

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11380

研究課題名（和文）有酸素性代謝能力を効果的に向上させる低酸素環境を利用した持続的トレーニングの探索

研究課題名（英文）Validation of endurance training using hypoxic environments to improve aerobic metabolic capacity effectively.

研究代表者

高倉 久志 (Takakura, Hisashi)

同志社大学・スポーツ健康科学部・准教授

研究者番号：20631914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素暴露や常酸素環境下での持続的トレーニング（TR）による刺激を同時、または連続的に行った場合にはどちらかの単独因子による刺激に獲得できる効果が消失してしまうことが我々のこれまでの研究で示された。そこで本研究では、3時間低酸素暴露刺激による低酸素応答がどの程度継続するかを踏まえた上で、TRと3時間低酸素暴露刺激を一定の時間間隔を空けて交互に実施する運動プロトコルが骨格筋の有酸素性代謝能力に及ぼす影響を検討した。その結果として、TRと低酸素暴露を交互に実施した場合においては、ヘモグロビン濃度の増加が認められたものの、それ以外の筋有酸素性代謝能力に関する因子への影響は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

持続的トレーニング（TR）と低酸素暴露を同時や連続的に実施すると酸素供給能力やミトコンドリア生合成の変化が抑制される。そこで、それぞれの刺激を十分な時間間隔を空けて実施すれば、併用しても各刺激因子を単独で用いた際の適応が維持されるかもしれないと考え、両刺激を交互に行う低酸素暴露を用いたTR法の検証を実施した。これらの成果は筋の有酸素性代謝能力を効果的に向上させる新たな低酸素トレーニングプログラムの開発に繋がると考えられる。また、上記のTR方法が確立されれば、低酸素環境を用いたTRを高地に出向かずとも低酸素テントのような環境さえあれば実施でき、効率的な競技力の向上を望める。

研究成果の概要（英文）：In this study, muscle oxidative metabolism can be divided roughly into three factors: extracellular oxygen supply capacity, intracellular oxygen supply capacity, and intracellular oxygen utilization capacity. Stimulation with either hypoxia or training (TR) alone enhanced different factors involved in muscle oxidative metabolism. In contrast, endurance TR in a hypoxic environment and hypoxic exposure immediately after endurance TR showed counteracting effects on the factors involved in muscle oxidative metabolism. Therefore, this study aimed to examine the effect of alternating stimulation with endurance TR and short-term hypoxia exposure twice a day with sufficient time interval on the muscle oxidative metabolism. The alternating interventions in this study did not affect the factors related to muscle oxidative metabolism capacity, except hemoglobin concentration.

研究分野：スポーツ生化学

キーワード：低酸素環境 持続的トレーニング ミトコンドリア 赤血球 ヘモグロビン ミオグロビン 酸素供給
機構 筋組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

持久系アスリートは運動トレーニング (TR) による持久的パフォーマンスの向上を助長させるために低酸素環境を用いた TR を実践する場合があるが、科学的にはその有用性について議論が続けられている (Hoppeler et al., 2008)。我々はこれまでに、持久的パフォーマンスを支える骨格筋有酸素性代謝能力を 細胞外からの酸素供給能力 (毛細血管密度、赤血球数、サイズなど)、筋細胞内酸素運搬能力 (ミオグロビン)、筋細胞内酸素利用能力 (ミトコンドリア) の 3 要因に大別し、3 要因すべてが向上するような低酸素環境を用いた持久的トレーニングプログラムの検証に取り組んできた (図 1)。その結果、赤血球や (RBC) ヘモグロビン (Hb) といった細胞外からの酸素供給能力 (上記) は低酸素暴露のみの刺激によって向上した。低酸素暴露による RBC や Hb の増加は、酸素濃度の低下に伴って低酸素誘導因子である HIF-1 α が細胞内で安定化して核内に移行し、低酸素応答性の遺伝子発現を促すことによって生じる。実際に 1 日に 3 時間の低酸素暴露 (12.0%O₂) を 9 週間継続することによって、RBC や Hb が有意に増加した (図 2)。筋細胞内での酸素運搬および利用能力 (上記と) は通常酸素環境での持久的 TR によって向上した。持久的 TR

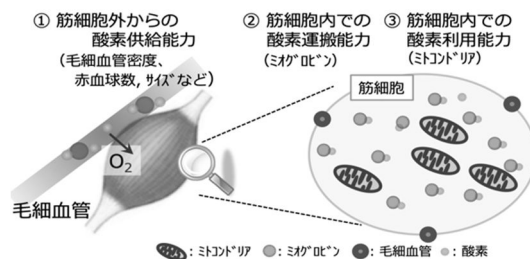


図1. 骨格筋有酸素代謝能力を規定する3要因

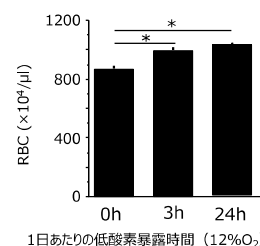


図2. 9週間の低酸素暴露が赤血球 (RBC) 数に及ぼす影響 (*: p < 0.05)

によるミトコンドリア量の増加は、ミトコンドリア生合成の鍵因子である PGC-1 α の増加や活性化によってもたらされる (Egan and Zierath, 2013)。その一方で、低酸素環境を用いた持久的 TR の場合には、低酸素環境下での持久的 TR (15.4%O₂) であっても、常酸素環境下での持久的 TR 後に 3 時間低酸素暴露 (12%O₂) を行った場合であっても、図 1 中の①~③のいずれにも TR 効果が認められなかった (図 3)。つまり、低酸素暴露や、常酸素環境下での持久的 TR による刺激はそれぞれ単独の刺激因子として用いた場合には図 1 中の①~③のいずれかの要因を向上させるものの、両因子による刺激を同時、または連続的に行った場合には既述の効果が消失してしまう可能性が示唆された。これらの実験結果を踏まえると、低酸素環境を用いた持久的 TR が持久的競技パフォーマンスの向上に対して本当に有用であるのかについて疑念を抱かざるを得ない。そこで本研究では、低酸素環境と持久的 TR を併用した場合においても、それぞれの単独刺激によって獲得できる適応がどちらも残存するような TR 方法が存在するのかについて、その解決に取り組んだ。

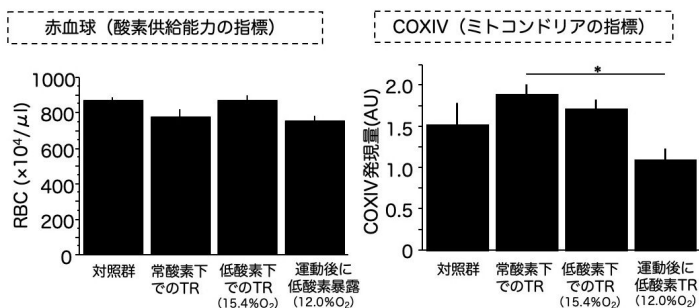


図3. 低酸素暴露と持久的TRの組合せが酸素供給および利用能力に及ぼす影響 (*: p < 0.05). 通常酸素環境下でのTRはミトコンドリア生合成を促進したことが示唆されるものの、低酸素とTRの併用は、酸素供給および利用に影響を及ぼさなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低酸素環境と持久的トレーニングのそれぞれの刺激因子によって引き起こされる適応が、両刺激因子を併用した場合でもどちらも残存する組み合わせ条件が存在するのか否かについて検証を行った。

3. 研究の方法

被験動物は Wistar 系雄性ラットとし、以下の実験を実施した。

(1) 酸素濃度と低酸素暴露時間の様々な組み合わせが骨格筋有酸素性代謝能力に及ぼす影響について

低酸素暴露時間の条件として 1, 3, 6, 24 時間と対照群を含む 5 条件を設定し (この際の酸素濃度は 12.0%O₂ とした)、暴露させる低酸素濃度条件として 20.9%O₂, 17.7%O₂, 15.4%O₂, 12%O₂ の 4 条件を設定し (この際の暴露時間は 3 時間とした) それぞれの刺激条件に対する筋有酸素性代謝に関わる因子の mRNA 応答を検証した。mRNA 発現量の測定には real time PCR 法を用い、腎臓でのエリスロポエチン (Epo) や筋組織での筋有酸素性代謝に関与する因子 (Pgc1 α , Glut1, Cox5a, Mb) を測定対象とした。

(2) 短時間低酸素暴露後の低酸素応答継続時間の検証

3時間低酸素暴露(12%O₂)を行ってから1時間後に解剖を行った群(1h群)、3時間後に解剖を行った群(3h群)、6時間後に解剖を行った群(6h群)、12時間後に解剖を行った群(12h群)、24時間後に解剖を行った群(24h群)に分類した。筋組織(ヒラメ筋)と腎臓を摘出し、real-time PCR法を用いて腎臓でのEpoや筋有酸素性代謝に関する因子のmRNA発現量を測定した。

(3) 低酸素暴露と持久的運動トレーニングの組み合わせが骨格筋有酸素性代謝能力に及ぼす影響について

持久的TRと低酸素暴露を同時や連続的に実施すると酸素供給能力やミトコンドリア生合成の変化が抑制される。両刺激因子の併用によるこのような変化を生じさせないためには、各因子による刺激を十分な時間間隔を空けてそれぞれ実施すれば、併用しても各刺激因子を単独で用いた際の適応が維持されるかもしれない。そこで、被験動物をコントロール群(Con群)、1日おきに低酸素暴露(12%O₂で3時間)を実施する群(Hyp群)、1日おきに1日2回持久的TRを実施する群(Tr群)、低酸素暴露と持久的TRを交互に実施する群(Hyp+Tr群)に分類した。Hyp+Tr群においては、それぞれの刺激を交互に行う時間間隔はおおよそ24時間とした。運動トレーニング期間は9週間とした。運動様式にはトレッドミルを用いた強制ランニングを用い、運動時間は最大で60分、走行速度は最大で30m/min、斜度は5°に固定した。各トレーニング期間終了後に解剖を実施し、血液成分(Hb、RBC)やミトコンドリア関連タンパク質、ミオグロビンのタンパク質発現量をウェスタンブロッティング法によって測定した。

4. 研究成果

(1) 酸素濃度と低酸素暴露時間の様々な組み合わせが骨格筋有酸素性代謝能力に及ぼす影響を検証したところ、筋組織においては最も条件の厳しい12%O₂での暴露であっても24時間までの暴露時間では上記因子のmRNA応答に顕著な変化は認められなかった。その一方で、腎臓では赤血球産生に重要なエリスロポエチンのmRNA発現が、12%O₂の低酸素環境下であれば3時間以上の暴露によって増加した。したがって、短時間で十分な低酸素応答を引き起こすためには、少なくとも12%O₂よりも厳しい酸素濃度条件で少なくとも3時間の暴露時間を設ける必要があることが示唆された。

(2) 3時間低酸素暴露後の低酸素応答継続時間を検証したところ、腎臓におけるEpo mRNA発現量は低酸素暴露後1時間目において有意に増加し、3時間目以降においては発現量が安静時と同様の発現量となった(図4)。その一方で、ヘキソキナーゼII(HKII)やPgc1 α mRNA発現量は低酸素暴露1時間後に発現量が減少したものの、3時間後や6時間後での発現量は安静時の発現レベルにまで戻っていた。これらはいずれも低酸素刺激に応答する因子でありながら、Epo mRNAとそれ以外のmRNAとで異なった動態を示したことは、低酸素応答を担うHIFのサブタイプのはたらきの違いによるのかもしれない(Jaskiewicz et al., 2022; Chen et al., 2016)。その一方で、骨格筋組織においては、測定したPgc1 α やクエン酸合成酵素(CS)、Mb、HKIIのmRNA発現量には低酸素暴露後24時間以内において有意な変化は認められなかった。以上のことから、12%O₂での3時間低酸素暴露後の低酸素応答は筋組織においては顕著には生じず、腎臓においても低酸素暴露6時間後には安静時状態と同じ状態にまで戻ることが示唆された。

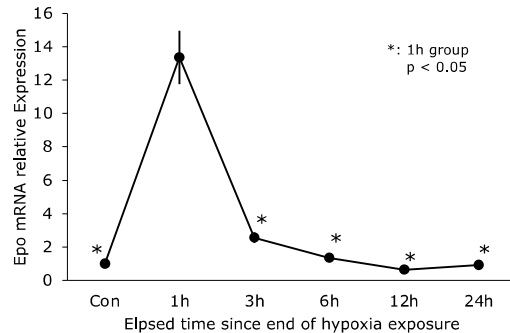


図4. 3時間の低酸素暴露後における常酸素環境下でのEpo mRNA発現量の経時的変化について

(3) 持久的TRと短時間の低酸素暴露刺激を十分な時間間隔を空けて交互に実施する運動プロトコルが、骨格筋の有酸素性代謝能力に及ぼす影響について検討した。有酸素性能力を評価する指標として、ミトコンドリア量とその生合成に関わるCSやPGC-1 α 、筋細胞内の酸素運搬に寄与するMbのタンパク質発現量、血液成分(HbやRBC)を評価した。Mb発現量に関しては、Hyp+Tr群の発現量がHyp群のそれと比較して増加傾向が認められた。Mbは低酸素の刺激だけでは増加せず(Shin et al., 2016)、低酸素と持久的TRと

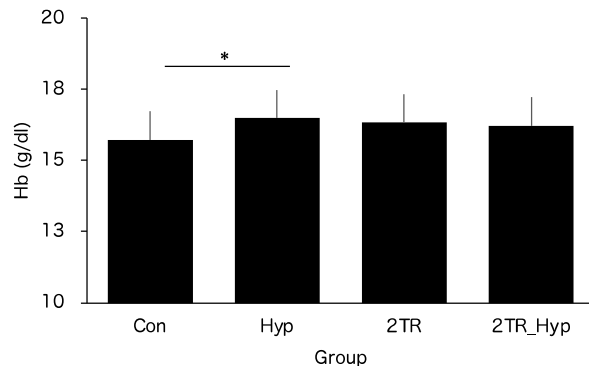


図5. 低酸素暴露と持久的トレーニングの交互実施がヘモグロビン濃度に及ぼす影響について (*: p < 0.05)

組み合わせることによって増加することが報告されているため (Vogt et al., 2001) 時間間隔を空けたとしても、低酸素暴露と持続的 TR を併用することによって増加する可能性が考えられた。また、PGC-1 α 発現量については、Tr 群の発現量が Con 群のそれと比較して増加傾向が認められた。これは、1 日おきの 1 日 2 回の持続的 TR を実施するとミトコンドリア酵素量が増加するという先行研究と応答の方向性が一致している (Wee et al., 2008)。このことから、1 日 2 回の持続的 TR は筋有酸素性代謝能力を向上させることが期待できた。しかしながら、PGC-1 α 発現量の傾向とは異なり、その下流に当たるミトコンドリアタンパク質の 1 つである CS 発現量の増加は認められなかった。この結果の相違については今後検証を進めていく必要がある。また、血液成分については、Hyp 群での Hb 濃度が Con 群のそれと比較して有意に増加した一方で、RBC については全ての群間で有意な差は認められなかった (図 5)。したがって、Hb 濃度の変化については低酸素暴露のみであれば 1 日おきでの刺激であっても適応が生じる可能性が認められた。

持続的 TR と 3 時間低酸素暴露刺激を十分な時間間隔を空けて交互に実施する TR 方法は、想定したような変化をもたらさなかった。本研究では持続的 TR か短時間の低酸素暴露のどちらかの刺激のみであっても、ヘモグロビン濃度にしか変化が認められなかったため、今後は低酸素暴露と持続的 TR のプロトコルを再検討した上で、それぞれの刺激方法が筋の有酸素性代謝能力を担ういずれかの因子に抑制効果をもたらさないような低酸素環境と持続的 TR の組み合わせ方法を検討していく必要があると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| 1. 著者名 Takakura H, Yamada T, Furuichi Y, Hashimoto T, Iwase S, Jue T and Masuda K | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Muscle immobilization delays the abrupt change in myoglobin saturation at the onset of muscle contraction. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Phys Fitness Sports Med | 6. 最初と最後の頁 87-96 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7600/jpfsm.11.87. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 1. 著者名 Tsuchiya Y, Takakura H, Osawa S, and Izawa T | 4. 巻 658 |
| 2. 論文標題 Impact of high-intensity interval training on tendon related gene expression in rat Achilles tendon. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun | 6. 最初と最後の頁 116-121 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.03.076. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1. 著者名 Tsuchiya Y, Takakura H, Osawa S, and Izawa T | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 High-intensity interval training enhances mRNA expression of IGF1Ea in rat Achilles tendon. | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Biology Reports | 6. 最初と最後の頁 374 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-024-09306-x. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|--------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高倉久志, 大澤晴太, 見目大悟, 須藤みず紀, 安藤創一, 井澤鉄也 |
| 2. 発表標題 酸素濃度と低酸素暴露時間の様々な組み合わせが骨格筋への酸素供給能に及ぼす影響について. |
| 3. 学会等名 日本運動生理学会第30回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高倉久志 |
| 2. 発表標題 骨格筋有酸素性代謝能力を効果的に向上させるための低酸素環境を利用した運動トレーニング方法の検証. |
| 3. 学会等名 第34回呼吸研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高倉久志 |
| 2. 発表標題 有酸素性代謝能力を効果的に向上させるための低酸素環境を用いた運動トレーニング方法の検証. |
| 3. 学会等名 第9回骨格筋生物学研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高倉久志, 上羽真保, 大澤晴太, 見目大悟, 山口佐智子, 井澤鉄也 |
| 2. 発表標題 水泳トレーニングとカテキン・カフェイン含有高脂肪食摂取の組み合わせが白色脂肪細胞のベージュ化に及ぼす影響について. |
| 3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 高倉久志, 上羽真保, 大澤晴太, 見目大悟, 山口佐智子, 井澤鉄也 |
| 2. 発表標題 水泳トレーニングとカテキン・カフェイン摂取の組み合わせがミトコンドリア生合成に及ぼす影響について. |
| 3. 学会等名 第31回日本運動生理学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 Hisashi Takakura, Kojiro Ishii |
| 2. 発表標題 The effect of combined endurance exercise training and hypoxia exposure on oxidative capacity in skeletal muscles. |
| 3. 学会等名 The 101st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 同志社大学スポーツ健康科学部 高倉研究室 https://sites.google.com/view/takakuralab/ |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

| | | |
|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | | |
| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|