



Title	Studies on the Development Process of Angiotensin II-Induced Skeletal Muscle Abnormalities and Role of NAD(P)H Oxidase 2
Author(s)	門口, 智泰
Description	配架番号 : 2140
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11658号
Issue Date	2015-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11658
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58972
Type	doctoral thesis
File Information	Tomoyasu_Kadoguchi.pdf



学位論文

Studies on the Development Process of Angiotensin II-Induced Skeletal Muscle Abnormalities and Role of NAD(P)H Oxidase 2

(アンジオテンシン II 誘発性骨格筋異常の進展過程
と NAD(P)H oxidase 2 が及ぼす役割の検討)

2015 月 3 月

北海道大学

門口 智泰

学位論文

Studies on the Development Process of Angiotensin II-Induced Skeletal Muscle Abnormalities and Role of NAD(P)H Oxidase 2

(アンジオテンシン II 誘発性骨格筋異常の進展過程
と NAD(P)H oxidase 2 が及ぼす役割の検討)

2015 月 3 月

北海道大学

門口 智泰

[博士学位論文]

アンジオテンシン II 誘発性骨格筋異常の進展過程と NAD(P)H oxidase 2 が及ぼす役割の検討

門口 智泰

北海道大学大学院医学研究科 循環病態内科学

[主任 筒井 裕之教授]

原稿総頁数 42

図表総数 21

連絡先 門口 智泰

電話番号 : 011-706-6973

Fax 番号 : 011-706-7874

電子メールアドレス : kadoguchi@med.hokudai.ac.jp

目次

1. 発表論文目録および学会発表目録	1
2. 緒言	2
3. 実験方法	7
3. 1. 研究 1：アンジオテンシン II（Ang II）投与による骨格筋異常および運動能力低下における経時的変化の検討	7
3. 1. 1. 動物モデル	7
3. 1. 2. 運動能力テスト	7
3. 1. 3. 血圧測定	8
3. 1. 4. 骨格筋タンパク抽出および濃度測定	8
3. 1. 5. 電気泳動	9
3. 1. 6. ウェスタンブロット法	10
3. 1. 7. 定量的 reverse transcriptase-polymerase chain reaction（RT-PCR）法	11
3. 1. 8. 骨格筋酵素活性	14
3. 1. 9. 骨格筋ミトコンドリアの単離	14
3. 1. 10. 電子伝達系複合体活性	15
3. 1. 11. 骨格筋における組織学的染色	15
3. 1. 12. 骨格筋組織におけるスーパーオキシド産生および NAD(P)H oxidase 活性	18
3. 2. 研究 2：血管拡張薬（ヒドララジン）投与による血圧正常化が運動能力に及ぼす影響の検討	19
3. 2. 1. 動物モデル	19
3. 2. 2. 運動能力テスト	19
3. 2. 3. 血圧測定	19
3. 3. 研究 3：Ang II 投与による骨格筋異常および運動能力低下における Nox2 の役割の検討	19
3. 3. 1. 動物モデル	19

3. 3. 2. 運動能力テスト	20
3. 3. 3. 血圧測定	20
3. 3. 4. 骨格筋タンパク抽出および濃度測定	20
3. 3. 5. 電気泳動	20
3. 3. 6. ウェスタンブロット法	20
3. 3. 7. 定量的 RT-PCR 法	20
3. 3. 8. 骨格筋ミトコンドリアの単離, 骨格筋酵素活性および電子伝達系複合 体活性	20
3. 3. 9. 骨格筋における組織学的染色	20
3. 3. 10. TUNEL 染色法	20
3. 3. 11. スーパーオキシド産生および NAD(P)H oxidase 活性	20
3. 4. 統計処理	20
4. 実験結果	21
4. 1. 研究 1: Ang II 投与による骨格筋異常および運動能力低下における経時的変 化の検討	21
4. 1. 1. 動物特性	21
4. 1. 2. 体重, 下肢骨格筋重量および骨格筋横断面積	22
4. 1. 3. ミトコンドリア機能 (TCA サイクルおよび電子伝達系) および骨格筋 線維型の評価	23
4. 1. 4. 骨格筋組織におけるタンパク合成および分解	24
4. 1. 5. 骨格筋におけるアポトーシス	25
4. 1. 6. 骨格筋組織におけるスーパーオキシド産生, NAD(P)H oxidase 活性 および Nox2 タンパク 発現	26
4. 1. 7. 運動能力	26
4. 2. 研究 2: ヒドララジンによる血圧正常化が運動能力に及ぼす影響の検討	27
4. 2. 1. 動物特性	27
4. 2. 2. 体重および下肢骨格筋重量	27

4. 2. 3. 運動能力	28
4. 3. 研究 3 : Ang II 投与による骨格筋異常および運動能力低下における Nox2 の 役割の検討	28
4. 3. 1. 動物特性	28
4. 3. 2. 体重, 下肢骨格筋重量および筋横断面積	29
4. 3. 3. ミトコンドリア機能 (TCA サイクルおよび電子伝達系)	30
4. 3. 4. 骨格筋組織におけるタンパク合成および分解に関わる因子の遺伝子発 現	30
4. 3. 5. 骨格筋におけるアポトーシス	31
4. 3. 6. 骨格筋組織におけるスーパーオキシド産生および NAD(P)H oxidase 活性	32
4. 3. 7. 運動能力	32
5. 考察	33
6. 総括および結論	37
7. 謝辞	37
8. 引用文献	39

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は、以下の雑誌に投稿中である。

Tomoyasu Kadoguchi, Shintaro Kinugawa, Shingo Takada, Arata Fukushima, Takaaki Furihata, Tsuneaki Homma, Yoshihiro Masaki, Mikito Nishikawa, Masashige Takahashi, Takashi Yokota, Shouji Matsushima, Koichi Okita, Hiroyuki Tsutsui. Angiotensin II could directly induced mitochondrial dysfunction, fiber type transition, and atrophy in the hind limb skeletal muscle from mice. **Experimental Physiol.**

本研究の一部は、以下の学会に発表した。

1) 門口智泰，絹川真太郎，福島 新，本間恒章，菅 唯志，高田真吾，正木芳弘，降旗高明，沖田孝一，筒井裕之．アンジオテンシン II は骨格筋異常に重要な役割を果たしている．第 19 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会，2013 年 7 月 13-14 日，仙台．

2) 門口智泰，絹川真太郎，菅 唯志，高田真吾，沖田孝一，筒井裕之．アンジオテンシン II 由来の酸化ストレスは骨格筋異常と関連する．第 68 回日本体力医学会大会，2013 年 9 月 21-23 日，東京．

3) Angiotensin II Directly Induces Mitochondrial Dysfunction and Atrophy in the Skeletal Muscle. Tomoyasu Kadoguchi, Shintaro Kinugawa, Arata Fukushima, Takaaki Furihata, Tadashi Suga, Shingo Takada, Wataru Mizushima, Masato Kudo, Junichi Matsumoto, Masaya Tsuda, Mikito Nishikawa, Takashi Yokota, Shouji Matsushima, Koichi Okita, Hiroyuki Tsutsui. 85th Scientific Session of American Heart Association. Nov 15-19, 2014, Chicago, USA.

2. 緒言

運動能力低下は、高齢者、糖尿病、腎不全および心不全を始めとした慢性疾患における主要な徴候である（図 1A, B）¹⁻⁴。また心不全患者においては、運動能力低下と生命予後に関連があることが示されている（図 1B）²。一般的に、運動能力低下の原因として、ミトコンドリア機能障害、骨格筋線維型シフト、萎縮およびアポトーシスを含む骨格筋異常が大きな役割を果たしていると考えられている⁵。実際、これら骨格筋異常は加齢や複数の病態下において幅広く観察されている^{6,7}。

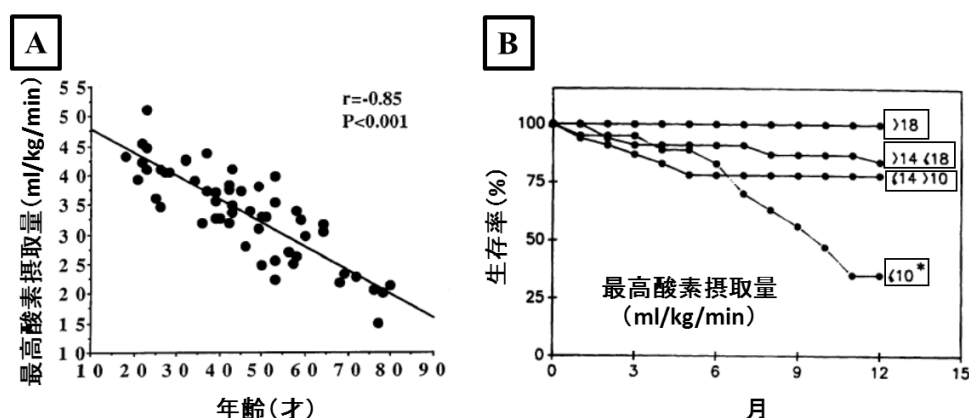


図 1. 加齢に伴う運動能力低下 (A) および心不全患者における運動能力低下と予後の関係 (B)

骨格筋異常は大別すると、持久力低下にかかわるミトコンドリア機能や数の異常や筋量・筋力低下にかかわるタンパク合成・分解バランス異常である。これらの骨格筋異常に関する分子機序は動物研究を中心に研究されている⁸。骨格筋におけるミトコンドリア機能や数を制御する分子として、AMP-activated protein kinase (AMPK), sirtuin family, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator-1 α (PGC-1 α)が中心的な役割を果たしている（図 2）。さらに、これらを制御する因子としては内皮型一酸化窒素合成酵素（endothelial nitric oxide synthase, eNOS）由来の一酸化窒素（nitric oxide, NO）や活性酸素種（reactive oxygen species, ROS）の関与が報告されている。また、骨格筋におけるタンパク合成には、insulin-like growth factor (IGF-1), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), Akt を介したシグナルが重要であることが知られている（図 3）。一方、タンパク分解にはユビキチンプロテアソーム系（ubiquitin proteasome system, UPS）が重要であるが、ユビキチン連結酵素（E3 リガーゼ）である Atrogin-1 および Muscle RING Finger-1 (MuRF-1) が多くの骨格筋萎縮に関わっていると考えられている（図 3）。Akt はタンパク合成の重要な分子であるとともに、Forkhead transcription factor

(FoxO) リン酸化による抑制を介してタンパク分解抑制にも関わる。また, nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) による E3 リガーゼの制御も様々な病態における骨格筋萎縮に関わっていることが知られ, ROS やサイトカインによって, これらが刺激されることも知られている。

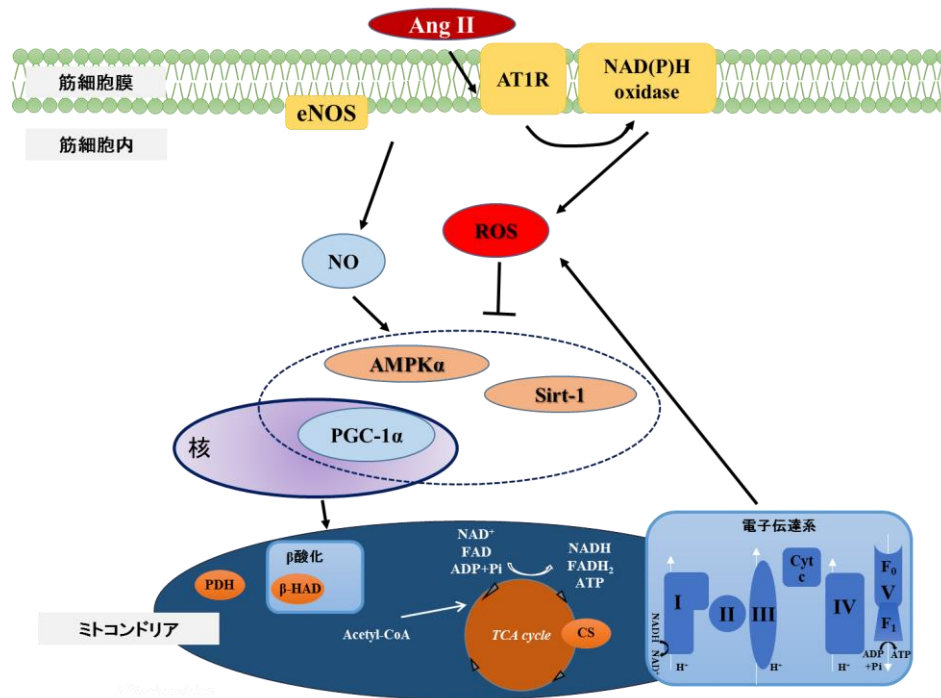


図 2. ミトコンドリア生合成における主要なシグナル伝達経路。

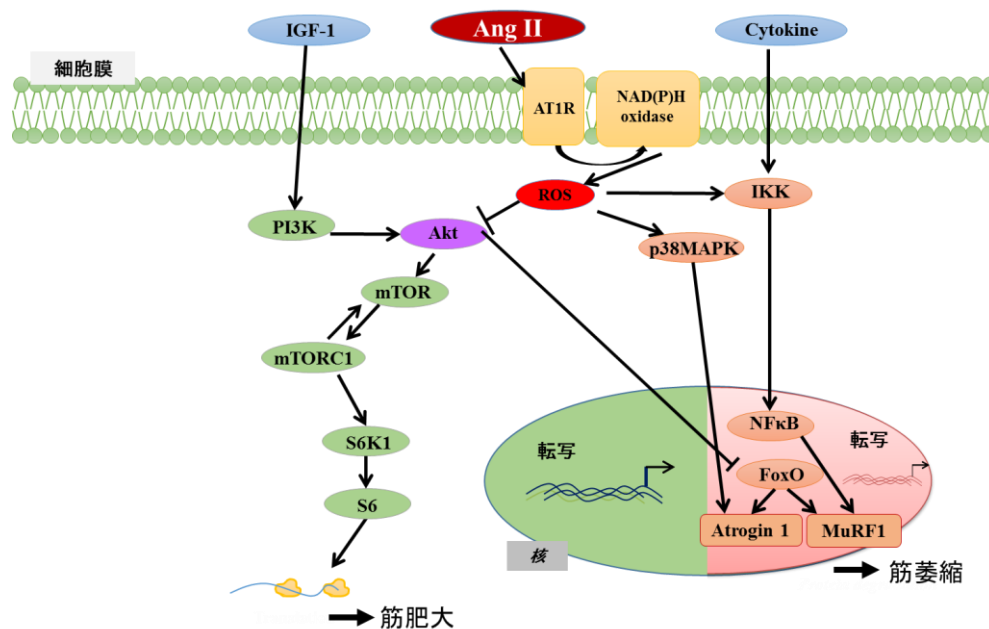


図 3. 主要なタンパク合成および分解におけるシグナル伝達経路

レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system, RAS) は, 生体の

恒常性維持に必要不可欠である。しかしながら、過剰な RAS の亢進は多くの病態発症および進展において中心的な役割を果たしていることが示されてきた⁹⁻¹¹。様々な病態において骨格筋異常が観察されていることを考えると、RAS のような全身性因子は共通の基盤としてそれらの進展と関連しているかもしれない。RAS の中心的な分子であるアンジオテンシン II (angiotensin II, Ang II) の増加は、心血管疾患および血管機能低下と関連することが示されてきた¹²。それゆえ、これらの知見は Ang II の増加が骨格筋異常の原因である可能性を示唆している。

我々は以前、血圧上昇を引き起こさない低用量 (50 ng/kg/min) の Ang II 投与が骨格筋ミトコンドリア機能障害を引き起こし、その結果として運動能力低下を引き起こすことを報告した¹³。さらに、Ang II 1 型受容体 (Ang II type I receptor, AT1R) 拮抗薬は、高脂肪食誘発性の 2 型糖尿病モデルの骨格筋ミトコンドリア機能障害および運動能力低下を改善することを示した¹⁰。加えて、Song らは血圧上昇を引き起こす高用量 (500 ng/kg/min) の Ang II 投与がアポトーシスおよび UPS を介したタンパク分解を引き起こすことを示した¹⁴。また他の研究においても同様に Ang II による骨格筋萎縮が示されている¹⁴⁻¹⁷。さらに、我々は心筋梗塞後心不全モデルマウスの骨格筋において、タンパク合成の重要因子である Akt のリン酸化が低下しており、血中の Ang II 増加が病態の原因であることを明らかにした^{18,19}。これらの結果は、Ang II が骨格筋異常の進展において中心的な役割を果たしている可能性を示唆する。しかしながら、1 つのモデルで同時に全ての骨格筋異常を包括的に研究した報告はなく、骨格筋異常の各々の表現型がどのようなに出現するか、それらの経時的変化は不明である。

ROS は、通常生体内において常時産生されているが、酸化と抗酸化作用の均衡が保持されることにより、ROS による様々な悪影響を受けない。しかしながら、病態下においてはそれらの均衡が破綻し過剰に産生される。過剰な ROS は DNA 変性およびタンパク変性など多くの細胞傷害を引き起こす¹²。NAD(P)H oxidase は、ROS であるスーパーオキシド (O_2^-) の主要な産生源であり、特に NAD(P)H oxidase 2 (Nox2) がその産生源として重要である²⁰⁻²²。実際、Nox2 の亢進が加齢や心不全を始めとする慢性疾患の病態発症および進展に重要な役割を果たしている²²⁻²⁴。また Ang II は、その受容体に結合した後、Nox2 を介して O_2^- を産生することが明らかにされている^{20,21}。これらの結果は、Ang II による Nox2 由来の O_2^- 産生亢進が骨格筋異常および運動能力低下において中心的な役割を果たしている可能性を示唆する。

したがって、本研究では、(1) 様々な病態で臨床的に観察される一連の骨格筋異常が Ang II により引き起こされるかどうかを経時的変化も含めて検討すること、(2) Nox2 欠損マウスにおいて骨格筋異常が抑制されるかどうか調

べることを目的とした.

本研究で使用する略語と記号

Ang II : angiotensin II ; アンジオテンシン II

H₂O₂ : hydrogen peroxide ; 過酸化水素

IGF-1 : insulin-like growth factor-1 ; インスリン様成長因子-1

IL-1 β : interleukin-1 β ; インターロイキン-1 β

IL-6 : interleukin-6 ; インターロイキン 6

MuRF-1 : Muscle RING Finger-1 ; 骨格筋特異的 RING 型ユビキチンリガーゼ

NADH : nicotinamide adenine dinucleotide : ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

ndufa2 : NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex ; NADH 脱水素酵素ユビキノン 1 α 複合体

O₂⁻ : superoxide ; スーパーオキシイド

PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha : PPAR- γ コアクチベータ-1 α

RAS : renin-angiotensin system ; レニン-アンジオテンシン系

ROS : reactive oxygen species ; 活性酸素種

Sirt-1 : Sirtuin-1 ; サーチュイン-1

Tfam : mitochondrial transcription factor A ; ミトコンドリア転写因子 A

TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling ; ターミナルトランスフェラーゼ dUTP ニック末端標識

TNF- α : tumor necrosis factor- α : 腫瘍壊死因子- α

UPS : ubiquitin proteasome system ; ユビキチンプロテオソーム系

uqcrc2 : ubiquinol-cytochrome c reductase complex ; ユビキノルサイトクローム c 還元酵素複合体

3. 実験方法

3. 1. 研究 1：アンジオテンシン II（Ang II）投与による骨格筋異常および運動能力低下における経時的变化の検討

3. 1. 1. 動物モデル

本研究に使用した雄性 10-12 週齢 C57BL/6J マウスは株式会社ホクドーから購入し、本学大学院医学研究科付属動物実験施設にて 12 時間明暗周期の環境下で飼育した。なお、全ての動物実験手技並びに飼育保管は、「北海道大学動物実験に関する規定」に沿って実施した。

Ang II (Sigma-Aldrich, USA) は、皮下に植え込んだ浸透圧ミニポンプ (Alzet 2004, Alzet Corp, Cupertino, CA) を用い、1000 ng/kg/min の投与量で持続的に投与した。また Vehicle には生理食塩水 (Otsuka Chemical, Tokyo, Japan) を用いた。投与から 1 あるいは 4 週後に各々の解析を実施した。

3. 1. 2. 運動能力テスト

運動能力は、小動物用トレッドミル (Oxymax system 2, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) を用いた漸増負荷運動により持久運動能力を評価した (図 3)。トレッドミル上にマウスを置き 10 分間安静にさせた後、トレッドミル傾斜角度を 0 度とし、6 m/min の速度にてウォーミングアップ運動を 10 分間実施した。その後、トレッドミルの傾斜角度を 10 度に設定し、2 分毎に 2 m/min の速度を漸増的に増加した。運動中は、マウスが運動を中断しないようにトレッドミル後方に位置するショッカープレートで電気刺激を与えた。その際、最大の電気刺激を与え、10 秒以上その上で動かなくなった時点まで、疲労困憊と定義した。持久能力の指標として、走行時間 (Run time) と速度の積から走行距離 (Run distance) を算出した。また、マウスの体重を考慮した垂直方向の仕事量 (Work) (= 体重 × 重力加速度 × 垂直方向の走行距離) を算出した。

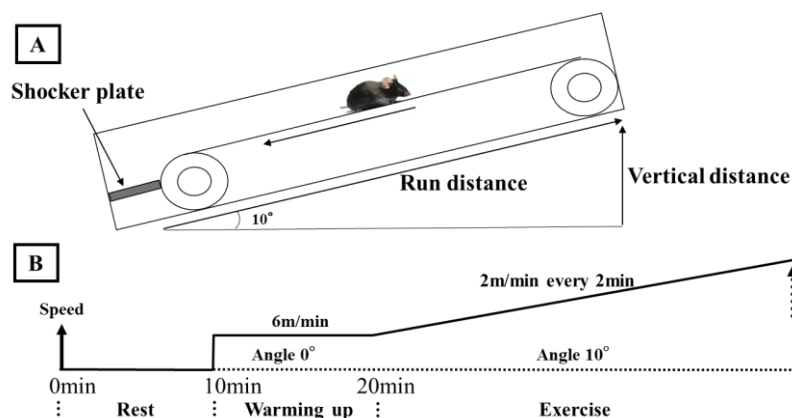


図 4. 小動物用トレッドミル (A) と運動プロトコル (B)

3. 1. 3. 血圧測定

安静時収縮期，拡張期，平均血圧および心拍数は，テールカフ法を用いて 3 回測定し（BP-98A, Softron, Tokyo, Japan），それらの平均を算出した．

3. 1. 4. 骨格筋タンパク抽出および濃度測定

×10 Cell lysis buffer（Cell signaling, Danvers, MA, USA）を蒸留水にて 10 倍希釈した．凍結保存した骨格筋サンプル 20 mg および調製液（×1 Cell lysis buffer）を 200 μ L, 1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride（Sigma-Aldrich, USA）, complete Mini（Roche, Indianapolis, IN, USA）をそれぞれエッペンチューブに，また凍結保存した骨格筋サンプル 20 mg 入れ，on ice にてホモジナイズした．その後，サンプルを 15,000 rpm で 20 分間遠心して上清を回収し，37°C で 30 分間インキュベート後，ウシ血清アルブミン（Bovine Serum Albumin, BSA）Standards（Thermo Scientific, Meridian Rd, Rockford, USA）を用い，ビスンコニン酸（Bicinchoninic acid, BCA）法にてタンパク濃度を算出した．

3. 1. 5. 電気泳動

泳動槽に、泳動 buffer および SDS (sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) -ポリアクリルアミドゲルを用意した。サンプルは、×1 cell lysis buffer および等量の×2 sample buffer (SDS と還元剤 2-Mercaptoetanol) で 20 µg/µL となるよう調製し、heat block (MULTI HEATER TYPE MH-36, WAKAMORI CO., LTD.) を用いて 100°C で 3 分間加温することでタンパクのジスルフィド結合をはずした。その後、ゲル内のレーンへ 20 µL 注入した。また、分子量マーカーである SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis ; PAGE) 用マーカー (Santa Cruz, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) およびカラーマーカー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を注入し、POWER PAC 300 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて 20 mA/ゲル (定電流) で標的タンパクの分子量に応じて電気泳動を行った。泳動 buffer, 分離ゲルおよび濃縮ゲルは以下に示す組成により調製した。

泳動 buffer	Volume
Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol Hydrochloride)	3.03 g
Glycine (Wako)	14.4 g
SDS (Sodium DodecylSulphate, Wako)	1 g
蒸留水	81.6 mL

分離ゲル (Total 約 15 mL, 2 枚分調製例)	Volume
30% Acrylamide mix (BIO-RAD Laboratories)	5 mL
蒸留水	2.3 mL
0.75 M Tris-HCl (pH8.8)	7.5 mL
10% SDS (Wako)	150 µL
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	12 µL

濃縮ゲル (Total 約 7.5 mL, 2 枚分調製例)	Volume
30% Acrylamide mix (BIO-RAD)	0.75 mL
蒸留水	2.9 mL
0.25 M Tris-HCl (pH6.8)	3.75 mL
10% SDS	75 µL
TEMED	6 µL

3. 1. 6. ウェスタンブロット法

以下の手順で、転写および抗原抗体反応を実施した．

- 1) SDS-PAGE で分離後，ゲルをポリフッ化ビニリデン膜（polyvinylidene fluoride ; PVDF）（Trans-Blot Turbo™, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）上に乗せ，Trans-Blot Turbo™ Transfer System（Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA）を用いてメンブレンへタンパクを転写した．
- 2) メンブレンを 0.1% Tween-TBS (Tris-buffered saline) (10% Tween, 25 mM TBS pH 7.4, 蒸留水) で洗浄後，3% スキムミルク（Morinaga Milk Industry, Kanagawa, Japan）あるいは 3% BSA（Nakalai Tesque, Kyoto, Japan）にて 1 時間ブロッキング処理した．
- 3) 0.1% Tween-TBS で 20 分間 × 3 回洗浄後，標的タンパクの一次抗体を抗体希釈液 (5% スキムミルクあるいは BSA 含有 0.1% Tween-TBS) に溶解し，それにメンブレンを浸し，4°C overnight の条件で反応させた．
- 4) 1 次抗体反応後，0.1% Tween-TBS にて 20 分間 × 3 回洗浄し，2 次抗体反応 (0.1% Tween-TBS) を 1 時間実施，その後 0.1% Tween-TBS にて 20 分間 × 3 回洗浄を行った．以下に使用した 1 次抗体を示す．

phosphor-Akt (Ser ⁴⁷³)	Cell signaling
Akt	Cell signaling
phosphor-p70S6K (Thr ³⁸⁹)	Cell signaling
p70S6K	Santa Cruz
Cleaved Caspase-3	Cell signaling
MuRF-1	Santa Cruz
Atrogin-1	Santa Cruz
Nox2	BD biosciences
GAPDH	Cell signaling

- 5) ECL Western Blotting Detection System によりメンブレンを化学発光させバンドを検出した．バンドのシグナルが弱い場合は，ECL Prime Western Blotting Detection System（いずれも GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom）により化学発光強度を上げた．
- 6) 可視化されたバンドは，画像解析ソフト（Image J, NIH）を用いて定量した．内在性コントロールには，GAPDH (Cell signaling, Danvers, MA, USA)，リン酸化タンパクにおいては，それに対応したタンパクの総量を用い，標的タンパクの発現量を標準化した．2 次抗体には horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体または HRP 標識抗マウス免疫グロブリン抗体（Santa Cruz, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA）を用いた．

3. 1. 7. 定量的 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

定量的 RT-PCR 法は以下の手順で、RNA (ribonucleic acid) 抽出、逆転写、PCR を行った。

RNA 抽出

RNA 抽出には QuickGene-810 (FujiFilm, Tokyo, Japan) を用いた。

- 1) 2.5% wt/vol, 8 μ L/g の 2, 2, 2-トリブロモエタノールの腹腔内投与による十分な深麻酔下でマウスを屠殺し、下肢骨格筋を迅速に摘出し、RNA later (Life technologies, Tokyo, Japan) に一晩浸した。
- 2) 組織をハサミで 1.5~2 mm 角のブロック状に整え、組織重量 15 mg を測り取り、5 μ L の 2-メルカプトエタノール含有 lysis buffer 500 μ L の入ったチューブに移した。ボールミル型ホモジナイザーでホモジナイズを行うため各チューブにはあらかじめ 5 mm ϕ のジルコニアボールを数個入れた。
- 3) 組織は Micro Smash MS-100 (TOMY SEIKO CO., Tokyo, Japan) を用い、毎分 3,800 回転 300 秒で 4 回 (各インターバルは 20 秒) ホモジナイズした。
- 4) 組織破片を分離除去するため $\geq 17,000 g$ で 3 分間、室温で遠心した。その後、底に沈んだ組織破片を吸い込まないように注意して、ホモジネート上清 350 μ L を新しい 1.5 mL マイクロチューブに移した。
- 5) Solubilization buffer を 175 μ L 添加し、最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行い、遠心分離器で数秒間スピンドウンし、マイクロチューブの蓋や壁に付着したサンプル液を収集した。
- 6) 特級エタノール (>99%) (Wako Chemical, Tokyo, Japan) を 175 μ L 添加し再び最大回転数で 15 秒間ボルテックスを行い、遠心分離器で数秒間スピンドウンしてマイクロチューブの蓋や壁に付着した液を収集した。
- 7) 抽出液完成後、QuickGene-810 を用いて RNA を抽出した。
- 8) 調整した抽出液を全量カートリッジへ添加した。
- 9) 数分後、RNase-Free DNase set (QIAGEN, Hilden, Germany) を添加して DNase 処理を行い、total RNA を回収した。
- 10) Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop, Peqlab, Erlangen, Germany) を用いて RNA 量を測定した。RNA の純正は、260/280 および 260/230 の比から確認した。RNA の純正は、一貫して A260/280 が 1.8-2.0 の間であった (data not shown)。

逆転写

High capacity cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) reverse transcription キット (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、以下の手順で RNA から cDNA を合成した。全ての操作を氷上で行った。

- 1) 逆転写後の cDNA 濃度が 100 ng/ μ L となるように、各サンプルの Total RNA を 1 μ g/10 μ L に 調製した。
- 2) 総量で 10 μ L の $\times 2$ Reverse Transcription (RT) Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA) を以下の構成で調製し、各々のウェルに添加した。

Component	Volume/Well (μ L)
$\times 10$ RT Buffer	2.0
$\times 25$ dNTP Mix (100 mM)	0.8
$\times 10$ RT Random Primers	2.0
Multiscribe TM Reverse Transcriptase	1.0
RNase Inhibitor	1.0
Nuclease-free H ₂ O	3.2
総量	10.0

- 3) 10 μ L の RNA サンプルを各ウェルに加え 2 回ピペッティング行い良く混合させた後、スピンドウンさせ空胞を除去した。
- 4) 逆転写反応は、以下の Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) の設定で行った。

Step 1	25°C 10 分
Step 2	37°C 120 分
Step 3	85°C 5 秒
Step 4	4 °C ∞

定量的 RT-PCR

標的遺伝子の cDNA を増幅させるため、TaqMan™ アッセイによる定量的 PCR を 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて以下の手順で行った。また、すべての primer は Applied Biosystems から購入した。詳細を以下に示す。

Muscle Ring Finger-1 (MuRF-1)	Mm01185221_m1
Atrogin-1	Mm00499523_m1
Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)	Mm00439560_m1
Interleukin-6 (IL-6)	Mm00446190_m1
Interleukin-1 β (IL-1 β)	Mm00434228_m1
Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	Mm00443260_m1
ndufa2 (ETC complex I component)	Mm00477755_g1
uqcrc2 (ETC complex III component)	Mm00445961_m1
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α)	Mm01208835_m1
Sirt-1	Mm01168521_ml
mitochondrial transcription factor A (Tfam)	Mm00447485_ml

1) 定量的 PCR Master Mix は、以下の構成で調製した。

Component	Volume/Well (μ L)
×2 TaqMan Universal Master Mix	12.5
TaqMan Gene Expression Assays	1.25
Control Assays (GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	1.25
Nuclease-free H ₂ O	5
総量	20

2) 調製した Master Mix を 20 μ L ずつ PCR ウェルに分注した。

3) Nuclease-free H₂O (GIBCO BRL, Life Technologies, Sweden) を用いて cDNA 溶液を 5 倍希釈し、各サンプル 5 μ L を PCR 用 96 Well (Applied Biosystems, Foster City, CA) に添加し、2 回ピペッティング行って混合させた後スピンドウンさせ空胞を除去した。

4) リアルタイム PCR 反応のサイクル条件は以下の設定で行った。

Step 1	50°C 2 分
Step 2	95°C 10 分
Step 3 (40 サイクル)	95°C 15 秒

	60°C 1 分
Step 4	4 °C ∞

- 1) 内部標準として GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、蛍光標識された PCR 産物の増幅曲線上の閾値線を元にサイクル数 (CT 値) を求め、 Δ CT 法を用いて遺伝子発現を定量化した。

3. 1. 8. 骨格筋酵素活性

骨格筋組織を phosphate buffer (20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 5 mM β -mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA, pH 7.4) を用いてホモジナイズし、800 g で 10 分間遠心分離を行った後、上澄み溶液を採取した。上澄み溶液のタンパク量は、BSA をスタンダードとした BCA 法で測定し、1 mg/mL に調製して解析に用いた。

トリカルボン酸 (Tricarboxylic acid cycle, TCA) サイクルの代表的な酵素であるクエン酸合成酵素 (Citrate synthase, CS) 活性の測定は、分光光度計 (SmartSpec 3000 spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた。CS 活性は、30 μL タンパク溶液に、反応溶液として 3.33 mM K_2HPO_4 (Wako Chemicals, Tokyo, Japan), 0.1 mM 5', 5'-Dithiobis 2- nitrobenzoic acid (Sigma-Aldrich, USA) および 0.1 mM acetyl-CoA を含む 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) (Wako Chemicals, Tokyo, Japan) 加え、さらに 0.5 mM oxaloacetate (Sigma-Aldrich, USA) を添加し、412 nm における吸光度の変化を 3 分間測定した。分光光度計から得られた吸光度の変化をタンパク量によって補正することにより活性量を算出した。

3. 1. 9. 骨格筋ミトコンドリアの単離

骨格筋を Isolation buffer (220mM D-maninitol, 70 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) (いずれも Wako chemicals, Tokyo, Japan) の入ったホモジナイズ専用チューブに入れ、12,000 rpm でホモジナイズした。その後、800 g で 10 分間遠心分離、上澄み溶液を採取し、さらに 10,000 g で 10 分間遠心分離を行い、単離ミトコンドリアを得た。単離ミトコンドリアは、Isolation buffer を用いて懸濁した。単離ミトコンドリアのタンパク濃度は、BSA をスタンダードとする BCA 法で測定した。また得られたタンパク濃度に基づき 1 mg/ml に調製し、以後の解析に用いた。

3. 1. 10. 電子伝達系複合体活性

複合体 I 活性 (NADH-ユビキノン還元) は, 30 μg のミトコンドリア単離溶液に, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Wako chemicals, Tokyo, Japan), 250 mM sucrose, 0.01 mM decyl-ubiquinone (Sigma-Aldrich, USA) および 2 mM potassium cyanide (KCN) (Wako chemicals, Tokyo, Japan) 含有の 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (Wako chemicals, Tokyo, Japan) を加え, 最後に 5 mM nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma-Aldrich, USA) を添加して反応を開始させた. 反応開始後, 340 nm にて 3 分間, 分光光度計 (SmartSpec 3000 spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用い吸光度の変化を測定した.

電子伝達系 (electron transport chain, ETC) 複合体 III 活性 (ユビキノール-シトクローム C 還元) は, I 測定時と同様, 30 μg ミトコンドリア単離溶液を用い, 1 mM EDTA (Wako chemicals, Tokyo, Japan), 250 mM sucrose (Wako chemicals, Tokyo, Japan), 2 mM KCN および 0.05 mM cytochrome C (Sigma-Aldrich, USA) 含有 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 加え, 0.05 mM decylbenzoquinol (Wako chemicals, Tokyo, Japan) を添加し反応を開始させた. 反応開始後, 3 分間, 550 nm にて吸光度の変化を測定した. これらの活性量は, 事前に測定したミトコンドリアタンパク量によって補正することにより算出した.

3. 1. 11. 骨格筋における組織学的染色

病理組織学的検討には, 骨格筋の凍結切片を用いた. マウスに麻酔を打った後, 直ちに腓腹筋およびヒラメ筋を摘出し, 液体窒素で冷却したイソペンタン (Wako chemicals, Tokyo, Japan) により凍結し作成した. その後, クリオスタット (Zeiss, Cambridge, UK) を用いて, 筋腹部より厚さ 8 μm の連続横断切片をシランコーティングスライドガラス (DAKO, Carpinteria, CA) に貼り付けた. 凍結切片を風乾後, 以下の方法により各々の染色を実施した.

HE 染色

- 1) 凍結切片をアセトン (Wako chemicals, Tokyo, Japan) およびエタノールを等量混合で調製した溶液に入れ, 3 分間浸透させた.
- 2) 蒸留水にて 3 分間洗浄した.
- 3) マイヤーヘマトキシリン (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) 溶液に 2 分間浸透させた.
- 4) 蒸留水にて 2 分間洗浄した.
- 5) 0.5% HCl (Wako chemicals, Tokyo, Japan) + 70%アルコールに数秒浸透させた.
- 6) 蒸留水にて 1 分間洗浄した.
- 7) 60~70%に希釈したエオジン (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) 溶液に浸した.
- 8) 100%エタノールにより脱水した.
- 9) キシレン (Wako chemicals, Tokyo, Japan) を用いて透徹し, マリノール (Muto Kagaku, Tokyo, Japan) 添加後, カバーガラス (Matsunami Glass, Kishiwada, Osaka) により封入した.

NADH 染色

骨格筋線維型の分類は, ミトコンドリア酸化酵素である NADH 脱水素酵素 (NADH) の染色を用い, 以下の方法により実施した.

- 1) 0.2 M Tris-HCl buffer (pH7.4), 1.5 mM nitroblue tetrazolium (Wako chemicals, Tokyo, Japan) および 1.5 mM β -NADH (Wako chemicals, Tokyo, Japan) で調製した溶液中に切片を入れ, 30 分間, 37°C でインキュベートした.
- 2) 60%および 90%アセトンで脱色した.
- 3) 蒸留水で洗浄後エタノールにより脱水, カバーガラスにより封入した.

NADH 染色により得られる結果は, 一般にミトコンドリア複合体 I の活性を反映するとされており, 染色像の濃い部分はミトコンドリア活性が高いことを示す. 実際, 染色強度が高強度の線維は活性が高い type I 線維, 染色強度が中強度 (細胞辺縁に色が染まる) のものを type IIa 線維, 低強度のものは type IIb 線維を示す. それらをカウントし, 各々のパーセンテージを評価した.

また, 筋横断面積 (Muscle cross sectional area) は, HE 染色を施した切片を用い, 各個体のサンプルの一横断面積あたり 50 個以上とし, Image J により算出した. なお, 小径線維は横断面積の計測から除外した.

TUNEL 染色法

In situ apoptosis detection kit (Takara Bio Inc, Otsu, Japan) を用いて terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) 法でアポトーシス細胞を検出した。染色は以下の手順で行った。

- 1) 親水化処理した。
- 2) Proteinase K (Takara Bio Inc) 400 $\mu\text{g/mL}$, 15 分, 室温で処理したのち, PBS (phosphate buffer saline) で 5 分間 $\times$ 3 回, 洗浄を行った。
- 3) 内因性ペルオキシダーゼの不活化処理のため, 3% 過酸化水素に室温で 5 分浸した後に, PBS で 5 分 $\times$ 3 回洗浄した。
- 4) 標識抗体による反応として TdT 酵素 5 μL と Labeling Safe Buffer 45 μL を混合した Labeling reaction mixture 50 μL をそれぞれのスライドガラス (DAKO, Carpinteria, CA) に添加し, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 90 分間インキュベートした。スライド上の組織乾燥防止のため, カバーガラスを用いた。反応終了後, PBS で 5 分 $\times$ 3 回洗浄した。
- 5) 70 μL の抗-FITC HRP 複合体をそれぞれのスライドガラスに添加し, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートさせた後, PBS で 5 分 $\times$ 3 回洗浄した。
- 6) DAB 液 (DAKO, Carpinteria, CA) 70 μL をそれぞれのスライドガラスに添加し, 室温で 3 分間反応させた後, 蒸留水で洗浄した。
- 7) 対比染色として, マイヤーヘマトキシリン (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) 液に 1 分浸した, 5 分間流水洗浄した。
- 8) 脱水, 透徹を行った後, 封入した。

3. 1. 12. 骨格筋組織におけるスーパーオキシド産生および NAD(P)H oxidase 活性

スーパーオキシド産生

- 1) 2.5%アバーチン 10 $\mu\text{L/g}$ 体重を腹腔内投与し，麻酔下で摘出した骨格筋を Krebs/Hepes buffer (pH7.2) 内で結合組織等を除去した後，組織重量を精秤した．
- 2) 骨格筋を Krebs/Hepes buffer (pH7.2) の入ったエッペンチューブに入れ，37°C で 10 分間加温した．上記 Buffer の組成は以下に示す．

119 mM NaCl	Wako
4.6 mM KCl	Wako
1.2 mM CaCl_2	Wako
0.4 mM KH_2PO_4	Wako
1 mM MgSO_4	Wako
0.15 mM Na_2HPO_4	Wako
25 mM NaHCO_3	Wako
5.5 mM glucose	Wako
20 mM Hepes	Wako

- 3) 骨格筋を 5 μM lucigenin を入れたエッペンチューブ内に移し，再度 10 分間 37°C で加温，その後ルミノメーター (AccuFLEXLumi 400, Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan) を用い，5 分間発光量を測定した．
- 4) スーパーオキシド (O_2^-) の阻害薬である Tiron を 10 mM 添加し，5 分間発光量を測定した．この化学発光が O_2^- に由来するかどうか確認するための作業である．骨格筋 O_2^- の産生量は，Tiron を添加する前後の発光量の差を単位時間と組織湿重量で補正することによって算出した．

骨格筋組織における NAD(P)H oxidase 活性

- 1) 骨格筋を Krebs/Hepes buffer (O_2^- 産生測定時に使用したものと同じ) を用いてホモジネートし, 10,000 g で 20 分間遠心分離した.
- 2) 遠心分離後, BSA をスタンダードとする BCA 法を用い, 上澄み溶液のタンパク量を測定し, 1 mg/mL に調製した.
- 3) エッペンチューブ内に, 5 μ M lucigenin 溶液およびタンパク溶液の 100 μ L (100 μ g) を入れ懸濁し, さらに 100 μ M NADPH を添加した後, ルミノメーターで 3 分間発光量を測定した.
- 4) これにより得られた発光量を, 5 μ M lucigenin 溶液自体の発光量 (バックグラウンド信号) で除した値を単位時間およびタンパク濃度で補正することにより, NAD(P)H オキシターゼ活性とした.

3. 2. 研究 2: 血管拡張薬 (ヒドララジン) 投与による血圧正常化が運動能力に及ぼす影響の検討

3. 2. 1. 動物モデル

本研究に使用した雄性 10-12 週齢 C57BL/6J マウスにおける購入手順および飼育条件は, 研究 1 の方法に準じて実施した.

Ang II の投与量および介入期間は, 研究 1 の方法に準じて実施した. ヒドララジンは, 750 mg/L の濃度で蒸留水にて溶解し, 飲水により投与した. 投与から 1 および 4 週後, 各々の解析を実施した.

3. 2. 2. 運動能力テスト

仕事量, 走行距離および走行時間は, 研究 1 の方法に準じて実施した.

3. 2. 3. 血圧測定

研究 1 の方法に準じて実施した.

3. 3. 研究 3: Ang II 投与による骨格筋異常および運動能力低下における Nox2 の役割の検討

3. 3. 1. 動物モデル

雄性 10-12 週齢 Nox2 ホモ欠損マウス (B6.129S-Cybb^{tm1Din}/J) は Jackson Laboratory (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) から購入した. 実験手技および飼育については, 研究方法 1-1 に準じて実施した.

3. 3. 2. 運動能力テスト

仕事量，走行距離および走行時間は，研究 1-1 の方法に準じて測定した．

3. 3. 3. 血圧測定

研究 1 の方法に準じて測定した．

3. 3. 4. 骨格筋タンパク抽出および濃度測定

研究 1 の方法に準じて測定した．

3. 3. 5. 電気泳動

研究 1 の方法に準じて測定した．

3. 3. 6. ウェスタンブロット法

研究 1 の方法に準じて測定した．

3. 3. 7. 定量的 RT-PCR 法

研究 1 の方法に準じて測定した．

3. 3. 8. 骨格筋ミトコンドリアの単離，骨格筋酵素活性および電子伝達系複合体活性

研究 1 の方法に準じて測定した．

3. 3. 9. 骨格筋における組織学的染色

HE 染色は，研究 1 の方法に準じて測定した．

3. 3. 10. TUNEL 染色法

研究 1 の方法に準じて実施した．

3. 3. 11. スーパーオキシド産生および NAD(P)H oxidase 活性

研究 1 の方法に準じて実施した．

3. 4. 統計処理

統計処理は，統計解析ソフトウェア SPSS 17.0 software (Chicago, IL) を用いて行った．各計測値は，平均値 ± 標準誤差で表した．条件間の平均値の差の検定は，一元配置分散分析を用いて行い，有意差が認められた場合に post hoc test として Tukey の多重比較法により検定した．なお，有意水準は危険率 0.05 未満とした．

4. 実験結果

4. 1. 研究 1 : Ang II 投与による骨格筋異常および運動能力低下における経時的変化の検討

4. 1. 1. 動物特性

表 1 に動物特性を示す. Ang II 投与 1 および 4 週後, 心重量, 収縮期血圧, 拡張期血圧および平均血圧は Vehicle 群に比較し有意に上昇した (表 1). 投与 1 および 4 週後の間に違いはなかった. また心拍数にも違いはなかった.

表 1. Ang II 投与 1 および 4 週後における心重量, 血圧および心拍数

	1 wk		4 wks	
	Vehicle	Ang II	Vehicle	Ang II
N	n = 10	n = 8	n = 10	n = 8
Heart weight (mg)	103 ± 1	121 ± 2*	112 ± 1	133 ± 3*
Systolic blood pressure (mmHg)	101 ± 1	158 ± 2*	104 ± 2	161 ± 5*
Diastolic blood pressure (mmHg)	59 ± 2	111 ± 3*	57 ± 4	109 ± 3*
Mean blood pressure (mmHg)	73 ± 1	129 ± 2*	71 ± 3	125 ± 5*
Heart rate (bpm)	682 ± 7	690 ± 12	677 ± 6	689 ± 3

平均 ± 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Vehicle. Ang II, angiotensin II.

4. 1. 2. 体重，下肢骨格筋重量および骨格筋横断面積

体重（図 5A），下肢骨格筋重量（図 5B）は，Ang II 投与 1 週後において低下傾向がみられ，一方，投与 4 週後においては有意に低下した（図 5A）．図 5C に HE 染色による代表的な筋横断面積の図を示す（図 5C）．定量評価した骨格筋横断面積は，Ang II 投与 4 週後において有意に低下した（図 5D）．

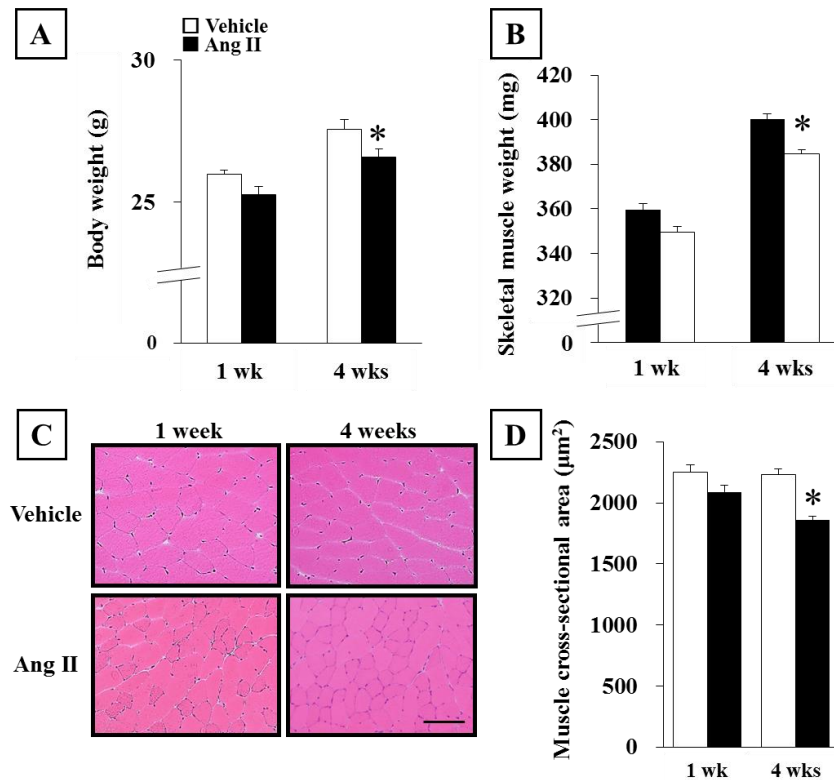


図 5. 体重，下肢骨格筋重量および筋横断面積．（A）体重および（B）下肢骨格筋重量．（C）HE 染色により得られた筋横断面積代表例．（D）HE 染色により定量評価した筋横断面積．（A）各群 $n = 8-10$ ；（B）各群 $n = 5-6$ ．平均 $\pm$ 標準誤差．* $P < 0.05$ vs. Vehicle.

4. 1. 3. ミトコンドリア機能（TCA サイクルおよび電子伝達系）および骨格筋線維型の評価

TCA サイクルの代表的な酵素である CS 活性は, Ang II 投与 1 週後で有意に低下し, 4 週後でも有意に低下したが更なる低下はなかった (図 6A). 電子伝達系である ETC 複合体活性 I および III も, Ang II 投与 1 および 4 週後において有意に低下し, CS 活性と同様の変化を示した (図 6B). 複合体活性 I および III にコードされている *ndufa2* および Cyt C の遺伝子発現は, *ndufa2* は違いがなかったが, Cyt C は Ang II 投与 1 および 4 週後において低下傾向を認めた (図 B). 図 6C に NADH 染色により骨格筋線維型を分類した代表的な図を示す (図 6C). 遅筋線維である type I 線維は, Ang II 投与 1 週後で有意に低下し, 4 週後では低下傾向がみられた. 一方, 速筋線維である type IIb 線維の割合は有意に増加した. 両者の中間の性質を持つ type IIa 線維には違いがなかった (図 6D). またミトコンドリア新生に関わる PGC-1 α , Sirt-1 および Tfam の遺伝子発現は, PGC-1 α では違いがなく, Sirt-1 は Ang II 投与 1 週後で有意に低下し, 4 週後では低下傾向を認めた. Tfam は Ang II 投与 1 および 4 週後において有意に低下した. (図 6E).

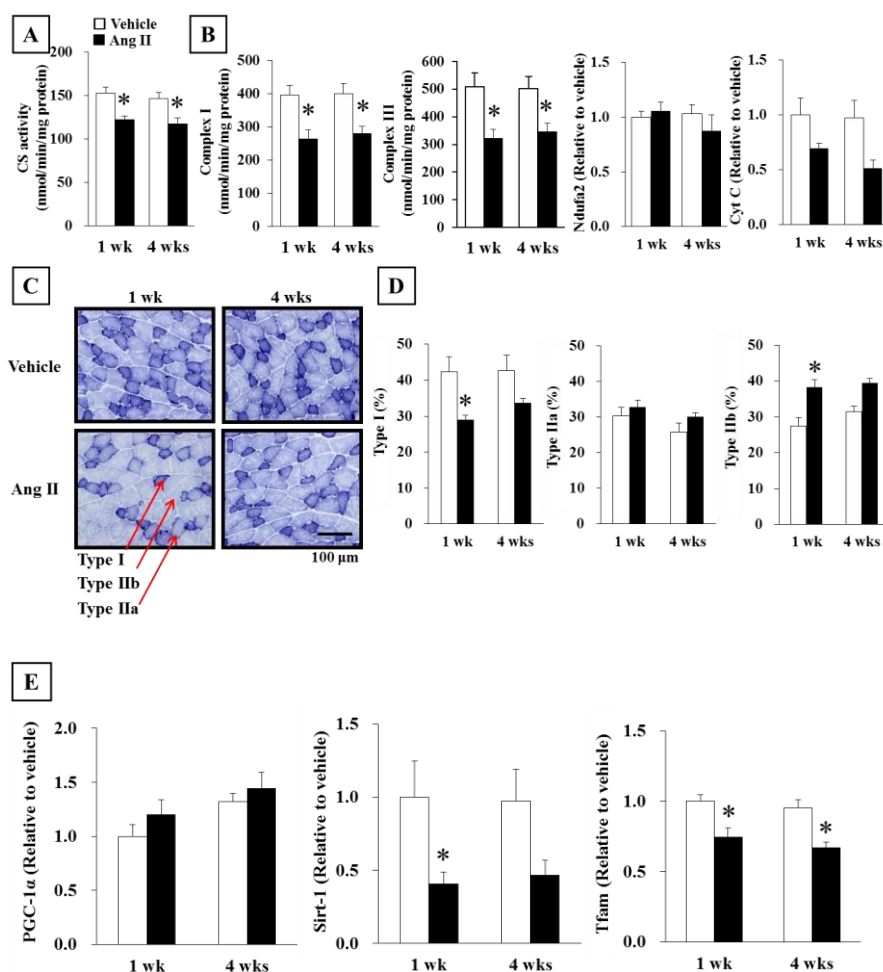


図 6. 骨格筋組織における CS 活性, 骨格筋組織より単離したミトコンドリア

における複合体活性 I, III, NADH 染色による骨格筋線維型評価. (A) 骨格筋組織における CS 活性. (B) 骨格筋単離ミトコンドリアにおける ETC 複合体活性 I および III, 複合体 I および III にコードされる遺伝子発現. (C) NADH 染色により得られた骨格筋線維型分類. (D) NADH 染色による骨格筋線維型の定量評価. (E) ミトコンドリア新生関連因子の遺伝子発現. 各群 $n = 6-8$. 平均 $\pm$ 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Vehicle.

4. 1. 4. 骨格筋組織におけるタンパク合成および分解

図 7A にタンパク合成および分解に関わる指標の代表的なバンドを示す (図 7A). タンパク合成に関わる Akt のリン酸化 (Ser473) および p70S6K のリン酸化 (Thr389) のタンパク発現は, Ang II 投与 4 週後において有意に低下した. 一方, タンパク分解の代表的な指標である MuRF-1, Atrogin-1 は有意に亢進した (図 7B), また IGF-1 の遺伝子発現は, Ang II 投与 1 および 4 週後において低下傾向を認めた. MuRF-1 および Atrogin-1 遺伝子発現は, タンパク発現と同様の結果を示した (図 7C).

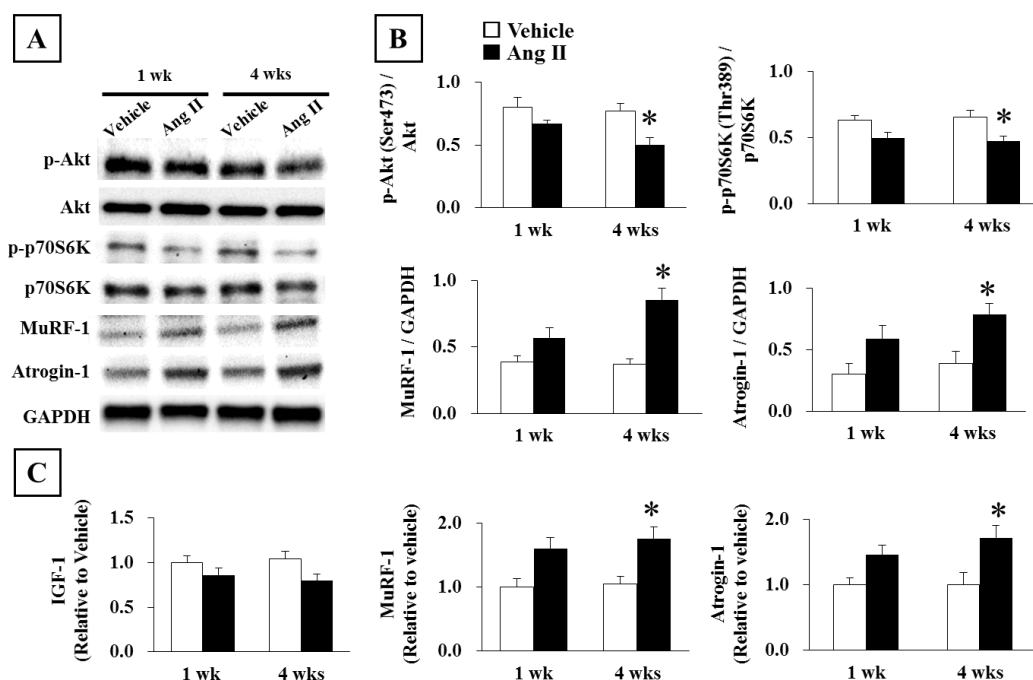


図 7. 骨格筋組織におけるタンパク合成および分解系の指標. (A) ウェスタンブロットにより検出された標的タンパクの代表的なバンド. (B) タンパク合成 (p-Akt, p-p70S6K) および分解に関わる主要なタンパク (MuRF-1, Atrogin-1) の定量評価. (C) タンパク合成および分解に関わる遺伝子の遺伝子発現 (IGF-1, MuRF-1, Atrogin-1). 各群 $n = 6-8$. 平均 $\pm$ 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Vehicle.

4. 1. 5. 骨格筋におけるアポトーシス

図 8A に TUNEL 染色により得られた代表的な図を示す (図 8A). TUNEL 陽性細胞数は, Ang II 投与 1 および 4 週後において有意に増加した (図 7B). また Cleaved caspase-3 も Ang II 投与 1 および 4 週後において有意に増加し, TUNEL 陽性細胞数と同様の結果であった (図 8C). また IL-1 β , IL-6 および TNF- α の遺伝子発現は Ang II 投与によって, 増加傾向があったが, 有意ではなかった (図 8D).

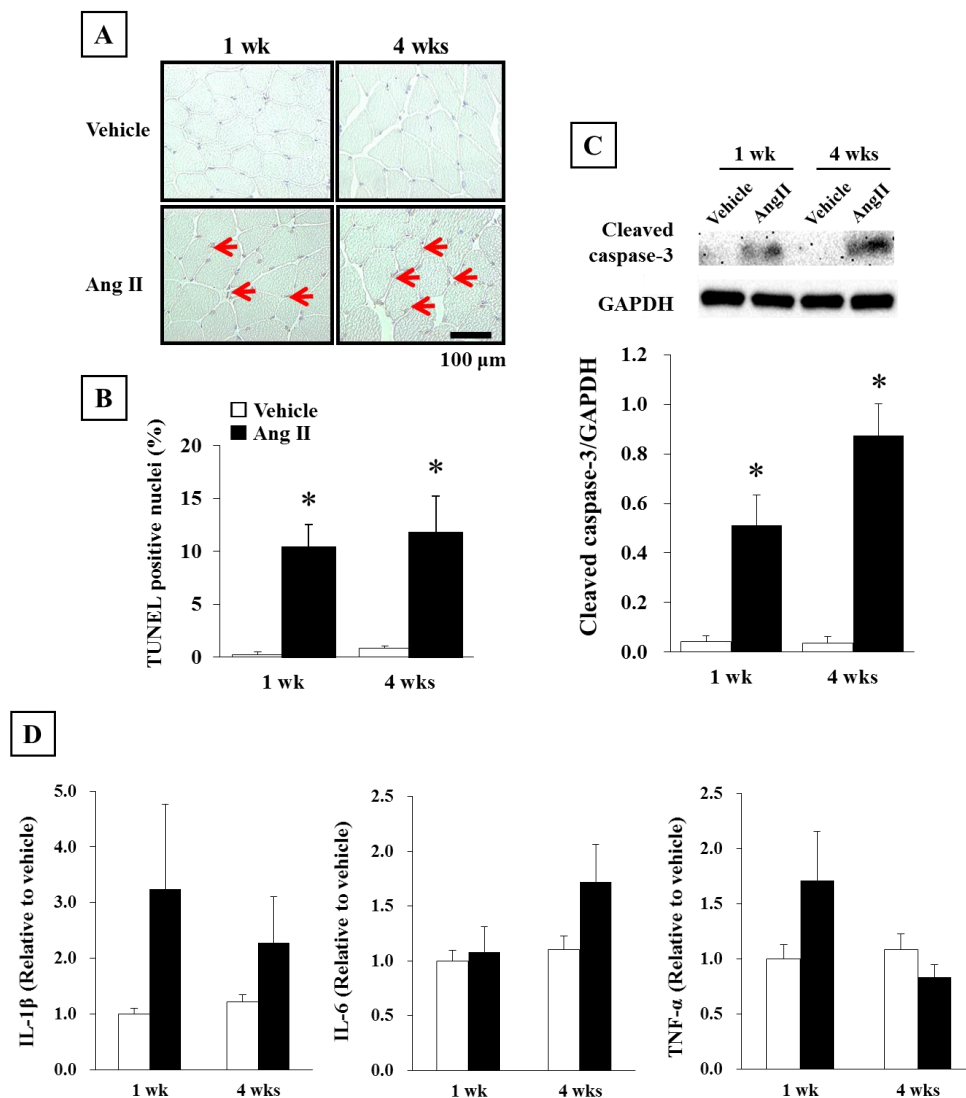


図 8. 骨格筋組織におけるアポトーシス. (A) TUNEL 染色により得られた代表的な図. 赤矢印は TUNEL 陽性細胞を示す. (B) TUNEL 陽性細胞数の定量評価. (C) Cleaved caspase-3 の代表的なバンドおよび定量評価. (D) 炎症性サイトカインの遺伝子発現. 各群 n = 6-8. 平均 $\pm$ 標準誤差. * P < 0.05 vs. Vehicle.

4. 1. 6. 骨格筋組織におけるスーパーオキシド産生，NAD(P)H oxidase 活性および Nox2 タンパク発現

スーパーオキシド産生および NAD(P)H oxidase 活性は，Ang II 投与 1 および 4 週後において有意に増加した．また Nox2 タンパク発現は，Ang II 投与 1 週後において有意に増加し，4 週後では増加傾向を認めた（図 9）．

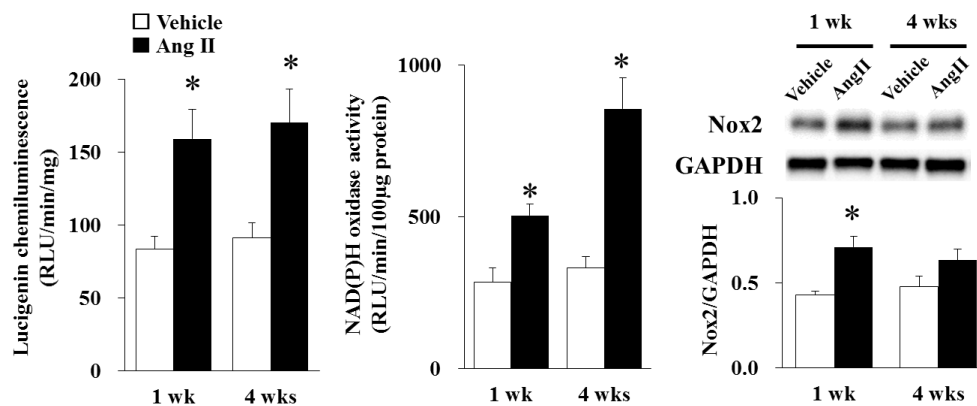


図 9. 骨格筋組織における O_2^- 産生，NAD(P)H oxidase 活性および Nox2 タンパク発現．骨格筋組織の O_2^- 産生および NAD(P)H oxidase 活性，Nox2 タンパクの代表的なバンドおよび定量評価．各群 $n = 6-8$ ．平均 $\pm$ 標準誤差．* $P < 0.05$ vs. Vehicle.

4. 1. 7. 運動能力

仕事量，走行時間および走行距離は，Ang II 投与 1 週後において低下傾向を認め，4 週後では有意に低下し，時間依存的な変化がみられた（図 10）．

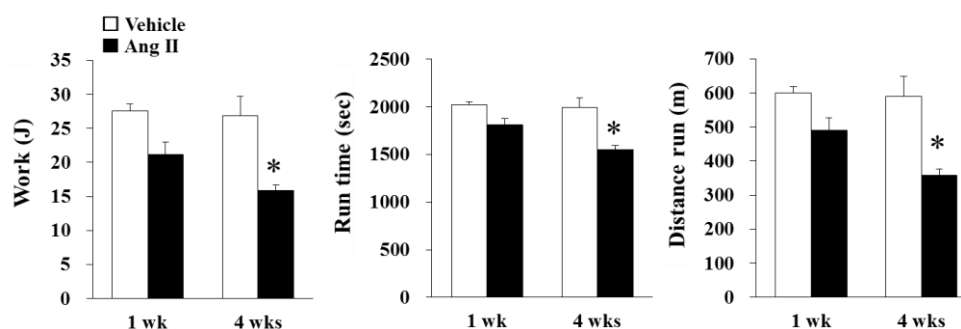


図 10. トレッドミルにより評価した仕事量，走行時間および走行距離．各群 $n = 8$ ．平均 $\pm$ 標準誤差．* $P < 0.05$ vs. Vehicle.

4. 2. 研究 2：ヒドララジンによる血圧正常化が運動能力に及ぼす影響の検討

4. 2. 1. 動物特性

表 2 に動物特性を示す (表 2). Ang II およびヒドララジン投与 1 および 4 週後における心重量, テールカフ法により測定した収縮期血圧, 拡張期血圧 および平均血圧は, Ang II 投与 1 および 4 週後において有意に増加したが, Hyd 投与により正常化した. 心拍数に違いはなかった.

表 2. ヒドララジン投与 1 および 4 週後における心重量, 血圧および心拍数

	1 wk		4 wks	
	Ang II	Ang II +Hyd	Ang II	Ang II +Hyd
N	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Heart weight (mg)	129 ± 6	115 ± 2	142 ± 5	127 ± 5
Systolic blood pressure (mmHg)	158 ± 2	111 ± 7*	163 ± 5	107 ± 2*
Diastolic blood pressure (mmHg)	111 ± 3	78 ± 8*	110 ± 5	71 ± 7*
Mean blood pressure (mmHg)	129 ± 8	88 ± 8*	122 ± 8	86 ± 8*
Heart rate (bpm)	690 ± 8	706 ± 22	691 ± 10	696 ± 6

平均 ± 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. Ang II. Hyd, Hydralazine.

4. 2. 2. 体重および下肢骨格筋重量

体重および下肢骨格筋重量は, ヒドララジン投与によって影響しなかった (図 11).

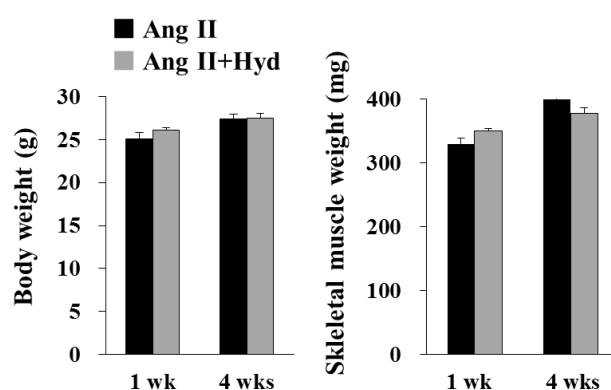


図 11. 体重および下肢骨格筋重量. (A) 体重および下肢骨格筋重量. 各群 n = 8. 平均 ± 標準誤差. Hyd, Hydralazine.

4. 2. 3. 運動能力

Ang II 投与マウスの仕事量，走行時間および走行距離は，ヒドララジン投与によって変化しなかった（図 12）。

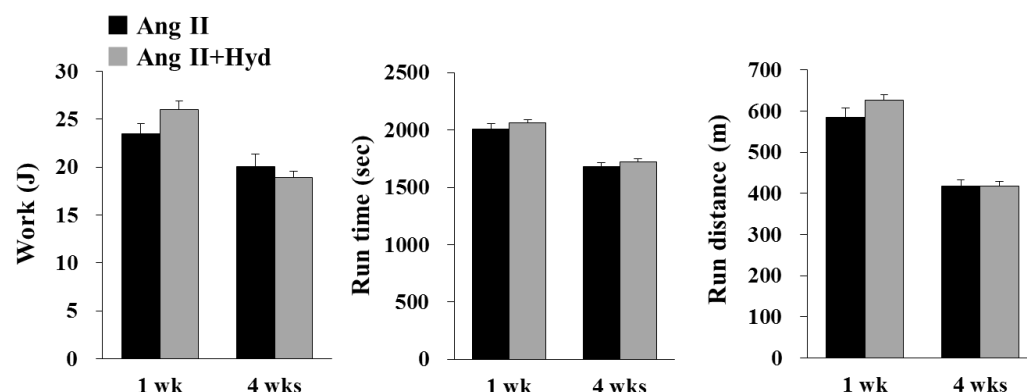


図 12. 仕事量，走行時間および走行距離．各群 $n = 8$ ．平均 $\pm$ 標準誤差．Hyd, Hydralazine.

4. 3. 研究 3: Ang II 投与による骨格筋異常および運動能力低下における Nox2 の役割の検討

4. 3. 1. 動物特性

表 3 に動物特性を示す（表 3）．心重量，収縮期血圧，拡張期血圧および平均血圧は，Ang II 投与群において WT + Vehicle に比較し有意に増加した．WT + Ang II 群と KO + Ang II 群の間には違いがなかった．

表 3. 心重量，血圧および心拍数

	WT +Vehicle	KO +Vehicle	WT +Ang II	KO +Ang II
N	n = 8	n = 6	n = 8	n = 6
Heart weight (mg)	105 $\pm$ 2	113 $\pm$ 3	138 $\pm$ 5*	155 $\pm$ 3*
Systolic blood pressure (mmHg)	102 $\pm$ 1	109 $\pm$ 3	149 $\pm$ 7*	153 $\pm$ 7*
Diastolic blood pressure (mmHg)	69 $\pm$ 2	87 $\pm$ 10	106 $\pm$ 4*	101 $\pm$ 6*
Mean blood pressure (mmHg)	79 $\pm$ 2	92 $\pm$ 3	121 $\pm$ 3*	119 $\pm$ 6*
Heart rate (bpm)	691 $\pm$ 14	688 $\pm$ 4	673 $\pm$ 23	678 $\pm$ 40

平均 $\pm$ 標準誤差．* $P < 0.05$ vs. WT + Vehicle.

4. 3. 2. 体重，下肢骨格筋重量および筋横断面積

体重，下肢骨格筋重量は，WT + Ang II 群が WT + Vehicle 群に比較して有意に低下し，KO + Ang II 群ではそれらの低下が有意に抑制された（図 13A）．図 13 B に HE 染色により得られた筋横断面積の代表的な図を示す（図 13B）．筋横断面積も体重および下肢骨格筋重量と同様の結果を得た（図 13C）．

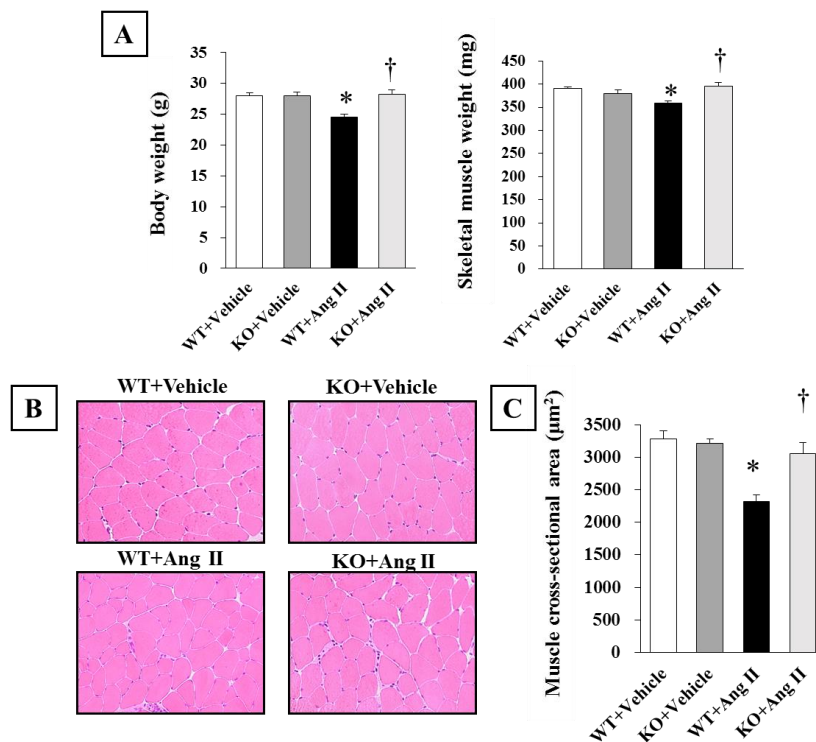


図 13. 体重，下肢骨格筋重量および骨格筋横断面積．（A）体重および下肢骨格筋重量．（B）HE 染色により得られた筋横断面積の染色画像代表例．（C）HE 染色により定量評価した筋横断面積．（A）各群 $n = 6-8$ ；（B および C）各群 $n = 5$ ．平均 $\pm$ 標準誤差．* $P < 0.05$ vs. WT + Vehicle．† $P < 0.05$ vs. WT + Ang II．

4. 3. 3. ミトコンドリア機能（TCA サイクルおよび電子伝達系）

CS 活性は，WT + Ang II 群で有意に低下したが，KO + Ang II 群では変化がなかった．複合体活性 I および III も CS 活性同様 WT + Ang II 群において有意に低下したが，KO + Ang II 群で変化がなかった（図 14）．

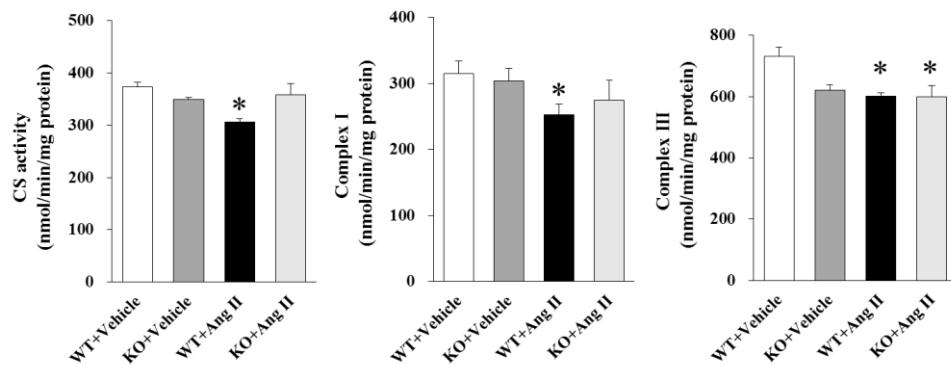


図 14. 骨格筋組織における CS 活性，骨格筋組織より単離したミトコンドリアにおける複合体活性 I, III. 骨格筋組織 Whole cell lysate における CS 活性．骨格筋単離ミトコンドリアにおける複合体活性 I および III. 各群 n = 6. 平均 ± 標準誤差．* $P < 0.05$ vs. WT + Vehicle.

4. 3. 4. 骨格筋組織におけるタンパク合成および分解に関わる因子の遺伝子発現

タンパク合成に関わる IGF-1 遺伝子発現は，全群に違いがなかった．一方，タンパク分解に関わる MuRF-1, Atrogin-1 遺伝子発現は Ang II 群で有意に増加し，KO + Ang II 群では有意に抑制された（図 15）．

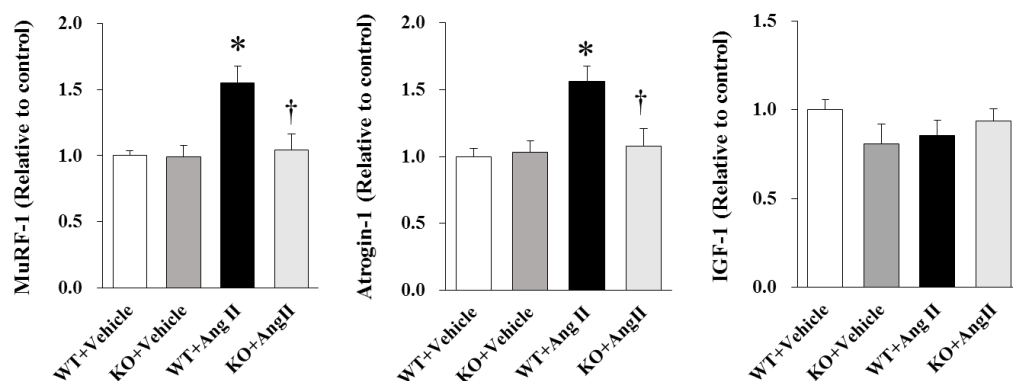


図 15. 骨格筋組織におけるタンパク合成および分解に関わる因子の遺伝子発現．各群 n = 6-8. 平均 ± 標準誤差．* $P < 0.05$ vs. WT + Vehicle. † $P < 0.05$ vs. WT + Ang II.

4. 3. 5. 骨格筋におけるアポトーシス

図 16A に、TUNEL 染色により得られた代表的な図を示す (図 15A). TUNEL 陽性細胞数は、KO + Vehicle 群、Ang II 群および KO + Ang II 群で WT + Vehicle 群に比較し有意に増加した. KO + Ang II 群は WT + Ang II 群に比較し低下傾向を認めた (図 16B). また Cleaved caspase-3 も TUNEL 陽性細胞数と同様の結果を示した (図 16C).

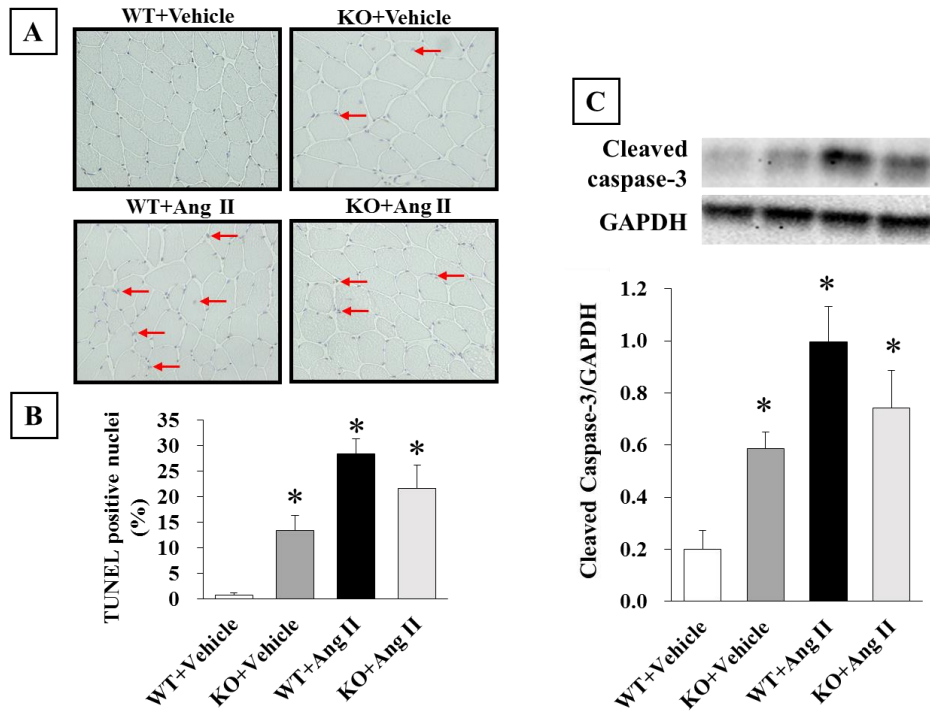


図 16. 骨格筋組織におけるアポトーシス. (A) TUNEL 染色により得られた代表的な図. 赤矢印は TUNEL 陽性細胞を示す. (B) TUNEL 陽性細胞数の定量評価. (C) Cleaved caspase-3 の代表的なバンドおよび定量評価. 各群 $n = 5-6$. 平均 $\pm$ 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. WT + Vehicle.

4. 3. 6. 骨格筋組織におけるスーパーオキサイド産生および NAD(P)H oxidase 活性

O_2^- 産生は, Ang II 群が WT + Vehicle 群に比較し有意に増加した. KO + Ang II 群は, WT + Ang II 群に比較し低下傾向を認めた. NAD(P)H oxidase 活性は, O_2^- 産生の結果と同様 WT + Ang II 群が WT + Vehicle 群に比較し有意に増加した. KO + Ang II 群では有意に抑制された (図 17).

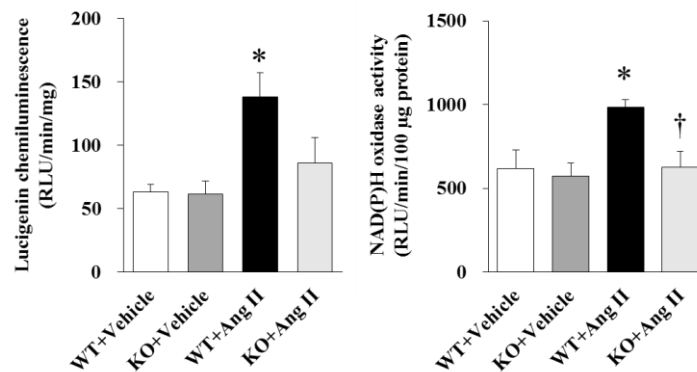


図 17. 骨格筋組織における O_2^- 産生, NAD(P)H oxidase 活性. ルシジェニン化学発光法により定量評価した骨格筋組織の O_2^- 産生および NAD(P)H oxidase 活性. 各群 n = 6-8. 平均 ± 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. WT + Vehicle. † $P < 0.05$ vs. WT + Ang II.

4. 3. 7. 運動能力

仕事量, 走行時間および走行距離は, WT + Ang II 群が WT + Vehicle 群に比較して有意に低下した. KO + Ang II 群も WT + Ang II 群と同様に有意に低下し, KO + Ang II 群も WT + Ang II 群の両群間では違いがなかった. (図 18).

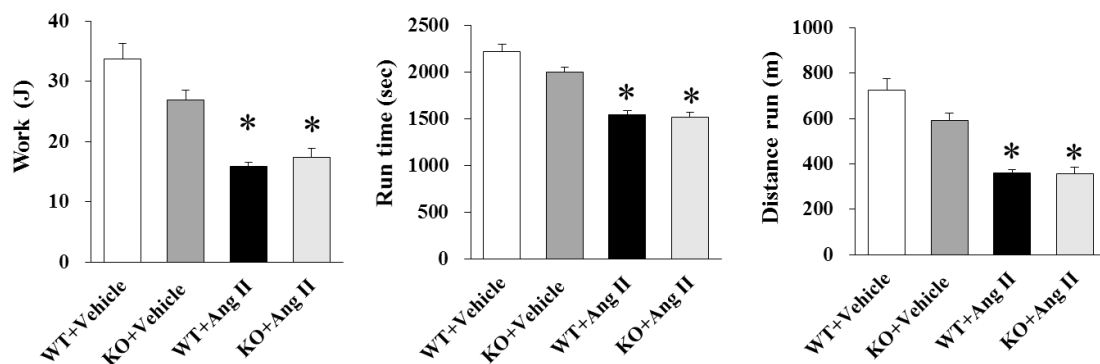


図 18. トレッドミルにより評価した仕事量, 走行時間および走行距離. 各群 n = 6-8. 平均 ± 標準誤差. * $P < 0.05$ vs. WT + Vehicle.

5. 考察

本研究では、研究 1 において、マウスにおける Ang II 投与がミトコンドリア機能障害、骨格筋線維型シフト (type I→IIb)、アポトーシスおよび骨格筋萎縮を含む骨格筋異常および運動能力低下を引き起こすことを明らかにした。ミトコンドリア機能障害および骨格筋線維型シフトは Ang II 投与初期に出現し、対して骨格筋萎縮過程は後期に明らかとなった。したがって、Ang II は加齢や心不全を始めとする慢性疾患における骨格筋異常において中心的な役割を果たす可能性が示唆された。また研究 2 では、Ang II 投与による骨格筋萎縮は Nox2 欠損マウスにおいて抑制され、ミトコンドリア機能障害や線維型シフトは変化がないことが明らかとなった。Ang II による骨格筋異常、特に骨格筋萎縮の進展に Nox2 由来の ROS が関わっていることが示唆された。

骨格筋異常

一連の骨格筋異常は加齢により引き起こされることが明らかにされている^{25, 26}。骨格筋におけるミトコンドリア機能障害および骨格筋線維型シフトは加齢に伴って起こり、またそれらの変化は運動能力低下と深く関連している^{25, 26}。これらの変化は、ヒトおよび動物モデルの骨格筋サンプルを用いた研究により明らかにされている^{25, 27, 28}。一般に、加齢に伴う骨格筋量の減少はサルコペニアと呼ばれる。ヒトおよび動物モデルの骨格筋においてサルコペニアを含めた骨格筋萎縮を促進するシグナルが活性化されている²⁹⁻³¹。骨格筋異常は加齢のみならず、心不全、腎不全および糖尿病においても観察されることが示されている^{5, 6, 32}。特に、一連の骨格筋異常は、心不全において詳細に研究されている。我々は、心不全患者では骨格筋代謝に異常を来しており、その原因には骨格筋におけるミトコンドリア機能障害が関わっていることを報告した³³。実際、ミトコンドリア TCA サイクルの主要酵素である CS 活性が心不全患者の骨格筋において障害されていることが知られている³⁴。ミトコンドリア機能は、ラットの心筋梗塞後心不全モデルマウスの骨格筋においても障害されている³⁵。一方で、骨格筋萎縮にかかわるシグナルの活性化および骨格筋萎縮の進展が心不全患者で観察されている³⁶。この様に、一連の骨格筋異常が様々な病態下において観察されることから、骨格筋異常の原因となる共通基盤が存在することを示唆している。

骨格筋と RAS

RAS の活性化は糖尿病、心不全および腎不全を始めとする慢性疾患の進展と強く関連することが明らかにされている^{10, 19, 32}。加齢 Fischer-344 ラットでは、尿中の Ang I および Ang II が上昇し、また AT1R 拮抗薬の投与は加齢と関連した様々な表現型を改善した³⁷。長期的な Ang II の抑制は、加齢ラットに

おける心保護作用を示した¹¹。アンジオテンシン変換酵素阻害薬は、心筋梗塞後心不全モデルの骨格筋におけるミトコンドリア機能障害を抑制する³⁴。我々は以前、Ang II (50 ng/kg/min) 投与マウスの骨格筋においてミトコンドリア機能障害が起こることを明らかにした¹³。また、他の研究において、高用量(500 ng/kg/min)の Ang II が UPS を介したタンパク分解により骨格筋萎縮を引き起こすことが示されている^{14, 16}。これらの結果は、RAS の活性化が各々の骨格筋異常における共通経路である可能性を示唆している。しかしながら、1つのモデルで同時に全ての骨格筋異常の理解を得る研究は存在しなかった。本研究では、Ang II が直接的に一連の骨格筋異常の原因であることを明らかにした。

骨格筋異常における時間依存的な変化

これまで、各々の骨格筋異常がどのようなタイミングで出現するかは不明であった。本研究では、Ang II 投与マウスにおいて、初期に骨格筋におけるミトコンドリア機能障害 (図 6A, B) および骨格筋線維型シフト (図 6D)、後期には骨格筋萎縮 (図 5, 7) が起こることを明らかにした。ミトコンドリア機能障害は後期においても持続的に低下した (図 6A, B)。さらに骨格筋における萎縮の過程は、初期の段階でも進行しているようだった。サルコペニアの見られない若年健常者において、骨格筋ミトコンドリア機能によって規定される持久的運動能力はしばしば低下する。心不全患者においても、持久的運動能力および骨格筋ミトコンドリア機能は軽症である早期においてさえ低下し、そして骨格筋萎縮は通常重症となる後期に観察される。実際、我々は重症度が中程度のすべての心不全患者において骨格筋代謝異常を生じ、そのうちの 30%だけが骨格筋萎縮を併発していたことを明らかにした³³。これらのことから、本研究の結果は Ang II 投与マウスによる時間依存的な骨格筋異常が、臨床的に観察されている表現型と一致していることを示唆する。

Nox 由来 ROS と骨格筋異常

血圧上昇を引き起こす高用量 (1000 mg/kg/min) の Ang II 投与により、投与 1 週後、骨格筋における CS および複合体活性 (図 6A, B) を始めとするミトコンドリア機能は有意に低下し、また type I 線維も減少した (図 6D)。O₂⁻産生増加も同時に観察された。我々の過去の報告で、血圧上昇を引き起こさない低用量 (50 ng/kg/min) の Ang II をマウスに投与し、NAD(P)H oxidase 由来の O₂⁻産生増加が骨格筋ミトコンドリア機能障害の原因であることを明らかにした¹³。ApoE 欠損マウスに Ang II (1440 ng/kg/min) を投与した最近の研究では、type I 線維が減少し、その変化は PPAR- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) の減少が関連していることが示されている³⁸。さらに、骨格筋の type I 線維の減少は CS、コハク酸脱水素酵素および 3-ヒドロキシ CoA 脱水素酵素活性などのミト

コンドリア機能低下と並行して起こるとされる³⁹。ETC 複合体は、ROS に対する感受性の高い鉄-硫黄中心を含んでいることから、ROS は直接的に ETC 複合体活性を障害する。一方、C2C12 筋管細胞および動物モデルにおいては、酸化ストレスが PGC-1 α 低下の原因であることが示されてきた⁴⁰。これらの知見は、酸化ストレス増加が Ang II 投与により初期に起こる骨格筋異常の変化と関連する可能性を示唆する。しかしながら、Nox2 欠損マウスを用いた研究では、骨格筋の ROS が完全に抑制された（図 17）にも関わらず、骨格筋ミトコンドリア機能は改善しなかった（図 14）。この結果は、我々の以前の結果と矛盾するが、この原因は投与した Ang II の濃度が高濃度（50 ng/kg/min 対 1000 ng/kg/min）であったことや長期間（1 週間対 4 週間）であったことが挙げられる。また、高濃度・長期間の Ang II 刺激による骨格筋ミトコンドリア機能障害や骨格筋線維型シフトは ROS 以外の要因にもよる可能性があると考えられる。

体重および下肢骨格筋重量は、Ang II 投与 1 週間後においては維持されていたが、それらは 4 週間後において有意に低下した（図 5A, B, D）。一般に、骨格筋萎縮は UPS の活性化により促進され、タンパク合成と分解のバランスが崩れることにより起こる。本研究では、タンパク分解の主要な指標である MuRF-1 および Atrogin-1 のタンパク発現が有意に増加した（図 7B）。対照的にタンパク合成の指標である Akt リン酸化（Ser473）および p70S6K リン酸化（Thr389）は有意に低下した（図 7B）。過剰な ROS は、C2C12 筋管細胞において C/EBP ホモロジータンパクおよび MuRF-1 の増加を引き起こすことが示されている⁴¹。また過酸化水素は、C2C12 筋管細胞において、ユビキチン結合タンパク、Atrogin-1 および MuRF-1 を増加させる⁴²。加えて、L6 筋幹細胞において、Ang II による NAD(P)H oxidase の活性化は Akt リン酸化を減少させ、またその減少が NAD(P)H oxidase の抑制剤や p47 siRNA により改善した⁴³。これらの知見は、酸化ストレスが Ang II 投与によって引き起こされる骨格筋異常の後期の変化と関連を示唆する。実際、Nox2 欠損マウスを用いた今回の研究では、骨格筋の ROS が完全に抑制されたことと並行して、骨格筋萎縮が改善した（図 13）。また心不全モデルマウスにおいても、NAD(P)H oxidase 抑制薬によって骨格筋 ROS を減少させると骨格筋萎縮が抑制されることが示されている⁴⁴。したがって、Ang II による骨格筋萎縮に Nox2 由来の ROS 産生が重要な役割を果たしていると考えられる。

Ang II と運動能力

血圧上昇を引き起こす高用量の Ang II（1000 ng/kg/min）投与は持久的運動能力低下を引き起こした（図 10）。Ang II 投与による高血圧および心肥大の影響を除外するため、血管拡張薬であるヒドララジンを追加投与した。ヒドラ

ラジンにより血圧は正常化し、心肥大は低下傾向を示した（表 2）．対照的に、持久的運動能力低下には影響がなかった（図 12）．したがって、これらの結果は Ang II による運動能力低下は、高血圧および心肥大に独立している可能性を示唆する．一方、Nox2 欠損マウスへの Ang II 投与は骨格筋萎縮が弱められたが、ミトコンドリア機能は変化がなく、運動能力も低下したままだった（図 14, 18）．我々が本研究で評価した運動能力は持久的運動能力であり、筋力は評価していない．したがって、Nox2 欠損による骨格筋萎縮の改善が持久的運動能力改善に影響しなかったと考えられる．

本研究の限界

本研究では、Ang II 投与による骨格筋異常および運動能力低下の経時的変化を観察した．しかしながら、各々の骨格筋異常の関連性を明確にできなかった．今後はそれらの因果関係を解明する必要がある．また、本研究においてアポトーシスの役割を明確にできなかった．TUNEL 染色および Cleaved caspase-3 のタンパク発現により評価した骨格筋におけるアポトーシスは、Ang II 投与により著明に増加した（図 8B, C）．しかしながら、骨格筋萎縮は出現しなかった．アポトーシスは 4 週後も同じレベルで維持されており、ミトコンドリア機能障害と関連しているかもしれない．

運動能力低下には、今回評価した骨格筋異常に加え、血流量低下および血管内皮機能障害の関与も否定できない．Ang II により、全身⁴⁵、骨格筋血流量の低下⁴⁶および血管内皮機能障害⁴⁷が誘発され、これらの因子も本研究における運動能力低下に関与していた可能性がある．

Nox2 欠損マウスを用いた研究では、Ang II 投与による骨格筋萎縮が抑制された．ミトコンドリア機能障害、アポトーシスに有意な改善が見られなかったことから、それらのシグナルを介さずに萎縮を改善する機序が存在する可能性が示唆され、今後評価する必要がある．

本研究の臨床的意義

加齢や心不全および腎不全を始めとする慢性疾患では、骨格筋異常および運動耐容能低下が観察されている．また骨格筋萎縮および運動耐容能低下は生命予後にも影響をおよぼす．本研究で用いた Ang II 投与モデルでは、加齢、心不全および腎不全において臨床的に観察される骨格筋異常および運動耐容能低下と表現型が一致していた．さらに Nox2 欠損マウスにおいて Ang II による骨格筋萎縮が抑制された．これらのことから、Ang II の抑制や Nox2 由来 ROS を標的因子とした骨格筋異常の治療戦略につながる可能性がある．

6. 総括および結論

本研究の結果を踏まえ, Ang II 投与マウスにおける骨格筋異常および運動能力低下に対する Nox2 由来の ROS の役割についての要約を以下に述べる.

1. マウスにおける Ang II 投与がミトコンドリア機能障害, 骨格筋線維型シフト, アポトーシスおよび骨格筋萎縮を含めた骨格筋異常および運動能力低下を引き起こした. ミトコンドリア機能障害および骨格筋線維型シフトは Ang II 投与初期 (1 週後) に出現し, 対して骨格筋萎縮の進行は初期において軽微に観察され, 後期 (4 週後) において顕著に認められた.
2. Ang II 投与によるミトコンドリア機能障害, アポトーシスおよび運動能力低下は, Nox2 KO マウスにおいて違いがなかった. 一方, 骨格筋萎縮は, Nox2 KO マウスにおいて抑制され, その変化は, タンパク分解に関わる MuRF-1 および Atrogin-1 遺伝子発現の抑制と一致していた.

これらのことから, 本研究では, Ang II 投与による骨格筋萎縮に対しては, Ang II-Nox2 が重要である可能性が示唆された. 加齢, 心不全といった慢性疾患においても, 本研究で観察された骨格筋異常および運動能力低下が引き起こされることが明らかにされている. したがって, 今後は Ang II-Nox2 が臨床的に, 加齢, 心不全を始めとする各種疾患における治療標的となるかどうかを明らかにするため, 更なる検討を進めていくことが重要な課題である.

7. 謝辞

本研究を遂行し学位論文を作成するに当たり, 多くの御支援と御指導を承りました, 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学 筒井裕之教授に深く感謝申し上げます. 科学に対する真摯な研究姿勢, 科学的な考察方法などきめ細かく指導して頂き, 今後の糧になるものでございます.

博士課程での研究全般に多大な御支援を頂きました, 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学 絹川真太郎講師には, 本研究を遂行するに当たり日々の研究や学術発表だけでなく多くの御指導をして頂き, 大変感謝申し上げます. また, 本論文作成に当たり, 多忙の中御助言頂きました審査委員の先生方には深く感謝申し上げます.

本研究に当たり日頃より多くの助力を頂きました北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学心不全・運動負荷グループの研究室の方々, 松島将士先生, 横田 卓先生, 高田真吾先生, 降旗高明先生, 福島 新先生, 本間恒章先生, 正木芳宏先生, 西川幹人先生, 菅 唯志先生に感謝申し上げます.

本研究の実験遂行にあたり, 多大な御助力を頂きました実験助手の木村有紀様, 池田典子様, 會田晶子様, 藤井美和子様, 檜舘薫子様に深く感謝申し上げます.

また、本研究は多くの実験動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

最後に、有益な助言また激励を下さいました諸先輩方、研究室の皆様、そして忙しい研究生活を陰ながら支えてくれた家族に感謝いたします。

8. 引用文献

- 1 Houmard, J. A. *et al.* Fiber type and citrate synthase activity in the human gastrocnemius and vastus lateralis with aging. *J. Appl. Physiol.* **85**, 1337-1341 (1998).
- 2 Mancini, D. M. *et al.* Value of peak exercise oxygen consumption for optimal timing of cardiac transplantation in ambulatory patients with heart failure. *Circulation* **83**, 778-786 (1991).
- 3 Ribisl, P. M. *et al.* Exercise capacity and cardiovascular/metabolic characteristics of overweight and obese individuals with type 2 diabetes: the Look AHEAD clinical trial. *Diabetes Care* **30**, 2679-2684 (2007).
- 4 Odden, M. C., Whooley, M. A. & Shlipak, M. G. Association of chronic kidney disease and anemia with physical capacity: the heart and soul study. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 2908-2915 (2004).
- 5 Okita, K., Kinugawa, S. & Tsutsui, H. Exercise intolerance in chronic heart failure--skeletal muscle dysfunction and potential therapies. *Circ. J.* **77**, 293-300 (2013).
- 6 Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V. & Ritov, V. B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944-2950 (2002).
- 7 Chabi, B. *et al.* Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging cell* **7**, 2-12 (2008).
- 8 Lunde, P. K., Sjaastad, I., Schiotz Thorud, H. M. & Sejersted, O. M. Skeletal muscle disorders in heart failure. *Acta Physiol. Scand.* **171**, 277-294 (2001).
- 9 Harada, K. *et al.* Angiotensin II type 1A receptor knockout mice display less left ventricular remodeling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* **100**, 2093-2099 (1999).
- 10 Takada, S. *et al.* Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *J. Appl. Physiol.* **114**, 844-857 (2013).
- 11 Basso, N. *et al.* Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1351-1358 (2007).
- 12 Zablocki, D. & Sadoshima, J. Angiotensin II and oxidative stress in the failing heart. *Antioxid. redox signal.* **19**, 1095-1109 (2013).
- 13 Inoue, N. *et al.* Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H1202-1210 (2012).
- 14 Song, Y. H. *et al.* Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin

- II-induced skeletal muscle wasting. *J. Clin. Invest.* **115**, 451-458 (2005).
- 15 Brink, M., Wellen, J. & Delafontaine, P. Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor I in rats through a pressor-independent mechanism. *J. Clin. Invest.* **97**, 2509-2516 (1996).
 - 16 Yoshida, T., Semprun-Prieto, L., Sukhanov, S. & Delafontaine, P. IGF-1 prevents ANG II-induced skeletal muscle atrophy via Akt- and Foxo-dependent inhibition of the ubiquitin ligase atrogin-1 expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **298**, H1565-1570 (2010).
 - 17 Yoshida, T. *et al.* Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2322-2332 (2013).
 - 18 Ohta, Y. *et al.* Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H1637-1644 (2011).
 - 19 Fukushima, A. *et al.* (Pro)renin receptor in skeletal muscle is involved in the development of insulin resistance associated with postinfarct heart failure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **307**, E503-514 (2014).
 - 20 Bendall, J. K. *et al.* Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* **105**, 293-296 (2002).
 - 21 Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D. & Alexander, R. W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **74**, 1141-1148 (1994).
 - 22 Byrne, J. A. *et al.* Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **93**, 802-805 (2003).
 - 23 Li, J. M. *et al.* Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension* **40**, 477-484 (2002).
 - 24 Salles, N. *et al.* Expression of mRNA for ROS-generating NADPH oxidases in the aging stomach. *Exp. Gerontol.* **40**, 353-357 (2005).
 - 25 Rooyackers, O. E., Adey, D. B., Ades, P. A. & Nair, K. S. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 15364-15369 (1996).
 - 26 Frontera, W. R. *et al.* Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J. Appl. Physiol.* **88**, 1321-1326 (2000).
 - 27 Blough, E. R. & Linderman, J. K. Lack of skeletal muscle hypertrophy in very aged male Fischer 344 x Brown Norway rats. *J. Appl. Physiol.* **88**, 1265-1270

- (2000).
- 28 Kerner, J., Turkaly, P. J., Minkler, P. E. & Hoppel, C. L. Aging skeletal muscle mitochondria in the rat: decreased uncoupling protein-3 content. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**, E1054-1062 (2001).
 - 29 Fleg, J. L. & Lakatta, E. G. Role of muscle loss in the age-associated reduction in VO₂ max. *J. Appl. Physiol.* **65**, 1147-1151 (1988).
 - 30 Andersen, J. L. Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **13**, 40-47 (2003).
 - 31 Clavel, S. *et al.* Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech. Ageing Dev.* **127**, 794-801 (2006).
 - 32 Tamaki, M. *et al.* Chronic kidney disease reduces muscle mitochondria and exercise endurance and its exacerbation by dietary protein through inactivation of pyruvate dehydrogenase. *Kidney Int.* **85**, 1330-1339 (2014).
 - 33 Hirabayashi, K. *et al.* Intramyocellular lipid is increased in the skeletal muscle of patients with dilated cardiomyopathy with lowered exercise capacity. *Int. J. Cardiol.* **176**, 1110-1112 (2014).
 - 34 Zoll, J. *et al.* ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J. Appl. Physiol.* **101**, 385-391 (2006).
 - 35 Gielen, S. *et al.* Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Intervention in Chronic Heart Failure and Aging catabolism study. *Circulation* **125**, 2716-2727 (2012).
 - 36 Schulze, P. C. *et al.* Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction. *Circ. Res.* **97**, 418-426 (2005).
 - 37 Gilliam-Davis, S. *et al.* Long-term AT1 receptor blockade improves metabolic function and provides renoprotection in Fischer-344 rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1327-1333 (2007).
 - 38 Kackstein, K. *et al.* Impact of angiotensin II on skeletal muscle metabolism and function in mice: contribution of IGF-1, Sirtuin-1 and PGC-1α. *Acta Histochem.* **115**, 363-370 (2013).
 - 39 Sullivan, M. J., Green, H. J. & Cobb, F. R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* **81**, 518-527 (1990).
 - 40 Irrcher, I., Ljubcic, V. & Hood, D. A. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1α transcription in skeletal

- muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C116-123 (2009).
- 41 Sriram, S. *et al.* Myostatin augments muscle-specific ring finger protein-1 expression through an NF- κ B independent mechanism in SMAD3 null muscle. *Mol. Endocrinol.* **28**, 317-330 (2014).
- 42 Li, Y. P., Chen, Y., Li, A. S. & Reid, M. B. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C806-812 (2003).
- 43 Wei, Y. *et al.* Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 35137-35146 (2006).
- 44 Cunha, T. F. *et al.* Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS One* **7**, e41701 (2012).
- 45 Nishiyama, A. *et al.* Role of nitric oxide in regional blood flow in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Hypertens. Res.* **24**, 421-427 (2001).
- 46 Goossens, G. H., Blaak, E. E., Saris, W. H. & van Baak, M. A. Angiotensin II-induced effects on adipose and skeletal muscle tissue blood flow and lipolysis in normal-weight and obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2690-2696 (2004).
- 47 Kroller-Schon, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1alpha deletion induces angiotensin II-associated vascular dysfunction by increasing mitochondrial oxidative stress and vascular inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1928-1935 (2013).