

機関番号：10102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500571

研究課題名(和文) 低酸素刺激が骨格筋における酸素センシング機構に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of prolyl hydroxylase inhibitor treatment on oxygen sensing mechanism in skeletal muscles

研究代表者

鈴木 淳一 (SUZUKI JUNICHI)

北海道教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：80261379

研究成果の概要(和文)：酸素が足りない状態に陥ると、生体では HIF-1 $\alpha$  というタンパク質が安定化し、酸素不足に適応するような変化が引き起こされる。本研究では、通常酸素下においてその適応反応を刺激する物質 (prolyl hydroxylase 抑制剤) を投与し、低酸素適応反応が生じるか否かを観察した。その結果、投与によって骨格筋における毛細血管新生や解糖系の酵素の活性が増加し、酸素不足を解消するような適応反応が観察された。

研究成果の概要(英文)：Recently a family of O<sub>2</sub>-dependent prolyl hydroxylase domain-containing enzymes has been identified as a cellular oxygen sensing mechanism. Reduced prolyl hydroxylase activity facilitates an accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ). This study was designed to examine the effects of prolyl hydroxylase inhibitor, supplementation on muscle oxygen sensing mechanism. The present results suggest that prolyl hydroxylase inhibitor facilitates capillary angiogenesis and glycolytic enzyme activity via HIF-1 $\alpha$  upregulation in hind-leg muscles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：運動生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：スポーツ生理学, 運動生理学, 酸素センシング機構

## 1. 研究開始当初の背景

低酸素環境への暴露、運動、虚血などによる組織への低酸素刺激は、組織酸素センサーを介して低酸素誘導因子 (HIF) -1 $\alpha$  の発現を引き起こし、エリスロポエチンの分泌増加、無氣的解糖系酵素活性増加、毛細血管網の再構築等の適応性変化を惹起することが知られている。この「組織酸素センサー」に関しては、以前から様々なモデルが考えられてきたが、現在は 2001 年に Kaelin と Ratcliffe の

グループが発表したモデルが有力とされている。そのモデルでは、通常の酸素レベルでは、HIF-1 $\alpha$  は HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase (HIF-PH) の作用によって hydroxylation され、それが von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL) の修飾するユビキチン化プロセスを活性化するため、HIF-1 $\alpha$  は常に ubiquitin-proteasome pathway で分解されている状況にある (図 1 左側)。一方、HIF-PH が作用する際には酸素分子と Fe<sup>2+</sup> が必

要であるため、低酸素状態やキレーターの存在下では、HIF-PHの作用が抑制されることによってHIF-1 $\alpha$ が安定化し、様々な適応性変化が惹起される。骨格筋における運動時の局所的な低酸素状態や低酸素暴露時に生じる適応反応もこのモデルで説明できると考えられる。

これまで酸素センシング機構（酸素分圧を感知し、HIF-1 $\alpha$ の発現を促進するメカニズム）に関して、骨格筋においてその存在を明らかにした研究はこれまで報告されていない。以前より、コバルトイオンを摂取すると赤血球数の増加等、低酸素刺激と同様の反応が見られることが知られている。申請者が行った先行研究では、ラットに塩化コバルトを投与中に持続的トレーニングを負荷すると、トレーニングだけを行うよりも骨格筋毛細血管数が顕著に増加し、またコバルトを投与するだけでも横隔膜の毛細血管が顕著に増加することを報告している。また、筋線維タイプではtype-IIbの割合が顕著に増加していた。さらに、コバルト投与中に持続的トレーニングを負荷すると3日後に血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現が著しく増加し、その後毛細血管数が増加することを観察している。このことから、低酸素に対する骨格筋の適応性変化においても前述のような酸素センシング機構が重要な役割を果たしていることが推察される。しかしながら、コバルトの作用機序が明確にされていないことから、「酸素センシング機構」に直接作用しているということとはできない。

## 2. 研究の目的

細胞レベルのin vitroの研究では、HIF-PHを抑制するethyl-3,4 dihydroxybenzoate (EDHB)を用いて酸素センシング機構の研究が行われている(図1右)。最近、このEDHBをマウスに短期間投与すると、肝臓のHIF-1 $\alpha$ の発現と血中エリスロポエチン濃度が顕著に増加し、また低酸素環境下での生存率が向上することが報告されている。このことから、EDHBの投与によって全身の酸素センシング機構が刺激され、低酸素適応が生じていることが示唆される。本研究では、ラットにおいてEDHB投与による骨格筋酸素供給系の適応性変化、運動トレーニングと投与の相互作用による影響も検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)実験1：間欠的なEDHB投与が骨格筋の筋線維組成及び代謝機能に及ぼす影響。

実験には12週令のWistar系雄雌ラット16匹を用いた。任意に対照(Cnt)群8匹、EDHB(ED)群8匹に分けた。ethyl-3,4 dihydroxybenzoate (EDHB)を100mg/Kg・BWの割合で腹腔内投与した。投与は月曜日から

水曜日の週3日間で、3週間行った。対照群にはvehicleであるdimethylsulfoxideを投与した。

最終投与終了48時間後、 $\alpha$ -クロラロース(0.06g/Kg)+ウレタン(0.7g/Kg)麻酔下でヒラメ筋を摘出し、湿重量を秤量した。組織学用サンプルはOCT-compoundで包埋し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結した。生化学分析用サンプルは液体窒素で急速凍結した。腹部大動脈から動脈血を採取し、ヘモグロビン濃度とヘマトクリットを測定した。

厚さ6 $\mu$ mのヒラメ筋横断切片を作成し、免疫組織学的手法を用い、type II筋線維の同定を行なった。一次抗体には、monoclonal anti-skeletal myosin (fast) clone MY-32(Sigma, M4276)を用いた。この染色法に陽性の線維をtype II、陰性の線維をtype Iと分類した。

筋のホモジネートを作製し、 $\beta$ -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD), citrate synthase (CS)活性、hexokinase(HK), phosphofructokinase (PFK), lactate dehydrogenase (LDH)を分光光度計によって測定した。

(2)実験2：間欠的なEDHB投与が運動依存性毛細血管新生に及ぼす影響。

実験には12週令のWistar系雄雌ラット32匹を用いた。任意に安静対照(Cnt)群、EDHB投与(ED)群、トレーニング(Tr)群、投与+トレーニング(EDTr)群各8匹に分けた。投与群への投与は実験1と同様に行った。トレーニング群には、トレッドミル走行運動(20m/min, 30min, 5days/wk, 10% grade)を3週間負荷した。

厚さ10 $\mu$ mのヒラメ筋横断切片を作成し、酵素組織学的手法を用い、毛細血管の同定を行なった。

(3)実験3：EDHB投与が短期間の高強度運動による毛細血管新生に及ぼす影響。

実験には12週令のWistar系雄雌ラット32匹を用いた。任意に安静対照(Cnt)群、EDHB投与(ED)群、トレーニング(Tr)群、投与+トレーニング(EDTr)群各8匹に分けた。投与群にはEDHBを100mg/Kg・BWの割合で腹腔内投与した。投与は3~5日目と8~10日目に行った。対照群にはvehicleであるdimethylsulfoxideを投与した。

運動は回転ゲージによる自発走行運動を10日間負荷した。総走行距離は、Tr群：34.2 $\pm$ 4.8 Km, EDTr群：26.3 $\pm$ 2.1 Kmで、両群間に有意な差異はみられなかった。

実験2と同様に毛細血管の分析を行った。

## 4. 研究成果

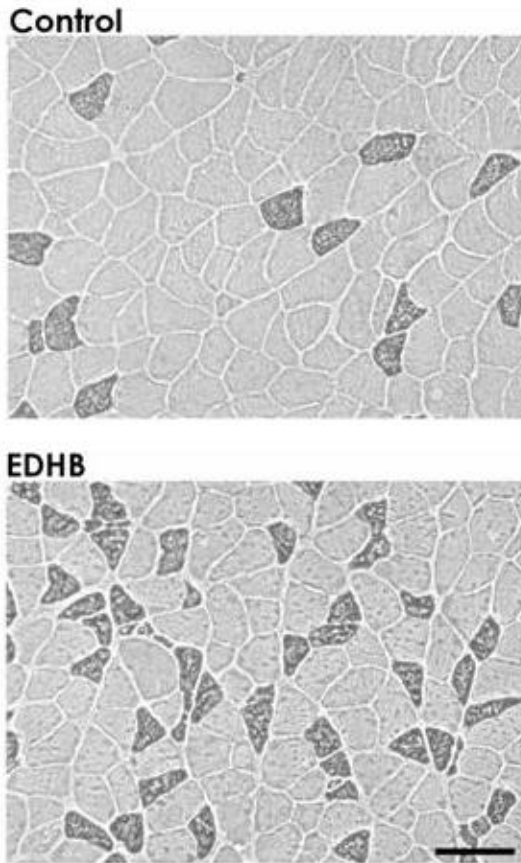


図1 EDHBの投与が速筋(黒)と遅筋(白)の割合に及ぼす影響. ヒラメ筋横断切片に免疫組織染色を施した. 図右下の黒線は100  $\mu$ mを示す.

(1) 実験 1

EDHBの投与によって, type-II 線維の割合が有意に増加し, type-I 線維の割合が有意に減少した(図1).

酵素活性は, HK 活性が投与によって有意に増加したが, HAD, CS, PFK, LDH の活性には差がみられなかった(図2).

先行研究において, 低酸素暴露によって成長期ラットにおける, 速筋から遅筋への移行抑制(速筋の割合が増加)が報告されている. また, HK は HIF-1 $\alpha$  の安定化によって発現が促進することが報告されている. このようなことから, 本研究の EDHB 投与は骨格筋において HIF-PH を抑制し, 低酸素適応反応を惹起することが確認された.

(2) 実験 2

ヒラメ筋の毛細血管密度は ED 群と EDTr 群で有意に増加した. capillary-to-fiber ratio は Tr 群, ED 群, EDTr 群で同等に有意に増加した(図3). これらのことから, PH 抑制は, 毛細血管新生を引き起こすが, 運動依存性血管新生に及ぼす影響はほとんどないことが示唆された.

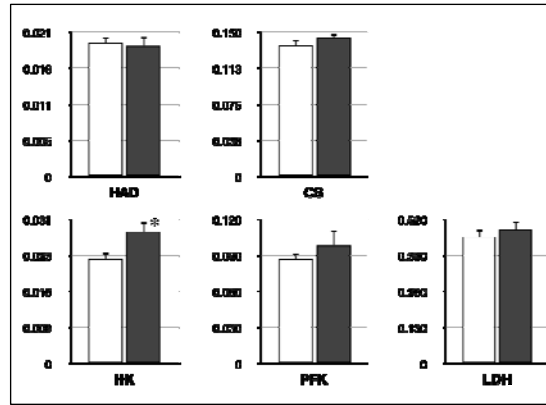


図2 EDHBの投与が骨格筋の酵素活性に及ぼす影響. \* vs Cnt (P < 0.05)

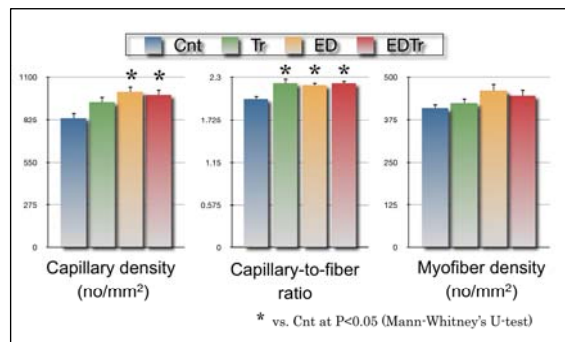


図3 EDHBの投与がヒラメ筋毛細血管網に及ぼす影響.

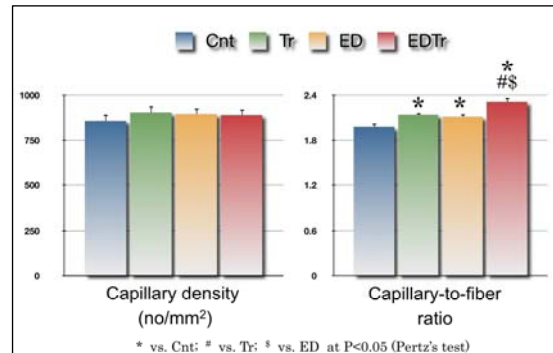


図4 EDHBの投与がヒラメ筋の運動依存性毛細血管新生に及ぼす影響.

(3) 実験 3

ヒラメ筋の capillary-to-fiber ratio は Tr 群と ED 群で有意に増加し, EDTr 群では運動群よりも有意な増加が観察された(図4). 免疫組織染色の結果, ED 群と EDTr 群で血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の顕著な発現増加が観察された(図5). これらのことから, EDHB 投与による PH 抑制は, VEGF の発現を促進して毛細血管新生を引き起こすとともに,

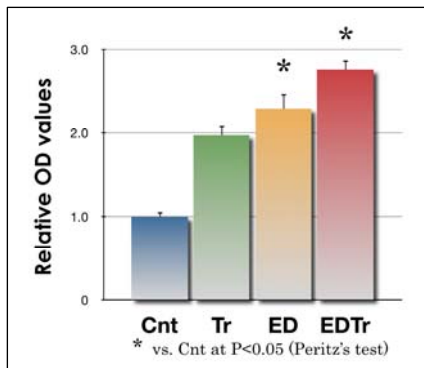


図5 EDHB の投与がヒラメ筋の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の発現に及ぼす影響. 運動依存性毛細血管新生に及ぼす影響.

運動依存性毛細血管新生を促進することが示唆された.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

(1) SUZUKI Junichi, Effects of prolyl hydroxylase inhibitor on fiber type composition and metabolic enzyme activities in rat soleus muscle. 北海道教育大学紀要(自然科学編), 査読無, 第61巻, 2011, pp. 7-11.

[学会発表] (計3件)

(1) 鈴木淳一, Prolyl hydroxylase 抑制剤の投与は運動依存性毛細血管新生を促進する. 第18回大会, 鹿児島, 2010年8月1日.

(2) 鈴木淳一, Prolyl hydroxylase 抑制剤の投与が骨格筋の運動依存性毛細血管新生に及ぼす影響. 日本運動生理学会 第17回大会, 東京, 2009年7月25日.

(3) 鈴木淳一, Prolyl hydroxylase 抑制剤の投与が骨格筋の毛細血管新生と代謝酵素活性に及ぼす影響. 日本運動生理学会 第16回大会, 奈良, 2008年8月2日.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 淳一 (SUZUKI JUNICHI)

北海道教育大学・教育学部・准教授

研究者番号: 80261379