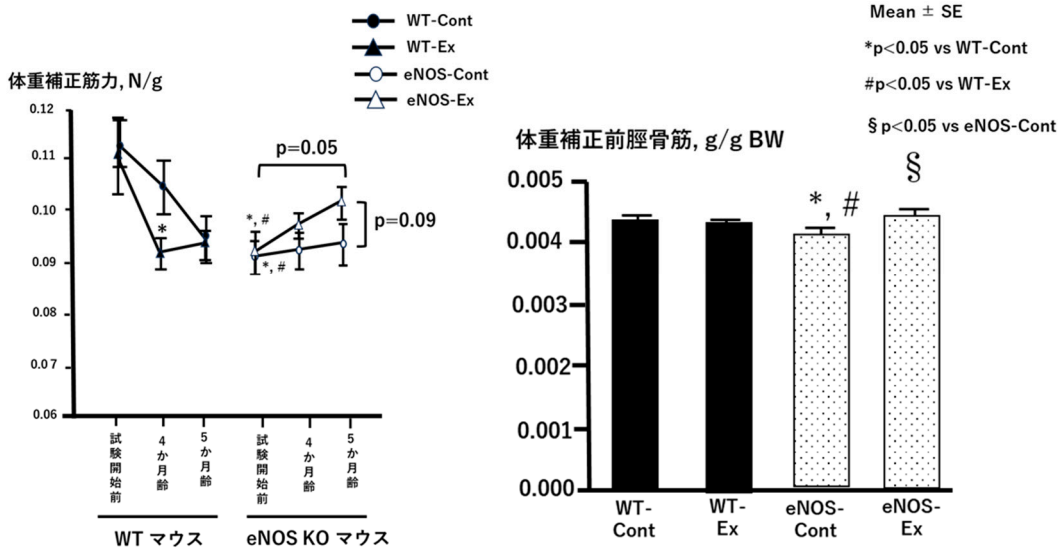
2　運動による骨格筋の新たな毛細血管新生機序の解明	池森　敦子

【目的】高齢化社会を背景に、平均寿命と健康寿命のギャップを埋めるため、健康寿命を延伸する対策が求められている。中でも重要な課題が、骨格筋量の減少および筋力低下を認めるサルコペニアを抑制することである。サルコペニアの抑制には、習慣的走運動による骨格筋の量と質の維持が有効であるが、様々な慢性疾患を有する高齢者では、有効な運動量を確保できないのが現状であり、運動効果を補うサルコペニア進行抑制法の確立が急務である。私たちは、サルコペニアを高頻度で発症する 2 型糖尿病に着目し、習慣的走運動が骨格筋の萎縮や筋力低下を抑制する機序を検討してきた。その結果、2 型糖尿病の骨格筋では、筋内の毛細血管が減少し、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）が低下しているが、運動により骨格筋委縮が軽減され、筋力が増加した。また、そのような骨格筋では、毛細血管が増加し、eNOS の発現が有意に増加する結果を得た。この結果は、運動による毛細血管の増加は、骨格筋の量と質の維持に重要である可能性を示している。一方で、血管内皮機能が低下する動脈硬化を有する高齢者において、運動の骨格筋への影響は十分検討されていない。そこで、骨格筋内の血流減少、身体機能および骨格筋量の低下が報告されている eNOS 欠損マウスを使用し、習慣的走運動による骨格筋への影響について検討した。

【方法】3 か月齢（14 週齢）の eNOS 欠損オスマウス（C57/B6J を背景に有する、eNOS Ko マウス、合計 15 匹）および野生型オスマウス（C57/B6J、WT マウス、合計 13 匹）をそれぞれ、2 群｛非運動群（eNOS-Cont 8 匹、WT-Cont 6 匹）、運動群（eNOS-Ex 7 匹、WT-Ex 7 匹）｝に分けた。習慣的走運動は、トレッドミル装置を使用し週 5 日、25 m／分、傾斜 5 度、60 分間で 8 週間実施した。4 週間おきに、体重、餌摂取量、血圧、筋力、身体活動量、採尿を行い、運動開始 8 週間後に後肢筋を摘出し、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋、長趾伸筋、足底筋の筋重量を測定した。

【結果】既報のとおり、eNOS Ko マウスでは、血圧が WT マウスよりも有意に高値であり、体重補正筋力は、試験開始時では、WT マウスよりも有意に低値であった。一方で、当初の予想に反し、eNOS Ko マウスでは、習慣的走運動により体重補正筋力が増加する傾向を示し、身体活動量が週齢に従い増加し、その程度は、WT マウスと比較し有意差を認めなかった。また、習慣的走運動により、WT マウスでは骨格筋重量が増加しなかったが、eNOS Ko マウスでは前脛骨筋の筋重量が有意に増加した。さらに毛細血管血流量は、両マウスで同程度であった。これらの結果は、習慣的走運動が、血管内皮機能非依存的に骨格筋へ好影響を及ぼすことを示しており、今後さらにその分子メカニズムを詳細に明らかにしていく。

eNOS 欠損マウスにおける習慣的走運動の骨格筋への影響



2. 運動による骨格筋の新たな毛細血管新生機序の解明

池森　敦子

聖マリアンナ医科大学 医学部 解剖学（機能組織分野）

Key words：サルコペニア，習慣的走運動，骨格筋，毛細血管，内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）

緒　言

高齢化社会を背景に、平均寿命と健康寿命のギャップを埋めるため、健康寿命を延伸する対策が求められている。中でも重要な課題が、骨格筋量の減少および筋力低下を認めるサルコペニアを抑制することである。サルコペニアは、加齢に加え、慢性疾患により悪化するが、逆にサルコペニアが慢性疾患を進行させることも報告されており、サルコペニアの抑制対策は、併発する慢性疾患の進行をも抑制する可能性がある。

サルコペニアの抑制には、習慣的走運動による骨格筋の量と質の維持が有効である。しかし、心血管疾患、整形外科的疾患に罹患している高齢者も多く、有効な運動量を確保できないのが現状であり、運動効果を補うサルコペニア進行抑制法の確立が急務である。私たちは、サルコペニアを高頻度で発症する 2 型糖尿病に着目し、習慣的走運動が骨格筋の萎縮や筋力低下を抑制する機序を検討してきた。その結果、2 型糖尿病の骨格筋では、筋内の毛細血管が減少し、内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）が低下しているが、運動により骨格筋委縮が軽減され、筋力が増加した。また、そのような骨格筋では、毛細血管が増加し、eNOS の発現が有意に増加する結果を得た［1］。この結果は、運動による毛細血管の増加は、骨格筋の量と質の維持に重要である可能性を示している。一方で、血管内皮機能が低下する動脈硬化を有する高齢者において、運動の骨格筋への影響は十分検討されていない。そこで、骨格筋内の血流減少［2］、身体機能および骨格筋量の低下［3］が報告されている eNOS 欠損マウス使用し、習慣的走運動による骨格筋への影響について検討した。

方　法

1. 使用動物と群分け

3 か月齢（14 週齢）の eNOS 欠損オスマウス（背景は C57/B6J 、以後 eNOS Ko マウスと略す、合計 15 匹、Jackson Lab）および野生型オスマウス（C57/B6J、以後 WT マウスと略す、合計 13 匹、Jackson Lab）をそれぞれ、2 群｛非運動群（eNOS-Cont 8 匹、WT-Cont 6 匹）、運動群（eNOS-Ex 7 匹、WT-Ex 7 匹）｝に分けた。習慣的走運動は、トレッドミル装置（夏目製作所）を使用し、徐々に走行速度を上げて、最終的には週 5 日、25 m／分、傾斜 5 度、60 分間で 8 週間実施した。運動開始 8 週間後に後肢筋を摘出し、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋、長趾伸筋、足底筋の筋重量を測定した。なお本研究は、本学動物実験委員会の承認を得た（認可番号：TG230324-1、TG240118-1）。

2. 体重、餌摂取量、血圧、筋力、身体活動量の測定

3 か月齢（14 週齢）、4 か月齢（17 週齢）、5 か月齢（21 週齢）において、体重、24 時間餌摂取量、収縮期血圧（3 回測定した平均値を算出、ソフトロン）を測定した。筋力は、OECD 方式握力測定装置 MK-380CM/R（室町機器）を使用し、1 度に 3 回測定した平均値（N）と体重で補正した平均値（N/g）で評価した。身体活動量は、自発性回転輪運動装置（飼育容器内に回転輪を設置し、走行距離を算出、ニューロサイエンス社ワイヤレスホイール）を使用し、3 日間の夜間走行距離を測定した。

3. 骨格筋の毛細血管評価

後肢筋を摘出する前に、筋表面に毛細血管スコープ（GOKO Bscan-ZD）を 30 秒間あて、毛細血管を撮影した。撮影後、解析ソフト（GOKO-VIP）を使用し、2〜4 本の毛細血管に対して血流速度を測定し、平均値を算出した。

4. 尿中バイオマーカー測定

運動は、尿中アルブミンを低下させ、腎障害（糸球体障害、尿細管障害）を抑制し、腎保護的に作用する［1，4］。eNOS Ko マウスは、高血圧をみとめ、糸球体および尿細管障害を認めることから、運動は、腎障害の程度を軽減し、尿中アルブミンを減少させ、骨格筋へ影響する可能性がある。このため、糸球体マーカーの尿アルブミンおよび尿細管マーカーの Kidney injury molecule 1（KIM-1）を測定した。

5. 統計解析

結果は、平均値±標準誤差で表し、統計学的有意差は $p<0.05$ に設定した。Kruskal-Wallis test で一元配置分散分析後、Mann-Whitney U 検定で群間比較を行った。群内比較は、Friedman 検定後に、Dunn 検定を行った。統計解析ソフトは、JMP（12.2.0, SAS）を使用した。

結果および考察

1. 体重、餌摂取量、血圧（表 1）

体重は、試験開始時では 4 群間に有意差がなかったが、4 か月齢、5 か月齢では運動群（eNOS -Ex 群、WT-Ex 群）が、それぞれの非運動群と比較し有意に体重が低値であった（$p<0.05$）。運動群間においては、同程度であった。非運動群では、経過中体重が増加したが、5 か月齢の eNOS-Cont 群は、同月齢の WT-Cont 群と比較し有意に高値であった（$p<0.05$）。運動群では、試験開始時と比較し、4 か月齢で体重が減少したが、その後 5 か月齢で体重は増加した。

餌摂取量は、試験開始時では、eNOS Ko マウスが WT マウスよりも有意に多かったが（$p<0.05$）、eNOS Ko マウスは、経過中に餌摂取量が減少し、4 か月齢、5 か月齢では、WT マウスと比較し有意差が見られなくなった。また、運動は、食欲を抑制することが報告されているが［5］、本研究では、運動群では、非運動群にくらべ、有意な餌摂取量の低下は認められなかった。実施された運動プロトコールは、食欲を低下させるほどの強度でなかった可能性が考えられた。

血圧は、eNOS-Cont 群、eNOS-Ex 群で、WT-Cont 群、WT-Ex 群と比較し、経過中有意に高値を示した。この結果は、eNOS 欠損が、NO 産生を抑制し（血管内皮機能の低下）、血管の拡張を抑制していることを示している。

表 1. 体重、餌摂取量、血圧の推移

パラメーター	群	試験開始時	4 か月齢	5 か月齢
体重, g	WT-Cont	25.1 ± 0.3	26.1 ± 0.4	26.7 ± 0.3 ¶
	WT-Ex	24.8 ± 0.3	24.2 ± 0.2 *	25.3 ± 0.2 *, †
	eNOS-Cont	27.2 ± 0.6 *, #	27.5 ± 0.6 #	28.9 ± 0.6 *, #, ¶, †
	eNOS-Ex	25.6 ± 0.9	24.6 ± 0.7 §, ¶	25.5 ± 0.7 §, †
餌摂取量, g	WT-Cont	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.1 ± 0.1
	WT-Ex	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.3	3.0 ± 0.1
	eNOS-Cont	3.8 ± 0.1*, #	3.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1¶
	eNOS-Ex	3.8 ± 0.1*, #	3.4 ± 0.2	2.8 ± 0.2
収縮期血圧, mmHg	WT-Cont	108 .3 ± 4.1	110.2 ± 2.0	112.7 ± 3.0
	WT-Ex	107.1 ± 2.3	113 .3 ± 1.7	110.4± 2.2
	eNOS-Cont	129.8 ± 2.5*, #	134.2 ± 3.8*, #	136.8 ± 4.1*, #
	eNOS-Ex	129.8 ± 2.9*, #	128 .3 ± 4.7*, ¶	135.1 ± 1.9*, #

Mean±SE。 Kruskal-Wallis test で一元配置分散分析後、Mann-Whitney U 検定で群間比較。群内比較は、Friedman 検定後に、Dunn 検定。*p＜0.05 vs WT-Cont、#p＜0.05 vs WT-Ex、§ p＜0.05 vs eNOS-Cont、¶p＜0.05 vs 各群の試験開始時、†p＜0.05 vs 各群の 4 か月齢。

2. 筋力、身体活動量、筋重量（図 1、2）

体重補正筋力は、試験開始時では、eNOS-Cont 群、eNOS-Ex 群で、WT-Cont 群、WT-Ex 群と比較し、有意に低値であったが、その後、WT マウスでは、体重補正筋力が減少し、eNOS Ko マウスとの間に有意差が認められなくなった。eNOS Ko マウスでは、経過中筋力の有意な変化は認められなかったが、eNOS -Ex 群は増加傾向を示し（p＝0.05）、5 か月齢では eNOS-Cont 群と比較し、高い傾向であった（p＝0.09）（図 1a）。今回の運動プロトコールは、野生型マウスの筋力を増加させるほどの強度ではなかったが、予想に反して eNOS 欠損によって血管内皮機能が低下しているマウスでは、筋力を増加させる傾向にあったことから、血管内皮機能低下は、運動による筋力増加を抑制しないことが示された。血管内皮機能が低下している動脈硬化を認める高齢者であっても運動によりサルコペニアが抑制される可能性がある。今後、運動による eNOS 非依存的な筋力増加のメカニズムを明らかにしていく必要がある。

身体活動量は、4 群間で有意差を認めなかったが、eNOS-Cont 群では、試験開始時と比較し 5 か月齢で有意に増加した（p＜0.05）（図 1b）。eNOS 欠損による血管内皮機能低下や習慣的走運動は、身体活動量へ影響しない結果となったが、個体間のばらつきが多かったことから、さらに個体数を増やして検討する必要がある。

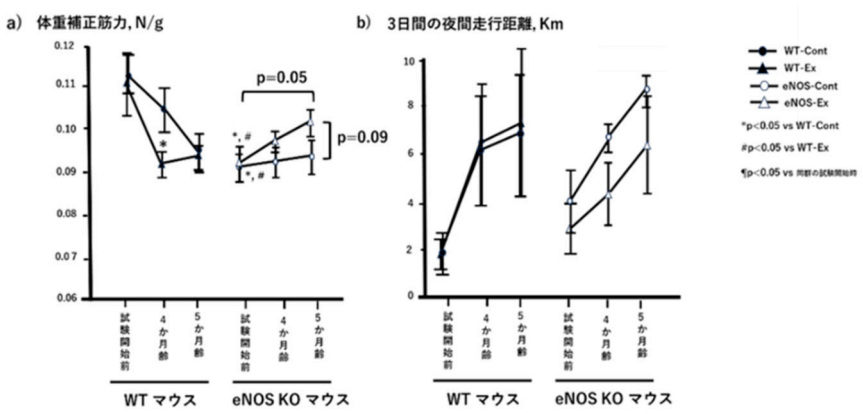


図 1. 体重補正筋力、3 日間の夜間走行距離

a) 体重補正筋力。

b) 3日間の夜間走行距離。

Kruskal-Wallis test で一元配置分散分析後、Mann-Whitney U 検定で群間比較。

群内比較は、Friedman 検定後に、Dunn 検定。

*p＜0.05 vs WT-Cont、#p＜0.05 vs WT-Ex、¶ p＜0.05 vs 各群の試験開始時。

5 か月齢の体重補正筋重量は、eNOS-Cont 群では、WT-Cont 群および WT-Ex 群と比較し腓腹筋、前脛骨筋、長趾伸筋において有意に低値であった（p＜0.05）。eNOS-Ex 群では、WT-Cont 群および WT-Ex 群と比較し腓腹筋において、WT-Cont 群と比較し長趾伸筋において、有意に低値であったが（p＜0.05）、前脛骨筋においては、WT マウス群と有意差を認めなかった（図 2）。また、予想に反して、前脛骨筋では、eNOS-Ex 群が、eNOS-Cont 群より有意に高値であった（p＜0.05）（図 2）。一方で、足底筋およびヒラメ筋は、4 群間で有意差を認めなかった（図 2）。これらの結果より、eNOS 欠損は、一部の骨格筋重量の低下をきたすが、運動により、前脛骨筋の筋重量を増やすことが示された。運動は、血管内皮機能低下を認める状態であっても、筋重量を増加させる可能性があり、今後 eNOS 欠損下における運動の筋重量増加メカニズムの解明を行う。

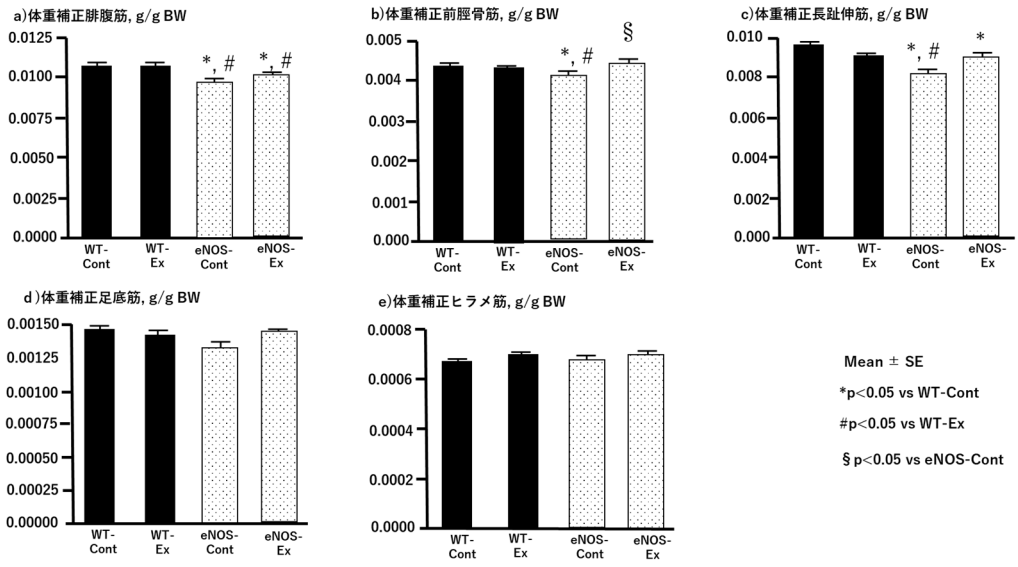


図 2. 骨格筋重量

a) 腓腹筋、b) 前脛骨筋、c) 長趾伸筋、d) 足底筋、e) ヒラメ筋。

Mean±SE。Kruskal-Wallis test 後に、Mann-Whitney U 検定。

*p＜0.05 vs WT-Cont、#p＜0.05 vs WT-Ex、§p＜0.05 vs eNOS-Cont。

3. 骨格筋の毛細血管血流の評価（図 3）

骨格筋の毛細血管血流速度は、4 群間で有意差を認めなかったが、WT マウスと比較し、eNOS Ko マウスでは、平均値が低値であった。毛細血管の血管径は、おおよそ 3～5μm であり、eNOS Ko マウスと WT マウスで同程度であったことから、毛細血管内の血流量については、両マウスで同程度であると想定された。

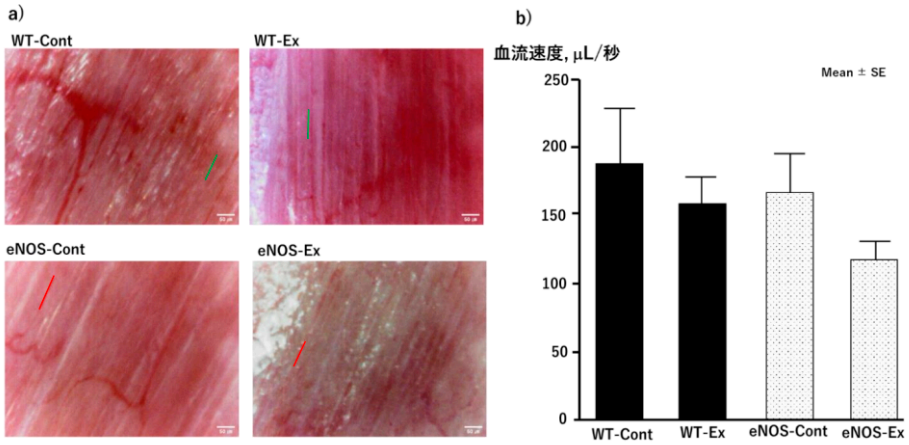


図 3. 骨格筋の毛細血管と血流速度

a）骨格筋の毛細血管画像（WT-Cont 群、WT-Ex 群、eNOS-Cont 群、eNOS-Ex 群）。スケールバー：50μm。

b）血流速度。a）画像内の緑線（WT-Cont 群、WT-Ex 群）、赤線（eNOS-Cont 群、eNOS-Ex 群）部分における血流速度。Kruskal-Wallis test の一元配置分散分析で p＝0.1675。

4. 尿アルブミン、尿 KIM-1

尿アルブミンは、eNOS Ko マウスおよび WT マウスにおいて、試験開始時と比較し、4 か月齢および 5 か月齢で有意に増加した（$p<0.05$）。また、eNOS Ko マウスでは、WT マウスと比較し、尿アルブミンが、試験開始時、4 か月齢および 5 か月齢において、有意に高値であったが（$p<0.05$）、両マウスの運動群と非運動群の群間に有意差は認められなかった。尿 KIM-1 排泄量は、eNOS Ko マウスおよび WT マウスにおいて、観察期間中に尿 KIM-1 の有意な増加は認めなかった。eNOS-Cont 群および eNOS-Ex 群は、試験開始時において、WT-Ex 群と比較し有意に尿 KIM-1 が高値であったが（$p<0.05$）、4 か月齢および 5 か月齢の 4 群間では、有意差を認めなかった。これらの結果から、本研究では、運動による腎臓への好影響は認められなかった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、聖マリアンナ医科大学解剖学（機能組織）の井上一歩、星野誠子、赤木嵩将、聖マリアンナ医科大学腎臓高血圧内科の柴垣有吾、片山きみえ、浅野純子である。

文　献

1) Kotake H, Ogura Y, Yamada S, Inoue K, Watanabe S, Ichikawa D, Sugaya T, Ohata K, Natsuki Y, Hoshino S, Watanabe M, Kimura K, Shibagaki Y, Kamijo-Ikemori A. Mechanism for exercise-mediated prevention against muscle wasting on extensor digitorum longus muscle in Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. J Physiol Sci. 2023 Apr 4;73(1):5. PMID: 37016292 DOI: 10.1186/s12576-023-00865-5

2) Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, Scherrer U. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. Circulation. 2001 Jul 17;104(3):342-5. PMID: 11457755 DOI: 10.1161/01.cir.104.3.342

3) Momken I, Lechene P, Ventura-Clapier R, Veksler V. Voluntary physical activity alterations in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Aug;287(2):H914-20. PMID: 15277206 DOI: 10.1152/ajpheart.00651.2003

4) Kosaki K, Sugaya T, Ohata K, Tanabe J, Hoshino S, Inoue K, Kimura K, Maeda S, Shibagaki Y, Kamijo-Ikemori A. Renoprotective effects of voluntary running exercise training on aldosterone-induced renal injury in human L-FABP chromosomal transgenic mice. Hypertens Res. 2019 Oct;42(10):1518-1527. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31168059 DOI: 10.1038/s41440-019-0273-z

5) Broom DR, Batterham RL, King JA, Stensel DJ. Influence of resistance and aerobic exercise on hunger, circulating levels of acylated ghrelin, and peptide YY in healthy males. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009 Jan;296(1):R29-35. PMID: 18987287 DOI: 10.1152/ajpregu.90706.2008