

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790711

研究課題名（和文）受動運動による骨格筋由来因子を介した血管新生メカニズムの解明

研究課題名（英文）

Identification of novel muscle-derived angiogenic factors induced by passive exercise

研究代表者

泉家 康宏（IZUMIYA YASUHIRO）

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：10515414

研究成果の概要（和文）：動脈硬化を基盤とした下肢血管障害は患者の生命予後と QOL に大きな影響を与える。運動療法は末梢動脈疾患患者に対する最も基本的な介入方法であるが、重症患者ではその適応や効果に限界がある。本研究では全身加速ベッドを利用した受動運動が下肢血流障害後の血流改善にどのような影響を与えるかを実験動物と臨床症例にて検討した。受動運動は虚血肢での血管内皮 NO 合成酵素の活性化と血管新生因子の分泌亢進を介して血管新生を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Whole body periodic acceleration (WBPA) has been developed as a "passive exercise" device to improve endothelial function by increasing shear stress through repetitive movements in spinal axis direction. We investigated the effects of WBPA on blood flow recovery in a mouse model of hindlimb ischemia and in patients with peripheral arterial disease (PAD). WBPA increased blood supply to ischemic lower extremities through activation of eNOS signaling and upregulation of pro-angiogenic growth factor in ischemic skeletal muscle. WBPA is a potentially suitable non-invasive intervention to facilitate therapeutic angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学

1. 研究開始当初の背景

(1) Whole-body periodic acceleration

(WBPA) : 新たな運動療法モダリティ

高血圧・糖尿病などのリスクファクターを基盤とした末梢動脈疾患(PAD)は患者のQOLと生命予後に大きな影響を与える。運動療法はPAD患者に対する最も基本的な介入方法であるが、重症化したPAD患者ではその適応や効果に限界がある。体位を固定し、体軸方向に規則的に振動させる Whole-body periodic acceleration (WBPA)を用いた受動運動は、臨床的に血管内皮の shear stress を高め、NO 産生を亢進し血管内皮機能を改善することが報告されており(*Circ. J.*, 2008)、能動的な運動療法が施行できない患者に対する新たな治療モダリティとして注目されている。近年 WBPA の有用性を検討した臨床・基礎研究は散見されるが、血管新生に及ぼす影響について検討されたものはなく、さらにその分子機序に関してはまったく検討されていない。

(2) 骨格筋由来血管新生因子の発見

従来より骨格筋組織の成長・発育と血管新生(及び筋萎縮と血管網の減少)には密接な協調関係があることが知られている。レジスタンストレーニングにより骨格筋細胞において活性化される Akt シグナルは細胞の肥大と同時に血管新生因子である VEGF の分泌を促進することで組織の成長と血管新生を制御していることが報告されている(*Mol Cell Biol.* 2002)。研究代表者らは In vivo における骨格筋発育と血管新生の協調性の機序を明らかにするために、骨格筋特異的-誘導型 Akt1 過剰発現マウスを作製し可逆的な骨格筋肥大と血管新生を誘導できるモデルを確立した(Izumiya et al. *Cell Metab.* 2008)。続いて Akt1 の活性化

に伴い骨格筋より分泌される新規の血管新生因子を同定するため、トランスジェニックマウスの骨格筋の RNA サンプルをマイクロアレイにて網羅的に解析し、多数の分泌シグナルを持った遺伝子の発現が亢進することを見出し、代謝調節因子である FGF-21, 心保護作用と血管新生作用を有する Fstl-1, 骨格筋再生を促進する Ins1-6 が骨格筋より分泌されていることを報告してきた(*FEBS Lett.* 2008., *Circulation.* 2008., *J Biol Chem.* 2008., *J Biol Chem.* 2010.)。この骨格筋肥大に伴う骨格筋由来血管新生因子の分泌亢進は運動療法の有用性の新しい機序となりうると考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではマウス下肢虚血モデルおよび末梢静脈疾患症例に対して WBPA が下肢血流にどのような影響を与えるかを検討した。次にそのメカニズムとして、骨格筋由来の血管新生因子に焦点を当てて検討した。

3. 研究の方法

(1) WBPA の下肢血管新生に及ぼす効果の検討

下肢虚血手術を施行した野生型マウスおよび eNOS ノックアウトマウスを1日1回45分間、150回/分の速度で体軸方向に振動させ、手術後1, 3, 5, 7, 14日目にレーザードップラー(MoorLDI, Moor Instruments)を使用し下肢血流の回復を評価した。測定時のばらつきを最小限にするために、患側の下肢血流は健側に対する患側の血流の割合(ischemic/normal laser doppler blood flow ratio)で評価した。レーザードップラーによる評価に加えて CD31 免疫染色を行い組織学的に微小血管レベルでの血管新生の程度についても評価を行った。

末梢動脈疾患症例に対する受動運動はわれわれがこれまで使用し報告してきた Acceleration Therapeutics AT101 を用いた。一回のセッションは45分間とし、1日1回4週間の受動運動を行う。全身加速ベッド前後に血液採取を行い生化学パラメーターの測定に使用した。急性効果は単回のセッション施行後に、慢性効果は4週間のセッション終了後に評価した。

(2) WBPA により骨格筋より分泌される血管新生因子のスクリーニング

新規の血管新生因子を同定するため、WBPA による虚血肢の遺伝子発変化をマイクロアレイにて網羅的に解析した。WBPA により発現が亢進していた遺伝子のうち、分泌シグナルを有するものでかつ細胞膜貫通ドメインを持たないものを分泌タンパク候補としてスクリーニングした。それらの遺伝子の発現は特異的プライマーを用いた定量的リアルタイム PCR 法にて確認を行った。

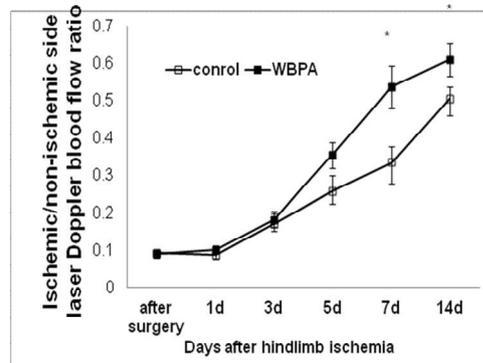
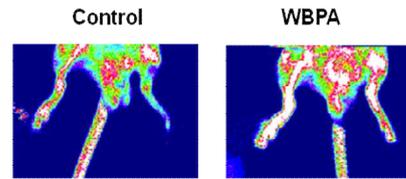
(3) 骨格筋由来分泌因子のアデノウイルスベクターの作製と in vivo での血管新生アッセイ

トランスフェクションアッセイにて培地中への分泌が確認された候補遺伝子のアデノウイルスベクターを作製し、マウス下肢虚血モデルの虚血肢に遺伝子導入し、in vivo における候補遺伝子の血管新生能をレーザー Doppler 法と CD31 免疫組織染色で評価した。

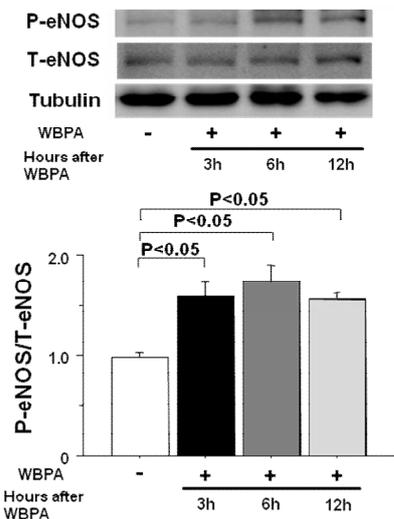
4. 研究成果

(1) WBPA の下肢血管新生に及ぼす効果

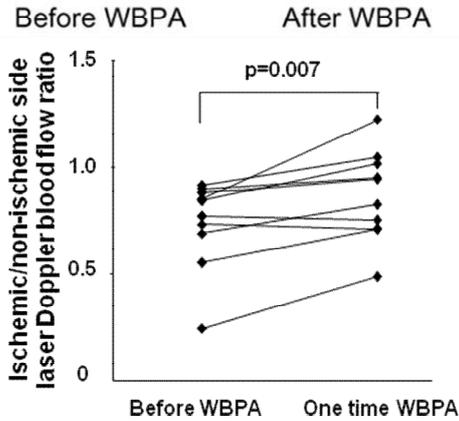
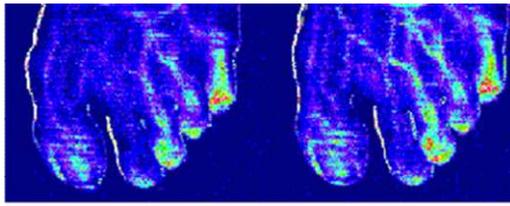
下肢虚血手術によって患側の血流は健側と比較して約 90%低下した。WBP 群ではコントロール群と比較して著明な血流改善を認めた。



CD31 染色により血管新生を微小血管レベルで評価したところ、WBPA 群では有意な血管新生の増加が認められた。患側の内転筋サンプルを western blot にて解析したところ、WBPA 終了後 3、6 時間で eNOS の著明な活性化が認められ、VEGF 等の血管新生因子の発現増加が認められた。WBPA による血流改善効果は eNOS 欠損マウスでは認められなかったことから、全身加速ベッドの血流改善効果は eNOS を介していると考えられた。



さらに末梢動脈疾患患者で検討を行ったところ、下肢血流の著明な改善が急性・慢性いずれの時期においても認められた。



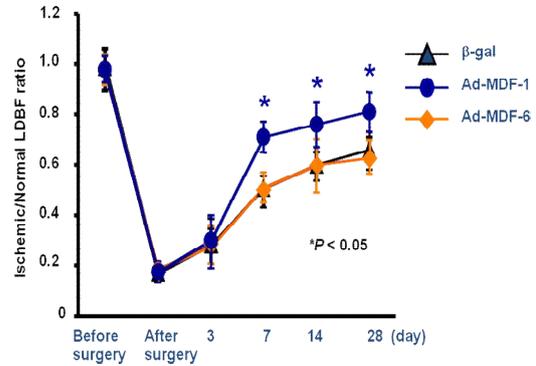
(2) WBPAにより骨格筋より分泌される血管新生因子のスクリーニング

プロテインアレイにて血管新生因子の発現を網羅的に解析したところ、既知の血管新生因子である VEGF, bFGF, SDF-1 の骨格筋での発現は WBPA により著明に増加した。次に WBPA による虚血肢の遺伝子発変化をマイクロアレイにて網羅的に解析した。コントロール群と比較して WBPA 群で発現が亢進していた遺伝子のうち、分泌シグナルを有するものでなおかつ細胞膜貫通ドメインを持たないものをウェブ上のソフトでスクリーニングを行い新規分泌因子の候補とした。そのスクリーニングの結果いくつかの新規代謝調節因子の候補をリストアップすることができた。その中のひとつ muscle-derived factor 1 (MDF-1) のタンパク発現は WBPA により骨格筋で著明に増加し、それに伴い血中濃度も有意な増加を認めた。

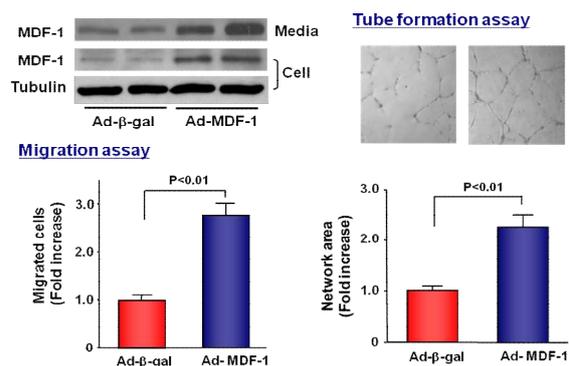
(3) 骨格筋由来分泌因子のアデノウイルスベクターの作製と in vivo での血管新生アッセイ

下肢虚血手術を施行したマウスの骨格筋

にアデノウイルスベクターを用いて MDF-1 を遺伝子導入することにより、骨格筋での Akt と eNOS の活性化を認め、レーザー Doppler での血流改善及び組織学的に CD31 陽性細胞の増加を認めた。



アデノウイルスベクターを用いて MDF-1 を培養血管内皮細胞で過剰発現すると、血管内皮細胞の遊走・分化を促進し、血清除去によるアポトーシスを著明に抑制した。これら MDF-1 の血管内皮細胞保護効果は PI3-kinase 阻害薬・優勢抑制型 Akt1 の過剰発現および NO 合成阻害薬によりブロックされた。さらに MDF-1 による血流改善効果は eNOS ノックアウトマウスでは認められなかったことから、MDF-1 の血管内皮細胞に対する作用は Akt-eNOS 経路を介していることが示唆された。



すなわち MDF-1 は受動運動により骨格筋より分泌される新規血管新生因子となりうる可能性があると考えられた。

(4) 得られた結果の国内外における位置づ

けとインパクト

本研究で新規骨格筋由来血管新生因子として同定された MDF-1 のように骨格筋から種々の分泌因子が様々な外的刺激により分泌され、心血管系細胞へ作用することが明らかとなってきた。これら骨格筋由来分泌因子を介した骨格筋と他臓器のコミュニケーションの分子機序を明らかにすることは心血管疾患患者に対する心臓リハビリテーションやメタボリックシンドローム患者に対する運動療法を行うことの理論的根拠を与えるものとなりうる。さらに骨格筋由来分泌因子の作用機序を分子レベルで解明することで新たな治療ターゲットの発見へとつながる可能性がある。

(5) 今後の展望

今後は現在解析を進めている MDF-1 に対するペプチド抗体を作製し ELISA システムを構築し、組織発現プロファイルやマウス PAD モデルにおける発現の変化、血中濃度の推移について検討する予定である。さらに、ヒトに対する抗体も同時に作製し PAD 患者における血中濃度を測定しさらに薬剤介入後の変化についてもモニタリングを行いその臨床的意義を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Araki S, Izumiya Y*, Hanatani S, Rokutanda T, Usuku H, Akasaki Y, Takeo T, Nakagata N, Walsh K, Ogawa H. Akt1-mediated skeletal muscle growth attenuates cardiac dysfunction and remodeling after experimental myocardial infarction.

Circ Heart Fail. 2012;5:116-25.

(*Corresponding author). 査読あり.

2. Matsubara J, Sugiyama S, Sugamura K, Nakamura T, Fujiwara Y, Akiyama E, Kurokawa H, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Maeda H, Izumiya Y, Kaikita K, Sumida H, Jinnouchi H, Matsui K, Kim-Mitsuyama S, Takeya M, Ogawa H. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Des-Fluoro-Sitagliptin, Improves Endothelial Function and Reduces Atherosclerotic Lesion Formation in Apolipoprotein-E Deficient Mice. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59:265-76.
査読あり.
3. Rokutanda T, Izumiya Y*, Miura M, Fukuda S, Shimada K, Izumi Y, Nakamura Y, Araki S, Hanatani S, Matsubara J, Nakamura T, Kataoka K, Yasuda O, Kaikita K, Sugiyama S, Kim-Mitsuyama S, Yoshikawa J, Fujita M, Yoshiyama M, Ogawa H. Passive Exercise Using Whole Body Periodic Acceleration Enhances Blood Supply to Ischemic Hindlimb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2872-80.
(*Corresponding author). 査読あり.
4. Enomoto T, Ohashi K, Shibata R, Higuchi A, Maruyama S, Izumiya Y, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. Adipolin/C1qdc2/CTRP12 functions as an adipokine that improves glucose metabolism. *J Biol Chem.* 2011;286:34552-8. 査読あり.
5. Izumiya Y*, Kojima S, Kojima S, Araki S, Usuku H, Matsubara J, Sakamoto K, Tsujita K, Nagayoshi Y, Kaikita K, Sugiyama S, Ogawa H. Long-term use of oral nicorandil stabilizes coronary

plaque in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis*.

2011;214:415-21.

(*Corresponding author). 査読あり.

6. Kim MH, Kay DI, Rudra RT, Chen BM, Hsu N, Izumiya Y, Martinez L, Spencer MJ, Walsh K, Grinnell A, Crosbie RH. Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration, and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2011;20:1324-38. 査読あり.
7. Zeng L, Akasaki Y, Sato K, Ouchi N, Izumiya Y, Walsh K. Insulin-like 6 is induced by muscle injury and functions as a regenerative factor. *J Biol Chem.* 2010;285:36060-9. 査読あり.
8. Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, Matsubara J, Sumida H, Kaikita K, Kojima S, Nagayoshi Y, Yamamuro M, Izumiya Y, Iwashita S, Matsui K, Jinnouchi H, Kimura K, Umemura S, Ogawa H. Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:1688-96. 査読あり.

[学会発表] (計 3 件)

1. 泉家康宏: Sirt7 Deficiency Impairs Angiogenic Responses in a Mouse Model of Vascular Insufficiency. American Heart Association Scientific Session 2011 11.13.2011 Orange County Convention Center

Orlando, USA.

2. 泉家康宏: Akt1-Mediated Skeletal Muscle Growth Attenuates Cardiac Dysfunction and Remodeling after Experimental Myocardial Infarction. 第15回日本心不全学会・学術集会 10.13.2011 かごしま県民交流センター, 鹿児島
3. 泉家康宏: Akt1-Mediated Skeletal Muscle Growth Promotes Capillary Growth in the Myocardium and Attenuates Cardiac Remodeling in a Murine Myocardial Infarction Model. 第76回日本循環器学会学術集会 3.16.2012 福岡国際会議場, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉家 康宏 (IZUMIYA YASUHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 10515414