

## 学位論文要旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| 学位論文題目<br>(Dissertation Title) | 低酸素暴露および伸張性収縮が骨格筋に及ぼす影響<br>— サテライトセル, 毛細血管および痛み関連分子の動態 — |
| 氏名 (Name)                      | 長久 広   |

筋細胞膜と基底膜の間に局在するサテライトセル (SCs) は活性化・増殖し, 筋核へと分化することで筋の再生に寄与する。近年, 筋再生以外の SCs の役割が明らかにされてきており, その研究は骨格筋全体の可塑性に関する理解を深めることにつながる。

低酸素暴露は骨格筋に対して血管新生を誘導する。SCs は毛細血管の近傍に位置して血管新生に関与することが示されているが, *in vivo* での血管新生における SCs の役割はほとんど明らかにされていない。我々は若齢 (10 週齢) と高齢 (20 ヶ月齢) マウスに対し, 低酸素暴露を行って骨格筋に対する影響を検討した。持続的低酸素暴露は若齢マウスのヒラメ筋の MyoD mRNA の発現を増加させ, 低酸素に適応するために SCs が必要である可能性が示された。しかし, この活性化は血管新生において重要な因子である VEGF-A mRNA の増加を伴わなかった。高齢マウスヒラメ筋は持続的低酸素暴露によって有意な毛細血管密度の増加を示し, この結果は VEGF-A mRNA の増加を示したリアルタイム RT-PCR の結果に一致していた。この VEGF-A mRNA の増加は nNOS mRNA の増加と同時に生じており, nNOS による NO の産生が血管新生のために必要である可能性が示された。一方で常酸素状態と低酸素状態が繰り返される間欠的低酸素暴露は, 若齢マウスの腓腹筋の FGF2 mRNA を有意に増加させた。更に持続的低酸素条件と比較した時, 腓腹筋において間欠的低酸素暴露は eNOS と関連した VEGF-A mRNA の有意な増加を示した。これらの結果は間欠的低酸素暴露が, 持続的低酸素暴露とは異なる方法で血管新生をもたらすことを示している。また, SCs の活性化と血管新生は必ずしも協調しておらず, 低酸素暴露の際の SCs の血管新生への寄与はその主要な要因でないと考えられる。

一方で SCs は低酸素暴露とトレーニングを組み合わせた低酸素トレーニングが, 常酸素よりも高いトレーニング効果を持つことに寄与している可能性がある。我々は先行研究においてサラブレッドを用い, 急性の低酸素トレーニングが SCs の活性化に有益であるが血管新生には不利である可能性を示した。急性の運動から予測される結果と異なり, 長期的な低酸素トレーニングは有意な毛細血管密度の増加, VEGF-A mRNA の増加, 運動パフォーマンスの向上をもたらした。更に myogenin mRNA の増加で示される SCs の活性化も同時に見られた。これらの結果から低酸素トレーニングにおいては SCs が血管新生に関与していることが考えられる。また, NO にその低下作用が認められることから, 低酸素トレーニング後に見られた炎症性サイトカイン IL-6 の発現低下はトレーニング後の NO の増加を示している可能性がある。我々のマウスに対する低酸素暴露において見られた NOS 発現の増加は, 低酸素トレーニングによる適応の一端を説明する可能性がある。しかし, 低酸素トレーニング後の漸増負荷試験による SCs 及び血管新生関連因子の発現は, 常酸素トレーニング後と比較して抑制される傾向が見られ, IL-6 発現の低下が常酸素下での運動による適応に負の影響を与えていることが考えられる。

IL-6 は筋痛に関連することが示されている炎症性マーカーであると同時に SCs の活性化に関与する。筋痛は活動を阻害して QOL を低下させる要因であり, その抑制方法及びその機序の解明が求められて



いる。我々はプレコンディショニング収縮が、損傷性のエキセントリック収縮後の筋痛マーカールの mRNA 発現を抑制することを明らかにした。加えて、プレコンディショニングは組織化学的結果からも筋損傷を抑制した。一方で、プレコンディショニングは SCs 関連遺伝子 (Pax7, MyoD, Myogenin) の mRNA 発現を有意に低下させた。このことは、プレコンディショニングがトレーニング効果を抑制する可能性を示している。

以上の研究は、低酸素(トレーニング)の影響や痛みの抑制に関して SCs に焦点を当てて検討しており、一般的なトレーニング効果および筋痛発生のメカニズムの理解に役立つと考えられる。今後は SCs を活性化する要因の特定や、その活性化による骨格筋への貢献を明らかにするためのより詳細な研究が必要である。



## 学 位 論 文 要 旨

(Summary of the Doctoral Dissertation)

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| 学位論文題目<br>(Dissertation Title) | Effects of hypoxia exposure and eccentric contraction on skeletal muscle—dynamics of key molecules related to satellite cell, capillary and pain— |
| 氏 名(Name)                      | NAGAHISA Hiroshi  |

Satellite cells (SCs), which exist between muscle cell membrane and basal lamina, are activated, proliferated and differentiated to myonucleus and thereby, contribute to regeneration of muscle. Recently, the roles of SCs other than muscle regeneration have been revealed. To explore these roles leads understanding of skeletal muscle which is necessary for lifework and sports.

Hypoxia exposure induces angiogenesis in skeletal muscle. SCs are located close to capillary and involved in angiogenesis, but there are hardly studies on the roles of SCs in angiogenesis in vivo. We evaluated the effects of continuous or intermittent hypoxia in young (10 weeks old) and old mice (20 months old). Continuous hypoxia increased in MyoD mRNA expression in young soleus muscle, suggesting SCs may be needed to adaptation to hypoxia. However, this increase was not associated with increase of VEGF-A mRNA expression contributing to angiogenesis. In old mice, continuous hypoxia enhanced capillary density in soleus muscle, and this enhancement was consistent with result of real-time RT-PCR which showed an increase of VEGF-A mRNA. Additionally, the increase of VEGF-A mRNA coincided with increase of nNOS mRNA, suggesting nitric oxide (NO) generated by nNOS may be needed to angiogenesis. Intermittent hypoxia which consist of repeated exposure to normoxia and hypoxia increased FGF2 mRNA expression in young gastrocnemius muscle. Significant increase of VEGF-A mRNA expression in intermittent hypoxia groups compared with continuous hypoxia groups correlated significantly with eNOS mRNA expression in young gastrocnemius muscle. These results indicate that mechanism of angiogenesis is different between continuous and intermittent hypoxia. As activation of SCs was not necessarily associated with angiogenesis in skeletal muscle, the roles of SCs in angiogenesis may be not main mechanisms of adaptation to hypoxia.

However, SCs may contribute to higher effects of hypoxia training than normoxia training. We previously reported that acute hypoxia training in thoroughbred may result in activation of SCs and suppression of angiogenesis. Unlike the results expected from acute exercise, chronic hypoxia training resulted in significant increase of capillary density, VEGF-A mRNA expression and exercise performance. The activation of SCs indicated by increase of myogenin mRNA expression enhanced concurrently with these increase. These results suggest that SCs may serve as a factor for angiogenesis in hypoxia training. Since NO prevents inflammatory cytokine IL-6 mRNA expression, suppression of IL-6 expression after hypoxia training may indicate increase of generation of NO. Increase of NOS mRNA expression in our study with hypoxia exposure in mice may explain a part of adaptation to hypoxia training. However, expression of SCs and angiogenesis related factor was decreased after second exercise tests in hypoxia training groups compared with normoxia training groups, suggesting that suppression of IL-6 expression may have an adverse effect on adaptation to normoxia exercise.

IL-6 is inflammatory marker related to muscle pain and involved in activation of SCs. As muscle pain disturbs activity and decrease QOL, elucidation of suppression methods and mechanism of muscle pain is required. We showed that preconditioning contractions suppressed mRNA expressions of muscle pain markers after damaging eccentric contractions. In addition,



histological results also showed that preconditioning contractions decreased muscle damage. On the other hand, preconditioning contractions abrogated increase of SCs-related gene after damaging eccentric contractions. This result suggests preconditioning contractions may suppress training effects.

These studies are focused on SCs in relation to the influence of hypoxia (training) and suppression of pain, and are considered to be useful for understanding general training effect and mechanism of muscle pain generation. More detailed studies will be required in the future to identify activation factor of SCs in these situations and to clarify how the activation of SCs is involved in skeletal muscle.

(様式 9 号)

## 学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

| 氏 名   | 長 久 広  |
|---|--|
| 審査委員  | 主 査： 宮 田 浩 文   |
|   | 副 査： 松 井 健 二   |
|   | 副 査： 薬 師 寿 治   |
|   | 副 査： 井 内 良 仁   |
|   | 副 査： 杉 浦 崇 夫   |
| 論文題目  | 低酸素暴露および伸張性収縮が骨格筋に及ぼす影響<br>—サテライトセル, 毛細血管および痛み関連分子の動態—<br>(Effects of hypoxia exposure and eccentric contraction on skeletal muscle —dynamics of key molecules related to satellite cell, capillary and pain—) |
| 【論文審査の結果及び最終試験の結果】  |  |
| <p>本研究では、低酸素暴露・トレーニングの効果および伸張性収縮後の筋痛の抑制に関してサテライトセルの動態に焦点を当てて検討した。その結果、低酸素刺激を用いた効率の良いトレーニング方法および筋痛発生のメカニズムの理解に役立つ現象が、遺伝子発現レベルで確認された。</p> <p>平成31年1月24日(木)、上記審査委員5名で構成された審査委員会は、山口大学において、学位申請者本人に研究内容を、公開発表会の形式で発表させ、その内容について質疑応答を行った。また、関連事項についても試問を行った。その結果、研究内容はオリジナリティが高く、その成果は関連分野の水準を高めるものであり、また質問に対して満足すべき回答が得られた。よって審査委員会は、同人を大学院創成科学研究科博士後期課程修了者としての学力、見識を有するものと認め、博士(生命科学)の学位を与えるに十分な資格を有するものと判定した。</p> |  |