高強度持久的トレーニングに対する心筋の分子適応機構の解明 - 分子基盤に立脚したトレーニング指針の作成 -

研究代表者:我妻玲

	目	次
要約		
緒言・・・・・		
材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・		
結果・・・・・		
考察		
参考文献 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
図表・・・・・		

## 研究代表者: 我妻玲

## 要約

長期間にわたる全身持久的トレーニングは、心臓を形態的にも機能的にも変化させる。しかしながら、トレー ニング開始初期の影響については不明な点が多い。そこで本研究では、高強度持久的トレーニングに対する心 筋の分子適応機構の解明を目指して、 一過性の高強度水泳運動に対する心筋の分子適応と 長期間の高 強度水泳トレーニングに対する心筋の分子適応について検討した。一過性の高強度水泳運動は、水温 34-35 に制御された水槽で 30 分間、複数のマウスを同時に泳がせることによって行わせた。長期間の高強度 水泳トレーニングは、上記の水泳運動を2日間行った後1日間休息するのを1サイクルとし3カ月継続した。一 ・過性の高強度水泳運動を行うことによって、心筋組織構造の変化やアポトーシス反応の増大は認められず、 Bax/Bcl-2 発現比率にほとんど変化が認められなかった。さらに、caspase-9 及び caspase-3 の発現が運動開始 15 分後から減少、apaf-1 の発現は運動開始 15 分後に減少、p53 の発現が運動開始 15 分後から減少傾向が認 められた。長期間の高強度水泳トレーニングを行うことによって血管新生に関わる HIF-1α の遺伝子発現量は増 加したが、タンパク質の発現量はむしろわずかな減少傾向を示した。ミトコンドリアの増加に関わる PGC-1α と Sir2/SIRT1も同様の傾向を示した。また、心筋肥大に関与する STAT3 遺伝子及びタンパク質レベルでもその発 現量が低下していた。これらの結果から、一過性の高強度水泳運動を行っても心筋へのダメージはほとんどなく、 アポトーシス経路の活性化も生じないことが示唆された。トレーニング開始初期には疲労困憊に至らないように 休息を上手く取ることによって、十分なトレーニング効果が得られるようになると考えられる。また、長期間の高強 度水泳トレーニングは、HIF-1αやPGC-1α、Sir2/SIRT1、STAT3のタンパク質量を増加させないことが明らかとな った。

緒言

全身持久的トレーニングは、心臓を形態的にも機能的にも変化させる。例えば、水泳トレーニングにより心肥 大(Geenen et al., 1988; Evangelista et al., 2003)や血管新生(Mandache et al., 1973; Ljungqvist & Unge, 1977)、安静時心拍数の減少(Evangelista et al., 2003)や左心室拡張終期容積(Geenen et al., 1988)の増大が 認められる。このようにトレーニングのプラス効果については多くの研究がなされているが、マイナス効果につい てはほとんどなされていない。特にトレーニング開始初期には身体に大きな負荷がかかることが予想され、慎重 なトレーニング馴化計画が必要とされるにもかかわらず、その根拠とすべきデータが十分には存在しない。とトや 動物を使ったトレーニング実験では、安全性を考慮しかつトレーニング効果を最大限に得るために、運動に馴 化させる期間を設定している。したがって、トレーニング開始初期の影響については不明な点が多い。

馴化期間を設定しないで不慣れな運動を行うとどうなるか。とトの骨格筋に伸張性収縮を伴う運動をさせた場 合、遅発性筋肉痛(Armstrong 1984)や筋力低下(Clarkson *et al.*, 1992)、筋損傷を受けた際に漏出する逸脱酵 素であるクレアチンキナーゼ活性の上昇(Clarkson *et al.*, 1992; Nosaka & Clarkson 1992)、プロテアーゼ活性の 上昇(Cannon *et al.*, 1991; Thompson HS & Scordilis 1994)が見られる。動物の骨格筋の場合も同様に、筋力低 下(Warren *et al.*, 1999)やプロテアーゼ活性の上昇(Salminen & and Vihko 1981; Belcastro 1993)が見られる。 さらに、回転ケージを使った自発的運動によっても再生筋線維(Podhorska-Okolow *et al.*, 1998)やアポトーシス 陽性核(Sandri *et al.*, 1995; Podhorska-Okolow *et al.*, 1998)が見られる。これらの報告から、馴化期間を設定し ないで運動を行うと、筋線維が損傷を受け筋力低下が生じる。そして、筋サテライト細胞の活性化、増殖、分化 による修復が行われるものの、アポトーシス反応の増大も生じていると考えられる。心筋の報告例は少ないが、 マウスに疲労困憊まで強制的にトレッドミルでの走運動をさせると、左心室にアポトーシス陽性核が見られる (Huang *et al.*, 2009)ことが報告されている。骨格筋と比較して、心筋は再生能力がきわめて低いため、アポトー シスによる細胞死は、心筋細胞の減少に伴う収縮力の減少による心機能低下を招く可能性がある。

細胞死の形態は大きくアポトーシスとネクローシスに分けられる(Weedon *et al.*, 1979)。ネクローシスは感染や 物理的破壊、化学的損傷、血流減少などが原因で、細胞内小器官の膨大化が起こり、細胞が徐々に膨化する。 次に、浸透圧を制御できなくなり細胞溶解が起こり、炎症を引き起こすなどの特徴を示す病理的な細胞死である。 一方、アポトーシスは発生や免疫、ホルモン作用など生理的現象の発現に重要な役割を演じ、細胞膜構造の変 化、核の凝縮、DNAの断片化、アポトーシス小胞を伴う細胞の分断化などの特徴を示す生理的な細胞死である。 しかしながら近年、虚血性心疾患等での細胞死にアポトーシスが関与することが示され、生理的な細胞死のみ ならず、病的な細胞死においても重要な役割を果たすことが注目されるようになっている。

運動は酸素摂取とミトコンドリア活性を高め、活性酸素を生成する(Alessio *et al.*, 2000)。実際、ラットの骨格 筋に電気刺激を与えて筋収縮を誘発すると、活性酸素が生成される(Delliaux *et al.*, 2009)。活性酸素は、タン パク質、脂質、核酸、DNA、酵素等に酸化障害を与えて細胞機能を低下させるだけでなく、アポトーシスを誘導 することでも知られている。しかしながら、生体には活性酸素を除去する防御システムが備わっており、生理的な 条件下では酸化的ストレスから生体を保護している。しかもこの防御システムは、トレーニングにより強化されるこ とが報告されている。例えば、ラットにトレッドミル走によるトレーニングを 8 週間行うと、活性酸素種の消去系酵 素であるミトコンドリア型スーパーオキシドジスムターゼ(MnSOD)やアポトーシス抑制効果を持つ分子シャペロ ンの一つである熱ショックタンパク質(HSP70)、抗アポトーシス調節因子である Bcl-2 の発現が増加する(Siu *et al.*, 2004)。このように全身持久的トレーニングによって防御システムは強化されるが、トレーニング開始初期に は既存の防御システムが酸化ストレスに対応しきれず、細胞にダメージを与えるかもしれない。

そこで本研究では、高強度持久的トレーニングに対する心筋の分子適応機構の解明を目指して以下の二つ

の実験を行った。 一過性の高強度水泳運動に対する心筋の分子適応について調べた。特に、アポトーシス 反応について、TUNEL法による組織レベルでの検出および抗アポトーシス調節因子とアポトーシス促進因子の 発現パターンについて検討した。 長期間の高強度水泳トレーニングに対する心筋の分子適応について調べ た。特に、心肥大や血管新生、ミトコンドリア増大に関連する遺伝子・タンパク質の発現について検討した。

### 材料と方法

## 実験動物

12週齢C57BL/6 (B6) 雄性マウスを実験に用いた。水と飼料(日本クレア製飼育繁殖固形飼料)は自由摂取 とし、12時間の明暗サイクルの照明下で温度20-25 に常時維持した飼育室において飼育した。運動を行わせ ないコントロールグループと運動グループの2グループに分けた。動物実験の施行にあたっては、「研究機 関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第71号)、および日本学術会議によりま とめられた「実験動物の適正な実施に向けたガイドライン」を遵守した。

#### 水泳運動

#### [一過性の高強度水泳運動]

水泳運動は、Ueno ら (1997)の方法に従った。水温 34-35 に制御された水槽で 30 分間、複数のマウスを 同時に泳がせた。運動グループでは運動中 15 分後、運動終了直後(30 分後)、60、180、360、1440 分後に心 筋を摘出した。

#### [長期間の高強度水泳トレーニング]

水泳運動を 2 日間行った後 1 日間休息するのを 1 サイクルとし 3 カ月継続した。急性の運動影響を避けるため、運動終了 24 時間後にサンプリングを行った。

## 免疫組織化学染色

ジエチルエーテル(吸入投与)による麻酔を行い、頚椎脱臼によりマウスを安楽死させた。胸骨突起から胸部 切開して心臓を摘出し、左右心室を摘出した。心筋標本をTissue-Tek II OCT compound (Miles Lab., Naperville, IL) で包埋し、液体窒素で冷却した 2-methylbutane (isopentane) 内で急速凍結した。Leica cryostat (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL) により凍結切片 (8µm) を作製した。切片を3.8%のパラフォルムアルデヒ ド(Wako Chemicals Inc., Tokyo)で5分間固定後、リン酸緩衝食塩水 (PBS) でよく洗浄した後、ラビット抗ヒト dystrophin ポリクローナル抗体 (diluted 1:1000; Abcam, Inc., Cambridge, MA)、Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG 抗体 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) を用いて免疫組織化学染色を行った。さらに Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) にて核染色を行った。また、同様に作製した凍結切片に対してヘマトキ シリン・エオジン染色を施行した。

## アポトーシスの検出

凍結切片 (8µm) を作製し、3.8%のパラフォルムアルデヒドで 30 分間固定後、PBS でよく洗浄した後、*In situ* Apoptosis Detection Kit (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga) により断片化した DNA をもつ核を検出した後、 propidium iodide (Sigma-Aldrich) で核染色した。蛍光顕微鏡で観察した。Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法はターミナルトランスフェラーゼ (TdT) を用い

て、アポトーシスを起こした細胞の断片化 DNA の遊離 3'-OH 末端にフルオレセイン-dUTP を高感度にかつ特 異的に標識した後、直ちに蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーで検出する方法である (*In situ* Apoptosis Detection Kit manual より)。

## Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

心筋組織を液体窒素内で急速凍結した後、ステンレス製乳鉢で粉砕した。TRI reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) により Total RNA を抽出し、First-strand cDNA Synthesis System for Quantitative RT-PCR (Marligen Bioscience, Inc., Ijamsville, MD) により cDNA を合成した。1/10 量の cDNA を用いて TaKaRa RNA PCR™ Kit (AMV) ver.3.0 (Takara Bio Inc.) により PCR を行った。Bcl-2、Bax、p53 (RTPrimerDB, http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/)、caspase-3 (Zandy *et al.*, 2005)、 caspase-9 (O'Driscoll *et al.*, 2006), apaf-1 (Honarpour *et al.*, 2001)、survivin (Jiang *et al.*, 2004)、Sir2/SIRT1 (Saban *et al.*, 2006)、MnSOD (Guo *et al.*, 2003)、gp130 (Sriram *et al.*, 2004)、STAT3 (Hart *et al.*, 2004), HIF-1α (Simpson *et al.*, 2000)、VEGF (Shih *et al.*, 2002)、PGC-1α、PGC-1β (Wiwi *et al.*, 2004)、GAPDH (Krüger *et al.*, 2001) のプライマーの合成はつくばオ リゴサービス株式会社に依頼した。PCR 産物を 12%のポリアクリルアミドを用いて電気泳動し、ethidium bromide (Sigma-Aldrich) にて染色後 UVトランスイルミネーターで可視化し、デジタルカメラで記録した。バンドの定量は, 解析ソフトとして汎用されている画像解析ソフト Image J ver. 1.42 (http://rsb.info.nih.gov/ij/) を用いて行った。

#### sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) とイムノブロット

心筋組織を液体窒素内で凍結させながらステンレス製乳鉢で粉砕し、SDS-PAGE サンプルバッファー[0.125 mol/L Tris/HCl buffer, pH 6.4, 10% glycerol, 4% SDS, 4 mol/L urea, 10% dithiothreitol, and 0.001% bromophenol blue (pH 6.8)] (Anderson & Davison, 1999) に溶解した。タンパク濃度はウシ血清アルブミンを標準として、BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce Inc., Rockford, IL)で測定した。Laemmli の方法(1970) に従いサンプルを SDS-PAGE により分離した後、Towbin (1979) らの方法を用いて PVDF 膜に転写した。一次抗体はラビット抗とト STAT3 ポリクローナル抗体 (diluted 1:2000; Signalway Antibody Co. Ltd., Pearland, TX)、ラビット抗とト pTyr705-STAT3 ポリクローナル抗体 (diluted 1:2000; Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC)、PGC-1α (diluted 1:2000; Chemicon, Inc., Temecula, CA)、ラビット抗とト Sir2/SIRT1 ポリクローナル抗体 (diluted 1:3000; Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO)、ラビット抗マウス HIF-1α ポリクローナル抗体 (diluted 1:5000; Epitomics, Inc., Burlingum CA)を使用した。二次抗体は Alexa Fluor 680 goat anti-rabbit IgG 抗体 (Invitrogen, Inc.)を使用した。 パンドの可視化は DyLight 680/800 Western Blotting Kit を用いて、蛍光イメージング Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) により行った。

## 統計処理

実験結果は平均 ± 標準誤差で表示した。統計的有意差の検定は、Mann-Whitney U-test、Student's unpaired t-test、one-way analysis of variance (ANOVA), least significant difference (LSD) *post hoc* test を行った。全ての 検定において有意水準は 5% とした。

### 結果

#### 一過性の高強度水泳運動の心筋組織への影響

光学顕微鏡レベルではコントロールおよび一過性の高強度水泳運動による形態的な異常所見は認められな かった。また、心筋細胞膜の完全性が保持されているかどうか筋細胞膜直下に存在する筋細胞膜裏打ちタン パク質であるジストロフィンの局在を指標に検討したところ、その局在に異常所見は認められなかった(data not shown)。Figure 1に心筋組織切片のTUNEL法によるアポトーシス反応検出像を示す。コントロール(2.1 ± 0.2/field)および一過性の高強度水泳運動(1.7 ± 0.5/field)によるアポトーシス反応に有意差は認められなかっ た。

一過性の高強度水泳運動によりアポトーシス反応の増加が観察されないことから、次に、抗アポトーシス因子 およびアポトーシス促進因子の運動中および運動後のmRNAの発現レベルをRT-PCR法により検討した。Figure 2にBcl-2とBaxの発現レベルの結果を示す。Bcl-2はアポトーシスを強力に抑制し、細胞死抑制に機能している タンパク質であることで知られる。Bcl-2の発現レベルは、運動中および運動後1440分までコントロールレベルに 対して10-25%の減少した状態が継続した。一方、Baxはアポトーシスの調節に関与しており、ホモダイマーもしく はBcl-2とヘテロダイマーを形成し、アポトーシスを促進する作用を持つことで知られる。Baxの発現レベルは、運 動中および運動後60分までコントロールレベルに対して15 30%の減少した状態が継続し、運動後180分には一 過性にコントロールレベルよりも10%増加するが、運動後1440分後にはコントロールレベルに回復した。Baxと Bcl-2の発現比率がアポトーシス刺激に対する細胞生死の運命を決定すると報告されているので、Bax/Bcl-2の 発現比率を算出したところ、運動直後(Bax/Bcl-2 = 0.85)に落ちるが、運動180、360、1440分(Bax/Bcl-2 = 1.39、 1.15、1.23)分後ではわずかに上昇傾向を示した。

caspaseは、アポトーシスの誘導の比較的初期に関わるイニシエータータイプと、アポトーシスの実行そのもの に関わるエフェクタータイプの2つに大別される。イニシエータータイプには、caspase-8、-9などが該当し、アポト ーシスのシグナル伝達経路の上流からの開始シグナルを受け取って活性化され、不活性型のエフェクターを活 性化する役割を持つ。エフェクタータイプには、caspase-3、-7などが該当し、イニシエータータイプのcaspaseなど によって活性化され、細胞内の他のタンパク質を分解してアポトーシスを起こさせることで知られる。Figure 3に caspase-3とcaspase-9の発現レベルの結果を示す。caspase-3の発現レベルは、運動中および運動後1440分まで コントロールレベルに対して10 30%の減少した状態が継続した。一方、caspase-9の発現レベルは、運動中およ び運動後もコントロールレベルに対して40 70%の減少した状態が継続した。

Figure 4にapaf-1とsurvivinの発現レベルの結果を示す。Baxを介してミトコンドリアの膜電位が低下して、ミトコンドリアから細胞質内へのチトクロムCの遊離が起こり、チトクロムCに結合したapaf-1はATP/dATP存在下でアポトソームを形成する。アポトソームはcaspase-9と結合して、caspase-3を活性化し、アポトーシスを誘導するといわれている。apaf-1の発現レベルは、運動中15分にはコントロールレベルに対して75%減少するが、運動直後および180分後までにその発現レベルは、コントロールレベルの80%まで回復する。しかしながら、運動1440分後でもコントロールレベルに対し30%減少していた。一方、survivinはアポトーシスを阻害するタンパク質で,細胞周期のG2/M期で発現し,有糸分裂の開始時に,紡錘体の微小管に作用する。survivin と微小管の相互作用の均衡が崩れると,survivinの発現レベルは、運動中および運動後もコントロールレベルに対して80 90%の減少した状態が継続した。

Figure 4にp53とSir2/SIRT1の発現レベルを調べた結果を示す。p53はDNAが修復不可能な損傷を受けた場合に、アポトーシスを誘導するタンパク質である。p53の発現レベルは、運動中および運動後もコントロールレベ

- 5 -

ルに対して30-40%の減少した状態が継続した。一方、Sir2/SIRT1はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存 性ヒストン脱アセチル化酵素であり、SIR2を強制発現させた細胞ではp53の転写活性の抑制が観察されている。 Sir2/SIRT1の発現レベルは、運動中および運動後もコントロールレベルに対して70-90%の減少した状態が継続 した。

#### 長期間の高強度水泳トレーニングの心筋組織への影響

コントロールでは、実験開始前後で統計的に有意な体重増加(10%)が認められたものの、高強度水泳トレー ニングでは認められなかった(3%)。また、心室重量は増加傾向(Control, 133.3 ± 3.1; Training, 138.0 ± 2.0)を 示したが、有意差は認められなかった。心室重量と体重の比率は、統計的に有意な増加(Control, 4.9± 0.1; Training, 5.2 ± 0.1)が認められた。

MnSOD はミトコンドリア特有のスーパーオキサイドを処理する酵素として知られる。MnSOD の発現レベルは、 コントロールレベルに対して 3 倍増加していた。HIF-1α は HIF-1β とヘテロダイマーを形成し、血管新生や細胞 増殖、糖代謝、pH 調節やアポトーシス等の遺伝子制御に関与している。VEGF は HIF-1 のターゲット遺伝子で あり、血管新生を制御する成長因子である。HIF-1αの発現レベルは、コントロールレベルに対して 1.2 倍増加し ていたが、VEGF の発現レベルには有意差を認められなかった (Figure 5.)。

PGC-1 はペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPARγ) コアクチベーターであり、転写因子 PPARα、 PPARγ、および他の転写調節因子と協調的に働き、ミトコンドリア増加に関与する。PGC-1αとPGC-1βの発現レ ベルは、コントロールレベルに対してそれぞれ 1.1 および 5 倍増加していた。Sir2/SIRT1 は p53 を介したアポト ーシス制御だけでなく、PGC-1α の活性化を介してミトコンドリアの量を増加させるともいわれている。Sir2/SIRT1 の発現レベルは、コントロールレベルに対して 4 倍増加していた(Figure 5.)。

Interleukin-6(IL-6)ファミリーは gp130 受容体サブユニットを介して転写因子である STAT3 を介するシグナル 伝達経路を活性化し、心肥大に関与するとされている。STAT3 の発現レベルは、コントロールレベルの 1/4 に減 少していた。一方、gp130 の発現レベルは、コントロールレベルに対して 1.6 倍増加していた(Figure 5.)。

Figure 5 に長期間の高強度水泳トレーニングによるタンパク質発現の変化を示す。STAT3 および pTyr705 STAT3 の発現レベルは、コントロールレベルの 1/5 に減少していたが、pTyr705 STAT3 とSTAT3 の比率には有 意差は認められなかった。HIF-1α と PGC-1α、Sir2/SIRT1、の発現レベルは、それぞれ 15%、35%、35%減少し た。

#### 考察

### 一過性の高強度水泳運動の心筋組織への影響

本研究では、一過性の高強度水泳運動を行うことによって、酸化ストレスを防御する機能が十分でないために 心筋組織にダメージがあるのではないかと仮定したが、心筋組織の構造変化やアポトーシス反応の増大は認め られなかった。このことは既存の防御システムが一過性の運動性酸化ストレスから心筋組織を保護していると考 えられる。しかしながら、近年、疲労困憊まで運動を行わせるとアポトーシス反応の増大が認められることが報告 されている。マウスに疲労困憊まで強制的にトレッドミルでの走運動をさせると、心筋組織の構造変化に変化を 伴うことなく左心室にアポトーシス陽性核が見られる(Huang *et al.*, 2009)。彼らは、Bax/Bcl-2 発現比率に変化 が見られないものの、cytochrome C や cleaved caspase-3、cleaved poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)の 増大を報告している。つまり、cytochrome C の増加が caspase-3 を活性化して、caspase-3 の基質である PARP を切断していると考えられ、疲労困憊に至る運動がアポトーシス経路を活性化している可能性が示唆され

る。一方、一過性の高強度水泳運動がアポトーシス反応を増加させないことから、その分子機構を明らかにする ため、抗アポトーシス因子およびアポトーシス促進因子の運動中および運動後の mRNA の発現レベルを検討し たところ、 Bax/Bcl-2 発現比率に大きな変化が認められなかったこと、 イニシエータータイプの caspase-9 及 びエフェクタータイプの caspase-3 の発現が運動開始 15 分後から減少傾向が認められること、 アポトーシスを 誘導する apaf-1 の発現は運動開始 15 分後に大きな減少傾向が認められること、 p53 の発現が運動開始 15 分後から減少傾向が認められることから、一過性の高強度水泳運動はアポトーシス経路を活性化しないと考えら れる。 しかしながら、 アポトーシスを阻害するタンパク質である survivin の発現にも運動開始 15 分後から減少傾 向がみられた。survivin は、癌細胞で高度に発現しているのに対し、完全に分化した細胞ではほぼ発現が見ら れないことから、正常組織での役割については不明な点が多い。しかしながら、一過性の高強度水泳運動によ り、survivin の発現レベルが低下することがアポトーシス経路の活性化につながるかどうか今後検討したい。本 研究ではタンパク質レベルでの解析をしていないため、既存の抗アポトーシス因子およびアポトーシス促進因子 の挙動については明らかではない。特にイニシエータータイプの caspase-9 及びエフェクタータイプの caspase-3 の活性が運動前後でどのように変化するのか今後検討したいと考えている。これらの結果から、トレーニング開 始初期に、疲労困憊まで身体を追い込むようなトレーニングを行わなければ(通常は行わないと思われる)、心 筋組織の構造変化やアポトーシスといった心筋機能低下に結びつくようなことはないように思われる。しかしなが ら、トレーニング開始初期には不慣れな運動で疲労が蓄積しやすいことから、疲労を溜めることなくトレーニング を行えるように休息をとる必要がある。

## 長期間の高強度水泳トレーニングの心筋組織への影響

Nakao ら(2000)は、6 週間の水泳トレーニングを行った後、水泳トレーニングを行ったマウスと非トレーニング マウスの間に体重差は見られなかったとしている。本研究でも同様の傾向が認められたが、トレーニング開始前 と 90 日後では、非トレーニングマウスで 10%程度の統計的に有意な体重の増加が見られたが、水泳トレーニン グを行ったマウスではトレーニング期間中の体重増加が抑制された。これは、定期的な水泳トレーニングにより エネルギー消費が増大することによって体重増加を抑制したと考えられる。

一般的にトレッドミルを使った走運動よりも水泳トレーニングの方が、心肥大(Geenen *et al.*, 1988; Evangelista *et al.*, 2003)や左心室拡張終期容積の増大を誘発する(Geenen *et al.*, 1988)。Evangelista ら(2003)は、90分間の水泳運動を1日2回で1週間に5回を4週間行うと、20%程度の心肥大が生じると報告している。本研究でも水泳トレーニングにより心室重量に増加傾向(4%程度)が見られたが、統計的な有意差は認められなかった。Evangelista らはマウスを単独で泳がせているため、本研究で行ったグループ水泳との単純な比較はできないが、運動時間や回数、頻度のすべてにおいて本研究よりも多いことから、グループ水泳の運動時間や回数、頻度を増加させることで心肥大を誘発できるかもしれない。

長期間の高強度水泳トレーニングによって、血管新生に関わる HIF-1α の遺伝子発現量は増加したが、タン パク質の発現量はむしろわずかな減少傾向を示した。また、ミトコンドリアの増加に関わる PGC-1α と Sir2/SIRT1 同様の傾向を示した。これは、高強度水泳トレーニングによって遺伝子発現は高進するものの、細胞内にそのタ ンパク質は十分量あることから、翻訳レベルでそのタンパク質量を制御しているのかもしれない。

IL-6ファミリー (IL-6、IL-11、leukemia inhibitory factor (LIF)、oncostatin M (OSM)、ciliary neurotrophic factor (CNTF) and cardiotrophin (CT)-1) が受容体と結合し、さらにgp130と結合することにより、JAK/STAT経路を活性化し、心肥大や細胞保護、血管新生に関わる(Yamauchi-Takihara & Kishimoto 2000)。ラットを長期間にわたって間欠的に低酸素暴露することにより心肥大を起こさせるとIL-6及びSTAT3のタンパク質量が増加すると報告さ

れている(Chen *et al.*, 2007)。本研究では、STAT3の発現レベルについて検討したが、遺伝子及びタンパク質レベルでもその発現量が低下していた。STAT3はTyr705のリン酸化により活性化され、二量体形成と核へ移行し、 ターゲット遺伝子の転写を活性化するが、そのリン酸化STAT3量も低下していた。このことは長期間の水泳トレーニングがJAK/STAT経路を活性化しない可能性を示唆する。しかしながら、トレーニング開始初期における JAK/STAT経路の応答については不明であり、今後検討が必要である。

# 参考文献

Alessio H, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. Med Sci Sports Exer 32: 1576–1581, 2000.

Anderson LV, Davison K. Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. Am J Pathol . 154: 1017–1022, 1999.

Armstrong RB. Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. Med Sci Sports Exerc. 16: 529-538, 1984.

Belcastro AN. Skeletal muscle calcium-activated neutral protease (calpain) with exercise. J Appl Physiol 74: 1381-1386, 1993.

Cannon JG, Meydani SN, Fielding RA, Fiatarone MA, Farhangmehr M, Orencole SF, Blumberg JB, and Evans WJ. Acute phase response in exercise. II. Associations between vitamin E, cytokines, and muscle proteolysis. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 260: R1235-R1240, 1991.

Chen LM, Kuo WW, Yang JJ, Wang SG, Yeh YL, Tsai FJ, Ho YJ, Chang MH, Huang CY, Lee SD. Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats. Exp Physiol. 92: 409-416, 2007.

Clarkson PM, Nosaka K, and Braun B. Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. Med Sci Sports Exerc 24: 512-520, 1992.

Delliaux S, Brerro-Saby C, Steinberg JG, Jammes Y. Reactive oxygen species and inflammatory mediators enhance muscle spindles mechanosensitivity in rats. Pflügers Arch 457: 877–884, 2009.

Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. Braz J Med Biol Res. 36: 1751-1759, 2003.

Geenen D, Buttrick P & Scheuer J. Cardiovascular and hormonal responses to swimming and running in the rat. J Appl Physiol. 65: 116-123, 1998.

Guo Z, Boekhoudt GH, Boss JM. Role of the intronic enhancer in tumor necrosis factor-mediated induction of

manganous superoxide dismutase. J Biol Chem. 278: 23570-23578, 2003.

Hart GT, Shaffer DJ, Akilesh S, Brown AC, Moran L, Roopenian DC, Baker PJ. Quantitative gene expression profiling implicates genes for susceptibility and resistance to alveolar bone loss. Infect Immun. 72:4471-4479, 2004.

Honarpour N, Gilbert SL, Lahn BT, Wang X, Herz J. Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice. Proc Natl Acad Sci 98(17): 9683-9687, 2001.

Huang CC, Lin TJ, Chen CC, Lin WT. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. Eur J Appl Physiol. 2009 [Epub ahead of print].

Jiang Y, Saavedra HI, Holloway MP, Leone G, Altura RA. Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins. J Biol Chem. 279(39): 40511-40520, 2004.

Krüger M, Mennerich D, Fees S, Schäfer R, Mundlos S, Braun T. Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. Development. 128(5): 743-752, 2001.

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685, 1970

Ljungqvist A and Gunnar U. Capillary proliferative activity in myocardium and skeletal muscle of exercised rats. J Appl Physiol 43: 306-307, 1977.

Mandache G, Unge G, Appelgren LE, Ljungqvist A. The proliferative activity of the heart tissues in various forms of experimental cardiac hypertrophy studied by electron microscope autoradiography. Virchows Arch 12: 112-122, 1973.

Nakao C, Ookawara T, Kizaki T, Oh-Ishi S, Miyazaki H, Haga S, Sato Y, Ji LL, Ohno H. Effects of swimming training on three superoxide dismutase isoenzymes in mouse tissues. J Appl Physiol. 88: 649-654, 2000.

Nosaka K, and Clarkson PM. Relationship between post-exercise plasma CK elevation and muscle mass involved in the exercise. Int J Sports Med 13: 471-475, 1992.

O'Driscoll C, Donovan M, Cotter TG.Analysis of apoptotic and survival mediators in the early post-natal and mature retina. Exp Eye Res. 83: 1482-1492, 2006.

Podhorska-Okolow M, Sandri M, Zampieri S, Brun B, Rossini K, Carraro U. Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. Neuropathol Appl Neurobiol. 24: 518-531, 1998.

Saban MR, Hellmich HL, Turner M, Nguyen NB, Vadigepalli R, Dyer DW, Hurst RE, Centola M, Saban R. The inflammatory and normal transcriptome of mouse bladder detrusor and mucosa. BMC Physiol. 18;6:1, 2006.

Salminen A and Vihko V. Effects of age and prolonged running on proteolytic capacity in mouse cardiac and skeletal muscles. Acta Physiol Scand 112: 89-95, 1981.

Sandri M, Carraro U, Podhorska-Okolov M, Rizzi C, Arslan P, Monti D, Franceschi C. Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. FEBS Lett. 373: 291-295, 1995.

Shih SC, Robinson GS, Perruzzi CA, Calvo A, Desai K, Green JE, Ali IU, Smith LE, Senger DR.Molecular profiling of angiogenesis markers. Am J Pathol.161:35-41, 2002.

Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. Mol Vis. 6: 178-183, 2000.

Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. FASEB J. 18:1150-1152, 2004.

Sriram K, Benkovic SA, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP. Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? J Biol Chem. 279: 19936-19947, 2004.

Thompson HS and Scordilis SP. Ubiquitin changes in human biceps muscle following exercise-induced damage. Biochem Biophys Res Commun 204: 1193-1198, 1994.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354, 1979.

Ueno, N., S. Oh-ishi, T. Kizaki, M. Nishida, and H. Ohno. Effects of swimming training on brown-adipose-tissue activity in obese ob/ob mice: GDP binding and UCP m-RNA expression. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. 95: 92-104, 1997.

Warren GL, Lowe DA, and Armstrong RB. Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. Sports Med 27: 43-59, 1999.

Weedon D, Searle J, Kerr JF.Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. Am J Dermatopathol. 1:133-144, 1979.

Wiwi CA, Gupte M, Waxman DJ. Sexually dimorphic P450 gene expression in liver-specific hepatocyte nuclear factor 4alpha-deficient mice. Mol Endocrinol. 18: 1975-1987, 2004.

Yamauchi-Takihara K, Kishimoto T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. Trends Cardiovasc Med. 10: 298-303, 2000.

Zandy AJ, Lakhani S, Zheng T, Flavell RA, Bassnett S. Role of the executioner caspases during lens development. J Biol Chem. 280: 30263-30272, 2005.



Figure 1. Detection of DNA fragments in situ using the terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method. Sections were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 30 min at room temparature and washed with phosphate-buffered saline. Sections were stained with TUNEL method and conterstained with propidium iodide. Apoptotic nuclei (white arrow) appear in both control and acute exercised mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=6).



Figure 2. Effects of acute exercise on anti-apoptotic Bcl-2 and proapototic Bax expression. Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed using specific primers. PCR products were visualized by ethidium bromide staining . Quantification was performed with a ImageJ and normalized in relation to GAPDH levels. Results are expressed relative to the control value which was defined as a value of 100. The Bax to Bcl-2 ratio at each time point was calculated relative to the cotrol value (set as 1 arbitrary unit) \*\*p < 0.01 compared with control (Ctrl.). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5).



Figure 3. Effects of exercise on caspase-3 and caspase-9 expression. Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed using specific primers. PCR products were visualized by ethidium bromide staining. Quantification was performed with a ImageJ and normalized in relation to GAPDH levels. Results are expressed relative to the control value which was defined as a value of 100. \*\*p < 0.01 compared with control (Ctrl.). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5).



Figure 4. Effects of acute exercise on apaf-1, survivin p53, and Sir2/SIRT1 expression. Semi-quantitative RT-PCR analysis was performed using specific primers. PCR products were visualized by ethidium bromide staining. Quantification was performed with a ImageJ and normalized in relation to GAPDH levels. Results are expressed relative to the control value which was defined as a value of 100. \*\*p < 0.01 compared with control (Ctrl.). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=5).





Figure 5. Effects of exercise training on gene and protein expression. Quantification was performed with a ImageJ and normalized in relation to GAPDH levels. Results are expressed relative to the control value which was defined as a value of 100. \*p < 0.05 compared with control. Gene expression data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3). Protein expression data are expressed as mean (n=2).