

## 運動による骨格筋の毛細血管密度の制御に対する マイオカインの役割

名古屋市立大学 奥津光晴  
(共同研究者) 同 山田麻未

### The Role of Myokines in The Regulation of Capillary Density by Exercise

by

Mitsuharu Okutsu, Mami Yamada  
*Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University*

#### ABSTRACT

Regular exercise improves capillary density (capillary network) in skeletal muscle, which contributes to protect against chronic diseases- or aging-induced skeletal muscle atrophy. Although capillary density in skeletal is likely to be regulated by multiple angiogenic factors from skeletal muscle, the exercise-induced angiogenic factor family are poorly understood. In this study, we measured angiogenic factors in skeletal muscle to identify a family of angiogenic factors that regulate capillary density by regular exercise. To identify multiple angiogenic factors, we compared the factors between oxidative soleus muscle with high capillary density and glycolytic extensor digitorum longus muscle with low capillary density. We also compared angiogenic factors between exercise training group and sedentary group in plantaris muscle. After the analysis, we combined these results to identify family for exercise-induced angiogenic factors. Thirty-four angiogenic factors in oxidative soleus muscle were higher than glycolytic muscle. Forty-one angiogenic factors in exercise training group were higher than sedentary group. Twenty-seven an angiogenic factors were abundant in both oxidative muscle and exercise group. These results suggest that the multiple angiogenic factors could be a potential role to regulate capillary density by exercise training.

## 要 旨

定期的な運動は骨格筋の血管新生因子を増加し、毛細血管密度（毛細血管網）を増加することで筋萎縮を抑制する。血管新生は骨格筋由来の血管新生因子が統合的に調節する可能性が高いが、これを網羅的解析から同定した報告はない。そこで本研究では、骨格筋が産生する血管新生因子に着目し、運動が毛細血管密度を調節する血管新生因子群の同定を目的とした。方法は、毛細血管密度が高い遅筋および運動群と毛細血管密度が低い速筋および安静群の血管新生因子を網羅的に解析した。解析後、両解析結果を統合し、血管新生を誘導する因子群を統合した。その結果、遅筋の方が速筋よりも発現が高い血管新生因子は34種類、運動群の方が安静群よりも発現が高い血管新生因子は41種類、遅筋と運動群の両群で発現が高い因子は27種類あった。これらの結果は、定期的な持久的運動による骨格筋の血管新生は複数の血管新生因子が統合的に調節する可能性を示唆している。

## 緒 言

癌、糖尿病や心不全などの慢性疾患や加齢は骨格筋量を減少（筋萎縮）する。筋萎縮はフレイルやロコモティブ症候群を発症することから、筋量を維持する分子メカニズムを解明し予防や治療に応用することは、健康寿命の延伸や医療費削減の観点から重要な課題である。加齢や慢性疾患が筋萎縮を引き起こす生化学的な要因は酸化ストレスや炎症性サイトカインの増加<sup>1,2)</sup>、形態学的な要因は骨格筋の毛細血管密度（毛細血管網）の減少である<sup>3)</sup>。毛細血管は、正常な骨格筋の保持に必要な酸素や栄養を供給し、不要な二酸化炭素や代謝産物を除去する重要な骨格筋内の器官である。毛細血管密度の増加は、骨格筋の必要物質と不要物質の交換を効率よく実施できるため、骨格筋の

恒常性維持に貢献すると考えられている。実際に、末梢血管が狭窄や閉塞する末梢動脈疾患では筋量の減少や筋組織の壊死が観察されるが、毛細血管網を発達し血流の迂回路を構築すると筋量の減少や壊死は改善する<sup>4,5)</sup>。これらは毛細血管網の発達が筋量維持に深く関与することを示唆している。

骨格筋の毛細血管網を発達させる代表的な方法は定期的な持久的運動である<sup>6,7)</sup>。運動は骨格筋の収縮による物理的刺激や内分泌系因子を増加することで血管新生因子の産生を増加する。血管新生を誘導する代表的な因子は血管内皮細胞増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF）であり、持久的な運動トレーニングはこれを増加することが報告されている<sup>8)</sup>。しかしながら、運動による血管新生のメカニズムに関する近年の報告を統合すると、運動により増加するVEGFは骨格筋の毛細血管密度の増加に重要であるが、VEGF以外の血管新生因子も毛細血管密度の増加に関与する可能性が高い<sup>9,10)</sup>。また生体内には複数の血管新生因子が分泌されているため、運動による血管新生の増加には一種類だけでなく複数の因子が統合的に関与する可能性が高い。

そこで本研究では、運動などの筋収縮刺激により分泌が促進する筋由来の生理活性物質であるマイオカイン（myokine）に着目し、毛細血管密度の高い遅筋と毛細血管密度の低い速筋および運動トレーニング群と安静群を網羅的解析から比較し、毛細血管密度を増加する血管新生因子群を同定することで、血管新生因子群の生理学的意義を立証するための基盤なる研究を実施することを目的とした。

## 1. 方 法

### 1. 1 実験動物

実験には8週齢の雄性のC57BL/6Jマウスを使用した。マウスの飼育は、明暗サイクル、温度

や湿度（室温23度，湿度50%）が管理された名古屋市立大学実験動物研究教育センターにて実施した。購入したマウスは飼育環境に順応させるため1週間の予備飼育を行った後に実験を開始した。餌と水は自由摂取とした。

## 1. 2 運動方法

マウスは体重が均等になるよう持久的運動を実施する群（運動群）と通常飼育する群（安静群）に分けた。運動群は4週間の自発走行運動トレーニングを実施した。運動群は，トレーニング期間中の走行距離を継続的に測定し，運動を十分に実施したマウスのみを解析に使用した。安静群は，運動群がトレーニングを実施する期間中，飼育ケージ内にて通常飼育した。

## 1. 3 検体採取

運動トレーニング期間終了後にマウスを解剖し検体を採取した。検体採取は運動期間最終日の一過性の運動の影響を取り除くため，運動期間終了24時間後に実施した。解剖はマウスを麻酔下で頸椎脱臼し安楽死させた後，速筋優位な白色広筋と長趾伸筋，遅筋優位なヒラメ筋の他，腓腹筋と足底筋を採取した。両足の白色広筋および腓腹筋と片足の長趾伸筋，ヒラメ筋および足底筋は，採取直後に液体窒素にて冷凍し実験に使用するまで-80℃にて冷凍保存した。液体窒素に保存しなかったもう片方の長趾伸筋，ヒラメ筋と足底筋は，イソペンタンにて急速して免疫染色用の検体を作成し，実験に使用するまで-80℃にて冷凍保存した。

## 1. 4 タンパクの評価

運動トレーニングの効果を評価するため，運動により変動する骨格筋のタンパクの発現を検討した。タンパクの評価にはウェスタンブロット法を使用した。方法は，凍結保存した足底筋をウェスタンブロット用のサンプルバッファーに懸濁した

タンパク濃度を測定した。測定後，アクリルアミドゲルを用いて電気泳動しタンパクを分離した。分離後，タンパクはメンブレンに転写しMHCIIa (SC-71, DSHB), MHCIIb (BF-F3, DSHB) およびPGC-1 $\alpha$  (AB3242, Millipore) の一次抗体と反応させた。反応後，各メンブレンは一次抗体に対応したHorse Radish Peroxidase ラベルした二次抗体と反応させ，検出試薬にて発色しイメージアナライザー (Las 500, GE) で観察した。

## 1. 5 毛細血管密度の評価

遅筋と速筋の毛細血管密度の比較と運動トレーニングによる毛細血管密度の変動を評価するため，骨格筋の蛍光免疫染色を実施した。方法は，免疫染色用に保存した長趾伸筋，ヒラメ筋と足底筋をクライスタットにて薄切し，MHCIIa, MHCIIbと毛細血管のマーカーであるCD31 (550274, BD) の一次抗体と反応させた。反応後，一次抗体に対応したAlexa Fluor 405 (ab175660, Abcam), Alexa Fluor 488 (ab150121, Abcam) およびAlexa Fluor 555 (A21434, Invitrogen) の二次抗体と反応させ，蛍光顕微鏡にて撮影した。撮影した画像はImageJを用いてMHCIIaとMHCIIbの筋線維に隣接する毛細血管の数を計測した。

## 1. 6 血管新生因子の測定

遅筋と速筋および運動群と安静群の骨格筋の血管新生因子の発現を網羅的に解析し比較した。測定には長趾伸筋，ヒラメ筋および腓腹筋を使用した。方法は，採取した同じ群のマウス3匹分の同じ種類の骨格筋をRIPAバッファーに懸濁して1検体とし，これを各群2検体準備した。懸濁後，タンパク濃度を測定し同量のタンパクをProteome Profile Angiogenesis Antibody Arrays (R&D) のメンブレンと反応させた。反応後，メンブレンを二次抗体と反応させ，検出試薬にて発色しイメージアナライザーで観察した。

### 1. 7 統計

統計は、遅筋と速筋および運動群と安静群の骨格筋タンパクの発現および毛細血管密度の比較は対応のないT検定を使用し、 $p < 0.05$ を有意とした。

## 2. 結果

### 2. 1 持久的運動トレーニングによる骨格筋の適応の確認

4週間の持久的運動トレーニングによる骨格筋の適応を確認するため、運動トレーニングで変動することが知られているタンパクを評価した。その結果、持久的運動トレーニングを実施すると足底筋で増加することが知られているMHCIIaやPGC-1 $\alpha$ は安静群に比べて有意に高く、運動トレーニングで減少することが知られているMHCIIbは有意に低かった(図1)。

### 2. 2 毛細血管密度の比較

骨格筋の毛細血管密度を遅筋と速筋および運動群と安静群で比較した。その結果、ヒラメ筋のMHCIIaとMHCIIbの線維に隣接する毛細血管数は長趾伸筋に比べて有意に高かった(図2 AB)。また、運動群のMHCIIaおよびMHCIIbの線維に隣接する毛細血管数は安静群に比べて有意に高かった(図2 CD)。

### 2. 3 網羅的解析による血管新生因子の比較

血管新生因子の発現を遅筋と速筋および運動群と安静群で網羅的に解析し比較した(表1)。その結果、ヒラメ筋は長趾伸筋と比べてVEGFやAngiogeninなどの34種類の血管新生因子が高かった。一方、運動群は安静群と比べてVEGFやFGF acidicなどの41種類の血管新生因子が高かった。また、長趾伸筋よりもヒラメ筋の方が高く、かつ安静群よりも運動群の方が高かった血管新生因子は27種類あった(図3)。

## 3. 考察

本研究では、骨格筋の血管新生因子の発現を毛細血管の多い遅筋優位なヒラメ筋と毛細血管の少ない速筋優位な長趾伸筋および運動群と安静群の骨格筋を用いて網羅的に測定し、毛細血管密度を調節する複数のマイオカインを同定することを目的とした。その結果、ヒラメ筋は長趾伸筋と比べて34種類の血管新生因子が高かった。また、運動群は安静群に比べ41種類の血管新生因子が高かった。さらに、運動群よりも安静群の方が高く、ヒラメ筋よりも長趾伸筋の方が高かった血管新生因子は27種類あった。骨格筋の毛細血管密度に関する先行研究は、血液中の一種類のみの血管新生因子に着目した報告が多い。運動による血管新生は筋収縮刺激により骨格筋から分泌される血管

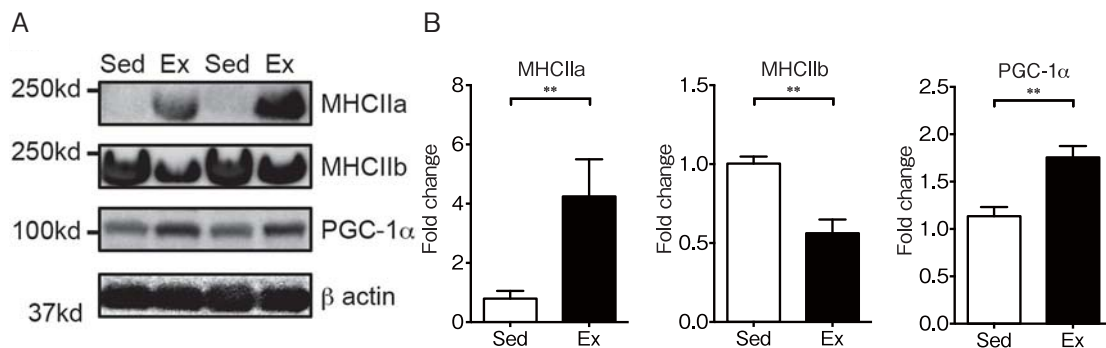


図1 運動トレーニングによる骨格筋タンパクの変動

A) ウェスタンブロットの代表的な撮影像。B) MHCIIa, MHCIIbおよびPGC-1 $\alpha$ の変動。Sed: 安静群, Ex: 運動群, \*\*  $p < 0.01$ 。

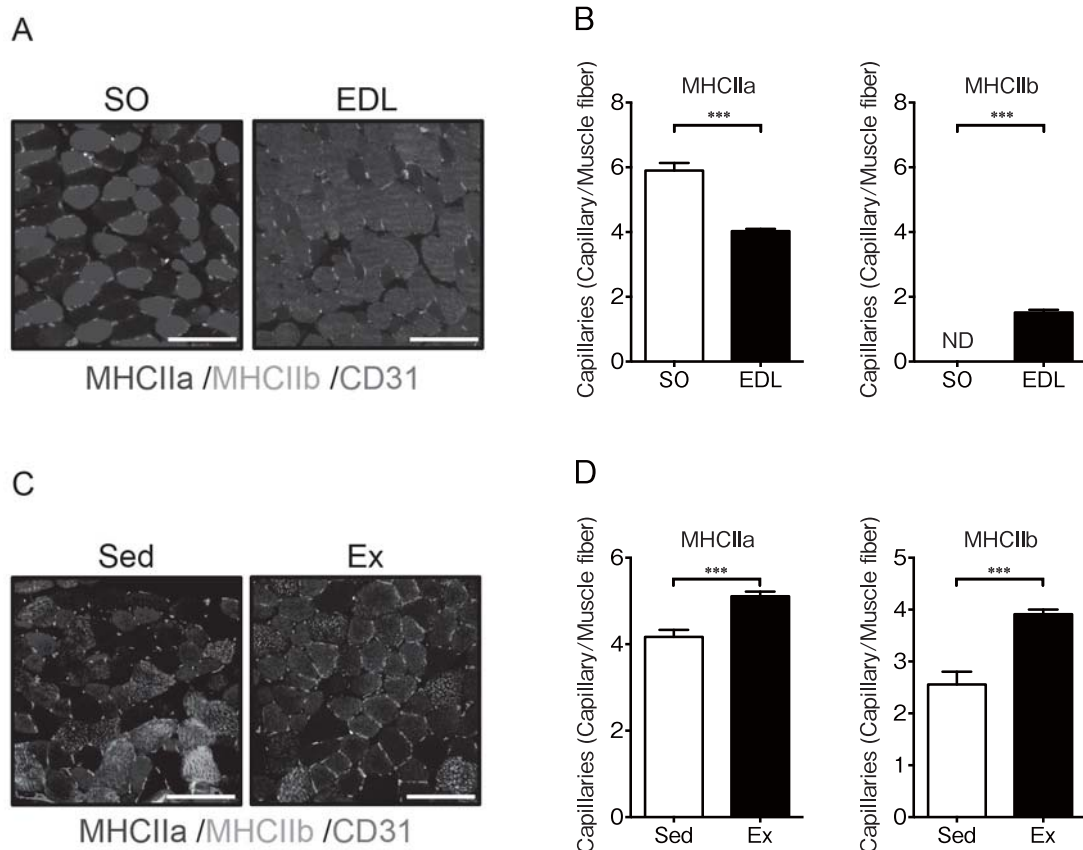


図2 骨格筋の毛細血管密度

A) ヒラメ筋と長趾伸筋の代表的な蛍光免疫染色像。 B) ヒラメ筋と長趾伸筋の MHCIIa線維と MHCIIb線維に隣接する毛細血管数の比較。 C) 安静群と運動群の足底筋の代表的な蛍光免疫染色像。 D) 安静群と運動群の足底筋の MHCIIa線維と MHCIIb線維に隣接する毛細血管数の比較。 Sed: 安静群, Ex:運動群, \*\*\* p<0.001.

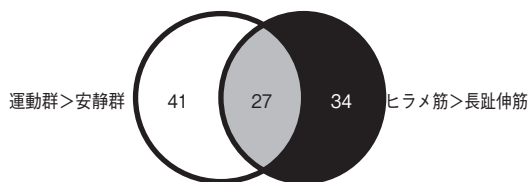


図3 骨格筋の血管新生因子の網羅的解

ヒラメ筋が長趾伸筋より発現が高い血管新生因子は 34種類, 運動群の足底筋が安静群の足底筋より高い血管新生因子は41種類, ヒラメ筋と運動群の両群で高い血管新生因子は27種類あった。

新生因子が統合的に調節する可能性が高いが, これを網羅的解析から同定した報告はない。本研究結果は, 骨格筋から分泌される複数の血管新生因子に着目して研究を実施することで, 骨格筋の血管新生機構を詳細に理解できる可能性を示唆している。

骨格筋の毛細血管は筋線維に隣接して発達しており, 筋線維に平行および交差する構造で毛細血

表1 解析した血管新生因子

ADAMTS1	IGFBP-1
Amphiregulin	IGFBP-2
Angiogenin	IGFBP-3
Angiopoietin-1	IL-1 alpha
Angiopoietin-3	IL-1 beta
CCL2/JE/MCP-1	IL-10
CCL3/MIP-1 alpha	Leptin
Coagulation Factor III	MMP-3(pro and mature)
CXCL1/KC	MMP-8(pro)
CXCL10/IP-10/CRG-2	MMP-9(pro and active)
CXCL12/SDF-1	NOV/CCN3/IGFBP-9
CXCL16	Osteopontin
CXCL4/PF4	PD-ECGF
Cyr61/CNN1/IGFBP-10	PDGF-AA
DLL4	PDGF-AB/BB
DPPIV/CD26	Pentraxin-3
EGF	PIGF-2
Endoglin/CD105	Prolactin
Endostatin/Collagen XVIII	Proliferin
Endothelin-1	Serpin E1/PAI-1
FGF acidic	Serpin F1/PED
FGF basic	Thrombospondin-2
FGF-7/KGF	TIMP-1
Fractalkine	TIMP-4
GM-CSF	VEGF
HB-EGF	VEGF-B
HGF	

管網を形成している。毛細血管網を形成する代表的な血管新生因子である VEGF は毛細血管が豊富な遅筋で高く、毛細血管密度が向上する運動などの筋収縮刺激により増加する。しかしながら、筋特異的に VEGF を欠損したマウスの毛細血管密度は野生型マウスとの間に有意な違いはなく、定期的な運動を実施すると骨格筋の VEGF を欠損しても毛細血管密度は増加することが報告されている<sup>9)</sup>。したがって、骨格筋の毛細血管網の形成に VEGF は重要であるが、VEGF 以外の複数の因子も血管新生網の形成に関与する可能性が高い。本研究でも VEGF は運動群が安静群よりも高く、ヒラメ筋が長趾伸筋よりも高かった。しかしながら、運動群と安静群およびヒラメ筋と長趾伸筋で最も大きな違いを示した因子は VEGF ではなかった。これらの結果は、VEGF は骨格筋の血管新生に関与するが、運動による毛細血管密度を調節する因子の同定は VEGF を含む複数の因子から統合的に検証する必要があることを示唆している。

本研究では血管新生を誘導するマイオカインの同定を目的とした。その結果、骨格筋の種類の違いや運動トレーニングの有無により血管新生因子の発現が異なることを明らかにした。骨格筋組織は大半が筋線維から構成されている。一方で、骨格筋組織は血管を構成する血管内皮細胞、神経細胞や脂肪細胞なども含む複合的な組織でもある。したがって、本研究では骨格筋組織を用いて血管新生因子の量を比較したが、その違いは筋線維以外の組織の変動を反映した結果である可能性も否定できない。また、本研究では骨格筋組織をタンパク抽出用の溶液に懸濁し評価した。マイオカインは骨格筋から分泌された内分泌系因子の総称であるため、溶液に懸濁した骨格筋を用いた本研究では、検出された因子が筋細胞から分泌されない細胞内タンパクであった可能性も考えられる。今後、筋伸展刺激した骨格筋培養細胞の培養液中の血管新生因子の変動を評価し、これらの因子が骨

格筋から分泌された血管新生因子であることの立証が必要である。

本研究では、遅筋で多く運動で増加する血管新生因子が 27 種類あることを明らかにした。しかしながら、これらの血管新生因子のうち、どの因子群が運動による血管新生の調節に必須であるかを立証することはできなかった。血管新生に必須である因子は、候補となる全ての因子を骨格筋で消失させたマウスを作成し、毛細血管密度の顕著な減少や運動による血管新生が完全に消失すればその因子群の重要性を立証できる。しかしながら、これら全ての血管新生因子をマウス骨格筋にて消失することは困難であり、また組織特異的に欠損しても胎生致死となる可能性が高い。今後、培養した血管内皮細胞にこれらの複数の因子を添加し、血管内皮細胞の浸潤や増殖などの機能を評価することで鍵を握る因子群を同定できる可能性がある。

これらの実験から得た知見は筋量維持を目的とした新たな運動プログラムや創薬の開発が期待できる。今後、スポーツ科学や健康科学の分野に貢献できる研究への発展が期待できるだろう。

#### 4. 結 論

運動トレーニングによる骨格筋の血管新生には複数の血管新生因子が関与する可能性が示唆された。

#### 謝 辞

本研究の遂行に対し多大な助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Call J.A., Chain K.H., Martin K.S., Lira V.A., Okutsu M., Zhang M., Yan Z., Enhanced skeletal muscle expression of extracellular superoxide dismutase mitigates streptozotocin-induced diabetic

- cardiomyopathy by reducing oxidative stress and aberrant cell signaling, *Circ. Heart Fail.*, **8**: 188-197 (2015)
- 2) Yamada M., Iwata M., Warabi E., Oishi H., Lira V.A., Okutsu M., p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle, *FASEB. J.*, **33**: 8022-8032 (2019)
  - 3) Hazarika S., Farber C.R., Dokun A.O., Pitsillides A.N., Wang T., Lye R.J., Annex B.H., MicroRNA-93 controls perfusion recovery after hindlimb ischemia by modulating expression of multiple genes in the cell cycle pathway, *Circulation*, **127**: 1818-1828 (2013)
  - 4) Okutsu M., Call J.A., Lira V.A., Zhang M., Donet J.A., French B.A., Martin K.S., Peirce-Cottler S.M., Rembold C.M., Annex B.H., Yan Z., Extracellular superoxide dismutase ameliorates skeletal muscle abnormalities, cachexia, and exercise intolerance in mice with congestive heart failure, *Circ. Heart Fail.*, **7**: 519-530 (2014)
  - 5) Dokun A.O., Chen L., Okutsu M., Farber C.R., Hazarika S., Jones W.S., Craig D., Marchuk D.A., Lye R.J., Shah S.H., Annex B.H., ADAM12: a genetic modifier of preclinical peripheral arterial disease, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **309**: H790-803 (2015)
  - 6) Yan Z., Okutsu M., Akhtar Y.N., Lira V.A., Regulation of exercise-induced fiber type transformation, mitochondrial biogenesis, and angiogenesis in skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.* (1985), **110**: 264-274 (2011)
  - 7) Yamada M., Hokazono C., Tokizawa K., Marui S., Iwata M., Lira V.A., Suzuki K., Miura S., Nagashima K., Okutsu M., Muscle-derived SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 modulates endothelial cell proliferation but not exercise training-induced angiogenesis, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* (in press)
  - 8) Olfert I.M., Howlett R.A., Tang K., Dalton N.D., Gu Y., Peterson K.L., Wagner P.D., Breen E.C., Muscle-specific VEGF deficiency greatly reduces exercise endurance in mice, *J. Physiol.*, **587**: 1755-1767 (2009)
  - 9) Delavar H., Nogueira L., Wagner P.D., Hogan M.C., Metzger D., Breen E.C., Skeletal myofiber VEGF is essential for the exercise training response in adult mice, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **306**: R586-595 (2014)
  - 10) Waters R.E., Rotevatn S., Li P., Annex B.H., Yan Z., Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **287**: C1342-1348 (2004)