

平成 31 年 5 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13019

研究課題名（和文）末梢動脈疾患の改善に対する運動誘発性マイオカインの役割

研究課題名（英文）Role of exercise-induced myokine in peripheral arterial disease

研究代表者

奥津 光晴（Okutsu, Mitsuharu）

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・講師

研究者番号：80409755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：運動は毛細血管密度を増加する。早期の末梢血動脈疾患は運動の実施により疾患が改善される。運動による毛細血管密度の増加は末梢血動脈疾患を改善するメカニズムの一つであることから、運動により骨格筋から分泌される血管新生因子を同定することで、効果的な治療や予防への応用が期待できる。本研究では運動により骨格筋から分泌が増加する血管新生作用を持つケモカインを同定した。しかしながら、筋特異的にこのケモカインを欠損したマウスは運動をすると通常のマウスと同様に毛細血管密度が増加した。このことは、このケモカインは運動による末梢血動脈疾患の改善における毛細血管密度の増加には直接的には関与しないことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動による血管新生を調節するマイオカインを同定できれば、同定したマイオカインの分泌を効果的に促進する運動プログラムの開発やマイオカインを標的とした創薬への貢献が期待できる。本研究が予防医学や健康科学の分野に応用されれば世界規模での波及効果が期待できる。したがって本研究は、学術的意義や社会的意義が高い研究である。

研究成果の概要（英文）：Regular exercise increases capillary density in skeletal muscle. Regular exercise contributes to ameliorate in the early stage of peripheral arterial disease (PAD). Increased capillary density is one of the mechanisms to prevent PAD by regular exercise. In the current study, we hypothesized that regular exercise-induced muscle-derived chemokine contribute to promote angiogenesis in skeletal muscle. In this study, we have demonstrated that enhanced contractile activity induces the chemokine both in vivo and in vitro demonstrating that the chemokine is secreted from muscle. However, our findings in muscle-specific the chemokine knockout mice indicate that muscle-derived the chemokine is not necessary for exercise training-induced angiogenesis in skeletal muscle.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：運動 骨格筋 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、高血圧、脂質異常症や肥満などの生活習慣病や加齢は、PAD などの動脈硬化性疾患を発症する。PAD は、主に下肢の末梢血管を閉塞し、しびれ、痛み、潰瘍や組織の壊死を引き起こす疾患で、推定患者総数は2億人を超えると報告されている (Fowkes FG, et al. Lancet, 2013)。予後は極めて悪く、50歳以上の重症患者では25%が死亡に至ることから、効果的な治療や予防の方法の確立は重要な課題である。PAD の治療ガイドラインでは、重症に至っていない患者に対する初期治療の一環として運動療法が推奨されており、運動療法で改善が見られない場合は薬物療法や外科的血行再建を含めた手術が推奨されている。運動療法が有効な場合は薬物療法や外科的治療を最小限に抑えられるため、PAD を改善する効果的な運動プログラムの開発は治療戦略において重要である。運動による PAD の改善は、骨格筋収縮が血管新生作用を持つマイオカイン (myokine) の分泌を促進し、血管新生を誘導することで血流の迂回路を構築し血流を改善することが一因である。しかしながら、運動によるマイオカインの変動に関する報告の大半は現象論に終始しており、血管新生作用を持つマイオカインの分泌を詳細に分析し、マイオカインの生理学的な意義を分子レベルから解明し PAD の改善や予防への応用を目指した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、運動による血管新生作用を持つマイオカインの分泌を評価し、マイオカインの同定とその生理学的意義を遺伝子改変動物を作成して立証することで、運動による PAD の改善や予防への貢献を目指す。

3. 研究の方法

初年度は、運動トレーニングや筋線維の種類による血管新生因子の分泌を評価し、血管新生を促進するマイオカインの同定を行なった。実験には雄性 C57BL/6 マウスを使用した。マウスの飼育は、温度、湿度や明暗サイクルなどの飼育環境が整備されている名古屋市立大学実験動物研究教育センターを使用した。運動トレーニングは、4週間のランニングホイールによる自発的な走行運動を使用した。運動トレーニング期間終了後、マウスを麻酔下にて頸椎脱臼し、遅筋優位なヒラメ筋、速筋優位な長趾伸筋および速筋と遅筋が混在した足底筋と腓腹筋を採取し実験に使用した。骨格筋採取は、運動トレーニング期間終了の24時間後とすることでトレーニング期間最終日の一過性の運動効果を取り除き、トレーニング効果のみを評価するよう工夫した。ヒラメ筋、長趾伸筋と足底筋は mRNA 解析とタンパク解析の溶液にてホモジネイトした。タンパク解析の検体は、血管新生因子の網羅的解析に使用した。mRNA 解析の検体はリアルタイム PCR による mRNA の発現の評価に使用した。また、足底筋の一部は解剖直後に OCT コンパウンドにて凍結検体を作成し、筋線維タイプ、血管内皮細胞と同定した血管新生因子を蛍光免疫染色にて多重染色を行い、毛細血管密度の変化や候補となる血管新生因子を分泌する筋線維タイプを評価した。腓腹筋は解剖直後に液体窒素にて急速冷凍後、-80℃にて保存し血管新生因子の産生を制御する細胞内情報伝達経路の解析などに使用した。さらに、日本福祉大学岩田全広准教授との連携により、筋管細胞に分化した C2C12 細胞を運動による筋収縮と同等の環境を再現した培養細胞伸展装置にて伸展刺激し、同定したマイオカインの mRNA やタンパクの発現を評価することで、生体内では検出できない詳細な変動も評価した。

二年目以降は、候補となる血管新生因子を筋特異的に欠損したマウスを作成し、運動トレーニングによる血管新生に対する生理学的意義の立証を目的に実験を実施した。マウスの作成は Cre/loxP 発現制御系を使用した。筋特異的に欠損させるため、fast myosin light chain - Cre (mlc1f-Cre) を組み込んだマウスと同定した血管新生因子を組み込んだ loxP マウスを交配し筋特異的に欠損するよう作成した。作成した全てのマウスは PCR 法で遺伝子改変型と野生型を判別し実験に使用した。また解剖後、同定した血管新生因子のタンパク発現を測定し遺伝子改変の有無を正確に評価した。作成した欠損マウスは初年度の実験方法と同様の自発走行運動トレーニングを4週間実施し、運動トレーニングに対する血管新生と血管新生による生理学的な機能変化を評価した。血管新生の評価は初年度の実験と同様、蛍光免疫染色を使用した。生理学的評価はトレッドミルを用いた運動負荷テストにて評価した。

4. 研究成果

運動群と安静群、運動により増加する遅筋線維が多いヒラメ筋と速筋線維が多い長趾伸筋を比較し、運動群とヒラメ筋の両者で高い血管新生因子からケモカインである SDF-1 /CXCL12 に着目した (図1)。骨格筋の CXCL12 の発現を蛍光免疫染色で比較したところ、MHC I 線維で高く MHC I b 線維が低かった。MHC I a 線維では MHC I 線維と同等に発現が高い線維と MHC I b 線維と同等に発現が低い線維が観察された (図2)。培養した C2C12 細胞に伸展刺激を加えたところ、筋管細胞に分化した細胞は CXCL12 の発現と分泌が増加したが、分化していない筋芽細胞では CXCL12 の発現や分泌に変化は観察されなかった (図3)。筋特異的に CXCL12 を欠損したマウス (CXCL12mKO) を作成し野生型マウスと比較した。その結果、安静時は CXCL12mKO マウスと野生型マウスに毛細血管密度に違いはなかった。また CXCL12mKO マウスと野生型マウスに運動トレーニングを実施したところ、運動により毛細血管は増加したが、その増加は CXCL12mKO マウスと野生型マウスの間に違いはなかった (図4)。

以上の結果をまとめると運動は骨格筋から血管新生因子である CXCL12 の分泌を増加するが、運動による血管新生には直接的には関与しない可能性が示唆された。

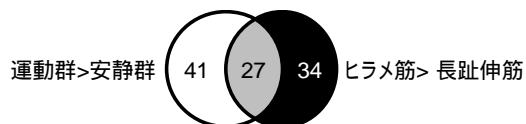


図1. 骨格筋由来の血管新生因子の探索

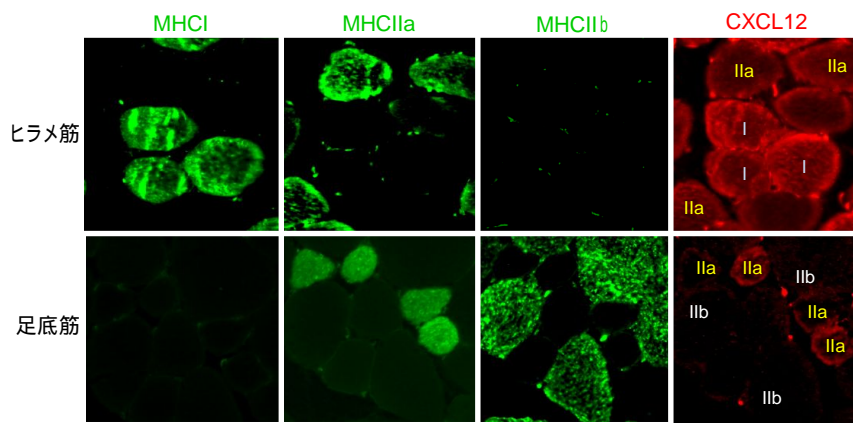


図2. 骨格筋のCXCL12の蛍光免疫染色像

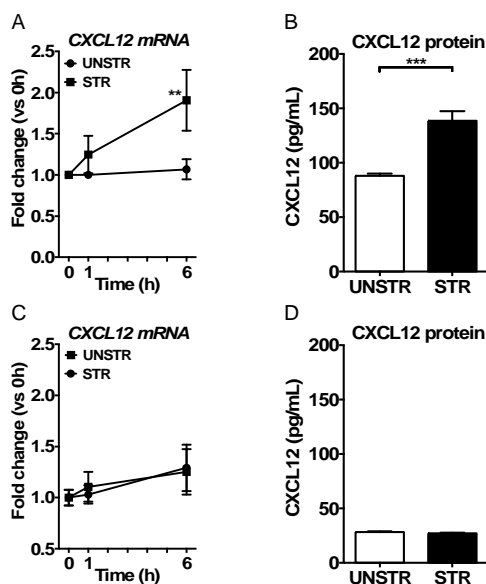


図3. C2C12細胞に対する伸展刺激によるCXCL12 mRNAの発現とタンパクの分泌。
 A) 筋管細胞のCXCL12mRNA, B) 筋管細胞培養液中のCXCL12タンパク, C) 筋芽細胞のCXCL12mRNA, D) 筋芽細胞培養液中のCXCL12タンパク, UNSTR:対照群, STR:伸展刺激群, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

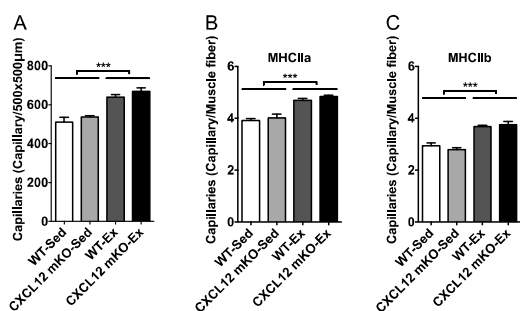


図4. 筋特異的CXCL12欠損マウスの運動による毛細血管密度の変化。
 A) 単位面積あたりの毛細血管数, B) MHCIIa線維に隣接する毛細血管数, C) MHCIIb線維に隣接する毛細血管数, WT:野生型マウス, CXCL12mKO:筋特異的CXCL12欠損マウス, Sed:安静群, EX:運動群, *** $p < 0.001$

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

- ・ 奥津光晴, 山田麻未, 骨格筋の恒常性維持に関する最新知見, 2018年 67巻 3号 p. 245-249.
 DOI <https://doi.org/10.7600/jspfsm.67.245>
- ・ Yamada M, Hokazono C, Okutsu M. Maternal exercise training attenuates endotoxin-induced sepsis in mice offspring. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jun 14;15:19-24.
 DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.06.001.

[学会発表](計 4件)

- ・ 山田麻未, 外園千紘, 栗栖豊昌, 岩田全広, 奥津光晴. 骨格筋細胞の収縮刺激による SDF-1 /CXCL12 の発現変化. 第 71 回日本体力医学会学術集会. 盛岡, 2016 年 9 月.
- ・ Yamada M, Hokazono C, Tokizawa K, Marui S, Iwata M, Suzuki K, Miura S, Nagashima K, Okutsu M. Muscle contractile activity regulates SDF-1 /CXCL12 expression in skeletal muscle. Experimental Biology 2017. Chicago, April 2017.
- ・ Okutsu M, Uto T, Hokazono C, Yamada M. Exercise training regulates autophagy in aorta. Experimental Biology 2017, April 2017, Chicago.
- ・ Okutsu M, Muscle-derived SDF-1 /CXCL12 modulates endothelial cell proliferation but is not required for exercise training-induced angiogenesis. 第 7 回骨格筋生物学研究会, 名古屋, 2019 年 3 月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~okutsu/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 岩田全広

ローマ字氏名: IWATA Masahiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。