

競走馬のトレーニングおよび脱トレーニングが骨格筋サテライトセルの反応性に及ぼす影響

今岡 洋子<sup>1</sup>, 河合 美菜子<sup>2</sup>, 向井 和隆<sup>3</sup>, 大村 一<sup>3</sup>, 高橋 敏之<sup>3</sup>, 平賀 敦<sup>3</sup>, 宮田 浩文<sup>1</sup>

## Training and Detraining Effects on Satellite Cell Response after Exhaustive Exercise in Thoroughbred Horses

Youko Imaoka<sup>1</sup>, Minako Kawai<sup>2</sup>, Kazutaka Mukai<sup>3</sup>, Hajime Ohmura<sup>3</sup>, Toshiyuki Takahashi<sup>3</sup>,  
Atsushi Hiraga<sup>3</sup> and Hirofumi Miyata<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 山口大学大学院医学系研究科生物機能科学, 〒753-8515 山口県山口市吉田1677-1 (*Biological Sciences, Graduate School of Medicine, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, Yamaguchi 753-8515, Japan*)

<sup>2</sup> 島根大学医学部医学科生理学講座, 〒693-8501 島根県出雲市塩冶町89-1 (*Shimane University School of Medicine, 89-1 En-ya, Izumo, Shimane 693-8501, Japan*)

<sup>3</sup> 日本中央競馬会競走馬総合研究所, 〒320-0856 栃木県宇都宮市砥上町321-4 (*The Equine Research Institute, Japan Racing Association, 321-4 Tokami-cho, Utsunomiya, Tochigi 320-0856, Japan*)

Received: July 25, 2013 / Accepted: September 24, 2013

**Abstract** We investigate the effects of training and detraining on the satellite cell activation in thoroughbred horse muscles after an exhaustive exercise. Six horses were subjected to conventional training for 18 weeks and detraining for 6 weeks. Before training (Pre), after 10-week and 18-week training (10Tr and 18Tr), and after 6-week detraining (DTr), an incremental exercise test (IET) was performed on inclined treadmill to measure  $\dot{V}O_2\max$  and the velocity at a plasma lactate of 4 mmol/l (VLA4). Biopsy samples from gluteus medius muscle was obtained before and at 1 minute (1min), 3 hour (3hr), 6 hour (6hr) and 1 day after each IET. Number of muscle satellite cell were counted in type identified muscle fibers by immuno-histochemical stain images. The levels of mRNA expressions were determined using real time RT-PCR system. The number of satellite cells in 10Tr was significantly higher in type IIa fibers ( $0.31 \pm 0.10$ ) than Pre ( $0.15 \pm 0.06$ ). As compared to each value before IET, IL-6 mRNA expression (fold change) increased remarkably at 6hr after IET in 10Tr ( $\times 2290.2$ ) and 18Tr ( $\times 2304.2$ ), but not in both Pre ( $\times 260.0$ ) and DTr ( $\times 853.3$ ). IGF-I and Myogenin mRNA expressions were significantly increased at 1 day after IET in 18Tr ( $\times 6.6$  and  $\times 3.3$ ), but not in both Pre and DTr. These results suggested that the increased reactivity of satellite cells by training for 18 weeks is almost disappeared after detraining for 6 week, as well as  $\dot{V}O_2\max$  and VLA4.

*Jpn J Phys Fitness Sports Med, 63(1): 177-187 (2014)*

**Keywords** : muscle satellite cell, exhaustive exercise, detraining, thoroughbred

### 緒 言

持久性トレーニングに対する最も顕著な変化は、最大酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2\max$ ) の増加に代表される呼吸循環器能の向上である<sup>1,2)</sup>。骨格筋レベルでは、酸化能力の低いType IIx線維から酸化能力の高いType IIa線維への移行が生じ、筋全体の酸化能力が高くなるのが組織・生化学的に証明されている<sup>3-5)</sup>。一般に、骨格筋線維の可塑性は、内在性筋原性幹細胞である筋サテライトセルの増殖および分化に大きく依存している。増殖したサテライトセルは、新たな筋線維を形成する筋芽細胞となるか、既存の筋線維と融合し筋核を供給し、細胞内分子の発現調節を担っている<sup>6)</sup>。最近、我々の先行研究において、

疲労困憊に至る一過性高強度トレッドミル運動によっても、サラブレッド中殿筋のサテライトセルの増殖および分化が数日に渡って促進されることが報告された<sup>7)</sup>。この研究結果は、特別なトレーニングを長期間受けていないサラブレッド競走馬において観察された。実際の調教では、鍛錬時期と脱トレーニング期が一定の周期をなして年間計画が立案されており、トレーニング効果と同様に、脱トレーニングに伴う筋線維の適応変化を検討することは非常に興味深い。

これまでに、Tylerら<sup>8)</sup>はサラブレッド競走馬における高強度トレーニングにより最大酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2\max$ ) が上昇する一方、脱トレーニングによって $\dot{V}O_2\max$ が減少すること報告している。またKitaokaら<sup>9)</sup>は、同じくサ

ラブレッド競走馬において, 乳酸アニオンの取り込みを促進するモノカルボン酸トランスポーター (MCT) 1と乳酸アニオンの排出を促進するMCT4発現量が数か月にわたる高強度トレーニングにより増加し, その後の脱トレーニングによりトレーニング前の値に戻ることを報告している. さらにKadiら<sup>10)</sup>は, ヒトの外側広筋における90日間の高強度筋力トレーニングによりサテライトセル数が増加し, その後, 脱トレーニング60日後までサテライトセル数が維持されるが, 90日後にはトレーニング前の状態に戻ることを報告している.

以上のように, サラブレッド競走馬のみならずヒトにおいても, 脱トレーニング期における筋線維の適応変化に関する検討は実施されているが, サテライトセルの反応性そのものについて, トレーニング状態を考慮した研究は未だ行われていない. そこで本研究は, 一過性の激運動に対するサテライトセルの動態が, トレーニングおよび脱トレーニングでどのように変化するかを調べることを目的とした.

## 方 法

**被験動物** 日本中央競馬会 (JRA) 競走馬総合研究所に所属する3歳齢のサラブレッド競走馬6頭が実験に用いられた. 性別は, オス3頭, メス3頭であり, 実験開始時の平均体重は492kgであった. JRA動物実験委員会および山口大学動物実験委員会によって定められた「動物実験指針」に基づいて, 全ての運動試験および筋サンプルの採取は, 栃木県宇都宮市のJRA競走馬総合研究所で行われた.

**最大酸素摂取量および血中乳酸濃度 4 mmol/l相当走速度 (VLA4) の測定** 全てのウマは最大酸素摂取量( $\dot{V}O_2\max$ )を決定するため6%傾斜トレッドミルにおいて, 疲労困憊に至る高強度運動テストを行った. 2分間の常歩 (1.7m/s) と2分間の速歩 (3.5m/s) でのウォームアップ後, 走行速度を10m/sで2分, その後2分ごとに2m/sずつ増加させ, 疲労困憊に至って走行が不可能となった時点で試験を終了した.  $\dot{V}O_2\max$ の測定はオープンフローシステム<sup>11)</sup>を用いて行い, 呼気中 $O_2$ および $CO_2$ の濃度, 温度と湿度が継続的に測定された. 全ての測定データは, AD変換を用いてコンピューターに蓄積され, 分析用のソフトウェアを用いて計算した. 各走行速度の最後の15秒間の平均 $\dot{V}O_2$ が, その走行速度における $\dot{V}O_2$ として記録された.  $\dot{V}O_2\max$ は回帰直線分析により決定された. また, 運動テスト中は継続的にウマの血液採取を行い, 血中乳酸濃度を測定し, 血中乳酸濃度が4 mmol/lに相当する走行速度 (VLA4) を決定した.

**トレーニングプロトコル** 全てのトレーニングは6%傾

斜トレッドミルで行った. 1~3週目は75%  $\dot{V}O_2\max$ , 4~6週目は90%  $\dot{V}O_2\max$ , 7~10週目は100~110%  $\dot{V}O_2\max$ でそれぞれ週5日, 3分間の走行を行った. 11~18週目は2分間の110%  $\dot{V}O_2\max$ での走行を週2日と, 3分間の90%  $\dot{V}O_2\max$ での走行を週3日行った (Fig. 1). なお, トレーニング時以外は馬房で安静にさせた.

19週目以降は, 週5日の頻度で3分間の常足 (1.7m/s) 運動または馬房安静を基本パターンとする6週間の脱トレーニングを行った. トレーニング前, トレーニング10週, 18週および脱トレーニング6週の各時点で疲労困憊に至る高強度運動テストを行い,  $\dot{V}O_2\max$ , VLA4測定および筋サンプル採取を行った. 筋サンプルは高強度運動テスト前, 1分後, 3時間後, 6時間後, 1日後にそれぞれ採取した.

**筋サンプルの採取** 筋サンプルはニードルバイオプシー法を用いた. バイオプシーサンプルは, Lindholmら<sup>12)</sup>によって確立された方法に従い中殿筋から採取された. 約2cm<sup>2</sup>の皮膚を剃毛, 清拭, 消毒した後に皮膚を局部麻酔し, 外科用メスを用いて皮膚と筋膜を1cmほど切開した. その切開部から筋に生検針を挿入して, 筋サンプルを採取した. 得られたサンプルは, 直ちに液体窒素で急速凍結され, 分析まで-80℃のディープフリーザー中で保存された.

**筋線維組成および筋線維面積の測定** トレーニング前, トレーニング10週・18週および脱トレーニング6週における高強度運動テスト前のサンプルを用いて組織学的分析を行った.

各凍結筋サンプルから, -20℃のクリオスタット (CM1510, Leica, Nussloch, Germany) を用いて厚さ7μmの連続凍結切片を作成した. 切片を室温に戻し, その後0.1 M phosphate buffered saline (PBS; pH7.6) を溶媒とする1% normal goat serum (Millipore Chemicon, Billerica, Massachusetts, USA) で10分間プレインキュベートした. 一次抗体は以下のものをそれぞれ使用した: 1) ミオシン重鎖 (MHC) -IIに特異的に反応するFast myosin (1:4000, Sigma, St Louis, Missouri, USA), 2) MHC-IIaに特異的に反応するSC-71 (1:1000, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA). 各切片をこれらの一次抗体中で3時間インキュベートし, PBS溶液で洗浄後, horseradish peroxidase (HRP) 結合二次抗体 (goat anti-mouse IgG, Bio-Rad, Hercules, California, USA) に3時間反応させ, 再びPBSで洗浄した. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) をHRPの局在を示す色素として使用した.

染色した筋線維の画像を, 顕微鏡 (Nikon E600, Nikon, Tokyo, Japan) とイメージプロセッシングシステム (DS-

U1, Nikon) を使って記録した (Fig. 2 a and b). 筋線維は、免疫染色特性を基準として Type I, IIa, IIx に分類し、筋線維タイプ割合、筋線維タイプ横断面積をそれぞれ 200-400本の筋線維から算出した。

なお、免疫組織化学法や電気泳動法により、ウマの筋

線維には MHC-IIb 分子種が存在せず、以前 ATPase 染色で Type IIb 線維と分類されていたものは MHC-IIx を発現する Type IIx 線維であったことが示されている<sup>13)</sup>。また複数の MHC 分子種を共発現するハイブリッド線維である Type IIa/x 線維の存在も明らかにされている<sup>14-16)</sup>。

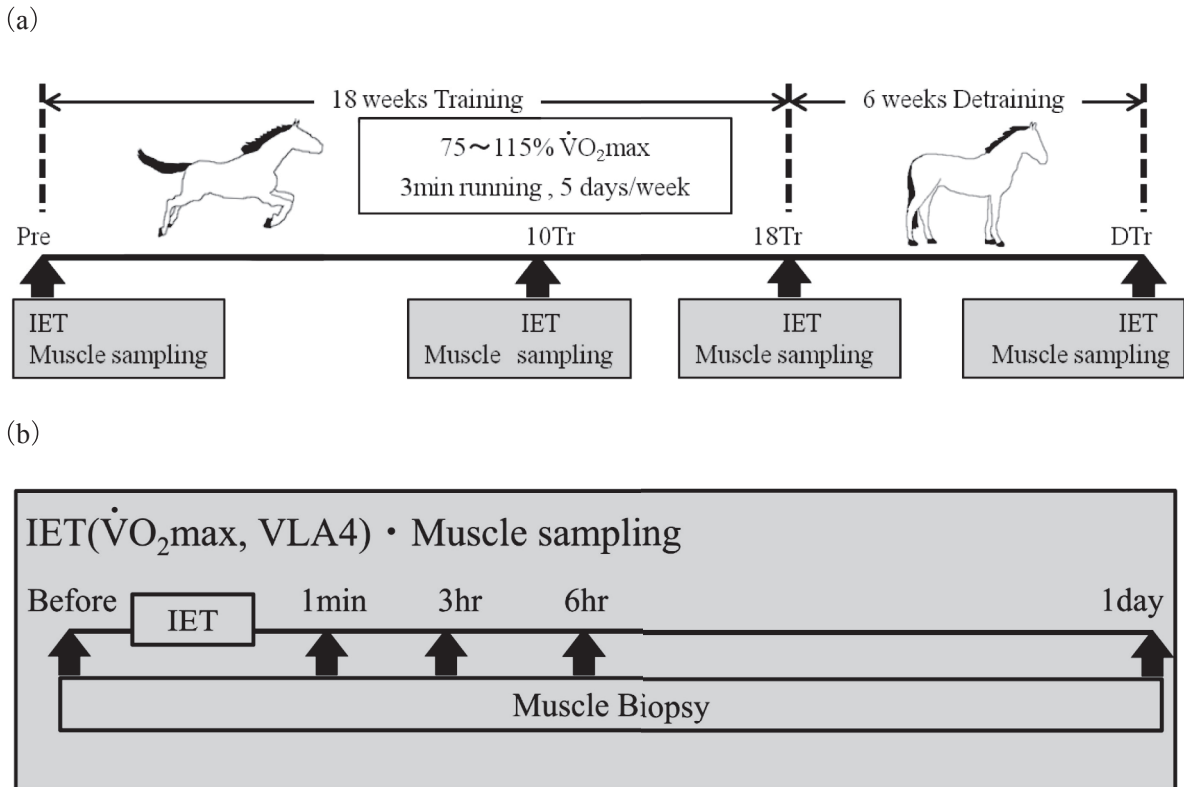


Fig. 1 Schematic figure of experimental schedule. Horses were subjected to conventional training for 18 weeks and detraining for 6 weeks (a). Before training (Pre), after 10-week and 18-week training (10Tr and 18Tr), and after 6-week detraining (DTr), an incremental exercise test (IET) was performed on an inclined treadmill to measure  $\dot{V}O_2\max$  and running speed at 4mmol/l plasma lactate level (VLA4) (b). Biopsy samples from gluteus medius muscle was obtained before and at 1 minute (1min), 3 hour (3hr), 6 hour (6hr) and 1 day after each IET.

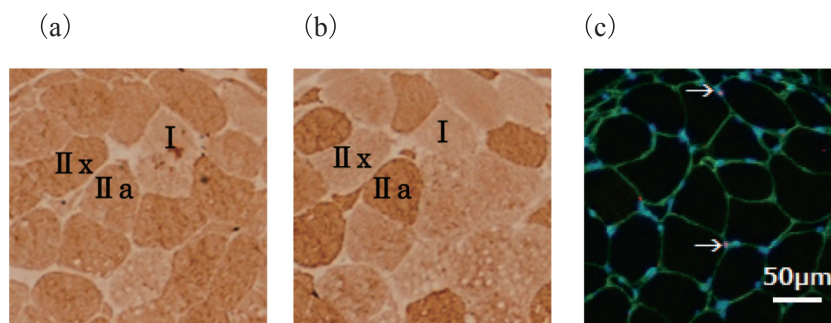


Fig. 2 Typical photomicrographs of serial transverse sections of gluteus medius muscle from a Thoroughbred horse at Pre. Two sections were stained with monoclonal antibodies against fast myosin (a) and MHC-IIa (SC-71) (b). Muscle fibers were classified into type I (the fibers unstained in both a and b), IIa (stained fibers in both a and b) and IIx (stained fibers only in a). Triple-immunofluorescent stains for laminin, Pax7 and nuclei (c). The white arrows in c indicate satellite cells (Pax7<sup>+</sup> nuclei).

本研究においても, 当初ハイブリッド線維を加えた4種類に筋線維タイプを分類したが, Type IIa/xの出現頻度が非常に低かった(5%以内)ため, Type IIa線維に統合して結果をまとめた。

**筋核数およびサテライトセル数の測定** 他の切片を0.1 M PBSを溶媒とする4% paraformaldehydeにより10分間室温で固定し, PBSで洗浄した。これらの切片を, PBSを溶媒とする10% Goat Normal Serum (Millipore-Chemicon), 2% bovin serum albumin (Sigma) を含むブロッキング溶液中に30分間室温でプレインキュベートした。その後切片を洗浄し, 2% bovin serum albumin/PBSを溶媒とする一次抗体mouse anti-Paired box transcription factor 7 (Pax7, 1:1000, DSHB) およびrabbit anti-laminin (1:1000, Sigma) 中で3時間インキュベートした。切片をPBSで洗浄し, 対応する二次抗体には以下のものを使用した: Cy3-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) とAlexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:1000, Molecular Probes, Breda, Netherlands)。二次抗体中で2時間インキュベートした後, 切片をPBSで洗浄し, PBSを溶媒とする4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes) 中に5分間室温で染色した。

撮影したPax7, laminin, DAPIの染色画像をソフトウェア (Adobe Photoshop software CS2, Adobe Systems Inc., Tokyo, Japan) により加算し, 筋核およびサテライトセルの定量に使用した (Fig. 2c)。筋核ドメインは, 筋線維横断面積を筋核数で割り, 筋線維タイプ別に算出した。サテライトセルは, lamininで染色された基底膜内でDAPIとPax7によって共染色されているものとして同定し, 筋線維タイプ別にサテライトセル数を算出した。

**リアルタイムRT-PCRによるmRNAの発現量比較** 各筋の, Pax7, Interleukin-6 (IL-6), Insulin-like growth factor-I (IGF-I), Hepatocyte growth factor (HGF), Myogenic determination factor (MyoD), Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) およびMyogeninのmRNA発現量をリアルタイム逆転写 (RT)-PCRシステムによって分析した。Total RNAをTORIZOL reagent (Invitrogen, Tokyo, Japan) により抽出した。total RNAの精製度と収率は260nm, 280nmの波長の吸光度を測定することで決定した。total RNAをTURBO™ DNase (Ambion, Austin, USA) で37°C, 30分間処理し, ゲノムDNAを除去した。DNase-treated RNA (0.5µg) から, Exscript RT reagent kit (Tanaka, Tokyo, Japan) により一本鎖cDNAを合成した。その後, cDNA産物をStepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems

Japan, Tokyo, Japan) によるSYBR Green PCR Master Mixのプロトコルを使用して分析した。

増幅プログラムは, 95°Cで10分間の初期分解段階および95°Cで3秒間の分解と58°Cで1分間のアニーリング/進展の40サイクルで構成されている。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA量を内在性コントロールとして設定した。各遺伝子のmRNAは, 遺伝子ターゲットのcycle threshold (Ct) の値からGAPDHのCtを差し引くことによって標準化した [ $\Delta Ct$  (target)]。ターゲット遺伝子の相対的発現量を高強度運動前 (Before) に対する相対量 (RQ) として算出した。相対的発現に続き, 分解曲線分析はcDNAサンプル中にいかなる非特異的増幅も検出しなかった。

本実験で使用した特異的プライマーの配列はTable 1にまとめた。各プライマーはPrimer Express software (v3.0, Applied Biosystems Japan) で設計され, オリゴヌクレオチドはFASMAC (Kanagawa, Japan) で作成した。

**統計**  $\dot{V}O_2\max$ , VLA4および組織化学的分析から得られたデータは, One way-ANOVAおよびBonferroni adjusted t-testにより分析した。各mRNAの発現量におけるトレーニングに対するサテライトセルの応答については, Wilcoxon's signed-rank testを用いてbeforeとその他のタイムポイントを比較した。全ての結果は平均±標準偏差で示し, 統計的有意性は $P < 0.05$ とした。

## 結 果

**体重および全身持久力** トレーニング前 ( $492 \pm 31\text{kg}$ ) と比較して, トレーニング10週 ( $510 \pm 26\text{kg}$ ), 18週 ( $503 \pm 29\text{kg}$ ), 脱トレーニング6週 ( $516 \pm 26\text{kg}$ ) のいずれにおいても, 体重の有意な増減は認められなかった。

トレーニング前の $\dot{V}O_2\max$ およびVLA4は, それぞれ $144.3 \pm 14.5\text{ml/kg/min}$  および $7.3 \pm 0.5\text{m/s}$ であり, トレーニング10週では $168.0 \pm 14.2\text{ml/kg/min}$  および $8.5 \pm 0.6\text{m/s}$ , トレーニング18週では $164.2 \pm 8.6\text{ml/kg/min}$  および $8.3 \pm 0.7\text{m/s}$ であり, トレーニングによる有意な増加が認められた (Fig. 3)。一方脱トレーニング6週では,  $145.5 \pm 16.7\text{ml/kg/min}$  および $7.3 \pm 1.2\text{m/s}$ であり, トレーニング前のレベルに戻った。

**組織化学的特性** 筋線維タイプ組成は, トレーニング前において, Type I =  $12.9 \pm 6.0\%$ , Type IIa =  $48.1 \pm 13.0\%$  およびType IIx =  $39.1 \pm 12.1\%$ であった。トレーニング18週において, Type IIa =  $54.4 \pm 9.6\%$ であり, 増加傾向が認められたが有意差は生じなかった。また, 脱トレーニング6週においても有意な変化は認められなかった。

各筋線維タイプの横断面積は, トレーニング前において, Type I =  $2888 \pm 570\mu\text{m}^2$ , Type IIa =  $3625 \pm 760\mu\text{m}^2$ お

Table 1. Real-time RT-PCR primer sequences

|          | Forward 配列              | Reverse 配列              |
|----------|-------------------------|-------------------------|
| GAPDH    | CAAGGCTGTGGCAAGGT       | GGAAGGCCATGCCGTGA       |
| Pax7     | CATCGGCGGCAGCAA         | TCCTCGATCTTTTTCTCCACATC |
| IGF-I    | TGTCCTCCTCACATCTTCTACCT | CGTGGCAGAGCTGGTGAA      |
| HGF      | GGTACGCTACGAAGTCTGTGACA | CCCATTGCAGGTCATGCAT     |
| IL-6     | AACAACCTCACCTCATCTTCGAA | CGAACAGCTCTCAGGCTGAAC   |
| PCNA     | GCGGCAAGCTTGGATCTTC     | AGGCTTCACAGAACAGGAGAGAA |
| MyoD     | ACGGCTCTCCTCTGCAACTTTG  | GAGTCGAAACACGGGTCATCA   |
| Myogenin | TCACGGCTGACCCTACAGATG   | GGTGATGCTGTCCACAATGG    |

Paired box7 protein (Pax7), Interleukin-6 (IL-6), insulin-like growth factor-I (IGF-I), hepatocyte growth factor (HGF), Myogenic determination (MyoD), proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

よび Type IIx =  $5158 \pm 1005 \mu\text{m}^2$ であったが、トレーニング18週において、Type IIa =  $2872 \pm 653 \mu\text{m}^2$ および Type IIx =  $4752 \pm 992 \mu\text{m}^2$ となり、減少傾向が認められた。脱トレーニング6週間においては、トレーニング前とほぼ同様な値を示した (Type I =  $2750 \pm 821 \mu\text{m}^2$ , Type IIa =  $3211 \pm 929 \mu\text{m}^2$ および Type IIx =  $4205 \pm 772 \mu\text{m}^2$ )。

筋核数、筋核ドメインおよびサテライトセル数を各筋線維タイプごとにまとめ、Fig. 4に示す。Type IIxの筋核数はトレーニング前の  $2.77 \pm 0.29$ 個/fiberからトレーニング10週では  $3.44 \pm 0.31$ 個/fiberになり、有意な増加が見られた。筋核ドメインは、トレーニング前において Type IIa =  $1586 \pm 352 \mu\text{m}^2$ および Type IIx =  $2072 \pm 386 \mu\text{m}^2$ であったが、トレーニング10週において Type IIa =  $1246 \pm 198 \mu\text{m}^2$ および Type IIx =  $1468 \pm 348 \mu\text{m}^2$ となり減少傾向にあったが、統計的な有意性は見られなかった。Type IIaの筋線維当たりのサテライトセル数は、トレーニング前の  $0.16 \pm 0.06$ 個/fiberからトレーニング18週では  $0.31 \pm 0.10$ 個/fiberとなり、有意な増加が見られた。また、脱トレーニング6週において Type IIxでは  $0.03 \pm 0.03$ 個/fiberとなり、トレーニング前の  $0.11 \pm 0.05$ 個/fiberに比べ有意に減少した。

**mRNA発現量** トレーニング前、トレーニング10週・18週および脱トレーニング6週における高強度運動テスト後の各mRNA発現量の変化を、各運動前の値を基準としてFig. 5に示す。

Pax7 mRNA発現量は、トレーニング18週における高強度運動テスト6時間後に  $4.9 \pm 4.0$ 倍程度の変動があっ

たが、統計的な有意性は認められなかった。IL-6 mRNA発現量は、高強度運動前と比較し、トレーニング10週・18週および脱トレーニング6週の全ての期間で発現量が有意に増加した。特に、トレーニング10週、18週では高強度運動6時間後における発現量の最大ピークがそれぞれ  $2290.2 \pm 2372.6$ 倍、 $2304.2 \pm 1413.4$ 倍に達し、脱トレーニング6週の高強度運動6時間後は再び減少 ( $853.3 \pm 1252.1$ 倍)が認められた。サテライトセルの活性化因子と考えられるIGF-I mRNAは、トレーニング18週において発現量の増加が生じ、運動1日後には有意な増加 ( $6.6 \pm 4.7$ 倍)が認められた。脱トレーニング6週では再びトレーニング前と同程度の発現量まで減少していた。IGF-Iと同様に有力な活性化因子であるHGFのmRNA発現量は、運動1日後までは大きな発現量の変化は認められなかった。

筋原性調節因子であるMyoD mRNA発現量は、トレーニング18週の6時間後において  $3.9 \pm 5.1$ 倍程度の変動があったが、統計的な有意性は認められなかった。一方、PCNA mRNA発現量は、高強度運動前と比較し、1日後にすべてのグループにおいて有意な増加が認められた。サテライトセルの分化マーカーであるMyogeninは、トレーニング前、10週および脱トレーニング後の高強度運動テスト1日後において増加傾向が見られ、トレーニング18週では有意に高い値 ( $3.3 \pm 2.3$ 倍)を示した。

## 考 察

本研究では、疲労困憊に至る高強度運動テストに対するサテライトセルの活性化過程が、トレーニングおよび

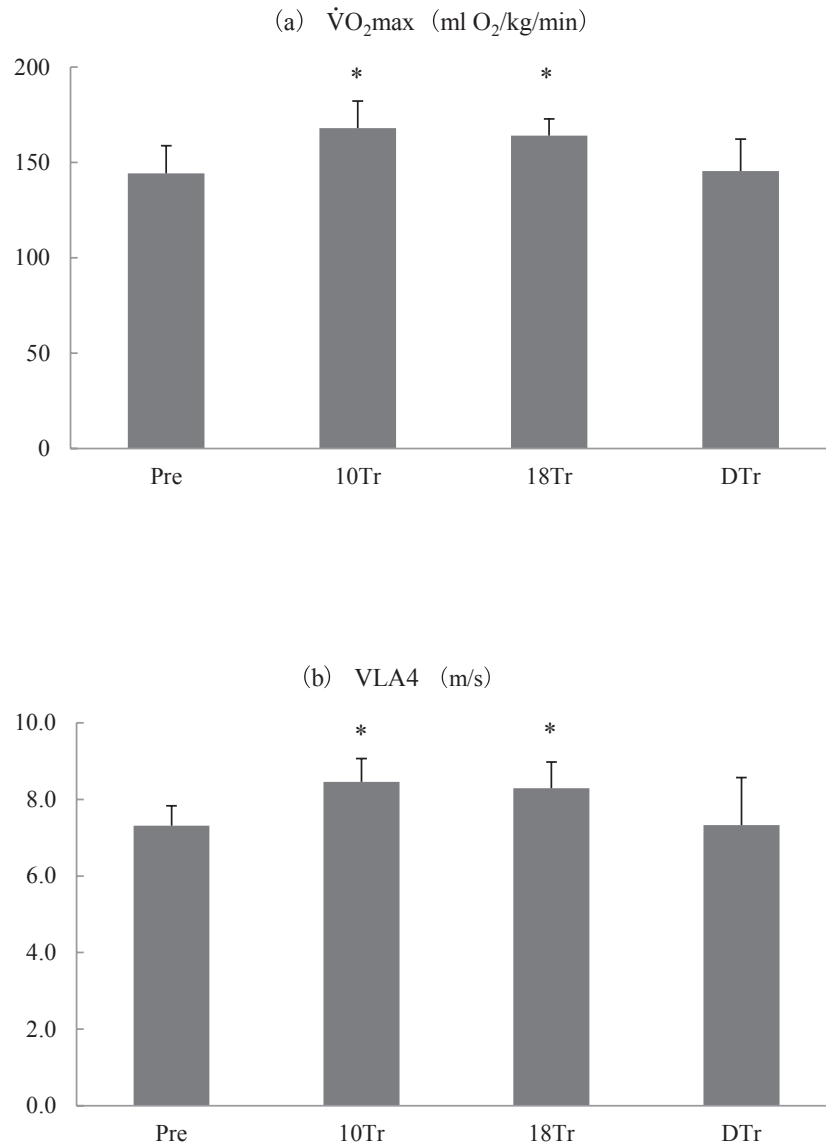


Fig. 3 Changes in mean values of  $\dot{V}O_2\text{max}$  (a) and VLA4 (b) in pre-, 10 week-, 18 week-training, and 6 week-detraining. \*: significant differences as compared to pre value ( $P<0.05$ ).

脱トレーニングでどのように変化するか調べることが目的とした。線維当たりのサテライトセル数はType IIa線維でトレーニング18週において有意に増加していた。サテライトセルの活性化因子であるIL-6およびIGF-I mRNA発現量、細胞増殖および分化を示唆するMyoDおよびMyogenin mRNA発現量は、トレーニング18週における高強度運動テストにより増加する傾向が見られ、脱トレーニング6週ではトレーニング前と同様の発現量まで減少した。

以上の結果から、全身持久性の指標である $\dot{V}O_2\text{max}$ およびVLA4と同様に、高強度運動テストに対するサテライトセルの反応性は、10~18週のトレーニングにより高くなり、6週の脱トレーニングによりトレーニング前の状態に戻ることが示された。

全身持久力および筋線維の適応変化  $\dot{V}O_2\text{max}$ およびVLA4は、トレーニング前と比較してトレーニング10週および18週で有意に増加し、脱トレーニング6週でトレーニング前の値に戻った。この結果は、Tylerら<sup>8)</sup>のサラブレッド競走馬における高強度トレーニングにより $\dot{V}O_2\text{max}$ が上昇し、脱トレーニングによって $\dot{V}O_2\text{max}$ が減少するという報告と一致している。また、Kitaokaら<sup>9)</sup>のモノカルボン酸トランスポーターがトレーニングおよび脱トレーニングで増加および減少することを明らかにした結果とも類似している。本研究においては酸化酵素活性の定量を行っていないが、サラブレッド競走馬に対する慣習的なトレーニングによりType IIa線維が増加し、酸化酵素活性が上昇することが報告されている<sup>5)</sup>。本研究におけるトレーニングは、慣習的なトレーニング

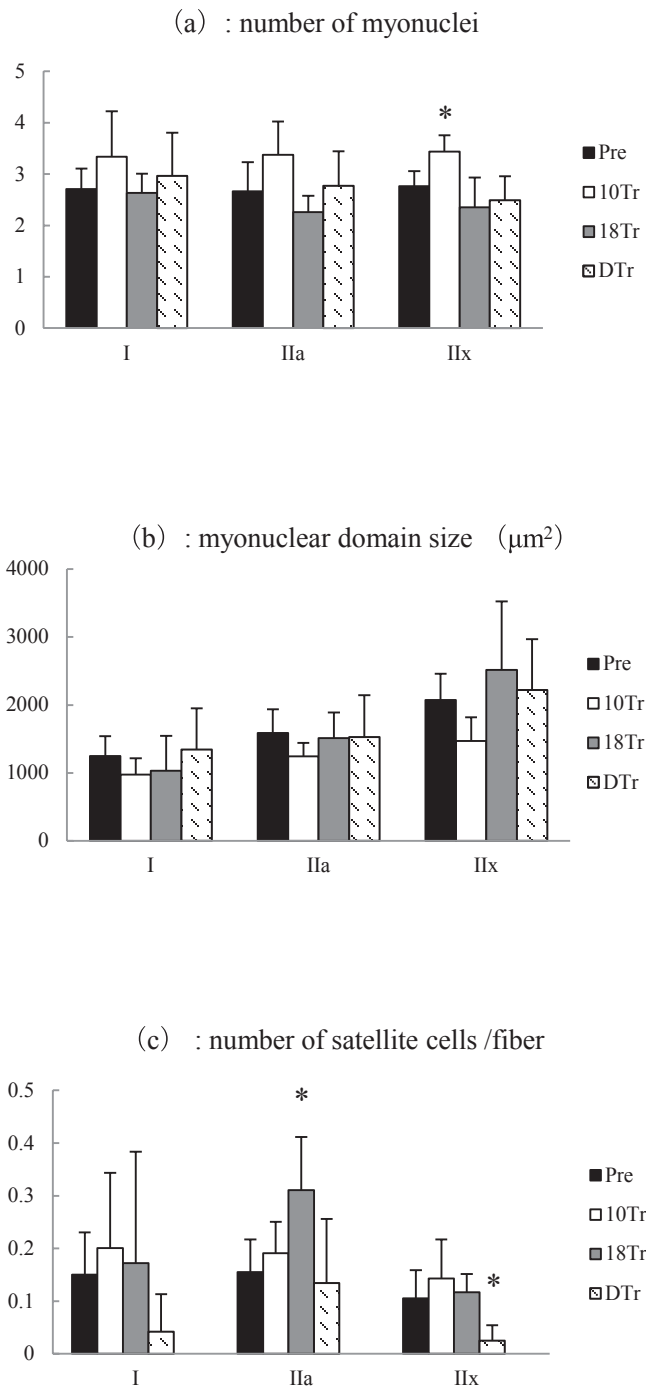


Fig. 4 Exercise-related changes in mean values of muscle nuclei number (a), domain size of each nucleus (b) and rate of satellite cells in total nuclei (c) in type-identified muscle fibers. \*: significant differences as compared to pre value in each fiber type (P<0.05).

以上の強度があり、 $\dot{V}O_2\max$ の増加も生じていることから、筋におけるミトコンドリア量の増加が予想される。ミトコンドリアが独自のDNAをもつことは良く知られているが、ミトコンドリアDNAがコードするタンパク質はわずか13種類であり、筋核が残りのミトコンドリアタンパク質を制御しているので、ミトコンドリア含有量

の増加に筋核数増加が連動することが推察される。実際、げっ歯類の筋を用いた先行研究では、特にType II線維において筋核ドメインサイズがミトコンドリア含有量に反比例することが証明されている<sup>17)</sup>。本研究において、トレーニング10週で筋核数が増加し、筋核ドメインが減少傾向にある背景には、ミトコンドリアの増減に連動した筋核数の増減が関連しているかもしれない。さらに、18週間のトレーニングおよび6週間の脱トレーニングにより、Type IIx線維とType IIa線維間で約6%のタイプ移行が生じた。つまり、トレーニング18週のType IIa線維および脱トレーニング6週のType IIx線維には、ミトコンドリア含有量の顕著な増加および減少が生じた筋線維が含まれると推察される。それぞれの筋線維において有意なサテライトセル数の増減が確認された点に関しても同様の説明が可能であろう。しかし、筋核数および筋核ドメインには18週間のトレーニングおよび6週間の脱トレーニングによる有意な変化は認められていない。今後、筋線維タイプ別の面積と同様にミトコンドリア量の変化を調べ、筋核数への影響について詳細に検討する必要がある。

細胞増殖・分化マーカー mRNA発現量の変化 多くの先行研究が、IGF-I、HGFおよびIL-6などのサイトカインが筋芽細胞の活性化と増殖に密接に関連していることを証明している<sup>18-21)</sup>。特に、HGFに関しては、休止・活性化サテライトセルの両方において細胞膜上に細胞内シグナリング応答を仲介するc-metレセプターを発現していることがin vitroでもin vivoでも証明されており、最も有力なサテライトセル活性化因子と考えられている<sup>19,22)</sup>。しかし、本研究の結果においては、HGF mRNAの発現量はトレーニングの状態に関わらず、有意な変動を示さなかった。同じくサラブレッド競走馬の中殿筋を用いて行われた我々の先行研究において、HGF mRNAが高強度運動後3日~1週間後に有意な上昇を示したことを報告した<sup>7)</sup>。本研究では、ほぼ連日トレーニングが課されたため、2日後以降の筋を採取することが不可能であったが、運動後3日以降にHGF mRNAの顕著な発現上昇が起こったと予想される。

IGF-Iは、mitogen-activated protein kinaseの活性化を通じてin vitroのサテライトセルの増殖を刺激し<sup>18)</sup>、培地中のヒト筋芽細胞の分化を促進することが示唆されており<sup>20)</sup>、サテライトセルの活性化および増殖に関連して筋肥大を促進することが報告されている<sup>18-20)</sup>。また、ヒトの筋運動における研究では、運動後にサテライトセルおよび筋線維においてIGF-I splicing variants (MGF, IGF-IEaおよび-IEb)が検出され、これらのmRNA発現がMyoDおよびmyogeninなどのサテライトセル活性化調節因子群と連動していることが証明されている<sup>23)</sup>。さ

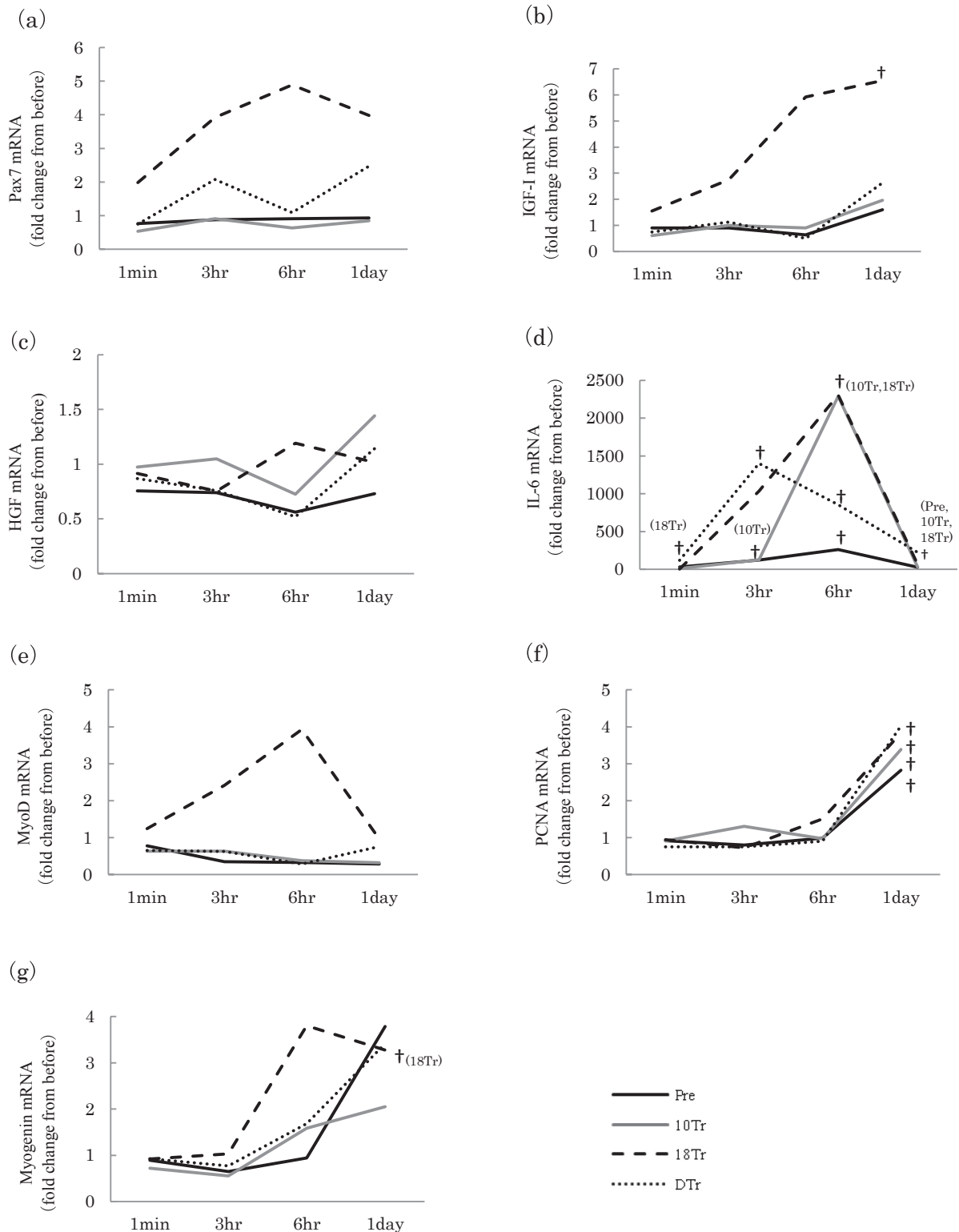


Fig. 5 Exercise-related changes in relative values of mRNA expression in Pax7 (a), IGF-I (b), HGF (c), IL-6 (d), MyoD (e), PCNA (f) and Myogenin (g). The mRNA expression of each time point (at 1 min, 3 hr, 6 hr, 1day after IET) calculation as x-fold change from before (before value = 1).

†: significant differences as compared to before value in each IET ( $P < 0.05$ ).

らに, IGF-I splicing variantsの発現調節について調べた研究では, 成長ホルモンに対する刺激に対して骨格筋のIGF-IEaとMGFの発現に違いは観察されておらず<sup>24)</sup>, 運動によるIGF-I発現刺激に対しても, IGF-IEaとMGF

とで同様であると報告されている<sup>25)</sup>. 一方, in vitroの実験においては, IGF-IEaは筋芽細胞の増殖とその後の筋管への融合を促進するのに対して, MGFでは筋芽細胞の増殖は見られるものの筋管へ融合しなかったことが



報告されている<sup>26)</sup>。また、ウィルスベクターを用いて IGF-I splicing variants をラットの筋に導入したところ、異なる筋量増加効果が報告されている<sup>27)</sup>。本研究において、トレーニング18週においてのみ IGF-I mRNA 発現量が最も顕著に変化した点は非常に興味深い。今後、IGF-I splicing variants の機能的な違いを明らかにすることと合わせて、IGF-I のサテライトセル活性化における影響についてさらに検討していく必要がある。

本実験において、IL-6 mRNA 発現量の劇的な増加が運動3時間または6時間後に起こり、高強度抵抗性運動や代償性過負荷後に IL-6 が運動後早期にピークに達することを報告した研究に一致した<sup>21,28)</sup>。IL-6 は JAK/STAT3 シグナリング経路 (the Janus kinase/signal transducer and activators of transcription3) を介したサテライトセルの活性化因子であり<sup>29,30)</sup>、骨格筋肥大に必須の調節因子であることが IL-6 ノックアウトマウスにおける代償性過負荷実験で証明されている<sup>28)</sup>。トレーニング10週および18週において、顕著な、IL-6 mRNA 発現量の変化が認められたことは、運動刺激に対するサテライトセルの反応性の向上を示唆すると考えている。しかし近年、IL-6 が糖質や脂質の代謝に重要な役割を果たし<sup>31)</sup>、損傷の有無に関わらず運動直後に骨格筋から産生されることが示唆されており、単なる運動能力の向上に伴うエネルギー需要量の増大に付随する変化であるかもしれない。

MyoD および Myogenin mRNA 発現量は、トレーニング18週に増加しており、脱トレーニング6週で再びトレーニング前と同程度の発現量まで減少していた。PCNA mRNA 発現量は、トレーニング前から脱トレーニングまでの全ての期間において、高強度運動テスト1日後には有意な増加を示した。MyoD および PCNA mRNA の発現はサテライトセルの活性化および増殖に関連し、Myogenin は最終分化に関連すると考えられている<sup>32,33)</sup>。本研究のトレーニング18週における高強度運動テスト6時間後に MyoD mRNA 発現量が上昇し、1日後には PCNA mRNA 発現量が増加している。これより高強度運動6時間～1日後にはサテライトセルの増殖が誘導され始めたことが示唆される。

培養細胞において、Myogenin は筋芽細胞の分化段階の最初に発現する。このことは Myogenin の発現が MyoD より後に起こることを暗示している<sup>34,35)</sup>。しかし、本研究のトレーニング18週のデータは Myogenin の増加が MyoD の増加よりも先行し、高強度運動テスト後1日以内にサテライトセルの一部が分化段階に移行したことを示唆した。先行研究において、激運動後に Myogenin mRNA 発現量のピークが1日後と1週間後の2回出現することが報告されている<sup>7)</sup>。成熟骨格筋において、2つのサテライトセルの細胞亜群が存在することが報告され

ており、一つはすぐに分化することが可能であり、他方は分化前に1回またはそれ以上の増殖をすることができる可能性がある<sup>36)</sup>。本研究で見られた運動1日後の Myogenin mRNA 発現量の増加は、これらのサテライトセル亜群を示していると推測される。

## まとめ

本研究の目的は、サラブレッド競走馬骨格筋における高強度運動後のサテライトセル活性化について、トレーニング前後および脱トレーニング後で比較検討することである。6頭のサラブレッド競走馬において、75～115% 最大酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2\max$ ) 強度のトレッドミル走行によるトレーニングを18週間行い、その後脱トレーニングを6週間行った。トレーニング前、トレーニング10週、18週および脱トレーニング6週に疲労困憊に至る高強度運動テストを行い、 $\dot{V}O_2\max$  および血中乳酸 4 mmol/l に相当する走速度 (VLA4) の測定を行うと同時に、高強度運動テスト前、高強度運動テスト後1分、3時間、6時間および1日に筋バイオプシーサンプルを中殿筋から得た。各筋サンプルに対する免疫組織化学的分析と real time RT-PCR を用いた各種 mRNA の相対的定量分析を行った。

$\dot{V}O_2\max$  および VLA4 は (144ml/min/kg, 7.3m/s) トレーニング前に比べ、トレーニング18週 (164ml/min/kg, 8.3m/s) で増加を示し、脱トレーニング6週 (145ml/min/kg, 7.3m/s) で有意差の無いレベルに戻った。免疫組織化学的分析の結果、サテライトセル割合は Type IIa 線維においてトレーニング10週で有意な増加が認められた。高強度運動後の mRNA 発現量は、トレーニング18週において有意な活性化因子および分化マーカー (IL-6, IGF-I および Myogenin) の増加が示唆され、脱トレーニング6週ではトレーニング前と同程度の変化パターンを示した。

本研究の結果、高強度運動後のサテライトセルの反応性は、10～18週間のトレーニングにより高くなり、6週間の脱トレーニングによりトレーニング前の状態に戻ることが示され、 $\dot{V}O_2\max$  および VLA4 と同様な変動を示した。

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、多大なご協力をいただいた日本中央競馬会・競走馬総合研究所 (宇都宮) の方々に厚く感謝致します。なお、本研究は、日本体力医学会中国・四国地方会「若手研究プロジェクト助成」を受けて実施された。

## 参考文献

- 1) Tyler CM, Golland LC, Evans DL, Hodgson DR, Rose RJ. Skeletal muscle adaptations to prolonged training,

- overtraining and detraining in horses. *Pflugers Arch* 436: 391-397, 1998.
- 2) Geor RJ, McCutcheon LJ, Shen H. Muscular and metabolic responses to moderate-intensity short-term training. *Equine Vet J Suppl* 30: 311-317, 1999.
  - 3) Henckel P. Training and growth induced changes in the middle gluteal muscle of young Standardbred trotters. *Equine Vet J* 15: 134-140, 1983.
  - 4) Miyata H, Sugiura T, Kai M, Hiraga A, Tokuriki M. Muscle adaptation of Thoroughbred racehorses trained on a flat or sloped track. *Am J Vet Res* 60: 1536-1539, 1999.
  - 5) Yamano S, Eto D, Sugiura T, Kai M, Hiraga A, Tokuriki M, Miyata H. Effect of growth and training on muscle adaptation in Thoroughbred horses. *Am J Vet Res* 63: 1408-1412, 2002.
  - 6) Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91: 534-551, 2001.
  - 7) Kawai M, Aida H, Hiraga A, Miyata H. Muscle satellite cells are activated after exercise to exhaustion in Thoroughbred horses. *Equine Vet J* 45: 512-517, 2013.
  - 8) Tyler CM, Golland LC, Evans DL, Hodgson DR, Rose RJ. Change in maximum oxygen up take during prolonged training, overtraining, and detraining in horse. *J Appl Physiol* 81: 2244-2249, 1996.
  - 9) Kitaoka Y, Masuda H, Mukai K, Hiraga A, Takemasa T, Hatta H. Effect of training and detraining on monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in Thoroughbred horses. *Exp Physiol* 96: 348-355, 2011.
  - 10) Kadi F, Schjerling P, Andersen LL, Charifi N, Madsen JL, Christensen LR, Andersen JL. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J Physiol* 558: 1005-1012, 2004.
  - 11) Erickson BK, Seaman J, Kubo K, Hiraga A, Kai M, Yamaya Y, Wagner PD. Mechanism of reduction in alveolar-arterial PO<sub>2</sub> difference by helium breathing in the exercising horse. *J Appl Physiol* 76: 2794-2801, 1994.
  - 12) Lindholm A, Piehl K. Fiber composition, enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscle of standardbred horses. *Acta Vet scand* 15: 287-309, 1974.
  - 13) Rivero JL, Talmadge RJ, Edgerton VR. Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in equine skeletal muscle and the influence of training. *Anat Rec* 246: 195-207, 1996.
  - 14) Dingboom EG, Dijkstra G, Enzerink E, van Oudheusden HC, Weijs WA. Postnatal muscle fibre composition of the gluteus medius muscle of Dutch Warmblood foals; maturation and the influence of exercise. *Equine Vet J Suppl* 31: 95-100, 1999.
  - 15) Dingboom EG, van Oudheusden H, Eizema K, Weijs WA. Changes in fibre type composition of gluteus medius and semitendinosus muscles of Dutch Warmblood foals and the effect of exercise during the first year postpartum. *Equine Vet J* 34: 177-183, 2002.
  - 16) Yamano S, Eto D, Kasashima Y, Hiraga A, Sugiura T, Miyata H. Evaluation of developmental changes in the coexpression of myosin heavy chains and metabolic properties of equine skeletal muscle fibers. *Am J Vet Res* 66: 401-405, 2005.
  - 17) Tseng BS, Kasper CE, Edgerton VR. Cytoplasm-to-myonucleus ratios and succinate dehydrogenase activities in adult rat slow and fast muscle fibers. *Cell Tissue Res* 275: 39-49, 1994.
  - 18) Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 272: 6653-6662, 1997.
  - 19) Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, Allen RE. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell* 13: 2909-2918, 2002.
  - 20) Ates K, Yang SY, Orrell RW, Sinanan AC, Simons P, Solomon A, Beech S, Goldspink G, Lewis MP. The IGF-I splice variant MGF increases progenitor cells in ALS, dystrophic, and normal muscle. *FEBS Lett* 581: 2727-2732, 2007.
  - 21) McKay BR, De Lisio M, Johnston AP, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G. Association of interleukin-6 signalling with the muscle stem cell response following muscle-lengthening contractions in humans. *PLoS One* 24: e6027, 2009.
  - 22) McKay BR, Toth KG, Tarnopolsky MA, Parise G. Satellite cell number and cell cycle kinetics in response to acute myotrauma in humans: immunohistochemistry versus flow cytometry. *J Physiol* 588: 3307-3320, 2010.
  - 23) McKay BR, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G. Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging muscle-lengthening contractions in humans. *J Physiol* 586: 5549-5560, 2008.
  - 24) Iida K, Itoh E, Kim DS, del Rincon JP, Coschigano KT, Kopchick JJ, Thorner MO. Muscle mechano growth factor is preferentially induced by growth hormone in growth hormone-deficient lit/lit mice. *J Physiol* 560: 341-349, 2004.
  - 25) Yamaguchi A, Fujikawa T, Shimada S, Kanbayashi I, Tateoka M, Soya H, Takeda H, Morita I, Matsubara K, Hirai T. Muscle IGF-I, MGF, and myostatin mRNA expressions after compensatory overload in hypophysectomized rats. *Pflugers Arch* 453: 203-210, 2006.
  - 26) Yang SY, Goldspink G. Different roles of the IGF-I E peptide (MGF) and mature IGF-I in myoblast proliferation and differentiation. *FEBS Lett* 522: 156-160, 2002.
  - 27) Barton ER. Viral expression of insulin-like growth factor-I isoforms promotes different responses in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 100: 1778-1784, 2006.
  - 28) Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab* 7: 33-44, 2008.

- 29) Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 62: 3351-3355, 2002.
- 30) Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* 20: 23-32, 2004.
- 31) Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88: 1379-1406, 2008.
- 32) Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326: 515-517, 1987.
- 33) Schultz E, Chamberlain C, McCormick KM, Mozdziak PE. Satellite cells express distinct patterns of myogenic proteins in immature skeletal muscle. *Dev Dyn* 235: 3230-3239, 2006.
- 34) Holterman CE, Rudnicki MA. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol* 16: 575-584, 2005.
- 35) Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* 73: 723-732, 1995.
- 36) Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 72: 341-347, 1995.