

| | | | |
|-------------|--------------------------|--------------|---------|
| 氏 名 (本籍) | まち だ まさ なお (新潟県) | | |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (体育科学) | | |
| 学 位 記 番 号 | 博 乙 第 2541 号 | | |
| 学位授与年月日 | 平成 23 年 3 月 25 日 | | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 | | |
| 審 査 研 究 科 | 人間総合科学研究科 | | |
| 学 位 論 文 題 目 | 運動による血管新生関連因子の発現動態と炎症の関与 | | |
| 主 査 | 筑波大学教授 | 学術博士 | 西 平 賀 昭 |
| 副 査 | 筑波大学准教授 | 理学博士、博士 (医学) | 武 政 徹 |
| 副 査 | 筑波大学准教授 | 医学博士 | 大 森 肇 |
| 副 査 | 筑波大学講師 | 博士 (体育科学) | 前 田 清 司 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

持久性運動により、骨格筋においてはその持久力を増強するため、毛細血管密度の増加、ミトコンドリア容量の増加、速筋から遅筋へのミオシンモーター蛋白質のタイプシフト等が起こることが知られている。本研究は運動による血管新生機序の解明を目指し、研究課題 1 では、一過性運動が血管内皮細胞の増殖のみならず、周皮細胞の離脱や周辺組織の分解などにどのように影響を与えるのか、その分子機序を明らかにすることを目的として研究を行った。また、研究課題 2 では、運動による炎症が血管新生を誘導する可能性を検証する研究を行った。

研究課題 1-1 では、一過性運動が、血管内皮細胞の増殖を引き起こす VEGF の発現変化だけでなく、周皮細胞の離脱に関係する Ang-1、Ang-2 や基底膜の分解に関係する MMP-2、MMP-9 の発現変化を与えるかの検討を行った。その結果、一過性運動により VEGF は運動直後に一過的な発現増加を示すと共に、Ang-1 は運動直後と比べ運動終了 3～4 時間後で有意に低下する事が観察された。また、MMP-2 はその発現量には変化が認められなかったものの、MMP-9 は運動 30 分後の群がその他の群と比べ有意に高値を示した。この結果は、一過性運動が VEGF などの増殖因子の発現を通して血管新生における血管内皮細胞の増殖・遊走に影響を及ぼしているだけでなく、Ang-1 の低下による周皮細胞の離脱、MMP-9 の発現増加による基底膜の分解にも影響を及ぼしている可能性を示している。

研究課題 1-2 では骨格筋における HIF-1 α の発現は、安静時には他組織と比べ高レベルで発現する。そして、骨格筋の不活動で低下し、運動では更なる増加は観察できない事を明らかにした。この結果は、筋管において HIF-1 α のタンパク量の増加と核移行の不一致と共に、骨格筋における HIF-1 α の特異的制御機構の存在を示唆するものである。また、運動による VEGF 発現への HIF-1 の関与は、タンパク量の増加ではなく、核移行が重要な役割を担う事を示唆した。

研究課題 1-3 では筋線維内の VEGF mRNA は低酸素、ionomycin、non-Glucose による処理で増加し、高濃度の乳酸処理により低下した。この結果は、運動により引き起こされる VEGF の増加には筋線維内の酸素濃度の低下、カルシウムイオンの分泌による筋活動、ATP:ADP 比の低下が影響を及ぼす反面、高濃度の乳酸は VEGF を抑制する事を示している。

研究課題1の結果から、骨格筋には骨格筋特異的な VEGF 発現機序が存在する事が考えられる。特に、HIF-1 を経由するものは先行研究からもその可能性が高い。Stroka らは、研究課題1-2と同様に常酸素環境下でも骨格筋でのみ低酸素環境と変わらない HIF-1 α の発現を報告している (Stroka *et al.*, 2001)。また、研究課題1-2では分化前の C2C12 は HIF-1 α のタンパクの増加と核移行が同時に観察されるが、分化後の C2C12 は核移行とタンパクの増加が同時には起こらない事を確認した。加えて、Kubis らは、コバルト処理では核移行しない HIF-1 α が低酸素刺激により核移行する事を報告している (Kubis *et al.*, 2005)。分化後の HIF-1 α が核移行を阻害されている機序は不明であるが、恐らくこの HIF-1 α の核移行阻害機序及び分解抑制機序が骨格筋における VEGF の骨格筋特異的発現機序解明のカギになるのではないだろうか。Ono らは、C2C12 の HIF-1 α が HSP90 の阻害剤により低下する事を報告し、骨格筋における常酸素環境下での安定化には HSP90 が重要である事を示唆している (Ono *et al.*, 2006)。また、HSP90 には、HIF-1 α の核移行シグナルをブロックする働きがある事も知られており、骨格筋特異的な VEGF の発現はこの HSP90 による HIF-1 α の分解抑制及び核移行抑制効果が一因であるのではないかと考えられる。骨格筋では、運動の急激な増加に対して解糖系による ATP 産生増大により筋活動を維持する事が可能になる。解糖系酵素の部分的な欠損は、骨格筋に筋損傷を引き起こしやすくする事が知られている。骨格筋の解糖系酵素の維持や亢進のために HIF-1 α は他組織よりも素早い反応が求められるために、低酸素環境にならなくともタンパク量が保持できるような機序が存在するのは合目的であると考えられる。研究課題1より、骨格筋における血管新生因子の発現は、一過性運動により血管内皮細胞の増殖だけでなく、周皮細胞の離脱や周辺組織の分解に関わる遺伝子発現が血管新生を促進する方向に変化することが確認された。さらに、血管新生に中心的役割を果たす VEGF は局所的な ATP や酸素分圧の低下や、さらにカルシウムイオン濃度の増加により誘導されることも示唆された。また、血管新生促進因子を標的遺伝子として多く持つ HIF-1 α は骨格筋特異的な制御の下、VEGF などの血管新生促進因子の発現を制御する可能性を示唆した。

研究課題2では、持久性トレーニングによる骨格筋の血管新生を含む遅筋化と炎症に関して研究課題2では検討を進め、以下の結果を得た。

研究課題2-1では、一過性の持久性運動により甚大な筋損傷は起こらないものの、骨格筋内におけるマクロファージ数が増加することが確認された。さらに、骨格筋内のマクロファージで、VEGF が発現していることも確認された。この結果は、運動による骨格筋の血管新生の過程において、炎症がその過程を促進する可能性を示している。

研究課題2-2では、抗炎症剤であるイブプロフェンの投与が、自発運動による骨格筋の遅筋化現象にどのような影響を与えるかについて検討した。そして、イブプロフェンの摂取が運動による遅筋化を走行距離非依存的に進行させることを確認した。

研究課題2の結果は、研究課題1と同様に今日まで多く報告されてきた、運動による筋線維からの血管新生促進因子の局所的な発現以外にも、運動が骨格筋への白血球の浸潤を促進し血管新生を促進するという新たな機序の存在を示唆するものである。これらの結果は、筋肥大や筋再生だけでなく、血管新生を含む遅筋化においても炎症は何らかの役割を持つことを示唆する結果である。しかし現時点では、炎症がどのように筋再生、筋肥大、遅筋化を制御しているかの詳細な機序は不明である。炎症と運動効果という問題は、非常に複雑である。炎症の抑制が、運動効果を減弱させるという報告は多くある。実験的に骨格筋に過負荷を与える協働筋切除による筋肥大は、各種の抗炎症剤により抑制されることが、近年報告されるようになった。一方で、全身性の炎症反応を引き起こすような LPS の投与が筋萎縮を惹起することは、既に多く報告されている。今後の研究として、どのような炎症反応が筋肥大を引き起こし、どのような炎症が筋萎縮を惹起するかを検討する研究は、運動の効果を最大限に引き出す上で、非常に重要な研究になるだろう。本研究においても、運動による炎症が血管新生を誘導する可能性を示し、運動による炎症に、血管新生の誘導という新

たな役割があることを示唆する研究となった。ただ、筋肥大と同様に運動による全ての炎症反応が、血管新生を進めるとは限らない。また、生理学的な血管新生は様々な血管新生調節因子が調和の取れた環境の下、それらの発現がコントロールされる必要がある。本研究を契機に、運動による炎症反応と血管新生に関する研究を進め、運動によるどのような炎症が効率よく血管新生を惹起するかという問題を解決しようと考えている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、運動により筋線維から血管新生促進因子が局所的に発現することを確認し、さらに、運動が引き起こす炎症反応が骨格筋への白血球の浸潤を促進し、血管新生も促進するという、新たな機序の存在を示唆するものである。これらの結果は、血管新生を含む遅筋化においても炎症は大きな役割を果たしていることを示唆する結果であり、オリジナリティーが高い研究であると評価された。さらに、専門委員から本研究を機に運動による炎症反応と血管新生に関するさらなる研究を期待する意見がよせられたが、このことは本研究の独創性を少しも損なうものではなく今後の課題として著者には取り組んで欲しい。

よって、著者は博士（体育科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。