

# 学 位 論 文

## Doctoral Thesis

論文題名 : 骨格筋の増大は心筋梗塞後のリモデリングを抑制する  
(Skeletal muscle growth attenuates cardiac remodeling  
after myocardial infarction)

著 者 名 : 荒 木 智  
Satoshi Araki

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻循環器病態学 小川 久雄 教授

審査委員名 : 生体機能薬理学担当教授 光山 勝慶  
分子遺伝学担当教授 尾池 雄一  
代謝内科学担当教授 荒木 栄一

2013年3月

# 学位論文

## Doctoral Thesis

骨格筋の増大は心筋梗塞後のリモデリングを抑制する  
(Skeletal muscle growth attenuates cardiac remodeling  
after myocardial infarction)

荒木 智

Satoshi Araki

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻循環器病態学

指導教員

小川 久雄 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻循環器病態学

2013年3月

## 目次

1. 要旨	2
2. 発表論文リスト	3
3. 謝辞	4
4. 略語一覧	5
5. 研究の背景と目的	
5-1. 骨格筋と慢性心不全	6
5-2. 骨格筋と Akt1 シグナル	7
5-3. 本研究の目的	9
6. 実験方法	11
6-1. 実験動物	
6-2. 心筋梗塞モデル	
6-3. 心エコー	
6-4. 血行動態評価	
6-5. 定量的リアルタイム PCR 解析	
6-6. ウェスタンブロット解析	
6-7. 免疫組織学的解析	
6-8. 血管新生アレイによる解析	
6-9. 統計学的解析	
7. 実験結果	
7-1. 心エコーおよびカテーテルによる心機能評価	15
7-2. 心筋梗塞後の心不全および心肥大の評価	20
7-3. 組織学的検討による線維化および毛細血管数の検討	22
7-4. 血清中の血管新生因子の検討	25
7-5. eNOS の活性化および心筋リモデリング抑制との関連について	26
8. 考察	30
9. 結語	35
10. 参考文献	36

## 1. 要旨

[ 目的 ] 慢性心不全患者では進行性の骨格筋萎縮が高頻度に発生し、これが死亡の独立した予測因子であることが明らかにされている。一方心臓リハビリテーションの有用性は広く知られており、有酸素運動により慢性心不全患者の予後の改善することが報告されている。近年それらに加えて、骨格筋量の増大を目的としたレジスタンストレーニングの有用性・安全性が報告されている。しかしながらその有用性の機序に関しては今まで適切な動物モデルが存在しなかったことからほとんど検討されていない。我々は任意の時期に活性化 Akt1 を骨格筋特異的に過剰発現させることで骨格筋量を増大させることができる遺伝子改変マウスを用いて、骨格筋増大が心筋梗塞後のリモデリングへ与える影響を検討した。

[ 方法 ] 野生型(WT)マウス及び骨格筋特異的-Akt1 コンディショナルトランスジェニック(TG)マウスを使用した。冠動脈結紮による心筋梗塞モデルを作成し、心筋梗塞 2 日後から Dxcycline を投与することで Akt1 の発現を誘導し、その後 2 週間、4 週間後に心筋リモデリングや心機能への影響を心エコー、観血的血行動態測定および組織学的手法を用いて検討を行った。

[ 結果 ] 心筋梗塞後の死亡率は WT マウスおよび TG マウス間では差はなかった。しかし心エコーおよびカテーテルによる血行動態評価では Akt1 による骨格筋の肥大は WT マウスに比較し心筋梗塞後の左室拡大および収縮能の低下を有意に抑制した。また組織学的検討では TG マウスにおいて心筋細胞の肥大や心筋間質の線維化が抑制されており、線維化関連遺伝子の発現も有意に抑制されていた。また梗塞境界領域および健常領域のいずれにおいても毛細血管密度の増加を認めた。プロテインアレイを用いた血中の血管新生因子の測定では WT マウスに比較して、TG マウスにおいて VEGF、FGF-2、SDF-1 などの血管新生因子が増加していた。また骨格筋においても VEGF の蛋白発現が亢進しており、骨格筋が VEGF の供給源である可能性が示唆された。Akt1 による骨格筋肥大の心保護効果の機序を検討するため心筋梗塞後の心臓の細胞内シグナルと検討したところ、血管新生のシグナルの一つである eNOS の活性化が TG マウスにおいて有意に亢進していた。また骨格筋肥大による心保護効果は NOS の阻害剤である L-NAME の投与により消失した。

[ 考察 ] Akt1 過剰発現による骨格筋増大の心保護効果は心臓における eNOS の活性化を介している可能性が考えられた。

[ 結論 ] Akt1 を介した骨格筋増大は骨格筋由来の血管新生因子の増加を介して心筋梗塞後のリモデリングを抑制することが示唆された。

## 2. 発表論文リスト

### ①関連論文

1. Satoshi Araki, Yasuhiro Izumiya, Shinsuke Hanatani, Taku Rokutanda, Hiroki Usuku, Yuichi Akasaki, Toru Takeo, Naomi Nakagata, Kenneth Walsh, Hisao Ogawa  
Akt1-Mediated Skeletal Muscle Growth Attenuates Cardiac Dysfunction and Remodeling After Experimental Myocardial Infarction  
*Circ Heart Fail.* 2012;5;116-125

### ②その他の論文

1. Izumiya Y, Araki S, Usuku H, Rokutanda T, Hanatani S, Ogawa H.  
Chronic C-Type Natriuretic Peptide Infusion Attenuates Angiotensin II-Induced Myocardial Superoxide Production and Cardiac Remodeling.  
*Int J Vasc Med.* 246058; 2012.
2. Maruyama S, Shibata R, Kikuchi R, Izumiya Y, Rokutanda T, Araki S, Kataoka Y, Ohashi K, Daida H, Kihara S, Ogawa H, Murohara T, Ouchi N.  
A fat-derived factor omentin stimulates endothelial cell function and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism.  
*J Biol Chem.* 2012;287:408-17.
3. Rokutanda T, Izumiya Y, Miura M, Fukuda S, Shimada K, Izumi Y, Nakamura Y, Araki S, Hanatani S, Matsubara J, Nakamura T, Kataoka K, Yasuda O, Kaikita K, Sugiyama S, Kim-Mitsuyama S, Yoshikawa J, Fujita M, Yoshiyama M, Ogawa H.  
Passive Exercise Using Whole Body Periodic Acceleration Enhances Blood Supply to Ischemic Hindlimb.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2872-80.
4. Izumiya Y, Kojima S, Kojima S, Araki S, Usuku H, Matsubara J, Sakamoto K, Tsujita K, Nagayoshi Y, Kaikita K, Sugiyama S, Ogawa H.  
Long-term use of oral nicorandil stabilizes coronary plaque in patients with stable angina pectoris.  
*Atherosclerosis.* 2011;214:415-421.

### 3. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的にご支援下さいました熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻循環器病態学分野 小川久雄教授に深甚なる謝意を表します。

また本研究において直接ご指導を頂きました熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻循環器病態学分野 泉家康宏助教に深く感謝いたしますとともに共同研究者として御協力頂いた熊本大学生命資源研究・支援センター 資源開発分野 中瀬 直己教授をはじめ多くの先生方に深く感謝申し上げます。

#### **4. 略語一覽**

**BNP: B-type natriuretic peptide**

**BZ: border zone**

**ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**

**eNOS: endothelia NO synthase**

**FGF: fibroblast growth factor**

**H.E.: hematoxylin and eosin**

**IVS: interventricular septum**

**LAD: left anterior descending artery**

**LVDd: left ventricular end-diastolic dimension**

**LVDs: left ventricular end-systolic dimension**

**MCK: Muscle-creatine kinesis**

**MI: myocardial infarction**

**NO: nitric oxide**

**myrAKT: myristoylated Akt**

**%FS: percent fraction shortening**

**PDK1: 3 phosphoinositide dependent protein kinase 1**

**PI3K: phosphotidylinositol 3 kinase**

**PW: posterior wall**

**rtTA: reverse tetracycline transactivator**

**RZ: remote zone**

**SDF-1: stromal cell-derived factor 1**

**TG: transgene**

**TRE: tetracycline responsive element**

**UCG: ultrasound cardiogram**

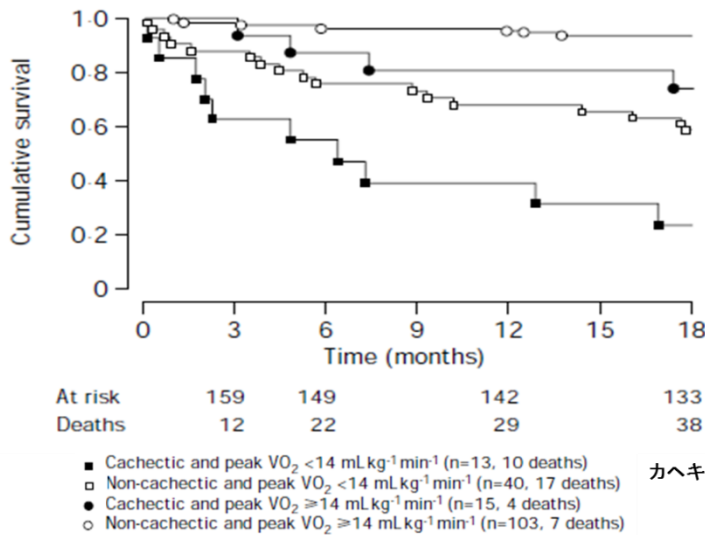
**VEGF: vascular endothelial growth factor**

**WT: wild-type**

## 5. 研究の背景と目的

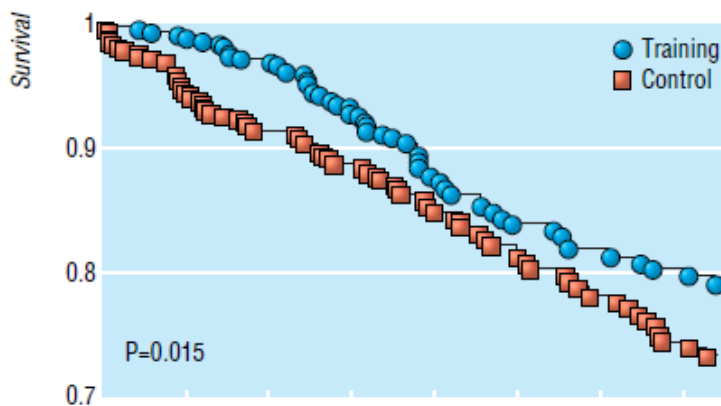
### 5-1 骨格筋と慢性心不全

以前より慢性心不全患者では心臓カヘキシアと称される進行性の骨格筋萎縮が高頻度に発生し、運動耐容能の低下とカヘキシアは死亡の独立した危険因子であることが報告されている (1)。



図：カヘキシアと最大酸素摂取量の低下は慢性心不全患者の危険因子である  
*Lancet. 1997;349:1050-1053.*

また慢性心不全患者においてはI型骨格筋(遅筋)の減少やミトコンドリア機能不全機能不全も報告されている (2)。心不全患者の骨格筋萎縮について、以前は心不全患者への運動療法は骨格筋への血流増加から禁忌とされていたが、多くの臨床試験から近年では心臓リハビリテーションの有用性は広く知られており、心不全患者であっても運動療法を行うことにより運動耐容能や予後を改善することが報告されている (3)。



図：有酸素運動は慢性心不全患者の予後を改善する  
*BMJ. 2004;328:189-192.*



高負荷でない有酸素運動では骨格筋量自体はほとんど増加しない。一方、レジスタンストレーニング(抵抗運動)では主に2型骨格筋(速筋)の増大や蛋白合成を促進することが知られている(4)。臨床においても抵抗運動は筋力の増加のみならず、インスリン感受性や脂質代謝改善効果もあることも報告されている。

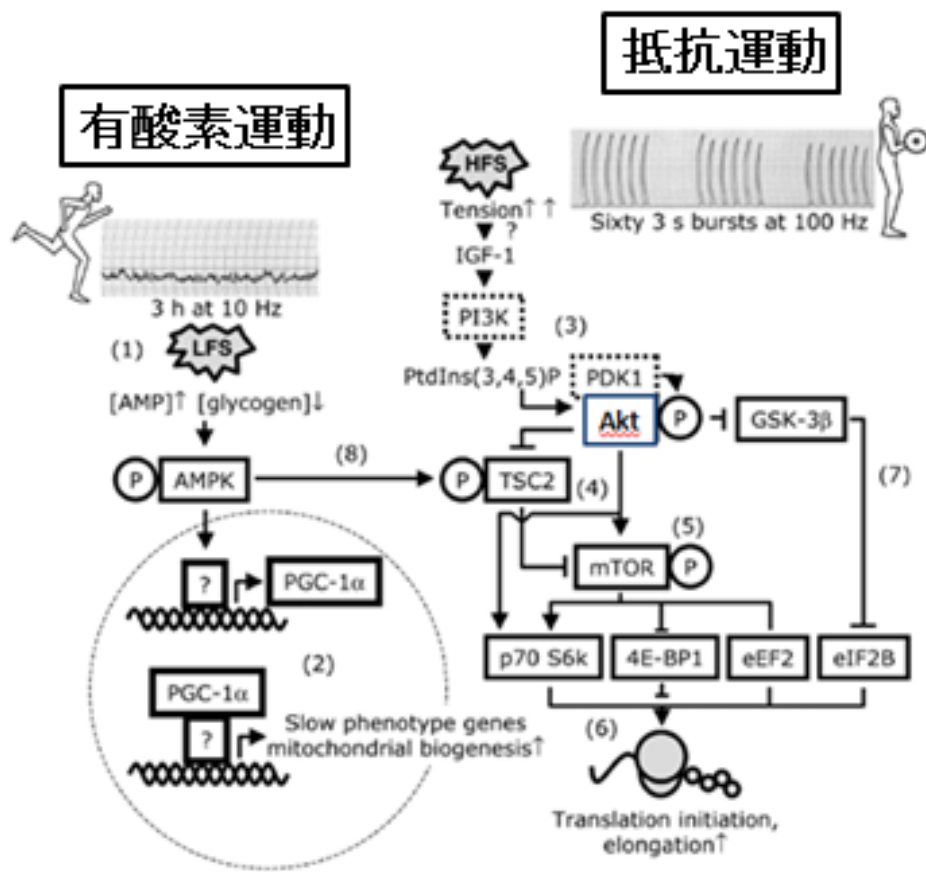
パラメーター	有酸素運動	レジスタンストレーニング
筋力	↔	↑↑↑
骨塩量	↑	↑↑↑
体組成		
体脂肪率	↓↓	↓
除脂肪体重	↔	↑↑
糖代謝		
インスリンの反応性	↓↓	↓↓
インスリンの基礎分泌量	↓	↓
インスリン感受性	↑↑	↑↑
脂質代謝		
LDL コレステロール	↓↔	↓↔
HDL コレステロール	↑↔	↑↔
安静時心拍数	↓↓	↔
安静時血圧		
収縮期	↓↓	↓
拡張期	↓↓	↓
運動持続時間	↑↑↑	↑↑
基礎代謝量	↑	↑↑

図：運動療法のメタボリックパラメーターに与える影響  
*Circulation 2006;113:2642* より改変

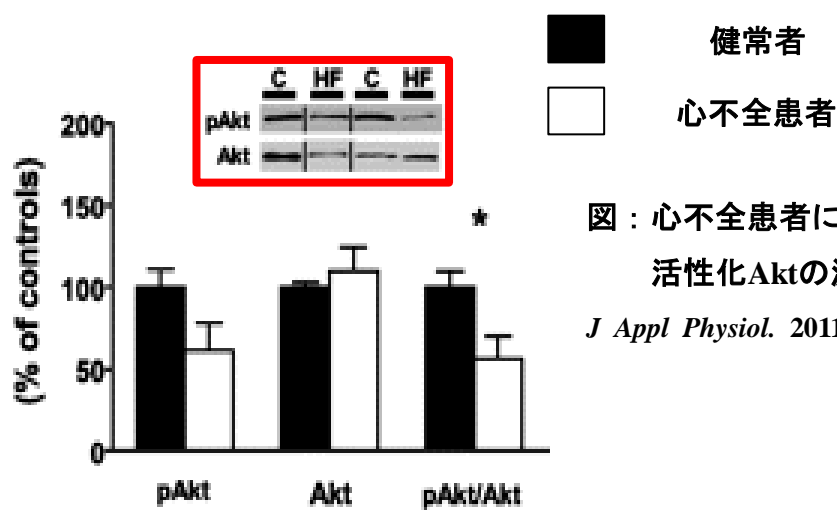
上記の代謝改善効果もあり抵抗運動は心血管疾患の患者においても、運動能の改善のみならず心機能への好影響がある可能性があり、有酸素運動に加えて抵抗運動も推奨されるようになってきた(5)(6)。

## 5-2 骨格筋とAkt1シグナル

Aktファミリーはセリン・スレオニンリン酸化酵素の一員であり、豊富に存在する細胞内シグナル伝達因子である。様々な外部の刺激によりPI3Kを介して活性化され、下流の器質のリン酸化を介して細胞応答を制御する。骨格筋においては抵抗運動により活性化され、骨格筋肥大を促進するシグナルとして機能する(7)(8)。一方、慢性心不全患者での骨格筋萎縮において、Aktの活性が低下していることが報告されており(9)、その一因として心不全の心臓から分泌されるMyostatinによる骨格筋萎縮が挙げられている(10)。

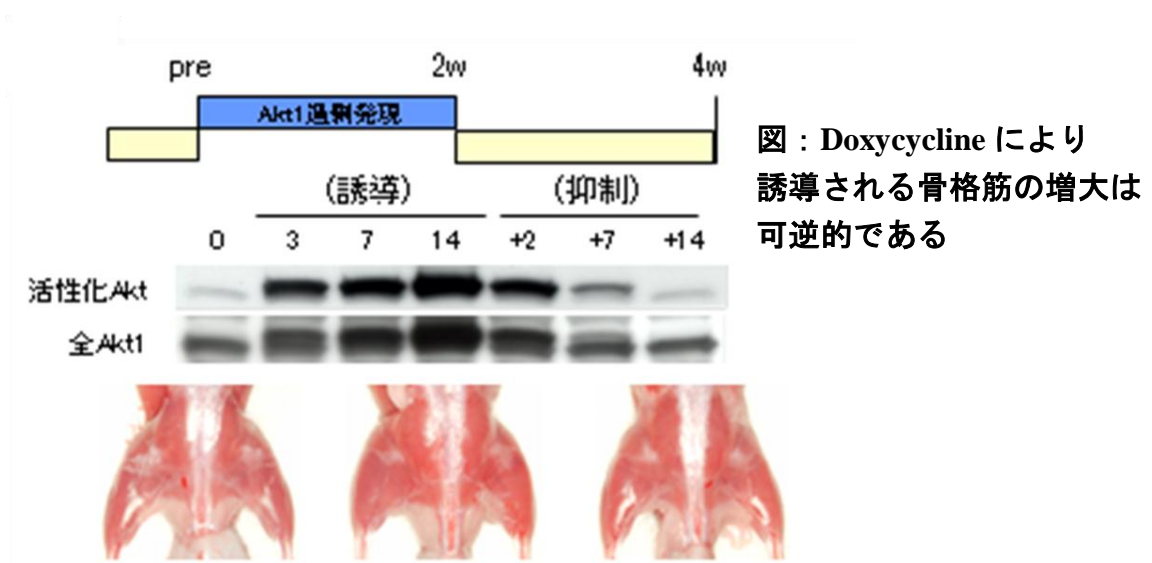


図：Akt シグナルと骨格筋肥大  
*Faseb J.* 2005;19:786-788.から改変

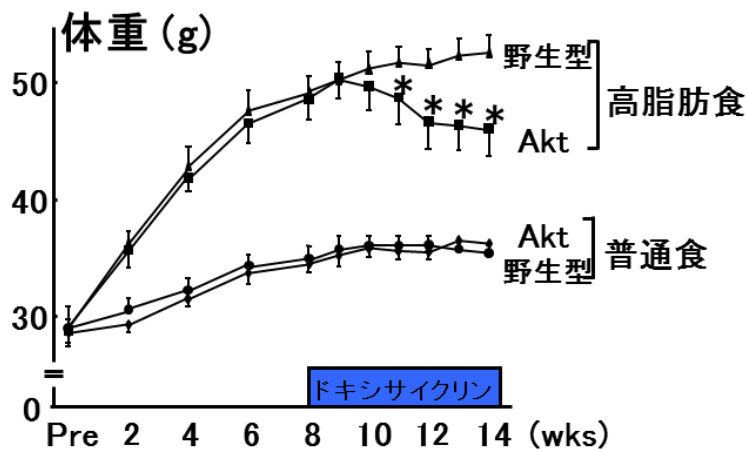


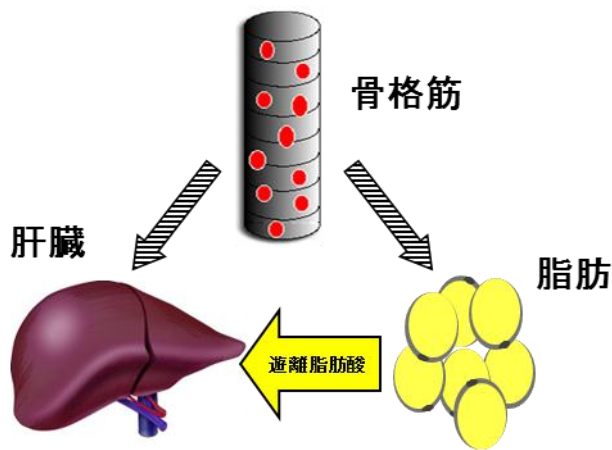
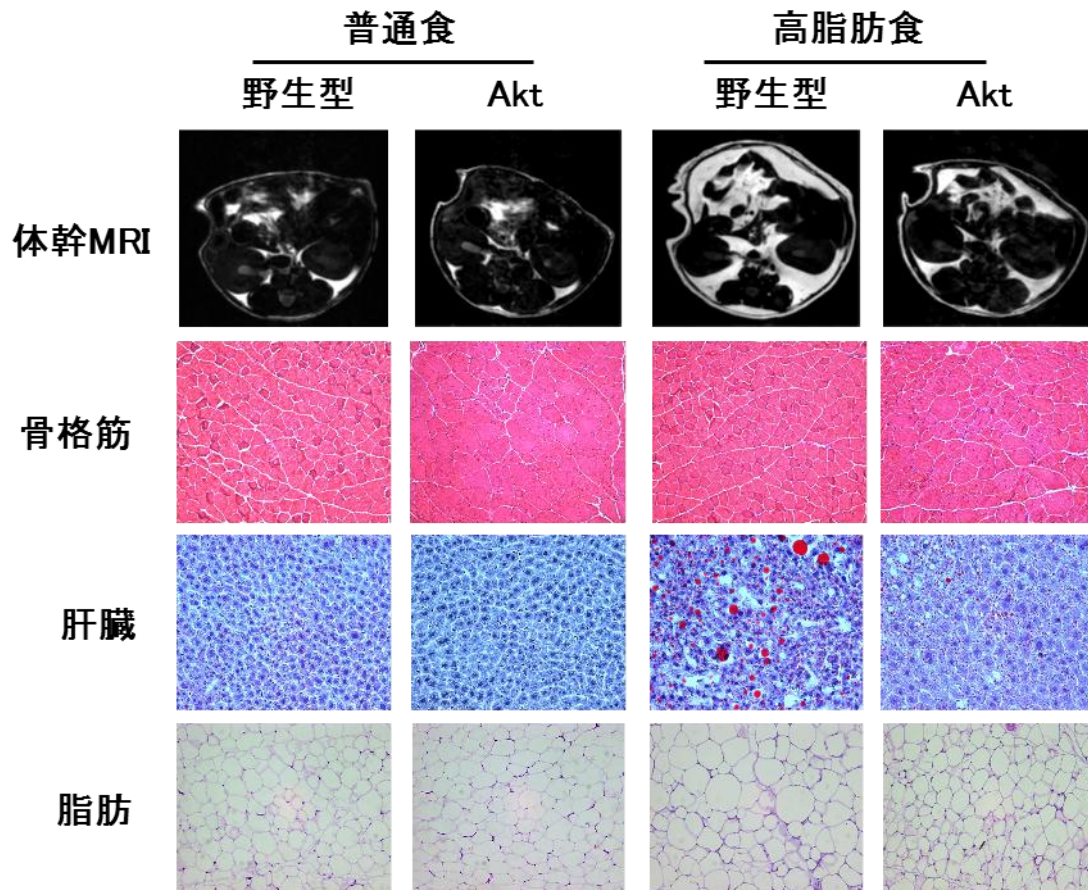
### 5-3 本研究の目的

以前に我々のグループは骨格筋肥大を任意の時期に誘導できる骨格筋特異的 Akt1 誘導型過剰発現マウスを作成し、Akt1 の過剰発現により II b 型の速筋のみが選択的に増大することを報告している。このマウスに対し、高蔗糖/高脂肪食を与え代謝リックシンドローム様の病態を惹起し、その後骨格筋肥大を誘導したところ高血糖、高インスリン血症、高レプチン血症などの肥満に伴う代謝異常を著明に改善した。II 型骨格筋細胞の肥大は骨格筋自身での糖の取り込みを上昇させるのみならず、肝臓での脂肪酸  $\beta$  酸化を促進し、脂肪組織への脂肪蓄積を抑制した (11)。このマウスモデルでは Akt1 の過剰発現は骨格筋に特異的なものであるため、脂肪肝の改善や脂肪蓄積の抑制効果は骨格筋由来の分泌因子が遠隔臓器である肝臓・脂肪組織に作用した結果である可能性が示唆された。



図：Doxycycline により誘導される骨格筋の増大は可逆的である





図：Akt1による骨格筋肥大は肝臓での脂肪酸酸化を促進し、肥満に伴う糖・脂質代謝異常を改善した  
*Cell Metab.* 2008;7:159-172.から改変

慢性心不全患者において骨格筋の萎縮が認められ、予後の独立した予測因子となっているが、逆に抵抗運動による骨格筋の増大が心不全を改善するかどうかは不明である。我々はこのマウスを用いて心筋梗塞後のリモデリングに対する骨格筋肥大の影響について検討した。

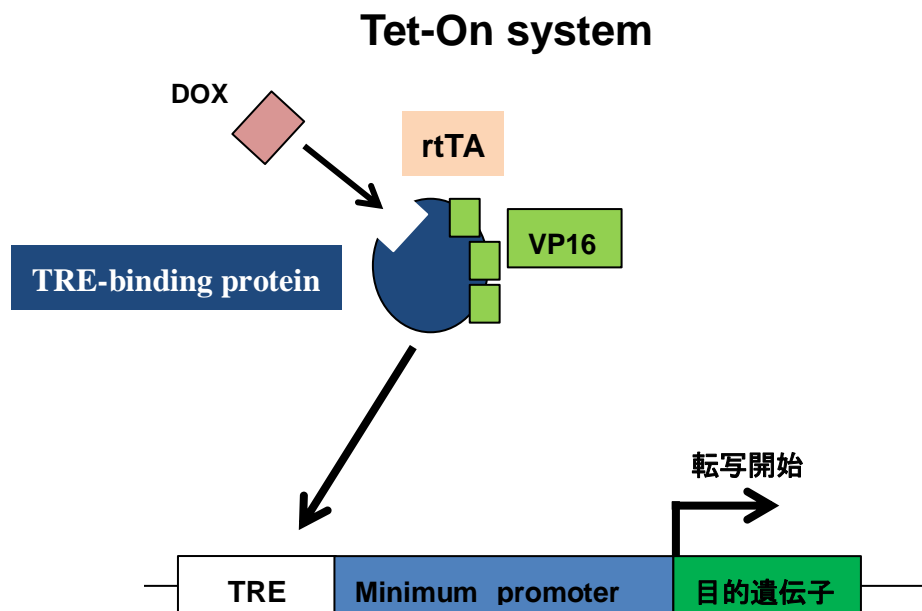
## 6. 実験方法

### 6-1 実験動物(骨格筋特異的Akt1過剰発現マウス)

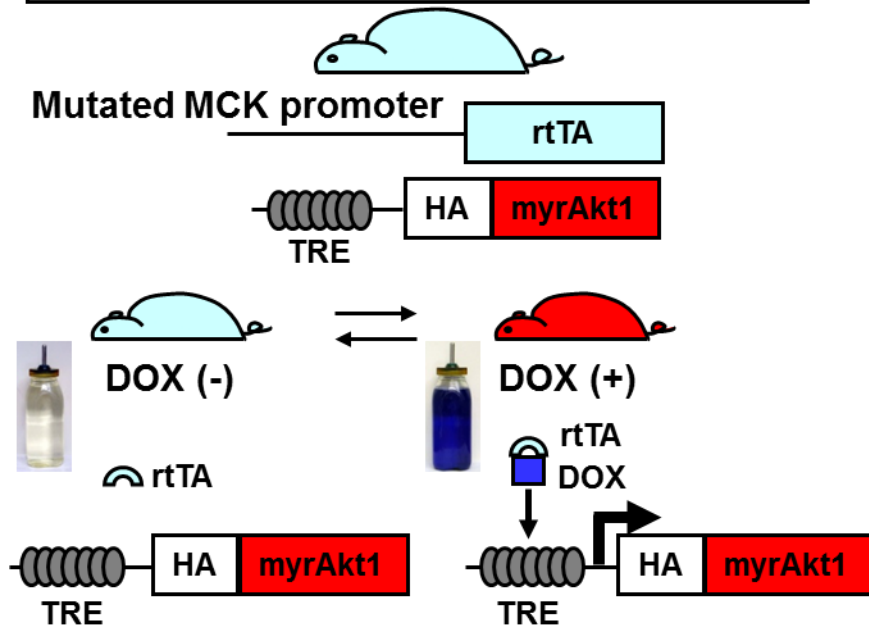
1256(3Emut)MCK-rtTA transgenic mouse (TG)マウス (12)とTRE-myrAkt1 TGマウス (13)を掛け合わせるにより、ダブルTGを作成しこれをAkt1 TGマウスとした。このマウスモデルではTet-on systemを用いた。reverse tetracycline transactivator (rtTA)はTRE-binding proteinとVP16 transactivation domainの融合蛋白であり、Tet-on systemとはドキシサイクリン(Doxycycline : DOX)を投与することによりrtTAへDOXが結合し、TRE-binding proteinが tetracycline responsive element (TRE)に結合しその下流の転写を促進するシステムである。

なおMuscle creatine kinesis (MCK)プロモーターのE boxには3カ所のミューテーションが加えられており、心臓では発現せず骨格筋にのみrtTAが発現するように改変されている (14)。Akt1を過剰発現させるためには、DOXを0.5g/Lの濃度で飲水投与することで骨格筋特異的にAkt1を誘導することができ、DOXの中断によりAkt1の遺伝子発現は抑制される(10)。MCK-rtTA

シングルTGマウスをコントロールとし各種実験を行った。なおmyrAkt1はAkt1のN末端にミリスチル基をつけることにより、Akt1が細胞膜へ移行し、3 phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)によって持続的にリン酸化され活性化型となっているAkt1である (15)。



## MCK-rtTA x TRE-myrAkt1 Double transgenic (DTG) mouse



### 6-2 心筋梗塞モデル

コントロールマウスとAkt1 TGマウスは10-12週齢時に実験を行った。マウスの麻酔はペントバルビタール(50mg/kg)を腹腔内注射により行った。気管内にポリエチレン製チューブを挿入し、小型動物用従量式人工呼吸器にて陽圧換気を開始した。右側臥位にて左第4及び第5肋骨の間から開胸し、心臓を露出させた後、顕微鏡下に左前下行枝(left anterior descending artery : LAD)を8-0シルク糸にて恒久的に結紮した (16)。心筋虚血の確認は心電図上の持続性ST上昇および結紮部以遠の心筋の色調変化(赤から白へ)にて確認した。閉胸は5-0シルク糸にて行った。なおsham手術は同様に開胸を行ったが、LADの結紮は行わず閉胸した。DOXの投与は手術2日後から開始した。心筋梗塞後のマウスの生存曲線はカプラン・マイヤー法を用いた。組織サンプルの採取はDOXを2週間もしくは4週間投与後に過量のペントバルビタールを投与にて麻酔を行い、心臓および骨格筋を採取した。

すべてのプロトコールは、熊本大学動物実験委員会の承認を受けており、日本学術会議が策定した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」の則り行われた。

### 6-3 心エコー

経胸壁心エコーは高周波(12MHz)リニア式プローブ、本体はXiaro超音波診断システム(Toshiba Medical Systems, Japan)を用いて行った。覚醒状態での心機能をM-mode心エコーにて左室乳頭筋レベルの短軸像を記録した。左室拡張末期径(left ventricular end-diastolic dimension:LVDd)及び左室収縮末期径(left ventricular end-systolic dimension:LVDs)、中隔(interventricular septum:IVS)、後壁(posterior wall:PW)、左室内径短縮率(percent fraction shortening:%FS)を測定した。 $\%FS=(LVDd-LVDs)/LVDd \times 100$ にて計算した。

### 6-4 血行動態評価

左室の収縮能測定はDOXを4週間投与後に行った(17)。ペントバルビタールによる麻酔下で1.4FのMillarカテーテルを用いて右総頸動脈よりカテーテルを挿入し左室まで進めた。測定波形の記録にはLabChart7 Proを用いた。

### 6-5 定量的リアルタイムPCR (reverse transcription-polymerase chain reaction)解析

取り出した心臓からの全RNAの抽出はQiagenのRNeasy fibrous minikitを取り扱い指針に基づいて行った。cDNAの作成はThermoScript RT-PCR System (Invitrogen)を用いた。このcDNAを用いて定量的リアルタイムPCRはBNP、コラーゲンI、コラーゲンIIIおよび36B4に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを作成し、Sybergreenを使用しABI Prism 7900 sequence detection system(Applied Biosystems)にてmRNAレベルを測定した(17)。なお内因性コントロールとして36B4を用いた。

Gene	Primer Sequences
BNP	
Forward	5'-GGAGTCCTAGCCAGTCTCC-3'
Reverse	5'-TTGGTCCTTCAAGAGCTGTC-3'
Collagen I	
Forward	5'-GTCCCAACCCCAAGAC-3'
Reverse	5'-CATCTTCTGAGTTTGGTGATACGT-3'
Collagen III	
Forward	5'-GTCCCAACCCCAAGAC-3'
Reverse	5'-CATCTTCTGAGTTTGGTGATACGT-3'
36B4	
Forward	5'-GCTCCAAGCAGATGCAGCA-3'
Reverse	5'-CCGGATGTGAGGCAGCAG-3'

### RT-PCR 分析に用いたプライマー配列

#### 6-6 ウェスタンブロット解析

蛋白のサンプルはCell signalingの細胞溶解バッファーを用いてサンプルを破碎し、蛋白量を合わせたのちに、SDSおよびβメルカプトエタノールを含むサンプルバッファーと1対1で混和し95°C5分の処理を行ったものを用いた。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)にて分離しニトロセルロース膜へ転写した(14)。一次抗体としてリン酸化eNOS、total-eNOS、GAPDHはCell signaling、VEGF-AはAbcam、α-tubulinはCalbiochemの抗体を用いた。

#### 6-7 免疫組織学的解析

DOX投与2週間目のマウスの心臓を用いて解析を行った。組織は4%パラホルムアルデヒドにて24時間固定し、その後パラフィン固定をした。心筋梗塞後の心肥大および線維化を評価するために、それぞれ、ヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン・トライクロム染色にて評価を行った。また心筋の毛細血管数を評価するために内皮のマーカであるCD31を用いて染色を行った。線維化および毛細血管密度はLumina Vision Version 2.2にて解析を行った。

#### 6-8 血管新生因子アレイによる解析

血管新生因子関連タンパク質のプロテインアレイによる解析はR&Dのmouse angiogenesis antibody arrayを用いた。これは53個の血管新生に関連する蛋白の評価を同時に行うことができるものである。この解析は取り扱い指針に基づ



き行った。

## 6-9 統計学的解析

全ての統計学的結果は、平均値±標準誤差(mean±SEM)で表示した。心エコーにおけるグループ間の差は線形混合効果モデルを用いて解析を行った。多重比較においては、p-valueはBonferroni法にて補正を行った。生存曲線はカプランマイヤー法にて評価を行った。ウエスタンブロット法の解析はStudent t testにて評価を行った。P<0.05の場合に有意と判定した。

## 7 実験結果

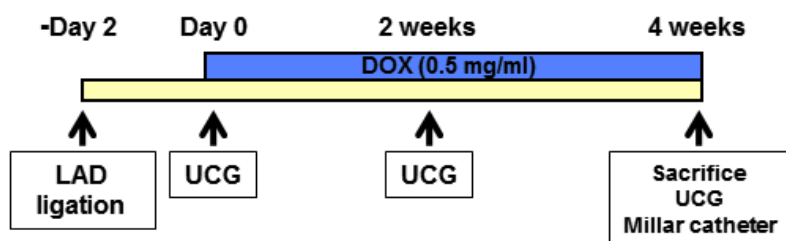
### 7-1 Akt1過剰発現による骨格筋増大は心筋梗塞後のリモデリングを抑制する

骨格筋の増大と心筋リモデリングとの関連を検討するため、Akt1 遺伝子導入前の WT マウスと Akt1TG マウスに LAD の恒久結紮による心筋梗塞もしくは sham 手術を行い 2 日目後に心エコーによる心機能評価を行った (図 1A)。心筋梗塞モデルでは sham 群に比べ有意に LVDd、LVDs が拡大し、%FS も減少していた。しかしながら WT マウスと Akt1TG マウスとの間には有意な差はなかった。その後、速やかにすべての群に DOX を飲水投与により Akt1 発現導入を開始し、2 週間後、4 週間後に心機能を評価した (図 1B)。

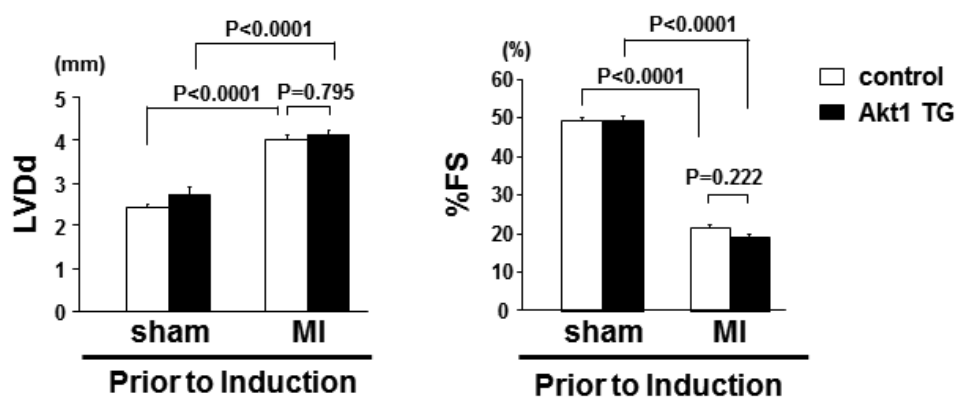
この任意の時期に遺伝子を導入できるシステムでは、DOX 投与による Akt1 の過剰発現は Akt1TG マウスの骨格筋にのみ認められ、心臓では Akt1 の発現亢進は確認されなかった (図 1C)。骨格筋の増大は腓腹筋の重量/体重比 (Skeletal Muscle /Body Weight(BW))にて評価を行った。Skeletal Muscle /BW は 2 週間、4 週間後ともに Akt1TG マウスにて認められたが、心筋梗塞によりこれらのパラメータが影響を受けることはなかった (図 1D)。なお除脂肪体重の増加率は 5% 程度と軽度であったが、この理由としては以前の我々の検討にてこのマウスモデルでは骨格筋の増大は速筋(腓腹筋や大腿四頭筋など)のみで認められ、ヒラメ筋などの遅筋では骨格筋の増大しなかったためであることが考えられた (図 1E)。

なお心筋梗塞後の死亡は主に 10 日以内に起こり、ほとんどが心破裂によるものであり、心不全もしくは不整脈による死因は 1 例のみであった。また WT マウスと Akt1TG マウス間では生存率には有意差は認めなかった (図 1F)。

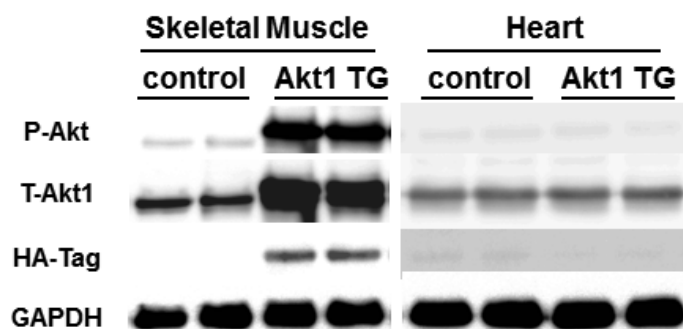
(A)



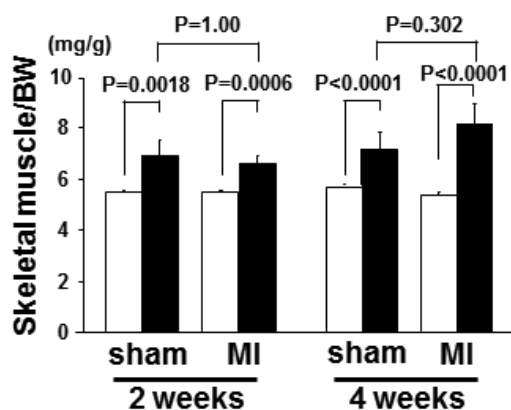
(B)



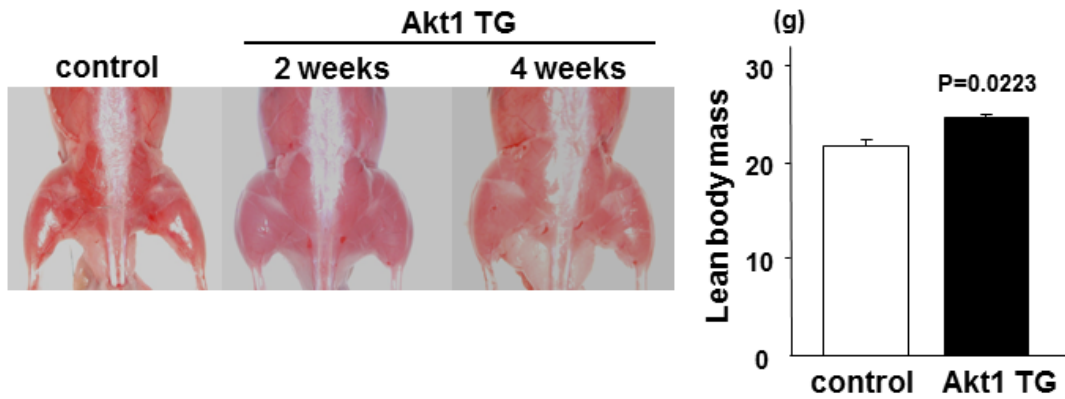
(C)



(D)



(E)



(F)

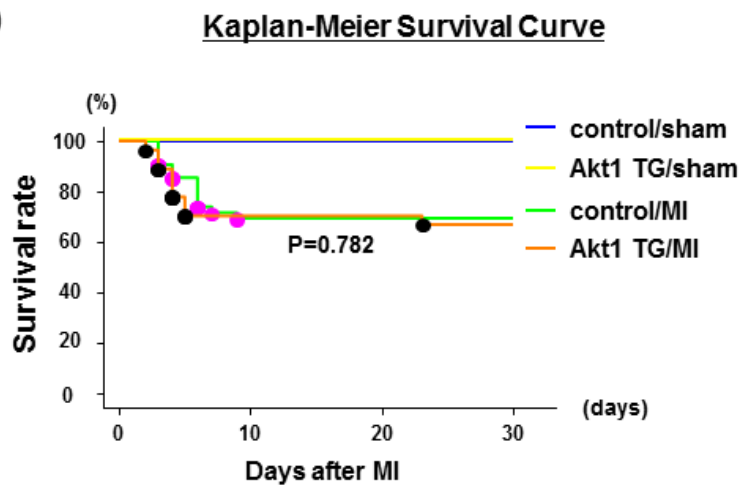


図 1A 実験プロトコール

B 心筋梗塞 2 日後の心エコーdata (各群 N=7)

C DOX2 週間投与後の Akt1 遺伝子の発現プロファイル

D DOX2 週間、4 週間投与後の腓腹筋重量/体重比

E 左 : DOX 投与 2 週、4 週間後の骨格筋

右 : DOX 投与 2 週間後の MRI 評価による除脂肪体重

F 心筋梗塞、sham 手術後の生存曲線 (WT sham:n=15 WT MI:n=20  
TG sham:n=10 TG MI:n=10)

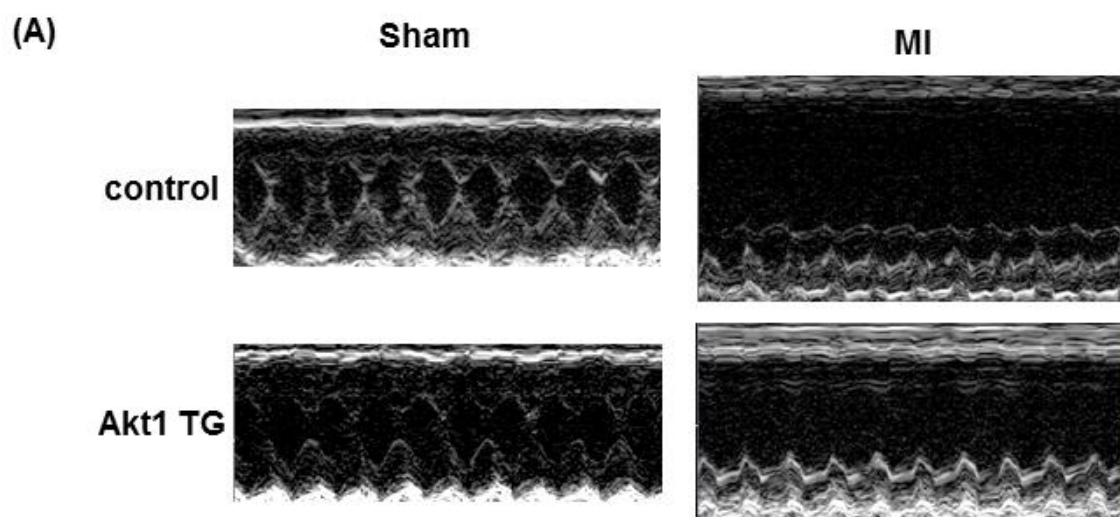
DOX 投与 4 週間後の体重と心拍数、平均動脈圧には WT マウスと Akt1TG マウス間には差はなかった。

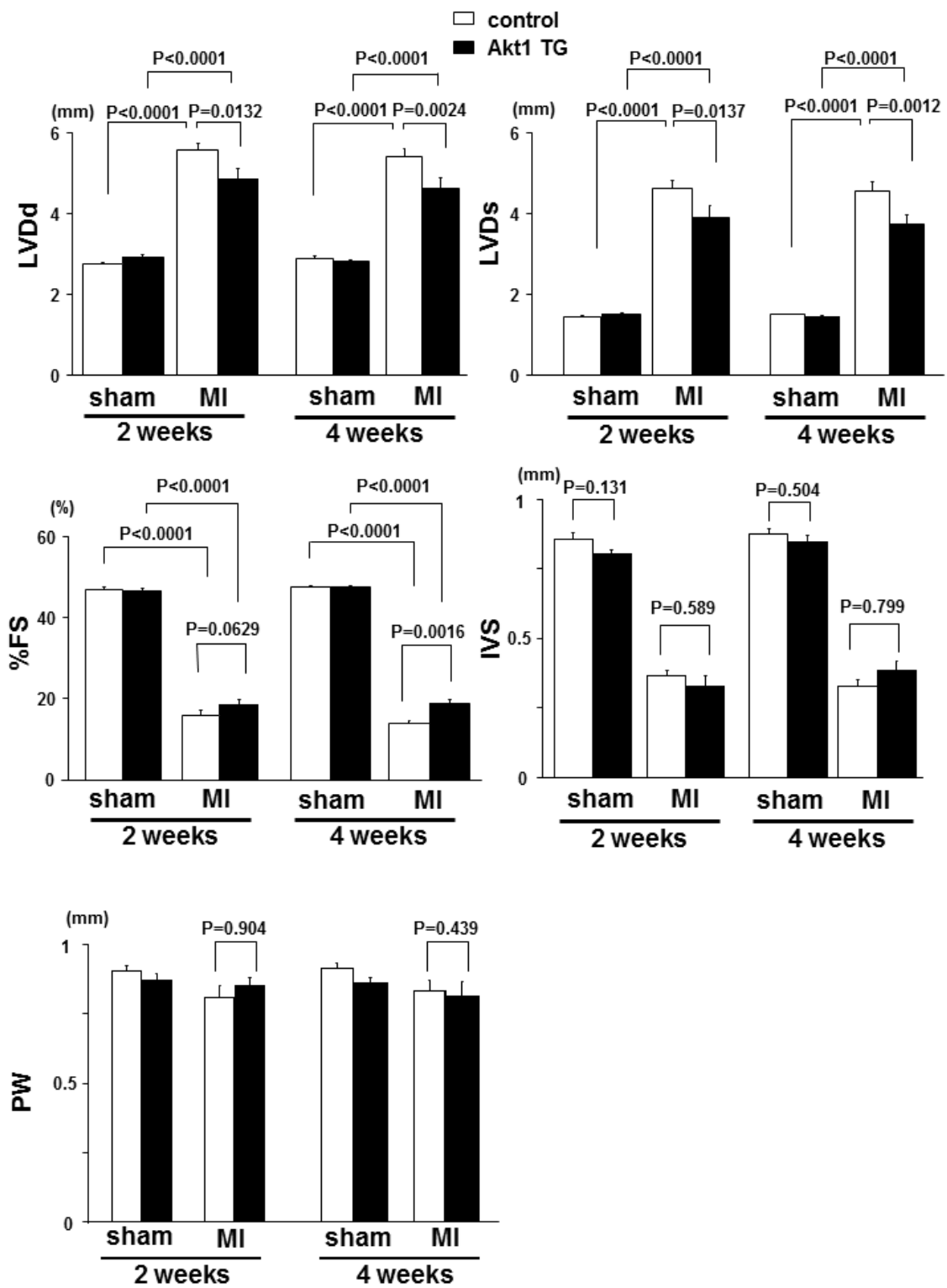
	Sham			MI		
	Control	Akt1 TG	<i>P</i> Value	Control	Akt1 TG	<i>P</i> Value
BW (g)	30.1±0.7	30.7±0.8	0.876	29.5±0.7	30.3±1.1	0.343
HR (bpm)	670±11	641±17	0.418	687±12	680±13	0.711
mAP (mm Hg)	63.0±2.7	65.9±3.7	0.631	54.2±1.1	58.2±1.1	0.189

Results are presented as mean±SEM. Measurements were made at 4 weeks post-surgery.

心エコー検査では骨格筋への Akt1 導入により、2 週間および 4 週間後の心筋梗塞後の LVDd 及び LVDs の拡大は WT マウスに比して有意に抑制されていた (図 2A)。この心保護効果は 2 週間後よりも 4 週間後でより顕著であり、4 週間後では %FS の減少も有意に抑制されていた。なお DOX 投与は sham 手術を行ったマウスに対しては、左室径や収縮力への影響を与えなかった。

収縮期血圧は心筋梗塞群において、WT マウス、Akt1TG マウス群ともに有意に低下していたが、両群間では有意な差はなかった (図 2B)。しかし左室の収縮力を反映する最大左室圧発生速度 (dP/dTmax) は DOX 投与 4 週間後の Akt1TG マウスにおいて有意に改善しており骨格筋における Akt1 過剰発現による心筋収縮力の保持が血行動態データ上からも示唆された。





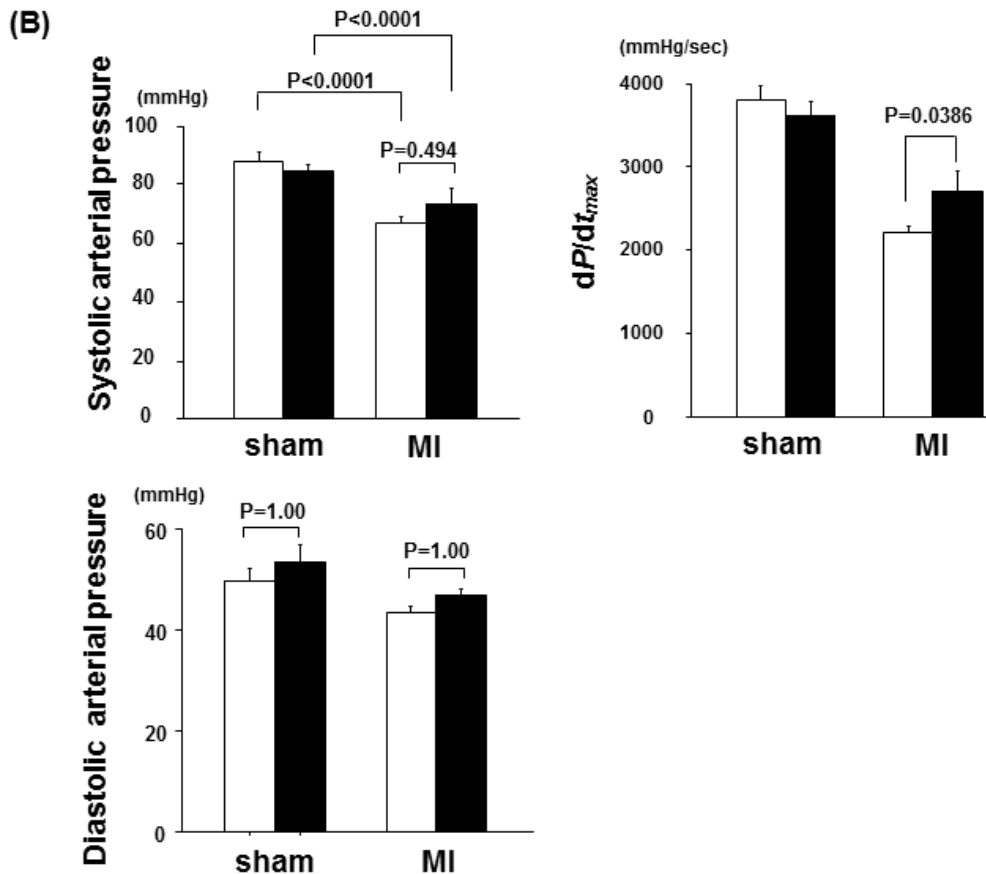


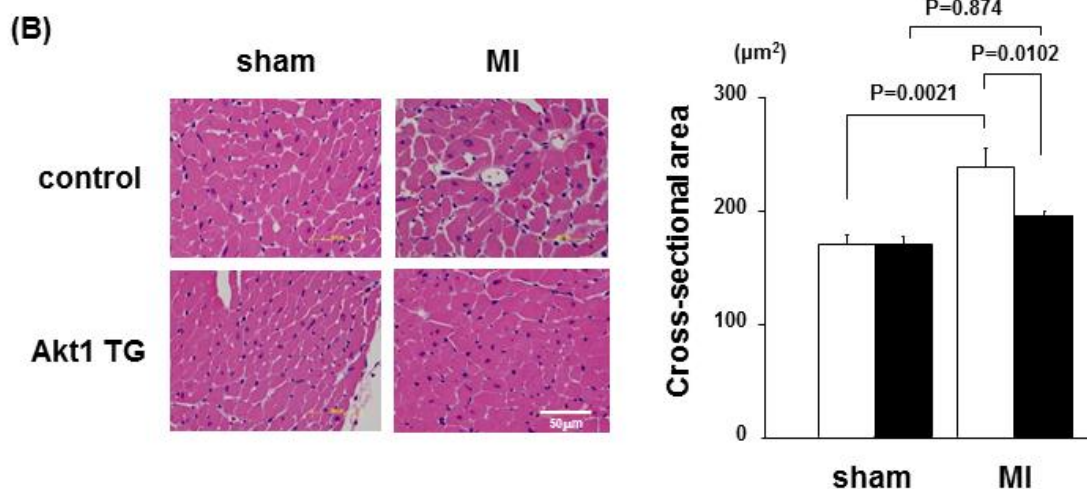
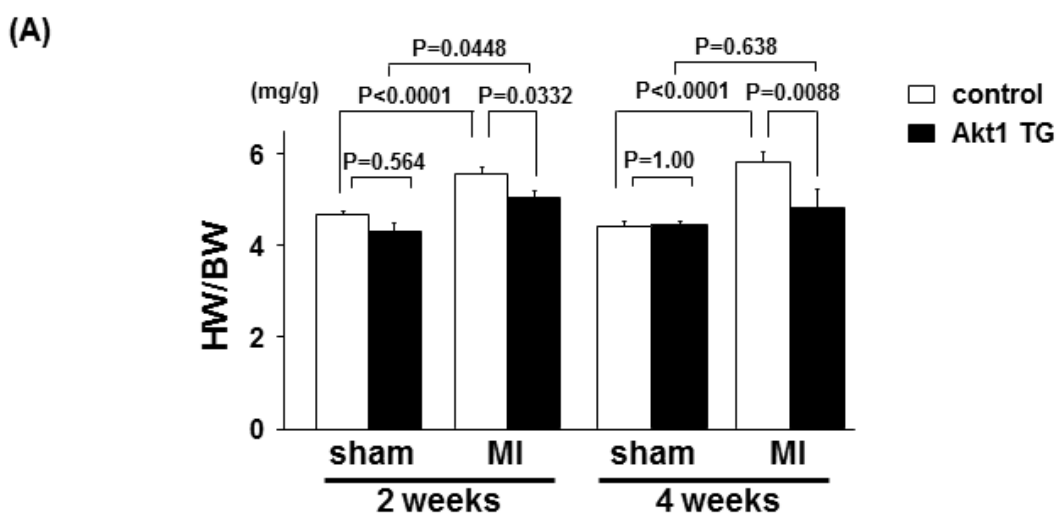
図 2 A 上 DOX 投与 4 週間後の左室乳頭筋レベルの M モード心エコー  
 下 DOX 投与 2 週間、4 週間後の心エコーパラメーター  
 B Millar カテーテルによる血行動態評価 (DOX 投与 4 週間後)

## 7-2 Akt1過剰発現による骨格筋増大は心筋梗塞後の心肥大および心不全を抑制する

心筋梗塞後のリモデリングを評価するため、WT マウスおよび Akt1TG マウス両群で心臓組織のヘマトキシリン・エオジン染色を行った。心筋梗塞のサイズは両群間では有意な差は認めなかった。しかし、心重量/体重比(heart weight/ BW (HW/BW))の増加はコントロールマウスと比較して Akt1 TG マウスで有意に軽度であり、その効果は 2 週間後よりも 4 週間後でより著明であった。なお sham 群においては WT マウスと Akt1TG マウス間での HW/BW の有意な差はなかった (図 3A)。また心筋梗塞後のリモデリングによる心肥大を評価するために、梗塞部から離れた健常部(remote zone)における心筋細胞横断面積を測定した。心筋細胞横断面積は Akt1TG マウスにおいて WT マウスに比して有意に減少し

ていた (図 3B)。また健常部における BNP の mRNA 発現亢進も Akt1TG マウスでは有意に減少していた。ただし、sham 群では BNP の発現レベルに差は認めなかった (図 3C)。これらより骨格筋肥大が心筋梗塞後の心肥大を抑制することが示唆された。

また心不全の指標となる肺重量/体重比(Lung weight/BW (LW/BW))は心筋梗塞後の WT マウスでは有意に増加した。しかし Akt1TG マウスでは LW/BW の増加は DOX 投与 2 週間後、4 週間後ともに認めず、肺うっ血の改善が示唆された (図 3D)。



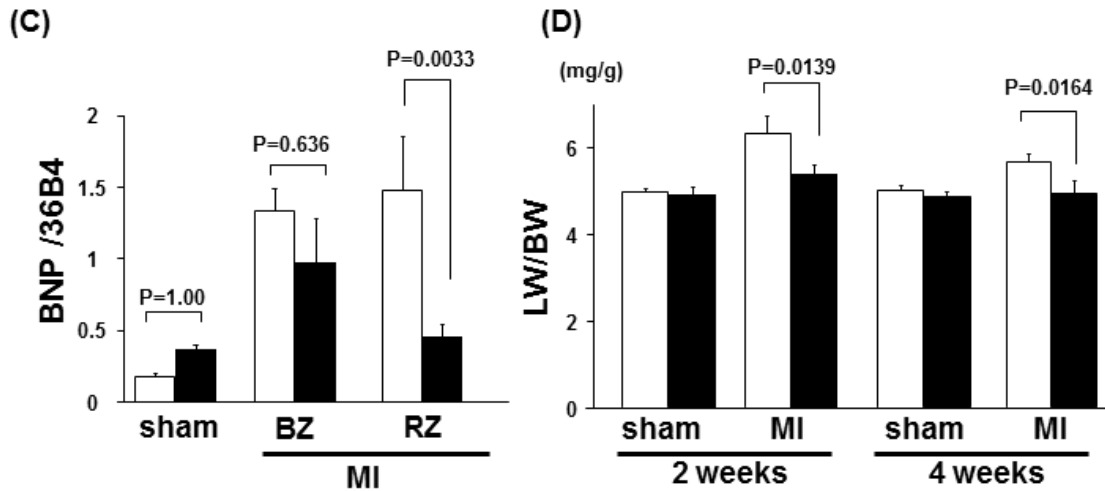


図 3A DOX 投与 2、4 週間後の HW/BW  
 B 左: 健常部の代表的な H. E. 染色  
 右: DOX 投与 2 週間後の健常部における心筋細胞横断面積の定量  
 C B-type natriuretic peptide の mRNA 発現レベル (DOX 投与 2 週間後)  
 D DOX 投与 2、4 週間後の LW/BW

### 7-3 Akt1TG マウスは心筋梗塞後の線維化を抑制し心筋毛細血管数を増加させる

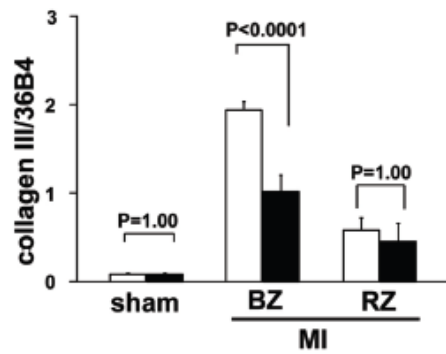
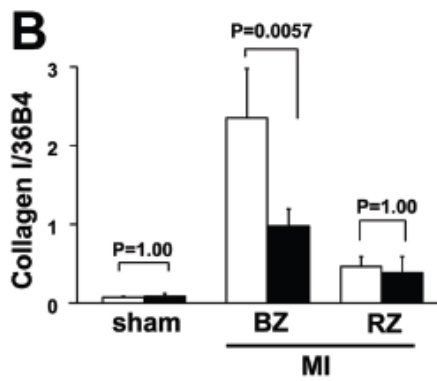
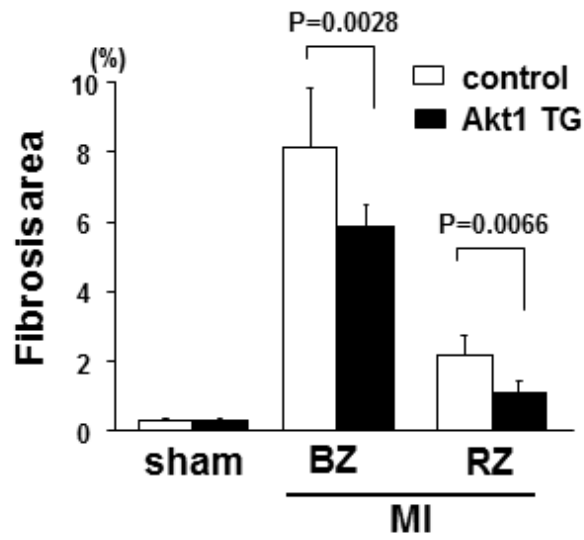
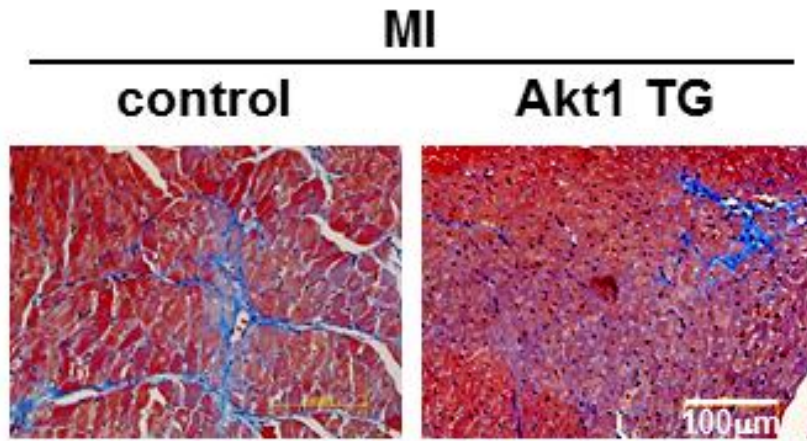
心筋間質の線維化は心筋梗塞後のリモデリングにおける重要な要素であるため、心臓組織のマッソン・トライクロム染色を行い、線維化を評価した。心筋梗塞後の線維化は心筋梗塞境界部 (BZ) および健常部 (RZ) とともに Akt1TG マウスにおいて減少していた (図 4A)。なお sham 群ではほとんど線維化部位は検出されなかった。また心筋梗塞境界部の線維化のマーカである、コラーゲン I および III の mRNA 発現も Akt1TG マウスにおいて有意に減少していた (図 4B)。なおコラーゲン I、III とともに sham 群では Akt1 過剰発現の影響は受けなかった。

DOX 投与 2 週間後の心臓を用いて毛細血管密度を CD31 染色にて評価した。梗塞境界部および健常部両方で、Akt1TG マウスは WT マウスに比して有意に毛細血管密度の上昇を認めた。なお Sham 群では Akt1 の骨格筋過剰発現は心臓での毛細血管数には影響を与えなかった。

これらの結果から、Akt1 による骨格筋増大は心筋梗塞後の再血管数の増加促進し、梗塞後の線維化を抑制したと考えられた。

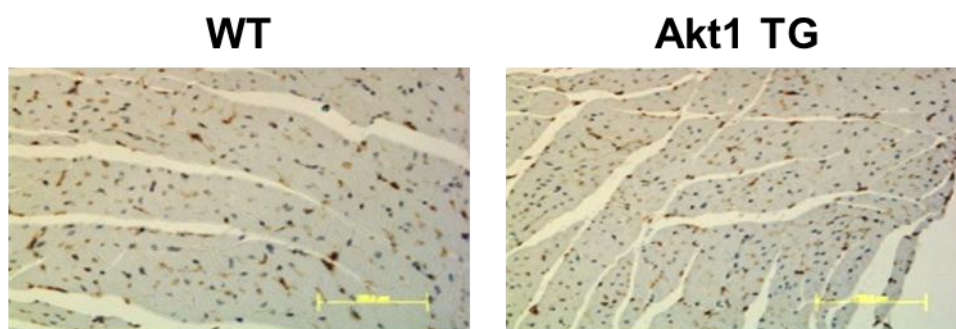


(A)



(C)

sham



MI (健全部)

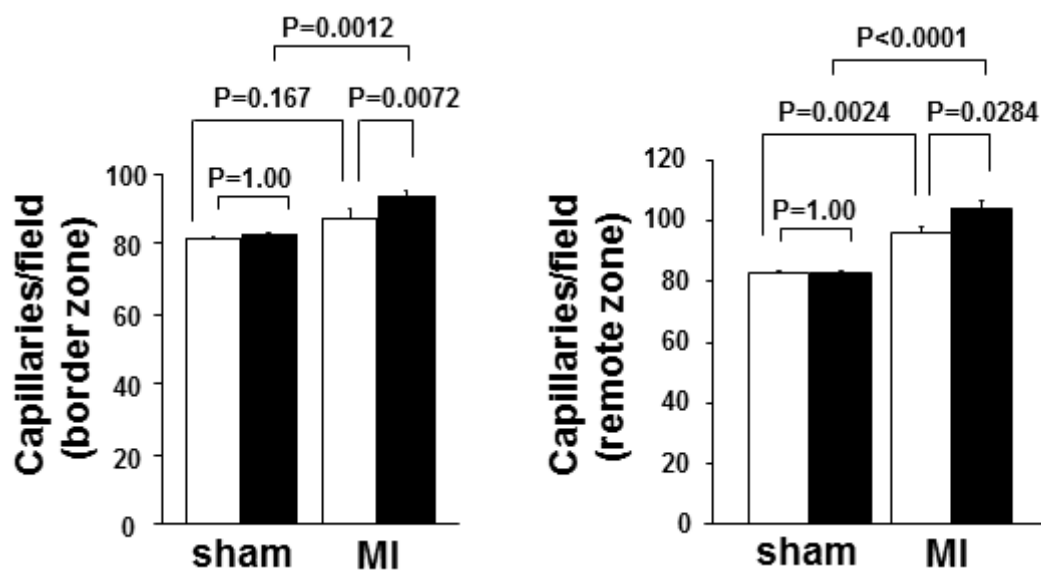
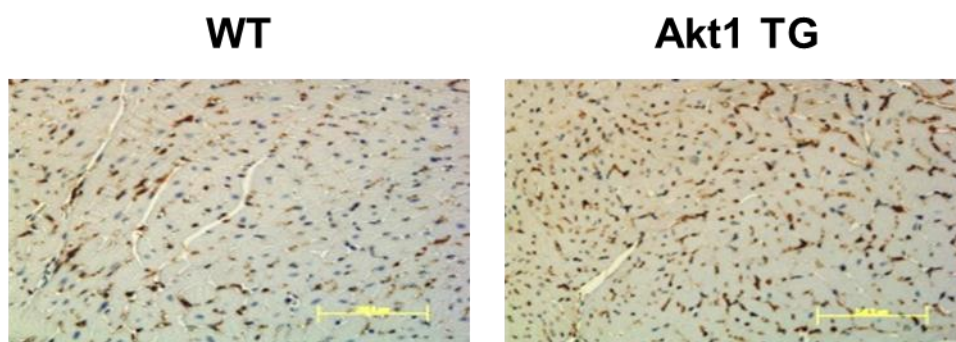


図 4A DOX2 週間投与後

左:代表的な梗塞境界部の MT 染色

右:心筋間質線維化の定量

B DOX2 週間投与後の心筋での線維化関連遺伝子の発現レベル

C DOX2 週間投与後

左:CD31 染色による健全領域

右:梗塞境界領域および健全領域の毛細血管密度の定量

7-4 Akt1 過剰発現による骨格筋の増大は血清中の血管新生因子を増加させる

骨格筋における Akt1 シグナルは血管新生因子の産生を制御しているとの報告があるため (18)、我々は mouse angiogenesis antibody array を用いて循環血液中の血管新生因子を半定量的に測定した。その結果、vascular endothelial growth factor (VEGF)-A、fibroblast growth factor (FGF)-1、FGF-2、stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) といった血管新生因子が Akt1TG マウスにおいて WT マウスに比べ有意に増加していた(図 5A)。それらの中でも、VEGF-A を ELISA にて定量的に測定したところ、Akt1TG マウスの血清で有意な増加を認めた ( $87 \pm 7$  versus  $69 \pm 11$  pg/ml,  $n=6$ ,  $P=0.0229$ )。また DOX2、4 週間投与後の骨格筋での VEGF-A の蛋白および mRNA 発現も、Akt1TG マウスにおいて有意に増加していた(図 5B)。心臓における VEGF-A の mRNA の発現量は WT マウスと Akt1TG マウス間では差はなく、Akt1 を過剰発現した骨格筋が血清で増加した VEGF の供給源である可能性が示唆された。

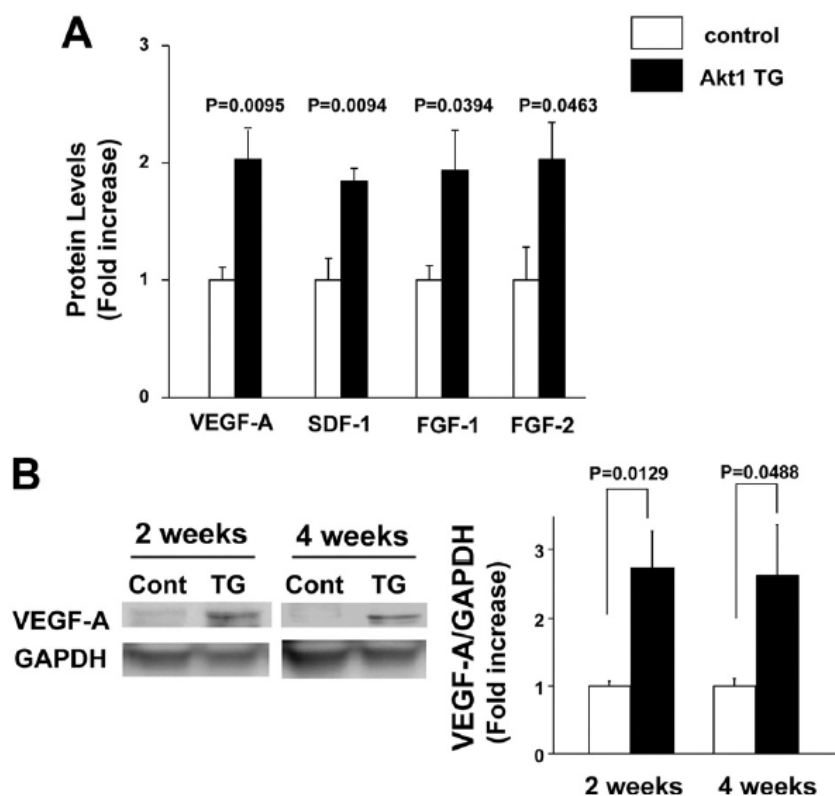


図 5A angiogenesis array を用いた血清中の血管新生因子の半定量測定(DOX2 週間投与後、各群 n=3)

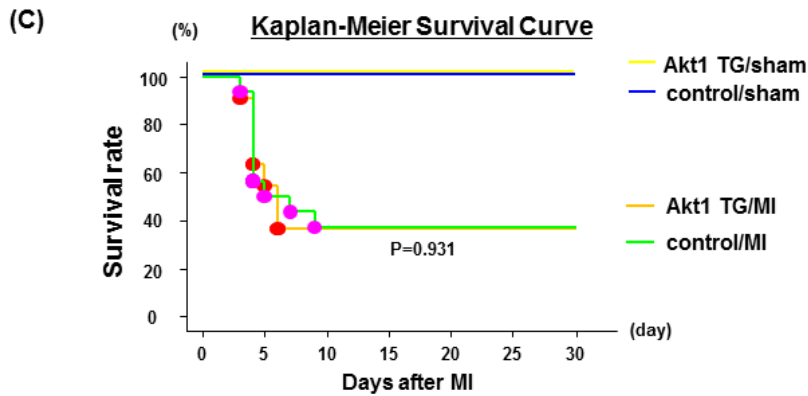
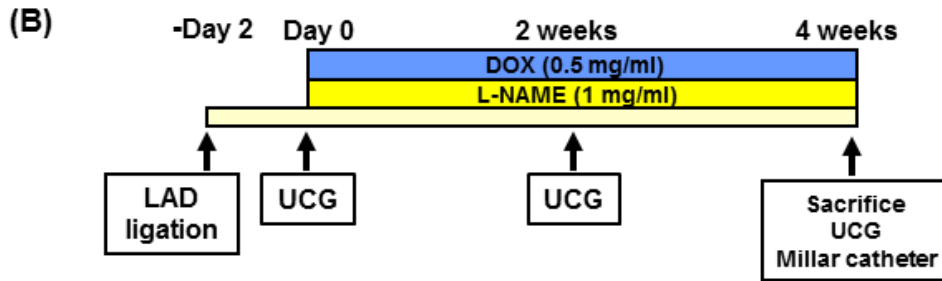
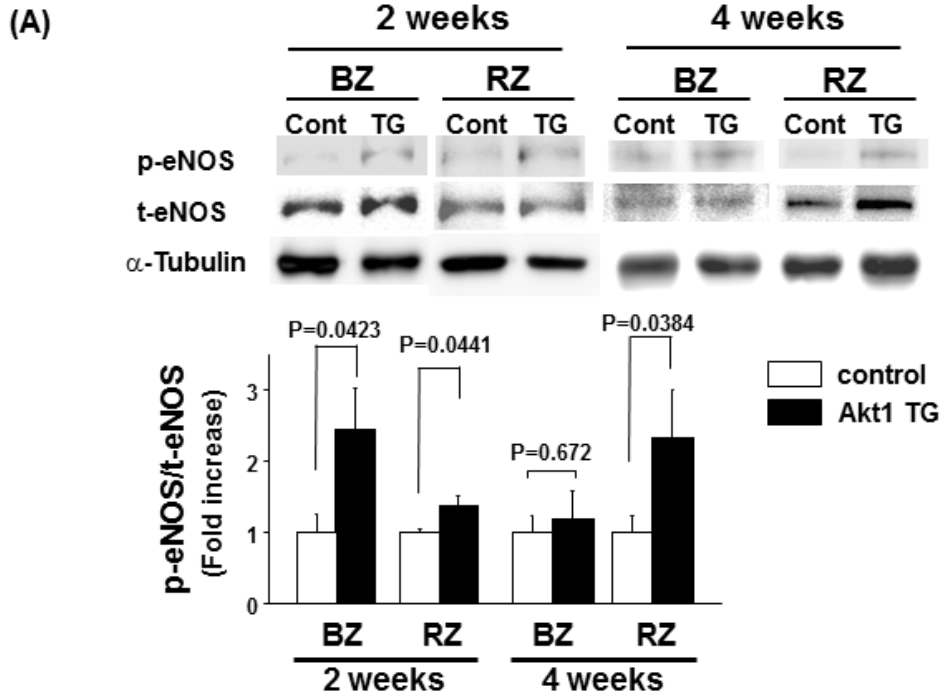
B 骨格筋における VEGF-A の蛋白レベルおよび mRNA レベルの発現

7-5 Akt1過剰発現による骨格筋増大の心筋梗塞後リモデリング抑制効果は NOSの阻害剤であるL-NAMEによる打ち消される

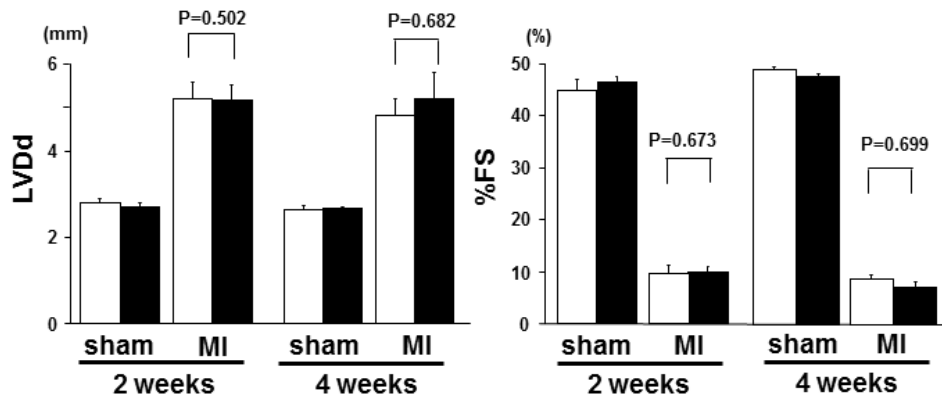
次に我々は Akt1 による骨格筋肥大の心保護作用の機序を検討するため、心筋梗塞後の心臓の細胞内シグナルを解析したところ、Akt1 TG マウスにおいて血管新生シグナルのひとつである endothelial NO synthase (eNOS)のセリン 1177 のリン酸化による活性化(19)が心筋梗塞境界部、健常部において有意に亢進していることを見出した (図 6A)。

心臓での eNOS の活性化が心臓リモデリング抑制に直接的に関与しているかを検討するため、コントロールマウスと Akt1 TG マウスに NOS の阻害薬である L-NAME (1mg/ml)を 4 週間飲水投与した(図 6B)。L-NAME 投与により、血清中の Nitric oxide (NO)の代謝産物である NOx は WT マウス、Akt1TG マウスともに低下した (図 7A)。また収縮期血圧は L-NAME 投与 2 週間、4 週間後ともに両群で有意に上昇した (図 7B)。心筋梗塞後の生存率は L-NAME 投与により心破裂が増加したことにより低下したが、WT マウスと Akt1TG マウス間では生存率には有意差は認めなかった (図 6C)。なお L-NAME 投与は Akt1TG マウスの骨格筋増大や骨格筋における VEGF-A の発現には影響を与えず(図 7C、D)、Akt1TG マウスにおける心臓での eNOS のリン酸化にも影響は与えなかった (図 7E)。

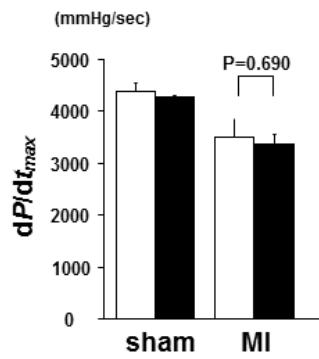
しかし心エコーによる心機能評価では Akt1 による骨格筋肥大の心保護効果(心拡大抑制、収縮力保持)は L-NAME の投与により消失し(図 6D)、Millar カテーテルを用いた血行動態検査では最大左室圧発生速度(dP/dTmax)の保持効果も消失した (図 6E)。また心肥大抑制効果や肺うっ血抑制効果も L-NAME により消失しており (図 6F)、これらの結果から Akt1 過剰発現による骨格筋肥大の心保護作用は eNOS 由来の NO を介している可能性が考えられた。



(D)



(E)



(F)

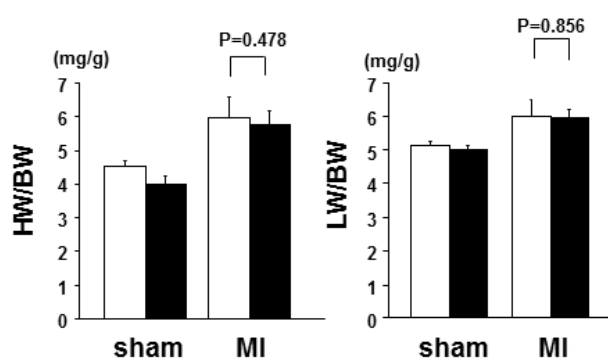
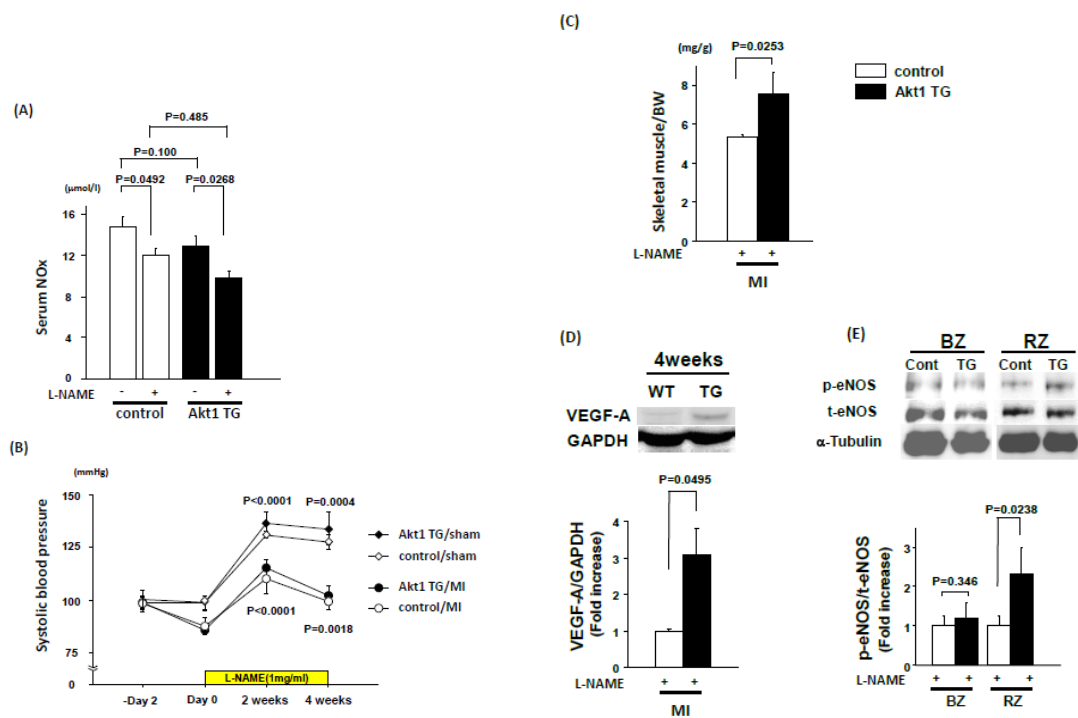


図 6A 心筋における eNOS の活性化の測定

- B L-NAME を用いた NOS の阻害実験のプロトコール
- C 術後の生存曲線(WT sham:n=4 WT MI:n=16  
TG sham:n=4 TG MI:n=11)
- D L-NAME 投与 2、4 週間後の心エコーパラメーター
- E・F L-NAME 投与 4 週間後の dP/dT<sub>max</sub> および心重量・肺重量



**図 7 A** L-NAME 投与後の血清中の NO<sub>x</sub> 測定  
**B** 収縮期血圧のタイムコース  
**C・D** L-NAME 4 週間投与後の骨格筋/体重比および VEGF の発現測定  
**E** L-NAME 投与 4 週間後の心筋での eNOS の活性化の測定

## 8.考察

骨格筋の肥大における Akt1 シグナルの重要性は広く知られている (20) (21)。我々は以前にテトラサイクリンによる骨格筋特異的に Akt1 を過剰発現させるマウスモデルを用いて、速筋の成分である IIb 型筋線維が増加し筋線維が増大することを見出した (11)。IIb 型筋線維はレジスタンス運動により肥大し、速く強い筋収縮を引き起こすことができる。このマウスモデルでは握力の増加が認められる一方、有酸素運動能の軽度の低下を示した (11)。このマウスモデルを用いて、本研究では 5% の除脂肪体重の増加が心梗塞後の心機能低下と心筋リモデリングを抑制したことを示した。Akt1 の過剰発現は骨格筋のみで認められたにも関わらず、心臓での毛細血管数の増加や心筋間質の線維化の減少を認めた。Akt1 による骨格筋の増大は心重量の増加や肺うっ血の軽減し、さらに B タイプナトリウム利尿ペプチドの発現も減少させ、これらの所見から骨格筋量が慢性的な心筋虚血に対する心筋リモデリングへ影響を与えることが示唆された。

骨格筋は全身の約 40% を占める臓器であり運動器としての機能のみならず、糖・脂質代謝においても重要な役割を演じている。我々の用いた骨格筋特異的 Akt1 誘導型過剰発現マウスでは、上記の心臓リモデリング抑制効果に加えてメタボリックシンドロームに対する作用や血管新生・サテライト細胞の誘導・血管内皮前駆細胞の末梢血中への動因などの表現型が認められている (11)。このことから骨格筋細胞からの液性因子いわゆる骨格筋由来ホルモンを介した骨格筋細胞と遠隔臓器との相互作用の存在が強く示唆された。この仮説を支持する所見として、我々は骨格筋の Akt1 発現により VEGF-A、SDF-1、FGF-2 を含む血清中の血管新生因子が増加することを見出した。この血管新生因子の増加が心臓における eNOS のセリン 1177 のリン酸化の増加と関連していると考えられた。また eNOS が血管新生のシグナルであるため、心臓における毛細血管数の増加につながったと考えられた。

骨格筋の増大モデルと比較し、有酸素運動の心筋梗塞後のリモデリングの抑制についてはよく知られている。臨床研究では有酸素運動は運動耐容能を増加し、さらに心筋梗塞後の好ましくないリモデリングを抑制することが報告されている (22) (23) (24)。動物モデルではホイールランニングやスイミングトレーニングといった有酸素運動は心梗塞後の心機能低下を抑制することが知られている (25) (26)。その抗心臓リモデリング効果は $\beta$ 1 アドレナリンシグナルや心筋線維機能の改善や筋小胞体のカルシウムポンプや筋細胞膜のナトリウム-カルシウム交換蛋白の増加によるものと考えられている。また心筋梗塞前に有酸素



運動をすることにより梗塞サイズを減少させ、リモデリングによる心機能低下を減弱することも動物モデルでは報告されている (27) (28)。

近年、心筋梗塞後の有酸素運動の有用性が内因性の eNOS に依存しているとの報告がされ (29)、実際に我々の研究でも骨格筋増大に伴う心保護作用は NOS の阻害剤にて消失している。しかしながらこの骨格筋増大による eNOS の重要性に関してはいくつかの疑問が残る。一つは心臓の eNOS だけではなく、全身の血管も含めた eNOS の活性化がこの心保護に寄与している可能性は否定できないことである。しかし eNOS が活性化していれば血管拡張作用を示すはずであるが、L-NAME 投与による血圧上昇は WT マウスと Akt1TG マウス間で差はなく、全身の eNOS が心保護に主要な働きがある可能性は低いと思われる。またどのようにして心臓の eNOS が活性化されているのかも不明であるが、いくつかの骨格筋由来の血管新生因子が関与している可能性があり、この機序に関しては今後も研究が必要である。

有酸素運動は遅筋内のミトコンドリアを増加し、筋肉における酸素摂取を上げている。一方、レジスタンストレーニングは速筋の肥大を促し、筋肉量を増加させる。臨床においては 30 歳代以降では 10 年ごとに 3kg の筋肉量が失われていくといわれている (30)。我々はこの速筋の筋量の減少が、様々な年齢と関連のある心血管病の一因となっていると仮説を立てた。実際、筋肉の減少は心不全患者における死亡の独立した因子であり、これは心不全患者の筋肉内の Akt1 シグナルの減弱と関連があると考えられる。遺伝子操作や薬剤投与によるいくつかの骨格筋量を増大するようなマウスモデルはあるものの (31) (32) (33)、心臓疾患へ影響を与えるものは報告されていなかった。我々の研究は骨格筋量の増大が心筋梗塞後のリモデリングを抑制することを初めて支持するものである。若年者よりも骨格筋量に劣る高齢者の方が心筋梗塞後の心不全が進行しやすいことから (34)、速筋量を維持することは心筋梗塞後のリモデリングを抑制することにつながるかもしれない。

また近年、骨格筋は様々な液性因子を分泌し他の組織と関連し、心血管内分泌代謝制御を行っている可能性が示唆されている。これら骨格筋由来ホルモンを介した骨格筋と他臓器とのコミュニケーションの分子機序を明らかにすることは心血管疾患やメタボリックシンドローム患者に対して運動療法を施行する際の新たな理論的根拠となりうる。

以下にその例を述べる。

心血管系に作用する骨格筋由来ホルモン

### (1)Vascular endothelial growth factor

血管新生因子である Vascular endothelial growth factor (VEGF)は Akt シグナルの活性化 (18)やトレッドミル (35)に伴い骨格筋、特に type II 線維からの分泌が亢進し血管新生に寄与していることが報告されている。骨格筋細胞の生理的な肥大は協調した血管新生を伴う必要があり VEGF はその中心的な役割を担っているものと考えられる。また骨格筋由来の VEGF はオートクライン的に作用し骨格筋細胞の分化・肥大の過程においても重要な役割を演じている(36)。

### (2)Follistatin like-1

Follistatin ファミリーの一員である Follistatin like-1 (Fstl-1)も Akt シグナルの活性化により骨格筋より分泌される骨格筋由来ホルモンであることが報告されている (37)。 Fstl-1 のタンパク発現は Akt1 の活性化により骨格筋で著明に増加し、それに伴い血中濃度も有意な増加する。下肢虚血手術を施行したマウスの骨格筋に Fstl-1 を遺伝子導入すると Akt と eNOS の活性化を認め、著明な血流改善と毛細血管数の増加を認めた。Fstl-1 による血流改善効果は eNOS ノックアウトマウスでは認められなかったことから、Fstl-1 の血管内皮細胞に対する作用は Akt/eNOS 経路を介していることが示唆された。Fstl-1 は骨格筋のみならず心筋細胞からも発現が誘導されることが明らかとなっており、心筋虚血再灌流モデルにおいて心筋細胞のアポトーシスを抑制し心保護的に働くことが報告されている (38)。臨床的にも Fstl-1 は虚血性・非虚血性心不全患者の心臓組織での発現が増加することが知られており、その血中濃度は左室重量係数や BNP 値と正の相関があることが報告されており (39)、新規の心疾患のバイオマーカーとして期待されている。また最近の知見として、ブタやマウスに Fstl-1 蛋白を投与することにより虚血再灌流障害を抑制することが報告されており、急性冠症候群の患者への新たな治療選択となりうる可能性がある (40)。

### (3)Interleukin- 1 $\beta$

Tateno らは末梢血単核球移植の際の血管新生は、移植した細胞が産生する血管新生因子よりも、移植により再生が促進された骨格筋から分泌される因子が重要であることを報告している(41)。野生型マウスに Interleukin- 1  $\beta$  (IL1- $\beta$ )ノックアウトマウスの骨髄を移植し下肢虚血手術を行ったところ血流改善効果が認められたが、IL1- $\beta$ ノックアウトマウスに野生型マウスの骨髄を移植しても有意な血流改善は得られなかったことから、骨格筋由来の IL1- $\beta$ が血管新生作用の中心的な役割を演じていることが示唆された。

## -内分泌代謝系に作用する骨格筋由来ホルモン-

### (1)Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6)は最も研究が進んでいる骨格筋由来ホルモンのひとつである。1994年に Ullum ら(42)が自転車エルゴメータ運動により血中の IL-6 が著明に増加することを報告したが、当初その機序は運動による骨格筋線維の破壊によるものと考えられてきた。しかしながら骨格筋での IL-6 mRNA 発現が運動により有意に上昇することが証明され、IL-6 は運動により発現が亢進する骨格筋由来ホルモンとして認識されることとなった (43)。骨格筋細胞において IL-6 は gp130 受容体に結合し AMP kinase や PI3 kinase などのシグナルカスケードを活性化し、細胞内へのグルコースの取り込みや脂肪酸の燃焼を促進することで代謝に好影響を与えることが知られている。しかしながら一方で IL-6 は炎症性サイトカインのひとつとして広く認識されており、SOCS-3 の発現亢進を介して肝臓でのインスリン抵抗性を惹起することも報告されている (44)。以上のように IL-6 の作用は標的臓器によって異なっているため、代謝制御における役割については今後更なる検討が必要である。

### (2)Fibroblast Growth Factor-21

Fibroblast Growth Factor-21 (FGF-21)は成長因子である FGF ファミリーの一員であるが細胞の増殖や成長にはあまり関与せず、むしろ糖・脂質代謝において重要な役割を果たす新規代謝調節因子として近年注目を集めている生理活性物質である (45)。FGF-21 は主に肝臓から分泌されるタンパクであると考えられていたが、最近骨格筋でも肝臓と同程度に発現していること、さらに骨格筋での Akt1 の過剰発現により著明に分泌が亢進し血中濃度の上昇に寄与することが報告されている(46)。培養骨格筋細胞を用いた検討で、FGF-21 の発現・分泌はインスリン/PI3 キナーゼ/Akt シグナルを介して制御されていることが証明されている(46)。骨格筋が FGF-21 の供給源のひとつであることを支持するデータとして、Hojman らは臨床研究において、インスリンの持続注入により骨格筋での mRNA 発現および血中の FGF-21 濃度が上昇することを報告している (47)。

### (3)Interleukin-15

Interleukin-15 (IL-15)はもともと骨格筋での発現が高いアナボリックファクターとして知られており (48)、実際 IL-15 の血中濃度はレジスタンストレーニング後に有意に増加することが報告されている。IL-15 自身は培養骨格筋細胞における検討で IGF-1 とは異なる機序で骨格筋肥大や分化に関与することが報告されていることから (49)、骨格筋萎縮に対する治療標的になりうると考えられて

いる。遠隔臓器への作用としては、Quinnらは骨格筋特異的 IL-15 トランスジェニックマウスを作製し IL-15 の血中濃度を上昇させると、他のサイトカイン発現には影響を与えることなく体脂肪を減少させることを示した (50)。骨格筋に対する作用のみならず、脂肪細胞に作用し抗肥満作用を発揮することから (51)、IL-15 は骨格筋と脂肪組織の相互作用を仲介するメディエーターのひとつである可能性が示唆されている。

#### (4)Musclin

Nishizawaらはマウス骨格筋 cDNA の signal sequence trap 法により骨格筋由来の分泌タンパク Musclin を同定し、骨格筋での糖代謝における機能を報告している (52)。In vivo において Musclin の mRNA 発現レベルは栄養状態により制御されており、骨格筋細胞においては分化に伴い発現が亢進する。Musclin は骨格筋細胞にオートクライン的に働きかけ、インスリン刺激によるグルコース取り込みとグリコーゲン合成を著明に抑制しすることが報告されており、糖代謝に影響を与える骨格筋由来ホルモンであることが示唆されている。Musclin はナトリウム利尿ペプチド受容体 3(NPR3)に競合的に結合することが証明され、ナトリウム利尿ペプチドの生理活性を調節している可能性も示唆されている (53)。

#### (5)Irisin

脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PGC-1 $\alpha$  は骨格筋細胞の II 型から I 型への形質転換に寄与する。骨格筋での PGC-1 $\alpha$  の過剰発現や有酸素運動により骨格筋細胞の膜タンパクである FNDC5 の発現が増加する。FNDC5 が切断を受け循環血中に分泌されたものが新規代謝調節ホルモンとして同定された Irisin である (54)。Irisin は白色脂肪細胞の褐色化を促進し、摂食や日中活動度を変化させることなくエネルギー消費を上昇させ糖代謝改善に寄与することが報告されている。

## 9.結語

Akt1による速筋量の増加は心筋梗塞後のリモデリングや心機能低下を抑制した。この所見はレジスタンストレーニングが心不全患者における新たな運動療法となる理論的根拠を与えるものとなりうる。特に有酸素運動を行うことができない患者においては、重要な介入手段となり得ると考えられる。

また骨格筋と他臓器間の連関を研究することは心血管病の新たな治療ターゲットの発見へとつながる可能性がある。今後は上記骨格筋由来ホルモンの種々の病態生理条件下における発現制御、その臨床的意義に関する更なる検討が必要と考えられる。

## 参考文献

1. Anker, S.D., Ponikowski, P., Varney, S., Chua, T.P., Clark, A.L., Webb-Peploe, K.M., Harrington, D., Kox, W.J., Poole-Wilson, P.A., and Coats, A.J. 1997. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* 349:1050-1053.
2. Piepoli, M.F., Davos, C., Francis, D.P., and Coats, A.J. 2004. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* 328:189.
3. Caforio, A.L., Rossi, B., Risaliti, R., Siciliano, G., Marchetti, A., Angelini, C., Crea, F., Mariani, M., and Muratorio, A. 1989. Type 1 fiber abnormalities in skeletal muscle of patients with hypertrophic and dilated cardiomyopathy: evidence of subclinical myogenic myopathy. *J Am Coll Cardiol* 14:1464-1473.
4. Kemi, O.J., Loennechen, J.P., Wisloff, U., and Ellingsen, O. 2002. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 93:1301-1309.
5. Braith, R.W., and Stewart, K.J. 2006. Resistance exercise training: its role in the prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 113:2642-2650.
6. Williams, M.A., Haskell, W.L., Ades, P.A., Amsterdam, E.A., Bittner, V., Franklin, B.A., Gulanick, M., Laing, S.T., and Stewart, K.J. 2007. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 116:572-584.
7. Nader, G.A., and Esser, K.A. 2001. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol* 90:1936-1942.
8. Atherton, P.J., Babraj, J., Smith, K., Singh, J., Rennie, M.J., and Wackerhage, H. 2005. Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J* 19:786-788.
9. Toth, M.J., Ward, K., van der Velden, J., Miller, M.S., Vanburen, P., Lewinter, M.M., and Ades, P.A. 2011. Chronic heart failure reduces Akt phosphorylation in human skeletal muscle: relationship to muscle size and function. *J Appl Physiol* 110:892-900.
10. Heineke, J., Auger-Messier, M., Xu, J., Sargent, M., York, A., Welle, S., and Molkentin, J.D. 2010. Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation* 121:419-425.
11. Izumiya, Y., Hopkins, T., Morris, C., Sato, K., Zeng, L., Viereck, J., Hamilton, J.A., Ouchi, N., LeBrasseur, N.K., and Walsh, K. 2008. Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab* 7:159-172.

12. Grill, M.A., Bales, M.A., Fought, A.N., Rosburg, K.C., Munger, S.J., and Antin, P.B. 2003. Tetracycline-inducible system for regulation of skeletal muscle-specific gene expression in transgenic mice. *Transgenic Res* 12:33-43.
13. Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R., Colucci, W.S., and Walsh, K. 2005. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 115:2108-2118.
14. Shield, M.A., Haugen, H.S., Clegg, C.H., and Hauschka, S.D. 1996. E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. *Mol Cell Biol* 16:5058-5068.
15. De Vita, G., Berlingieri, M.T., Visconti, R., Castellone, M.D., Viglietto, G., Baldassarre, G., Zannini, M., Bellacosa, A., Tschlis, P.N., Fusco, A., et al. 2000. Akt/protein kinase B promotes survival and hormone-independent proliferation of thyroid cells in the absence of dedifferentiating and transforming effects. *Cancer Res* 60:3916-3920.
16. Shibata, R., Izumiya, Y., Sato, K., Papanicolaou, K., Kihara, S., Colucci, W.S., Sam, F., Ouchi, N., and Walsh, K. 2007. Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 42:1065-1074.
17. Izumiya, Y., Shiojima, I., Sato, K., Sawyer, D.B., Colucci, W.S., and Walsh, K. 2006. Vascular endothelial growth factor blockade promotes the transition from compensatory cardiac hypertrophy to failure in response to pressure overload. *Hypertension* 47:887-893.
18. Takahashi, A., Kureishi, Y., Yang, J., Luo, Z., Guo, K., Mukhopadhyay, D., Ivashchenko, Y., Branellec, D., and Walsh, K. 2002. Myogenic Akt signaling regulates blood vessel recruitment during myofiber growth. *Mol Cell Biol* 22:4803-4814.
19. Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601.
20. Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., et al. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 3:1014-1019.
21. Lai, K.M., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, A.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. 2004. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol* 24:9295-9304.
22. Dubach, P., Myers, J., Dziekan, G., Goebels, U., Reinhart, W., Vogt, P., Ratti, R., Muller, P., Miettunen, R., and Buser, P. 1997. Effect of exercise training on myocardial remodeling in patients with reduced left ventricular function after myocardial infarction: application

- of magnetic resonance imaging. *Circulation* 95:2060-2067.
23. Giannuzzi, P., Temporelli, P.L., Corra, U., Gattone, M., Giordano, A., and Tavazzi, L. 1997. Attenuation of unfavorable remodeling by exercise training in postinfarction patients with left ventricular dysfunction: results of the Exercise in Left Ventricular Dysfunction (ELVD) trial. *Circulation* 96:1790-1797.
  24. Otsuka, Y., Takaki, H., Okano, Y., Satoh, T., Aihara, N., Matsumoto, T., Yasumura, Y., Morii, I., and Goto, Y. 2003. Exercise training without ventricular remodeling in patients with moderate to severe left ventricular dysfunction early after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 87:237-244.
  25. de Waard, M.C., van der Velden, J., Bito, V., Ozdemir, S., Biesmans, L., Boontje, N.M., Dekkers, D.H., Schoonderwoerd, K., Schuurbijs, H.C., de Crom, R., et al. 2007. Early exercise training normalizes myofilament function and attenuates left ventricular pump dysfunction in mice with a large myocardial infarction. *Circ Res* 100:1079-1088.
  26. Wisloff, U., Loennechen, J.P., Currie, S., Smith, G.L., and Ellingsen, O. 2002. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 54:162-174.
  27. de Waard, M.C., and Duncker, D.J. 2009. Prior exercise improves survival, infarct healing, and left ventricular function after myocardial infarction. *J Appl Physiol* 107:928-936.
  28. Freimann, S., Scheinowitz, M., Yekutieli, D., Feinberg, M.S., Eldar, M., and Kessler-Icekson, G. 2005. Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. Heart structure, function, and gene expression. *J Am Coll Cardiol* 45:931-938.
  29. de Waard, M.C., van Haperen, R., Soullie, T., Tempel, D., de Crom, R., and Duncker, D.J. 2010. Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full eNOS expression. *J Mol Cell Cardiol* 48:1041-1049.
  30. Tzankoff, S.P., and Norris, A.H. 1977. Effect of muscle mass decrease on age-related BMR changes. *J Appl Physiol* 43:1001-1006.
  31. Guo, T., Jou, W., Chanturiya, T., Portas, J., Gavrilova, O., and McPherron, A.C. 2009. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One* 4:e4937.
  32. McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83-90.
  33. Wenz, T., Rossi, S.G., Rotundo, R.L., Spiegelman, B.M., and Moraes, C.T. 2009. Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:20405-20410.
  34. Ezekowitz, J.A., Kaul, P., Bakal, J.A., Armstrong, P.W., Welsh, R.C., and McAlister, F.A.



2009. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 53:13-20.
35. Birot, O.J., Koulmann, N., Peinnequin, A., and Bigard, X.A. 2003. Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. *J Physiol* 552:213-221.
36. Bryan, B.A., Walshe, T.E., Mitchell, D.C., Havumaki, J.S., Saint-Geniez, M., Maharaj, A.S., Maldonado, A.E., and D'Amore, P.A. 2008. Coordinated vascular endothelial growth factor expression and signaling during skeletal myogenic differentiation. *Mol Biol Cell* 19:994-1006.
37. Ouchi, N., Oshima, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Ikegami, C., Izumiya, Y., and Walsh, K. 2008. Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *J Biol Chem* 283:32802-32811.
38. Oshima, Y., Ouchi, N., Sato, K., Izumiya, Y., Pimentel, D.R., and Walsh, K. 2008. Follistatin-like 1 is an Akt-regulated cardioprotective factor that is secreted by the heart. *Circulation* 117:3099-3108.
39. El-Armouche, A., Ouchi, N., Tanaka, K., Doros, G., Wittkopper, K., Schulze, T., Eschenhagen, T., Walsh, K., and Sam, F. 2011. Follistatin-like 1 in chronic systolic heart failure: a marker of left ventricular remodeling. *Circ Heart Fail* 4:621-627.
40. Ogura, Y., Ouchi, N., Ohashi, K., Shibata, R., Kataoka, Y., Kambara, T., Kito, T., Maruyama, S., Yuasa, D., Matsuo, K., et al. 2012. Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. *Circulation* 126:1728-1738.
41. Tateno, K., Minamino, T., Toko, H., Akazawa, H., Shimizu, N., Takeda, S., Kunieda, T., Miyachi, H., Oyama, T., Matsuura, K., et al. 2006. Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res* 98:1194-1202.
42. Ullum, H., Haahr, P.M., Diamant, M., Palmo, J., Halkjaer-Kristensen, J., and Pedersen, B.K. 1994. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol* 77:93-97.
43. Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., and Klarlund Pedersen, B. 2000. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* 529 Pt 1:237-242.
44. Senn, J.J., Klover, P.J., Nowak, I.A., Zimmers, T.A., Koniaris, L.G., Furlanetto, R.W., and Mooney, R.A. 2003. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 278:13740-13746.
45. Kharitonov, A., and Shanafelt, A.B. 2008. Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. *BioDrugs* 22:37-44.

46. Izumiya, Y., Bina, H.A., Ouchi, N., Akasaki, Y., Kharitonov, A., and Walsh, K. 2008. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* 582:3805-3810.
47. Hojman, P., Pedersen, M., Nielsen, A.R., Krogh-Madsen, R., Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, S., and Pedersen, B.K. 2009. Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. *Diabetes* 58:2797-2801.
48. Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M., et al. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264:965-968.
49. Furmanczyk, P.S., and Quinn, L.S. 2003. Interleukin-15 increases myosin accretion in human skeletal myogenic cultures. *Cell Biol Int* 27:845-851.
50. Quinn, L.S., Anderson, B.G., Strait-Bodey, L., Stroud, A.M., and Argiles, J.M. 2009. Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E191-202.
51. Quinn, L.S., Strait-Bodey, L., Anderson, B.G., Argiles, J.M., and Havel, P.J. 2005. Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway. *Cell Biol Int* 29:449-457.
52. Nishizawa, H., Matsuda, M., Yamada, Y., Kawai, K., Suzuki, E., Makishima, M., Kitamura, T., and Shimomura, I. 2004. Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem* 279:19391-19395.
53. Kita, S., Nishizawa, H., Okuno, Y., Tanaka, M., Yasui, A., Matsuda, M., Yamada, Y., and Shimomura, I. 2009. Competitive binding of musclin to natriuretic peptide receptor 3 with atrial natriuretic peptide. *J Endocrinol* 201:287-295.
54. Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., Rasbach, K.A., Bostrom, E.A., Choi, J.H., Long, J.Z., et al. 2012. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 481:463-468.