

Periodic accelerationを利用した受動運動により 骨格筋から分泌される血管新生因子の同定

熊本大学大学院 生命科学研究部 循環器病態学
泉家 康宏

1. はじめに

動脈硬化を基盤とした下肢血管障害(Peripheral arterial diseases: PAD)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 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。Whole-body periodic acceleration (WBPA) devise を用いた受動運動は、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⁽¹⁾、様々な要因で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。WBPA は重症の PAD 患者に対しても施行可能と考えられ、WBPA に下肢血流改善効果が認められれば臨床的意義は非常に大きいと考えられる。本研究ではマウスモデルを用いて WBPA 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。近年、骨格筋は他組織にパラクライン的に作用する様々な生理活性物質を分泌する内分泌器官として働くことが明らかになってきた。申請者はこれまで骨格筋肥大が誘導できるトランスジェニックマウスを使って骨格筋の発育・肥大が他の臓器に与える影響について研究を行い、代謝調節因子として最近注目されている fibroblast growth factor-21 や血管新生作用を有する follistatin like-1 が骨格筋より分泌されていることを報告してきた⁽²⁾⁻⁽⁶⁾。本研究では新たな血管新生因子を単一遺伝子の過剰発現マウスという人工的なモデルからではなく、生理的刺激を与えたモデルで探索・同定しその生体における機能解析を行った。

2. 方法

A. 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マウスを 1 日 1 回 60 分間、180 回/分の速度で体軸方向に振動させ、手術後 3, 5, 7, 14, 28 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。

B. 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。

C. 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ドップラー法と CD31 免疫組織染色で評価した。

3. 結果 研究成果

A. WBPA の下肢血管新生に及ぼす効果の検討

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(7日目: 0.54 ± 0.06 vs 0.33 ± 0.04 , 14日目: 0.61 ± 0.05 vs 0.51 ± 0.03 , $p < 0.05$)。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Aktシグナルの活性化を認めた。また大動脈サンプルにおいてはeNOSの著明な活性化を認めた。

B. 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

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。

C. 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、レーザードップラー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. 考察 まとめ

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。

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心疾患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心血管疾患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。

最後に本研究を遂行するにあたり、多大なご支援を賜りました財団法人 病態代謝研究会に深く感謝いたします。

5. 発表論文, 参考文献

1. Matsumoto T, Fujita M, Tarutani Y, Yamane T, Takashima H, Nakae I, Horie M. Whole-body periodic acceleration enhances brachial endothelial function. *Circ J*. 2008;72(1):139-143.
2. Izumiya Y, Hopkins T, Morris C, Sato K, Zeng L, Viereck J, Hamilton JA, Ouchi N, LeBrasseur NK, Walsh K. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab*. 2008;7:159-72. Accompanied by editorial.
3. Ouchi N, Oshima Y, Ohashi K, Higuchi A, Ikegami C, Izumiya Y, Walsh K. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric oxide synthesis-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 2008;283(47):32802-11.
4. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitonov A, Walsh K. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett*. 2008;582(27):3805-3810.
5. 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. 12;285(46):36060-9..
6. Peter AK, Ko CY, Kim MH, Hsu N, Ouchi N, Rhie S, Izumiya Y, Zeng L, Walsh K, Crosbie RH. Myogenic Akt signaling upregulates the utrophin-glycoprotein complex and promotes sarcolemma stability in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2009;18(2):318-327.