

❖ 研究テーマ

低酸素環境下の一過性運動が健康関連指標に及ぼす影響

❖ 研究背景

山梨県は全国的に見て生活環境の標高が高い準高地が多く、生体の利用できる酸素量の少ない**低酸素環境**を有している。この適度な低酸素刺激が予防医学的価値を持つことが

多方面で報告されており、さらに運動と組み合わせることによってその効果が増幅される可能性が期待されている。したがって、山梨県の準高所を訪れて運動（登山、ハイキングなど）し、他の地域資産である美しい景観や豊かな食文化に触れることによって、健康増進効果

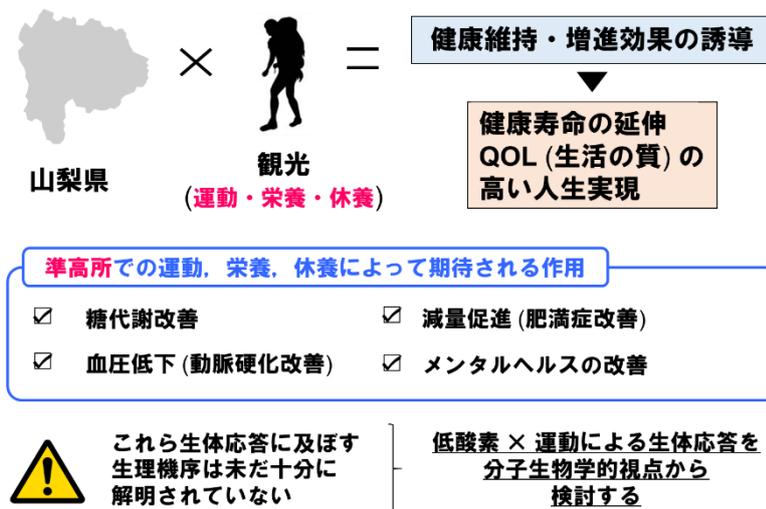


Fig. 1 山梨県（高所環境）での運動による健康増進効果の獲得

を享受できる可能性がある (Fig. 1).

これらは、健康長寿社会の実現を目指す山梨県健康増進計画に合致し、地域振興にも貢献する。しかしながら、現時点において、低酸素環境下の運動により獲得される健康増進効果の生理機序については未だ十分に解明されていないのが現状である。そこで本研究は、低酸素環境下の運動が健康増進効果に関連する因子の遺伝子発現に及ぼす影響について、動物実験モデルを対象に検討し、地域振興に資する基盤データを収集することを目的とした。

❖ 研究方法

A. 実験動物、および実験デザイン

軽度の糖代謝異常を呈する動物実験モデルを用いて検討するため、先行研究に倣い 15 週齢の Wistar 系雄性ラット (n = 32) に対し、脂肪分 60 % カロリー

比の高脂肪食を自由摂取させ、3週間の飼育を行った。群分けは、低酸素曝露の有無 (Normoxia vs. Hypoxia) と運動の有無 (Sedentary vs. Exercise) で4群に分類し、さらに運動後の回復時間 (解剖実施時間) を2水準設定し (運動直後, 3時間後), 計8群に無作為に割り付けた。介入群はそれぞれ、常酸素/安静 (Normoxia/Sedentary: NS) 群, 常酸素/運動 (Normoxia/Exercise: NE) 群, 低酸素/安静 (Hypoxia/Sedentary: HS) 群, 低酸素/運動 (Hypoxia/Exercise: HE) 群とし、運動直後に解剖を行う検体は各群3匹ずつとし、運動3時間後に解剖を行う検体は各群5匹ずつとした (Fig. 2)。なお、本研究は山梨大学動物実験倫理委員会の承認を受け実施した (承認番号: A21-30)。

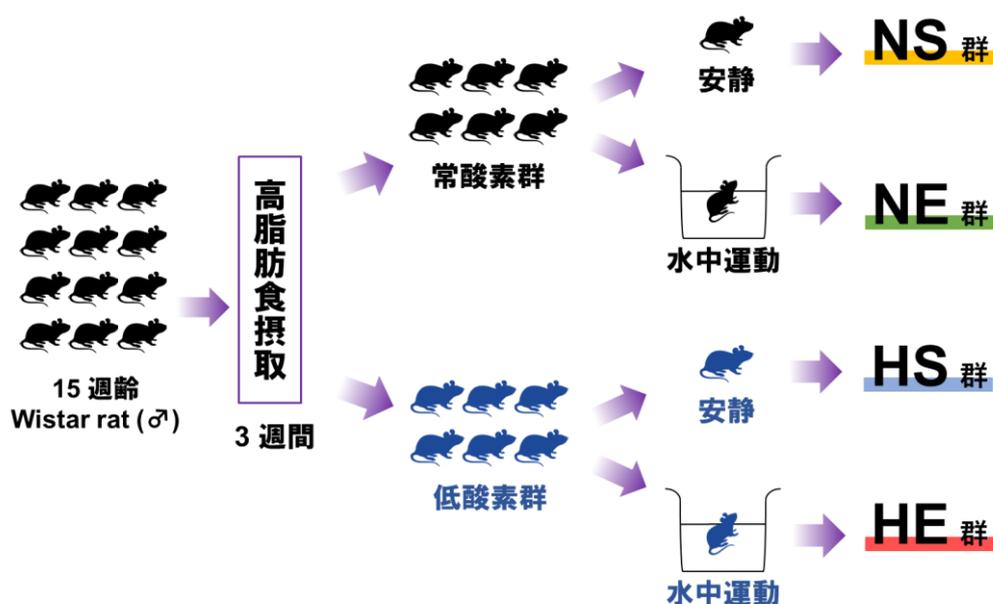


Fig. 2 実験デザイン

## B. 運動プロトコール

非活動期に12時間の絶食期間を確保し、その後に低酸素 (常酸素) 曝露と運動 (安静) 介入を一過性に施した。低酸素環境は酸素濃度 14.5 % (標高 3,000 m に相当), 常酸素環境は酸素濃度 20.9 % (標高 400 m に相当) とし、いずれも簡易的チャンバーと人工的低酸素発生装置 (Everest Summit II, HYPOXICO 製) を用いて制御した。運動は水温 35°C, 深さ 35 cm の水槽内での無負荷水泳運動とし、30 分間の連続泳を 5 分間の休憩を挟んで 2 セット行わせ (計 60 分間), 非運動群は同一時間、飼育用ケージ内で安静を保持させた。

## C. 組織の摘出

運動終了直後、あるいは3時間の安静回復 (運動介入を行った環境内に継続曝露) 後に、エーテル麻酔下に腹腔動脈からの採血により脱血死させ、各種骨格

筋, 肝臓, 脳を速やかに採取し, これらの組織サンプルは測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  のデュープフリーザー内で凍結保存した.

#### D. 測定項目

本研究では, 採取した血液, 水泳運動の主働筋である滑車上部筋, 肝臓, および海馬を測定対象とした. 運動直後に採血を行ったサンプルから血中乳酸濃度を Lactate Pro II (アークレイ製) を用いて評価した. 耐糖能の評価として, 血清グルコース濃度の測定をオリエンタル酵母株式会社に外部委託し, 血清インスリン濃度の測定は, 市販のキット (レビス インスリン ラット-T, シバヤギ製) を用いて, ELISA 法により行った. なお, 血清グルコース濃度とインスリン濃度からインスリン抵抗性指標である HOMA-IR を算出した.

各組織中の遺伝子発現について, リアルタイム PCR 反応を用いて mRNA レベルで評価した. まず各組織専用の RNA 抽出キット (QIAGEN 製) を用いて RNA を抽出し,  $0.5\text{-}1.0\ \mu\text{g}$  の RNA を ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO 製) と混合し, 逆転写反応により cDNA を合成した. その後,  $1\ \mu\text{l}$  の cDNA に,  $10\ \mu\text{l}$  の Power SYBR® Green PCR Master Mix ( $10\ \mu\text{l}$ , Applied Biosystems, USA) を混合し, さらに  $2\ \text{mM}$  の配列特異的な上流, および下流プライマーの混合溶液  $4\ \mu\text{l}$  と滅菌蒸留水  $5\ \mu\text{l}$  を添加してリアルタイム PCR 反応を行った. なお, 本実験に使用したプライマー配列は Primer Blast を用いて設計した (Table 1).

Table 1 プライマー配列

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
PGC-1 $\alpha$	ACGCAGGTCGAATGAACTGAC	TGGTGGAAAGCAGGGTCAAAATC
FNDC5	AGAAGGCACAAGTCCGTGAG	TGATGGAGTCGGAACCCCTGA
PPAR- $\delta$	GACAAACCCACGGTAAAGGC	CTGTTCCATGACTGACCCCC
PDK4	ATACTCCACTGCTCCAACGC	AGAGACGGGAAATCGGCAAG
GLUT4	GAGAAATCGCCCCACTCAT	CAAAGCCAGGCCTACTTACCT
Rab20	CTGTTCGAGTACAGAGCGGTG	AGCAGCACGATCTTCCCATC
Nrf2	GGTTGCCACATTCCCAAAC	TCCTGCCAAACTTGCTCCAT
KAT4	GAGGGTTCGGAGCCAGCTT	GTTTCCCCAGGATGGTTTGG
18s rRNA	CGAACGTCTGCCCTATCAACTT	ACCCGTGGTCACCATGGTA

#### E. 統計処理

全ての結果は平均  $\pm$  標準偏差 (means  $\pm$  SD) で示した. 各種遺伝子の mRNA 発現レベルは内在性標準因子である 18s rRNA の発現量で補正し, その上で NS

群の平均値を 1 とした場合の相対量として示した。群間の比較には、環境と運動を要因とした対応のない二元配置分散分析を用いた。交互作用が有意であった場合は、Tuckey's HSD 法を用いて多重比較検定を行った。なお、有意水準は P 値が 5% 未満 ( $P < 0.05$ ) とした。

## ❖ 研究結果

まず 3 週間の高脂肪食飼育は安静空腹時のインスリン濃度を  $5.3 \pm 2.8$  ng/ml (平均  $\pm$  SD, 参考値  $0.87 \pm 0.67$  ng/ml) へと上昇させ、HOMA-IR を  $2.77 \pm 1.54$  (基準値 2.5) へと押し上げた (data not shown)。このことから、耐糖能異常を惹起させたと考えられる。これらの耐糖能異常モデルラットに対し一過性の運動を行わせたところ、運動直後の血中乳酸濃度に、低酸素曝露と運動による交互作用が認められ、低酸素環境下で運動を行った HE 群は、常酸素環境下で運動を行った NE 群、および低酸素環境で安静曝露を行った HS 群に比較して、有意な高値を示した (Fig. 3)。血中乳酸濃度は相対的な運動強度、あるいは糖代謝の活性化の指標として理解されている。本研究でラットに用いた無負荷水泳運動は比較的強度の運動であったが、低酸素曝露を組み合わせることで、絶対運動強度は同一であっても、相対的には高強度の運動刺激が加わったことや糖代謝が活性化された可能性を示唆された。

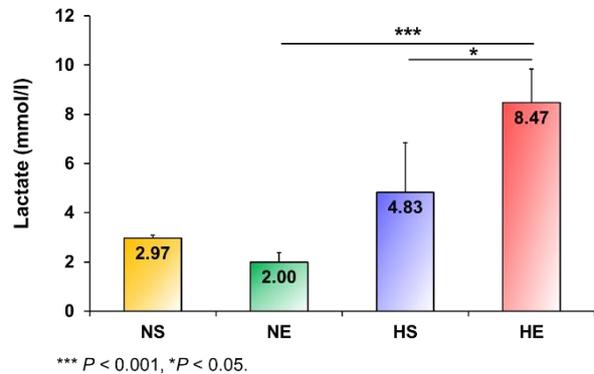


Fig. 3 血中乳酸濃度

次にラットにおける水泳運動の主働筋の 1 つである滑車上部筋に着目し、運動による健康増進効果を誘導するマスターキーとされる PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現レベルを運動後 3 時間で評価したところ、NS 群に比較して NE 群は有意な高値を示し、運動と低酸素刺激を組み合わせさせた HE 群では、NE 群および HS 群と比較して有意な高値を示した (Fig. 4A)。これは水泳運動による PGC-1 $\alpha$  mRNA 発現の増大を低酸素刺激が増強する可能性を示唆する結果である。このことから、PGC-1 $\alpha$  の下流因子として指摘されている遺伝子として、白色脂肪細胞を褐色化し、エネルギー消費の亢進に関わる膜タンパク質である FNDC5、組織中の脂肪酸の取り込みに関わる PPAR- $\delta$ 、脂質代謝を亢進するエネルギー代謝調節酵素である PDK4、抗酸化応答転写因子である Nrf2、そして抗うつ作用を発揮する KAT4 の発現レベルを検討した。その結果、いずれの指標も HE 群が他の群に比較して最も高値を示したものの、PGC-1 $\alpha$  の挙動で認められた水泳運動と低酸素刺激の相互作用は観察されず、低酸素

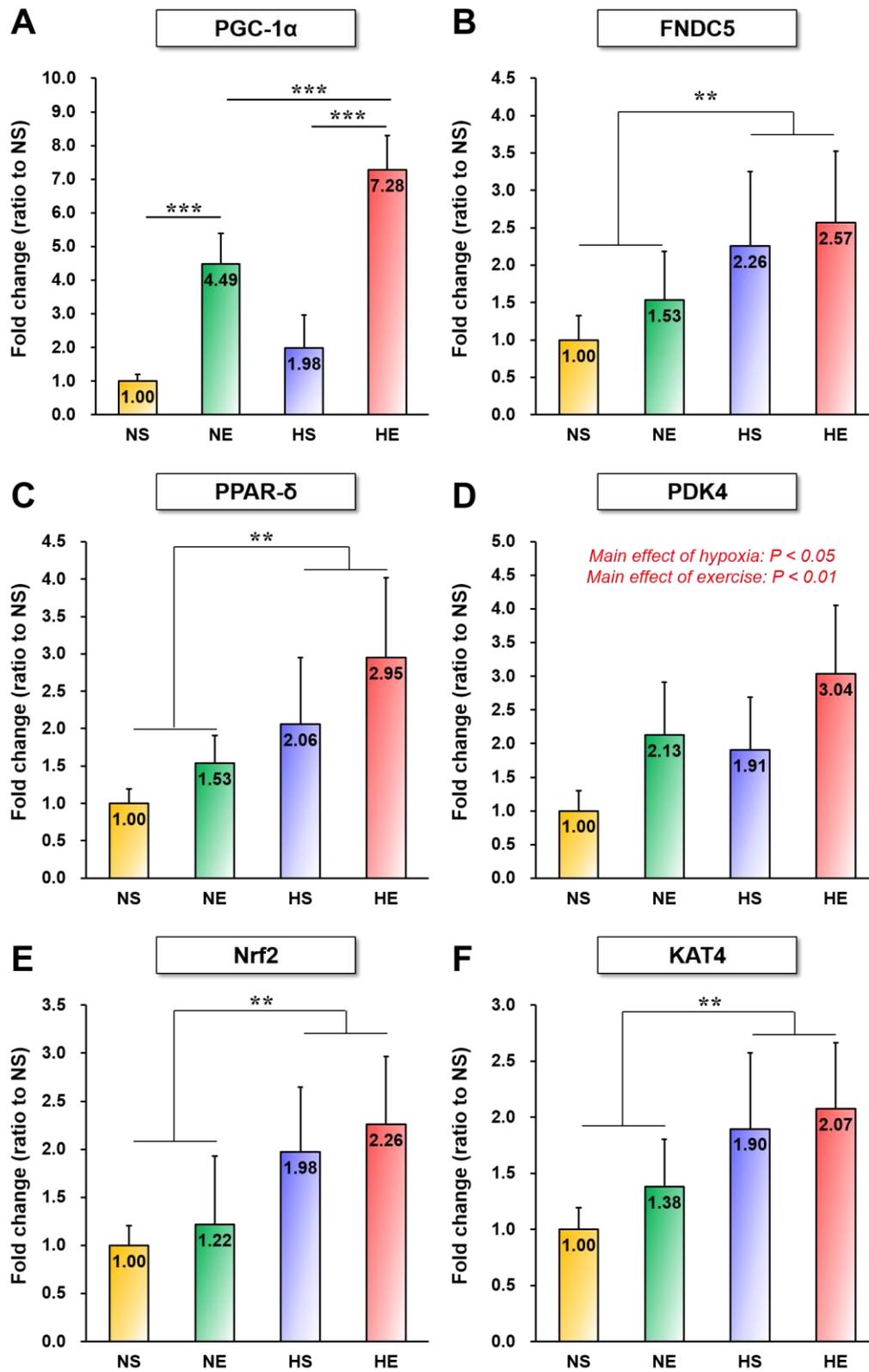


Fig. 4 運動 3 時間後における滑車上部筋 PGC-1 $\alpha$  とその下流因子の mRNA 発現レベル.  
\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ .

曝露単独の影響が大きく検出された (Fig. 4B-4F). 本研究は、動物愛護の視点から各群の n 数を最小限に抑えて検討を行っており、統計学的な有意性を検出しにくかったことが影響している可能性がある. しかしながら、これらの結果は標高 3,000 m に相当する低酸素環境に滞在するだけで、エネルギー代謝の改善や抗酸化能力の向上、さらには抗うつ関連因子の発現が促進する可能性を示唆するものであり、先行研究では報告されていない極めて興味深い結果であると言える.

さらに PGC-1 $\alpha$  依存的な発現応答を示すわけではないが、先行研究において、低酸素環境下の運動は糖代謝を亢進させることが報告されていることから、細胞への糖取り込みを中心的に制御するグルコース輸送体 (GLUT4) についても検討を行った. その結果、PGC-1 $\alpha$  の挙動と同様に HE 群の mRNA 発現が NE 群や HS 群に比し有意に亢進していることを確認した (Fig. 5A). また通常 GLUT4 は骨格筋の細胞内部に位置し、骨格筋の細胞表面に移動 (トランスロケーション) することで糖取り込みを行い、血糖値の低下を促進することが指摘されている. そのため、本研究では、GLUT4 のトランスロケーションを亢進する因子である Rab20 の mRNA 発現レベルを検討したところ、低酸素刺激により増大することが明らかになった (Fig. 5B). これらのことから、低酸素環境下の運動は GLUT4、およびその GLUT4 による糖取り込みを促進させる Rab 20 を増大させることで糖代謝の改善に寄与する可能性が示唆された.

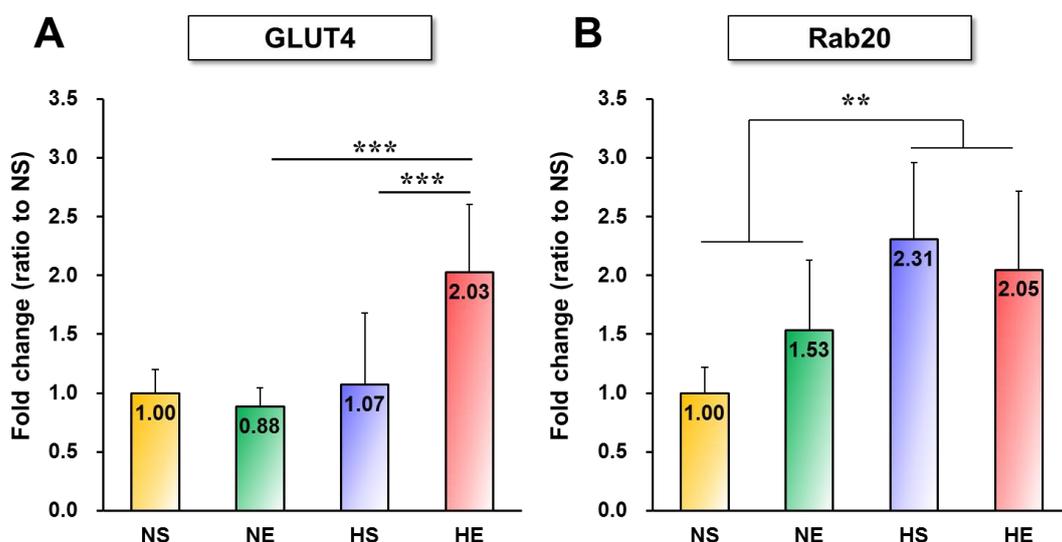


Fig. 5 運動 3 時間後における滑車上部筋 GLUT4, Rab20 mRNA 発現レベル.

\*\*\* $P < 0.001$ , \*\* $P < 0.01$ .

一方で、これらと同様の検討を肝臓、海馬で行ったが、水泳運動、低酸素刺激のいずれの影響も検出されなかった (data not shown).

## ❖ 本研究の総括と今後の展望

本研究では、単回の運動と低酸素曝露刺激の相乗効果によって、糖・脂質代謝改善、抗うつ作用、抗酸化能力向上に向けた健康増進効果が、少なくとも組織の遺伝子発現の急性応答として惹起されていることを示唆するものであった。しかしながら、運動と低酸素曝露刺激の相乗作用が観察された指標もあれば、低酸素刺激単独の影響を強く受ける指標も存在し、結果に一貫性が認められないことも観察された。したがって、本研究で測定した健康関連指標の生理機序は複数存在することが示唆され、今後さらに詳細に検証する必要があると考えられる。

本研究では、低酸素環境下の一過性運動が健康関連指標に及ぼす影響について動物実験モデルを用いて検討を行ったが、今後は長期的な介入による検討を介して、いずれはヒトを対象にした研究に移行していくことを想定している (Fig. 6)。現在広く一般に認知されている健康運動処方とは、運動強度・時間・頻度・様式などにより構成されているが、本研究を端緒として将来的に得られるデータにより、運動処方の構成要素に「実施環境」という新たな概念が組み込まれる可能性が期待される。

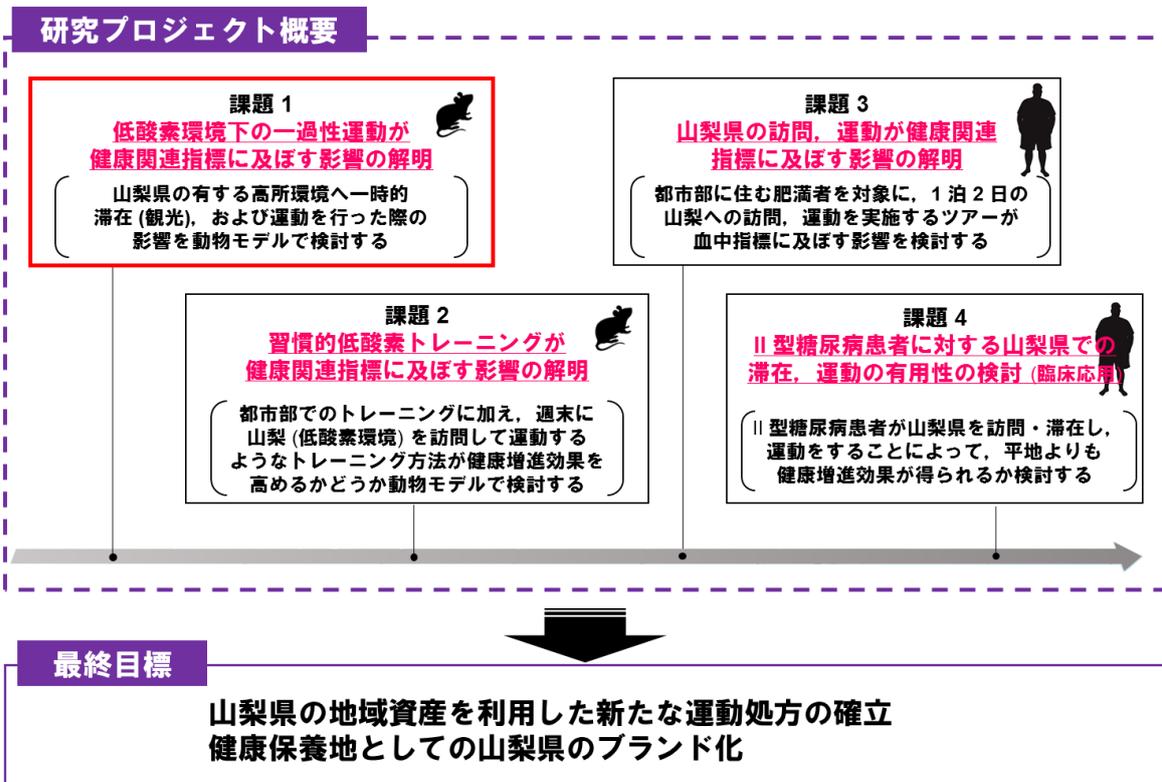


Fig. 6 今後の研究プラン.

これは山梨県の持つ高所や自然環境などに訪問・滞在し，その中で運動をするスタイルの確立に貢献する可能性があり，**山梨県が保有する山岳地への登山客の増加に加え，富士五湖や清里などの準高所に位置する観光地の新たな観光客，および移住者の誘致戦略**として有用である可能性がある．これに資するデータを蓄積していくことが今後の課題であり，山梨県民の健康寿命の延伸，および地域振興改革に寄与できるものとする。