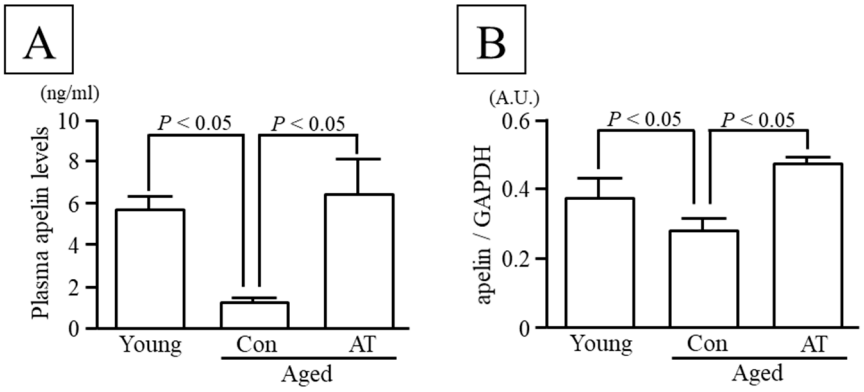
118　動脈硬化に対する運動効果にマイオカインが及ぼす影響	藤江　隼平

【目的】有酸素性トレーニングによる動脈硬化度の低下効果のメカニズムに血管内皮由来の血管拡張物質である一酸化窒素（Nitric Oxide：NO）が関与する。骨格筋から分泌される生理活性物質・マイオカインは自己作用だけでなく、血液を介して脂肪細胞や骨細胞といった他臓器にも作用する可能性が報告されている。最近では、マイオカインが動脈血管にも作用して、動脈機能に影響する可能性が報告されている。しかしながら、習慣的な運動刺激によって誘発されるマイオカインが動脈硬化の低下効果に関与するか否かの検討は国内外を見ても明らかとなっていない。そこで、本研究では、これまでの我々のヒト研究の成果を基盤として、動物実験を用いて、習慣的な有酸素性運動によるマイオカイン分泌の変動が血液を介して動脈硬化度を低下させるか否か検討することを目的とした。本報告書では、検証を試みた複数のマイオカインのうち、最も解析の進んだ apelin に着目して報告することとした。apelin は動脈血管の内皮型 NO 合成酵素（endothelial NO synthase：eNOS）を増加調節し、動脈血管の NO 産生の調節に関与することが報告されている。我々は、これまでに、中高齢者における 8 週間の有酸素性トレーニングが血中 apelin 濃度を増大させ、その増大は動脈硬化度の低下効果と相関関係があることを明らかにしてきた。

【方法】本研究では、老化促進モデルマウスである 38 週齢の雄 SAMP1 マウスを老齢モデルマウスとして、12 週間の有酸素性トレーニング（回転車輪を用いた自発走）を行う老齢運動（Aged-AT）群と同期間安静飼育する老齢安静（Aged-Con）群の 2 群に分割した。さらに、加齢の影響を検討するために 13 週齢の雄 SAMP1 マウスを若齢マウスとし、若齢（Young）群として、12 週間安静飼育した。動脈血管の内皮機能は、等容性ミオグラフを用いて、動脈血管に対して血管内皮依存性血管弛緩作用を有するアセチルコリン（Ach）を添加することで評価した。骨格筋 apelin タンパク発現や動脈血管 Akt および eNOS リン酸化は Western blot 法、血中 apelin 濃度は ELISA 法、動脈血管の nitrate／nitrite（NOx：NO の代謝産物）濃度は Griess 法で測定した。

【結果】血管標本に対して血管内皮依存性血管弛緩作用を有する ACh を 10^{-9}M～10^{-4}M まで濃度依存的に添加した結果、すべての群において有意な血管拡張作用は認められ、Young 群よりも Aged-Con 群の同量の ACh 添加に対する血管拡張率は有意に低値を示していたが、Aged-AT 群の同量の ACh 添加に対する血管拡張率は Aged-Con 群よりも有意に高値を示した（$P<0.05$）。Aged-Con 群の動脈血管の Akt リン酸化、eNOS リン酸化、NOx 濃度は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の Akt リン酸化は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した（$P<0.05$）。加えて、Aged-Con 群の血中 apelin 濃度および骨格筋 apelin タンパク発現は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の血中 apelin 濃度は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した（$P<0.05$）。さらに、血中 apelin 濃度と骨格筋 apelin タンパク発現（$r=0.526$、$P<0.05$）、動脈血管の eNOS リン酸化（$r=0.562$、$P<0.05$）および動脈血管の NOx 濃度（$r=0.553$、$P<0.01$）とは有意に正の相関関係が認められた。

血中 apelin 濃度および大腿四頭筋 apelin タンパク発現の群間比較



118. 動脈硬化に対する運動効果にマイオカインが及ぼす影響

藤江　隼平

立命館大学 スポーツ健康科学部

Key words：有酸素性運動，加齢，動脈硬化，apelin，マイオカイン

緒　言

現在までに我々は、有酸素性トレーニングによる動脈硬化改善効果のメカニズムに血管内皮由来の血管拡張物質である一酸化窒素（Nitric Oxide : NO）が関与することをヒトおよび動物実験から解明してきた［1］。骨格筋から分泌される生理活性物質・マイオカインは自己作用だけでなく、血液を介して脂肪細胞や骨細胞といった他臓器にも作用する可能性が報告されている。最近では、マイオカインが動脈血管にも作用して、動脈機能に影響する可能性が報告されている。しかしながら、習慣的な運動刺激によって誘発されるマイオカインが動脈硬化の低下効果に関与するか否かの検討は国内外を見ても明らかとなっていない。そこで、本研究では、これまでの我々のヒト研究の成果を基盤として、動物実験を用いて、習慣的な有酸素性運動によるマイオカイン分泌の変動が血液を介して動脈硬化度を低下させるか否か検討することを目的とした。本報告書では、検証を試みた複数のマイオカインのうち、最も解析の進んだ apelin に着目して報告することとした。apelin は動脈血管の内皮型 NO 合成酵素（endothelial NO synthase : eNOS）を増加調節し、動脈血管の NO 産生の調節に関与することが報告されている［2］。また、apelin は血管や骨格筋をはじめ数多くの組織で発現しており、受容体である APJ 受容体に結合することで各組織に作用することが報告されている［3～5］。血管内皮細胞においては、phosphatidylinositol 3-kinase（PI3K）／protein kinase B（Akt）シグナル経路を介して、eNOS リン酸化を増大させ、動脈血管の NO 産生を促進させることで、血管拡張を介して動脈硬化度を低下させることが報告されている［2，6］。我々は、これまでに、中高齢者における 8 週間の有酸素性トレーニングが血中 apelin 濃度を増大させ、その増大が動脈硬化度の低下効果と相関関係があることを明らかにしてきた［7］。

方　法

1.　実験動物

本研究では、老化促進モデルマウスである 38 週齢の雄 Senescence-Accelerated Mouse Prone（SAMP）1 マウスを老齢モデルマウスとして、12 週間の有酸素性トレーニングを行う老齢運動（Aged-AT）群と同期間安静飼育する老齢安静（Aged-Con）群の 2 群の体重が均等になるように分割した。さらに、加齢の影響を検討するために 13 週齢の雄 SAMP1 マウスを若齢マウスとし、若齢（Young）群として、12 週間安静飼育した。すべてのマウスは、餌と水を自由摂取とした。

2.　運動方法

Aged-AT 群は、回転車輪を用いた自発走運動による 12 週間の有酸素性トレーニングを各マウスの個別ケージにて実施した。自発走による活動量は経時的に観察し、介入終了時まで測定した。

3.　検体採取

12 週間の有酸素性トレーニングもしくは安静飼育後にマウスを解剖（老齢群：50 週齢時、若齢群：25 週齢時）し、検体を採取した。一過性の運動刺激を除外するために、Aged-AT 群は解剖の 48 時間前に個別ケージから回転車輪を取り除いた。麻酔下にて、眼窩静脈叢から採血を行なった後に、脱血により安楽死処置し、大腿四頭筋、動脈血管、精巣上体周囲脂肪組織を摘出した。各サンプルは、冷生理食塩水にて洗浄し、付着している血液を取り除き、組織重量を測

定した。採血した血液は、4℃で 3,000 回転、10 分間の遠心によって上清を分離し、分析を行うまで―80℃で冷凍保存し、各組織も分析を行うまで―80℃で冷凍保存した。

4. 等容性ミオグラフを用いた血管の等尺性および等張性収縮

動脈血管の血管拡張能の測定は、等容性ミオグラフ（Danish Myo Technology A/S 社製、Aarhus N、Denmark）を用いて実施した。マウスから胸部大動脈を血管内皮細胞が損傷しないように摘出し、2 mm の長さに切断、大動脈輪として血管標本を作製した。作製された血管標本は、37℃、95% O_2と 5% CO_2で灌流された Krebs Buffer（130 mM NaCl、4.7 mM KCL、1.18 mM KH_2PO_4、1.18 mM $MgSO_4$ $7H_2O$、14.9 mM $NaHCO_3$、5.5 mM Glucose、0.026 mM EDTA、1.16 mM $CaCl_2$）のインキュベーション中にチャンバー内の張力測定用のワイヤーにセットした。張力測定はトランスデューサにて測定し、ポリグラフ上に記録した。安静時張力を 20 mN とし、血管標本に対して、300 nM U-46619（Prostaglandin F2α、Cayman Chemical 社製、Ann Arbor、MI、USA）で最大収縮させた後、血管内皮依存性血管弛緩作用を有する 10^{-9}～10^{-4}M アセチルコリン（Acetylcholine：ACh）、または血管内皮非依存性弛緩作用を有する 10^{-9}～10^{-4}M ニトロプルシドナトリウム（Sodium nitroprusside：SNP）を添加し、血管弛緩反応を濃度依存曲線で表し、血管内皮依存性および非依存性の血管弛緩反応を評価した。

5. Citrate Synthase（CS）酵素活性

大腿四頭筋サンプルを氷冷下でホモジェナイズバッファー：1 mM TrisHCl（pH 7.4）、130 mM NaCl、250 mM sucrose を用いてホモジェナイズした後、9,000×g、0℃で 20 分間遠心し、ペレットにホモジェナイズバッファーを加え、再懸濁した。その後、600×g、0℃で 10 分間遠心し、得られた上清を 8,000×g、0℃で 15 分間遠心した後、ペレットを 250 mM sucrose で再懸濁し、サンプルを作製した。タンパク定量は、Protein Assay Rapid Kit を用いてマイクロプレートリーダー（xMark Microplate Spectrophotometer; Bio-Rad Laboratories 社製、Hercules、CA、USA）により、605 nm にて測定した。CS 活性を評価するために、182 μl の混合物（100 mM TrisHCl（pH 8.0）、1 mM 5、5-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid]）、10 mM acetyl-CoA と 8 μl のサンプルを混ぜ、30℃で 2 分、インキュベートした。酵素活性反応は 10 μl の 10 mM oxaloacetate を加えた後、マイクロプレートリーダーを用いて、412 nm で測定した。

6. 動脈組織中 nitrate／nitrite（NOx：NO の代謝産物）濃度および血中 apelin 濃度の測定

動脈組織中 NOx 濃度は、R&D Systems 社製（Minneapolis、MN、USA）の実験プロトコルに従い、Griess 法を用いて、測定した。吸光度値は、マイクロプレートリーダーを用いて 540 nm の波長で測定し、標準回帰曲線から対象動物の動脈組織中 NOx 濃度を算出した。血中 apelin 濃度は、Phoenix Pharmaceuticals 社製（Burlingame、CA、USA）の実験プロトコルに従って、ELISA 法により測定した。吸光度値は、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の波長で測定し、標準回帰曲線から各サンプルの血中 apelin 濃度を算出した。各サンプルはデュプリケイトで測定し、その 2 つの値の平均値を用いた。

7. 動脈血管の eNOS リン酸化および Akt リン酸化、大腿四頭筋の apelin タンパク発現

摘出した動脈血管は、ホモジェナイズバッファーを用いてホモジェナイズした。その後、4℃で 30 分間撹拌したサンプルは、12,000×g、4℃で 15 分間遠心し、得られた上清をタンパク抽出サンプルとした。タンパク定量は、Protein Assay Rapid Kit（Wako 社製、Tokyo、Japan）を用いて、マイクロプレートリーダーにより、605 nm にて測定した。phosphorylation eNOS および total eNOS、phosphorylation Akt および total Akt タンパク発現は、Western blotting 法を用いて測定した。抽出した 10 μg タンパク分画を Laemmli buffer にて 95℃で 10 分間加熱した。各分画のタンパクは 5～20% SDS-polyacrylamide ゲルと泳動槽（Wako 社製、Tokyo、Japan）を用いて SDS-PAGE により分離した。SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンにタンパクを 20 V、60 分間の条件下にて転写した。転写されたメンブレンは、2% skim milk、0.1% Tween 20 を含む Phosphate-buffered saline（Blocking buffer）を用いて、室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、1 次抗体 phosphorylation eNOS（BD Biosciences 社製、Tokyo、Japan）および total eNOS（BD Biosciences 社製、Tokyo、Japan）、phosphorylation Akt（Cell Signaling Technology 社製, Tokyo, Japan）および total Akt（Cell Signaling Technology 社製、Tokyo、Japan）、apelin（Bioss 社製、Tokyo、Japan）および GAPDH（Cell Signaling Technology 社製、Tokyo、Japan）を 2% Blocking buffer で希釈し、

4℃で12時間インキュベートした。反応後はメンブレンをPBS-1% tweenにて3回洗浄し、次に、2次抗体:horseradish peroxidase（HRP）-conjugated anti-rabbit immunoglobulin secondary antibodies（GE Healthcare Bio-Sciences 社製、Pittsburgh、PA、USA）もしくは HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulin secondary antibodies（GE Healthcare Bio-Sciences 社製、Pittsburgh、PA、USA）を2% Blocking buffer で希釈し、60 分間室温にてインキュベートした。その後、PBS-1% tween にて 3 回洗浄したメンブレンは、発酵液（Luminata Forte Western HRP Substrate）に 5 分間メンブレンをインキュベーションした後に、画像解析装置（Image Quant LAS image 4000、GE Healthcare Bio-Sciences system 社製、Pittsburgh、PA、USA）を用いてタンパク発現量を定量解析した。

8. 統計解析

本研究結果は、すべて平均値±標準誤差で示した。3 群間の各測定項目の比較は、一元配置分散分析法により検定し、有意な差が認められた項目には、Fisher の PLSD 法を用いて post-hoc テストを実施した。3 群間の等容性ミオグラフを用いた血管弛緩反応の比較は、繰り返しのある二元配置分散分析法により検定し、交互作用が認められた項目において、Fisher の PLSD 法を用いて post-hoc テストを実施した。各項目の相関関係は、ピアソンの相関係数によって検討するとともに、単回帰により回帰直線を求めた。危険率（p）は 5%未満を有意水準とした。すべての統計解析は、StatView 5.0（SAS 社製、Cary、NC、USA）を使用した。

結　果

1. 体重、精巣上体周囲脂肪組織重量、大腿四頭筋 CS 活性の比較

Young 群、Aged-Con 群、Aged-AT 群の 3 群において、体重および精巣上体周囲脂肪組織重量に有意な差は認められなかった。Aged-AT 群の大腿四頭筋 CS 活性は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した（$P<0.05$）。

表 1. 体重、精巣上体周囲脂肪組織重量、大腿四頭筋 CS 活性の群間比較

		Aged	
	Young	Con	AT
Body Weight, g	34.9±1.2	37.6±1.6	36.3±2.9
Epididymal fat, g	1.62±0.14	1.71±0.18	1.20±0.26
Femoris CS activity, μmol/mg/min	12.8±0.8	11.4±0.7	15.0±0.5 *

Femoris：quadriceps femoris muscle, CS：Citrate Synthase, Mean Value±SEM.
$P<0.05$ vs Aged-Con.

2. 薬理学的手法を用いた動脈血管の血管拡張能の群間比較

摘出した大動脈血管より作製した血管標本に対して、血管内皮非依存性血管弛緩作用を有する SNP を 10^{-9}～10^{-4}M まで濃度依存的に添加した結果、Young 群、Aged-Con 群、Aged-AT 群のすべての群において、有意な血管拡張作用は認められたが、各群における同量の SNP 添加に対する血管拡張率に有意な差は認められなかった（$P<0.05$）。一方、血管標本に対して血管内皮依存性血管弛緩作用を有する Ach を 10^{-9}～10^{-4}M まで濃度依存的に添加した結果、すべての群において有意な血管拡張作用は認められ、Young 群よりも Aged-Con 群の同量の ACh 添加に対する血管拡張率は有意に低値を示していたが、Aged-AT 群の同量の ACh 添加に対する血管拡張率は Aged-Con 群よりも有意に高値を示した（$P<0.05$）

3. 動脈血管の Akt リン酸化、eNOS リン酸化および NOx 濃度の群間比較

Aged-Con 群の動脈血管の Akt リン酸化は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の Akt リン酸化は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した（図 1A、P＜0.05）。Aged-Con 群の動脈血管の eNOS リン酸化は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の動脈血管の eNOS リン酸化は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した（図 1B、P＜0.05）。Aged-Con 群の動脈組織中 NOx 濃度は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の動脈組織中 NOx 濃度は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した（図 1C、P＜0.05）。

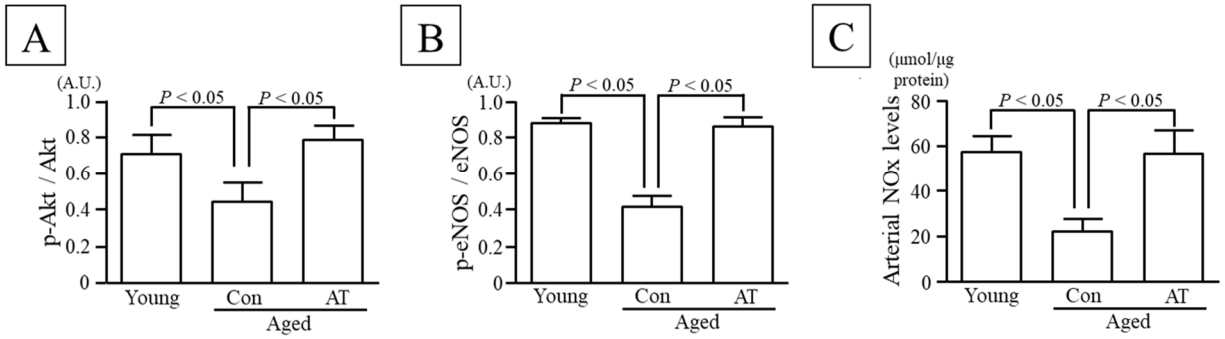


図 1. 動脈血管の Akt／eNOS／NO シグナル経路の群間比較

A） 動脈血管の Akt リン酸化の群間比較。

B） 動脈血管の eNOS リン酸化の群間比較。

C） 動脈血管の nitrate／nitrite（NOx）濃度の群間比較。

4. 骨格筋 apelin タンパク発現および血中 apelin 濃度の群間比較

Aged-Con 群の血中 apelin 濃度は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の血中 apelin 濃度は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した（図 2A、P＜0.05）。Aged-Con 群の骨格筋 apelin タンパク発現は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の骨格筋 apelin タンパク発現は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した（図 2B、P＜0.05）。

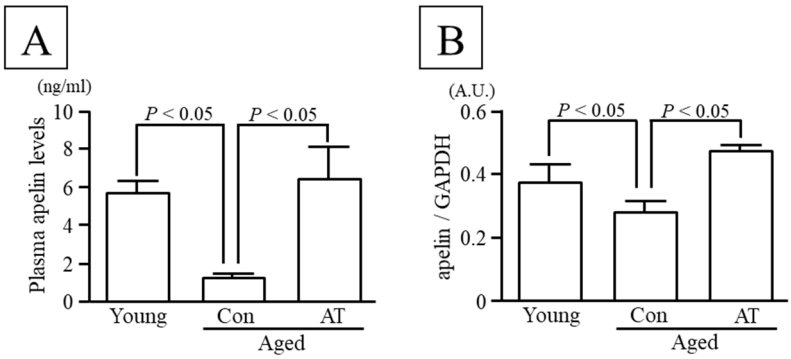


図 2. 血中 apelin 濃度および大腿四頭筋 apelin タンパク発現の群間比較

A） 血中 apelin 濃度の群間比較。

B） 大腿四頭筋 apelin タンパク発現の群間比較。

5. 血中 apelin 濃度と骨格筋 apelin タンパク発現、動脈血管の eNOS リン酸化および NOx 濃度との相関関係

血中 apelin 濃度と骨格筋 apelin タンパク発現（r＝0.526、P＜0.05）、動脈血管の eNOS リン酸化（r＝0.562、P＜0.05）および動脈血管の NOx 濃度（r＝0.553、P＜0.01）とは有意に正の相関関係が認められた。

考　察

本研究成果として、加齢に伴い骨格筋 apelin タンパク発現および動脈血管の NO 産生が低下することで動脈血管の内皮機能は低下することが示されたが、有酸素性トレーニングの実施により骨格筋 apelin タンパク発現および動脈血管の NO 産生は増加し、血管内皮機能も増大していた。さらに、骨格筋 apelin タンパク発現と血中 apelin 濃度には有意に正の相関関係が認められ、血中 apelin 濃度と動脈血管の NO 産生にも有意な正の相関関係が認められた。したがって、老齢マウスの有酸素性トレーニングによる骨格筋 apelin タンパク発現の増加は、動脈血管の NO 産生の増加を介した血管内皮機能の増大に関与する可能性が示唆された。

老齢マウスの有酸素性トレーニングは、骨格筋 apelin タンパク発現の増大を誘導することで、動脈血管の Akt／eNOS／NO シグナル経路に刺激を加え、血管内皮機能は増大することが明らかとなった。しかしながら、先行研究においてapelin は骨格筋以外にも心臓や血管をはじめとした数多くの組織で発現することが報告されている。そのため、今後は有酸素性トレーニングにより骨格筋以外の他の臓器で apelin の分泌が誘導されるか否か、さらには骨格筋特異的 apelin 遺伝子欠損マウスを用いて、有酸素性トレーニングによる血管内皮機能の増大に対する骨格筋 apelin 分泌の貢献度を解明する必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、立命館大学スポーツ健康科学部教授家光素行先生および立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科博士課程後期課程の井上健一郎氏に協力いただき、実施しました。ここに記載して感謝の意を表します。さらに、本研究を遂行するにあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団および関係の皆様に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Fujie S, Hasegawa N, Horii N, Uchida M, Sanada K, Hamaoka T, Padilla J, Martinez-Lemus LA, Maeda S, Iemitsu M. Aerobic Exercise Restores Aging-Associated Reductions in Arterial Adropin Levels and Improves Adropin-Induced Nitric Oxide-Dependent Vasorelaxation. J Am Heart Assoc. 2021 May 18;10(10):e020641. doi: 10.1161/JAHA.120.020641. Epub 2021 May 3. PMID: 33938228; PMCID: PMC8200711.

2) Jia YX, Lu ZF, Zhang J, Pan CS, Yang JH, Zhao J, Yu F, Duan XH, Tang CS, Qi YF. Apelin activates L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. Peptides. 2007 Oct;28(10):2023-9. doi: 10.1016/j.peptides.2007.07.016. Epub 2007 Jul 21. PMID: 17719140.

3) Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, Nishiwaki S, Iguchi T, Harada S, Sugaya T, Matsuzaki H, Yamamoto R, Shiota N, Okunishi H, Kihara M, Umemura S, Sugiyama F, Yagami K, Kasuya Y, Mochizuki N, Fukamizu A. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. J Biol Chem. 2004 Jun 18;279(25):26274-9. doi: 10.1074/jbc.M404149200. Epub 2004 Apr 15. PMID: 15087458.

4) Son JS, Kim HJ, Son Y, Lee H, Chae SA, Seong JK, Song W. Effects of exercise-induced apelin levels on skeletal muscle and their capillarization in type 2 diabetic rats. Muscle Nerve. 2017 Dec;56(6):1155-1163. doi: 10.1002/mus.25596. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28164323.

5) Mughal A, O'Rourke ST. Vascular effects of apelin: Mechanisms and therapeutic potential. Pharmacol Ther. 2018 Oct;190:139-147. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.013. Epub 2018 May 25. PMID: 29807055; PMCID: PMC6165679.

6) Andersen CU, Hilberg O, Mellemkjær S, Nielsen-Kudsk JE, Simonsen U. Apelin and pulmonary hypertension. Pulm Circ. 2011 Jul-Sep;1(3):334-46. doi: 10.4103/2045-8932.87299. PMID: 22140623; PMCID: PMC3224425.
7) Fujie S, Sato K, Miyamoto-Mikami E, Hasegawa N, Fujita S, Sanada K, Hamaoka T, Iemitsu M. Reduction of arterial stiffness by exercise training is associated with increasing plasma apelin level in middle-aged and older adults. PLoS One. 2014 Apr 1;9(4):e93545. doi: 10.1371/journal.pone.0093545. PMID: 24691252; PMCID: PMC3972107.