

骨格筋損傷にともなう毛細血管の新生について

中村 文香

Angiogenesis accompanied by skeletal muscle injury

Ayaka NAKAMURA

1. はじめに

身体組織は、血液が酸素や栄養分を供給し、二酸化炭素や老廃物を運び去ることで機能することができる。こうした物質のやりとりを組織と直接行っているのが毛細血管である。骨格筋において毛細血管は筋線維の間を縫うようにして存在し、運動する上で非常に重要な役割を果たしている。骨格筋が運動中の事故やケガによって損傷した場合には毛細血管はともに損傷する。骨格筋の損傷は、パフォーマンスの低下につながるため、早期回復が望まれる。骨格筋にとって重要な役割を担っている毛細血管の損傷からの新生（再生）は、骨格筋自体の早期回復にも必要不可欠であり、筋損傷後の毛細血管新生について明らかにすることは、非常に有意義である。

毛細血管は、単層の血管内皮細胞で構成され、2～3個の内皮細胞が互いに接し、管腔を形成している。血管内皮細胞は、毛細血管新生の中心となり、基底膜の分解、遊走、増殖、管腔形成という過程を経て血管新生を行う⁸⁾。過去に筋損傷後の血管内皮細胞の経時的変化を蛍光免疫抗体染色を用いて観察・分析した結果、損傷が最も進む挫滅3日後に血管内皮細胞の増殖がみられ、5日後にピークとなり、その後増殖性は減少することを明らかにした。

こういった血管内皮細胞の血管新生時の働きは、血管新生を促す遺伝子によって引き起こされる。代表的な遺伝子として知られるのが、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF）である。VEGFは、血管新生の促進だけでなく、損傷した筋線維に発現することや、損傷筋において筋線維直径や再生を表す中心核数を増加させることが報告²⁾されており、筋損傷後の動態につ

いて注目されている。

そこで本研究では、運動性筋損傷モデルとして筋に挫滅損傷を惹起させ、蛍光免疫抗体染色による筋切片の観察・分析に加えて、ウエスタンブロッティングによるタンパク質定量を行い、血管内皮細胞、血管内皮増殖因子の筋損傷後の経時的変化を組織化学的、生化学的に観察することで、骨格筋損傷後の回復にともなう毛細血管の新生について明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1 挫滅損傷

実験動物として、5週齢のFischer344系雌性ラット15匹を用いた。被験筋はヒラメ筋（Soleus: SOL）とし、麻酔下で皮膚切開し、筋を露出させ、アキレス腱移行部から4～5mmの筋腹部を先端幅約1mmのピンセットで強くはさみ、5秒間圧迫することで挫滅損傷（crush）を惹起した。なお、挫滅損傷は右脚のみとし、左脚は脚皮膚切開のみの対照群（cont）とした。挫滅損傷を施した実験日を0日とし、1日後（1st day）、3日後（3rd day）、5日後（5th day）、7日後（7th day）、15日後（15th day）にそれぞれ3匹ずつ、体重測定後、十分な麻酔下にて頸動脈を切断、屠殺脱血し、SOLを摘出した。摘出した筋は筋湿重量を測定し、液体窒素にて瞬間凍結させた。

2.2 蛍光免疫抗体染色 I

筋損傷後の血管内皮細胞の遊走を調べるため、血管内皮細胞の増殖がみられる損傷3日後と、減少がみられる7日後のSOLを用いて染色を行った。摘出した筋の損傷部、損傷部から2mm離れた部位（2mm部）及びcontの横断切片を作成した。切片の厚さは10μmとした。血管内皮細胞の

マーカーとして CD31, 筋紡質膜のマーカーとして Dystrophin, 核のマーカーとして DAPI 蛍光色素を用いた三重染色を行った. 1 サンプルあたり 4 か所の顕微鏡視野を任意に選択し, 観察画像を撮影した. 画像から, 筋線維 1 本あたりの毛細血管数を求めた.

染色Ⅱ

血管新生時の血管内皮細胞の働きを促すとされる VEGF の筋損傷後の局在, 発現の経時的変化を調べるために, 各日数の cont, crush の横断切片を作成し, CD31, VEGF, 筋核の三重染色を行った. 観察部位は crush にて挫滅損傷を施したアキレス腱から 4~5mm の筋腹部とした. 染色Ⅰ同様, 4 か所撮影し, 画像から筋線維 1 本あたりの VEGF 数を求めた.

2.3 ウエスタンブロッティング

筋損傷後の VEGF のタンパク質発現量を調べるために, ウエスタンブロッティングを行った. 各日数の cont, crush の SOL 横断切片 1mm 分をホモジナイズし, ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけタンパク質を分離させた. その後, セミドライ式ウエスタンブロッティングによりタンパク質を PVDF 膜に転写し, VEGF 抗体を用いて染色して得られたバンドの濃度から, VEGF の発現量を求めた. また, 内在性コントロールとして GAPDH (37kDa) の発現量を測定し, VEGF の発現量を GAPDH の発現量で除すことで規定化した. データの正確性を高めるために, 1 サンプルにつき 3 回定量した.

2.4 統計処理

測定した数値は, Microsoft office Excel 2010 のデータ分析ツールを用いて統計処理を行った. cont と crush, 部位毎の比較は T 検定を用い, 日数による比較には分散分析を用い, 全群間の差を一要因 (日数) とし, 多重比較を行った. 有意水準は 5% 未満 ($p<0.05$) とした.

3. 結果

3.1 血管内皮細胞 (毛細血管) 数

3 日後において毛細血管筋数は, 損傷部, 2mm 部とも cont と比較して有意に高値を示した. 特に 2mm 部は cont 値の約 2 倍を示し, 損傷部と

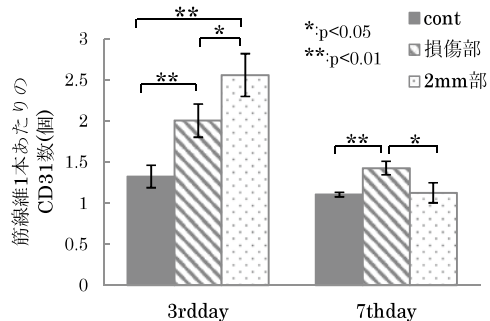


図1 毛細血管数 3日後, 7日後における部位比較

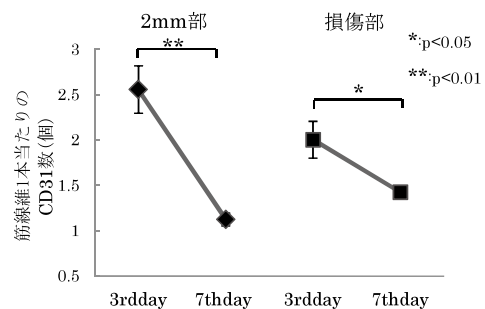


図2 毛細血管数 部位毎の経時的変化

比較しても有意な高値を示した (図1). 損傷3日後には, 損傷部から離れた部位でより血管内皮細胞が増殖することが明らかとなった. また, 両部位において3日後から有意な毛細血管数の減少がみられた (図2). 7日後においては, 2mm部の毛細血管数は, cont 値まで減少し, 両者間に差がなく, 損傷部が他の部位よりと比較して有意に高値を示した (図1).

3.2 血管内皮増殖因子 (VEGF) 発現数

通常では筋線維膜上の血管内皮細胞周辺に VEGF の発現がみられるが, 損傷3日後, 5日後においては損傷筋線維の細胞質にも VEGF の発現がみられた. 7日後には細胞質の VEGF 発現は減少し, 15日後にはほぼ発現は消失した.

筋線維 1 本あたりの VEGF 数は, 1 日後では crush 筋が cont と比較して有意に低値を示した. これは, 筋線維の損傷が激しく, 観察が困難であったためと考えられる. 3 日後の crush 筋では VEGF はピークとなる約 3 倍までの増加を示し, cont と比較しても有意に高値であった. それ以

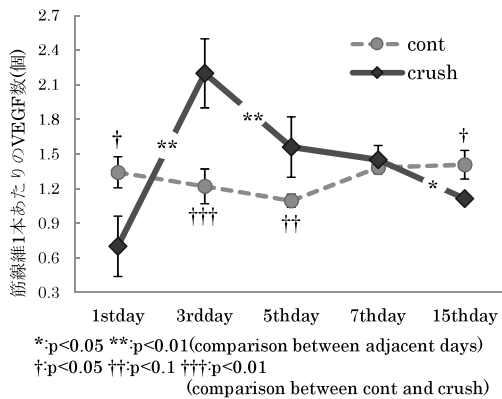


図3 VEGF 数の経時変化

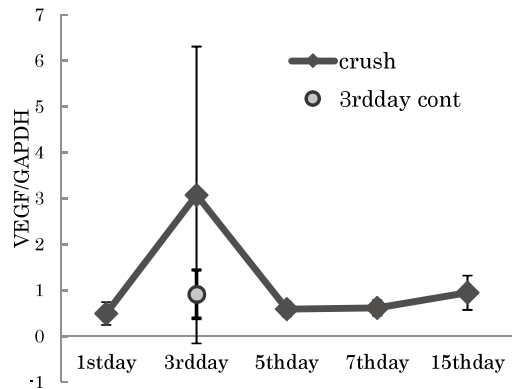
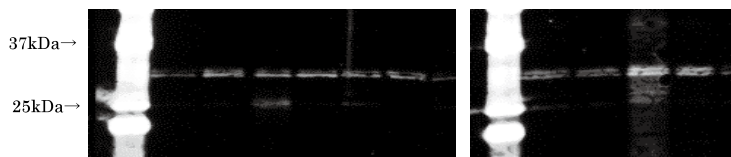


図4 crush における VEGF 発現量の経時変化

図5 ウェスタンブロッティングによって得られた VEGF のバンド
(左から分子量マーカー, 1st day cont, 1st day crush, 3rd day cont, 3rd day crush, 5th day cont, 5th day crush, 7th day cont, 7th day crush, 15th day cont, 15th day crush)

降減少し、7日後には cont との差はみられなくなった (図3)。

3.2 血管内皮増殖因子発現量

ウェスタンブロッティングにより、およそ 27kDa の位置に VEGF のバンドが検出された (図5)。VEGF/GAPDH 値は、各日数の cont と crush の比較、crush における日数間の比較のどちらにおいても、値のばらつきが大きく有意差がみられなかった。しかし、crush において損傷1日後から3日後にかけて約6倍の増加を示し、3日後から5日後にかけて減少がみられた (図4)。免疫染色でも同様の結果が得られたように、3日後は VEGF の発現が大きく変化する時期であるため、ばらつきが大きくなったと考えられた。

4. 考察

血管内皮細胞は筋損傷後、3日後までに損傷部だけでなく 2mm 部でも大幅な増殖をしていた。一方、7日後には 2mm 部の増殖はみられなくなり、損傷部でも減少していたことから、3日後から7日後にかけて血管内皮細胞が損傷部へ遊走

し、管腔形成が行われていた可能性が考えられた。

また、筆者の過去の研究において、挫滅損傷による筋自体の損傷は3日後にピークを示し、7日後には再生線維が確認され、15日後には形質的に回復することが分かっており、同様の研究結果も報告されている³⁾。よって、血管内皮細胞による毛細血管新生は筋の再生とほぼ同時に行われており、筋回復の一助となっていると考えられた。

VEGF は、損傷3日後に発現増強のピークがみられ、血管内皮細胞周辺及び筋線維細胞質に発現していた。7日後には cont との差が無くなるまで減少し、血管内皮細胞への血管新生促進は終息したと考えられた。血管内皮細胞は7日後には3日後と比較して大幅な減少がみられるものの、未だ損傷部において増殖がみられることから、VEGF が先行して増殖、減少し、それに続いて血管内皮細胞も増殖、減少しており、筋損傷後の血管新生においても強い関連性が示唆された。

VEGF は、低酸素状態時に発現が増強される低酸素誘導因子 (HIF-1 α) によって誘導され、活性化する^{7), 9)}。筋損傷後に HIF-1 α の発現が

みられる報告がされており⁵⁾、本研究においても、筋損傷に伴う毛細血管の損傷によって筋組織周辺が低酸素状態となり、HIF-1 α が発現増強され、VEGF の発現増強が促されたと考えられた。

VEGF 受容体には Flt-1, KDR/Flk-1, Flt-4 の3種類が存在し、そのうち Flt-1, KDR/Flk-1 は血管内皮細胞にも発現することが知られている。VEGF は血管内皮細胞の受容体に結合すると、受容体の2量体化と細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を引き起こし、血管内皮細胞における PI3K-Akt や RAF-MEK-ERK などのシグナル伝達を活性化させる^{4), 6)}。それによって、血管内皮細胞の増殖、遊走が引き起こされ、毛細血管新生が起きる。また、筋損傷後、Flt-1, KDR/Flk-1 が筋細胞膜、細胞質に検出されたという報告¹⁾があり、本研究において VEGF の発現が損傷筋線維にみられたことから、VEGF は筋自体の再生にも関与している可能性が考えられた。

以上のことから、筋損傷にともなう毛細血管の新生は次のような過程を経ると考えられた。筋損傷後、毛細血管損傷による酸素濃度の低下により HIF-1 α の発現が増強され、損傷3日後までに VEGF が増殖、活性化される。VEGF が VEGF 受容体に結合し、活性化したシグナル伝達系を介して血管内皮細胞の増殖、遊走が促され、毛細血管新生が進む。7日後には VEGF は減少し、血管内皮細胞増殖も終息にむかい、15日後には筋とともに毛細血管新生は完了すると考えられる。

参考文献

- 1) 我妻 玲, 小竹直樹, 荻田 太, 桐本 光, 田巻弘之: 骨格筋再生過程における VEGF, KDR/Flk-1, Flt-1 の発現 体力科学 Vol.53 No.6 p.681 2004
- 2) Cristina Borselli, Hannah Storrie, Frank Bevesch-Lee, Dmitry Shvartsman, Christine Cezar, Jeff W. Lichtman, Herman H. Vandenberg, and David J. Mooney: Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. PNAS Vol.107 No.8 p.3287-3292 2010
- 3) 後藤康文: 筋損傷による神経筋接合部の変化 平成 11 年 愛知教育大学 卒業論文
- 4) 暮石泰子, 中野 越: 血管新生と細胞内情報伝達 - Akt/eNOS signaling の役割 - 脈管学 Vol.43 No.10 p.591-594
- 5) 小野悠介, 泉水宏臣, 山口英峰, 永富良一: 骨格筋再生過程における低酸素誘導因子-1 α の発現 体力科学 Vol.3 No.6 p.674 2004
- 6) 佐藤靖史, 安部まゆみ: 血管の新生と再生における VEGF の役割 炎症・再生 Vol.22 No.3 2002
- 7) Semenza GL: HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J Appl Physiol 88 p.1474-1480 2000
- 8) 豊田淑江, 森田育男, 室田誠逸: 内皮細胞の機能と血管新生 日薬理誌 107 p.99-107 1996
- 9) Wenger RH: Mammalian oxygen sensing, signaling and gene regulation. J Exp Biol 203 p.1253-1263 2000

(指導教員 春日 規克)