

低酸素トレーニングモデルマウスにおける赤血球増多が もたらす危険性とそのリスク回避についての検証

東 北 大 学 布 宮 亜 樹

The Influence of Nitric Oxide-induced Vasodilatation on Blood Pressure During Hypoxic Adaptation – Risk Reduction of Erythrocytosis in Hypoxic Training Model Mice –

by

Aki Nunomiya
Tohoku University

ABSTRACT

Altitude training has been widely adopted by athletes, however it also involves a risk of excessive hematopoiesis. We used the model mice of hypoxic training (prolyl hydroxylase domain 2 conditional knockout mice: Phd2 cKO) to investigate the effect of erythrocytosis on blood flow and blood pressure. Additionally, we determined the effect of NOS inhibitor to the maintenance of blood pressure on Phd2 cKO mice. Phd2 cKO mice exhibited erythrocytosis and the reduction of blood flow velocity in hind limbs. As for systolic blood pressure, there was no significant difference between Phd2 cKO mice and control mice without treatment. 5 minutes after the injection of low concentration of NOS inhibitor, control mice exhibited an elevated systolic blood pressure. On the other hand, systolic blood pressure of Phd2 cKO mice was not affected by low concentration of NOS inhibitor. These results suggest that Phd2 cKO mice may be less susceptible to NOS inhibition. To understand the effect of NOS inhibition on blood pressure regulation in the state of polycytosis in more detail, further studies about concentration-dependent effect of NOS inhibitor using Phd2 cKO mice are required.

要 旨

効率よく持久力を高める方法として知られる低酸素トレーニングは、世界的に広く普及している一方で、ヘマトクリット値が過度に上昇することによるリスクも伴う。本研究では、常酸素環境下で赤血球増多を誘導できる低酸素モデルマウスを用いて、赤血球増多が血圧および血流にもたらす影響と、一酸化窒素合成酵素（NOS）阻害が血圧調節に及ぼす影響を明らかにすることを目的に検証を行った。ヘマトクリット値上昇が観察された低酸素モデルマウスでは、後肢の血流速度が低下していることが示された。また、低酸素モデルマウスのベースラインの収縮期血圧はコントロールマウスと同程度であった。その一方で、低濃度のNOS阻害剤を投与した場合、コントロールマウスでは血圧上昇が観察されたのに対し、低酸素モデルマウスでは血圧上昇が起らずNOS阻害の影響を受けにくいことが示された。今後は、濃度依存的にNOS阻害が血圧に及ぼす影響を明らかにするとともに、低酸素モデルマウスでNO以外の降圧作用が起きている可能性を明らかにしていく必要がある。

緒 言

近年、低酸素トレーニングは主に持久性競技において欠かすことの出来ないトレーニングとなりつつあり、世界中のアスリートが取り入れている¹⁾。身体が低酸素環境に暴露されると、生体防御反応である低酸素応答が亢進し、赤血球産生が誘導されることでヘマトクリット値が上昇する^{2,3)}。その結果、酸素運搬能力が向上し、高いトレーニング効果が得られると考えられているために、血液ドーピングをしてでもヘマトクリット値を上昇させようとする選手が後を絶たない。しかし、高地トレーニング中に起こった死亡事故も複数報告されており、詳細な死因は未解明であるも

の、過度なヘマトクリット値上昇がリスクファクターとなっている可能性は高く、低酸素トレーニングにおける危険性は検討の余地がある。当研究室では、常酸素環境下において低酸素応答を誘導することが出来るプロリン水酸化酵素2 (Prolyl hydroxylase domain 2: Phd2) 欠損マウスを低酸素トレーニングモデルマウスとして使用し、低酸素トレーニングの効果を立証してきた⁴⁾。Phd2欠損マウスは過剰とも言える赤血球増多を呈する一方で、運動遂行に影響はなかったことを受け、血管拡張作用を持つ一酸化窒素⁵⁻⁷⁾ (Nitric oxide : NO) の代謝物濃度を測定したところ、コントロールマウスに比べPhd2欠損マウスで高い数値が確認された⁴⁾。このことから、NOによる血管拡張作用がPhd2欠損マウスの血流を促進した可能性が高いが、その確証は得られていない。そこで本研究では、Phd2欠損マウスに一酸化窒素合成酵素阻害剤を投与し、血圧および血流状態に変化が生じるかを検証することにした。本研究の目的は、ヘマトクリット値が上昇した状態でNOが産生されない場合にどのような症状を引き起こすかを明らかにすることである。

1. 研究方法

1. 1 実験動物

実験には、タモキシフェン投与により全身のPhd2遺伝子を欠損する *Phd2^{ff}/ROSA26/Cre-ER^{T2}* マウスを Phd2 コンディショナルノックアウトマウス (Phd2 cKO) として使用した。また、同腹仔の *Phd2^{ff}* マウスをコントロールマウスとして使用し、マウスは全て雌性とした。全てのマウスは12時間ごとの照明管理の元で飼育され、飲料水および餌は自由摂取させた。4週齢時に全てのマウスに、10mg/mlの濃度でコーンオイルに溶解したタモキシフェンを腹腔内注射により5日間投与し、投与終了から6週後に血圧測定を行い、9週後に血流測定を行った。

全ての動物実験は、東北大学遺伝子組換え実験安全専門委員会および動物実験専門委員会の承認の下、国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に沿って行われた。

1. 2 血流測定

血流測定には、Moor Instruments社のLaser Doppler流速計(MoorLDI2-IR)を用いた。タモキシフェン投与から9週後の雌性マウスに、三種混合麻酔(ミダゾラム, メドミジン, プトルファンール)を腹腔内注射により投与し、除毛クリームによる除毛を行ったのち、麻酔から1時間以内に測定を行なった。測定箇所は後肢とし、背側側から測定を行なった。

1. 3 血圧測定

血圧測定は、37℃に設定した保温器内に無麻酔下でマウスを保持し行った。測定にはSoftron社の非観血式自動血圧測定装置(BP-98A-L)を用い、tail cuff法により心拍数・収縮期血圧を測定した。測定は、午前9時~12時に行った。まずベースラインの血圧を測定したのち、生理食塩水で希釈した低濃度の一酸化窒素合成酵素阻害剤(*N_ω*-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル塩酸塩:L-NAME, 10mg/kg)を腹腔内注射により投

与し、投与から5分後、10分後、40分後に再度血圧測定を行った。測定の後には、L-NAME投与による異常を来していないか1時間以上観察した後、飼育ケージに戻した。

1. 4 統計解析

データはすべて平均値 ± 標準誤差で表した。2群間の比較には対応のあるt検定を用い、有意水準はP<0.05とした。

2. 結果

2. 1 体重・心臓重量

L-NAMEを急性投与した全身性Phd2欠損マウスの体重はコントロールマウスと同程度であり、体重あたりの心臓重量においても有意な差は観察されなかった。しかし、Phd2欠損マウスの心臓重量/体重は、平均値でコントロールマウスの約1.62倍に増加しており、中には2倍以上の数値を呈するマウスも含まれていた(図1)。

2. 2 血液分析

L-NAMEを急性投与した場合においても、全身性Phd2欠損マウスでは赤血球増多の影響でヘマトクリット値が70%を越え、ヘモグロビン濃度もコントロールマウスと比較して有意に高い値

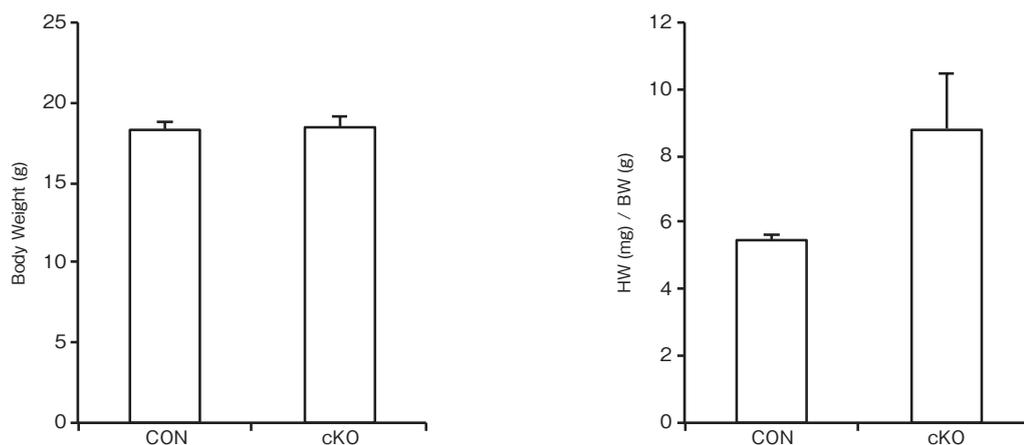


図1 コントロールマウス (CON) およびPhd2欠損マウス (cKO) の体重と体重あたりの心臓重量 (それぞれn=3)

表 1 血液分析の結果

	コントロール (n=3)	Phd2 欠損 (n=3)
赤血球数 ($10^6/\mu\text{L}$)	9.24 ± 0.49	17.56 ± 0.02**
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	14.3 ± 0.6	23.47 ± 0.41**
ヘマトクリット値 (%)	42.27 ± 1.72	72.77 ± 1.13**

を示した (表 1)。

2. 3 血流測定

タモキシフェン投与から 9 週後のコントロールマウスおよび Phd2 欠損マウスの後肢の血流を Laser Doppler 流速計にて計測したところ、Phd2 欠損マウスの後肢では血流速度が低下していることが示された (図 2)。



コントロールマウス



Phd2 欠損マウス

図 2 コントロールマウスと Phd2 欠損マウスの後肢における血流速度

2. 4 血圧測定

タモキシフェン投与から 6 週間後のコントロールマウスおよび Phd2 欠損マウスの収縮期血圧を測定したところ、ベースラインでは大きな差はないことが明らかになった。しかし、NOS 阻害剤である L-NAME を投与したところ、コントロールマウスでは投与後 5 分から血圧が上昇し始めたのに対し、Phd2 欠損マウスでは目立った血圧上昇は観察されず、両群間で有意な差が認められた ($P < 0.01$)。阻害剤投与から 10 分後においても、コントロールマウスに対し Phd2 欠損マウスでは収縮期血圧は有意に低値を示した ($P < 0.05$)。

さらに、心拍数についても解析を行ったところ、コントロールマウスにおいては L-NAME 投与から 5 分後の時点で心拍数が低下し始め、40 分後時点では投与前の心拍数のおよそ 50% まで低下した。一方 Phd2 欠損マウスにおいては、L-NAME 投与から 10 分後まではコントロールマ

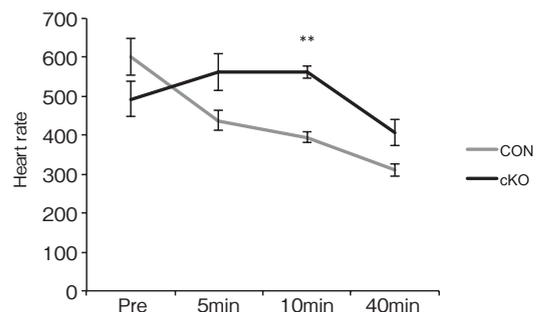
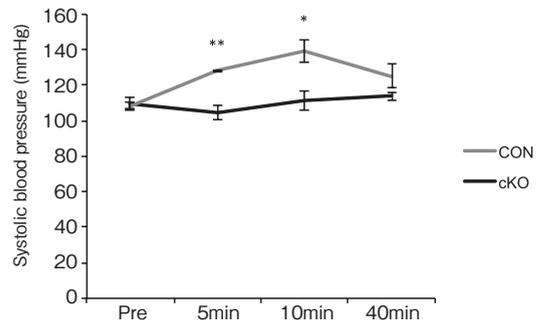


図 3 コントロールマウス (CON) と Phd2 欠損マウス (cKO) の心拍数および収縮期血圧の計測結果 (それぞれ n=3)

ウスで見られたような心拍数低下は確認されず、40分後時点でもベースラインの80%程度までしか低下しないことが示された。両マウス間ではL-NAME投与から10分後の心拍数に有意な差が見られた ($P < 0.01$) (図3)。

3. 考 察

本研究では、低酸素環境下で起こる低酸素応答による赤血球増多がもたらす危険性を解明するために、常酸素環境下で低酸素応答を誘導できるモデルマウスを用いて血流状態、血圧の解析を行った。

Phd2欠損マウスの心臓重量/体重はコントロールマウスと比較して有意に高いことを既に報告済み⁴⁾であるが、本研究においては有意な差は確認されなかった。これには、本研究で用いたマウスは個体数が少なかったこと、また極端な心重量増加を呈したマウスが含まれていたことが影響したものと考えられる。全身性にPhd2を欠損すると、拡張型心筋症に類似した心肥大を引き起こすことが報告されており⁸⁾、本研究で用いたマウスの中でも、特に心重量の増加が大きかったものについては拡張型心筋症を起こしている可能性が高く、今後さらなる病理学的解析が求められる。

後肢の血流状態を観察した結果、コントロールマウスに比べてヘマトクリット値の高いPhd2欠損マウスでは、血流速度が低速となっていることが明らかになった。Phd2欠損マウスにおける血中NO代謝物濃度はコントロールマウスと比較して有意に高いことを既に報告済み⁴⁾であり、Phd2欠損マウスではNOの血管拡張作用による血流促進が起こっていると推測された。しかし、今回の検証によって、ヘマトクリット値70%を超える血液状態においてはNOによる血管拡張作用だけでは血流促進には不十分である可能性が示された。一方、NOは血管拡張作用だけでなく血小板凝集抑制作用を持つことも知られており

9)、抗血栓性物質としてNOが重要な役割を果たしている可能性がある。今後、L-NAMEを投与した際の血流状態も観察することで、赤血球増多が起こった場合の血流速度にNOが及ぼす影響を明らかにすることが出来ると考えられる。また、L-NAME投与前後に血小板機能検査を行うことで、NOによる血小板活性抑制がPhd2欠損マウスの血液状態および血流状態に及ぼす影響も併せて検証することが求められる。

本研究で用いた全身性Phd2欠損マウスでは、過剰なヘマトクリット値上昇を呈することから、血液粘度が増し血圧上昇を引き起こすことが推測された。しかし、ベースラインの収縮期血圧を測定した結果、コントロールマウスとPhd2欠損マウス間に有意な差は無く、全身性Phd2欠損マウスの血圧は上昇していないことが示された。これには、Phd2欠損マウスでは血漿中NO代謝物濃度が上昇していることが影響し、NOによる血管拡張作用が血圧上昇を抑制していることが推測された。しかし、L-NAMEを投与した場合でもPhd2欠損マウスでは血圧上昇が起これず、むしろNOS阻害の影響を受けにくいことが明らかになった。心拍数においても、L-NAME投与後すぐに心拍数が低下し始めたコントロールマウスに比べ、Phd2欠損マウスでは心拍数低下のタイミングも遅延しており、L-NAMEの影響を受けにくいことが示された。L-NAMEを投与しても、血圧上昇が見られなかったことから、Phd2欠損マウスではNOの血管拡張作用以外の降圧作用が働いている可能性もある。しかし、本実験で使用したL-NAMEは低濃度で投与しており、元々血漿中NO産生量の多いPhd2欠損マウスにおけるNO合成を阻害するには十分量ではなかった可能性が高い。今後、NOS阻害剤の濃度依存的に血圧および心拍数が変化するかを検討することで、赤血球増多を呈するマウスの血圧調節にNOがもたらす影響をさらに詳細に明らかにすることが期

待される。また、その際血漿中の NO 代謝物濃度を測定することで、Phd2 欠損マウスにおける NOS の阻害に必要な阻害剤の量を明らかにすることも併せて求められる。

4. 結 論

本研究では、赤血球増多を起こす低酸素モデルマウスにおいて 1) 後肢の血流速度低下が起こっていること、2) 収縮期血圧は正常であり、また低濃度の NOS 阻害剤の影響を受けにくいことの 2 点が明らかになった。今後は、NOS 阻害剤の濃度依存的な影響の違いがあるかを明らかにすることが求められる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました石本記念デサントスポーツ振興財団に厚く御礼申し上げます。また、実験の実施にご協力いただきました東北大学の鈴木教郎准教授、宮内健一郎先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Wilber R.L., Application of altitude/hypoxic training by elite athletes, *Med. Sci. Sports Exerc.*, **39**:1610-24 (2007)
- 2) Semenza G.L. and Wang G.L., A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation, *Molecular*

and cellular biology, **12**:5447-54 (1992)

- 3) Jelkmann W., Erythropoietin after a century of research: younger than ever, *Eur. J. Haematol.*, **78**:183-205 (2007)
- 4) Nunomiya A., Shin J., Kitajima Y., Dan T., Miyata T. and Nagatomi R., Activation of the hypoxia-inducible factor pathway induced by prolyl hydroxylase domain 2 deficiency enhances the effect of running training in mice, *Acta. Physiol. (Oxf.)*, (2016)
- 5) Ruschitzka F.T., Wenger R.H., Stallmach T., Quaschnig T., de Wit C., Wagner K., Labugger R., Kelm M., Noll G., Rulicke T., Shaw S., Lindberg R.L., Rodenwaldt B., Lutz H., Bauer C., Luscher T.F. and Gassmann M., Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**:11609-13 (2000)
- 6) Palmer R.M., Ferrige A.G. and Moncada S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature*, **327**:524-6 (1987)
- 7) Kelm M. and Schrader J., Control of coronary vascular tone by nitric oxide, *Circ. Res.*, **66**:1561-75 (1990)
- 8) Minamishima Y.A., Moslehi J., Bardeesy N., Cullen D., Bronson R.T. and Kaelin W.G., Jr. Somatic inactivation of the PHD2 prolyl hydroxylase causes polycythemia and congestive heart failure, *Blood*, **111**:3236-44 (2008)
- 9) Benjamin N., Dutton J.A. and Ritter J.M., Human vascular smooth muscle cells inhibit platelet aggregation when incubated with glyceryl trinitrate: evidence for generation of nitric oxide, *Br. J. Pharmacol.*, **102**:847-50 (1991)