

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06414・19K21491

研究課題名(和文)なぜ女性では運動後の筋損傷が生じにくいのか - ミトコンドリアの作用に着目して -

研究課題名(英文) Why female has greater resistance for skeletal muscle damage than male?: contribution of mitochondria

研究代表者

渡邊 大輝 (Watanabe, Daiki)

広島大学・総合科学研究科・助教

研究者番号：30823281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、雌性のほうが雄性よりも運動後の筋損傷(長時間にわたる筋収縮力の低下と定義される)が生じにくい理由を明らかにすることであった。そのために、伸張性収縮後の骨格筋の変化を雌雄で比較するとともに、卵巣摘出雌マウスと卵巣摘出後エストロゲンを投与した雌マウスと疑似手術を行った雌マウスで伸張性収縮後の変化を比較した。その結果、雌性では、ミトコンドリアの適応が生じやすいため、運動後の筋損傷が引き起こされにくいこと、それはエストロゲンが分泌されることに起因することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、1) 雌性の方が雄性よりもミトコンドリアの運動に伴うダメージの緩衝能力が高い点、2) その原因はエストロゲンにある点を初めて明らかにした。本研究の結果は、男性と女性の運動後の適応の違いを説明するための学術的基礎となるだけでなく、今後、性別の特性を考慮した筋疲労や筋損傷への対処法やトレーニング法を考案するためにも、必要な知見となると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the mechanism underlying greater resistance for muscle damage in female than male. To this end, we examined the sex difference in muscle damage after repeated eccentric contractions (ECCs) and the difference between ovariectomy-treated (OVX), OVX with estrogen-treated and sham-operated female mice in muscle damage after ECCs. The results of this study suggest that 1) a superior mitochondrial adaptation in female alleviates muscle damage at least after ECCs, and 2) such mitochondrial adaptation is enhanced by the estrogen.

研究分野：筋生理学

キーワード：骨格筋 エストロゲン 伸張性収縮 細胞内遊離Ca<sup>2+</sup>

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋損傷とは、収縮後に筋収縮力の低下とともに筋の構造的破壊が見られる現象のことと定義され、男性と比較し、女性では同一の強度で運動を行ったとしても筋損傷が生じにくいことが知られている (Fulco et al. 1999; Sonobe et al. 2010). これまで、エストロゲンが十分に分泌されれば、筋損傷が低減されることから、この性差はエストロゲンの作用に起因するのではないかと考えられてきた (Enns & Tiidus 2010). しかしながら、「どのような作用機序でエストロゲンが筋損傷を軽減するのか」について明示したものは見当たらない. 筋損傷の根本的な原因は、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇にあると言われている (Kanzaki et al. 2017; Lamb & Westerblad 2011).

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー産生だけでなく、細胞内  $Ca^{2+}$  緩衝作用を担う (Eshima et al. 2017). 近年、エストロゲンは、ミトコンドリアの分裂能および  $Ca^{2+}$  緩衝能の亢進に寄与することが示され (Ribas et al. 2016), これらの機能亢進は筋損傷の緩和作用をもつと思われる. したがって、エストロゲンによるミトコンドリア機能亢進が、筋損傷に関する性差を引き起こす一因と考え、本研究ではこの点を検討した.

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、雌性のほうが雄性よりも運動後の筋損傷 (長時間にわたる筋収縮力の低下と定義される) が生じにくい理由を明らかにすることであった. そのために、1) 伸張性収縮 (筋損傷を引き起こす典型的な収縮様式) を行った後の筋収縮力の回復の程度に性差は存在するのか、2) 性差があるとすればその原因は筋細胞内のどのような機能に違いがあるためなのか、3) 性ホルモンであるエストロゲンがそのような違いを引き起こす根本的な原因であるのかの 3 点を明らかにすることとした.

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験デザイン

本研究は、2つの実験から構成された. 図1は、本研究の実験デザインの概要を示したものである. 実験1では伸張性収縮後の筋損傷の性差を、実験2ではエストロゲンが伸張性収縮後の筋損傷に及ぼす影響を検討した. なお、各解析の詳細は項目を分け記載する.

【実験1】 実験には16週齢の雄性および雌性のマウスを用いた (各群  $n = 8$ ). 片脚の腓腹筋に200回の伸張性収縮を負荷し (この脚を刺激脚と呼ぶ), 伸張性収縮負荷3日後において、腓腹筋を摘出した. 腓腹筋遠位部の表層部から生化学及び電子顕微鏡用サンプルを作製し、解析に用いた. なお、反対脚は安静脚として用いた.

【実験2】 実験には8週齢の雌性マウス24匹を用いた. 疑似手術を行う (Sham operated; Sham) 群、卵巣摘出を行う (ovariectomy; OVX) 群、卵巣摘出を行いエストロゲンを投与する (ovariectomy + estrogen; OVX+E) 群にマウスを分けた (各群  $n = 8$ ). 卵巣摘出8週間後 (16週齢目) において、片脚の腓腹筋に200回の伸張性収縮を負荷し、伸張性収縮負荷3日後において、腓腹筋を摘出した. 腓腹筋遠位部の表層部から生化学及び電子顕微鏡用サンプルを作製し、解析に用いた. なお、反対脚はコントロールとして用いた.

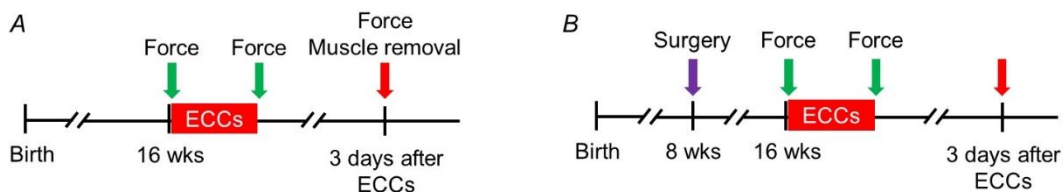


Figure 1. Scheme of experimental design in the present study.

A, experimental design of experiment 1. B, experimental design of experiment 2. In experiment 2, 8-week-old female mice were ovariectomized. Isometric forces in gastrocnemius muscle (GAS) were measured *in vivo* before, immediately after, and 3 days after ECCs. Three days after ECCs, GAS muscles were excised and used for morphological and biochemical analyses. Note that all female mice were subjected to ECCs during oestrous.

#### (2) 張力測定

マウスを麻酔下において、仰臥位に置き、フットホルダーに固定した. その後、表面電極をマウス腓腹筋内側と外側に平行となるように貼付した. 電極を介し、種々の刺激頻度 (1 Hz, 20 Hz, 40 Hz, 60 Hz, 80 Hz および 100 Hz) で電気刺激を筋に対し負荷し収縮を誘起した. 筋収縮力はフットホルダーに取り付けられたトルクセンサーによって測定した.

#### (3) 横行小管と筋小胞体間の距離

電子顕微鏡用の筋サンプルから筋線維の長軸方向と平行となるように切片を作製した. 作製した切片を電子顕微鏡で観察し、筋線維内部を CCD カメラを用いて撮影した. 撮影した画像における筋小胞体と横行小管の最短距離を ImageJ を用いて解析した.

#### (4) ジャンクトフィリン量

抽出した筋を液体窒素下でパウダー状にし、9倍量の抽出液を加えてホモジナイズした。ホモジナイズ後のサンプルを用いて、Western blot 法によりジャンクトフィリン 1 量を測定した。

#### (5) ミトコンドリア $Ca^{2+}$ ユニporter 量

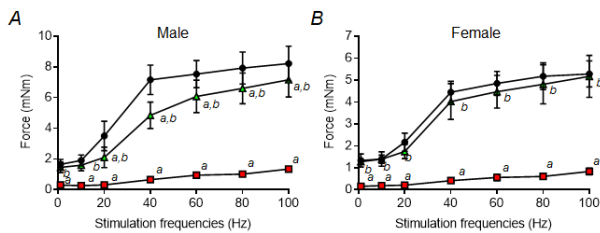
ジャンクトフィリン量を測定したサンプルを用いて、Western blot 法によりミトコンドリア  $Ca^{2+}$  ユニporter 量を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 張力変化 (図 2)

雄性では伸張性収縮 3 日後に張力が元のレベルまで回復しなかったのに対し、雌性では回復した (実験 1)。OVX 群では伸張性収縮 3 日後に張力が元のレベルまで回復しなかったのに対し、Sham 群および OVX+E 群では回復した (実験 2)。

##### Experiment 1



##### Experiment 2

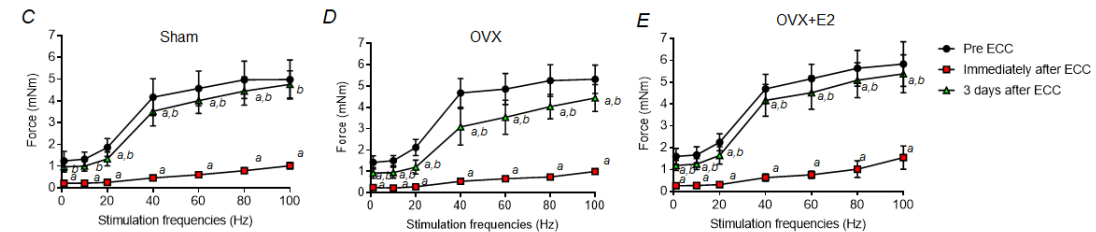
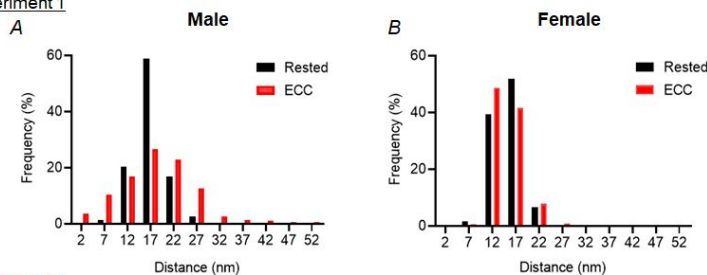


Figure 2. Force production after eccentric contractions in mouse gastrocnemius muscle. Values are means  $\pm$  SD. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. Pre ECC, <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs. immediately after ECC.

#### (2) 横行小管と筋小胞体間の距離 (図 3)

伸張性収縮 3 日後における横行小管と筋小胞体間の距離は、雄性では安静脚と比較し刺激脚で著しいばらつきが認められたが、雌性では同等であった (実験 1)。これについて、OVX 群では安静脚と比較し刺激脚で著しいばらつきが認められたが、Sham 群および OVX+E 群では同等であった (実験 2)。

##### Experiment 1



##### Experiment 2

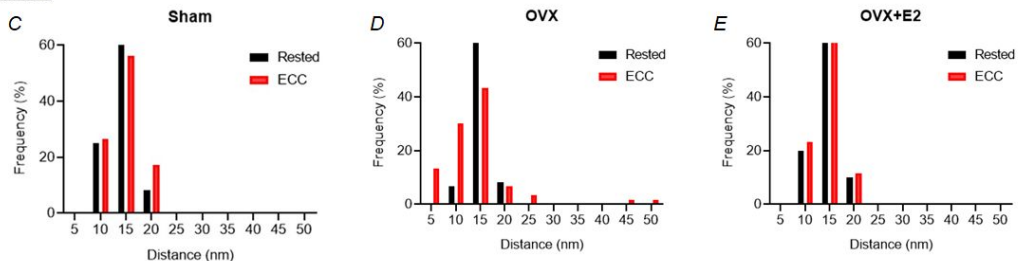


Figure 3. Distance between sarcoplasmic reticulum and transverse tubule.

#### (3) ジャンクトフィリン 1 量 (図 4)

伸張性収縮 3 日後におけるジャンクトフィリン量は、雄性では安静脚と比較し刺激脚で低下したが、雌性では変化しなかった (実験 1)。これについて、Sham 群、OVX 群および OVX+E2 群で

は安静脚と刺激脚の間に差異は認められなかった（実験2）。

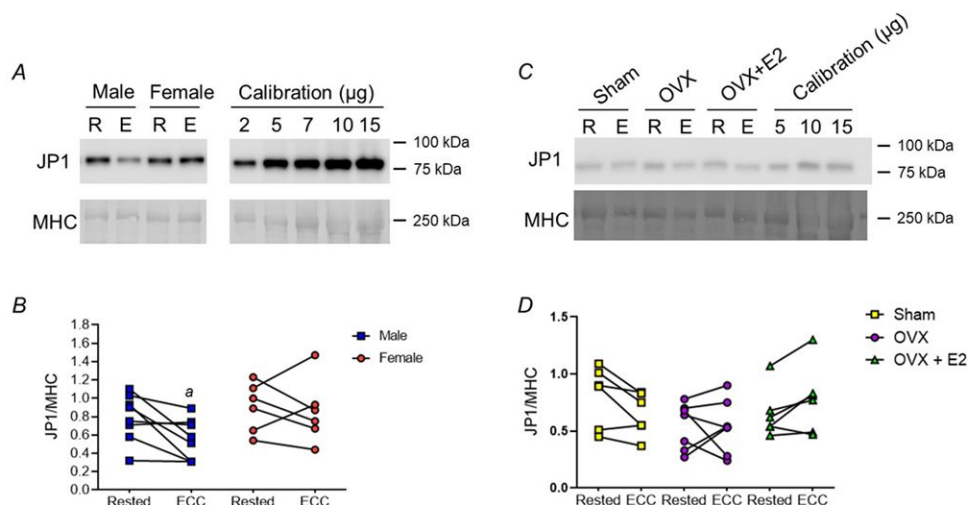
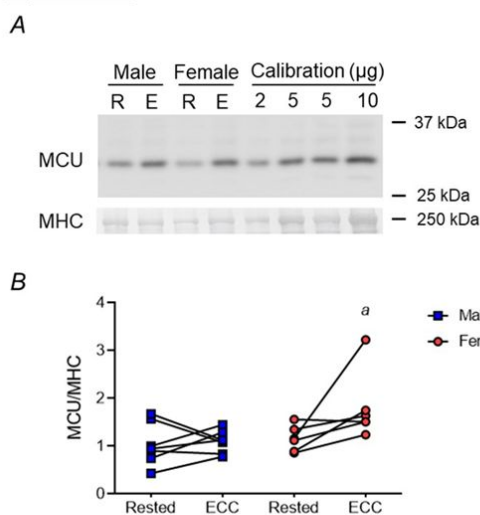


Figure 4. Junctophilin 1 (JP1) content 3 days after eccentric contractions in mouse gastrocnemius muscle. A and C, representative western blots. B, JP1 content in experiment 1. Individual values are shown as dot and the values from same rat were connected by line. D, JP1 content in experiment 2. Individual values are shown as dot and the values from same rat was connected by line. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. Rested.

#### (4) ミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>ユニポーター量 (図5)

伸張性収縮 3 日後におけるミトコンドリア Ca<sup>2+</sup>ユニポーター量は、雄性では変化しなかったが、雌性では安静脚と比較し刺激脚で増加した（実験1）。これについて、OVX 群では変化しなかったが、Sham 群では安静脚と比較し刺激脚で有意に増加し、OVX+E2 群では増加傾向が認められた（実験2）。

##### Experiment 1



##### Experiment 2

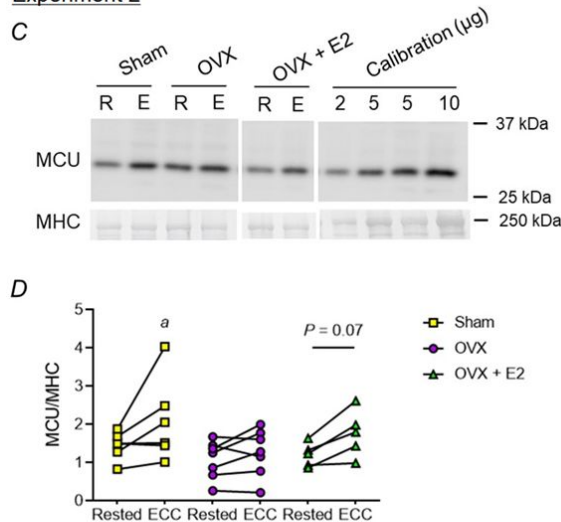


Figure 5. mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter (MCU) content 3 days after eccentric contractions in mouse gastrocnemius muscle. A and C, representative western blots. B, MCU content in experiment 1. Individual values are shown as dot and the values from same rat were connected by line. D, MCU content in experiment 2. Individual values are shown as dot and the values from same rat was connected by line. <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. Rested.

#### (5) 研究全体の総括

伸張性収縮後の筋損傷の主たる要因の一つは、細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に伴うタンパク質分解酵素（カルパイン）の活性化にあると考えられている（Kanzaki et al. 2017）。カルパインは筋小胞体と横行小管をつなぐタンパク質（ジャンクトフィリン）を基質とし、横行小管から筋小胞体への情報伝達を阻害し、筋収縮力を低下させる。

実験1の結果、1) 伸張性収縮負荷3日後において、雌と比較し雄では筋収縮力が著しく低下すること、2) この原因の一つはジャンクトフィリンが分解されることにあること、3) 雌ではミトコンドリアの Ca<sup>2+</sup>取り込み機能の亢進が生じジャンクトフィリンの分解を抑制していることが明らかとなった。

実験2の結果、1) エストロゲンが欠如すると、雌であっても伸張性収縮負荷3日後において筋収縮力が低下すること、2) エストロゲンはミトコンドリアの Ca<sup>2+</sup>取り込み機能を亢進するために必要であることが明らかとなった。

以上から、1) 雌性ではエストロゲンが供給されることで、細胞内環境に応じてミトコンドリア

アの適応が生じること、2) このことが雄性と比較し雌性では運動後の筋損傷が生じにくい理由の一つであることが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Daiki, Hatakeyama Koji, Ikegami Ryo, Eshima Hiroaki, Yagishita Kazuyoshi, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 128
2. 論文標題 Sex differences in mitochondrial Ca <sup>2+</sup> handling in mouse fast-twitch skeletal muscle in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00230.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitaoka Yu, Watanabe Daiki, Nonaka Yudai, Yagishita Kazuyoshi, Kano Yutaka, Hoshino Daisuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Effects of clenbuterol administration on mitochondrial morphology and its regulatory proteins in rat skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14266	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Daiki Watanabe, Ryo Ikegami, Yutaka Kano
2. 発表標題 Sex differences in prolonged low-frequency force depression after eccentric contractions
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daiki Watanabe, Hatakeyama Koji, Ikegami Ryo, Eshima Hiroaki, Yutaka Kano
2. 発表標題 Sex difference in mitochondria Ca <sup>2+</sup> handling properties in mouse skeletal muscle
3. 学会等名 Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	狩野 豊  (Kano Yutaka)  (90293133)	電気通信大学・情報理工学研究科・教授	
研究協力者	池上 諒  (Ikegami Ryo)  (70881770)	健康科学大学・健康科学部・助教	