs. MI+Ve.

3.2.5 骨格筋ミトコンドリア呼吸能 (酸化的リン酸化) 評価

術後 28 日の骨格筋ミトコンドリア呼吸能を評価するために、腓腹筋線維を細胞膜透過処置した後、高感度オキシグラフィーを用いて酸素消費速度 (O_2 flux) を測定した。脂肪酸酸化 (FAO) とミトコンドリア複合体 I (CI), ミトコンドリア複合体 II (CII) に関連したプロトンリークの際に生じる O_2 flux (FAO+CI+CII LEAK state) は各群に差はなかった。酸化的リン酸化 (FAO+CI+CII OXPHOS state) は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し有意に低下した。MI+Feb 群は MI+Ve 群と比較し、FAO+CI+CII OXPHOS state の O_2 flux は有意に増加した (図 3-8A)。FAO+CI+CII OXPHOS を FAO+CI+CII LEAK で割った値である respiratory control ratio (ミトコンドリアの酸化的リン酸化の効率を反映する) は、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し、有意に増加した (図 3-8B)。

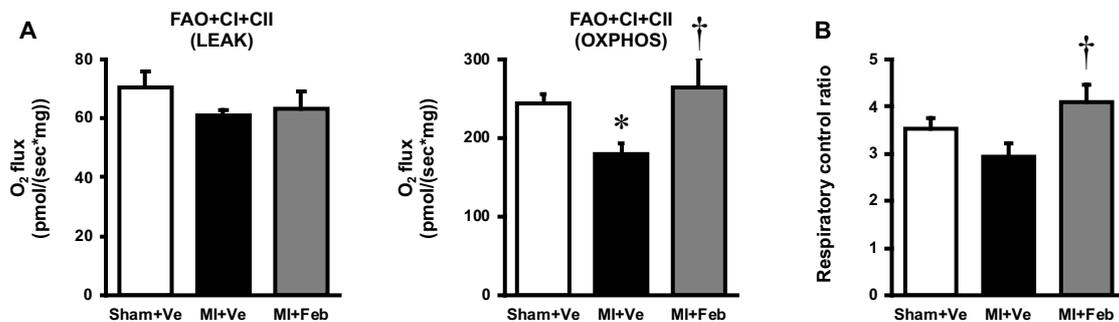


図 3-8. 骨格筋ミトコンドリア呼吸能 (酸化的リン酸化) 評価

A: 細胞膜透過処置をした腓腹筋線維での FAO+CI+CII LEAK state (左) および OXPHOS state (右) の O_2 flux. 各群 $n = 4-7$. **B:** Respiratory control ratio. 各群 $n = 4-7$. データは平均値 \pm 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Sham+Ve; † $P < 0.05$ vs. MI+Ve.

3.2.6 骨格筋ミトコンドリア形態および量の評価

図3-8で骨格筋ミトコンドリア機能がMI+Ve群で低下し, MI+Feb群で改善したが, この効果がミトコンドリアの質もしくは量のどちらが要因によるものか検討を行った.

透過型電子顕微鏡にて術後28日の骨格筋ミトコンドリアの形態的評価を行った. クリスタ構造が破壊されたミトコンドリア面積はMI+Ve群でSham+Ve群と比較し, 有意に増加した. 損傷を受けたミトコンドリア面積はMI+Feb群でMI+Ve群に比較し, 有意に減少した. したがって, XO-ROSが骨格筋ミトコンドリアの構造異常に関与することが示唆された(図3-9A, B).

次に, 透過型電子顕微鏡画像におけるミトコンドリア面積の定量評価を行ったが, 各群に有意差はなかった(図3-9C). 骨格筋ミトコンドリア量を反映する代表的なマーカーであるVDACのタンパク発現量をウエスタンブロッティング法で評価した. 術後28日の骨格筋において, 各群の間にVDACの発現量に有意差はなかった(図3-9D).

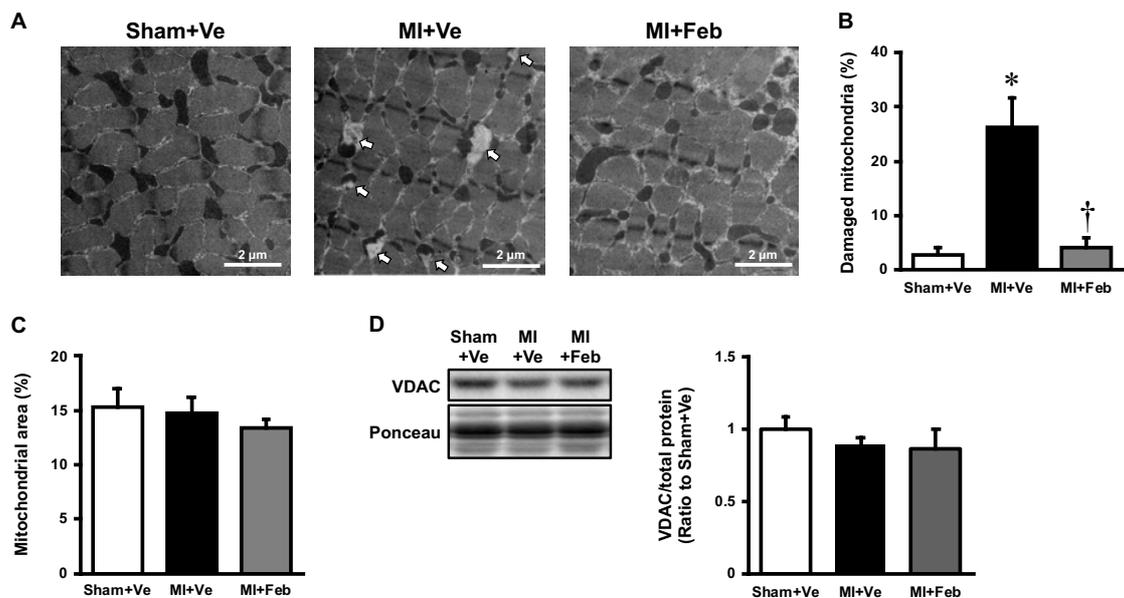


図3-9. 骨格筋ミトコンドリア形態および量の評価

A: 術後28日の代表的な腓腹筋での電子顕微鏡画像. Scale bar, 2 μ m. **B:** クリスタ構造の損傷を受けたミトコンドリア面積の単位ミトコンドリア面積当たりの定量評価. 各群 $n=4$. **C:** 単位面積当たりのミトコンドリア面積の定量評価. 各群 $n=4$. **D:** 術後28日の腓腹筋でのミトコンドリア量のマーカーであるVDACのタンパク発現の代表的なバンドと定量評価. 各群 $n=5-7$. データは平均値 \pm 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Sham+Ve; † $P < 0.05$ vs. MI+Ve.

3.2.7 骨格筋ミトコンドリア生合成の評価

ミトコンドリア生合成に関わるタンパクである AMPK α のリン酸化を評価した。術後 1 日および術後 28 日の腓腹筋で AMPK α のリン酸化に各群で有意差はなかった (図 3-10A)。AMPK α のリン酸化と同様に、ミトコンドリア生合成に関わる *Nrf1* mRNA の評価を行った。術後 1 日の腓腹筋で *Nrf1* mRNA 発現に各群に有意差はなかった (図 3-10B)。

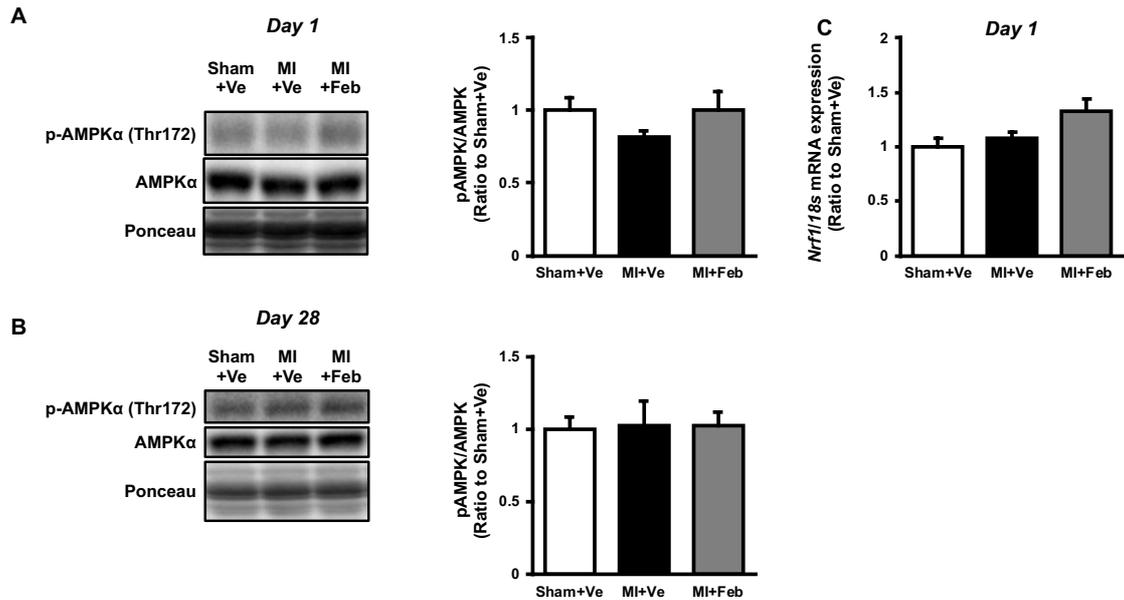


図 3-10. 骨格筋でのミトコンドリア生合成の評価

A, B: 術後 1 日、術後 28 日の腓腹筋におけるミトコンドリア生合成に関連した AMPK のリン酸化の代表的なバンドおよび定量評価。各群 $n=5-7$ 。 **C:** 術後 1 日の腓腹筋におけるミトコンドリア生合成に関連した *Nrf1* mRNA 発現。各群 $n=5-8$ 。データは平均値 \pm 標準誤差。

3.2.8 マイトファジーの評価

透過型電子顕微鏡画像から、MI 群において障害されたミトコンドリアが観察されたため、損傷ミトコンドリアの処理機構が MI+Ve で低下し、MI+Feb 群で改善していると考え、ミトコンドリアのオートファジー（マイトファジー）の評価を行った。腓腹筋から単離したミトコンドリアで、オートファゴソームのマーカーである LC3B-II (Laker et al., 2017) を術後 1 日および術後 3 日評価した。術後 3 日の VDAC で標準化した LC3B-II タンパク発現は MI+Feb 群で Sham+Ve 群、MI+Ve 群と比較し有意に増加した (図 3-11)。この結果から、XO 阻害によるミトコンドリア障害の改善にはマイトファジーが関与することが示唆された。

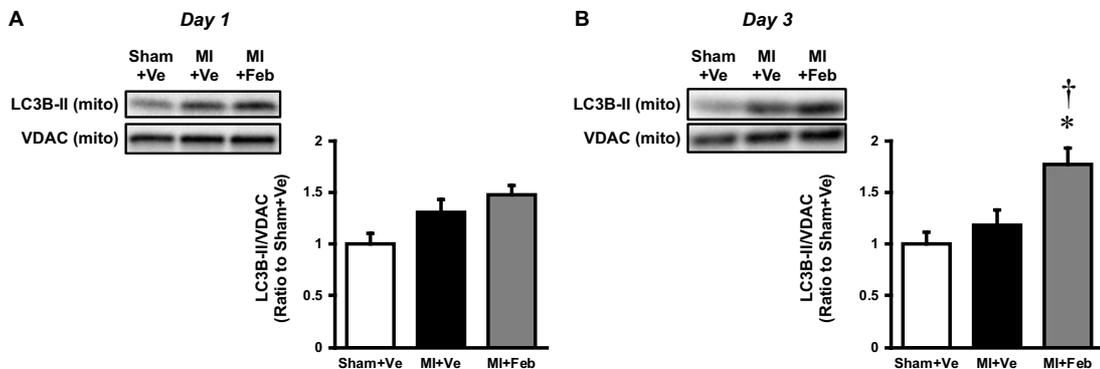


図 3-11. 腓腹筋から単離したミトコンドリアにおけるオートファゴソームの評価

A: 術後 1 日. 各群 $n = 5$. **B:** 術後 3 日. 各群 $n = 5-8$. データは平均値 \pm 標準誤差.

* $P < 0.05$ vs. Sham+Ve; † $P < 0.05$ vs. MI+Ve.

3.2.9 骨格筋量および萎縮の評価

骨格筋量の評価として、体重で標準化した骨格筋重量を測定した。腓腹筋重量（速筋と遅筋の混合筋）や長趾伸筋重量（速筋）では各群に有意差はなかった。一方、遅筋であるヒラメ筋重量は MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し、有意に増加した (図 3-12A)。骨格筋の組織学的評価として、HE 染色により腓腹筋の遅筋線維と速筋線維の横断面積を計測した。遅筋線維の筋横断面積は MI+Ve 群で Sham+Ve 群に比較し、有意に減少した。MI+Feb 群では MI+Ve 群と比較し、有意に増加した (図 3-12B, C)。速筋線維の筋横断面積は群間で差は見られなかった。

この結果から、心不全の骨格筋萎縮に XO が関与し、XO 阻害によって改善することが明らかになった。

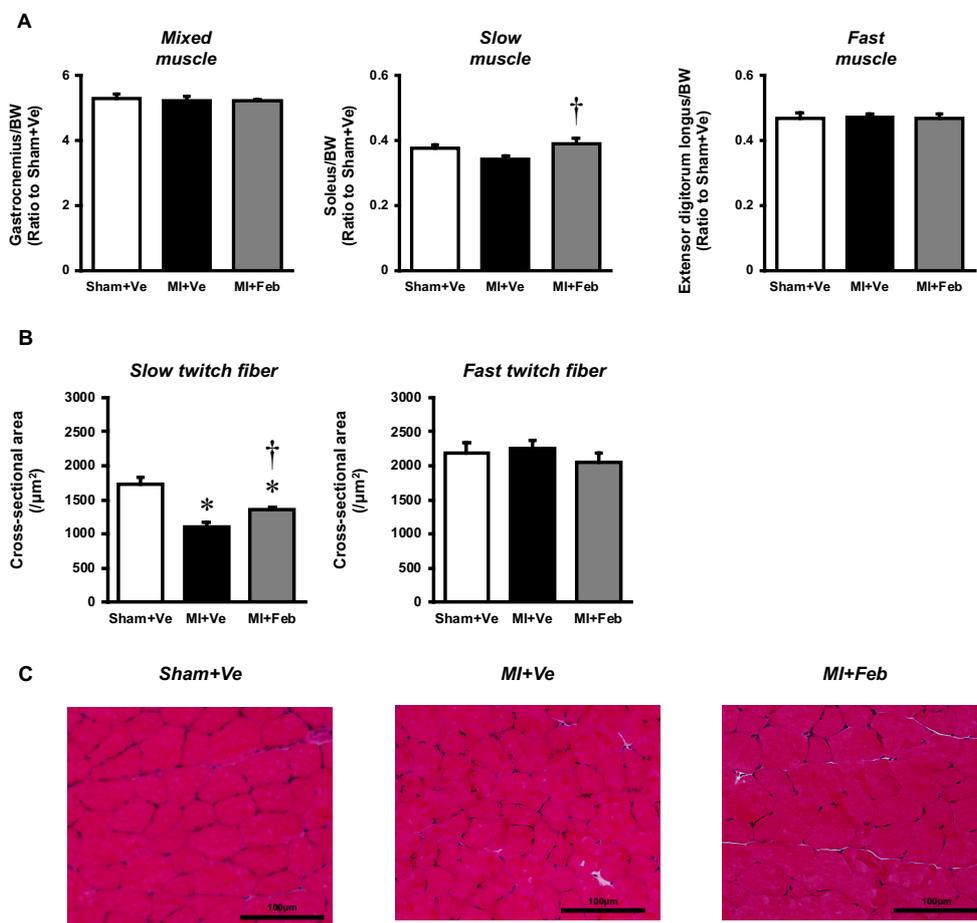


図 3-12. 骨格筋量および萎縮の評価。

A: 腓腹筋（混合線維），ヒラメ筋（遅筋），長趾伸筋（速筋）の体重で標準化した筋重量。各群 $n = 5-6$ 。 **B:** 腓腹筋の遅筋線維及び速筋線維の横断面積。各群 $n = 5-6$ 。 **C:** 代表的な腓腹筋の遅筋線維の HE 染色。 Scale bar, 100 μm。 データは平均値±標準誤差。 * $P < 0.05$ vs. Sham+Ve; [†] $P < 0.05$ vs. MI+Ve。

3.2.10 タンパク合成に関わるシグナルの評価

MI 群における骨格筋萎縮がタンパク合成の低下によるものか、タンパク分解の亢進によるものか検討を行った。

まず、タンパク合成に関わる mTOR-p70S6 kinase シグナルを評価した。術後 1 日の骨格筋におけるリン酸化した mTOR の発現は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し有意に減少し、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し有意に増加した (図 3-13)。術後 3 日の骨格筋におけるリン酸化した 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 群で有意に増加した (図 3-13)。

この結果から、XO-ROS が筋タンパク合成の mTOR-p70S6 kinase シグナルに関与することが明らかとなった。

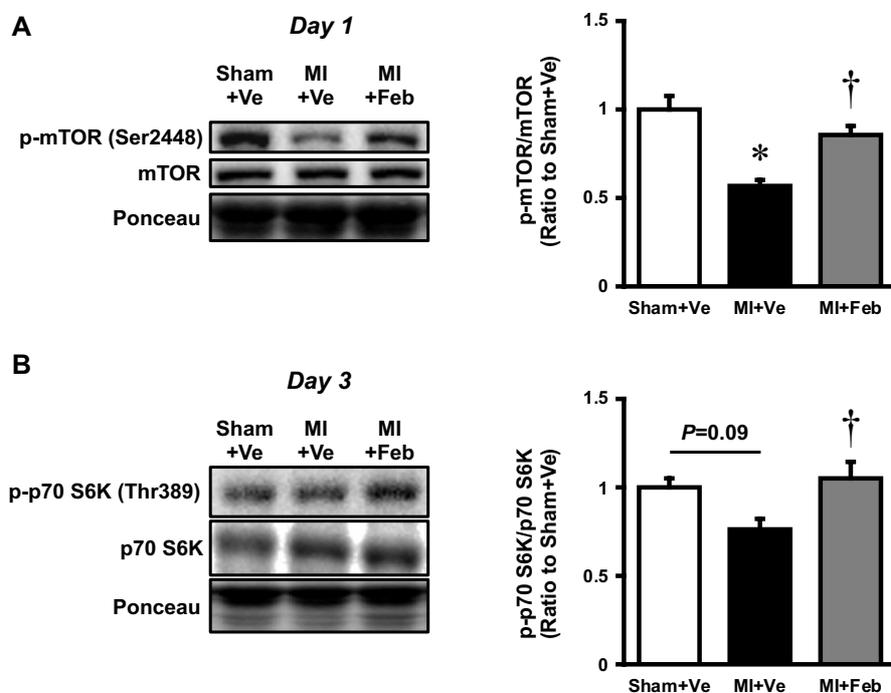


図 3-13. mTOR-p70S6 Kinase シグナルの評価

A: 術後 1 日の腓腹筋でのリン酸化 mTOR の代表的なバンドと定量評価。各群 $n=7-8$ 。
B: 術後 3 日の腓腹筋でのリン酸化 p70S6 kinase の代表的なバンドと定量評価。各群 $n=6-8$ 。データは平均値 \pm 標準誤差。* $P<0.05$ vs. Sham+Ve; † $P<0.05$ vs. MI+Ve。

3.2.11 タンパク分解に関わるシグナルの評価

次に、タンパク分解に関わるユビキチン-プロテアソーム系のユビキチンリガーゼである MuRF1 や Atrogin1 のタンパク発現を術後 1 日および 3 日の腓腹筋で評価したが、各群に有意な差はなかった (図 3-14).

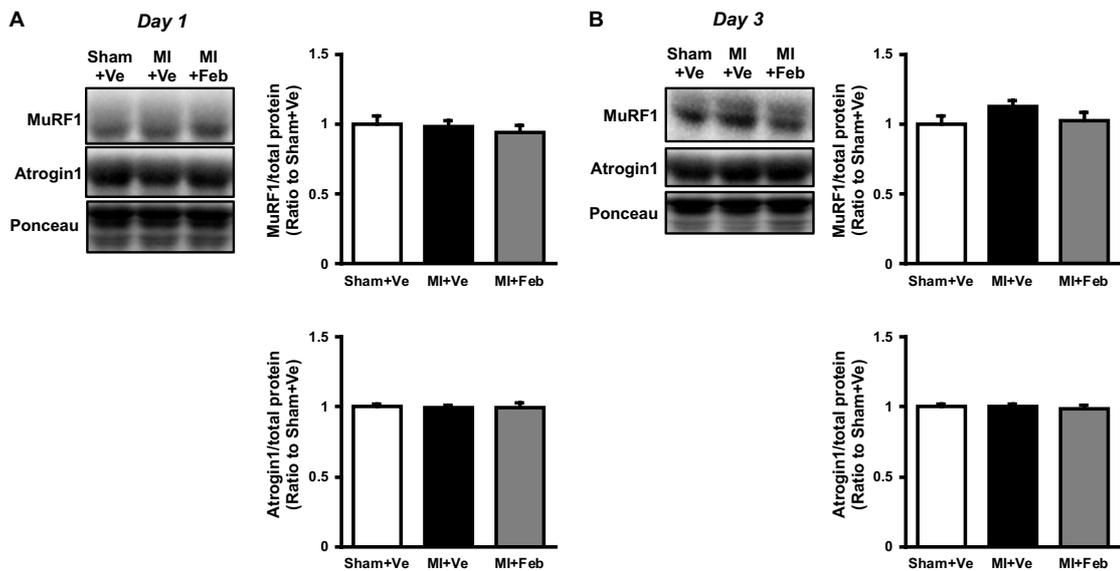


図 3-14. ユビキチン-プロテアソーム系のタンパク発現の評価

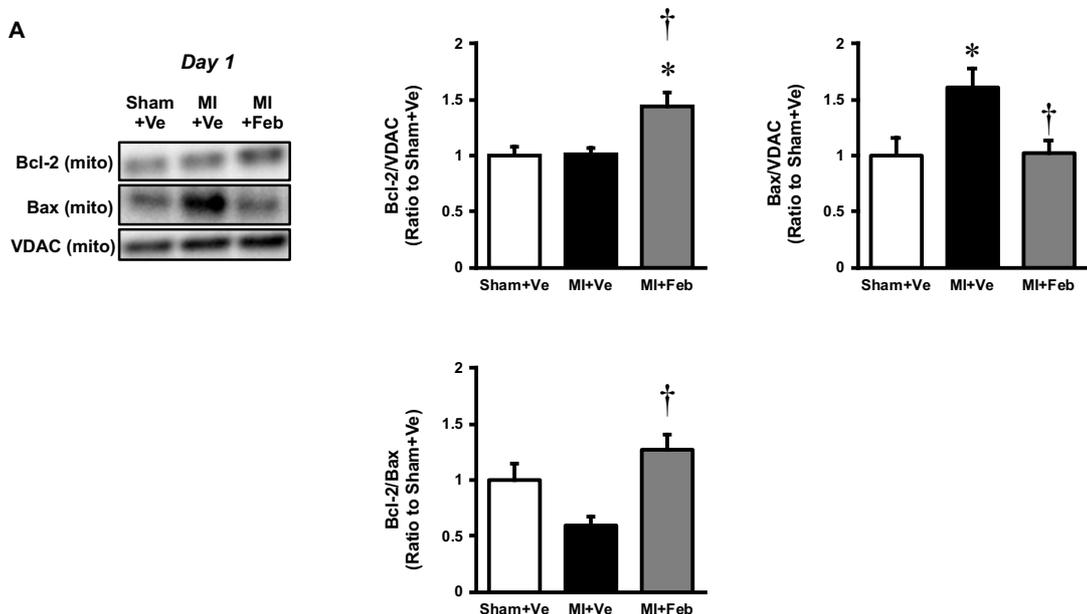
A: 術後 1 日, **(B)** 術後 3 日の MuRF1, Atrogin1 の代表的なバンドと定量評価. 各群 $n = 6-8$. データは平均値 \pm 標準誤差.

3.2.12 アポトーシスの評価

透過型電子顕微鏡画像の解析結果から、MI+Ve 群で損傷を受けたミトコンドリアがあり (図 3-9), 骨格筋萎縮と併せてミトコンドリア由来のアポトーシスが亢進していると考え、腓腹筋からミトコンドリアを抽出し、アポトーシスを促進するタンパクである Bax やアポトーシスを抑制するタンパクである Bcl-2 の評価を行った。VDAC で標準化した Bcl-2 発現量は MI+Feb 群で Sham+Ve 群及び MI+Ve 群と比較し、有意に増加した。Bax は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し有意に増加したが、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し、有意に低下した。Bcl-2/Bax 比は MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し、有意に増加した (図 3-15A)。

また、術後 3 日の腓腹筋でアポトーシスの実行に関わる Cleaved Caspase3 のタンパク発現を評価した。総タンパク量で標準化した Cleaved Caspase3 発現は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し有意に増加したが、MI+Feb 群で MI+Ve と比較し、有意に低下した (図 3-15B)。

これらの結果から、MI の骨格筋においてミトコンドリアを介したアポトーシスを促進するシグナルが亢進し、XO 阻害薬の投与によりそれらのシグナルが抑制されることが明らかとなった。



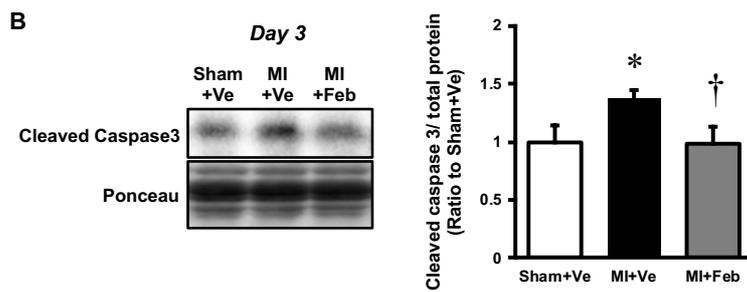


図 3-15. ミトコンドリアを介したアポトーシス経路の評価

A: 術後 1 日の腓腹筋から抽出したミトコンドリアでの Bcl-2, Bax の代表的なバンドと定量評価. 各群 $n = 8$. **B:** 術後 3 日の腓腹筋での Cleaved Caspase 3 の代表的なバンドと定量評価. 各群 $n = 8$. データは平均値 \pm 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Sham+Ve; † $P < 0.05$ vs. MI+Ve.

3.2.13 骨格筋における解糖系代謝の評価

解糖系代謝の主要酵素である HK2, PKM2, GAPDH のタンパク発現の評価を術後 28 日の腓腹筋で行ったが, 各群に有意な差はなかった (図 3-16).

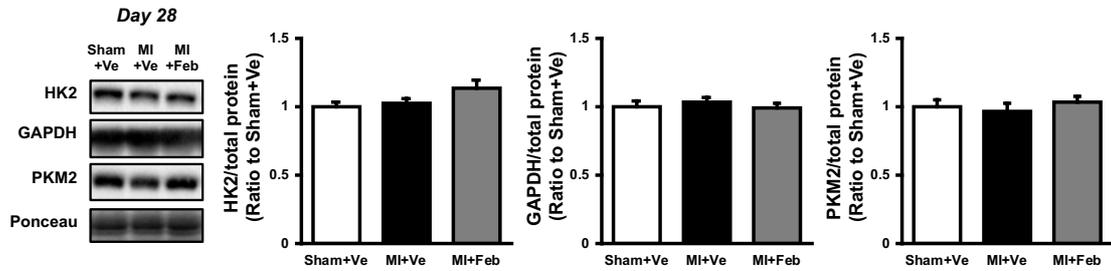


図 3-16. 解糖系に関わるタンパク発現の評価

術後 28 日の腓腹筋での HK2, PKM2, GAPDH の代表的なバンドと定量評価. 各群 $n = 5$. データは平均値 \pm 標準誤差.

3.2.14 骨格筋における脂肪酸代謝の評価

脂肪酸代謝の評価として、細胞膜透過処置をした腓腹筋線維に脂肪酸 (オクタノイルカルニチン) を加えたミトコンドリア呼吸能の測定を行った。LEAK state の O₂ flux は MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し有意に増加した。ADP を加えた OXPHOS state の O₂ flux は MI+Ve 群で Sham+Ve 群と比較し有意に低下し、MI+Feb 群で MI+Ve 群と比較し有意に改善した (図 3-17)。

以上から、MI では Sham と比較し脂肪酸代謝が低下するが、XO 阻害薬の投与により脂肪酸代謝が改善することが明らかとなった。

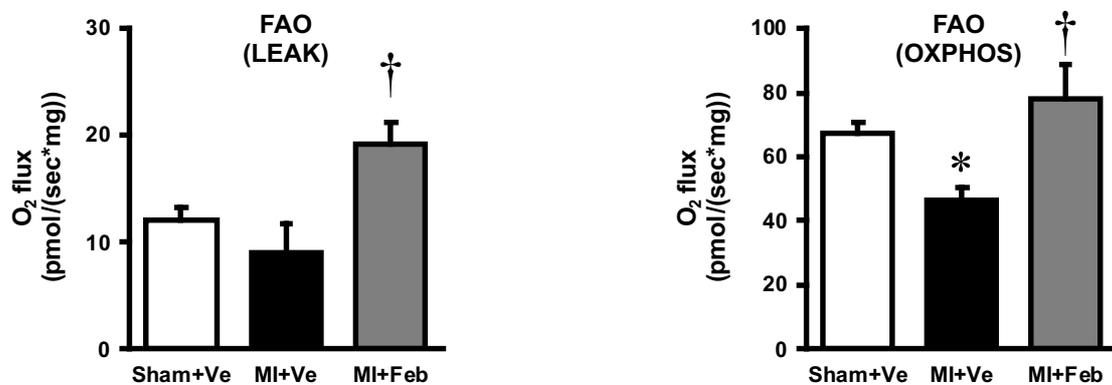


図 3-17. 脂肪酸代謝の評価

細胞膜透過処置をした腓腹筋線維に脂肪酸を加えた FAO LEAK state 及び ADP を加えた FAO OXPHOS state での O₂ flux. 各群 $n = 4-7$. データは平均値 \pm 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Sham+Ve; † $P < 0.05$ vs. MI+Ve.

3.3 実験3 慢性期から XO 阻害薬の投与が MI 後の骨格筋異常および運動耐力の低下に及ぼす影響の検討

3.3.1 臓器重量及び心エコー

MI における XO 阻害薬の治療効果を検討するため、MI 後心不全の慢性期から febuxostat の介入実験を行った (図 2-3)。

表 3-2 に術後 6 週の臓器重量および心エコー指標を示す。体重に MI+Ve 群と MI+Feb 群の間に有意差はなかった。体重で標準化した左室重量や肺重量は両群で有意差はなかった。心エコーで評価した左室内径や左室後壁厚、左室短縮率および心拍数は両群で有意差はなかった。慢性期からの XO 阻害薬の投与は MI 群の心臓の形態や機能に影響しなかった。

表 3-2. 術後 6 週の体重、臓器重量および心エコー指標

	MI+Ve n = 7	MI+Feb n = 6
体重および臓器重量		
体重, g	26.1±0.2	26.7±0.8
左室重量/体重, mg/g	4.22±0.11	4.47±0.18
肺重量/体重, mg/g	6.85±0.71	7.66±0.85
心エコー		
心拍数, 回/分	628±15	654±22
左室拡張末期径, mm	5.6±0.2	5.6±0.3
左室収縮末期径, mm	4.6±0.3	4.8±0.2
左室内径短縮率, %	18.5±3.3	15.3±1.6
左室前壁厚, mm	0.3±0.03	0.5±0.1
左室後壁厚, mm	0.9±0.1	1.0±0.03

データは平均値±標準誤差。

3.3.2 運動耐容能の評価

術後6週の運動耐容能を評価するため、トレッドミルテストを行った。走行時間、走行距離、仕事量は、MI+Ve 群と MI+Feb 群に有意差はなかった。嫌気性代謝の指標として運動直後の血中乳酸値を測定した。単位仕事量当たりの血中乳酸値は MI+Ve 群と MI+Feb 群で有意な差はなかった (図 3-18)。

これらの結果から、慢性期からの XO 阻害薬の投与は運動耐容能を改善しないことが明らかとなった。

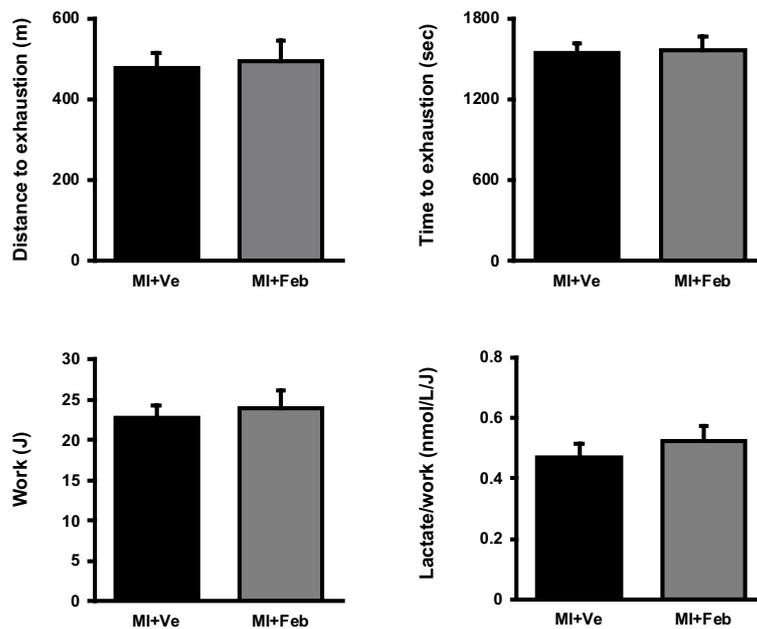


図 3-18. MI 後慢性期における XO 阻害薬の運動耐容能への影響

トレッドミルで評価した走行距離、走行時間、仕事量とトレッドミル運動直後の単位仕事当たりの血中乳酸値。各群 $n = 6-8$ 。データは平均値 \pm 標準誤差。

3.3.3 骨格筋ミトコンドリア呼吸能 (酸化的リン酸化能) の評価

術後 6 週の骨格筋ミトコンドリア呼吸能を評価するために、腓腹筋線維を細胞膜透過処置した後、高感度オキシグラフィーを用いて O₂ flux を測定した。FAO+CI+CII LEAK state および OXPHOS state での O₂ flux に両群で有意差はなかった。Respiratory control ratio は MI+Feb 群で MI+Ve 群で低下する傾向があった (図 3-19)。

これらの結果から、慢性期からの XO 阻害薬の投与は運動耐容能と同様に、骨格筋ミトコンドリア呼吸能を改善しないことが明らかとなった。

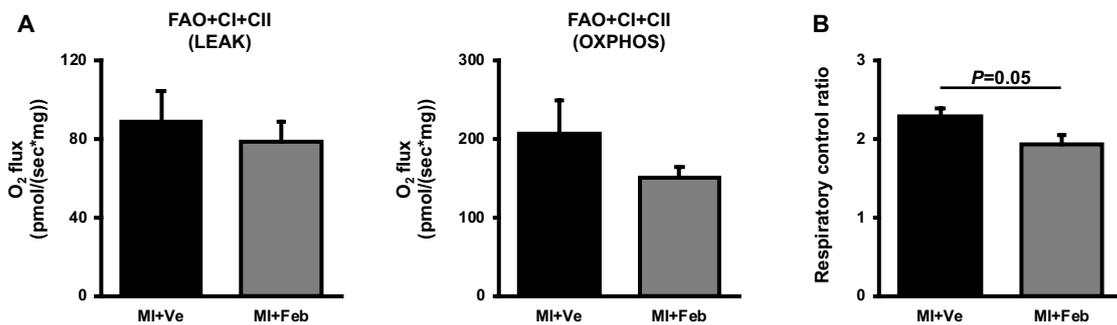


図 3-19. MI 後慢性期における XO 阻害薬のミトコンドリア呼吸能への影響

A: 細胞膜透過処置をした腓腹筋線維での FAO LEAK state (左) および OXPHOS state (右) の O₂ flux. 各群 $n = 6$. **B:** Respiratory control ratio. 各群 $n = 6$. データは 平均値±標準誤差.

3.4 実験4 骨格筋培養細胞での検討

3.4.1 低酸素と XO-ROS の関連の検討

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評価した。

Car9 mRNA 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た (図 3-20A)。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 (図 3-20B)。Xor mRNA 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 (図 3-20C, D)。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 FAO+CI+CII OXPHOS state の O₂ flux が有意に低下した (図 3-20E)。

これらの結果から、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。

次に、C2C12 細胞の低酸素曝露における XO 阻害薬のミトコンドリア呼吸能への効果を評価した。FAO+CI+CII の OXPHOS state での O₂ flux 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 μM 群で未治療群と比較し、有意に増加した (図 3-20F)。

これらの結果から、*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。

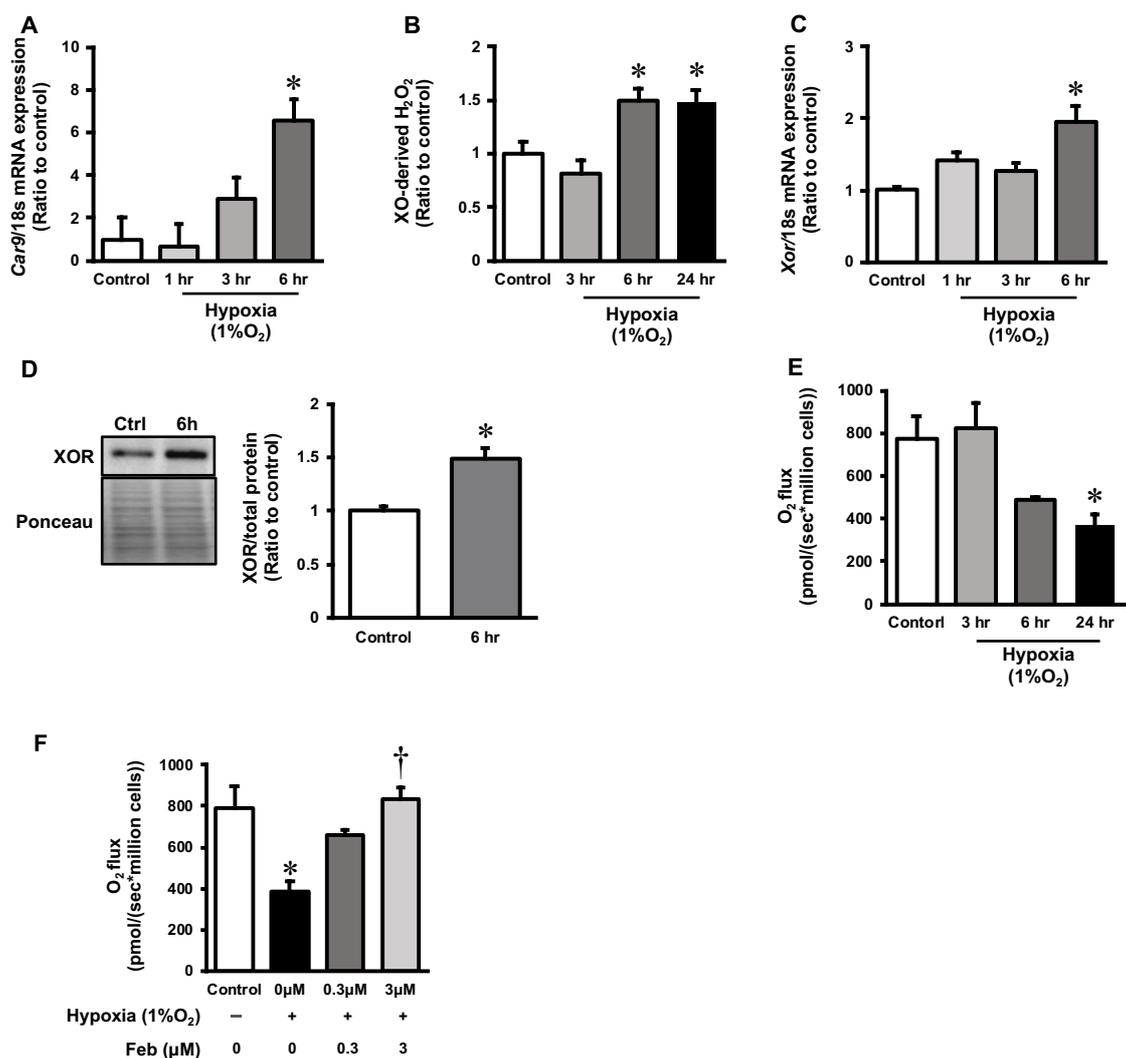


図 3-20. 低酸素に曝露されたマウス骨格筋 C2C12 筋管細胞の評価

A: 1%O₂に1時間から6時間低酸素暴露した骨格筋 C2C12 筋管細胞の *Car9* mRNA 発現量. 各群 $n=6$. **B:** 1%O₂に3時間から24時間低酸素暴露した骨格筋 C2C12 筋管細胞の XO 由来 H₂O₂ 産生量. 各群 $n=3-10$. **C:** 1%O₂に3時間から24時間低酸素暴露した骨格筋 C2C12 筋管細胞の *Xor* mRNA 発現量. 各群 $n=6$. **D:** 1%O₂に6時間低酸素暴露した骨格筋 C2C12 筋管細胞の XOR タンパク発現量. 各群 $n=5$. **E:** 1%O₂に3時間から24時間暴露した骨格筋 C2C12 筋管細胞の FAO+CI+CII OXPHOS state での O₂ flux. 各群 $n=4-6$. **F:** Febuxostat 0.3 μM, 3 μM を加え, 1%O₂に24時間低酸素暴露した C2C12 筋管細胞の FAO+CI+CII OXPHOS state での O₂ flux. 各群 $n=4-6$. データは平均値±標準誤差. * $P < 0.05$ vs. control; † $P < 0.05$ vs. Hypoxia+Feb 0 μM.

3.4.2 尿酸とミトコンドリア呼吸能の関連の検討

XO の代謝産物である尿酸を骨格筋 C2C12 筋管細胞の培養液に尿酸をそれぞれ 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, FAO+CI+CII OXPHOS state の O₂ flux に有意差はなかった (図 3-21).

この結果から, 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.

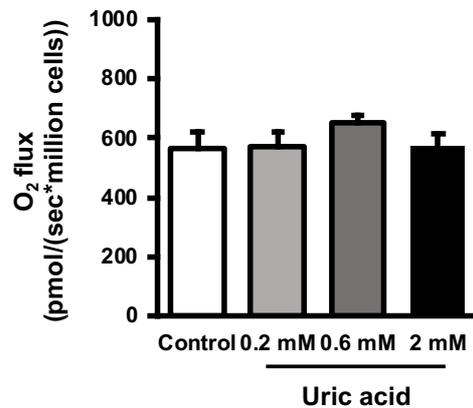


図 3-21. 尿酸添加後の骨格筋 C2C12 筋管細胞ミトコンドリア呼吸能評価
各群 $n = 4$. データは平均値 \pm 標準誤差.

4 考察

本研究において、MI 後心不全モデルマウスは慢性期にミトコンドリア障害、筋萎縮といった骨格筋障害と運動耐容能の低下を観察した。MI 後の急性期における骨格筋は一過性に低酸素に晒され、それに伴い XO-ROS が増加した。MI 後の急性期における XO 阻害薬の投与は左室機能やリモデリングを変化せず、MI 後慢性期の運動耐容能を改善した。また、XO 阻害薬の投与は XO-ROS による骨格筋ミトコンドリアダメージを軽減することでミトコンドリア呼吸能を正常化した。さらに、ミトコンドリアからのアポトーシスシグナルの低下や mTOR-p70S6K シグナルを活性化することで、MI における骨格筋萎縮を改善した。慢性期からの XO 阻害薬の投与は運動耐容能やミトコンドリア呼吸能を改善せず、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。

1) 運動耐容能とミトコンドリア異常について

心不全の運動耐容能低下には骨格筋異常が密接に関わっている (Matsumoto et al., 2018; Okita et al., 1998; Tsuda et al., 2018)。当研究室ではこれまで心不全における骨格筋ミトコンドリア異常には活性酸素種の増加が関わっていることを報告してきた (Fukushima et al., 2014; Ohta et al., 2011)。しかし、このミトコンドリア機能異常の発症機序は明らかとなっていない。本研究の結果から、XO-ROS 産生の増加がミトコンドリア異常の発症に関与していることが示唆された。因果関係の証明には骨格筋特異的 XOR ノックアウトマウスを用いた検討が考えられ、今後の検討課題である。

2) XO について

XO は XOR の一つの形態である。XOR のほとんどは XDH の形態をとり、タンパク融解やシステイン残基の酸化で不可逆的あるいは可逆的に XO へと変化する (Berry and Hare, 2004)。これまで、XO は虚血による低酸素で活性化することが報告されてきた (Terada et al., 1992; Terada et al., 1997)。本研究では MI 後心不全モデルマウスの骨格筋で低酸素のマーカーである *Car9* mRNA 発現が増加し、それに続いて XO-ROS が増加した。また、低酸素曝露により骨格筋培養細胞での *in vitro* の系においても同様の結果が再現できた。さらに、速筋線維に比べ遅筋線維で XO 発現が高いことが明らかになり、XO の抑制が遅筋線維やミトコンドリアに良い効果をもたらすと考えられた。過去の報告で、マクロファージでは XO/XOR はミトコンドリアにも局在しているという報告もあるが (Aboali et al., 2014)、本研究においては詳細な局在や ROS 産生以外の役割について検討することはできなかった。

3) 左室機能, リモデリングについて

これまで、心不全患者の血管内皮細胞で XOR 活性が増加していることや XDH/XO タンパク発現が拡張型心筋症の心筋で増加することが報告されている (Cappola et al., 2001). また、動物実験では MI 後心不全モデルマウスに術後 1 日から術後 4 週まで XO 阻害薬を投与することにより、左室機能やリモデリングを改善することが報告されている (Engberding et al., 2004). しかし、我々の研究での MI 後急性期のみの XO 阻害薬投与は左室機能やリモデリングを改善しなかった。本研究で血清や心筋の XO 活性は、急性期ではなく慢性期に上昇していた。一方で、本研究での慢性期のみの XO 阻害薬の投与も左室機能やリモデリングを改善しなかった。これまでの MI マウスを用いた研究報告から (Kinugawa et al., 2000), 術後 2 週の時点ですでに左室リモデリングが完成していたと考えられるため、慢性期の介入のみでは左室機能は改善しなかったと考えられる。以上の結果から、左室機能やリモデリングを改善するためには、急性期から慢性期にかけての持続的な介入が必要と考える。

4) ミトコンドリアダメージと ROS

術後 28 日の骨格筋の電子顕微鏡画像にて MI+Ve 群でクリスタ構造が破壊されたミトコンドリアが散見された。これまでの知見から、ROS が直接ミトコンドリアを障害すると考えられるが (Madesh and Hajnoczky, 2001; Tsutsui et al., 2011), ミトコンドリアのアダプタータンパクである p66SHC は ROS によって活性化された PKC によって活性化され、ミトコンドリアを障害すると考えられており (Migliaccio et al., 1999; Pinton et al., 2007), ROS による間接的なミトコンドリア障害も起こっている可能性がある。これらの事項は今回の研究では検討できなかった。

また、これまで我々は MI 後慢性期の骨格筋で ROS が上昇することを報告しているが (Fukushima et al., 2014; Ohta et al., 2011), XO-ROS 産生の増加は急性期のみであった。先行研究で MI 後慢性期の骨格筋で ROS の産生源の一つである NADPH oxidase が活性化すると報告されている (Fukushima et al., 2014). さらに、XO は ROS を介して NADPH oxidase を活性化すると報告されており (Nanduri et al., 2015), 急性期の XO-ROS がトリガーとなり慢性期に NADPH oxidase が活性する可能性が考えられる。さらに、障害されたミトコンドリアは ROS を産生することが知られており (Huang et al., 2015), 慢性期にはミトコンドリア由来の ROS も増加する可能性がある。これらの事項は今後の検討事項である。

5) ミトコンドリア生合成及び処理機構

先行研究では、MI 後心不全の骨格筋でミトコンドリア量の低下やミトコンドリア生合成に関わるシグナルである AMPK α -PGC1 α シグナルの低下が報告されている (Takada et al., 2016). 本研究では、電子顕微鏡像で評価したミトコンドリア面積やミトコンドリアマーカの VDAC のタンパク発現は Sham+Ve 群と MI+Ve 群で差は見られなかった. また、リン酸化 AMPK α のタンパク発現や PGC1 α の下流である *Nrf1* 遺伝子の発現量にも両群で差はみられず、本研究ではミトコンドリア量の低下や生合成の低下は見られなかった. この機序については不明である.

MI+Ve 群で障害されたミトコンドリアが散見されたが、この現象には ROS によるミトコンドリア障害だけでなく、処理機構であるマイトファジーの障害も関わっていると考えられ検討を行った. 術後 3 日で MI+Feb 群でのみミトコンドリア分画での LC3B II 発現が上昇していた. このことからオートファゴソームの形成が MI+Feb 群で亢進している可能性が示唆される. しかし、実際のオートファゴソームの形成やオートファゴライソソームの形成に関しては検討できなかった. また、マイトファジーを促進するシグナルとして mTOR-p70S6K シグナルがあるが、mTOR の活性化はマイトファジーを抑制する方向に働くため合致しない. しかし、活性化 p70S6K はインフルエンザ感染症の際に LC3BII 形成を促進するとの報告もあり (Datan et al., 2014), 病的な環境においては p70S6K がオートファジーに促進的に働く可能性があるが、本研究では詳細な検討ができなかった.

6) 筋萎縮

我々の MI 後心不全モデルマウスでは遅筋であるヒラメ筋のみ筋萎縮した. 過去の研究で、mTOR-p70S6K シグナルは ROS により抑制されると報告されている (Alexander et al., 2010). 我々の研究では MI+Ve 群でこのシグナルが抑制されており、XO 阻害薬の投与で改善した. この結果から、XO-ROS が mTOR-p70S6K シグナルを抑制し筋萎縮を引き起こす可能性が示唆された. また、下肢懸垂による筋萎縮モデルマウスの実験では、XO 阻害薬の投与によりタンパク分解に関わるユビキチン-プロテアソーム系のタンパク発現が減少し、遅筋線維の萎縮が改善した報告されている (Derbre et al., 2012). しかし、本研究では MI マウスでユビキチンリガーゼである MuRF1 や Atrogin1 の発現の亢進はなく、タンパク合成の低下により筋萎縮し、XO-ROS の抑制はタンパク合成シグナルを活性化することで筋萎縮を改善することを示した.

7) アポトーシス

MI+Ve 群で障害されたミトコンドリアが散見され、それが MI-Feb 群で減少したことから、「MI でミトコンドリア由来のアポトーシスシグナルが亢進し、XO の阻害によりそのシグナルは抑制される」と考え検討を行った。過去の研究では、XO-ROS の増加により、アポトーシスを促進するタンパクである Bax のミトコンドリア分画での発現が亢進し、アポトーシスのトリガーとなると報告されている (Huang et al., 2015; Madesh and Hajnoczky, 2001)。本研究でも、ミトコンドリア分画での Bax 発現やアポトーシスの実行に関わる Cleaved Caspase 3 の発現が MI+Ve 群で増加し、MI+Feb 群で改善し、先行研究と同様の結果が得られた。Bcl-2 の上昇に関しては、先行研究で p70S6K によりリン酸化された BAD がミトコンドリアでの Bcl-2 発現を増加させるとの報告があり (Harada et al., 2001)、このようなシグナルが関与する可能性がある。

また、心不全モデルラットの骨格筋萎縮にアポトーシスが関与することが報告されているが (Libera et al., 1999)、本研究ではその因果関係を証明することはできなかった。

8) 脂肪酸代謝

我々はこれまで MI 後心不全マウスの骨格筋で脂肪酸代謝が低下していることを報告してきた (Tsuda et al., 2018)。本研究でも、脂肪酸の基質を加えたミトコンドリア機能は MI で低下が見られた。XO を阻害することで脂肪酸代謝の亢進が見られたが、この機序として、脂肪酸の β 酸化がミトコンドリアで行われるため、ミトコンドリアダメージの軽減によるものの可能性が考えられる。また、高脂肪食マウスの研究では、febuxostat を投与することにより脂肪肝での脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現が増加したと報告しており (Nakatsu et al., 2015)、脂肪酸代謝に関わるタンパク質発現や脂肪酸代謝のレギュレーターである PPAR α の核内移行の評価などは今後の検討課題である。

5 結論

1) 得られた新知見

- MI 後急性期に骨格筋が一過性に低酸素状態にある。
- MI 後急性期に骨格筋で XO が活性化し ROS が増加している。
- MI 後急性期の XO-ROS が慢性期の骨格筋ミトコンドリア障害，骨格筋萎縮，運動耐容能低下に関与している。
- MI 後慢性期の XO 阻害薬の投与は骨格筋ミトコンドリア障害，運動耐容能を改善しない。

2) 新知見の意義

- MI 後の急性期における XO 阻害薬を投与は，慢性期における運動耐容能や骨格筋ミトコンドリア機能障害および筋萎縮が改善した (図 6).
- ✓ 運動耐容能の指標である，最高酸素摂取量は心不全の強力な予後規定因子であるが，心不全の運動耐容能低下を改善する治療法は運動療法のみであった。
- ✓ しかし，心不全患者の多くはその重症度から十分な運動療法を受けることができず，運動耐容能の低下に介入可能な薬物療法の確立が課題となっている。
- ✓ 当研究室ではこれまで大規模観察研究で心不全患者の高尿酸血症の合併は独立した予後因子であることを報告してきた。高尿酸血症の要因の一つとして XO の活性化が考えられており，心不全患者への XO 阻害薬の投与は予後を改善させると考えられてきた。しかしながら，これまでの臨床研究では心不全患者への XO 阻害薬の投与は運動耐容能や予後を改善しないことが報告されている。これまでの臨床研究は心不全の”慢性期”への介入であり，本研究の結果からは心筋梗塞後や心不全の”急性期”の XO 阻害薬の投与が運動耐容能の改善する可能性が示唆された。

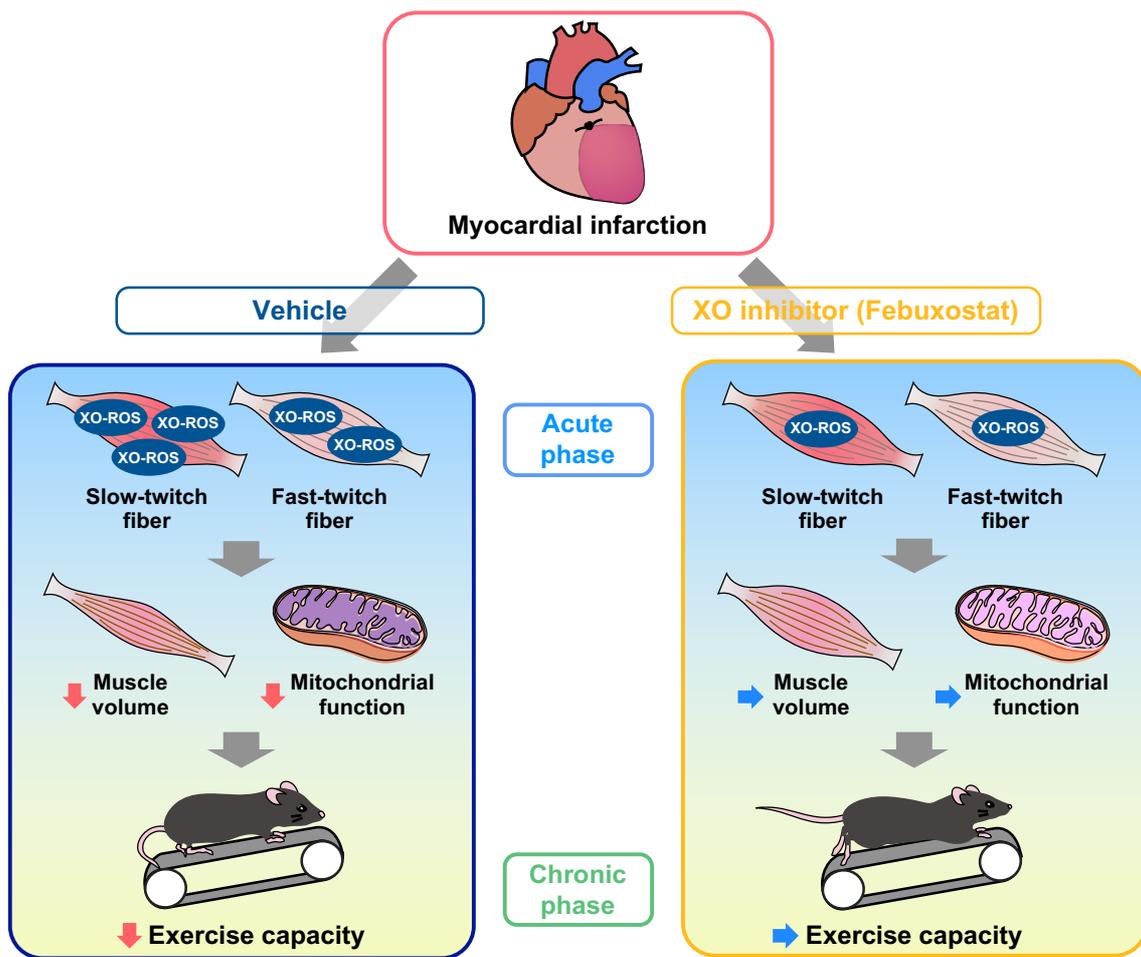


図 6. 本研究のまとめ

3) 今後の研究展開

- ✓ 本研究では解明できなかった詳細な分子機序を解明する.
- ✓ 今回の基礎研究の結果を基に, 急性心筋梗塞患者を対象とし, **XO** 阻害薬を投与する群とプラセボ群を無作為にわけ, 慢性期の運動耐容能を評価する臨床研究を立案中である.

4) 今後の課題

- ✓ **XO** と骨格筋障害の因果関係を証明するために, **XOR** の骨格筋特異的ノックアウトマウスでの検討が必要である.
- ✓ **XO** がなぜ遅筋線維に多く分布しているかは不明である.
- ✓ 本研究で, **MI+Ve** 群の骨格筋における慢性期の **ROS** の上昇が確認されていない.
- ✓ **XO** が慢性期に「どの **ROS** の産生源を活性化しているか」を検討する.
- ✓ 抗酸化物質である **SOD** やグルタチオン, カタラーゼを評価する.
- ✓ **p66SHC** など, **ROS** が間接的にミトコンドリアを障害する経路を検討する.
- ✓ *In vitro* の実験系で筋萎縮やアポトーシスを評価する.
- ✓ マイトファジーに関して, 本研究で確認したのはオートファゴソームのマーカのみであり, 詳細なマイトファジーの動態や機序を検討する.
- ✓ **MI+Ve** 群でミトコンドリアを介したアポトーシスシグナルは亢進しているが, 実際にアポトーシスが起きているかどうか **TUNEL** 染色で確認する.
- ✓ アポトーシス機序についても **Bcl-2** の発現亢進が **p70S6K** や **BAD** によるものか検討する.
- ✓ アポトーシスと骨格筋萎縮の因果関係を検討する.
- ✓ 脂肪酸代謝に関わるタンパク質やレギュレーターである **PPAR α** の核移行など詳細なメカニズムを検討する.

謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するに当たり、本研究の機会を与えて頂くとともに、多くの御指導と御支援を賜りました北海道大学大学院医学研究院循環病態内科学教室 絹川真太郎講師，安斉俊久教授に深謝申し上げます。また高田真吾先生には博士課程での研究全般・学位論文作成に、御多忙の中、多くの御指導をして頂き大変感謝しております。

本研究に当たり、日頃より多くの御指導・御助力を頂きました北海道大学大学院医学研究院 循環病態内科学教室の松本純一先生，前川 聡先生，角谷尚哉先生，降旗高明先生，津田正哉先生，中島孝之先生，片山貴史先生，白川亮介先生，尾畑嘉一先生，山梨克真先生，仲野一平先生，齋藤晶理先生，福島 新助教，横田 卓助教に感謝申し上げます。

本研究において、共同研究者として電子顕微鏡撮像に御助力頂きました北海道大学大学院医学研究院組織細胞学教室 小林純子講師に深く感謝申し上げます。また、低酸素ワークステーションを快く御貸しいただきました北海道大学アイソトープ総合センター 久下裕司教授，安井博宣准教授，東川 桂助教に深く感謝申し上げます。

また本論文作成に当たり、御多忙の中御助言頂きました審査委員の先生に深く感謝いたします。

本研究の実験遂行にあたり、多大な御助力を頂きました循環病態内科学講座実験助手の山根美和子様，池田則子様，木村友紀様，また秘書室の皆様に深く感謝申し上げます。

本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

最後に、私をここまで育てていただいた両親と、忙しい研究生活を陰ながら支えてくれた妻と 2 人の息子に心より感謝いたします。

2019 年 3 月

南部 秀雄

利益相反

本研究でを使用した **febuxostat** は帝人ファーマ株式会社から提供を受けたものである。

引用文献

- Abooli, M., Lall, G.S., Coughlan, K., Lall, H.S., Gibbs, B.F., and Sumbayev, V.V. (2014). Crucial involvement of xanthine oxidase in the intracellular signalling networks associated with human myeloid cell function. *Sci. Rep.* 4, 6307.
- Alberts, B. (2017). *Molecular Biology of THE CELL* Sixth edition (Garland Science).
- Alexander, A., Cai, S.L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K.H., Inoki, K., Guan, K.L., Shen, J., Person, M.D., et al. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4153-4158.
- Anker, S.D., and Coats, A.J. (1999). Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. *Chest* 115, 836-847.
- Anker, S.D., Ponikowski, P., Varney, S., Chua, T.P., Clark, A.L., Webb-Peploe, K.M., Harrington, D., Kox, W.J., Poole-Wilson, P.A., and Coats, A.J. (1997). Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 349, 1050-1053.
- Beckman, J.S., Parks, D.A., Pearson, J.D., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. (1989). A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 6, 607-615.
- Belardinelli, R., Georgiou, D., Cianci, G., and Purcaro, A. (1999). Randomized, controlled trial of long-term moderate exercise training in chronic heart failure: effects on functional capacity, quality of life, and clinical outcome. *Circulation* 99, 1173-1182.
- Berry, C.E., and Hare, J.M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 555, 589-606.
- Bravard, A., Bonnard, C., Durand, A., Chauvin, M.A., Favier, R., Vidal, H., and Rieusset, J. (2011). Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300, E581-591.
- Busk, M., Toustrup, K., Sorensen, B.S., Alsner, J., Horsman, M.R., Jakobsen, S., and Overgaard, J. (2011). In vivo identification and specificity assessment of mRNA markers of hypoxia in human and mouse tumors. *BMC Cancer* 11, 63.
- Cappola, T.P., Kass, D.A., Nelson, G.S., Berger, R.D., Rosas, G.O., Kobeissi, Z.A., Marban, E., and Hare, J.M. (2001). Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 104, 2407-2411.
- Christiansen, L.B., Dela, F., Koch, J., Hansen, C.N., Leifsson, P.S., and Yokota, T.

(2015). Impaired cardiac mitochondrial oxidative phosphorylation and enhanced mitochondrial oxidative stress in feline hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308, H1237-1247.

Datan, E., Shirazian, A., Benjamin, S., Matasov, D., Tinari, A., Malorni, W., Lockshin, R.A., Garcia-Sastre, A., and Zakeri, Z. (2014). mTOR/p70S6K signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza A infection. *Virology* 452-453, 175-190.

Derbre, F., Ferrando, B., Gomez-Cabrera, M.C., Sanchis-Gomar, F., Martinez-Bello, V.E., Olaso-Gonzalez, G., Diaz, A., Gratas-Delamarche, A., Cerda, M., and Vina, J. (2012). Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PLoS One* 7, e46668.

Drexler, H., Riede, U., Munzel, T., Konig, H., Funke, E., and Just, H. (1992). Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 85, 1751-1759.

Engberding, N., Spiekermann, S., Schaefer, A., Heineke, A., Wiencke, A., Müller, M., Fuchs, M., Hilfiker-Kleiner, D., Hornig, B., Drexler, H., et al. (2004). Allopurinol Attenuates Left Ventricular Remodeling and Dysfunction After Experimental Myocardial Infarction. *Circulation* 110, 2175-2179.

Fukushima, A., Kinugawa, S., Takada, S., Matsushima, S., Sobirin, M.A., Ono, T., Takahashi, M., Suga, T., Homma, T., Masaki, Y., et al. (2014). (Pro)renin receptor in skeletal muscle is involved in the development of insulin resistance associated with postinfarct heart failure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307, E503-514.

Gavin, A.D., and Struthers, A.D. (2005). Allopurinol reduces B-type natriuretic peptide concentrations and haemoglobin but does not alter exercise capacity in chronic heart failure. *Heart* 91, 749-753.

Givertz, M.M., Anstrom, K.J., Redfield, M.M., Deswal, A., Haddad, H., Butler, J., Tang, W.H., Dunlap, M.E., LeWinter, M.M., Mann, D.L., et al. (2015). Effects of Xanthine Oxidase Inhibition in Hyperuricemic Heart Failure Patients: The Xanthine Oxidase Inhibition for Hyperuricemic Heart Failure Patients (EXACT-HF) Study. *Circulation* 131, 1763-1771.

Hamaguchi, S., Furumoto, T., Tsuchihashi-Makaya, M., Goto, K., Goto, D., Yokota, T., Kinugawa, S., Yokoshiki, H., Takeshita, A., Tsutsui, H., et al. (2011). Hyperuricemia predicts adverse outcomes in patients with heart failure. *Int. J. Cardiol.* 151, 143-147.

Harada, H., Andersen, J.S., Mann, M., Terada, N., and Korsmeyer, S.J. (2001). p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic

molecule BAD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9666-9670.

Huang, C.C., Lee, C.C., Lin, H.H., Chen, M.C., Lin, C.C., and Chang, J.Y. (2015). Autophagy-Regulated ROS from Xanthine Oxidase Acts as an Early Effector for Triggering Late Mitochondria-Dependent Apoptosis in Cathepsin S-Targeted Tumor Cells. *PLoS One* 10, e0128045.

Ives, A., Nomura, J., Martinon, F., Roger, T., LeRoy, D., Miner, J.N., Simon, G., Busso, N., and So, A. (2015). Xanthine oxidoreductase regulates macrophage IL1beta secretion upon NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* 6, 6555.

Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S., and Kurosawa, T. (2011). Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.* 60, 481-487.

Kinugawa, S., Takada, S., Matsushima, S., Okita, K., and Tsutsui, H. (2015). Skeletal Muscle Abnormalities in Heart Failure. *Int. Heart. J.*

Kinugawa, S., Tsutsui, H., Hayashidani, S., Ide, T., Suematsu, N., Satoh, S., Utsumi, H., and Takeshita, A. (2000). Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress. *Circ. Res.* 87, 392-398.

Konishi, M., Pelgrim, L., Tschirner, A., Baumgarten, A., von Haehling, S., Palus, S., Doehner, W., Anker, S.D., and Springer, J. (2015). Febuxostat improves outcome in a rat model of cancer cachexia. *J. Cachexia. Sarcopenia. Muscle.* 6, 174-180.

Laker, R.C., Drake, J.C., Wilson, R.J., Lira, V.A., Lewellen, B.M., Ryall, K.A., Fisher, C.C., Zhang, M., Saucerman, J.J., Goodyear, L.J., et al. (2017). Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nat. Commun.* 8, 548.

Landmesser, U., Spiekermann, S., Dikalov, S., Tatge, H., Wilke, R., Kohler, C., Harrison, D.G., Hornig, B., and Drexler, H. (2002). Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106, 3073-3078.

Libera, L.D., Zennaro, R., Sandri, M., Ambrosio, G.B., and Vescovo, G. (1999). Apoptosis and atrophy in rat slow skeletal muscles in chronic heart failure. *Am. J. Physiol.* 277, C982-986.

Madesh, M., and Hajnoczky, G. (2001). VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J. Cell. Biol.* 155, 1003-1015.

Mancini, D.M., Eisen, H., Kussmaul, W., Mull, R., Edmunds, L.H., Jr., and Wilson, J.R. (1991). Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac

transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* 83, 778-786.

Matsumoto, J., Takada, S., Kinugawa, S., Furihata, T., Nambu, H., Kakutani, N., Tsuda, M., Fukushima, A., Yokota, T., Tanaka, S., et al. (2018). Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Limited Exercise Capacity in Mice With Heart Failure. *Circulation* 138, 2064-2066.

Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P.P., Lanfranccone, L., and Pelicci, P.G. (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*. 402, 309-313.

Nakatsu, Y., Seno, Y., Kushiya, A., Sakoda, H., Fujishiro, M., Katasako, A., Mori, K., Matsunaga, Y., Fukushima, T., Kanaoka, R., et al. (2015). The xanthine oxidase inhibitor febuxostat suppresses development of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 309, G42-51.

Nanduri, J., Vaddi, D.R., Khan, S.A., Wang, N., Makarenko, V., Semenza, G.L., and Prabhakar, N.R. (2015). HIF-1alpha activation by intermittent hypoxia requires NADPH oxidase stimulation by xanthine oxidase. *PLoS One* 10, e0119762.

Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B.T., Pai, E.F., and Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Febs. j.* 275, 3278-3289.

Ohta, Y., Kinugawa, S., Matsushima, S., Ono, T., Sobirin, M.A., Inoue, N., Yokota, T., Hirabayashi, K., and Tsutsui, H. (2011). Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H1637-1644.

Okita, K., Yonezawa, K., Nishijima, H., Hanada, A., Ohtsubo, M., Kohya, T., Murakami, T., and Kitabatake, A. (1998). Skeletal muscle metabolism limits exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 98, 1886-1891.

Otaki, Y., Watanabe, T., Kinoshita, D., Yokoyama, M., Takahashi, T., Toshima, T., Sugai, T., Murase, T., Nakamura, T., Nishiyama, S., et al. (2017). Association of plasma xanthine oxidoreductase activity with severity and clinical outcome in patients with chronic heart failure. *Int. J. Cardiol.* 228, 151-157.

Pachon, R.E., Scharf, B.A., Vatner, D.E., and Vatner, S.F. (2015). Best anesthetics for assessing left ventricular systolic function by echocardiography in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308, H1525-1529.

Piepoli, M.F., Davos, C., Francis, D.P., and Coats, A.J. (2004). Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* 328, 189.

Pinton, P., Rimessi, A., Marchi, S., Orsini, F., Migliaccio, E., Giorgio, M., Contursi, C., Minucci, S., Mantovani, F., Wieckowski, M.R., et al. (2007). Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science* 315, 659-663.

Sano, M., Minamino, T., Toko, H., Miyauchi, H., Orimo, M., Qin, Y., Akazawa, H., Tateno, K., Kayama, Y., Harada, M., et al. (2007). p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 446, 444-448.

Takada, S., Kinugawa, S., Matsushima, S., Takemoto, D., Furihata, T., Mizushima, W., Fukushima, A., Yokota, T., Ono, Y., Shibata, H., et al. (2015). Sesamin prevents decline in exercise capacity and impairment of skeletal muscle mitochondrial function in mice with high-fat diet-induced diabetes. *Exp. Physiol.*

Takada, S., Masaki, Y., Kinugawa, S., Matsumoto, J., Furihata, T., Mizushima, W., Kadoguchi, T., Fukushima, A., Homma, T., Takahashi, M., et al. (2016). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor improved exercise capacity and mitochondrial biogenesis in mice with heart failure via activation of glucagon-like peptide-1 receptor signalling. *Cardiovascular Research* 111, 338-347.

Terada, L.S., Guidot, D.M., Leff, J.A., Willingham, I.R., Hanley, M.E., Piermattei, D., and Repine, J.E. (1992). Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3362-3366.

Terada, L.S., Piermattei, D., Shibao, G.N., McManaman, J.L., and Wright, R.M. (1997). Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre- and posttranslational levels. *Arch. Biochem. Biophys.* 348, 163-168.

Tsuchihashi-Makaya, M., Hamaguchi, S., Kinugawa, S., Yokota, T., Goto, D., Yokoshiki, H., Kato, N., Takeshita, A., and Tsutsui, H. (2009). Characteristics and outcomes of hospitalized patients with heart failure and reduced vs preserved ejection fraction. Report from the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). *Circ. J.* 73, 1893-1900.

Tsuda, M., Fukushima, A., Matsumoto, J., Takada, S., Kakutani, N., Nambu, H., Yamanashi, K., Furihata, T., Yokota, T., Okita, K., et al. (2018). Protein acetylation in skeletal muscle mitochondria is involved in impaired fatty acid oxidation and exercise intolerance in heart failure. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9, 844-859.

Tsutsui, H., Kinugawa, S., and Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H2181-2190.

Vescovo, G., Serafini, F., Facchin, L., Tenderini, P., Carraro, U., Dalla Libera, L., Catani, C., and Ambrosio, G.B. (1996). Specific changes in skeletal muscle myosin

heavy chain composition in cardiac failure: differences compared with disuse atrophy as assessed on microbiopsies by high resolution electrophoresis. *Heart* 76, 337-343.

Wang, S., Li, Y., Song, X., Wang, X., Zhao, C., Chen, A., and Yang, P. (2015). Febuxostat pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via mitochondrial apoptosis. *J. Transl. Med.* 13, 209.

Wilson, J.R., Martin, J.L., and Ferraro, N. (1984). Impaired skeletal muscle nutritive flow during exercise in patients with congestive heart failure: role of cardiac pump dysfunction as determined by the effect of dobutamine. *Am. J. Cardiol.* 53, 1308-1315.

Xu, X., Hu, X., Lu, Z., Zhang, P., Zhao, L., Wessale, J.L., Bache, R.J., and Chen, Y. (2008). Xanthine oxidase inhibition with febuxostat attenuates systolic overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *J. Card. Fail.* 14, 746-753.

Yisireyili, M., Hayashi, M., Wu, H., Uchida, Y., Yamamoto, K., Kikuchi, R., Shoaib Hamrah, M., Nakayama, T., Wu Cheng, X., Matsushita, T., et al. (2017). Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates stress-induced hyperuricemia, glucose dysmetabolism, and prothrombotic state in mice. *Sci. Rep.* 7, 1266.

Yokota, T., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Matsushima, S., Inoue, N., Ohta, Y., Hamaguchi, S., Sobirin, M.A., Ono, T., Suga, T., et al. (2009). Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H1069-1077.

厚生労働省 (2014). 平成 26 年 (2014) 人口動態統計 (確定数) の概況.

日本循環器学会 (2017). 急性・慢性心不全診療ガイドライン (2017 年改訂版) .