

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26560353

研究課題名(和文)筋肥大を目的とした効果的なトレーニング法の開発：運動時の吸引酸素濃度に注目して

研究課題名(英文)Effects of hypoxia on skeletal muscle hypertrophy

研究代表者

宮本 直和 (MIYAMOTO, NAOKAZU)

鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・准教授

研究者番号：20420408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、骨格筋細胞を低酸素環境へ暴露することが筋形成にどのような影響を及ぼすのかについて検討した(研究1)。研究2では、研究1の結果に基づき、低酸素環境下でのレジスタンストレーニングの有用性を人間生体を対象に検討した。研究1の結果、シビアな低酸素環境では筋分化が遅延もしくは減弱するのに対し、マイルドな低酸素環境下では骨格筋線維の肥大が観察された。研究2の結果、適切な低酸素環境であれば、レジスタンストレーニングの負荷(強度・回数)は変わらなかった。

研究成果の概要(英文)：We first examined how exposure of skeletal muscle cells to hypoxic environment affects muscle differentiation (Study 1). In Study 2, based on the results of Study 1, we examined the usefulness of resistance training under hypoxic environment to muscle hypertrophy in human in vivo. In Study 1, muscle differentiation was delayed or inhibited under a severe hypoxic condition, whereas hypertrophy of skeletal muscle fibers was observed under a mild hypoxic condition. In Study 2, resistance training load (load and repetition) was not changed in an appropriate hypoxic condition.

研究分野：トレーニング科学

キーワード：低酸素 筋肥大 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

瞬発系やコンタクト系競技種目のアスリートにとって、効果的に筋量を増大(筋肥大)させるレジスタンストレーニングのプログラム開発が有益であることに疑う余地はない。また、超高齢社会となった日本では、サルコペニアやロコモティブシンドロームが問題となり、筋肥大および筋力の向上は重要事項であり、その効果的な方法の開発は急務の課題である。

近年、「加圧トレーニング」や「スロトレ」など、従来よりも軽い負荷を用いたトレーニングにおいても筋肥大が生じることは報告されているが、従来の高負荷(最大挙上重量の約70~80%以上の負荷)によるトレーニング法以上に筋肥大効果が見込めるわけではなく、筋肥大を目的としたトレーニング法は数十年間変わっていない。

一方、我々は、レジスタンス運動中の骨格筋内の酸素化レベルが低いと、そのトレーニングによる筋肥大率が大きくなることを明らかにした(Miyamoto et al. 2013)。骨格筋内の酸素化レベルが低くなるような高強度の運動では、筋中(および血中)の乳酸濃度は高い状態になるが、骨格筋培養細胞を用いた実験においては、筋細胞に乳酸を添加することにより、筋の増殖や分化に關与する転写因子遺伝子の発現が増加することが知られている(Hashimoto et al. 2007)。また、低酸素環境シミュレータを用いた研究によると、低酸素環境下(低濃度の酸素吸引)では、運動時の動脈血酸素飽和度は通常酸素環境下に比べ大きく低下し、血中乳酸濃度は通常酸素環境下に比べ高くなる。これらの結果は、低酸素環境下での運動は、筋内の酸素化レベル低下および筋中乳酸濃度上昇、すなわち、筋肥大を惹起する筋内環境に繋がると考えられる。

また、骨格筋細胞への低酸素刺激は、筋分化や筋肥大を抑制する作用を有するMyostatin(ミオスタチン)を増加させることにより、筋萎縮を誘導する可能性が示唆されている(Hayot et al. 2010)。このことから低酸素刺激は筋の萎縮を誘発する可能性がある。一方で、低酸素刺激によって誘導される転写因子であるhypoxia-inducible factor-1a(HIF-1a)がMyosin Heavy Chain(MHC:ミオシン重鎖)の肥大を誘導しているとする報告もあり(Ono et al. 2006)、低酸素刺激が筋の肥大を誘発する可能性もある。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず、骨格筋細胞を低酸素環境へ暴露することが筋形成にどのような影響を及ぼすのかについて検討することを目的とした(研究1)。この検討は2種類の低酸素環境条件で行った。また、研究1の結果に基づき、低酸素環境下でのレジスタンストレーニングの有用性を人間生体を対象に検討

することを第2の目的とした(研究2)。

## 3. 研究の方法

### ・培養細胞および培養方法

マウス由来C2C12骨格筋細胞を使用した。先駆研究(Higashide et al. 2013)にならう、細胞は5%CO<sub>2</sub>・37℃の環境に維持されたCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養を行った。C2C12骨格筋芽細胞は10%ウシ胎児血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)により培養した。90-100%confluentになった後、2%ウマ血清を含んだDMEMに取り替えた。低酸素群はシビア群とマイルド群の2種類とし、通常酸素群と合わせ、計3条件の比較を行った。DMEMは2日に1回の交換を行った。骨格筋細胞は0、2、4、6日目に回収を行った。

### ・ウエスタンブロッティング

保存したサンプルを氷上で融解させ、等量のサンプルを10μlずつSDS-PAGEゲルにアプライし、0.04Aで電気泳動を行った。電気泳動終了後トランスファー装置を用いて、ゲル上のタンパク質をポリフッ化ビニリデン膜に100Vの電圧で1時間転写した。転写の際には、メンブレンをメタノールに20秒間浸透させた後、トランスファー溶液に20分浸透させ、ゲルをトランスファー溶液に10分以上浸透させた。転写終了後、メンブレンをBlocking oneによって25分のブロッキングを行った。その後、適切な処理等を行った上で、種々のタンパク質の発現を検出した。検出した標本タンパク質のバンドはImage Jを使用して解析を行った。

### ・免疫染色

免疫染色法を行うために、上述の培養方法に加えて、細胞をカバーガラス上で培養を行った。分化誘導をかけた日を0日目と数えてから、6日目のC2C12細胞を用いた。細胞の培地を除去し、500μlずつ3.7%PFA/PBSに15分浸透させ、PBSで5分間、3度洗浄した。その後、適切な処理を行い、解析を行った。ミオシン重鎖の太さは、十分に分化が行われている両端と中心付近の計3点を測定し(図1)、平均値を計測した。

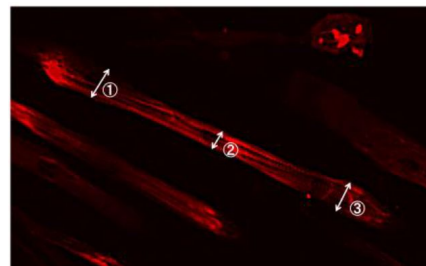


図1 免疫染色法によるミオシン重鎖の太さの測定方法の典型例

十分に分化されている筋線維の両端と中心付近を計測し、平均値を代表値として用いた

#### 4. 研究成果

細胞回収を行う際、それぞれの日数における細胞の状態を顕微鏡を用いて観察した。いずれの条件においても、培養を行った日数を重ねるごとに筋芽細胞が分化していく様子が確認された。通常酸素群においては、2日目においていくつかの細胞が結合していく様子が確認できた。4日目以降においては非常に長い筋線維が確認された。シビア低酸素群においては、4日目以降に長い筋線維が確認されたが、通常酸素群の筋線維と比較すると、分化の進行が遅れることが見てとれた(図2)。免疫染色法を用いて、分化誘導6日後の骨格筋細胞のミオシン重鎖を染色し、筋線維の太さを計測したところ、ミオシン重鎖は通常酸素群に比べシビア低酸素群で有意に細かった ( $P < 0.05$ )。

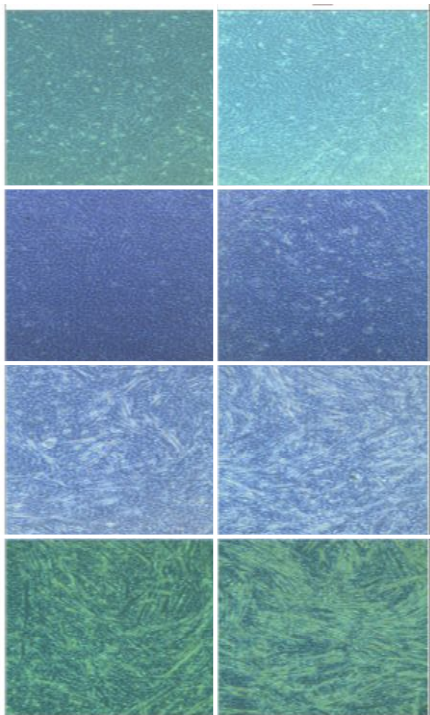


図2 シビア低酸素群(左列)と通常酸素群(右列)の顕微鏡観察下での比較

上から順に、0日目、2日目、4日目、6日目

一方、通常酸素群とマイルド低酸素群の比較では、両群とも2日目の時点で筋管の形成が確認され、6日目の時点で長い筋線維が観察された。通常酸素群とマイルド低酸素群を比較すると、2日目の時点で通常酸素群に比べてマイルド低酸素群の分化が進行していることが確認された。また、通常酸素群に対して、太い筋線維を形成していることも見てとれた(図3)。免疫染色法を用いて、分化誘導6日後の骨格筋細胞のミオシン重鎖を染色し、筋線維の太さを計測したところ、ミオシン重鎖は通常酸素群に比べマイルド低酸素群で有意に太かった ( $P < 0.05$ )。

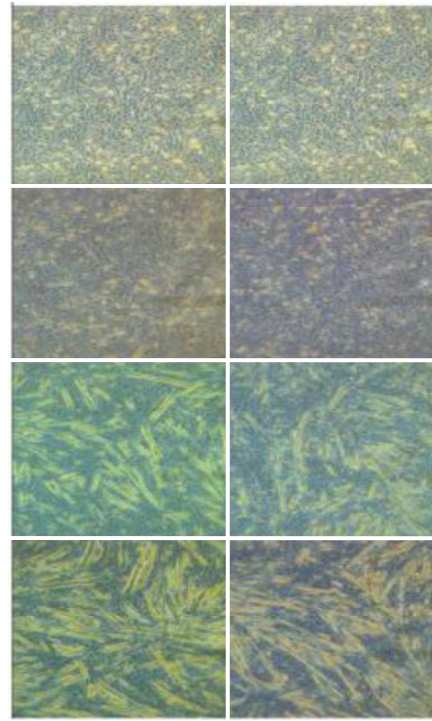


図3 マイルド低酸素群(左列)と通常酸素群(右列)の顕微鏡観察下での比較

上から順に、0日目、2日目、4日目、6日目

通常酸素群とシビア低酸素群の比較、および、通常酸素群とマイルド低酸素群の比較から、マイルドな低酸素環境への暴露によって、C2C12 骨格筋細胞が分化誘導をかけてから6日目の時点で筋線維は太く成長することが示唆される。

また、マイルドな(適切な)低酸素刺激が骨格筋細胞の分化を促進している可能性も示唆される結果を得た。さらに、分化誘導4日後の骨格筋細胞の Myogenin 発現量は、通常酸素群に比べ、マイルド低酸素群において有意に増加した。この結果は、低酸素刺激によって、骨格筋細胞が早期に分化している可能性を示唆している。

本研究は、マイルドな低酸素環境が C2C12 骨格筋細胞の肥大を誘導することを初めて明らかにした研究である。また、マイルドな低酸素刺激が、筋細胞の分化を誘導するシグナルの発現量を増加させたことから、通常酸素環境に比べて低酸素環境が骨格筋細胞を早期に分化させる可能性を示した。

#### <引用文献>

Miyamoto N, Wakahara T, Ema R, Kawakami Y. Non-uniform muscle oxygenation despite uniform neuromuscular activity within the vastus lateralis during fatiguing heavy resistance exercise. *Clinical Physiology and Functional Imaging* 33: 463-469, 2013.  
Hayot M, Rodriguez J, Vernus B, Carnac

G, Jean E, Allen D, ..., Bonniou A. Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. Molecular and Cellular Endocrinology 332: 38-47, 2011.

Ono Y, Sensui H, Sakamoto Y, Nagatomi R. Knockdown of hypoxia inducible factor 1 by siRNA inhibits C2C12 myoblast differentiation. Journal of Cellular Biochemistry 98: 642-649, 2006.

Higashida K, Kim SH, Jung SR, Asaka M, Holloszy JO, Han DH. Effects of resveratrol and SIRT1 on PGC-1 activity and mitochondrial biogenesis: a reevaluation. PLoS Biol 11: e1001603, 2013.

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Takeshi HASHIMOTO, Tomohiko OSAKI. The effect of hypoxia on skeletal muscle characteristic. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017.

〔図書〕(計2件)

宮本直和、南江堂、生理学、(印刷中)

宮本直和、NTS、進化する運動科学の研究最前線、2014、175-183

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://people.nifs-k.ac.jp/mp/>

<http://research-db.ritsumei.ac.jp/Profiles/84/0008321/profile.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宮本 直和 (MIYAMOTO, Naokazu)  
鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・准教授

研究者番号：20420408

##### (2) 研究分担者

橋本 健志 (HASHIMOTO, Takeshi)  
立命館大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70511608

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )