

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19887

研究課題名（和文）閉経後の骨格筋における水分代謝とサルコペニア：運動の予防効果の分子メカニズム

研究課題名（英文）The water metabolism and sarcopenia in postmenopausal women: the molecular mechanisms of sarcopenia prevention by exercise

研究代表者

洪 永豊 (HUNG, Yung-Li)

順天堂大学・大学院スポーツ健康科学研究科・博士研究員

研究者番号：40826575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：高齢期骨格筋の特徴として、骨格筋量および筋力の低下と伴に筋線維内水分量が低下することが知られている。特に、加齢に伴う筋線維内水分の低下量は男性よりも女性の方が顕著である。閉経後の女性では水分代謝の不調が認められ、要因のひとつとしてエストロゲン分泌の減少との関連が示唆されている。しかし、エストロゲンが骨格筋の水分量に及ぼす影響の分子メカニズムは明らかではない。本研究では、エストロゲン分泌の観点から、閉経後および高齢期女性の骨格筋の水分代謝調節の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、エストロゲンが低下した状態での水分代謝の改善を目的とした運動の影響について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、閉経後のエストロゲン分泌が低下した状態での運動トレーニングが骨格筋水分代謝に及ぼす影響を分子レベルで検討し、性差を考慮したサルコペニアの予防改善に役立てようとする試みであった。これまで、サルコペニアと筋線維内水分量の関連性が報告されていたが、その分子メカニズムは明らかではなかった。本研究の学術的独自性として、卵巣摘出およびサルコペニアの実験モデルを用いて、エストロゲン分泌が低下した状態での運動トレーニングの影響を骨格筋水分代謝に着目して検討した点である。サルコペニア発症の分子メカニズムの解明や予防法の開発などに貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The characteristics of geriatric skeletal muscle are that muscle mass, strength

and intracellular water content are reduced. Compared to elderly men, elderly women exhibit more loss of skeletal muscle intracellular water content. The increase of extracellular water in the skeletal muscle is associated with reduced estrogen levels. It is thought that the lack of estrogen after menopause may crucially contribute to reduced muscle mass and strength in elderly women. Estrogen is considered to regulate muscular water; however, the mechanism by which estrogen regulates muscular water is unknown. We investigated the effects of estrogen on water metabolism in the skeletal muscle by using estrogen-deficient animals following resistance exercise training.

研究分野：運動生理学

キーワード：サルコペニア エストロゲン 筋力トレーニング 水分代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い骨格筋量および筋力の低下が認められる。しかし、この加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)の詳細なメカニズムは不明である。骨格筋は水分含有量が約 80%であり、水分を豊富に含んだ組織である。骨格筋量はタンパク質量と水分量によって規定される(Aloia JF et al., 1998)。病的な筋萎縮は、骨格筋内の水分量の低下によって引き起こされることが知られている(Vignos PJ Jr et al., 1959)。骨格筋は筋線維(筋細胞)の集合体であり、筋線維はその収縮特性から速筋線維(type II)と遅筋線維(type I)に大別される。ヒトを対象とした研究によると、加齢に伴い筋線維内水分量は低下することが知られている(Yamada Y et al., 2010)。また、サルコペニアの場合、速筋線維に選択的な萎縮が認められるのが特徴である。このことから、加齢に伴うサルコペニアの発症や進展には筋線維内、特に速筋線維内水分量の低下が関与することが考えられる。

一方、加齢に伴う筋線維内の水分量の低下は男性よりも女性の方が顕著である(Yamada Y et al., 2017)。また、閉経後の女性では下半身のむくみ等の水分代謝の機能低下が顕著に認められている。その要因には女性ホルモンのひとつであるエストロゲンの関与が示唆されており、エストロゲン分泌量の低下は筋線維内水分量を減少させることが示唆されている(Sawai A et al., 2018)。一方で、エストロゲン分泌量の増加は筋線維内水分量を増加させることも示唆されている(Stachenfeld NS et al., 2004)。しかしながら、エストロゲンが骨格筋の水分代謝を調節するメカニズムについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

高齢期の女性骨格筋では、筋線維内水分量の低下が顕著に認められ、その要因のひとつとしてエストロゲンが関与している可能性がある。そこで本研究では、エストロゲンによる骨格筋水分代謝の調節機構に着眼して、サルコペニアおよび閉経後の女性における筋萎縮および運動による筋萎縮予防の分子メカニズムを解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、エストロゲンが加齢や運動による速筋線維内の浸透圧調整に関与し、骨格筋の水分量を制御する因子に及ぼす影響を分子レベルで解明するために、実験 1 として卵巣摘出モデルを用いて、運動トレーニングとエストロゲンが骨格筋の水分量を制御する因子 Aquaporin 4 (AQP4)と Na-K-Cl cotransporter1(NKCC1)に及ぼす影響を検討した。実験 2 として加齢に伴うラット骨格筋水分代謝の調節機構に性差が生じるのか否かについて検討した。

(1)実験動物

実験 1

8 週齢の F344 雌性ラット(n = 18)は飼育環境へ適応させるために手術処置前の 2 週間を予備飼育期間とし、通常飼育を行い、以下の 6 群に振り分けた：偽手術処置安静(Sham-Sed)群(n = 3)、偽手術処置クライミング運動トレーニング(Sham-CT)群(n = 3)、卵巣摘出处置安静(OVX-Sed)群(n = 3)、卵巣摘出处置クライミング運動トレーニング(OVX-CT)群(n = 3)、卵巣摘出处置エストロゲン投与安静(OVX+E-Sed)群(n = 3)、卵巣摘出处置エストロゲン投与クライミング運動トレーニング(OVX+ E-CT)群(n = 3)。

実験 2

若年期(4 ヶ月齢)、閉経前(10 ヶ月齢)、閉経後(16 ヶ月齢)、高齢期(22 ヶ月齢)の F344 系雌性および同月齢の雄性ラットを実験動物として用いる。雌雄とも各月齢のラットは安静群と運動群に分類する。運動群にはレジスタンス運動としてクライミング運動を 3 日に 1 度の頻度で、1 日 10 回疲労困憊に至るまで負荷した。

(2)卵巣摘出手術

卵巣摘出手術は、イソフルラン(2-3%)吸入による深麻酔を施した後に実施した。動物用バリカンを用いて、ラットの脇腹下を左右毛刈りし、3 cm 程度の切り込みを入れ、卵巣を摘出した。摘出後は、滅菌済み縫合糸を用いて止血し、縫合用クリップにて皮膚を縫合した。偽手術処置は、卵巣摘出处置と同様に皮膚および表層部位の筋に切れ込みを入れ、卵巣を摘出せず縫合した。

(3)エストロゲン投与

エストロゲン投与は、卵巣摘出を行った 60 日後、首元の皮下脂肪に 1cm 程度の切り込みを入れ、エストロゲン投与群にはエストロゲンペレットを挿入した。8 週間のエストロゲン投与を行った。

(4)クライミング運動トレーニング

クライミング運動トレーニングは、卵巣摘出を行った 60 日後に開始された。はしご(長さ 1.1m)を用いて、3 日に 1 回の頻度で 8 週間、計 20 回のクライミング運動を実施した。1 回目のトレー

ニングにおける負荷重量は、1セット目が体重の50%、2セット目は体重の75%、3セット目は体重の90%、そして4セット目が体重の100%となるように調整した。4セット以降の負荷重量は毎回30gずつ追加し、登りきれなくなるまでクライミング運動を実施した。2回目以降のトレーニングは、前回の最大負荷重量の50%から、登りきれなくなるまでクライミング運動を実施した。

(5)解剖および骨格筋摘出

最終トレーニングセッション終了から48時間後、イソフルラン(2-3%)吸入による深麻酔下にて心臓を摘出した後、長母趾屈筋(Flexor hallucis longus: FHL)を摘出し湿重量を測定した。その後、液体窒素で急速凍結し分析まで-80℃で保存した。

(6)免疫染色

マイクロトームで厚さ10μmの凍結切片を作成し、希釈した1次抗体のミオシン重鎖(MHC) I抗体、MHC IIa抗体、MHC IIx抗体及びLaminin抗体を用いて室温で1次抗体を1時間反応させ、その後、室温で2次抗体を1時間反応させた。染色された組織像は、蛍光顕微鏡を用いて撮影された。

(7)ウェスタンブロッティング

凍結筋サンプルは、液体窒素を用いて凍結破砕した。凍結破砕した筋サンプルは、低温のホモジナイズバッファ-Tissue Protein Extraction Reagentを用いてビーズ破砕機でホモジナイズした。遠心分離後に上清を回収し、タンパク質濃度をBCA Protein Assayで測定した。その後、サンプルバッファと混合した後、95℃で10分間加熱した。ポリアクリルアミドゲルを用いてタンパク質を電気泳動によって分離し、PVDFメンブレンに転写した。転写後は室温で5%スキムミルク溶液を用いて1時間ブロッキングした後、一次抗体(AQP4、NKCC1)を4℃で一晩反応させた。その後、室温で2次抗体を1時間反応させ、化学発光試薬を用いて標的タンパク質を検出した。

(8)統計処理

結果は平均値±標準誤差で表した。群間の比較は二元配置分散分析を行い、多重比較検定はTurkey's testを行った。有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

実験1は、トレーニングによって偽処置運動群ではFHLの湿重量に有意な増加が認められたが、卵巣摘出運動群では認められなかった。一方、卵巣摘出後にエストロゲン投与してトレーニングを行った卵巣摘出+エストロゲン投与運動群ではFHLの湿重量に有意な増加が認められた。骨格筋のAQP4とNKCC1のタンパク質は図1に示す。卵巣摘出で骨格筋のAQP4とNKCC1が減少し、卵巣摘出+エストロゲン投与によってAQP4とNKCC1が回復することを認めていたが、運動トレーニングの影響が認められなかった。本研究により、エストロゲン状態によって運動性筋肥大への影響が異なることが示されたが、骨格筋のAQP4とNKCC1の関与は少ない可能性が示唆された。

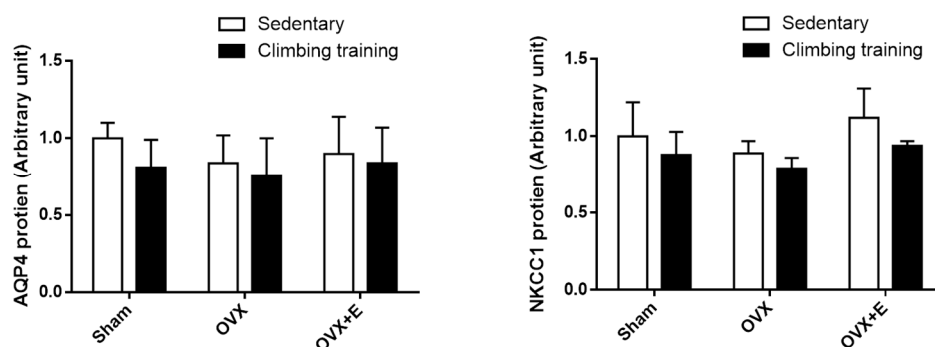


図1. FHLのAQP4とNKCC1タンパク質発現量

実験2は、6ヶ月齢と24ヶ月齢を比較した場合、筋力トレーニングによる筋重量の増加率は、雌ラットでは21.5%と14.2%、雄ラットでは14.9%と10.7%であった。若年期に筋力トレーニングによる筋横断面積(全部の筋線維タイプ)の増加率と比べて、高齢期雄および雌とも減少することが認められた。さらに、筋力トレーニングによるタイプIIa筋線維の横断面積の増加率は、高齢期雄および雌とも減少することが認められた。雄ラットでは筋力トレーニングと加齢の交互作用を認められなかったが、雌ラットでは筋力トレーニングと加齢の交互作用を認められた。先行研究では、速筋型MHCの発現様式がAQP4とNKCC1の発現制御に関与することを報告されて

いる。今後、AQP4 と NKCC1 の発現特性の変化は、筋力トレーニング速筋型 MHC 筋線維の横断面積の増加率に関与する可能性が考えられる。

以上のことより本研究結果は、エストロゲン状態によって運動性筋肥大に関与することが示されたが、骨格筋の AQP4 と NKCC1 の関与は少ない可能性が示唆された。さらに、エストロゲンが、筋力トレーニング速筋型 MHC 筋線維の横断面積の増加率に関与する可能性が考えられる。エストロゲンが、筋力トレーニングによる筋肥大の効果を高めることを認められた。本研究の成果は、閉経後の女性の筋萎縮を引き起こすメカニズムおよび運動による筋肥大抵抗性のメカニズムを明らかにし、女性のサルコペニアに対する新たな治療、予防や抑制方法の確立に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Hung Yung Li, Sato Ayami, Takino Yuka, Ishigami Akihito, Machida Shuichi | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Influence of oestrogen on satellite cells and myonuclear domain size in skeletal muscles following resistance exercise | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle | 6. 最初と最後の頁 2525 ~ 2536 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcsm.13031 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Hung Yung-Li, Kosugi Riki, Natsume Toshiharu, Machida Shuichi | 4. 巻 2022 |
| 2. 論文標題 Loquat Leaf Extract Enhances Muscle Contraction-Induced Activation of Protein Synthesis Signaling in Rat Skeletal Muscle | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 6 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/2234118 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 洪永豊、中野大輝、石道峰典、張碩文、町田修一 |
| 2. 発表標題 運動トレーニングによる筋肥大が骨格筋アクアポリンの発現特性に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第74回 日本体力医学会大会(つくば) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yung-Li Hung, Minenori Ishido, Shuichi Machida |
| 2. 発表標題 The effects of estrogen on muscle hypertrophy and muscular water homeostasis in skeletal muscle following resistance exercise |
| 3. 学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Oita city) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 洪永豊, 栗寿喜, 町田修一 |
| 2. 発表標題 エストロゲンがレジスタンストレーニングによる筋の適応に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第75回体力医学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yung-Li Hung, Shuichi Machida |
| 2. 発表標題 Effect of loquat leaf extract on resistance training-induced muscle hypertrophy in aged female rats |
| 3. 学会等名 Virtual APS Integrative Physiology of Exercise conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yung-Li Hung, Toshiharu Natsume, Shuichi Machida |
| 2. 発表標題 Effects of estrogen on satellite cells and domain size in skeletal muscles following resistance exercise |
| 3. 学会等名 The 98th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 洪永豊, 町田修一 |
| 2. 発表標題 自然閉経後のレジスタンストレーニングによる速筋線維の筋肥大に対するエストロゲンの影響 |
| 3. 学会等名 第76回体力医学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yung-Li Hung, Ayami Sato, Akihito Ishigami, Shuichi Machida |
| 2. 発表標題 Effects of estrogen and resistance training on myosin heavy chain isoform shifts in female rat skeletal muscle |
| 3. 学会等名 The 99th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 洪永豊, 佐藤綾美, 滝野有花, 石神昭人, 町田修一 |
| 2. 発表標題 レジスタンストレーニングによるリボソーム生合成に及ぼすエストロゲンの影響 |
| 3. 学会等名 第77回体力医学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|