

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560404

研究課題名(和文) 動脈硬化症予防におけるオートファジーの役割

研究課題名(英文) Molecular mechanisms in exercise training-induced atheroprotection

研究代表者

奥津 光晴 (Okutsu, Mitsuharu)

名古屋市立大学・その他の研究科・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)：本研究では、運動が動脈硬化症を抑制するメカニズムとして、不要なタンパクを排除し細胞や組織の恒常性を維持する働きを持つオートファジーの変動に着目し検討を行った。その結果、運動は動脈硬化層の形成を抑制すること、血中の総コレステロール、LDLおよびVLDLを低下することとオートファジータンパクを低下することが明らかにした。これらの結果は、運動は大動脈のオートファジーを抑制することで動脈硬化症を抑制する可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Animal studies have shown that regular exercise prevents atherosclerosis. Autophagy has been functionally linked to homeostasis in organs. Here, we determined if regular exercise-induced autophagy activation is sufficient to mitigate high-fat diet-induced atherosclerosis. Male C57BL/6J mice were randomly assigned into Sedentary (Sed) and (Ex) group. Mice in exercise group were performed voluntary wheel-running exercise for 16 weeks. Mice in both groups were fed 45% high-fat diet. After exercise training periods, aorta tissue was harvested and analyzed autophagy proteins by western blot. We showed that 16 weeks regular exercise prevented high-fat diet-induced obesity and atherosclerosis. Autophagy flux (i.e., LC3-II protein) in Sed mice was greater than Ex mice. These results suggest that exercise training may regulate atherosclerotic plaques formation by autophagy.

研究分野：スポーツ科学、応用健康科学、運動分子生物学

キーワード：動脈硬化 運動 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

我が国の死因の第1位は悪性新生物、第2位は心疾患、第3位は肺炎、第4位は脳血管疾患である。しかしながら、心疾患と脳血管疾患などの動脈硬化性疾患を基盤とする死因の合計は、悪性新生物の死因の割合に匹敵することから、動脈硬化症の発症機序の解明と予防方法の確立は重要な課題である。運動トレーニングは、動脈硬化症などの循環器系疾患の予防や改善に効果があることが近年の運動介入研究や大規模疫学調査により立証されている。動脈硬化症の予防を目的とした運動プログラムの開発は健康寿命の延伸や医療費削減の観点からも重要な課題であるが、運動が動脈硬化症を予防する分子メカニズムを解明し効果的な運動プログラムの開発を試みた報告は少ない。

動脈硬化症は、動脈を構成する血管内皮細胞や血管平滑筋細胞が酸化ストレスや炎症性サイトカインにより損傷を受け、単球やマクロファージなどの免疫細胞が大動脈の損傷部位から産生される細胞誘導因子により損傷部位に集積し、血管内皮細胞下へ浸潤後、酸化LDLなど取り込み泡沫化することで発症する。したがって、動脈硬化症は損傷した血管内皮細胞や平滑筋を素早く排除し、正常な血管を維持することで予防が期待できる。近年注目されているタンパク質分解システムであるオートファジーは、不要なタンパク質を素早く分解することで生体の恒常性を維持しており、オートファジー不全は代謝性疾患や骨格筋萎縮などの様々な疾患に関連することが報告されている。しかしながら、運動による動脈硬化症予防の分子メカニズムについて、大動脈のオートファジーに着目した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、定期的運動による動脈硬化症の抑制と大動脈のオートファジーとの関連について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 実験動物

8週令の雄性アポリポ蛋白E欠損マウスを日本エスエルシーより購入し実験に使用した。本研究で遂行した動物実験は動物実験倫理委員会の承認の下で実施された。

2) 飼育条件

購入したマウスは、1週間の予備飼育後、体重が均等になるよう運動トレーニング群(Ex群)と安静群(Sed群)の2群に分けた。Ex群は自発走行運動装置(MED社)を設置した飼育ケージにて16週間飼育した。その間、Sed群は運動装置を設置していないEx群と同じサイズの飼育ケージにて通常飼育した。マウスの運動パターンと走行距離は専用の解析ソフトにて解析した。餌は45%の脂肪を含む高脂肪食(Research Diet社)を自由

摂取させた。体重と摂餌量は毎週計測した。

3) 検体採取

運動トレーニング期間終了後、マウスをイソフラン麻酔下で採血し頸椎脱臼にて安楽死させた。安楽死後、生理食塩水を環流し体内に残留した血液を全て取り除き、胸部大動脈、心臓および足底筋を採取した。採取した血液は、遠心分離にて血清を単離しコレステロールとサイトカインの濃度の測定に使用した。胸部大動脈と足底筋は、解剖直後にタンパク解析用の溶液にてホモジネイトした。タンパクの発現の評価に使用した。心臓は、4%パラフォルムアルデヒドに一晩浸しスクロールにて置換した後、OCTコンパウンドに包埋し動脈硬化層の評価に使用した。

4) 骨格筋および大動脈のタンパク発現の評価

タンパクの発現の評価にはウェスタンブロット法を使用した。8%と12%のポリアクリルアミドゲルを作成後、ウェスタンブロットに使用する骨格筋と胸部大動脈の検体をポリアクリルアミドゲルにロードし十分に分離されるまで泳動した。泳動後、PVDFメンブレンに転写し5%スキムミルクにてブロッキングした。ブロッキング後、評価するタンパクの一次抗体にてメンブレンをインキュベーションした。使用した一次抗体は、Myosin heavy chain (MHC) IIa, MHCIIb, Peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 (PGC-1), manganese superoxide dismutase (MnSOD), LC3, Atg7, Beclin-1 および p62 を使用した。また、内因性コントロールとして actin を使用した。一次抗体反応終了後、それぞれの一次抗体に対応した horseradish peroxidase 標識された二次抗体にてインキュベーションした後、化学発光検出試薬にて発色しルミノイメージアナライザ(LAS500, GE)で観察した。

5) 動脈硬化層の評価

動脈硬化層の評価は、OCTコンパウンドに包埋した検体の大動脈弁が観察できる部位を薄切後オイルレッドOにて染色し、光学顕微鏡に接続したデジタルカメラ(DS-Fi2, Nikon)を用い撮影後、動脈硬化層をImageJにて計測した。

6) コレステロールの測定

血中コレステロールの測定には液体クロマトグラフィーを使用し、Total Cholesterol、LDL、VLDL、HDL、sd-LDL および TG を測定した。

7) サイトカインの測定

血中サイトカインの測定には Proteome Profiler Antibody Arrays (R&D) を使用した。

8) 統計解析

各項目の測定結果は平均値 ± 標準誤差で表した。各項目の測定結果の群間比較は対応のない T 検定を使用し、有意水準 $p < 0.05$ 以下を有意とした。

4. 研究成果

1) 体重、摂餌量および自発運動走行距離

体重は、Sed 群、Ex 群ともに増加したが、増加率は Ex 群の方が Sed 群よりも有意に低かった。自発運動は野生型のマウス同様に暗期に走行し明期に休息しており、走行距離は運動トレーニング期間中に有意な変化はなかった。摂餌量は、Ex 群の方が Sed 群よりも有意に多かった。

2) 運動トレーニングの評価

本研究で使用した自発走行運動モデルが適切なトレーニングモデルであることを確認するため、運動トレーニングにより変動することが知られている骨格筋のタンパクの変動を評価した。その結果、先行研究と同様、Ex 群の MHCIIa、PGC-1 および MnSOD の発現は Sed 群に比べ有意に高く、MHCIIb の発現は有意に低かった。

3) 動脈硬化層の評価

運動トレーニングによる動脈硬化症の抑制を確認するため、大動脈を Oil red O にて染色し Ex 群と Sed 群の動脈硬化層の形成を比較した。その結果、Ex 群の大動脈硬化層は Sed 群に比べ有意に小さかった。

4) コレステロールの評価

コレステロールは動脈硬化層の形成を促進する一因であるため、Ex 群と Sed 群の血中コレステロール濃度を比較した。その結果、Ex 群の Total Cholesterol、LDL および VLDL は Sed 群に比べ低い傾向を示したが有意差はなく、HDL に違いはなかった。

5) サイトカインの評価

血中サイトカインは、測定した約 40 項目のうち IL-1ra が最も顕著な違いを示し、Ex 群は Sed 群に比べ 48% 低かった。

6) オートファジータンパクの変動

大動脈のオートファジーの変動を検討するため、オートファジータンパクである LC3、Atg7 および Beclin-1 とオートファジーによる分解の指標となる p62 の発現をウェスタンブロットにて測定し Ex 群と Sed 群で比較した。その結果、Ex 群の LC3-II は Sed 群に比べ有意に低かった。Atg7 と Beclin-1 は低い傾向を示すものの有意差はなかった。また、オートファジータンパクは低下するが p62 は変化しなかったことから、単なるオートファジータンパクの増加ではなくオートファジーによる分解が抑制されたことを示した。

以上の結果をまとめると、運動トレーニングは動脈硬化症を予防するが、この予防には運動による大動脈のオートファジーの抑制が関与する可能性が示唆された。

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 1 件)

奥津 光晴 . 運動によるオートファジーの調節と動脈硬化症予防、*体育の科学*、査読なし、66 巻、2014、pp. 30-35

[学会発表](計 3 件)

奥津光晴、宇土泰希、外園千紘 . 運動による動脈硬化症の抑制とオートファジーとの関連、第 70 回日本体力医学会、2015 年 9 月 18 日、和歌山県民文化会館(和歌山市)

奥津光晴、時澤健、丸井朱里、外園千紘、鈴木克彦、永島計 . 運動トレーニングによる大動脈の抗酸化酵素の発現変化、第 19 回日本体力医学会東海地方会、2015 年 3 月 13 日、名古屋大学(名古屋市)

外園千紘、時澤健、丸井朱里、鈴木克彦、永島計、奥津光晴 . 運動による骨格筋の SDF-1 /CXCL12 の発現変化、第 19 回日本体力医学会東海地方会、2015 年 3 月 13 日、名古屋大学(名古屋市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)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：80409775

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし