

博士論文

低酸素暴露および伸張性収縮が骨格筋に及ぼす影響  
—サテライトセル，毛細血管および痛み関連分子の動態—

Effects of hypoxia exposure and eccentric contraction on skeletal muscle  
—dynamics of key molecules related to satellite cell, capillary and pain—

2019年3月

長久 広

山口大学大学院創成科学研究科

# 目次

## 第一章 序論

- I 低酸素曝露が骨格筋に与える影響……………1
- II 低酸素トレーニング……………3
- III プレコンディショニング……………5

## 第二章 低酸素刺激がマウス骨格筋における血管新生とサテライトセルに及ぼす影響

- I 緒言……………6
- II 実験方法……………7
- III 結果……………8
- IV 考察……………10
- 付表・付図……………14

## 第三章 低圧低酸素下での高強度トレーニングがサラブレッド骨格筋に与える影響

- I 緒言……………22
- II 実験方法……………22
- III 結果……………25
- IV 考察……………26
- 付表・付図……………30

## 第四章 プレコンディショニング収縮は損傷性エキセントリック収縮後の筋痛マーカーを抑制する

- I 緒言……………37
- II 実験方法……………37
- III 結果……………39
- IV 考察……………40
- 付表・付図……………43

## 第五章 まとめ……………48

- 謝辞……………50
- 引用文献……………51
- 要旨……………64
- 論文目録……………66

# 第一章

## 序論

骨格筋が損傷を受けると、細胞膜と基底膜の間に局在するサテライトセルが活性化・増殖し、筋核へと分化することで骨格筋の再生を行う (Dumont et al. 2015)。筋再生に加えて、サテライトセルは筋肥大や血管新生等にも寄与する可能性が示されており (Murach wt al. 2017; Christov et al. 2007)、近年様々な実験条件の下でサテライトセルの役割が明らかにされてきている。本稿においては、ヒトに応用可能な範囲の生理的刺激を想定し、低酸素トレーニング・低酸素曝露およびエキセントリック収縮がサテライトセルの動態に及ぼす影響を組織化学的・分子生物学的手法を用いて検討した。

### I 低酸素曝露が骨格筋に与える影響

低酸素が血管新生を誘導する機序として、低酸素誘導因子 1 (Hypoxia Inducible Factor-1 : HIF-1) による転写調節が知られている (Favier et al. 2015; Semenza, 2012)。HIF-1 は HIF-1 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  から成るヘテロ二量体の転写調節因子であり、低酸素下での適応の主要調節因子であると考えられている。常酸素化において、HIF-1 $\beta$  が安定な状態で多量に存在している一方で、HIF-1 $\alpha$  はタンパク質レベルでの調節を受けている。Prolyl-hydroxylases (PHD) は、HIF-1 $\alpha$  上のプロリン残基のヒドロキシル化を行う酵素であり、その反応に酸素と 2-オキソグルタル酸、更に補因子として Fe<sup>2+</sup>を必要とする。ヒドロキシル化された HIF-1 $\alpha$  は von Hippel-Lindau タンパク質に認識されてユビキチン化を受け、プロテアソーム系によって分解される。低酸素は PHD が利用できる酸素を減少させることで HIF-1 $\alpha$  を安定化する。安定化した HIF-1 $\alpha$  は HIF-1 $\beta$  と二量体を形成して核内に移行し転写調節を行う。しかし、低酸素曝露を受けた骨格筋中の HIF-1 $\alpha$  タンパク質の安定化は、実験的な制限によってしばしば確認されない。HIF-1 $\alpha$  タンパク質は半減期が短く、HeLa 細胞を用いた先行研究では HIF-1 $\alpha$  タンパク質の安定化を確認でできるのは 1% O<sub>2</sub> に曝露後 3 時間以内のみで (Bagnall et al. 2014)、更に 1%O<sub>2</sub> に 4 時間曝された Hep 3B 細胞では 15 分間後には検出不可能になった (Wang et al. 1995)。加えて HIF-1 $\alpha$  の安定化を示した多くの研究は in vitro で強い低酸素 (1%O<sub>2</sub> 等) を用いており、骨格筋で HIF-1 $\alpha$  の安定化を報告した研究は 6%O<sub>2</sub> や 5000m を超える強度の高い低酸素に限られている (Favier et al. 2015)。HIF-1 $\alpha$  の安定化に関与する他の要因として活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) と一酸化窒素 (nitric-oxide : NO) が報告されている (Chaudhary et al. 2012; Guzy et al. 2005; Balligand et al. 2009)。ROS は PHD の補因子である Fe<sup>2+</sup>を酸化して Fe<sup>3+</sup>に変化させることで HIF-1 $\alpha$  の安定化をもたらし、NO は PHD を S-ニトロシル化することで不活性化して HIF-1 $\alpha$  を安定化させる。

HIF-1 によって上方調節を受ける血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) は、血管新生の主要な調節因子である (Hoier and Hellsten, 2014)。VEGF の阻害剤の投与はトレーニングや過活動誘発性の血管新生を無効化し、VEGF の遺伝的ノックアウトマウスは基底レベルでの毛細血管数の低下を示した (Hoier and Hellsten, 2014)。実際に、低酸素曝露後に VEGF mRNA あるいはタンパク質の発現が増加したことを報告する研究が多く存在する (Ohno et al 2012; de Theije et al. 2015; Flann et al. 2014)。また、VEGF は HIF-1 に依存しない AMP-activated protein kinase (AMPK) 経路によっても上方調節を受ける (Zwetsloot et al. 2008)。AMPK は AMP/ATP 比の増加や低酸素曝露に

よって活性化されることが知られており、AMPK ノックダウンマウスは基底レベルでの VEGF mRNA の発現が低下し、急性の低酸素下においても VEGF の上方調節が抑制される (Zwetsloot et al. 2008)。AMPK が VEGF の調節を行う経路として、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター $\gamma$  共役因子 (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha : PGC1 $\alpha$ ) -エストロゲン関連受容体 $\alpha$  (estrogen-related receptor- $\alpha$  : ERR- $\alpha$ ) 経路が考えられ、実際に AMPK の活性化はマウス骨格筋の PGC1 $\alpha$  mRNA 発現を増加させた (Lee et al. 2006)。VEGF 遺伝子のイントロン部位には ERR $\alpha$  認識配列が存在し、PGC1 $\alpha$  は ERR- $\alpha$  のプロモーター部位に結合して ERR- $\alpha$  を活性化させて VEGF の発現を調節している (Chinsomboon et al. 2008)。NO もまた血管新生に関与する因子の 1 つである。NO は骨格筋において、血管内皮細胞に存在する内皮型 NOS (endothelial NOS : eNOS) と筋細胞膜上に存在する神経型 NOS (neuronal NOS : nNOS) によって合成される (Clanton, 2007)。 $\alpha$ 1-アドレナリン受容体アンタゴニストであるプラゾシンによる血流増加誘導性の長趾伸筋における血管新生は、VEGF の下方制御に関係して eNOS 欠損マウスにおいて抑制される (Williams et al. 2006)。また、nNOS 欠損マウスは Wild タイプのマウスと比較して、VEGF-A mRNA および毛細血管密度が低下することが明らかにされている (Ward et al. 2005)。この他にも線維芽細胞増殖因子 1/2 (Fibroblast growth factors : FGF1/2) やアンジオポエチン 1 等も血管新生に関与することが報告されており、様々な因子によって骨格筋の血管新生が誘導される (Yun et al. 2010; Brindle et al. 2006)。

サテライトセルは、基底膜下に存在して筋線維の再生や肥大、増殖に関与する幹細胞である。通常は休止状態で存在し、トレーニングや筋損傷に反応して活性化、増殖し筋核に分化してトレーニング効果や筋再生に関与する (Dumont et al. 2015)。主に *in vitro* において、低酸素曝露はサテライトセルの活性化・増殖を促進し、分化を阻害する研究結果が明らかにされている (Jash and Adhya, 2015; Li et al. 2007; Liu et al. 2012)。この作用は HIF-1 によって説明され、低酸素による HIF-1 の安定化は、サテライトセルの活性化および分化の阻害をもたらす。低酸素によるサテライトセルの活性化が *in vivo* の骨格筋に与える影響として、筋の損傷によって血流に異常が生じ、一時的な低酸素状態に陥ることが骨格筋の再生に有用であることが証明されている (Jash and Adhya, 2015)。しかし、吸気による全身性の低酸素曝露が、*in vivo* のサテライトセル動態にどのような影響を与えるのかに関してはほとんど明らかにされていない。

サテライトセルは骨格筋において毛細血管の近傍に位置しており、筋再生の際に毛細血管の内皮細胞と可溶性の成長因子を相互に分泌することが知られている (Christov et al. 2007)。特に分化状態 (myogenin を発現) のサテライトセルが、可溶性の血管新生促進因子 (VEGF-A、FGF2、HGF 等) を分泌する。サテライトセルによる血管新生効果は *in vivo* においても証明されており、ゲルプラグアッセイを用いた Latroche 等はゲル内にサテライトセルを追加することが、毛細血管の発達を促進することを明らかにした (Latroche et al. 2017)。また、サテライトセルは加齢によってその数や機能が低下することが明らかにされており、サテライトセルによる血管新生促進能力も加齢によって低下することが証明されている (Rhoads et al 2013)。他方、ヒトにおいて毛細血管の多く存在する骨格筋を持つ高齢者間の方が、毛細血管密度の低い骨格筋よりも運動によるサテライトセルの活性化が著しいことが示されている (Snijders et al. 2017)。更に、サテライトセルと毛細血管の距離は、Type II 線維において高齢者よりも若年者でより近いことが証明されている (Nederveen et al. 2016)。こうした研究結果は、血管新生およびサテライトセルの活性化が相互に関係することを強調している。しかし、サテライトセルの条件

的ノックアウトを用いた研究は、Adult のマウスにおけるサテライトセルの枯渇が、ランニングホイールの自由走行による血管新生に影響を与えないことを明らかにした (Murach et al. 2017)。これは、運動による血管新生にサテライトセルが関係しないことを示唆しているが、用いたマウスの年齢や低酸素曝露単独の効果、低酸素とトレーニングを組み合わせた際の相乗効果にサテライトセルが関係していないかは不明である。そこで、本稿第二章においては、持続的低酸素曝露が若齢 (10 週齢) と高齢 (20 ヶ月齢) マウスの骨格筋 (ヒラメ筋、腓腹筋表層部) の血管新生やサテライトセル活性化に与える影響を報告している。

低酸素曝露と常酸素状態を繰り返し受ける間欠的低酸素曝露は、持続的な低酸素とは異なる作用を持っている。ラットに対して一日に 15 分の 12%O<sub>2</sub> の低酸素曝露と 15 分間の常酸素を 5 回繰り返した間欠的低酸素曝露は、その急性的な効果として腓腹筋の深部と表層部の両方で PGC1 $\alpha$  及び VEGF-A mRNA の増加を示している (Suzuki, 2016)。この VEGF-A mRNA の増加には PGC1 $\alpha$  の増加が関与すると考えられている。同様の効果は、1 時間の持続的な低酸素曝露には見られなかった。同研究において、長期的 (3 週間) の間欠的低酸素曝露は腓腹筋深層部の C/F 比を有意に増加させ、同様の効果は 1 時間の持続的低酸素曝露では見られなかった。間欠的な低酸素が持続的低酸素と異なる点として、再酸化による活性酸素種 ROS の爆発的な増加が考えられる (Lavie, 2015)。低酸素状態ではアデニンヌクレオチドの分解によってヒポキサンチンが増加し、この状態で再酸化によって酸素が利用できる状況になるとキサンチンオキシダーゼによる ROS 生成を伴うヒポキサンチンの代謝が行われる。実際に間欠的低酸素曝露 (10%O<sub>2</sub>) が、常酸素コントロールと比較してラットの骨格筋の ROS を増加させることが明らかにされている (Domínguez-Álvarez et al. 2017)。睡眠時無呼吸症候群や COPD 等の慢性の呼吸疾患の患者は、日常的に間欠的な低酸素状態を経験する可能性が高い。このような患者において間欠的低酸素曝露は、患者における骨格筋や心血管機能の弱体化に関与すると考えられている (Mateika et al. 2015)。しかし、間欠的低酸素の有害な効果を示した研究の多くは、無呼吸に近い高い強度の低酸素を用いており、より低強度の低酸素を用いた研究では血圧の低下や恐らくは VEGF の放出に起因する側副血管の発達を示す等、間欠的低酸素が心血管機能に有益な可能性が示されている (Mateika et al. 2015)。また、Serebrovskaya 等は間欠的低酸素の有益な効果はシグナル分子としての ROS の産生に起因することを示した (Serebrovskaya et al. 2008)。間欠的低酸素がマウス骨格筋に血管新生をもたらす機序には未だ不明な点が多く存在し、サテライトセルに与える影響に関してはほとんど不明である。そこで本稿第二章では続的低酸素曝露に加えて、間欠的低酸素曝露が若齢及び高齢マウス骨格筋の血管新生とサテライトセル活性化に与える影響を合わせて報告している。

## II 低酸素トレーニング

低酸素 (あるいは高地) トレーニングには、低酸素下でトレーニングと生活を行う Living High-Training High (LHTH) と、どちらかを常酸素下で行う Living High-Training Low (LHTL)、Living Low-Training High (LLTH) が存在する (Vogt and Hoppeler, 2010)。低酸素トレーニングは主に持久力の向上のために行われているが、低酸素下では筋線維への酸素供給の低下とトレーニングの機械的負荷が減少するため、特に LHTH は骨格筋線維の萎縮を誘導しやすい。そのため、LHTL と LLTH は低酸素によるメリットを維持しつつデメリットを抑える方法として考案された。LLTH は、トレーニング時にのみ低酸素曝露を行うために LHTL よりもより簡便に取り扱うことができる。LLTH が実際に

運動パフォーマンスや筋の酵素活性を高めるか否かは議論がなされており、特に低酸素トレーニングを絶対的あるいは相対的な強度で行ったのかは重要な点の一つである (Vogt and Hoppeler, 2010)。コントロールトレーニングに対して絶対的な強度でトレーニングを行った研究の方が、低酸素トレーニングによる効果を示しやすい傾向が見られる。LLTH は運動パフォーマンスや酵素活性、血管新生に関連して研究されているが、血管新生の機序や毛細血管と相互作用するサテライトセルに与える影響に関して調査した研究はほとんど存在しない。

そこで我々は以前、サラブレッドを用いて絶対的な強度で一過性の低酸素 (16%O<sub>2</sub>) トレーニングによるこれらの変化を調査した (Okabe et al. 2017)。一過性の低酸素トレーニングは予想に反し、有意ではないが常酸素よりも PGC1 $\alpha$  及び VEGF mRNA 発現が低値を示すことを明らかにした。これは低酸素トレーニングが PGC1 $\alpha$  の上方調節に関わる AMPK の活性化に与える影響を調査した研究に一致しており、Morales-Alamo 等は予想に反して低酸素トレーニングを行ったヒトにおいて AMPK の Thr172 部位におけるリン酸化による活性化が生じないことを報告した (Morales-Alamo et al. 2012)。同研究において低酸素トレーニング群は活性化酸素の増加及び、AMPK のリン酸化を促進する AMP/ATP 比の増加をもたらす一方で、AMPK の上流に存在する LKB1 を活性化する Sirt1 の活性が低下することを示した。この Sirt1 活性化の低下は NAD<sup>+</sup>/NADH.H<sup>+</sup>の低下に起因しており、低酸素による ROS がこの比の低下に関わる糖代謝を促進したためであると提起した。同研究者等は、低酸素による過剰な ROS がこの結果をもたらしたと考え、次に抗酸化物質と低酸素トレーニングによる組み合わせを試験した (Morales-Alamo et al. 2017)。その結果、抗酸化物質群で血中 ROS が低下し NAD<sup>+</sup>/NADH.H<sup>+</sup>比の改善が見られた一方で AMP/ATP 比の増加も抑制され、AMPK の活性化は低酸素トレーニングのみの群と異ならなかった。更に類似の研究結果として組織の低酸素をもたらす血流制限トレーニングと、同程度の低酸素をもたらすトレーニングとを比較した研究が存在する (Christiansen et al. 2018)。同研究において、血流制限は低酸素トレーニングよりも ROS の増加及び AMPK の活性化をもたらした。同研究では低酸素を超える ROS 増加の原因は示されていないが、ずり応力の増加による NADPH オキシダーゼによる ROS の生成が一つの要因として考えられる (Bretón-Romero et al 2012)。これらの AMPK の活性化を調査した研究は、適度な ROS の発生、AMP/ATP 比と NAD<sup>+</sup>/NADH.H<sup>+</sup>比のバランスが重要であることを示している。この考えに一致して我々は以前、サラブレッドに対して高酸素下 (25%O<sub>2</sub>) での一過性トレーニング (絶対的強度) を行っており、代謝的負荷が常酸素群よりも低いと考えられるにも関わらず、高酸素トレーニング群は PGC1 $\alpha$  及び VEGF-A mRNA の発現が高く、同時に糖代謝が低いことを表す有意に低い血中乳酸濃度を示した (未発表)。低酸素が ROS の増加をもたらすと同様に、高酸素もまた ROS の増加をもたらすが、ROS が増加し始める変曲点は低酸素に比べて高く (Clanton, 2007)、絶対的強度で行った我々の研究において ROS の増加はおそらく低酸素と変わらないと考えられる。一過性の高酸素による結果は、AMPK-PGC1 $\alpha$ -VEGF-A による血管新生において高酸素が有効である可能性を示すと共に、ROS だけでなく代謝状態が重要な要因であることを強調している。一方で、急性の高酸素トレーニングではサテライトセルの活性化を示す遺伝子 (Pax7、MyoD、Myogenin) の発現が常酸素群よりも低く、低酸素トレーニング群ではこのような変化は見られなかった。高酸素下においてサテライトセルの活性化が抑制されたことは、代謝的ストレスがサテライトセルの活性化に有効である可能性を示している。本稿第三章においては、より長期的 (4 週間) な低酸素 (15%O<sub>2</sub>) トレーニングが、サラブレッド中殿筋の血管新生及びサテライトセルに与える影響について検討している。

### III プレコンディショニング

強度の高い運動を実行する前に同様の運動を行うこと（プレコンディショニング）は、高強度運動による筋痛の軽減や筋張力のより早い回復をもたらすことが報告されている（Chen et al. 2012; Lavender et al. 2008; Maeo et al. 2017）。プレコンディショニングの効果は2日から1週間程度で生じ、筋痛をほとんど伴わない軽い負荷や持続時間の短い運動を行うことによっても生じることが明らかにされている（Lavender et al. 2008; Maeo et al. 2017）。実際に筋痛の軽減が報告されている一方で、その機序に関してはほとんど明らかにされていない。

アイシングは、プレコンディショニングと同様に痛みを軽減する目的で、筋の損傷後の処置として広く用いられている。しかし、アイシングは再生中のサテライトセルの増殖や分化を遅延させる可能性が示されている（Takagi et al. 2010）。このことは筋痛が正常な骨格筋の再生のために必要である可能性を示唆している。我々の研究室は以前、アイシングが実際の筋再生及びサテライトセル動態に与える影響を調査した（Ikezaki et al. 2017）。その結果、損傷後3日間のアイシングは組織化学的に示される筋線維の回復を阻害しなかったが、特に損傷早期においてサテライトセルの増殖時に発現するMyoD mRNAの発現を低下させた。同時に筋痛関連遺伝子の発現低下を確認しており、より長いアイシングの期間は筋再生に悪影響を与える可能性も考えられる。

エキセントリック収縮は、コンセントリック収縮やアイソメトリック収縮と比較して効果的に筋の成長を促す（Roig et al. 2009; Hedayatpour et al. 2015）。一方でエキセントリック収縮は運動の1~2日後にピークを迎える筋痛（遅発性筋痛（DOMS））を引き起こす（Nosaka et al. 2002; Chen et al. 2012）。本稿第四章においては、プレコンディショニングの機序を調査するためにラットに2種類のエキセントリック収縮（プレコンディショニング収縮と損傷性エキセントリック収縮）を施し、筋痛関連遺伝子のmRNA発現を測定している。プレコンディショニングは筋損傷の前の処置であり、損傷後の処置であるアイシングとは異なる応答が考えられる。また、プレコンディショニングがサテライトセル動態に与える影響は明らかになっていない。そのため筋痛関連因子に加えて、サテライトセル関連遺伝子の発現を測定することで、プレコンディショニングが筋再生及びトレーニング効果（筋肥大や筋核数の増加）に与える影響を調査している。

## 第二章

# 低酸素刺激がマウス骨格筋における血管新生とサテライトセルに及ぼす影響

### I 緒言

低酸素 (Semenza, 2012) 並びに運動 (Radak et al. 2013) は共に活性酸素種(ROS)の増加要因であり、それらを組み合わせた低酸素トレーニングは ROS を大きく増加させることが考えられる (Zuo et al. 2013)。ROS や活性窒素種(RNS)の増加は、それらがミトコンドリア生成や血管新生、サテライトセルの活性化に対してホルミシス効果を持つことで、運動による有益な効果を得るために必要である可能性がある (Nagahisa et al. 2016; Merry and Ristow, 2016)。我々は以前にサラブレッドを用いて低酸素トレーニングの有益な効果を証明したが、毛細血管密度は速く解糖的な線維が支配的な中殿筋においてのみ評価を行っている (Nagahisa et al. 2016)。低酸素を用いた先行研究は筋線維タイプ特異的な適応変化を示しており (de Theije et al. 2015; Carberry et al. 2014)、ROS 及び RNS による作用が筋線維タイプ特異的に生じる可能性を示している。

持続的または間欠的な低酸素曝露は ROS の増加を引き起こすことが知られており、特に間欠的低酸素は低酸素から常酸素に切り替わる際の再酸化局面において、キサンチンオキシダーゼによる ROS の発生を爆発的に増加させると考えられている (Semenza, 2012; Lavie, 2015)。間欠的低酸素曝露はトレーニングと組み合わせられて、血管新生及び持久力の向上をもたらしているが (Suzuki, 2016)、どのような低酸素曝露の方法がより効果的であるのかは不明なままである。

高齢化もまた基底レベルの ROS を増加させる一方で、運動等による ROS の追加的な増加を抑制するという報告が存在する (Gliemann et al. 2016)。ROS は PGC1 $\alpha$  の上方調節に関係しており (Merry and Ristow, 2016)、PGC1 $\alpha$  は VEGF-A の増加に関与している (Chinsomboon et al. 2008)。先行研究は、運動によって誘導される外側広筋の VEGF-A mRNA 発現は高齢女性において若齢女性よりも低値を示した (Croley et al. 2005)。これらの研究結果は、持続的または間欠的低酸素曝露による ROS の増加が加齢に伴って弱まる可能性を示している。

本研究は免疫組織化学的手法及びリアルタイム RT-PCR 法を用いて、若齢 (10 週齢) 及び老齢マウス (20 ヶ月齢) に対して持続的低酸素または間欠的低酸素がもたらす作用を、特にサテライトセルと血管新生に関して調査することである。加えて、筋線維タイプ特異的な低酸素応答を明らかにするために、異なる代謝特性の筋 (ヒラメ筋、腓腹筋表層部) の分析を行った。

### II 実験方法

#### 1 動物と実験デザイン

全ての実験手法は山口大学の動物実験倫理委員会に承認されており、アメリカ生理学会動物実験指針に従っている。

被験動物として Kyudo company (Tosu, Japan) から購入した 16 頭の若齢 (10 week-old, body weights: 30.9 $\pm$ 0.51g) と、17 頭の老齢 (20 month-old, body weights: 49.3 $\pm$ 1.75g) 雄性マウス (ICR-JCL strain) を用いた。マウスをコントロール群 (N: FIO<sub>2</sub> = 0.21) と持続的低酸素群 (H: FIO<sub>2</sub> = 0.16)、間欠的低酸素群 (H: FIO<sub>2</sub> = 0.21 and 0.16) の 3 群に分けた。O<sub>2</sub> controller (MC-8G-S; Iijima Electronics CO.,



gamagori, Japan) と carbon dioxide monitor (COZY-1; JIKCO, Tokyo, Japan) を用いてチャンバー (内寸: 28 x 35 x 24 cm) 内が 16%O<sub>2</sub> 以下、0.1%CO<sub>2</sub> 以下の常压低酸素条件になるように調節した。持続的低酸素条件において、マウスは上記の低酸素チャンバー内で 5 日間飼育された。間欠的低酸素群においてマウスは 5 日間、明期の 12 時間で 1 時間の 16%O<sub>2</sub> と 1 時間の常酸素を繰り返し受け、一日の残りの暗期の 12 時間は常酸素下に置かれた。全てのマウスは 12 時間の明暗サイクルの下、自由摂食条件の温度 23±2°C、湿度 55±7% のケージ内で管理された。実験終了後直ちにマウスに対してペントバルビタール (70mg/kg) の腹腔内投与による麻酔を施し、被験筋として左右のヒラメ筋、腓腹筋を採取した。採取した筋は直ちに液体窒素によって凍結し、分析まで -80°C で保存した。腓腹筋は、表層部のみを分離しその後の解析に用いた (Fig 1A)。

## 2 免疫組織化学的解析

線維タイプ割合 (%), cross-sectional area (CSA:  $\mu\text{m}^2$ ), サテライトセル数、毛細血管密度は、以前に説明された手法を用いて計測されている (Nagahisa et al. 2016)。各凍結筋サンプルから、-20°C のクリオスタット (CM510, Leica, Nussloch, Germany) を用いて、厚さ 10 $\mu\text{m}$  の連続凍結横断切片を作成した。切片を常温に戻し、0.1M の 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。10 分間のインキュベート後、切片を PBS で洗浄し、一次抗体中で 3 時間インキュベートした。一次抗体として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 (1:2000, 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)。次に、切片を PBS で洗浄した後、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、再び洗浄し、diaminobenzine tetrahydrochloride (Sigma) を HRP の局在に対する色素として使用した。染色した筋線維の画像を顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE, Osaka, Japan) を使って記録した。筋線維は、免疫染色特性を基準として Type I、IIa、IIxb 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最低でも 200 本の筋線維から算出した。

別の切片を、室温下で 0.1M PBS を溶媒とする 2% paraformaldehyde 10 分間浸して固定し、その後 PBS で洗浄、PBS を溶媒とする 10% normal goat serum、2% bovine serum albumin を含むブロッキング溶液中で 30 分間プレインキュベートした。次に、PBS で洗浄し、2% bovine serum albumin/PBS を溶媒とする一次抗体 mouse anti-paired box protein-7 (Pax7, Developmental Studies Hybridoma Bank; 1: 1,000) 及び rabbit anti-laminin (Sigma Aldrich, 1: 1,000) 中で 2 時間インキュベートした。切片を PBS で洗浄し、それぞれの一次抗体に対応する二次抗体として、以下のものを用いた: Cy3-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (1:1000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, USA) と AlexaFluor488 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 で洗浄して、PBS を溶媒とする、4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes) 中に 5 分間室温で染色した。

撮影した Pax7、laminin、DAPI の染色画像を加算し (BZ-X710, KEYENCE)、筋核とサテライトセル及び筋線維面積の測定に使用した (Fig 1 B)。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。

明瞭な基底膜に覆われている毛細血管を計測し、毛細血管密度 (the number of capillaries per 1 mm<sup>2</sup>) と毛細血管/筋線維比を算出した。このような毛細血管と CD31 の共局在は、10 μm の筋切片に対して anti-laminin と anti-CD31 (1: 1000; Sigma Aldrich) 抗体を用いた染色を施すことで確認している。

### 3 RNA の単離とリアルタイム RT-PCR

筋サンプルにおける相対的な mRNA 発現量は、以前説明された手法によってリアルタイム RT-PCR を用いて解析されている (Nagahisa et al. 2016)。TRIZOL reagent (Molecular Probes, Breda, Netherlands) を用いて、各筋肉から total RNA を抽出した。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。抽出した total RNA を、TURBOTM DNase (Ambion, Austin, USA) を用いて 30 分間 37°C で処理し、DNA を除去した。DNase で処理された totalRNA 0.5μg から、Exscript RT reagent kit (Takara, Tokyo, Japan) を用いて 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+95°C で 30 秒間の分解と 58°C で 1 分間のアニーリング/伸展の 40 サイクルで構成されている。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の 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 PRE の値に対する相対量として算出した。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。

本実験に使用した各遺伝子特異的プライマーの配列は、Table 1 にまとめた。PCR プライマー内 pax7、MyoD、myogenin、TNF $\alpha$  (Fujimaki et al. 2014)、Atrogin1、ATG5 (de Theije et al. 2015)、BDNF (Naumenko et al. 2015) は、先行研究を下に設計されており、残りのプライマーは Primer Express software (v3.0, Applied Biosystems Japan) によって設計され、オリゴヌクレオチドは FASMAC (Kanagawa, Japan) において作成された。

#### 2.4. Statistics.

全ての値は平均 $\pm$ SE で表記されている。組織化学的解析及びリアルタイム RT-PCR 分析から得られたデータは、two-way ANOVA (hypoxic method and age differences) の後に t-test による分析を行って Bonferroni 法による調節がかけられた。mRNA 発現の増加割合の Pearson's correlation coefficients は、各群の全てのデータを総合して計算された。統計的有意差は  $p < 0.05$  とした。

## III 結果

### 3 体重と筋重量

若齢のマウスの筋重量は N 群 (SOL: 16.0 $\pm$ 1.1g, GA-S:193.0 $\pm$ 7.3g) と比較して H 群 (SOL: 13.3 $\pm$ 0.3g, GA-S:173.6 $\pm$ 17.4g) 及び IH 群 (SOL: 13.4 $\pm$ 0.6g, GA-S:173.7 $\pm$ 5.2g) でヒラメ筋、腓腹筋共に僅かに減少したが、有意ではなかった。老齢マウスの筋重量は、全ての条件において有意な変化は見られなかった (N 群 SOL: 16.8 $\pm$ 1.8g, GA-S:177.3 $\pm$ 16g, H 群 SOL: 17.0 $\pm$ 0.6g, GA-S:178.2 $\pm$ 3.9g, IH 群 SOL:

15.9±1.1g, GA-S:197.6±16.1g)。

## 2 筋線維特性

毛細血管密度を除く筋線維特性は Table 2 にまとめられている。両低酸素条件の筋線維タイプ組成は、若齢及び老齢マウスの全ての筋においてコントロールと比較して有意に変化しなかった。若齢マウスのヒラメ筋の筋線維面積は、持続的な低酸素条件において TypeI 及び IIa 線維で有意に低下し、間欠的低酸素条件においても TypeI 線維で有意に低下した (Fig 2)。一方で、若齢マウスの腓腹筋と老齢マウスの両筋では全ての条件で有意な筋線維面積の変化は見られなかった。若齢マウスの筋核数/筋線維は全ての筋で変化せず、筋核ドメインは筋線維面積同様に持続的低酸素及び間欠的低酸素条件のヒラメ筋において減少した。老齢マウスでは、両筋で筋核数及び筋核ドメインに有意な変化は見られなかった。サテライトセル数/筋線維は若齢及び老齢マウスの両筋で、両低酸素条件によって僅かに増加したが有意ではなかった。中心核線維割合は、若齢マウスと比較して老齢マウスの腓腹筋において有意な増加が見られた。

老齢マウスのヒラメ筋の毛細血管密度は、持続的低酸素条件において毛細血管密度の有意な増加を示した (Fig 3A, B)。若齢マウスにおいて毛細血管密度は両筋の両低酸素条件とも、コントロールと比較して有意に変化しなかったが、低酸素の曝露によってヒラメ筋では~15%増加した。毛細血管/筋線維比は、高齢の持続的低酸素群ヒラメ筋において増加したが、全ての群と条件においてコントロールと比較して有意差は見られなかった (Fig 3C, D)。老齢マウスの腓腹筋の毛細血管密度と毛細血管/筋線維比は、若齢マウスと比較して有意に減少した。

## 3 mRNA 発現

### Soleus muscle

各筋の mRNA 発現は、N 群を 1 とした相対量で表されている (Fig 4)。H 群の若齢ヒラメ筋において、MyoD、BDNF、MHCe mRNA 発現がコントロールと比較して有意に増加し、Atrogin1 mRNA 発現が間欠的低酸素条件との比較で有意に増加した (Fig 4A)。一方で、VEGF-A、PGC1 $\alpha$  mRNA 発現はコントロールと比較して両低酸素条件で有意に低下した。若齢マウスの IH 群では Myostatin mRNA 発現が有意に増加し、低酸素条件間の比較において PGC1 $\alpha$  mRNA 発現が H 群よりも有意に高かった。

老齢マウスのヒラメ筋では、若齢マウスと異なり H 群で VEGF-A mRNA の有意な増加が見られた (Fig 4B)。同時に、nNOS が H 群において有意に増加した。IH 群では、若齢マウスヒラメ筋と同様に Myostatin mRNA 発現の有意な増加が見られた。

両低酸素群の VEGF-A、nNOS mRNA 発現及び H 群の PGC1 $\alpha$  mRNA 発現は、若齢マウスと比較して高齢マウスで有意に増加した。反対に H 群の BDNF 及び IH 群の FGF2 mRNA 発現は高齢マウスにおいて有意に低値を示した。

### Gastrocnemius muscle

若齢の腓腹筋表層部もヒラメ筋と同様に H 群において、コントロールと比較して VEGF-A mRNA 発現が有意に低下した (Fig 4C)。若齢の IH 群においてのみ、FGF-2 mRNA 発現の有意な増加が見られた。低酸素条件間での比較では、IH 群の方が MyoD、VEGF-A、FGF-2、PGC-1 $\alpha$  において有意に高い mRNA 発現を示した。

老齢マウスの腓腹筋表層部の mRNA 発現は、両低酸素条件においてコントロールに対する有意な変化を示さなかった (Fig 4D)。H 群の Myogenin 及び ATG5 mRNA 発現は IH 群に対して有意に高かった。

#### Correlations between factors

先行研究は NO がサテライトセルの活性化に関与していることを証明しており (De Palma and Clementi, 2012)、活性化された SC は VEGF-A や FGF2 を含む血管新生因子を分泌する (Rhoads et al. 2009)。そのため、我々は nNOS 及び eNOS mRNA 発現増加割合と、血管新生やサテライトセルの活性化に関与する VEGF-A や FGF2、MyoD mRNA 発現増加割合との間の相関関係を解析した (Table 3)。

若齢、老齢マウスの両方のヒラメ筋において、VEGF-A と nNOS の mRNA の増加割合の間に有意な正の相関関係が見られた。この関係は、若齢、老齢共に腓腹筋の表層部においては見られなかった。若齢の腓腹筋においては eNOS と VEGF-A または MyoD の増加割合の間に有意な正の相関関係が認められた。この関係は老齢マウスにおいては見られず、ヒラメ筋では年齢に関係なく存在しなかった。

## IV 考察

### 1 筋線維特性

**Soleus muscle.** 本研究の 5 日間の持続的低酸素 (16%O<sub>2</sub>) 及び間欠的低酸素は、若齢マウスのヒラメ筋の TypeI 及び TypeIIa 線維の筋線維面積を有意に低下させた。一方で、老齢マウスのヒラメ筋においては筋線維面積の有意な変化は見られなかった。筋線維面積低下と同時に、タンパク質分解に関わる遺伝子である Atrogin1 (Razeghi et al. 2006) の mRNA 発現が、IH 群と比較して H 群において有意に増加した。更に、タンパク質分解の促進と筋形成の阻害に関与する Myostatin (Rodriguez et al. 2014) の mRNA 発現は両低酸素条件において増加した (H:P=0.3, IH:P<0.05)。本研究において Myostatin mRNA 発現は、筋面積の低下を示さなかった老齢マウスのヒラメ筋でも類似の反応を示している。Myostatin mRNA 発現は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROS の一種) の増加により、NF-κB シグナリングを介して上昇することが報告されており (Sriram et al. 2011)、本研究において IH 群においてのみ有意な増加が見られたことに関連すると推察している。

8%O<sub>2</sub> の持続的低酸素を 3 週間実施した先行研究は、マウスヒラメ筋の筋線維面積の低下を示さなかった (de Theije et al. 2015)。この本研究と異なる先行研究の結果を説明する一つの要因は、低酸素の強度である。ラットに対して本研究に近い 14-15%O<sub>2</sub> の間欠的低酸素を 8 週間曝露した先行研究は、毛細血管密度の増加と筋重量の変化を伴わないヒラメ筋の筋線維面積の低下を報告している (Chen et al. 2010)。比較的弱い強度の低酸素は、筋重量に関係なくヒラメ筋の筋線維面積を低下させるのかもしれない。また先行研究 (Chen et al. 2010) において、筋重量を変化させない毛細血管密度の増加は、既存の筋線維のアポトーシスと筋線維数の増加に起因していると考えられている。本研究では、若齢のマウスのヒラメ筋の持続的低酸素条件において MyoD、MHCe 及び BDNF mRNA の有意な増加を明らかにしている。低酸素は *in vitro* においてサテライトセルの増殖と分化を促進し、その重要な因子として MyoD の増加が報告されている (Kook et al. 2008)。先行研究において BDNF は運動後に増加し、新しい筋線維の形成を介して筋再生に寄与している (Yu et al. 2017) 更に、BDNF の筋特異的ノックアウトは、*in vitro* において myogenin、MHCe の発現を阻害し、筋管に融合しない筋核の数を増加させた (Clow and Jasmin, 2010)。加えて、足底筋において SC 枯渇と過活動を組み合わせることでその肥大を検証した先行研究

は、サテライトセルによる筋核の追加の必要性が若齢(8-week-old)において adult のマウス(16-week-old)よりも高いことを明らかにした (Murach *et al.* 2017)。低酸素が筋核の筋線維面積を支配する転写の能力に負荷を掛けるのならば、本研究で見られた低酸素曝露による若齢マウスの筋核ドメインサイズの低下と SCs の活性化は合理的な応答であり得る。これらの先行研究及び本研究の結果は、低酸素刺激により若齢マウスのヒラメ筋において筋線維の新生、もしくは筋核の追加が促進されている可能性を示唆している。このサテライトセルの活性化は、最終的には先行研究 (Chen *et al.* 2010) と同様に、筋重量を変化させることなく毛細血管密度を増加させるかもしれない。

**Gastrocnemius muscle.** 腓腹筋表層部は若齢と老齢共に有意な筋線維面積の低下を示さず、同様にリアルタイム RT-PCR の結果も *Atrogin1*、*Atg5*、*Myostatin mRNA* 発現の有意な変化を示さなかった。このことは、8% O<sub>2</sub> の低酸素を用いて解糖的な長指伸筋の筋線維面積の有意な低下を示した先行研究 (de Theije *et al.* 2015) と異なり、16%O<sub>2</sub> の持続的及び間欠的低酸素が解糖的な筋の萎縮を引き起こすほど深刻な強度ではないことを示している。更にヒラメ筋と異なり、腓腹筋において *MyoD*、*BDNF mRNA* 発現は、両年齢の持続的低酸素条件で増加しなかった。この結果は、筋線維面積変化と合わせて若齢においてはヒラメ筋よりも腓腹筋表層部で低酸素の影響が弱いことを示唆している。

一方、IH 群において *MyoD mRNA* 発現は若齢の H 群との比較で有意に増加した。この *MyoD mRNA* の増加は、コントロールだけでなく H 群との比較においてさえ、*BDNF* 及び *MHCe mRNA* の増加を伴わなかった。このことは、間欠的低酸素曝露が、若齢マウスの腓腹筋表層部のサテライトセルを活性化させる可能性を示唆しており、その機序が持続的低酸素条件のヒラメ筋と異なることを示している。この *MyoD mRNA* の増加は老齢マウスにおいては失われた。若齢マウスと老齢マウスとの間の差異は、間欠的低酸素によって生じる ROS の増加量の違い (Gliemann *et al.* 2016) または、サテライトセルの加齢変化による活性化能力の低下 (Rhoads *et al.* 2013)、NOS 活性の低下 (Casey *et al.* 2011) によって説明できる可能性がある。

## 2 血管新生

**Soleus muscle.** 先行研究 (de Theije *et al.* 2015) は、12 週齢のマウスに対する 8%O<sub>2</sub> の持続的低酸素曝露が酸化的なヒラメ筋において血管新生を促進することを証明した。本研究は、20 ヶ月齢マウスに対する 16%O<sub>2</sub> の持続的低酸素曝露が、ヒラメ筋の毛細血管密度を有意に増加させることを明らかにした。同時に、*VEGF-A mRNA* と *nNOS mRNA* が有意に増加し、両因子間に有意な正の相関関係が見られた。*nNOS* はヒトの運動時にも増加して血管新生に関与することが報告されており (Huber-Abel *et al.* 2012)、更に *nNOS* 欠損マウスは *VEGF-A mRNA* 及び毛細血管数の有意な低下を示す (Baum *et al.* 2013)。加えて、*nNOS* の *mRNA* 発現量は低酸素において増加することが報告されている (Ward *et al.* 2005)。本研究は、老齢マウスに対する 16%O<sub>2</sub> の低酸素曝露が、ヒラメ筋の *nNOS mRNA* 及び *VEGF-A mRNA* の増加をもたらすために十分であることを証明した。両因子の増加は、本研究の老齢マウスヒラメ筋で見られた有意な毛細血管密度の増加に関与していると考えられる。毛細血管密度の増加は低酸素下で筋線維面積の低下によっても生じるので、若齢のヒラメ筋において *nNOS* または *VEGF-A mRNA* の発現が増加しなかったことは、それらの筋線維面積低下に関係している可能性がある。*VEGF-A mRNA* の有意な発現低下に関して、先行研究において矛盾する結果が見られ、*VEGF-A mRNA* 発現は低酸素によつ

て増加 (6% O<sub>2</sub>/ 2 h, Gavin et al. 2016) あるいは低下 (12% O<sub>2</sub>/ 8 weeks, Olfert et al. 2001) が報告されている。実験条件の違いは VEGF-A の mRNA 発現がより短くより強度の高い低酸素によって誘導されることを示唆している。一方で、毛細血管が十分に発達してしまうために長期間の低酸素曝露は VEGF mRNA 発現を促進しなくなると考えられている (12% O<sub>2</sub>/ 8 weeks, Olfert et al. 2001)。本研究の若齢マウスのヒラメ筋は、筋線維面積の低下によって有意ではないが毛細血管密度の増加を示した。筋線維面積の低下は、長期間の曝露によって十分な毛細血管が発達した場合と同様に、拡散距離を短くすることで血管新生刺激を弱めた可能性が高い。

間欠的低酸素は、再酸素化の際にキサンチンオキシダーゼによる ROS の発生を爆発的に増加させる (Lavie, 2015)。ROS は様々な障害に関連している一方で、運動による有益な効果にも関与している (Merry and Ristow, 2016)。実際に間欠的低酸素曝露は、適度であれば血流や血圧に対し有益である可能性が示されている (Mateika et al. 2015)。本研究の間欠的低酸素曝露は、ヒラメ筋に対して若齢・老齢共に有意な毛細血管数の変化をもたらさなかった。特に、老齢においては H 群と異なり VEGF-A や nNOS mRNA 発現にも影響を与えなかった。このことは、H 群と比較して低酸素に曝露されている時間が短いことに起因していると考えられる。

**Gastrocnemius muscle.** 毛細血管密度と毛細血管/筋線維比は、老齢マウスにおいて若齢マウスよりも低値を示した。この結果はこれらのパラメーターが加齢によって同時に低下することを示したヒト外側広筋の先行研究に一致している (Verdijk et al. 2016)。

腓腹筋表層部に対する持続的低酸素曝露は、ヒラメ筋と異なり若齢・老齢共に nNOS mRNA と VEGF-A mRNA の間に相関関係が認められず、毛細血管数の増加をもたらさなかった。先行研究 (de Theije et al. 2015) では、より強度の高い低酸素曝露 (8% O<sub>2</sub>) によって解糖的な長趾伸筋の萎縮が見られた一方、本研究の 16% O<sub>2</sub> 曝露は筋線維面積の有意な変化をもたらさなかった。このことは同時に、若齢マウスのヒラメ筋と異なり筋線維面積の低下によって拡散距離が短くなっていないことを示している。

血管拡張に関与する一酸化窒素 (NO) は、constitutive NOS (eNOS 及び nNOS) によって生体内で合成される (Ho et al. 2012)。低酸素環境での NO 合成では、eNOS の活性が低下する一方で nNOS の影響力が高まる (Ho et al. 2012)。nNOS は Type IIb 線維において他の線維よりも強く発現される (Hoshino et al. 2002)。ヒラメ筋と比較した際、腓腹筋表層部における高い nNOS 発現は、血流の増加によって低酸素の軽減に貢献したと推察される。一方で、強度の高い低酸素 (8% O<sub>2</sub>) を用いた先行研究 (de Theije et al. 2015) において、解糖的な長趾伸筋の筋線維面積の低下が生じたことは、低酸素下での nNOS の上方調節 (Ward et al. 2005) あるいは NO による血流の増加が上限に達してしまったことに起因しているかもしれない。

血流の増加は、ずり応力を増加させることで eNOS mRNA を上方調節し、血管新生に関与する (Egginton et al. 2016)。実際にマウスの長趾伸筋を用いた先行研究において、過活動及び血流増加をもたらすプラゾシン投与は共に血管新生をもたらしたが、eNOS 欠損マウスにおいてはプラゾシン投与群のみが血管新生を生じなかった。更に、nNOS 欠損マウスではどちらも無効化されなかったことが報告されている (Williams et al. 2006a)。このことは、血流の増加が nNOS ではなく eNOS に関連して血管新生を引き起こすことを示している。その上、同様の実験系を用いた先行研究において、VEGF-A の阻害は過活動及びプラゾシン投与の両方の血管新生作用を打ち消した。この結果は、血流の増加による

eNOS と血管新生を介在する因子として VEGF-A の存在を示唆している (Williams et al. 2006b)。本研究において IH 群は、H 群と比較して VEGF-A ( $P<0.05$ ) と eNOS mRNA ( $P=0.063$ ) 発現の増加を示した。更に、若齢の腓腹筋においてのみ eNOS と VEGF-A の mRNA 増加量の間有意な正の相関関係が見られた。常酸素下と比較して低酸素下での運動中には血管の拡張が生じるが、若年と比較して高齢者ではこの血管拡張が弱く、NOS 阻害剤による血管拡張の減弱も見られなかったことが明らかにされている (Casey et al. 2011)。この結果は、本研究の老齢マウスの腓腹筋表層部において両因子に正の相関関係が見られなかったことを説明していると考えられる。

低酸素下での eNOS 発現の下方調節は (Ho et al. 2012)、若齢の腓腹筋表層部における持続的低酸素と間欠的低酸素の間の eNOS 及び VEGF-A mRNA 発現の有意な増減に関係している可能性がある。ヒトを用いた高強度インターバルトレーニング(SIT)と持久性トレーニングを比較した先行研究において、毛細血管密度の増加と eNOS タンパク質含量の増加が SIT により効果的に生じたことが示されている (Cocks et al. 2013)。このことは、持続的な運動よりも、インターバルのある運動が eNOS の増加に有効であることを示唆しているかもしれない。

持続的低酸素条件と比較して、若齢マウス腓腹筋の間欠的低酸素曝露条件において、VEGF-A mRNA が有意に増加すると同時に MyoD mRNA が増加した。このことは、eNOS-VEGF-A 誘導性の血管新生にサテライトセルが関与する可能性を示唆している。実際にサテライトセルは、NO によって活性化されることが知られており (De Palma and Clementi, 2012)、また活性化したサテライトセルは VEGF-A や FGF2 等の血管新生因子を放出することが報告されている (Rhoads et al. 2009)。本研究においては、FGF2 mRNA が若齢マウスの腓腹筋表層部で間欠的低酸素曝露によって有意に増加することが明らかになった。若齢の腓腹筋表層部において eNOS mRNA の発現は、MyoD、VEGF-A に対して有意な相関を持っていた。このことは、若齢の腓腹筋表層部においてサテライトセルが、NO 誘導性の VEGF-A の増加を介在している可能性を示唆している。

## Conclusion

若齢マウス (10 週齢) において、持続的な低酸素曝露は若齢の腓腹筋ではなくヒラメ筋において筋線維面積を低下させ、サテライトセル関連因子の発現を増加させた。更に、高齢マウスにおいて持続的低酸素は、腓腹筋ではなくヒラメ筋で nNOS と VEGF-A mRNA の発現を増加させ、同時に毛細血管密度の増加が見られた。我々は、年齢や低酸素曝露方法、筋の代謝特性の違いが骨格筋の血管新生に対して有意に異なる結果をもたらすと結論付けた。

**Table 1** Real-time RT-PCR primer sequences.

gene	Forward sequence	Reverse sequence
GAPDH	CATGGCCTCCGTGTTCCCTA	GCGGCACGTCAGATCCA
Pax7	AAATCCGGGACCGGCTGCTGAA	AGACGGTTCCTTTGTGCGCCA
MyoD	GGATGGTGTCCCTGGTTCTTCAC	CTATGTCCTTTCTTTGGGGCTGGA
myogenin	AACTACCTTCCTGTCCACCTTCA	GTCCCCAGTCCCTTTTCTTCCA
VEGF-A	AGTGGCTTACCCTTCCTCATCTT	CGGGTCTGCCCCATT
FGF2	TGGTATGTGGCACTGAAACGA	TCCAGGTCCCGTTTTGGAT
BDNF	TAGCAAAAAGAGAATTGGCTG	TTTCAGGTCATGGATATGTCC
PGC1 $\alpha$	GGACAGTCTCCCCGTGGAT	TCCATCTGTCAGTGCATCAAATG
Neuronal NOS	GGTCTTCGGGTGTCGACAA	GAGTAGGCAGTGTACAGCTCTCTGA
Inducible NOS	GGATCTTCCCAGGCAACCA	CAATCCACAACCTCGCTCCAA
Endothelial NOS	TTGTCTGCGGCGATGTCA	GAATTCTCTGCACGGTTTGCA
MHCe	GAGCAGCTGGCGCTGAA	TCTGATCCGTGTCTCCAGTTTCT
myostatin	ACCACGGAAACAATCATTACCAT	TGCCATCCGCTTGCATT
TNF $\alpha$	ATGGCCTCCCTCTCATCAGT	CTTGGTGGTTTGCTACGACG
Atrogin1	ACCGGCTACTGTGGAAGAGA	CCTTCCAGGAGAGAATGTGG
ATG5	TTGAATATGAAGGCACACCCC	CTCTTGAAATGTAAGTGTGATGTTCCAA

GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Pax7; paired box transcription factor-7, MyoD; myogenic determination factor, VEGF-A; vascular endothelial growth factor-A, FGF2; fibroblast growth factor 2, BDNF; brain-derived neurotrophic factor, PGC1 $\alpha$ ; proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, NOS; nitric oxide synthase, MHCe; myosin heavy chain embryonic, TNF $\alpha$ ; tumor necrosis factor alpha, ATG5; autophagy-related gene 5



**Table 2** Muscle fiber properties in each experimental group.

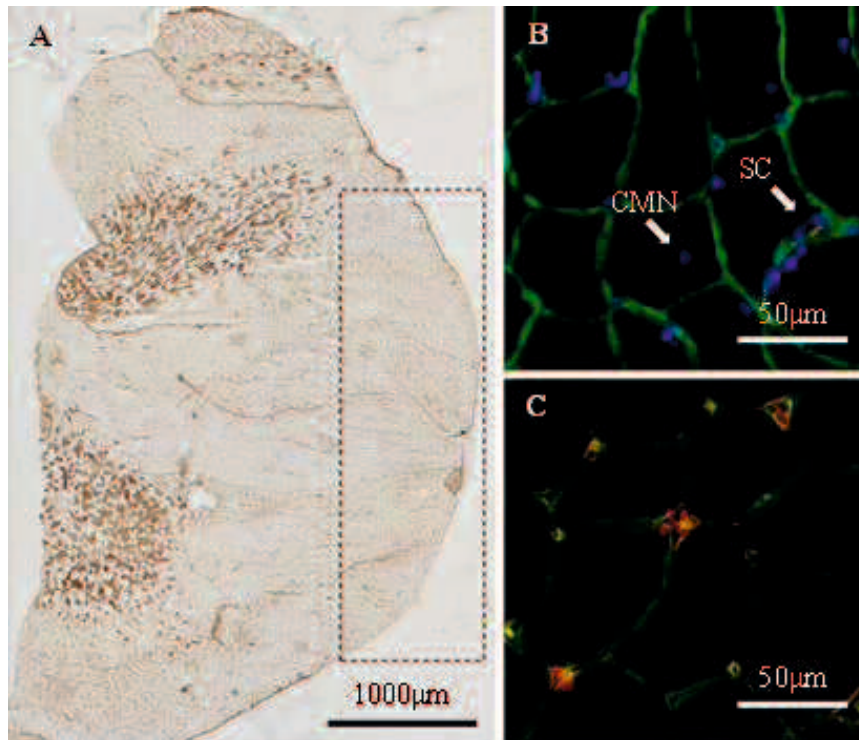
<b>SOL</b>	Fiber type	N	Young			Old	
			H	IH	N	H	IH
Population of muscle fiber type (%)	I	51.3 ± 3.4	59.8 ± 4.5	57.9 ± 2.8	52.7 ± 4	50.6 ± 5	53.5 ± 5.3
	IIa	48.7 ± 3.4	40.2 ± 4.5	42.1 ± 2.8	47.3 ± 4	49.4 ± 5	46.5 ± 5.3
Muscle fiber area (μm <sup>2</sup> )	I	2041 ± 68	1563 ± 115 †	1615 ± 50 †	1915 ± 74	1938 ± 95	2215 ± 240
	IIa	1734 ± 76	1207 ± 87 †	1419 ± 87	1944 ± 203	1966 ± 80 ‡	1891 ± 110 ‡
Myonuclear number/fiber	I	2.51 ± 0.06	2.47 ± 0.1	2.46 ± 0.08	2.45 ± 0.08	2.6 ± 0.07	2.63 ± 0.09
	IIa	2.27 ± 0.07	2.09 ± 0.12	2.13 ± 0.1	2.36 ± 0.1	2.44 ± 0.05	2.19 ± 0.08
Myonuclear domain size (μm <sup>2</sup> )	I	928 ± 38	679 ± 19 †	736 ± 26 †	882 ± 36	831 ± 46 †	911 ± 60
	IIa	854 ± 32	637 ± 27 †	754 ± 34	925 ± 69	880 ± 33 ‡	953 ± 62
Satellite cell number/100 fiber	I	3.3 ± 1.1	4.0 ± 1.3	6.1 ± 1.3	2.2 ± 1.1	3.4 ± 1.1	5.0 ± 1.7
	IIa	4.0 ± 0.7	2.7 ± 1.3	5.6 ± 0.7	2.9 ± 1.1	6.0 ± 1.3	3.9 ± 1.3
Fiber-containing central nucleus (%)	I	ND	ND	1.1 ± 0.7	7.4 ± 2.6	8.1 ± 3.8	1.7 ± 1.2
	IIa	ND	ND	0.6 ± 0.6	7.9 ± 3.2	5.3 ± 3.9	2.2 ± 1.1
<b>GA-S</b>	Fiber type	N	Young			Old	
			H	IH	N	H	IH
Population of muscle fiber type (%)	IIx/b	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
Muscle fiber area (μm <sup>2</sup> )	IIx/b	2518 ± 38	2402 ± 25	2723 ± 111	2612 ± 197	2513 ± 151	2718 ± 152
Myonuclear number/fiber	IIx/b	1.73 ± 0.05	1.67 ± 0.05	1.75 ± 0.07	2.06 ± 0.11	1.8 ± 0.05	1.83 ± 0.06
Myonuclear domain size (μm <sup>2</sup> )	IIx/b	1665 ± 58	1658 ± 36	1799 ± 60	1469 ± 153	1550 ± 111	1671 ± 112
Satellite cell number/100 fiber	IIx/b	5.3 ± 1.3	6.0 ± 1.3	7.8 ± 3.4	5.0 ± 0.8	6.0 ± 1.3	5.0 ± 0.8
Fiber-containing central nucleus (%)	IIx/b	1.3 ± 0.8	3.3 ± 1.1	2.8 ± 1.6	15.6 ± 3.6 ‡	8.7 ± 2.5	11.1 ± 3.3

Data are shown for properties of muscle fiber types and CSA in the soleus muscle (SOL) and superficial portion of the gastrocnemius (GA-S) in normoxic control (N), continuous hypoxia (H), and intermittent hypoxia (IH) groups of young and old mice. Values are the mean ± SE. †: Significant difference from each N group (P < 0.05). ‡: Significant difference from young mice in each group (P < 0.05).

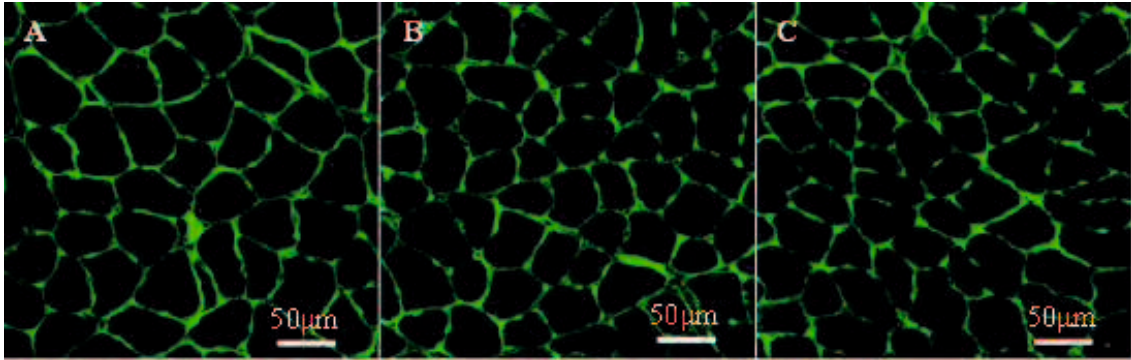
**Table 3** Pearson's correlation coefficients between each factor.

		MyoD		VEGF-A		FGF2	
		SOL	GA-S	SOL	GA-S	SOL	GA-S
nNOS	Young	-0.16	0.16	0.67*	0.25	-0.05	0.16
	Old	0.01	0.09	0.52*	0.28	0.48	-0.10
eNOS	Young	0.24	0.50*	0.14	0.59*	0.50	0.35
	Old	0.32	0.31	-0.08	0.08	0.57*	0.49*

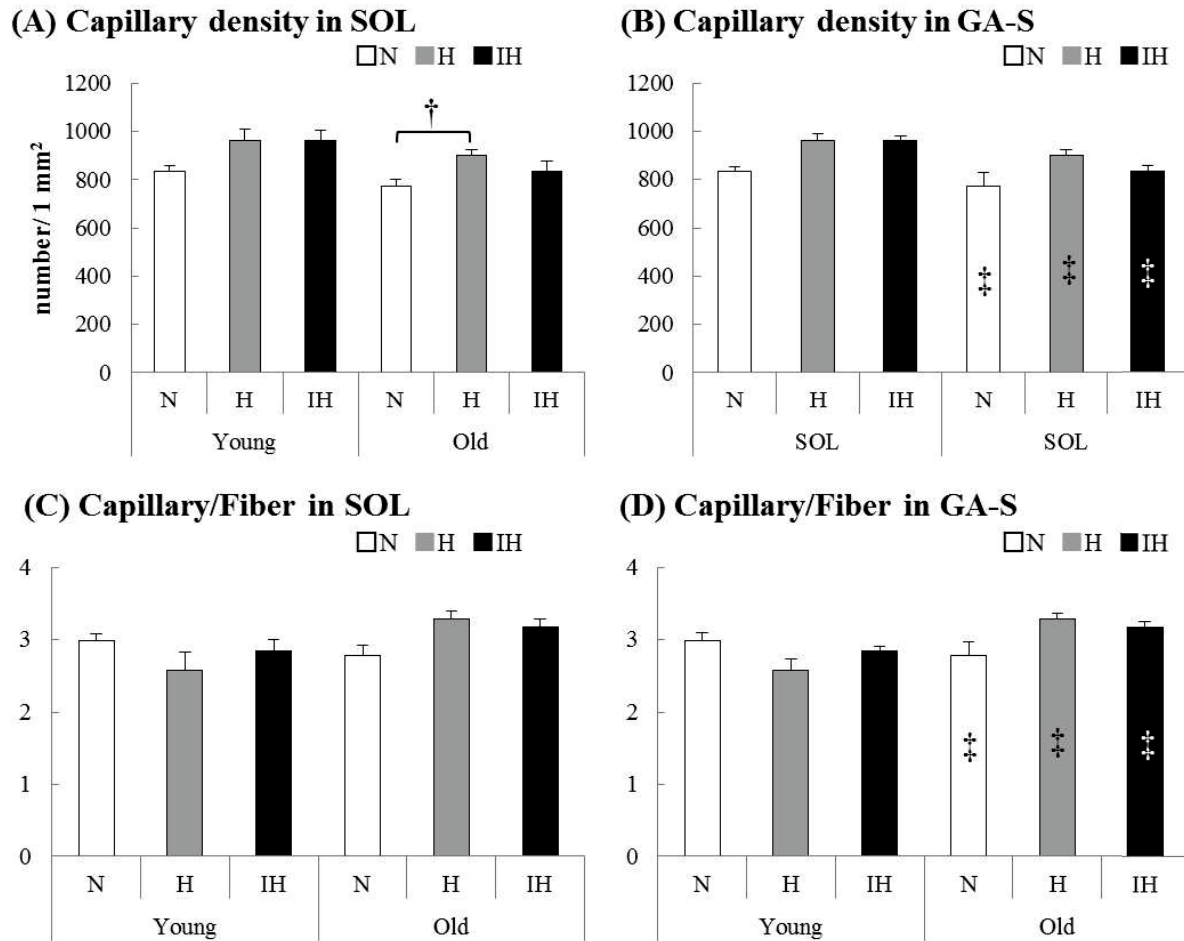
Pearson's correlation coefficients (R) between the ratio of the increase in nNOS, eNOS, and MyoD mRNA expression, and the ratio of the increase in MyoD, VEGF-A and FGF2 mRNA expression. Pearson's R was calculated based on total data for three experimental groups in each muscle from young and old mice. \*: Significant correlation between each factor (P < 0.05).



**Figure 1** Images for MHC-IIa (A), satellite cells (B), central myonucleus (B), and capillaries (C) in the gastrocnemius. (A): Stained fibers represent MHC-IIa, and the area surrounded by the dashed line is the superficial portion of the gastrocnemius. (B) Image representing the basal lamina (green), myonucleus (blue), and satellite cells (red). White arrows indicate satellite cells (SCs) or central myonucleus (CMN). (C) Image representing co-localization of capillaries detected by laminin (green) and CD31 (red).



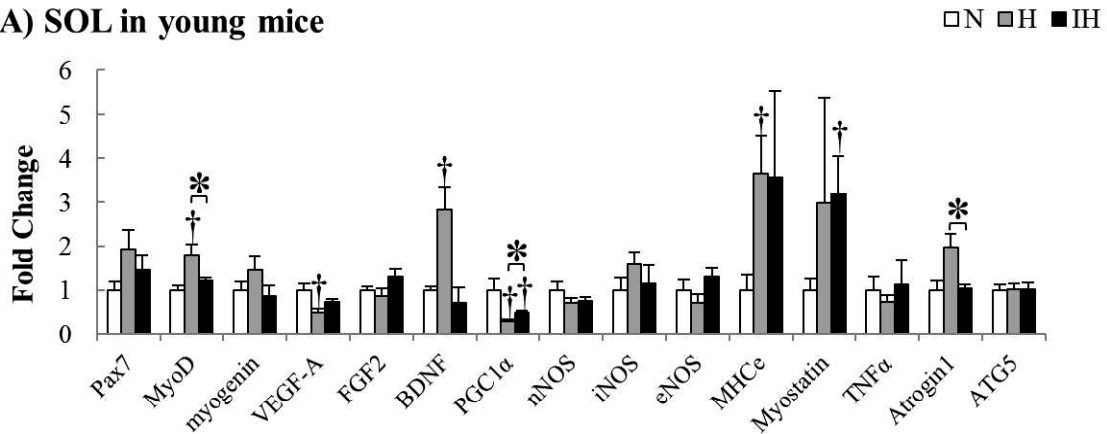
**Figure 2** Images of muscle fibers in the young soleus muscle stained by laminin (green) from the N group (A), H group (B), and IH group (C).



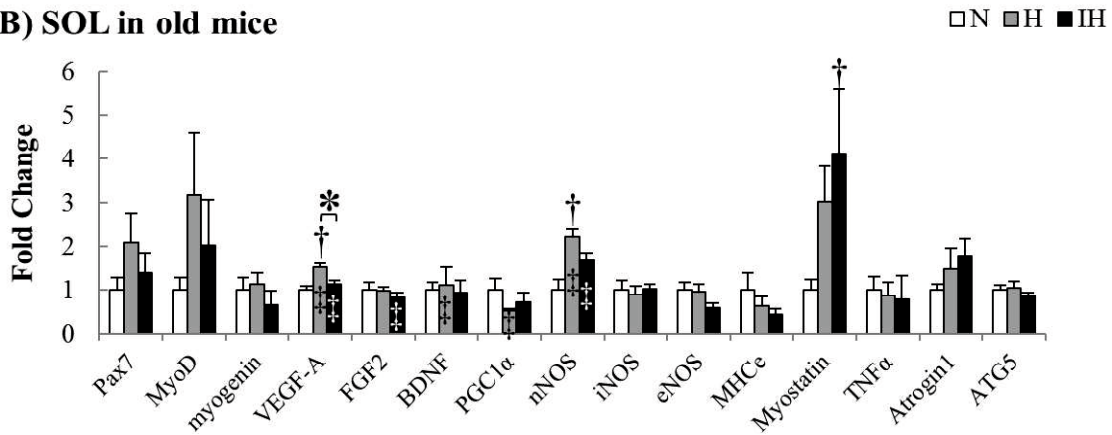
**Figure 3** The capillary density (number/ 1 mm<sup>2</sup>) and capillary-to-fiber ratio of the soleus (A, C) and superficial portion of the gastrocnemius (B, D) muscles in each experimental group of young and old mice (N: white bar, H: gray bar, IH: black bar).

Values are the mean  $\pm$  SE. †: Significant difference from each N group ( $P < 0.05$ ). ‡: Significant difference from young mice in each group ( $P < 0.05$ ). The capillary density (A) was higher in the old soleus muscle of H groups than of N groups ( $P=0.022$ ). In old gastrocnemius muscles, capillary densities (B) and capillary-to-fiber ratios (D) in all groups were lower than those in young mice [capillary densities: N ( $P=0.049$ ), H ( $P=0.001$ ), IH ( $P=0.001$ ), capillary-to-fiber ratios: N ( $P=0.001$ ), H ( $P=0.001$ ), IH ( $P=0.001$ )].

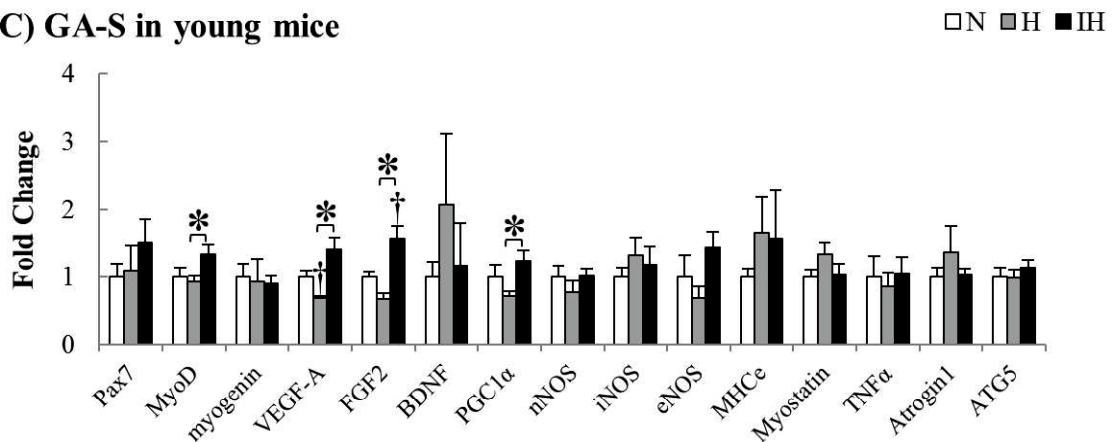
(A) SOL in young mice



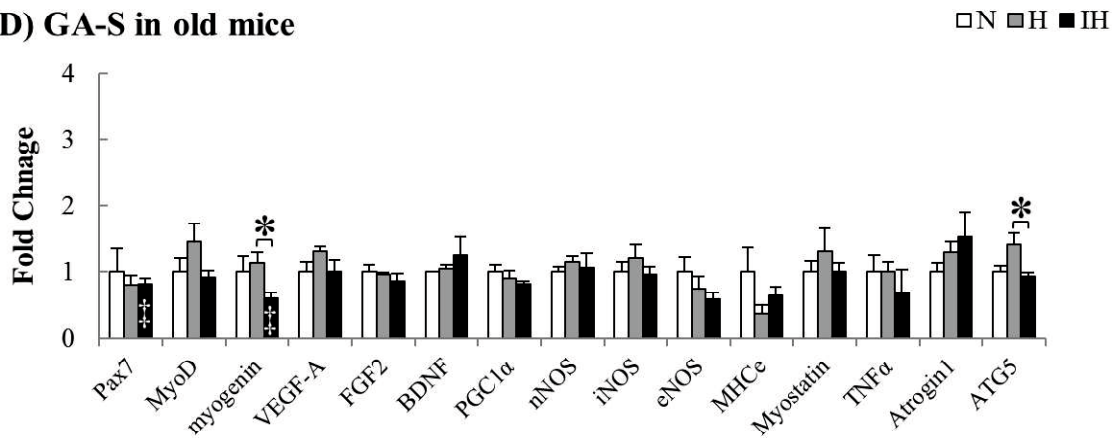
(B) SOL in old mice



(C) GA-S in young mice



(D) GA-S in old mice



**Figure 4** mRNA expression in both hypoxic groups compared with each N group in the soleus (A, B) and superficial portion of the gastrocnemius (C, D) muscles from young and old mice. Gray and black bars represent continuous hypoxia (H) and intermittent hypoxia (IH) groups, respectively. Values are the mean  $\pm$  SE. †: Significant difference from the N groups for each gene ( $P < 0.05$ ). \*: Significant difference between H and IH groups for each gene ( $P < 0.05$ ). ‡: Significant difference from young mice in each group ( $P < 0.05$ ).

(A) In the young soleus muscle, a significant increase was observed in the MyoD ( $P=0.013$  in H vs. N), BDNF ( $P=0.002$  in H vs. N), MHCe ( $P=0.035$  in H vs. N), Atrogin1 ( $P=0.011$  in H vs. IH), and myostatin ( $P=0.020$  in IH vs. N) mRNA expression. On the other hand, a significant decrease was observed in the VEGF-A ( $P=0.044$  in H vs. N) mRNA and PGC1 $\alpha$  ( $P=0.005$  in H vs. N,  $P=0.035$  in IH vs. N) mRNA expression. (B) In the old soleus muscle, VEGF-A ( $P=0.009$ ) and nNOS ( $P=0.035$ ) mRNA expression was significantly increased. In the IH groups, myostatin mRNA expression was significantly higher than that in the N groups ( $P=0.011$ ). The mRNA expression in old mice was higher in VEGF-A (H:  $P=0.001$ , IH:  $P=0.001$ ), nNOS (H:  $P=0.001$ , IH:  $P=0.001$ ) and PGC1 $\alpha$  (H:  $P=0.001$ ) than in the young mice, and was lower in BDNF (H:  $P=0.039$ ) and FGF2 (IH:  $P=0.031$ ) than in the young mice. (C) In the young gastrocnemius muscle, VEGF-A mRNA was significantly increased ( $P=0.016$  in H vs. N). FGF-2 mRNA expression was significantly higher than that in the N groups only in the gastrocnemius muscle of the IH groups ( $P=0.028$ ). In the IH groups, the expression of MyoD ( $P=0.049$ ), VEGF-A ( $P=0.001$ ), FGF-2 ( $P=0.005$ ), and PGC1 $\alpha$  ( $P=0.014$ ) mRNA was significantly higher than that in H groups. (D) The expression of myogenin ( $P=0.024$ ) and ATG5 ( $P=0.028$ ) mRNA was higher in the H groups than in the IH groups. The expression of pax7 ( $P=0.022$ ) and myogenin ( $P=0.048$ ) in the old IH groups was lower than that in the young IH groups.

## 第三章

### 低圧低酸素下での高強度トレーニングがサラブレッド骨格筋に与える影響

#### I 緒言

低酸素トレーニングはアスリートにおいて持久性能の向上を目的として広く用いられている (Vogt and Hoppeler, 2010; Wang et al. 2007; Stray-Gundersen et al.)。しかし、長期間 (4-8 週間) または重度の低酸素 (標高 4000-5000 m) は、骨格筋組織に対して悪影響や血行動態に障害をもたらす (Vogt and Hoppeler, 2010; Wang et al. 2007; de Theije et al.)。この負の効果を除いて低酸素トレーニングを利用する方法として「リビング-ロー、トレーニング-ハイ」理論が提案された (Vogt and Hoppeler, 2010)。このトレーニングは、運動と低酸素とを組み合わせた強い代謝ストレスを介して、相乗的なトレーニング効果を得ることを目的としている。この理論に基づいて先行研究は、最大酸素摂取量 ( $\dot{V}O_2 \max$ ) の向上と vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) の上方調節に関連する毛細血管密度の増加を証明している (Vogt and Hoppeler, 2010)。

細胞レベルにおいて多くの研究が、低酸素下で安定化して VEGF-A を介した血管新生を引き起こす hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) の調査を行っており、構造的・代謝的な低酸素適応におけるその重要な役割が証明されている (Favier et al. 2015; Semenza 2012)。サテライトセル (SCs) は基底膜下に局在する筋原性幹細胞であり、筋再生と血管新生に関与している (Christov et al. 2007; McClung et al. 2015; Rhoads et al. 2009)。SCs は毛細血管近傍に位置して、互いに血管新生因子と筋形成因子の分泌を行う (Christov et al. 2007)。SCs は通常休止状態で存在するが、内的・外的な刺激によって活性化して増殖を行う。低酸素環境において SCs の分化が阻害される一方で、活性化と増殖は促進されることが証明されている (Jash and Adhya, 2015; Li et al. 2007; Liu et al. 2012)。また、運動トレーニングは SCs 数を増加させ、SC 関連遺伝子の反応性を向上させる (Imaoka et al. 2014)。これらの研究結果に基づいて、骨格筋における血管新生が低酸素トレーニングによって誘導されることに、少なくとも部分的には SCs の活性化が関与していると考えられる。しかし、低酸素トレーニングにおける SCs と血管新生との関係性に関する情報はほとんど存在しない。

我々はヒトを含む哺乳類における低酸素トレーニングの効果を明らかにすることを最終目標としている。複数回のバイオプシーサンプルを用いた筋特性の解析のために、大きな筋量を持つ馬は優れたモデルである。現在まで、馬の筋に対する低酸素トレーニングの効果を示した研究はほとんど存在しない。本研究において、我々は馬の筋肉において長期的な低酸素下での運動が SCs の活性化や血管新生、ミトコンドリア生合成をもたらすか否かを調査している。

#### II 実験方法

##### 1 動物とトレーニングプロトコル

全ての手順は日本中央競馬会競走馬総合研究所の動物福祉倫理委員会に承認を受けており、アメリカ生理学会動物実験指針に従っている。

8 頭の訓練されたサラブレッド (去勢馬 5 頭、牝馬 3 頭、 $6.5 \pm 1.7$  歳、体重  $502 \pm 14$  kg) が本研究に用いられた。サラブレッドはオープンフローマスクを装着して (Pascoe et al. 1999) トレッドミル上で



走行訓練を受け (Sato I, Sato AB, Uppsala, Sweden)、少なくともトレッドミル上で実験が開始される 4 か月前から毎日約 6 時間は 2 ヘクタールの牧草地に置かれた。

トレーニングプロトコルは、16 週間の脱トレーニング期間を空けてランダム化されたクロスオーバー試験を採用している (Figure 1)。サラブレッドは、ランダムに常酸素トレーニング群 ( $n = 4$ ,  $FIO_2 = 0.21$ ) と低酸素トレーニング群 ( $n = 4$ ,  $FIO_2 = 0.15$ ) に分けられた。サラブレッドは 4 週間の間、6%の傾斜を付けたトレッドミル上でのトレーニングを週に 3 日間受け、残りの 4 日間は 2 ヘクタールの牧草地に 6 時間放牧された。トレーニングセッションは、ウォームアップ (1.7 m/s for 1 min and 4m/s for 2 min)、キャンタリング (7 m/s for 1min)、常酸素下で計測された 100%  $VO_2max$  ( $11.7 \pm 0.2$  m/s、約 2 分)、クールダウン (1.7m/s for 3 min) で構成され、両群で共通である。

## 2 漸増負荷試験

トレーニング期間の前後において、全ての馬は常酸素下での漸増負荷試験を受けた。一度目の漸増負荷試験 (pretest) をコントロール (normoxic training group pretest: Nor Con; hypoxic training group pretest: Hypo Con) として用い、2 回目の漸増負荷試験 (posttest) はトレーニング期間の終了後に行った (normoxic training group posttest: Nor Tr; hypoxic training group posttest: Hypo Tr)。

サラブレッドは疲労困憊に至る速度を計測するために 6%傾斜のトレッドミル上を走行した。サラブレッドが疲労困憊に至ったことを評価するために、トレッドミルでの運動の間、ホーストレーナーによって心拍数 (S810, Polar, Kempele, Finland) と走行姿勢の観察が行われた。1.7m/s の歩行と 3.5m/s の速歩でウォームアップを行った後、サラブレッドは 2 分間の 6m/s で走行を開始した。その後、2 分毎に 2m/s ずつ速度を増加させ、速度の増加はサラブレッドが人道的な激励の下でトレッドミル前方の位置を維持できなくなる疲労困憊状態に至るまで継続された。速度毎に  $O_2$  の伝達システムを定常状態にする目的でサラブレッドはトレッドミル上を 90 秒間走行し、各速度の最後の 30 秒間において  $\dot{V}O_2$  が計算された。我々は、漸増負荷試験中の走行距離と  $\dot{V}O_2$  の測定を行った。

## 3 筋サンプリングと免疫組織化学的な解析

各漸増負荷試験において、筋サンプル (湿重量 ~ 50 mg) は局所麻酔下 (lidocaine, Fujisawa Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) で中殿筋の筋腹の同箇所 (最初のサンプリングから同心円上に 2 cm 以内) かつ同程度の深さ (皮下 5cm) から漸増負荷試験の前 (pre)、直後 (post)、4 時間後 (4h)、24 時間後 (24h)、3 日後 (3d)、7 日後 (7d) の時点のニードルバイオプシーによって得られた (Lindholm and Piehl, 1974)。全ての筋サンプルは液体窒素によって凍結され、解析されるまで  $-80^\circ\text{C}$  で保存された。

線維タイプ割合は、先行研究と同様の方法で測定された (Kawai et al. 2013)。筋の連続横断切片 (7  $\mu\text{m}$ ) は  $-20^\circ\text{C}$  のクリオスタット (CM510, Leica, Nussloch, Germany) を用いて作成された。切片は室温に戻され、0.1M phosphate buffered saline (PBS, pH7.6) に 1%の正常ヤギ血清 (Millipore-Chemicon, Billerica, MA, USA) を加えた溶液内に 10 分間置かれた。次に以下の一次抗体が適応された: (1) Myosin heavy chain-IIa (MHC-IIa) and MHC-IIx に特異的に反応する fast myosin (Sigma, St. Louis, USA; 1 : 4,000)、(2) MHC-IIa に特異的に反応する SC-71 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa, USA; 1 : 1,000)。切片はこれら一次抗体の中に一晩置かれた後に、horseradish peroxidase (HRP, Bio-Rad, Hercules, CA, USA; 1:1,000) が結合した 2 次抗体の中に室温で 3 時間置かれた。Diaminobenzidine

tetrahydrochloride (Bio-Rad)は、HRP の局在を示す色素として用いた。染色された筋線維画像は、顕微鏡(E600, Nikon, Tokyo, Japan) と image-processing system (DS-U1, Nikon)を用いて撮影された。筋線維は、それらの免疫組織化学的染色特性に従って Type I、IIa、IIx 線維に分類され、その割合と筋線維横断面積は少なくとも 300 本の筋線維を基にして算出された。

#### 4 サテライトセルと毛細血管の同定

サテライトセル数と毛細血管密度は以前先行研究で説明された方法に従って同定された (Okabe et al. 2017)。筋サンプルから別の  $7\mu\text{m}$  横断切片と  $50\mu\text{m}$  の横断切片が、 $-20^{\circ}\text{C}$  のクリオスタット上で作成された。 $7\mu\text{m}$  の切片は  $0.1\text{M}$  PBS に 4% のパラホルムアルデヒドを溶かした溶液内で 10 分間置かれ固定された。これらの切片は次に室温下で 10% の正常ヤギ血清を含む  $0.1\text{M}$  PBS と 2% bovine serum albumin の混合溶液内で 30 分間放置された。更に切片は 2% bovine serum albumin/PBS で溶かされた一次抗体 (mouse anti-paired box protein-7 : Pax7, Developmental StudiesHybridoma Bank; 1 : 1,000、rabbit anti-laminin, Sigma, 1 : 1,000)内に室温で 1 時間置かれた。その後、切片は以下の二次抗体内でインキュベートされた : Pax7 抗体のための Cy3-conjugated AffiniPure goat antimouse IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; 1 : 1,000) とラミニン抗体のための Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Breda, Netherlands; 1 : 1,000)。切片は最後に PBS で希釈された 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液内に室温で 5 分間置かれて染色された。anti-Pax7、anti-laminin、DAPI の染色画像は、image-processing software (Adobe Photoshop Elements 12, Adobe, San Jose, CA, USA) によって統合され、SCs の評価のために用いられた (Figure 2(a))。SCs は基底膜下かつ各線維の外縁に位置する DAPI と Pax7 の両方が陽性の細胞とした。SCs/fibers は、3 つの線維タイプそれぞれで計測された。

$50\mu\text{m}$  の切片は、上述の手法によって一次抗体(anti-laminin)と 2 次抗体 (Alexa Fluor 488 goat antirabbit IgG)を用いた染色を受けた。laser-scanning confocal system (C1, Nikon) を用いて少なくとも切片上の 4 ヲ所が撮影された。少なくとも 15 枚の光学的断面 ( $2\mu\text{m}$  毎) が一カ所から得られ、2 次元スタック画像が再構築された (Figure 2(b))。明確に基底膜に覆われている毛細血管が計測され、毛細血管密度として示された (the number of capillaries per  $1\text{mm}^2$ )。

#### 5 RNA の単離とリアルタイム RT-PCR

Total RNA は各筋サンプルから TRIzol (Molecular Probes, Breda, Netherlands) を用いて抽出された。RNA の純度と量は  $260\text{nm} / 280\text{nm}$  の吸光度を計測することによって決定された。Total RNA は次に、サンプルの DNA を取り除くために  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間 TURBO DNase (Ambion, Austin, USA)処理を受けた。DNase 処理を受けた RNA ( $0.5\mu\text{g}$ ) は、Exscript™ RT reagent kit (Takara, Tokyo, Japan) によって 1 本鎖 cDNA を合成するために用いられた。得られた cDNA は SYBR Green PCR Master Mix protocol in StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan)を用いたリアルタイム RT-PCR によって解析された。

増幅プログラムは最初の 10 分間の  $95^{\circ}\text{C}$  の変性段階と 40 サイクルの変性 (30 秒)、アニーリングと伸長 (1 分間) で構成される。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の量は内部標準として用いられた。各標的遺伝子の mRNA の cycle threshold (Ct)は GAPDH の Ct の値を減算

されることによって標準化された[ $\Delta\text{Ct}$  (target)]。標的遺伝子の相対的な発現量は、Pre の値と比較することによって算出された。解離曲線解析において非特異的に増幅された cDNA サンプルは見られなかった。

本研究で用いた特異的プライマーは Table 1 に示されている。各 PCR プライマーは Primer Express software (Applied Biosystems Japan) で設計され、そのオリゴヌクレオチドは FASMAC (FASMAC, Kanagawa, Japan) から購入された。

## 6 統計

全てのデータは、mean  $\pm$  SEM で表記されている。一標本 t-test は、全てのデータのコントロールとトレーニング間の違いを比較するために用いられており、更に mRNA 発現の常酸素と低酸素の違いを比較するためにも用いられた。どちらの場合においても、統計的有意性は  $p < 0.05$  に設定した。

## III 結果

### 1 体重と運動能力

体重は両群でトレーニング後有意に低下した (Nor: from  $498 \pm 6$  to  $489 \pm 8$  kg;  $p = 0.034$ ; Hypo: from  $499 \pm 6$  to  $483 \pm 7$  kg;  $p = 0.006$ )。Figure 3(a)に示されているように、漸増負荷試験における走行距離は両群でトレーニング後に有意に増加したが、より大きな増加 (40.1%) は常酸素群 (14.0%、(from  $4317 \pm 217$  to  $4921 \pm 232$  m;  $p = 0.0006$ ) ではなく低酸素群で見られた (from  $4036 \pm 225$  to  $5653 \pm 266$  m;  $p = 0.0001$ )。Figure 3 (b)に示されているように  $\dot{V}O_2\text{max}$  は両群でトレーニング後に増加したが、有意な増加は常酸素群 (from  $162.5 \pm 5.3$  to  $166.2 \pm 4.6$  mL/min/kg) ではなく低酸素群 (from  $159.5 \pm 4.9$  to  $177.7 \pm 2.8$  mL/min/kg;  $p = 0.011$ ) でのみ見られた。

### 2 筋線維特性

酸素濃度やトレーニングに関わらず、線維タイプ組成は Pre の値から変化しなかった (Figure 4(a)、type I: 11.0–13.1%; type IIa: 57.0–63.8%; type IIx: 24.7–31.4%)。同様に、筋線維横断面積もまた全ての実験条件で有意な差異は見られなかった (Figure 4(b)、type I:  $3145\text{--}3621 \mu\text{m}^2$ ; type IIa:  $3956\text{--}4072 \mu\text{m}^2$ ; type IIx:  $4967\text{--}5176 \mu\text{m}^2$ )。毛細血管密度は両群で増加が見られたが、有意な増加は低酸素群においてのみ見られた (Figure 4(c)、Nor: from  $286 \pm 11$  to  $304 \pm 6/\text{mm}^2$ ; Hypo: from  $287 \pm 11$  to  $329 \pm 18/\text{mm}^2$ ;  $p = 0.045$ )。Figure 4(d)で示される SC number/fiber は、トレーニング後に両群でわずかに増加した (Nor Tr, type I: from  $0.26 \pm 0.04$  to  $0.28 \pm 0.03$ ; type IIa: from  $0.28 \pm 0.03$  to  $0.30 \pm 0.04$ ; type IIx: from  $0.18 \pm 0.02$  to  $0.24 \pm 0.02$ 、Hypo Tr, type I: from  $0.24 \pm 0.06$  to  $0.26 \pm 0.03/\text{fiber}$ ; type IIa: from  $0.25 \pm 0.03$  to  $0.30 \pm 0.03/\text{fiber}$ ; type IIx: from  $0.17 \pm 0.02$  to  $0.2 \pm 0.01/\text{fiber}$ )。

### 3 mRNA 発現

Pre からの変化を示した相対的 mRNA 発現の変化は、Figure 5 において示されている。Pax7 mRNA 発現は Pre の時点で全ての条件で類似しており、7d までの間に段階的に増加した。各条件間の有意差は見られなかったが、MyoD mRNA 発現は Hypo Tr において Pre の時点で 2.3 倍増加した。MyoD mRNA の経時的変化は、全ての実験群で 4h において低下して 24h から 7d の間に増加する傾向が見られた。Nor

Tr と比較して、myogenin mRNA 発現は Hypo Tr で Pre ( $p = 0.023$ ) と Post ( $p = 0.002$ ) の時点において有意に増加した。myogenin mRNA 発現の経時的変化は、Pax7 や MyoD mRNA と類似の傾向を示して、24h から 7d の間で増加した。VEGF-A mRNA 発現は、Hypo Tr において Hypo Con と比較して Pre ( $p = 0.029$ ) と Post ( $p = 0.020$ ) の時点で有意に増加した。全ての実験条件において VEGF-A mRNA 発現は 4h の時点で増加する傾向を示し、トレーニング後には 24h と 7d で増加傾向を示した。コントロールと比較して、VEGF receptor-2 (KDR) mRNA 発現は Hypo Tr において 4h ( $p = 0.031$ ) の時点で、Nor Tr において 7d ( $p = 0.016$ ) の時点で有意に増加した。Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) mRNA 発現は、全ての実験条件において VEGF-A 同様に 4h の時点で増加し、24h~3d の間低下傾向を示した。Angiopoietin-1 (ANGPT1) mRNA 発現は各条件間で有意な変化を示さなかったが、Hypo Tr において Pre と Post の時点で増加する傾向を示した。Hypo Tr において HIF-1 $\alpha$  mRNA 発現は Pre の時点で Hypo Con ( $p = 0.042$ ) や Nor Tr ( $p = 0.041$ ) と比較して有意に増加し、Hypo Con と比較して 3d で有意に低下した ( $p = 0.007$ )。また、HIF-1 $\alpha$  mRNA 発現は Nor Tr において、Nor Con と比較して 7d の時点で有意に増加した ( $p = 0.040$ )。全ての酸素条件において、HIF-1 $\alpha$  mRNA 発現の経時的変化はトレーニング後に増加する傾向が見られた (24h~7d)。

Hepatocyte growth factor (HGF) mRNA と HIF-1 $\alpha$  mRNA 発現の経時的変化は類似していた。コントロールと比較して HGF mRNA 発現は Pre の時点で Hypo Tr ( $p = 0.037$ ) において、7d の時点で Nor Tr ( $p = 0.023$ ) において有意に増加した。更に、HGF mRNA は MyoD mRNA 発現と同様に 4h の時点で低下する傾向を示した。Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA の発現は、HGF や HIF-1 $\alpha$  の発現に類似していた。Hypo Tr において FGF-2 mRNA 発現は、3d の時点でコントロールよりも有意に低下した ( $p = 0.013$ )。更に、Nor Tr の FGF-2 mRNA 発現は、コントロールと比較して Pre の時点で有意に低下し ( $p = 0.007$ )、7d の時点で有意に増加した ( $p = 0.033$ )。IGF-1 mRNA 発現の有意な低下は、Hypo Tr において 3d の時点で ( $p = 0.026$ )、Nor Tr において Pre の時点で見られた ( $p = 0.010$ )。SC の活性化に関与する因子 (HGF, FGF-2, IGF-1, HIF-1 $\alpha$ ) は、トレーニング後に 3d の時点でコントロールよりも低下する傾向が見られた。全ての条件で IL-6 の mRNA 発現は 4h で増加したが、Hypo Tr においては 4h ( $p = 0.006$ ) と 3d ( $p = 0.040$ ) の時点でそれぞれコントロールまたは Nor Tr と比較して有意な低下が見られた。

## IV 考察

### 1 低酸素トレーニングによる持久性能力の向上

本研究では低酸素トレーニングによって常酸素トレーニングを超える、漸増負荷試験における走行距離と最大酸素摂取量の有意な増加と毛細血管密度の有意な増加が見られた。血管新生因子 (VEGF-A や ANGPT-1 等) の上方調節は、毛細血管密度の増加の要因と成り得る。本研究の低酸素トレーニング後に VEGF-A mRNA の増加が見られた。先行研究 (Lloyd et al. 2003) は大腿動脈の結紮を施したラットにおいて、capillary contacts がトレーニング 12 日後に増加した一方で、VEGF-A mRNA の増加はトレーニングの 8 日後まで見られてその後に基底レベルに戻ることを示した。加えて、ヒトの筋において血流制限トレーニングの 5 週間後には mRNA の上方調節を伴わずに VEGF-A タンパク質の増加が見られた (Gustafsson et al. 2007)。これらの結果は、トレーニング直後の VEGF-A mRNA の転写的な上方調節が、血管新生のために必要な VEGF-A タンパク質を増加させることを示している。更に、我々は先行研

究において急性の低酸素トレーニングが、VEGF-Aの経時的な変化とPGC-1 $\alpha$ の発現が関係していることを報告した (Okabe et al. 2017)。この結果に一致して、本研究においてもVEGF-AとPGC-1 $\alpha$ のmRNAの経時的変化は類似している。しかし、Hypo TrにおいてPGC-1 $\alpha$  mRNA発現は4hで増加したけれども、VEGF-A mRNAの更なる増加は見られなかった。このことは、トレーニング後の急性運動におけるVEGF-A mRNA及びタンパク質の発現が、弱められることを示した先行研究の結果に一致している (Malek et al. 2010)。そのため、運動誘導性のVEGF-A上方調節の抑制はトレーニング適応の結果である可能性がある。

低酸素トレーニングは、nitrite/nitrateで計測されるNO (nitric oxide)の産生とNO合成酵素 (NOS)の発現を増加させる (Ren et al. 2010; Wang et al. 2014)。我々はNOに関連する因子を計測していないが、NOは抗炎症作用を持ち、IL-6 mRNAの発現を低下させることが報告されている (Liu et al. 2015)。薬理的に損傷させた筋に対するNOSの阻害剤の投与は、損傷4日後と7日後のIL-6 mRNA発現を増加させた (Liu et al. 2015)。我々の研究において、IL-6 mRNA発現は4hと3dの時点で低酸素トレーニング後に抑制されており、低酸素トレーニングが常酸素トレーニングよりもNOの産生を増加させた間接的な証拠となる可能性がある。

HIF-1はVEGF-Aの上方調節を行う。常酸素下においてHIF-1 $\alpha$ はprolyl hydroxylase (PHD)によって酸素を基質としたヒドロキシル化を受け、次いでプロテアソーム系による分解を受ける (Semenza, 2012; Balligand et al. 2009)。NOはPHDに作用することによって常酸素下でHIF-1 $\alpha$ タンパク質を安定化する (Balligand et al. 2009)。このNOを介したHIF-1 $\alpha$ の安定化は低酸素下では見られず、NOはミトコンドリア複合体IVによる酸素の消費を阻害することでPHDに酸素を供給する (Balligand et al. 2009)。従ってHIF-1 $\alpha$ タンパク質は酸素濃度またはNOによって制御されている。本研究においてHIF-1 $\alpha$ とHGF、IGF-1、FGF-2 mRNAの発現の経時的変化は類似していた。HGFはHIF-1 $\alpha$  mRNAの上方調節に関与しており (Rhoads et al. 2009)、IGFs (Flann et al. 2014)とFGF-2 (Conte et al. 2008)はHIF-1 $\alpha$ の制御に関連している。タンパク質レベルでの制御に起因して、本研究のHIF-1 $\alpha$  mRNAの経時的変化とVEGF-A mRNAの経時的変化は類似しなかったと考えられる。しかし、VEGF-AのレセプターであるKDRとHIF-1 $\alpha$ は類似の経時的変化を示している。

## 2 低酸素トレーニングによるサテライトセルの活性化

SCsは毛細血管近傍に位置して、内皮細胞由来のSC増殖促進因子 (HGF, VEGF, IGF-1, FGF-2)を受けて活性化される (Christov et al. 2007)。休止状態から活性化、分化状態へと変化して行くに従って、SCsは内皮細胞に対してVEGF、ANGPT1、FGF-2、HGF等の血管新生促進因子を分泌する (Christov et al. 2007; McClung et al. 2015; Rhoads et al. 2009)。この内皮細胞に対する作用はmyogeninを発現している分化状態のSCが最も強く、VEGFやANGPTといった因子の産生が増加する (Christov et al. 2007; McClung et al. 2015)。加えて、先行研究はSCsが筋誘導性の血管新生の制御を行う担体として機能し、SCの活性化が筋の再生と血管新生のために必要であるという仮説を立てている (Rhoads et al. 2009)。低酸素下においてSCはHIF-1によって活性化されるが、同時に分化が阻害される (Jash and Adhya, 2015; Li et al. 2007; Liu et al. 2012)。先行研究においてin vivoで損傷筋の一時的な低酸素によってHIF-1の安定化に起因するSCsの活性化が生じ、その後の段階的に酸素が増加することによってSCsの分解を阻害するHIF-1の分解が促進され、持続的な低酸素状態または常酸素状態の継続と比較し

てより早い筋の修復をもたらされた (Jash and Adhya, 2015)。上述したように、NO は HIF-1 $\alpha$  の安定化と分解を制御する。更に NO は SCs の活性化し、HIF-1 $\alpha$  mRNA の上方調節に関わる (Flann et al. 2014) HGF の放出を制御している (Rhoads et al. 2009)。NOS や血漿中の nitrite/nitrate レベルが低酸素トレーニングによって増加するならば、常酸素下での posttest 後において Hypo Tr ではより大きな SC の活性化が見られると推測される。本研究では SC number/fiber の増加傾向と毛細血管密度の有意な増加が低酸素トレーニング後に見られた。

損傷筋においてマクロファージは壊死組織を貪食し、FGF や IGF、HGF、IL-6 を含む成長因子を放出する (Filippin et al. 2009)。特に IL-6 はタンパク質の分解と変性、サテライトセルの増殖に関与している (Liu et al. 2015)。本研究において IL-6 mRNA 発現は、トレーニングによって 4h と 3d の時点でコントロールと比較して抑制され、HIF-1 $\alpha$  や HGF、FGF-2、IGF-1、KDR といった因子において 3d ではコントロールで高値を示した。ラットを用いた先行研究 (Yamaguchi et al. 2004) では、代償性過活動を施した足底筋において HGF と FGF-2 mRNA の増加が見られた。このことは、両因子が SC の活性化による筋肥大のために重要な役割を持つ可能性を示している。ヒト外側広筋を用いた先行研究では、IGF-1 mRNA の増加が収縮性の筋損傷の 3 日後に見られ、SC の増殖と IGF-1 タンパク質の発現が同時に見られた (McKay et al. 2008)。従って、IGF-1 mRNA の上方制御は SCs 活性化において重要であることが考えられる。骨格筋は損傷と炎症に曝されると、誘導型 NOS による NO の産生を局所的に促進する (Filippin et al. 2009)。Pax7 や HGF、HIF-1 $\alpha$  が上方調節されたことを考慮すると、コントロールにおける 3d での多くの因子の増加は、NO の産生を含む損傷や炎症の結果であるかもしれない。3d の時点で IGF-1 や FGF-2、IL-6 の mRNA 発現は低酸素トレーニング後に有意に低下した。これらの発現低下は、より損傷や炎症が生じなかったことを反映していると考えられる。この作用に、低酸素トレーニング後に増加した可能性がある NO 産生が関与しているかもしれない。

低酸素条件は SCs の活性化に寄与するが、続く増殖のためには成長因子の存在が必要である (Jash and Adhya, 2015)。そのため、posttest 後の応答に関して成長因子の増加と SCs の活性化・増殖は、低酸素トレーニングによって増加した NO に起因して抑制され得る。一方で、myogenin mRNA 発現は Pre の時点で有意に増加しており、低酸素トレーニング後に常酸素トレーニングよりも長期間 SCs の活性化が生じていることを示している。ラットを用いた先行研究において、myogenin mRNA 発現は筋損傷後 7 日まで増加しており、mRNA の増加に一致して損傷後 3-7 日後において myogenin 陽性の核数の増加が見られている (Srikuea et al. 2010)。SCs の活性化の強さと期間のどちらが血管新生に有用であるのかは明らかにされていない。しかし、虚血筋の再生過程に対する VEGF と IGF-1 の効果を見た先行研究は、一度の大量投与よりも持続的な投与が筋再生や血管新生に有効であったことを報告している (Borselli et al. 2010)。常酸素と比較した時、より長期的な低酸素トレーニングによる SCs の活性化は、より強い血管新生の促進をもたらす可能性がある。この低酸素トレーニングの効果は、NO や HIF-1 に関係していると考えられる。SCs が最も血管新生促進作用を持つ段階にあることを示す myogenin mRNA 発現の Pre の時点での増加に一致して、SCs が血管新生を促進するために産生することが報告されている VEGF-A、ANGPT1、FGF-2、HGF の発現増加が見られた。

## 5 結論

サラブレッドに対する低酸素トレーニングは、常酸素下で行われた漸増負荷試験において有意な走行

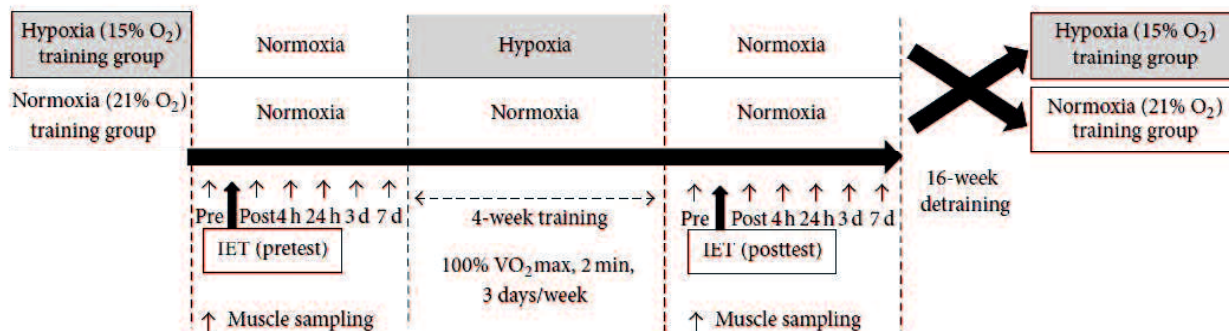
距離と最大酸素摂取量の増加をもたらした。同時に低酸素トレーニング後には毛細血管密度や myogenin、VEGF-A、HGF の増加が見られた。低酸素トレーニングによってもたらされたこれらの変化は、NO 産生や HIF-1 $\alpha$  によって引き起こされた可能性がある。我々は、低酸素トレーニングの利点の一つは、血管新生に寄与する可能性のある SC のより長期的な活性化であると結論付けた。

**Table 1** Real-time reverse transcriptional-PCR (RT-PCR) primer sequences.

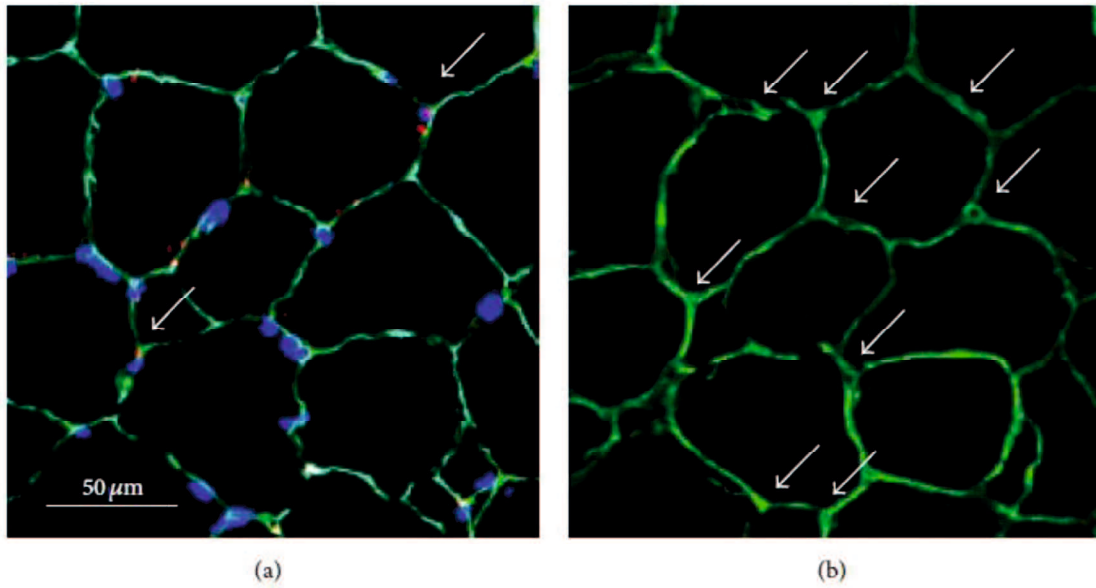
	Forward sequence	Reverse sequence
GAPDH	CAAGGCTGTGGCAAGGT	GGAAGGCCATGCCAGTGA
Pax7	CATCGGCGGCAGCAA	TCCTCGATCTTTTCTCCACATC
MyoD	ACGGCTCTCTGCAACTTTG	GAGTCGAAACACGGGTCATCA
Myogenin	TCACGGCTGACCCTACAGATG	GGTGATGCTGTCCACAATGG
HIF-1 $\alpha$	AAGTGGCAGCACGATTACAGTAT	GACGGTAGGAAGAGCAGGTTCTT
VEGF-A	CCCACTGCGGAGTTCAACAT	TTGGCTTTGGTGAGGTTTGAT
KDR	TTTTGGCATCACGGAAGTGTAT	TTCTCCGACAAGAGGATATTTG
PGC-1 $\alpha$	TCCGTGTCACCACCCAAAT	TGAACGAGAGCGCATCCTT
ANGPT1	GCAAATGTGCCCTCATGCT	CAGATTGGATGGCCACAAG
HGF	GGTACGCTACGAAGTCTGTGACA	CCCATTGCAGGTCATGCAT
FGF-2	TGCGAACCGTTATCTTGCTATG	CACTCGTCCGTAACACATTTAGAAG
IGF-1	TGTCCTCCTCACATCTCTTACCT	CGTGGCAGAGCTGGTGAA
IL-6	AACAACCTCACCTCATCCTTCGAA	CGAACAGCTCTCAGGCTGAAC

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Pax7: paired box transcription factor-7; MyoD: myogenic determination factor; HIF-1 $\alpha$ : hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; VEGF-A: vascular endothelial growth factor-A; KDR: vascular endothelial growth factor receptor-2; PGC-1 $\alpha$ : peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ; ANGPT1: angiopoietin-1; HGF: hepatocyte growth factor; FGF-2: fibroblast growth factor-2; IGF-1: insulin-like growth factor-1; IL-6: interleukin-6.

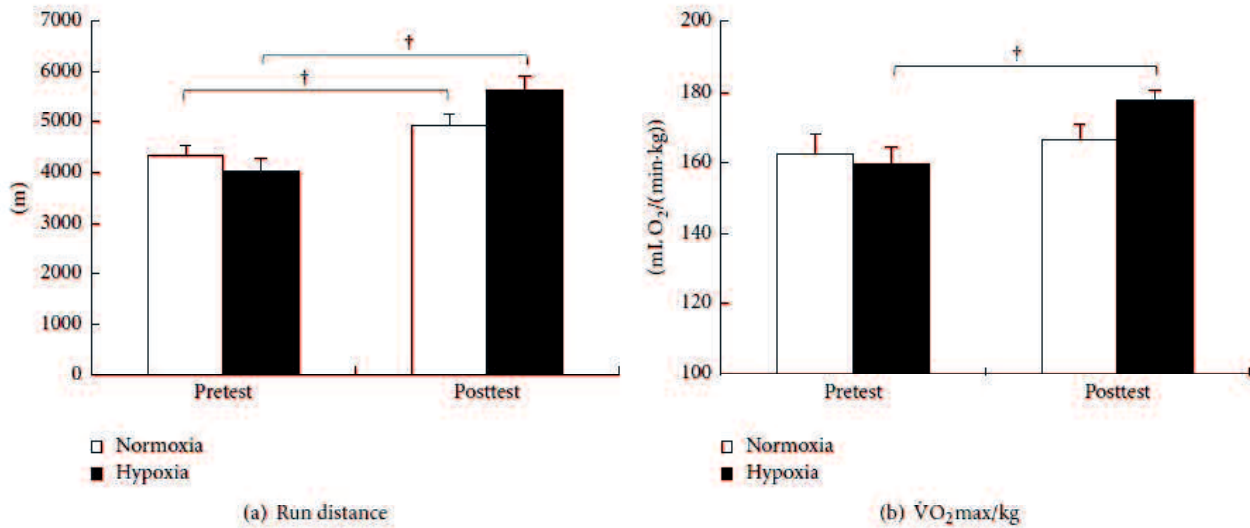




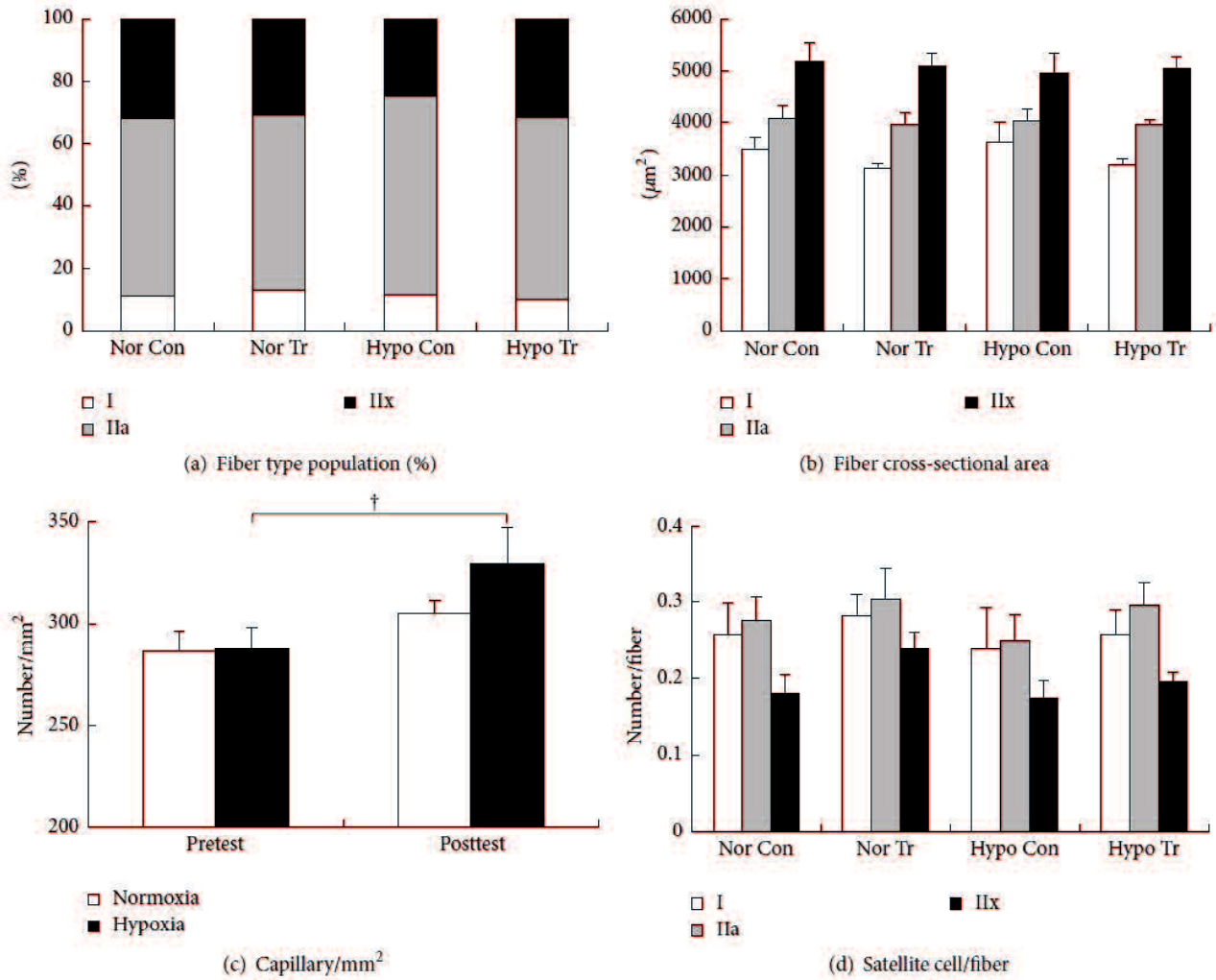
**Figure 1** Schematic figure of the experimental schedule. The training protocol adopted a randomized crossover design, which was separated by a 16-week detraining period. Eight horses were assigned randomly into normoxic training ( $n = 4$ ,  $FIO_2 = 21\%$ ) and hypoxic training ( $n = 4$ ,  $FIO_2 = 15\% O_2$ ) groups. Incremental exercise tests (IET) were carried out before (pretest) and after (posttest) training. In each IET, horses were subjected to biopsy sampling of the gluteus medius six times, indicated by “↑” (before (pre) and immediately (post) and 4 hours (4 h), 24 hours (24 h), 3 days (3 d), and 7 days (7 d) after IET).



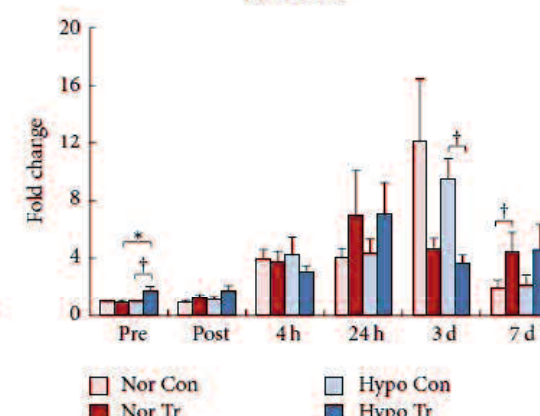
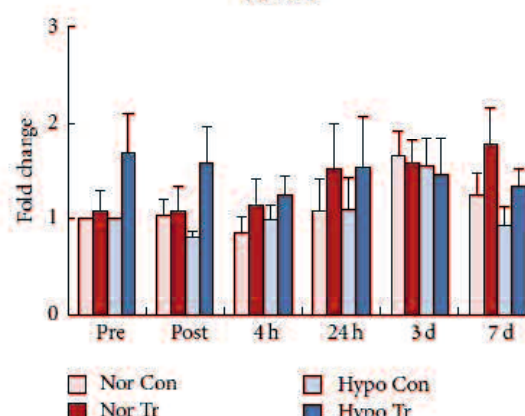
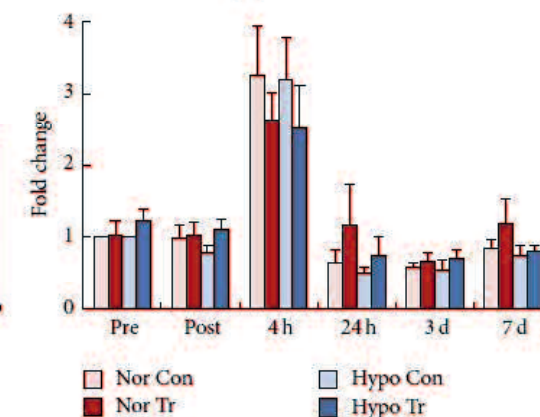
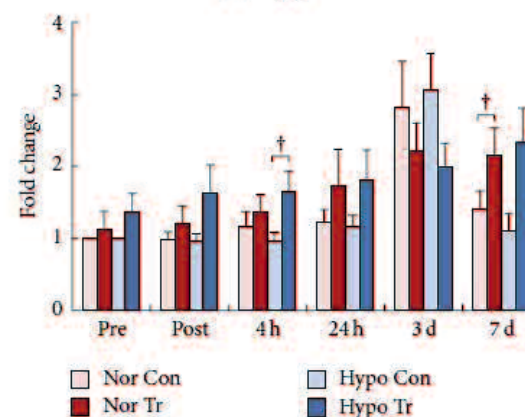
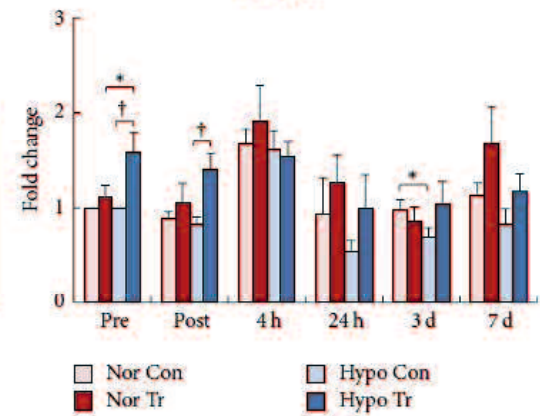
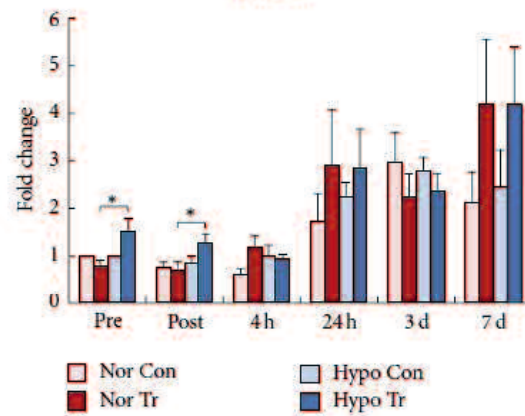
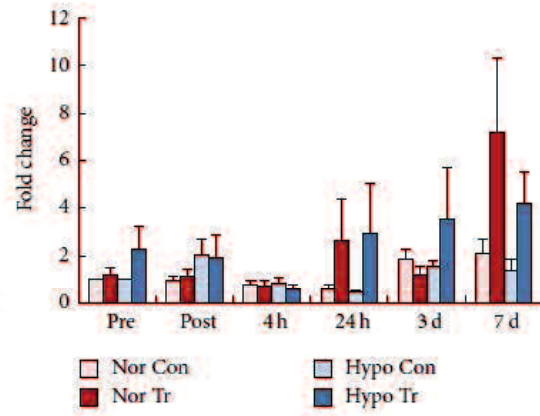
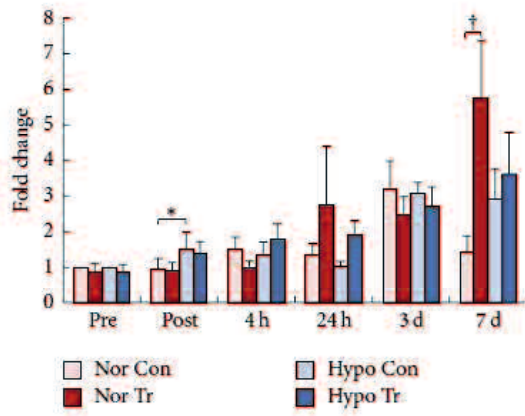
**Figure 2** Typical photomicrographs of serial transverse sections of the gluteus medius muscle. Thicknesses of sections are 7 and 50  $\mu\text{m}$  in panels (a) and (b), respectively. (a) Triple-immunofluorescent stained for laminin (green), Pax7 (red), and nuclei (blue). The white arrow in (a) indicates a satellite cell (Pax7+ nuclei). (b) Single-immunofluorescent stained for laminin. White arrows in (b) indicate capillaries.

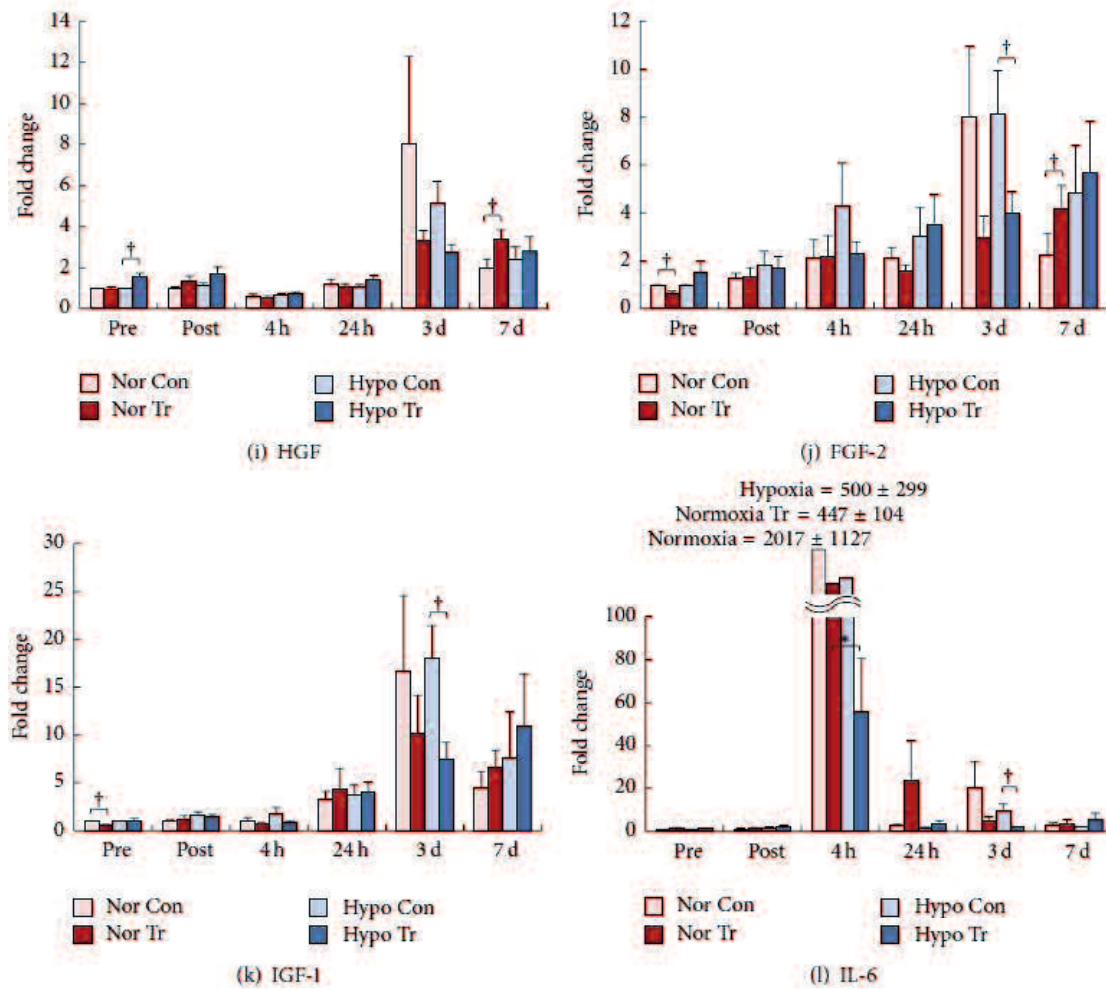


**Figure 3** Changes in run distance (a) and maximal oxygen consumption ( $\dot{V}O_2$ max) (b) in the incremental exercise test under normoxia for the normoxic training group (white bar) and the hypoxic training group (black bar). † Significant difference versus pretest ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SEM.



**Figure 4** Changes in fiber type population (a), fiber cross-sectional area (b), capillary density (c), and number of satellite cells (d) in pretest of control (Nor Con: normoxic control; Hypo Con: hypoxic control) and posttest (Nor Tr: normoxic training; Hypo Tr: hypoxic training) in normoxic or hypoxic training group. Measurements were performed on muscle samples obtained before the incremental exercise test (pre). White, grey, and black bars in (a), (b), and (d) represent fiber types I, IIa, and IIx, respectively. White and black bars in (c) represent normoxia and hypoxia, respectively. †Significant difference versus pretest ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SEM.





**Figure 5** (a–f) Time-course changes in mRNA expression of Pax7 (a), MyoD (b), myogenin (c), VEGF-A (d), KDR (e), and PGC-1 $\alpha$  (f) in pretest of control (Nor Con: normoxic control, light red; Hypo Con: hypoxic control, light blue) and posttest (Nor Tr: normoxic training, red; Hypo Tr: hypoxic training, blue) after normoxic or hypoxic training. Measurements were performed before (pre) and immediately (post) and 4 hours (4 h), 24 hours (24 h), 3 days (3 d), and 7 days (7 d) after the incremental exercise test. Values of mRNA expression were calculated as x-fold change from pretest of each control. †Significant difference versus pretest ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference versus normoxia training group ( $p < 0.05$ ). (g–l) Time-course changes in mRNA expression of ANGPT1 (g), HIF-1 $\alpha$  (h), HGF (i), FGF-2 (j), IGF-1 (k), and IL-6 (l) in pretest of control (Nor Con: normoxic control, light red; Hypo Con: hypoxic control, light blue) and posttest (Nor Tr: normoxic training, red; Hypo Tr: hypoxic training, blue) after normoxic or hypoxic training. Measurements were performed before (pre) and immediately (post) and 4 hours (4 h), 24 hours (24 h), 3 days (3 d), and 7 days (7 d) after the incremental exercise test. Values of mRNA expression were calculated as x-fold change from pretest of each control. †Significant difference versus pretest ( $p < 0.05$ ). Values are mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference versus normoxic training group ( $p < 0.05$ ).

## 第 四 章

# プレコンディショニング収縮は損傷性エキセントリック収縮後の

## 筋痛マーカーを抑制する

### I 緒言

エキセントリック収縮(ECC)を含む不慣れで激しい運動は、筋損傷、浮腫、張力の低下、可動域の制限、筋痛等を引き起こす。運動の数日後に生じる筋痛 (delayed onset muscle soreness : DOMS) は、その後数日で鎮静する (Nelson, 2013; Chen et al. 2012; Hyldahl and Hubal, 2014)。また ECC は、コンセントリック及びアイソメトリック収縮よりも効果的に筋の成長を促す (Roig et al. 2009; Hedayatpour and Falla, 2015)。そのため、筋機能の改善を目的としたリハビリテーションおよびトレーニングの場面において、ECCは効率的な運動であると考えられる。ECCによるDOMS等の症状は一過性ではあるが、日常生活やリハビリテーション、アスリートの毎日のトレーニング等の意欲に影響すると考えられる。しかし、トレーニングの数日前に同様の運動を行うと、DOMSが軽減され、低下した張力の回復が早くなることが知られている (Chen et al. 2012; Lavender and Nosaka, 2008; Maeo et al. 2017)。この事前運動の効果は Repeated-bout effect と呼ばれており、2日から1週間程度で生じ (Lavender and Nosaka, 2008; Maeo et al. 2017; Urai et al. 2013)、6か月持続することが報告されている (Nosaka et al. 2013)。しかし、筋痛と筋生成に与える事前運動の作用に関わる生理学的な機構は不明なままである。

腓腹筋へのホルマリン注射による炎症時の筋痛が発生している状態において、筋痛を含む様々な生理活性を有する Bradykinin (BK) の、 $B_2$  receptor mRNA の発現が増大する (Meotti et al. 2012)。この筋痛は、 $BKB_2$  receptor アンタゴニストの投与により抑制されるので、 $BKB_2$  receptor は筋痛に関与すると考えられている (Urai et al. 2013; Meotti et al. 2012)。痛みに関わる他の分子として、Prostaglandin (PG)  $E_2$  がある。 $PGE_2$  合成に関わる酵素の Cyclooxygenase (COX) -2 のタンパク質および mRNA 発現レベルは、エキセントリック収縮後に発現が増大する (Murase et al. 2013)。エキセントリック収縮後及びCarrageenan誘発炎症時の筋痛はCOX-2インヒビターの投与によって低下し、その後にCOX-2の最終産物である  $PGE_2$  濃度が低下する (Murase et al. 2013; Zhang et al. 1997)。更に、 $PGE_2$  合成経路の最終酵素である PGE 合成酵素にはいくつかのアイソザイムがあり、特にミクロゾーム PGE 合成酵素-1 (mPGES-1) は COX-2 と関連が深いことが示されている (Samuelsson et al. 2007)。従って、 $PGE_2$  合成経路にある酵素である COX-2 および mPGES-1 の発現は、 $PGE_2$  産生を介して筋痛に関与することが考えられる。

$BKB_2$  receptor あるいは COX-2 や mPGES-1 等の  $PGE_2$  合成経路にある酵素は、筋痛に関連することが推察される。しかし、事前運動によるこれらの筋痛関連分子の発現への影響は明らかではない。そこで本研究では、事前の非損傷性 ECC (Preconditioning; Precon) が、その後の損傷性 ECC による筋損傷、筋再生、炎症及び筋痛関連分子に及ぼす影響について、mRNA 発現レベルで検討を行った。

### II 実験方法

#### 1 実験動物及びプロトコル

ラットを用いた全ての実験は、山口大学及び札幌医科大学で実施され、山口大学 (No. 290) 及び札幌医科大学 (No. 16-077) の動物実験委員会の承認された手法に従って行われた。動物のケアは、施設のガイドラインに従った。

雄性 Wistar ラット(9 週齢、n=36)は Sankyo Labo Service (Sapporo, Japan) から提供された。ラットは食事と水が自由に与えられ、12 時間明暗サイクルの環境制御室(24±2°C)で飼育された。ラットは損傷性 ECC のみを施す Non-Precon 群と、損傷性 ECC の 2 日前に非損傷性 ECC を負荷する Precon 群に分けられた。全ての群において ECC は左肢で実施され、反対側の右肢をコントロール (CTL) とした。Precon 群は、100 回反復の損傷性 ECC の 2 日前に Precon (10 回の反復 ECC) を左肢に受けた。先行研究において、ECC の数が増えるに従って筋肉の損傷が段階的に増加することが示されている

(Hesselink et al. 1996; Willems and Stauber.)。我々は、Precon によって足底屈筋の最大アイソメトリック収縮力が低下しないことを確認している(データは示していない)。損傷性 ECC 終了の直後(0 日)、2 日および 4 日後に足底屈筋を各動物から摘出した。その後の実験には、腓腹筋内側頭を用いた。

## 2 エキセントリック収縮

イソフルラン麻酔下において、ラットは仰臥位でプラットフォームに置かれ、左肢を 0°の背屈位の角度(すなわち脛骨に対して 90°)でトルクセンサー(S-14154, Takei Scientific Instruments, Tokyo, Japan)に接続されたフットプレートに固定された。ECC として神経筋電気刺激(ES)と合わせた 150°/秒の 0°から 40°の強制背屈が行われた。足底屈筋は、4 秒ごとに 1 対の表面電極を介して過最大(45 V)に刺激を受けた。刺激のパラメーターは以下のように設定した: 1 ms の单相矩形パルス, 50 Hz の刺激周波数。

## 3 組織化学的解析

クリオスタット切片(10µm)はヘマトキシリン及びエオジン(H&E)によって染色された。Evans blue dye (EBD) 染色された切片を得るために、ラットは筋サンプルの摘出の 24 時間前に 1% (wt/vol) EBD solution (1 mg/10 g body wt) の腹腔内投与を受けた。H&E と EBD 染色画像は、蛍光顕微鏡 BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて撮影された。

## 4 リアルタイム RT-PCR

先行研究において説明されている手法に従って、リアルタイム RT-PCR 分析を行った(Nagahisa et al. 2016)。Total RNA を TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) により抽出した。Total RNA の純度と収率は 260 nm および 280 nm の波長の吸光度を測定することで決定した。そして、Total RNA を TURBO DNase (Ambion-Life Technologies, Austin, TX) で 37 °C 30 分間処理し、サンプルからゲノム DNA を除去した。DNase-treated RNA (0.5 µg) から、Exscript RT reagent kit (TaKaRa Bio, Otsu, Japan) を用いて一本鎖 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 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 分間の初期変性段階および 40 サイクル(95 °C; 30 秒間の変性 + 58 °C; 1 分間のアニーリング/伸長)で構成されている。Glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 量を内在性コントロールに設定した。各遺伝子の mRNA (Table 1) は、遺伝子タ



ターゲットの cycle threshold (Ct) の値から GAPDH の Ct を差し引くことで標準化した ( $\Delta Ct(\text{target})$ )。ターゲット遺伝子の相対発現量を CTL の値に対する相対量として算出した。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。

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。

## 5 統計解析

全ての結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差 (SE) で示されている。各 mRNA 発現レベルは、One way-ANOVA および Bonferroni adjust t-test を用いて比較されている。炎症性サイトカインと筋痛関連分子との相関関係は、Pearson の相関係数によって分析された。統計学的優位性は  $P < 0.05$  とした。

## III 結果

### 1 損傷性 ECC 後の骨格筋の組織化学的特性

0 day (ECC 直後) の時点では、non-Precon 及び Precon 群の H&E 染色切片の間に明らかな組織化学的異常は見られなかった (Figures 1(a) and 1(b))。損傷性 ECC2 日後と 4 日後の H&E 染色切片においては、non-Precon 群では膨潤して丸く膨れた筋線維やそれらを取り囲むように多数の炎症性細胞が見られた (Figures 1(c) and 1(e)) 一方で、Precon 群ではこれらの好ましくない変化は劇的に抑制された (Figures 1(d) and 1(f))。

H&E の結果に一致して、筋細胞膜が損傷していることを示す EBD 陽性細胞は 0 day の時点において見られず、non-Precon 群の損傷性 ECC2 日後と 4 日後の時点で増加し (Figures 1(i) and 1(k))、このような増加は Precon 群においてはほとんど見られなかった (Figures 1(j) and 1(l))。

### 2 筋損傷および筋再生に関わる因子の mRNA 発現

相対的な発現量は各群の 0d の時点での CTL を 1 として表記されている。MHC-embryonic および MHC-neonatal は、筋損傷後の再生過程で発現する。MHC-embryonic mRNA 発現量は、損傷性 ECC2 日後の Precon 群で CTL 群よりも有意に高い値を示した (Figure 2(a))。損傷性 ECC4 日後では、両群とも CTL より高い値を示したが、Non-Precon 群が Precon 群と比較して有意に高い値を示した。

MHC-neonatal mRNA 発現量は損傷性 ECC 直後、2 日後、4 日後において、Non-Precon と Precon 群で CTL と比較して高値を示した (Figure 2(b))。Non-Precon 群と Precon 群との間に有意な差異は認められなかった。

サテライトセル活性化因子である HGF の mRNA 発現レベルは、損傷性 ECC2 日後と 4 日後の時点で Precon 群において有意に増加した (Figure 3(a))。損傷性 ECC2 日後と 4 日後の HGF mRNA 発現の増加は、non-Precon 群においても見られ、その増加は CTL だけでなく Precon 群と比較しても有意に高値を示した。

筋サテライトセルが活性化/増殖状態にある時に発現する Pax7 mRNA 発現は、損傷性 ECC2 日および 4 日後で Non-Precon 群のみが CTL よりも高値を示し、損傷性 ECC4 日後において Precon 群は Non-Precon 群よりも有意に低い値だった (Figure 3(b))。

サテライトセルの増殖と分化を調節する MyoD mRNA 発現量は、損傷性 ECC 4 日後で Precon 群が

Non-Precon 群よりも低い値を示し、損傷性 ECC2 日後において Non-Precon 群のみが CTL よりも高値を示した (Figure 3(c))。

分化状態のサテライトセルで発現される Myogenin mRNA 発現量は、損傷直後及び 2 日後で Precon 群において CTL よりも高値を示し、損傷 2 日後及び 4 日後に Non-Precon 群は CTL よりも高い値を示した (Figure 3(b))。加えて、損傷性 ECC2 日及び 4 日後において、Precon 群の Myogenin mRNA 発現量は Non-Precon 群と比較して有意に低い値を示した。

### 3 筋痛関連分子 mRNA 発現

Precon 群の BKB<sub>2</sub> receptor mRNA 発現量は損傷性 ECC 直後、2 日後、4 日後において CTL よりも有意に高い値だった (Figure 4(a))。Non-Precon 群の BKB<sub>2</sub> receptor mRNA 発現量は、損傷性 ECC2 日後、4 日後において CTL と比較して有意に高値を示した。しかし、損傷性 ECC2 日および 4 日後では、Precon 群は Non-Precon 群よりも有意に低い値を示した。

COX-2 mRNA 発現量は、Precon 群及び Non-Precon 群の両群が損傷性 ECC 2 日後で CTL よりも有意に高い値を示した (Figure 4(b))。しかし、損傷性 4 日後においては Non-Precon 群のみが CTL よりも有意に高い値を示し、Precon 群は Non-Precon 群よりも有意に低い値だった。

mPGES-1 mRNA 発現量は、Non-Precon 群のみが損傷性 ECC2 日後、4 日後で CTL と比べて有意に高い値を示した (Figure 4(c))。更に Precon 群の mPGES-1 mRNA 発現量は、損傷性 ECC4 日後の時点で Non-Precon 群よりも有意に低い値を示した。

## IV 考察

我々は事前の低負荷非損傷性 ECC が、後の損傷性 ECC に起因する筋損傷、筋痛、筋再生関連分子に及ぼす影響について検討した。実際に、Precon は我々の先行研究の結果に一致して損傷性 ECC によって誘導される組織化学的な変化を抑制した (Yamada et al. 2018)。また、Precon は MHC-embryonic 及び MHC-neonatal mRNA 発現の増大を抑制し、このことから筋損傷の程度が小さくなったことが示唆される。同様に、Pax7、MyoD および Myogenin mRNA 発現の増大が Precon により抑制されたことから、Precon により筋損傷の程度が小さくなり、筋再生の必要性がほとんどなかったことが推察される。筋痛関連分子 mRNA の発現増加もまた抑制された。従って、本研究は事前の低負荷非損傷性 ECC が、その後の損傷性 ECC による筋損傷および炎症を低下させて筋痛の回復を早める可能性を、mRNA レベルで実証した。

本研究において我々は Precon それ自体が mRNA に与える影響を検証していない。しかし、non-Precon 群における筋痛関連分子を含むほとんどの因子は、0 day の時点で CTL や Precon 群 (2 days after Precon) と比較して増加していない。Precon それ自体 (10 回の反復 ECC) が non-Precon (100 回の反復 ECC) よりも影響が少ないことを考慮すると、Precon 自体の mRNA 発現に与える効果は少なくとも Precon の直後と 2 日後においてはほとんどないものと推察される。

### 1 エキセントリック収縮による筋損傷、筋再生

骨格筋は筋損傷後の回復過程において、MHC I、IIa、IIx 及び IIb の成熟型 MHC の他に、MHC-embryonic や neonatal 等の発達型 MHC を発現し、これらの発達型 MHC は筋損傷後の回復に伴

い成熟型MHCへと置き換わる(Schiaffino et al. 2015; Ciciliot and Schiaffino, 2010)。本研究において、MHC-embryonic 及び noenatal mRNA 発現は損傷性 ECC 後に増大した。しかし、損傷性 ECC4 日後において、MHC-embryonic の増大の程度は Precon により軽減された。筋損傷後の筋再生において、筋サテライトセルは重要な役割を果たす。サテライトセルは基底膜と形質膜の間に局在するが、通常休止状態にあり、Pax7 を発現する (Dumont et al. 2015)。サテライトセルは筋損傷により刺激されると、活性化して増殖し最終的に分化することで新しい筋線維や筋核を供給し、活性化サテライトセルの一部は休止状態に戻る (Dumont et al. 2015)。多くの研究が HGF のような成長因子が筋芽細胞の活性化と増殖に関係することを証明している (Yamada et al. 2010)。更に、MyoD や myogenin は活性化されたサテライトセルで発現され、それぞれ増殖と分化に関与する (Dumont et al. 2015)。本研究では損傷性 ECC のみを負荷したラットにおいて、Pax7、MyoD 及び Myogenin mRNA 発現が損傷性 ECC 後に増大したことから、筋再生機構が機能していたことが推察される。しかし、これらの増加は Precon をおこなったグループではほとんど観察されなかったことから、事前に Precon を行うことによって筋損傷の程度が軽減され、筋再生をする必要があまりなかったことが示唆される。激しい ECC により損傷が生じることは、間接的な分析 (血清クレアチンキナーゼ等、Nelson et al, 2013; Chen et al. 2012) や組織学的な分析によって示されている (Kano et al. 2008; Sudo and Kano, 2009; Hyldahl et al. 2014)。本研究の結果は、損傷性 ECC のみを行ったグループで筋損傷が生じ、Precon によって mRNA レベルで損傷の程度が軽減されたことを示している。

## 2 伸張性収縮による筋痛について

PGE<sub>2</sub> は、静的な運動ではなく動的な運動時に骨格筋で増大する (Karamouzis et al. 2005)。PGE<sub>2</sub> 合成経路の酵素である COX-2 は、筋痛に深く関与すること知られている。COX-2 インヒビターは、Lengthening 収縮の前に投与されることで筋痛を低下させる (Murase et al. 2013; Zhang et al. 1997)。加えて、PGE<sub>2</sub> 合成の最終酵素である mPGES-1 も、COX-2 由来の代謝産物から PGE<sub>2</sub> を産生し

(Samuelsson et al. 2007)、PGE<sub>2</sub> による疼痛や炎症に関与することが示されている (Dallaporta et al. 2010)。従って、COX-2 および mPGES-1 は PGE<sub>2</sub> 産生を介して筋痛を発生させると考えられる。炎症時、COX-2 は好中球、マクロファージ、内皮細胞、及び筋核/筋サテライトセルにおいて発現される

(Murase et al. 2013; Bachawaty et al. 2010; Novak et al. 2009)。mPGES-1 は、炎症時にマクロファージや線維芽細胞に局在することが報告されている (Korotkova et al. 2008; Korotkova and Jakobsson, 2008)。本研究の結果は、Precon による COX-2 および mPGES-1 mRNA 発現の低下を示し、PGE<sub>2</sub> 産生の減少を示唆している。従って、Precon をしていない群に比べて、Precon を行った群では、PGE<sub>2</sub> による筋痛が低下していたことが推察される。

エキセントリック収縮により血中 BK 濃度 (Blais Jr et al. 1999) ならびに骨格筋及び腱組織における間質の BK 濃度 (Langberg et al. 2002) は上昇する。BK の受容体には BKB<sub>1</sub> receptor と BKB<sub>2</sub> receptor が存在し、BKB<sub>1</sub> receptor は組織損傷時に発現して慢性的な炎症に寄与する一方、BKB<sub>2</sub> receptor は恒常的に発現して急性的な炎症に関与すると考えられている (Hamza et al. 2010; Su, 2014; Couture et al. 2001)。本研究において BKB<sub>2</sub> receptor mRNA 発現は、損傷性 ECC の 2 日後及び 4 日後で Precon により低下した。先行研究において、筋痛はエキセントリック収縮の 1 日後から 4 日後まで生じたが、エキセントリック収縮の前に BKB<sub>2</sub> receptor のアンタゴニストを投与することでその後の筋痛が抑制された

が、BKB<sub>1</sub> receptor アンタゴニストでは筋痛抑制効果がみられなかったことが報告されている (Murase et al. 2010)。また、Formalin 筋注による炎症モデルにおいては、BKB<sub>1</sub> および B<sub>2</sub> receptor アンタゴニストの両方による筋痛抑制効果が Formalin 注射直後から 7 時間まで観察されているが、B<sub>2</sub> receptor アンタゴニストのみが IL-6 の mRNA 発現を減少させた (Meotti et al. 2012)。IL-6 は炎症のマーカーとして知られ、筋痛に寄与することが示唆されている (Dina et al. 2008; Manjavachi et al. 2010)。そのため、BKB<sub>2</sub> receptor は B<sub>1</sub> receptor よりも炎症時の筋痛に関与すると考えられる。加えて、伸張性収縮の 30 分後の BKB<sub>2</sub> receptor アンタゴニスト投与は筋痛を抑制しなかったことから、BKB<sub>2</sub> receptor は筋痛の維持よりも筋痛の発生に寄与することが示唆されている (Murase et al. 2010)。本研究において、BKB<sub>2</sub> receptor mRNA 発現は Precon 群の 0 day (損傷性 ECC 直後) において有意に増加した。しかし、non-Precon 群の BKB<sub>2</sub> receptor mRNA 発現が段階的に増加したのに対して、Precon 群は段階的な低下を示した。このことは、筋痛マーカーのピークが早まったことを示唆している。我々は BKB<sub>2</sub> receptor mRNA 発現のピークの左方移動が直接筋痛に関係していることを証明できないが、Precon 群における BKB<sub>2</sub> receptor mRNA 発現の抑制は、他の筋痛関連分子の発現や組織化学的な損傷の結果に一致している。

まとめると、我々は筋痛において重要な BKB<sub>2</sub> receptor mRNA 発現がエキセントリック収縮後に有意に増加し、Precon によってその mRNA 発現が抑制されることを明らかにした。

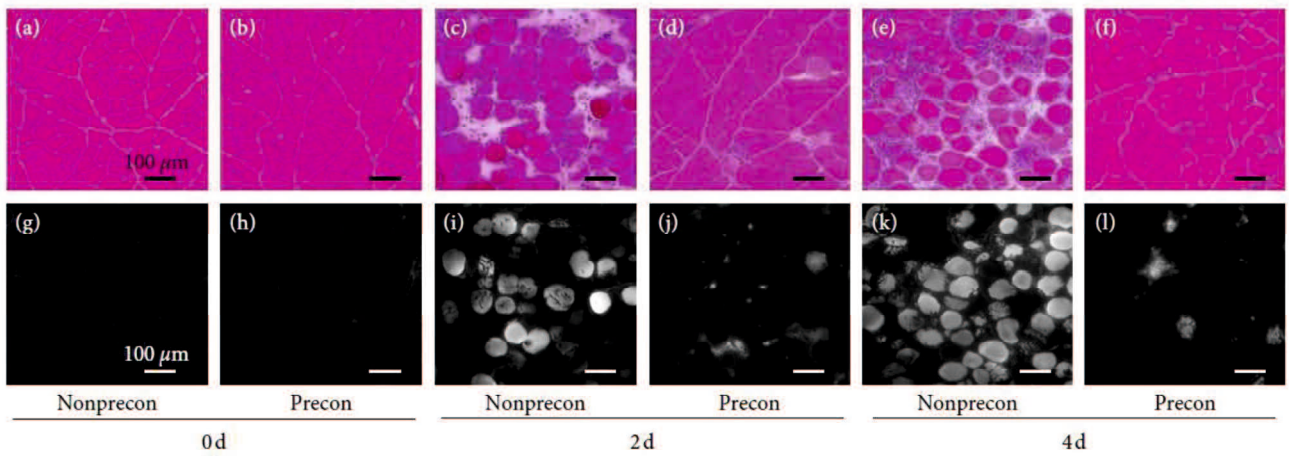
### 3 プレコンディショニングがトレーニング効果に与える影響

ここまで、ECC と Precon が筋損傷、筋再生、筋痛に与える影響についてを検討してきた。本研究の結果は、事前の低負荷 ECC がその後の損傷性 ECC による筋損傷とそれに伴う筋再生を減少させ、mRNA 発現レベルで筋痛が抑制されることを示している。これらの結果から、運動による筋痛を軽減が目的であるならば、事前に軽い運動を行っておくことが好ましいと考えられる。しかし、筋機能の改善を目的とした時、事前の軽い運動はトレーニング効果を弱める可能性がある。本研究において、筋肥大において重要な役割を果たす筋サテライトセルのマーカーである Pax7、サテライトセルの増殖・分化に関与する MyoD および Myogenin の mRNA 発現が Precon により抑制されたからである (Dumont et al. 2015)。また、COX-2 は筋肥大のために重要であることが、COX-2 インヒビターを用いた代償性筋肥大モデルの実験において報告されている (Novak et al. 2009)。従って、COX-2 の発現及び活性を抑制することは筋痛を抑える良い手法であると考えられるが、一方で筋肥大を目的とするならば COX-2 の発現及び活性が必要であるかもしれない。より長期的な影響について、更なる研究が必要とされる。

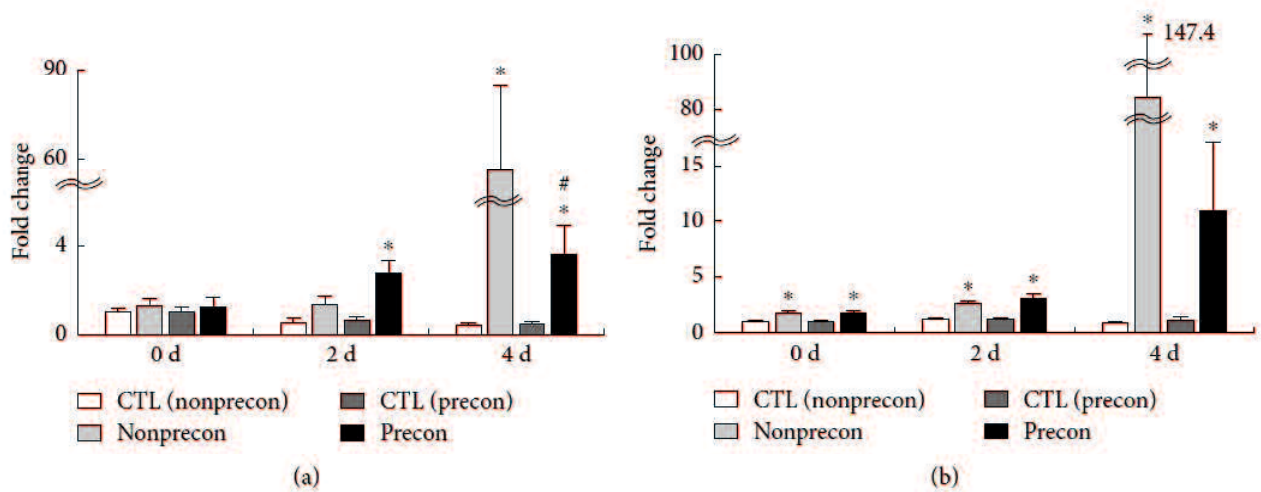
**Table 1** Real-time RT PCR primer sequences.

Gene	Accession number		Sequence	Primer position
GAPDH	NM_017008.4	Forward	GCTCTGTGCTCCTCCCTGTTT	4-24
		Reverse	GAGGCTGGCACTGCACAA	44-61
MHC-embryonic	NM_012604.1	Forward	CTTCAAACTGAAAAACGCCTATGA	4536-4559
		Reverse	GTTCTAAGTTCTTATTCTCTCGCTCACA	4584-4612
MHC-neonatal	NM_001100485.1	Forward	ATCAGTGCCAATCCCTTGCT	742-761
		Reverse	CCAAAGCGAGGAGTTGTCA	795-815
HGF	NM_017017.2	Forward	AAAACACATGGGCAACTTATCCAA	1335-1359
		Reverse	ATGACGGTGTAATCCTCCATATTC	1396-1420
Pax7	NM_001191984.1	Forward	AAAAGATTGAGGAGTATAAGAGGGAGAA	347-374
		Reverse	GCCGGTCCCGATTTC	394-409
MyoD	NM_176079.1	Forward	GACGGCTCTCTGTCTCCTTT	259-279
		Reverse	AGTCGAAACACGGATCATCATAGA	296-319
Myogenin	M24393.1	Forward	GACCCTACAGGTGCCACAA	604-623
		Reverse	CCGTGATGCTGTCCACGAT	643-661
BKB <sub>2</sub> receptor	M59967.2	Forward	GAGCTTGAAGCATCCTAGGGAAT	1543-1565
		Reverse	CGTTATGCCGTGAGACAAGA	1583-1603
COX-2	U03389.1	Forward	GGCAAAGCCTCCATTGAC	1423-1441
		Reverse	GCGTTTGCGGTACTCATTGA	1470-1489
mPGES-1	NM_021583.3	Forward	TGCTCCCGCCTTTCTG	78-94
		Reverse	CCACCGGTACATCTTGATG	115-134

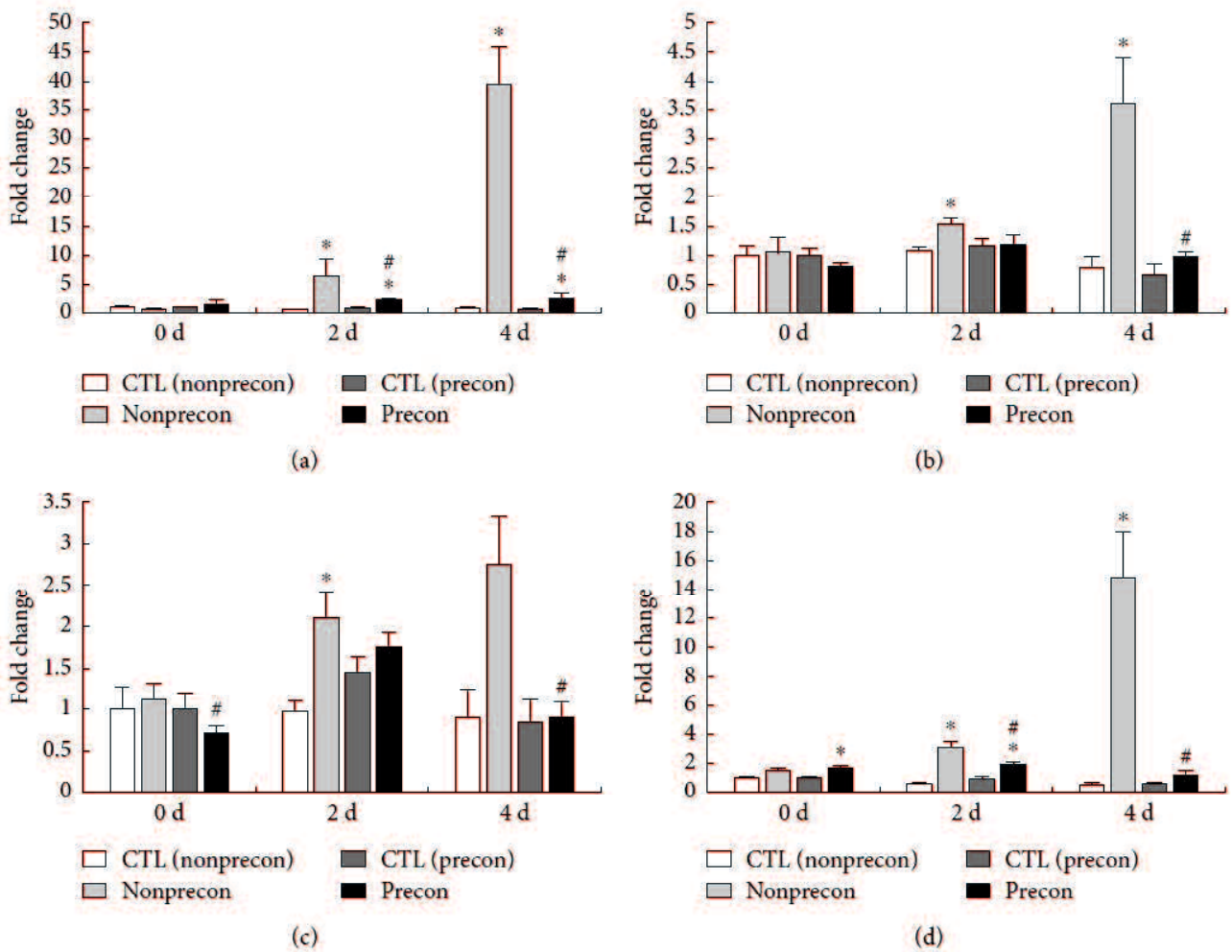
GAPDH, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase; MHC, myosin heavy chain; HGF, hepatocyte growth factor; Pax7, paired box transcription factor-7; MyoD, myogenic determination factor; BKB<sub>2</sub>, bradykinin B2 receptor; COX-2, cyclooxygenase 2; mPGES-1, microsomal prostaglandin E synthase-1.



**Figure 1** Photomicrograph of hematoxylin and eosin (a–f) and Evans blue dye (g–l) staining on sections of the left medial gastrocnemius muscles after damaging eccentric contractions.



**Figure 2** Time course changes in relative expression of MHC-embryonic (a) and MHC-neonatal (b) mRNA. These mRNA expression of each time point was calculated as x-fold change from each CTL value at 0 d. CTL indicates intact right muscle of each experimental group. Values are means  $\pm$  SE. \*significant differences ( $P < 0.05$ ) as compared with each CTL value. # significant differences ( $P < 0.05$ ) as compared with each Nonprecon value.



**Figure 3** Time course changes in relative expression of HGF (a), Pax7 (b), MyoD (c), and myogenin (d) mRNA. The mRNA expression of each time point was calculated as x-fold change from each CTL value at 0 d. CTL indicates intact right muscle of each experimental group. Values are means  $\pm$  SE. \*significant differences ( $P < 0.05$ ) as compared with each CTL value. # significant differences ( $P < 0.05$ ) as compared with each non-Precon value.



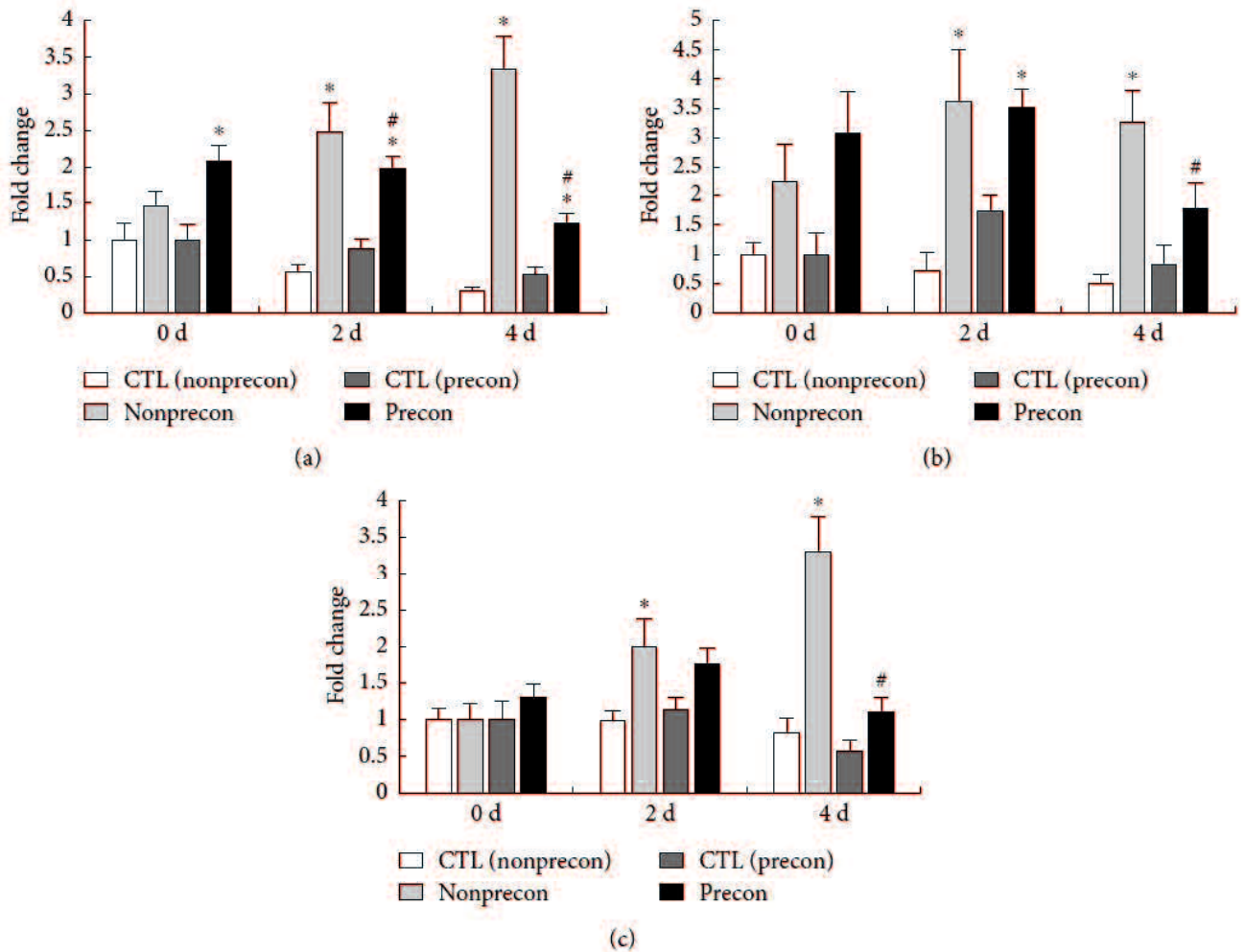


Figure 4: Time course changes in relative expression of BKB<sub>2</sub> receptor (a), COX-2 (b), and mPGES-1 (c) mRNA. The mRNA expression of each time point was calculated as x-fold change from each CTL value at 0 d. CTL indicates intact right muscle of each experimental group. Values are means  $\pm$  SE. \*significant differences ( $P < 0.05$ ) as compared with each CTL value. # significant differences ( $P < 0.05$ ) as compared with each non-Precon value.

## 第五章

### まとめ

多くの研究が筋再生に関わるサテライトセルの他の役割を調査している。サテライトセルは毛細血管の近傍に位置し、血管新生に関与することが示唆されている。低酸素は骨格筋に血管新生をもたらすことが明らかにされており、その機序に血管新生の重要な制御因子である VEGF の上方調節に関わる HIF1 や AMPK-PGC1 $\alpha$ 、NO、ROS が関与していると考えられる。低酸素曝露は *in vitro* でサテライトセルの活性化・増殖を促進することが示されており、*in vivo* においても活性化して血管新生に関与する可能性がある。現在、*in vivo* の骨格筋で低酸素曝露がサテライトセル動態に与える影響を調査した研究はほとんど存在しない。

本稿第二章では若齢（10 週齢）と高齢（20 ヶ月齢）マウスに対し、持続的低酸素と間欠的低酸素を施し、酸化的なヒラメ筋と解糖的な腓腹筋表層部に対する影響を調査している。持続的低酸素曝露は若齢マウスのヒラメ筋において MyoD mRNA の発現を増加させ、低酸素に適応するためにサテライトセルが必要である可能性が示唆された。この活性化には同時に発現が増加した BDNF が関与していると考えられるが、有意ではないけれども同様に MyoD mRNA の増加を示した高齢マウスヒラメ筋（3.2 倍）と若齢マウス腓腹筋表層部（1.3 倍）において BDNF mRNA の増加は見られなかった。

有意な毛細血管密度の増加は高齢マウスヒラメ筋においてのみ見られ、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る。この VEGF-A mRNA の増加は nNOS mRNA の増加と同時に生じており、両因子の間には有意な相関関係が見られた ( $R=0.52$ ,  $n=17$ )。このことは、筋細胞膜に存在する 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を示唆している。持続的低酸素条件と比較した時、間欠的低酸素条件の若齢腓腹筋表層部において、VEGF-A mRNA の有意な増加が見られた。この VEGF-A の増加は eNOS mRNA の増加と有意に相関しており ( $R=0.59$ ,  $n=16$ )、間欠的低酸素が eNOS-VEGF の経路で血管新生を促進する可能性を示している。更に間欠的低酸素条件の若齢腓腹筋表層部では、コントロールと比較して有意な FGF2 mRNA の増加が生じた。FGF2 は内皮細胞増殖の促進及び内皮細胞の管状構造への変化を誘導することで血管新生に関与する。これらの結果は間欠的低酸素曝露が、持続的低酸素曝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。

MyoD mRNA の増加と VEGF-A mRNA の増加は必ずしも協調していなかったことから、低酸素曝露の際のサテライトセルの血管新生への寄与は、VEGF-A を介していないか主要な要因でないと考えられる。

低酸素曝露とトレーニングの組み合わせは、低酸素曝露の効果とトレーニングの効果の相加的あるいは相乗的作用を期待して実施される。しかし、実際に相加あるいは相乗的な効果が存在するののかも議論がなされており、存在する場合も機序に関しては不明な点が多く存在し、サテライトセルに及ぼす影響もまた不明である。本稿第三章では、長期的な低酸素トレーニングがサラブレッド中殿筋にもたらす影響を報告している。我々は先行研究において、急性の低酸素トレーニングがサテライトセル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。更に常酸素トレーニング後と比較して低酸素トレーニング後では有意な myogenin mRNA の発現増加が見られた。これら、mRNA 発現の増加は常酸素下で行われた posttest の前 (pre) や直後 (post) においてのみ見られたことから、低酸素下でトレーニングを行うことによる独自の機序

が関係していることが考えられる。

低酸素曝露単独における作用はサテライトセルの血管新生に対する効果を持たない可能性が高いが、低酸素とトレーニングの組み合わせにおいては両者が関連している可能性も考えられる。低酸素トレーニング独自の機序に関するもう一つの要因は NO の増加である。NO はサテライトセルの活性化に関与する IL-6 の発現低下に寄与するので、NOS の増加が低酸素トレーニング群における posttest 後の IL-6 発現の低下に関係している可能性がある。更にマウスに対する間欠的低酸素曝露において増加が見られた FGF2 mRNA は常酸素トレーニング後に有意に低下し、低酸素トレーニング後には低下しなかった。このことは、間欠的低酸素曝露と低酸素トレーニングの骨格筋に対する作用機序の一部が重なっており、NOS の中でも eNOS が関与している可能性を示唆している。Posttest 後 7 日目では、Pax7 mRNA が常酸素トレーニング群でのみ有意に増加した。Posttest 4 時間後の IL-6 発現の低下は、低酸素トレーニング群でこの増加が見られなかったことを説明する可能性が高い。このことは、常酸素下で行われた posttest の 4 時間後以降に低酸素トレーニング群で比較的有意な mRNA 発現の増加が見られなかったことと合わせて、IL-6 あるいはサテライトセルの活性化がトレーニング後の応答に必要であることを示している。

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。本稿第四章は、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の発現を抑制することを報告している。筋痛は一般の人々からアスリートまでにおいて、運動に対する意欲を低下させる要素と成り得る。そのため、プレコンディショニングがどのような機序で筋痛を抑制するのか、またそのトレーニング効果に対する影響を調査することは様々な分野で有用な研究であると考えられる。アイシングの結果と異なっており、プレコンディショニング収縮は組織化学的に損傷を抑制しており、プレコンディショニングの 6 日後においても BKB<sub>2</sub> レセプターや COX-2、mPGES-1 mRNA 発現を低下させた。これらのことは筋痛の抑制が少なくとも mRNA レベルで変化を生じることと、損傷前の処置であるプレコンディショニングはより有効な筋痛の抑制手段であることを示している。一方で、プレコンディショニングはアイシングよりも顕著なサテライトセル関連遺伝子 (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おり、より長期的な実験による検証が必要である。

第二章の研究はマウスを用いて低酸素曝露が血管新生をもたらす機序に迫っており、第三章におけるサラブレッドの低酸素トレーニングの影響と合わせて、骨格筋に対する持続的あるいは間欠的低酸素の単独の効果やトレーニングとの組み合わせによる効果を示している。サテライトセルの活性化と血管新生は低酸素トレーニングにおいては関連する可能性があり、今後の研究課題と成り得る。第四章の研究はプレコンディショニングが筋痛を抑制する機序の一端を明らかにし、同時にサテライトセルの活性化が抑制されることを示した。これらの研究結果は低酸素曝露やプレコンディショニングが与える影響を、その機序とサテライトセルに注目して行っており、より詳細な機序の研究やトレーニングへと応用可能な情報を提供すると考えている。

## 謝 辞

本研究を進めるに当たり、3章におけるサラブレッドの筋サンプル及び心肺機能に関するデータを提供いただいた、日本中央競馬会（JRA）競走馬総合研究所・運動科学研究室の高橋敏之氏、大村一氏、向井和隆氏に心より感謝いたします。また、4章におけるエキセントリック収縮モデルの作成に多大なご協力をいただいた札幌医科大学大学院保健医療学科の山田崇史准教授並びに山田遼太郎氏に深謝いたします。本論文の作成においてあらゆる面で指導を賜った宮田浩文教授に深く感謝いたします。最後に、研究生生活において多くの協力をいただいた応用生理学研究室の皆様に感謝の意を表します。

## 引用文献

1. **Arany Z**, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM (2008) HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ . *Nature* 451, 1008-12.
2. **Bachawaty T**, Washington SL, Walsh SW (2010) Neutrophil expression of cyclooxygenase 2 in preeclampsia, *Reprod Sci* 17, 465-70.
3. **Bagnall J**, Leedale J, Taylor SE, Spiller DG, White MR, Sharkey KJ, Bearon RN, Sée V (2014) Tight control of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  transient dynamics is essential for cell survival in hypoxia. *J Biol Chem* 289, 5549–5564.
4. **Balligand JL**, Feron O, Dessy C (2009) eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues, *Physiol Rev* 89, 481-534.
5. **Baum O**, Vieregge M, Koch P, Guñl S, Hahn S, Huber-Abel FA, Pries AR, Hoppeler H (2013) Phenotype of capillaries in skeletal muscle of nNOS-knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304, R1175-82.
6. **Blais C Jr**, Adam A, Massicotte D, Péronnet F (1999) Increase in blood bradykinin concentration after eccentric weight-training exercise in men, *J Appl Physiol* (1985) 87, 1197-201.
7. **Borselli C**, Storrie H, Benesch-Lee F, Shvartsman D, Cezar C, Lichtman JW, Vandenberg HH, Mooney DJ (2010) Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3287-92.
8. **Bretón-Romero R**, González de Orduña C, Romero N, Sánchez-Gómez FJ, de Álvaro C, Porras A, Rodríguez-Pascual F, Laranjinha J, Radi R, Lamas S (2012) Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress. *Free Radic Biol Med* 52, 1093-100.
9. **Brindle NP**, Saharinen P, Alitalo K (2006) Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res* 98, 1014-23.

10. **Bruusgaard JC**, Liestøl K, Gundersen K (2006) Distribution of myonuclei and microtubules in live muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. *J Appl Physiol* 100, 2024-2030.
11. **Carberry JC**, McMorrow C, Bradford A, Jones JF, O'Halloran KD (2014) Effects of sustained hypoxia on sternohyoid and diaphragm muscle during development. *Eur Respir J* 43, 1149-58.
12. **Casey DP**, Walker BG, Curry TB, Joyner MJ (2011) Ageing reduces the compensatory vasodilatation during hypoxic exercise: the role of nitric oxide. *J Physiol* 589, 1477-88.
13. **Chaudhary P**, Suryakumar G, Prasad R, Singh SN, Ali S, Ilavazhagan G. (2012) Chronic hypobaric hypoxia mediated skeletal muscle atrophy: role of ubiquitin-proteasome pathway and calpains. *Mol Cell Biochem* 364, 101-13.
14. **Chen CY**, Tsai YL, Kao CL, Lee SD, Wu MC, Mallikarjuna K, Liao YH, Ivy JL, Kuo CH (2010) Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1 $\alpha$  signaling. *Chin J Physiol* 53, 62-71.
15. **Chen TC**, Chen HL, Pearce AJ, Nosaka K (2012) Attenuation of eccentric exercise-induced muscle damage by preconditioning exercises. *Med Sci Sports Exerc* 44, 2090-2098.
16. **Christiansen D**, Murphy RM, Bangsbo J, Stathis CG, Bishop DJ (2018) Increased FXYD1 and PGC-1 $\alpha$  mRNA after blood flow-restricted running is related to fibre type-specific AMPK signalling and oxidative stress in human muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 223, e13045.
17. **Christov C**, Chrétien F, Abou-Khalil R, Bassez G, Vallet G, Authier FJ, Bassaglia Y, Shinin V, Tajbakhsh S, Chazaud B, Gherardi RK (2007) Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners, *Mol Biol Cell* 18, 1397-409.
18. **Ciciliot S**, Schiaffino S (2010) Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications, *Curr Pharm Des* 16, 906-14.
19. **Clanton TL** (2007) Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* 102, 2379-88.
20. **Clow C**, Jasmin BJ (2010) Brain-derived neurotrophic factor regulates satellite cell differentiation and skeletal muscle regeneration. *Mol Biol Cell* 21, 2182-90.

21. **Cocks M**, Shaw CS, Shepherd SO, Fisher JP, Ranasinghe AM, Barker TA, Tipton KD, Wagenmakers AJ (2013) Sprint interval and endurance training are equally effective in increasing muscle microvascular density and eNOS content in sedentary males. *J Physiol* 591, 641-56.
22. **Conte C**, Riant E, Toutain C, Pujol F, Arnal JF, Lenfant F, Prats AC (2008) FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1 $\alpha$ , *PLoS One* 3, Article ID e3078.
23. **Couture R**, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptors in pain and inflammation, *Eur J Pharmacol* 429, 161-76.
24. **Croley AN**, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Pendergast AM, Hickner RC, Pofahl WE, Gavin TP (2005) Lower capillarization, VEGF protein, and VEGF mRNA response to acute exercise in the vastus lateralis muscle of aged vs. young women. *J Appl Physiol* (1985) 99, 1872-9.
25. **Dallaporta M**, Pecchi E, Thirion S, Jean A, Troadec JD (2010) Toward the management of inflammation: recent developments of mPGES-1 inhibitors, *Recent Pat CNS Drug Discov* 5, 70-80.
26. **De Palma C**, Clementi E (2012) Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair. *Mol Neurobiol* 46, 682-92.
27. **de Theije CC**, Langen RC, Lamers WH, Gosker HR, Schols AM, Köhler SE (2015) Differential sensitivity of oxidative and glycolytic muscles to hypoxia-induced muscle atrophy, *J Appl Physiol* (1985) 118, 200-11.
28. **Dina OA**, Green PG, Levine JD (2008) Role of interleukin- 6 in chronic muscle hyperalgesic priming, *Neuroscience* 152, 521-5.
29. **Domínguez-Álvarez M**, Gea J, Barreiro E (2017) Inflammatory Events and Oxidant Production in the Diaphragm, Gastrocnemius, and Blood of Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia: Therapeutic Strategies. *J Cell Physiol* 232, 1165-1175.
30. **Dumont NA**, Wang YX, Rudnicki MA (2015) Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function, *Development* 142, 1572-81.

31. **Egginton S**, Hussain A, Hall-Jones J, Chaudhry B, Syeda F, Glen KE (2016) Shear stress-induced angiogenesis in mouse muscle is independent of the vasodilator mechanism and quickly reversible, *Acta Physiol (Oxf)* 218, 153-166.
32. **Favier FB**, Britto FA, Freyssenet DG, Bigard XA, Benoit H (2015) HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: molecular insights into muscle physiology, *Cell Mol Life Sci* 72, 4681-96.
33. **Filippin LI**, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM (2009) Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury, *Nitric Oxide* 21, 157-63.
34. **Flann KL**, Rathbone CR, Cole LC, Liu X, Allen RE, Rhoads RP (2014) Hypoxia simultaneously alters satellite cell-mediated angiogenesis and hepatocyte growth factor expression, *J Cell Physiol* 229, 572-9.
35. **Fujimaki S**, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T (2014) Wnt protein-mediated satellite cell conversion in adult and aged mice following voluntary wheel running. *J Biol Chem* 289, 7399-412.
36. **Gavin TP**, Westerkamp LM, Zwetsloot KA (2006) Soleus, plantaris and gastrocnemius VEGF mRNA responses to hypoxia and exercise are preserved in aged compared with young female C57BL/6 mice. *Acta Physiol (Oxf)* 188, 113-21.
37. **Gliemann L**, Nyberg M, Hellsten Y (2016) Effects of exercise training and resveratrol on vascular health in aging. *Free Radic Biol Med* 98, 165-176.
38. **Gustafsson T**, Rundqvist H, Norrbom J, Rullman E, Jansson E, Sundberg CJ (2007) The influence of physical training on the angiopoietin and VEGF-A systems in human skeletal muscle, *J Appl Physiol (1985)* 103, 1012-20.
39. **Guzy RD**, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, Mansfield KD, Simon MC, Hammerling U, Schumacker PT (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1, 401-8.
40. **Hamza M**, Wang XM, Adam A, Brahim JS, Rowan JS, Carmona GN, Dionne RA (2010) Kinin B1 receptors contributes to acute pain following minor surgery in humans, *Mol Pain* 6, 12.



41. **Hedayatpour N**, Falla D (2015) Physiological and neural adaptations to eccentric exercise: mechanisms and considerations for training, *Biomed Res Int* 2015, Article ID 193741 7 pages,.
42. **Hesselink MK**, Kuipers H, Geurten P, Van Straaten H (1996) Structural muscle damage and muscle strength after incremental number of isometric and forced lengthening contractions, *J Muscle Res Cell Motil* 17, 335-41.
43. **Hoier B**, Hellsten Y (2014) Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation* 21, 301-14.
44. **Ho JJ**, Man HS, Marsden PA (2012) Nitric oxide signaling in hypoxia. *J Mol Med (Berl)* 90, 217-31.
45. **Hoshino S**, Ohkoshi N, Ishii A, Shoji S (2002) The expression of neuronal nitric oxide synthase and dystrophin in rat regenerating muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 23, 139-45.
46. **Huber-Abel FA**, Gerber M, Hoppeler H, Baum O (2012) Exercise-induced angiogenesis correlates with the up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 112, 155-62.
47. **Hyldahl RD**, Hubal MJ (2014) Lengthening our perspective: morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise, *Muscle Nerve* 49, 155-70.
48. **Hyldahl RD**, Olson T, Welling T, Groscost L, Parcell AC (2014) Satellite cell activity is differentially affected by contraction mode in human muscle following a workmatched bout of exercise, *Front Physiol* 5, 485.
49. **Ikezaki K**, Shibaguchi T, Sugiura T, Miyata H (2017) The effect of icing treatment on recovery process of damaged muscle in the rat. *Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 66, 345-354.
50. **Imaoka Y**, Kawai M, Mukai K, Ohmura H, Takahashi T, Hiraga A, Miyata H (2014) Training and detraining effects on satellite cell response after exhaustive exercise in thoroughbred horses, *Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 63, 177-187.

51. **Jash S**, Adhya S (2015) Effects of transient hypoxia versus prolonged hypoxia on satellite cell proliferation and differentiation in vivo, *Stem Cells Int* 2015, 961307.
52. **Kano Y**, Masuda K, Furukawa H, Sudo M, Mito K, Sakamoto K. (2008) Histological skeletal muscle damage and surface EMG relationships following eccentric contractions, *J Physiol Sci* 58, 349-55.
53. **Kawai M**, Aida H, Hiraga A, Miyata H (2013) Muscle satellite cells are activated after exercise to exhaustion in Thoroughbred horses, *Equine Vet J* 45, 512-7.
54. **Karamouzis M**, Langberg H, Skovgaard D, Bülow J, Kjaer M, Saltin B (2001) In situ microdialysis of intramuscular prostaglandin and thromboxane in contracting skeletal muscle in humans, *Acta Physiol Scand* 171, 71-6.
55. **Kook SH**, Son YO, Lee KY, Lee HJ, Chung WT, Choi KC, Lee JC (2008) Hypoxia affects positively the proliferation of bovine satellite cells and their myogenic differentiation through up-regulation of MyoD. *Cell Biol Int* 32, 871-8.
56. **Korotkova M**, Helmers SB, Loell I, Alexanderson H, Grundtman C, Dorph C, Lundberg IE, Jakobsson PJ (2008) Effects of immunosuppressive treatment on microsomal prostaglandin E synthase 1 and cyclooxygenases expression in muscle tissue of patients with polymyositis or dermatomyositis, *Ann Rheum Dis* 67, 1596-602.
57. **Korotkova M**, Jakobsson PJ (2011) Microsomal prostaglandin e synthase-1 in rheumatic diseases, *Front Pharmacol* 1, 146.
58. **Langberg H**, Bjørn C, Boushel R, Hellsten Y, Kjaer M (2002) Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans, *J Physiol* 542, 977-83.
59. **Latroche C**, Weiss-Gayet M, Muller L, Gitiaux C, Leblanc P, Liot S, Ben-Larbi S, Abou-Khalil R, Verger N, Bardot P, Magnan M, Chrétien F, Mounier R, Germain S, Chazaud B (2017) Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Reports* 9, 2018-2033.
60. **Lavender AP**, Nosaka K (2008) A light load eccentric exercise confers protection against a subsequent bout of more demanding eccentric exercise. *J Sci Med Sport* 11, 291-298.

61. **Lavie L** (2015) Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia-revisited-the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med Rev* 20, 27-45.
62. **Lee WJ**, Kim M, Park HS, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, Koh EH, Won JC, Kim MS, Oh GT, Yoon M, Lee KU, Park JY (2006) AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 291-5.
63. **Lindholm A**, Piehl K (1974) Fibre composition, enzyme activity and concentrations of metabolites and electrolytes in muscles of standardbred horses, *Acta Vet Scand* 15, 287-309.
64. **Liu W**, Wen Y, Bi P, Lai X, Liu XS, Liu X, Kuang S (2012) Hypoxia promotes satellite cell self-renewal and enhances the efficiency of myoblast transplantation, *Development* 139, 2857-2865.
65. **Liu X**, Wu G, Shi D, Zhu R, Zeng H, Cao B, Huang M, Liao H. (2015) Effects of nitric oxide on notexin-induced muscle inflammatory responses, *Int J Biol Sci* 11, 156-67.
66. **Li X**, Zhu L, Chen X, Fan M (2007) Effects of hypoxia on proliferation and differentiation of myoblasts, *Med Hypotheses* 69, 629-36.
67. **Lloyd PG**, Prior BM, Yang HT, Terjung RL (2003) Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H1668-78.
68. **Maeo S**, Yamamoto M, Kanehisa H, Nosaka K (2017) Prevention of downhill walking-induced muscle damage by non-damaging downhill walking, *PLoS One* 12, Article ID e0173909.
69. **Malek MH**, Olfert IM, Esposito F (2010) Detraining losses of skeletal muscle capillarization are associated with vascular endothelial growth factor protein expression in rats, *Exp Physiol* 95, 359-68.
70. **Manjavachi MN**, Motta EM, Marotta DM, Leite DF, Calixto JB (2010) Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice, *Pain* 151, 345-55.
71. **Mateika JH**, El-Chami M, Shaheen D, Ivers B (2015) Intermittent hypoxia: a low-risk research tool with therapeutic value in humans. *J Appl Physiol (1985)* 118, 520-32.

72. **McKay BR**, O'Reilly CE, Phillips SM, Tarnopolsky MA, Parise G (2008) Co-expression of IGF-1 family members with myogenic regulatory factors following acute damaging musclelengthening contractions in humans, *J Physiol* 86, 5549-5560.
73. **McClung JM**, Reinardy JL, Mueller SB, McCord TJ, Kontos CD, Brown DA, Hussain SN, Schmidt CA, Ryan TE, Green TD (2015) Muscle cell derived angiopoietin-1 contributes to both myogenesis and angiogenesis in the ischemic environment, *Front Physiol* 6, 161.
74. **Meotti FC**, Campos R, da Silva K, Paszcuk AF, Costa R, Calixto JB (2012) Inflammatory muscle pain is dependent on the activation of kinin B1 and B2 receptors and intracellular kinase pathways, *Br J Pharmacol* 166, 1127-39.
75. **Merry TL**, Ristow M (2016) Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training?. *J Physiol* 594, 5135-47.
76. **Morales-Alamo D**, Ponce-González JG, Guadalupe-Grau A, Rodríguez-García L, Santana A, Cusso MR, Guerrero M, Guerra B, Dorado C, Calbet JA (2012) Increased oxidative stress and anaerobic energy release, but blunted Thr172-AMPK $\alpha$  phosphorylation, in response to sprint exercise in severe acute hypoxia in humans. *J Appl Physiol (1985)* 113, 917-28.
77. **Morales-Alamo D**, Guerra B, Ponce-González JG, Guadalupe-Grau A, Santana A, Martin-Rincon M, Gelabert-Rebato M, Cadefau JA, Cusso R, Dorado C, Calbet JAL (2017) Skeletal muscle signaling, metabolism, and performance during sprint exercise in severe acute hypoxia after the ingestion of antioxidants. *J Appl Physiol (1985)* 123, 1235-1245.
78. **Murase S**, Terazawa E, Hirate K, Yamanaka H, Kanda H, Noguchi K, Ota H, Queme F, Taguchi T, Mizumura K. (2013) Upregulated glial cell line-derived neurotrophic factor through cyclooxygenase-2 activation in the muscle is required for mechanical hyperalgesia after exercise in rats, *J Physiol* 591, 3035-48.
79. **Murach KA**, White SH, Wen Y, Ho A, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA (2017) Differential requirement for satellite cells during overload-induced muscle hypertrophy in growing versus mature mice. *Skelet Muscle* 7, 14.
80. **Murach KA**, Confides AL, Ho A, Jackson JR, Ghazala LS, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE (2017) Depletion of Pax7+ satellite cells does not affect diaphragm adaptations to running in young or aged mice. *J Physiol* 595, 6299-6311.

81. **Murase S**, Terazawa E, Queme F, Ota H, Matsuda T, Hirate K, Kozaki Y, Katanosaka K, Taguchi T, Urai H, Mizumura K (2010) Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed-onset muscle soreness), *J Neurosci* 30, 3752-61.
82. **Nagahisa H**, Okabe K, Iuchi Y, Fujii J, Miyata H (2016) Characteristics of skeletal muscle fibers of SOD1 knockout mice, *Oxid Med Cell Longev* 2016, Article ID 9345970 8 pages.
83. **Nagahisa H**, Mukai K, Ohmura H, Takahashi T, Miyata H (2016) Effect of High-Intensity Training in Normobaric Hypoxia on Thoroughbred Skeletal Muscle. *Oxid Med Cell Longev* Article ID 1535367, 10 pages.
84. **Naumenko VS**, Kulikov AV, Kondaurova EM, Tsybko AS, Kulikova EA, Krasnov IB, Shenkman BS, Sychev VN, Bazhenova EY, Sinyakova NA, Popova NK (2015) Effect of actual long-term spaceflight on BDNF, TrkB, p75, BAX and BCL-XL genes expression in mouse brain regions. *Neuroscience* 284, 730-6.
85. **Nederveen JP**, Joannisse S, Snijders T, Ivankovic V, Baker SK, Phillips SM, Parise G (2016) Skeletal muscle satellite cells are located at a closer proximity to capillaries in healthy young compared with older men. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 7, 547-554.
86. **Nelson N** (2013) Delayed onset muscle soreness: is massage effective?, *J Bodyw Mov Ther* 17, 475-82.
87. **Nosaka K**, Sakamoto K, Newton M, Sacco P. (2001) How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last?, *Med Sci Sports Exerc* 33, 1490-5.
88. **Nosaka K**, Newton M, Sacco P (2002) Delayed-onset muscle soreness does not reflect the magnitude of eccentric exercise-induced muscle damage. *Scand J Med Sci Sports* 12, 337-346.
89. **Novak ML**, Billich W, Smith SM, Sukhija KB, McLoughlin TJ, Hornberger TA, Koh TJ (2009) COX-2 inhibitor reduces skeletal muscle hypertrophy in mice, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R1132-9.
90. **Okabe K**, Mukai K, Ohmura H, Takahashi T, Miyata H (2017) Effect of acute high-intensity exercise in normobaric hypoxia on Thoroughbred skeletal muscle. *J Sports Med Phys*

*Fitness* 57, 711-719.

91. **Ohno H**, Shirato K, Sakurai T, Ogasawara J, Sumitani Y, Sato S, Imaizumi K, Ishida H, Kizaki T (2012) Effect of exercise on HIF-1 and VEGF signaling. *Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 1, 5-16
92. **Olfert IM**, Breen EC, Mathieu-Costello O, Wagner PD (2001) Chronic hypoxia attenuates resting and exercise-induced VEGF, flt-1, and flk-1 mRNA levels in skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)* 90, 1532-8.
93. **Pascoe JR**, Hiraga A, Hobo S, Birks EK, Yarbrough TB, Takahashi T, Hada T, Aida H, Steffey EP, Jones JH (1999) Cardiac output measurements using sonomicrometer crystals on the left ventricle at rest and exercise, *Equine Vet J Suppl* 30, 148-52.
94. **Radak Z**, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M (2013) Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal* 18, 1208-46.
95. **Razeghi P**, Baskin KK, Sharma S, Young ME, Stepkowski S, Essop MF, Taegtmeier H (2006) Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 361-4.
96. **Ren W**, Yang X, Jiang X, Li Z, Zhang Z (2010) Chronic hypoxia and exercise training affect the NO content and NOS activity of rat skeletal muscle, *International SportMed Journal* 11, 244-257.
97. **Rhoads RP**, Johnson RM, Rathbone CR, Liu X, Temm-Grove C, Sheehan SM, Hoying JB, Allen RE (2009) Satellite cell mediated angiogenesis in vitro coincides with a functional hypoxia-inducible factor pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C1321-C1328.
98. **Rhoads RP**, Flann KL, Cardinal TR, Rathbone CR, Liu X, Allen RE (2013) Satellite cells isolated from aged or dystrophic muscle exhibit a reduced capacity to promote angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 440, 399-404.
99. **Rodriguez J**, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi A, Seiliez I, Picard B, Bonnieu A (2014) Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 71, 4361-71.

100. **Roig M**, O'Brien K, Kirk G, Murray R, McKinnon P, Shadgan B, Reid WD (2009) The effects of eccentric versus concentric resistance training on muscle strength and mass in healthy adults: a systematic review with meta-analysis. *Br J Sports Med* 43 556-568.
101. **Samuelsson B**, Morgenstern R, Jakobsson PJ (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target, *Pharmacol Rev Sep* 59, 207-24.
102. **Schiaffino S**, Rossi AC, Smerdu V, Leinwand LA, Reggiani C (2015) Developmental myosins: expression patterns and functional significance, *Skelet Muscle* 5, 22.
103. **Semenza GL** (2012) Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399-408.
104. **Serebrovskaya TV**, Manukhina EB, Smith ML, Downey HF, Mallet RT (2008) Intermittent hypoxia: cause of or therapy for systemic hypertension? *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 627-50.
105. **Snijders T**, Nederveen JP, Joannisse S, Leenders M, Verdijk LB, van Loon LJ, Parise G (2017) Muscle fibre capillarization is a critical factor in muscle fibre hypertrophy during resistance exercise training in older men. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 8, 267-276.
106. **Srikuea R**, Pholpramool C, Kitiyanant Y, Yimlamai T (2010) Satellite cell activity in muscle regeneration after contusion in rats, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37, 1078-86.
107. **Sriram S**, Subramanian S, Sathiakumar D, Venkatesh R, Salerno MS, McFarlane CD, Kambadur R, Sharma M (2011) Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- $\kappa$ B. *Aging Cell* 10, 931-48.
108. **Stray-Gundersen J**, Chapman RF, Levine BD (2001) Living high-training low' altitude training improves sea level performance in male and female elite runners, *J Appl Physiol (1985)* 91, 1113-1120.
109. **Sudo M**, Kano Y (2009) Myofiber apoptosis occurs in the inflammation and regeneration phase following eccentric contractions in rats, *J Physiol Sci* 59, 405-12.
110. **Su JB** (2014) Different cross-talk sites between the reninangiotensin and the kallikrein-kinin systems, *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 15, 319-28.

111. **Suzuki J** (2016) Short-duration intermittent hypoxia enhances endurance capacity by improving muscle fatty acid metabolism in mice. *Physiol Rep* 4, e12744.
112. **Takagi R**, Fujita N, Arakawa T, Kawada S, Ishii N, Miki A (2011) Influence of icing on muscle regeneration after crush injury to skeletal muscles in rats. *J Appl Physiol* 110, 382-8.
113. **Urai H**, Murase S, Mizumura K (2013) Decreased nerve growth factor upregulation is a mechanism for reduced mechanical hyperalgesia after the second bout of exercise in rats, *Scand J Med Sci Sports* 23, e96-101.
114. **Verdijk LB**, Snijders T, Holloway TM, VAN Kranenburg J, VAN Loon LJ (2016) Resistance Training Increases Skeletal Muscle Capillarization in Healthy Older Men. *Med Sci Sports Exerc* 48: 2157-2164.
115. **Vogt M**, Hoppeler H (2010) Is hypoxia training good for muscles and exercise performance? *Prog Cardiovasc Dis* 52, 525-533.
116. **Wang GL**, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5510-4.
117. **Wang JS**, Chen LY, Fu LL, Chen ML, Wong MK (2007) Effects of moderate and severe intermittent hypoxia on vascular endothelial function and haemodynamic control in sedentary men, *Eur J Appl Physiol* 100, 127-135,.
118. **Wang JS**, Lee MY, Lien HY, Weng TP (2014) Hypoxic exercise training improves cardiac/muscular hemodynamics and is associated with modulated circulating progenitor cells in sedentary men, *Int J Cardiol* 170, 315-23.
119. **Ward ME**, Toporsian M, Scott JA, Teoh H, Govindaraju V, Quan A, Wener AD, Wang G, Bevan SC, Newton DC, Marsden PA (2005) Hypoxia induces a functionally significant and translationally efficient neuronal NO synthase mRNA variant. *J Clin Invest* 115, 3128-39.
120. **Williams JL**, Cartland D, Hussain A, Egginton S (2006) A differential role for nitric oxide in two forms of physiological angiogenesis in mouse. *J Physiol* 570, 445-54.
121. **Williams JL**, Cartland D, Rudge JS, Egginton S (2006) VEGF trap abolishes shear stress- and overload- dependent angiogenesis in skeletal muscle. *Microcirculation* 13, 499-509.



122. **Willems ME**, Stauber WT (2009) the effect of number of lengthening contractions on rat isometric force production at different frequencies of nerve stimulation, *Acta Physiol (Oxf)* 196, 351-6.
123. **Yamada M**, Tatsumi R, Yamanouchi K, Hosoyama T, Shiratsuchi S, Sato A, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Furuse M, Allen RE (2010) High concentrations of HGF inhibit skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro by inducing expression of myostatin: a possible mechanism for reestablishing satellite cell quiescence in vivo, *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C465-76.
124. **Yamada R**, Himori K, Tatebayashi D, Ashida Y, Ikezaki K, Miyata H, Kanzaki K, Wada M, Westerblad H, Yamada T (2018) Preconditioning contractions prevent the delayed onset of myofibrillar dysfunction after damaging eccentric contractions, *J Physiol* 596, 4427-4442.
125. **Yamaguchi A**, Ishii H, Morita I, Oota I, Takeda H (2004) mRNA expression of fibroblast growth factors and hepatocyte growth factor in rat plantarismuscle following denervation and compensatory overload, *Pflugers Arch* 448, 539-46.
126. **Yun YR**, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW (2010) Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng* 2010, 218142.
127. **Yu T**, Chang Y, Gao XL, Li H, Zhao P (2017) Dynamic Expression and the Role of BDNF in Exerciseinduced Skeletal Muscle Regeneration. *Int J Sports Med* 38, 959-966.
128. **Zhang Y**, Shaffer A, Portanova J, Seibert K, Isakson PC (1997) Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production, *J Pharmacol Exp Ther* 283, 1069-75.
129. **Zuo L**, Shiah A, Roberts WJ, Chien MT, Wagner PD, Hogan MC (2013) Low Po2 conditions induce reactive oxygen species formation during contractions in single skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304, R1009-16.
130. **Zwetsloot KA**, Westerkamp LM, Holmes BF, Gavin TP (2008) AMPK regulates basal skeletal muscle capillarization and VEGF expression, but is not necessary for the angiogenic response to exercise. *J Physiol* 586, 6021-35.

## 要 旨

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。

低酸素曝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、低酸素曝露を行って骨格筋に対する影響を検討した。持続的低酸素曝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曝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曝露は、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曝露は *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曝露が、持続的低酸素曝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、低酸素曝露の際の 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 は低酸素曝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曝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。

## 論文目録

著者氏名: Hiroshi Nagahisa, Kazutaka Mukai, Hajime Ohmura,  
Toshiyuki Takahashi, Hirofumi Miyata

論文題目: Effect of High-Intensity Training in Normobaric Hypoxia on  
Thoroughbred Skeletal Muscle

学術雑誌名 (巻、号、頁) : Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016,  
Article ID 1535367, 10 pages

発行年月: 2016 年 9 月発行

..... 第三章

---

著者氏名: Hiroshi Nagahisa, Kazumi Ikezaki, Ryotaro Yamada,  
Takashi Yamada, Hirofumi Miyata

論文題目: Preconditioning Contractions Suppress Muscle Pain Markers after  
Damaging Eccentric Contractions

学術雑誌名 (巻、号、頁) : Pain Research and Management Volume 2018,  
Article ID 3080715, 8 pages

発行年月: 2018 年 10 月発行

..... 第四章

---

著者氏名: Hiroshi Nagahisa, Hirofumi Miyata

論文題目: Influence of hypoxic stimulation on angiogenesis and satellite cells  
in mouse skeletal muscle

学術雑誌名 (巻、号、頁) : PLOS ONE Volume 13, Article ID e0207040, 15 pages

発行年月: 2018 年 11 月発行

..... 第二章

---

参考論文

著者氏名: Hiroshi Nagahisa, Kazuma Okabe, Yoshihito Iuchi, Junichi Fujii, Hirofumi Miyata

論文題目: Characteristics of Skeletal Muscle Fibers of SOD1 Knockout Mice

学術雑誌名 (巻、号、頁) : Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016,

Article ID 9345970, 8 pages

発行年月: 2015 年 12 月発行

---

著者氏名: Hiroshi Ichikawa, Taiki Matsuo, Yasuo Higurashi, Hiroshi Nagahisa, Hirofumi Miyata,  
Takao Sugiura, Naomi Wada

論文題目: Characteristics of Muscle Fiber-Type Distribution in Moles

学術雑誌名 (巻、号、頁) : The Anatomical Record : Advances In Integrative Anatomy

And Evolutionary Biology <https://doi.org/10.1002/ar.24008>

発行年月: 2018 10 月 (on line published)