

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 26 日現在

機関番号：32717

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350821

研究課題名(和文) 遅発性筋痛の発症・治癒へのエストロゲンの関与

研究課題名(英文) The effect of estrogen on the recovery process of damaged skeletal muscles

研究代表者

桜井 智野風 (Sakurai, Tomonobu)

桐蔭横浜大学・スポーツ科学研究科・教授(移行)

研究者番号：30235220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：雄ラットへのエストロゲン投与の有無によって、筋損傷の修復過程で早期からHSP70発現を促進することがわかった。また、HE染色による筋断面画像の比較により、損傷筋の損傷度合が減少することからエストロゲン投与が損傷を抑制し、筋損傷治癒に要する期間を短期にさせる働きがあることを立証することができた。このことから筋損傷治癒過程には女性ホルモンが影響している可能性が示唆された。今後は雌ラットの卵巣除去を行うとともに、筋線維タイプ別でのHSP70発現の比較を行い、より長期的に筋損傷過程を観察することが必要と考える。

研究成果の概要(英文)：This study investigates gender differences in the damaged muscle recovery process by observing the relationship between the female hormone estrogen and HSP70 in damaged skeletal muscles. Damaged muscles were created by administering 0.5% bupivacaine hydrochloride (BPVC) to the tibialis anterior muscle (TA). Fourteen-week-old male Wistar rats were divided into four groups, i.e., a control group (Group C), an estrogen-administered group (Group E), a BPVC-administered group (Group B), and a group that received both estrogen and BPVC (Group EB). HSP70 expression was measured by Western blot analysis of homogenized TA. At 5 days after BPVC administration, the HSP70 expression level in TA was markedly higher in Group EB than that in Group B. These results demonstrated that HSP70 expression was promoted early in the damaged muscle recovery process in male rats that received estrogen, suggesting a possible difference between males and females in the recovery process of damaged muscles.

研究分野：運動生理学

キーワード：骨格筋 損傷 治癒 エストロゲン HSP

1. 研究開始当初の背景

筋運動等の機械的な刺激により骨格筋は損傷をうけるが、近年その修復過程における女性ホルモンの働きが注目されている。

女性ホルモンは、男性と比較して女性の体内で多く分泌され、その影響は女性の身体に様々な形で現れる。特に、女性ホルモンの1つであるエストロゲンは、分泌されると子宮内膜を厚くさせ妊娠を成立させ、月経の開始などの2次性徴を起こす。

骨格筋においては、運動誘発性の筋膜損傷に対して保護作用があり、好中球やマクロファージの過剰な活性の抑制、抗酸化的な性質ももっている。骨格筋の損傷修復に関わっている¹⁾。また、身体へのストレスである筋運動は、体温上昇や骨格筋の損傷を引き起こす HSP70 (ストレス蛋白) 生産を促す。HSP70 は HKP とも呼ばれ、高保存性ストレスたんぱく質の系統としてほぼ全ての生物に存在し²⁾、熱ショック・虚血・参加ストレス・たんぱく質の変性時など様々なストレスにより体内で合成される³⁾。平常時は分子シャペロンとして体内で機能するが、運動を行うことにより発現が促進される。骨格筋における HSP70 の効果については、ラットなどの動物実験では、熱ストレスを用いたプレコンディショニングによる HSP 誘発が骨格筋の虚血-最流によるミトコンドリア損傷を防いで細胞の壊死に対して有効であることや、伸張性の筋収縮あるいは、過度の運動によって骨格筋の損傷を受けるが、その後の損傷後を受けない程度に運動を行った後では筋が損傷を受けにくくなることが知られている。これには small HSPs が一部関与することが示唆されている⁴⁾。通常伸張性の収縮によって筋の微細構造であるジストロフィンやデスミンの消失が起きて収縮力の低下が起きるが、トレーニングなどによって smallHSP である α Bクリスタリン (α BC) や HSP25 などが増大した状態では、その働きにより筋原線維の微

細構造が維持される為に、収縮力の低下が軽減されると考えられている。

この HSP70 発現にエストロゲンが関与していることは既に研究がなされている。Zain ら²⁾の研究では、雄ラットおよびエストロゲン投与した雄ラットの内側広筋における運動の 24 時間後の HSP70 発現を比較したところ、エストロゲン投与雄ラットに比べ、何も投与しない雄ラットで HSP70 発現が著しく高かった²⁾。

また Bombardier ら⁵⁾は、卵巣切除した雌ラットおよび卵巣接してしたのちにエストロゲンを投与した雌ラットのヒラメ筋で平常時および運動 24 時間後での HSP70 の発現には差があり、特に筋繊維タイプに影響を受けるという結果を得ている。またエストロゲンによる HSP70 の発現は、平常時には発現を促進、運動後には抑制し、それらは特にタイプ I 線維で著しかったと報告している。

これらの参考研究により、エストロゲンの HSP70 への関与が運動の変化に伴うものだと考えられる。よって、運動による HSP70 の発現が変化することから、損傷を受けた骨格筋の修復過程においても、その発現にエストロゲン等が影響していると考えられる。

そこで本研究では、動物実験等において損傷筋の修復過程においても発現が確認されていることから、エストロゲンへの影響が考えられる^{6,7)}。

2. 研究の目的

筋運動等の機械的な刺激により骨格筋は損傷をうけるが、近年その修復過程における女性ホルモンの働きが注目されている。女性ホルモンの1つであるエストロゲンは、骨格筋において運動誘発性の筋膜損傷に対して保護作用があり、好中球やマクロファージの過剰な活性の抑制、抗酸化的な性質ももっている。筋運動は体温上昇や骨格筋の損傷を引き起こす HSP70 生産を促す。HSP70 はほぼ全て

の生物に存在するタンパク質である。常時は分子シャペロンとして体内で機能するが、運動を行うことにより発現が促進される。損傷筋の修復過程においても発現が確認されていることから、エストロゲンへの影響が考えられる。

よって、本研究ではこの HSP70 発現の変化を指標とし、先行研究^{2,5)}を参照とし、損傷をうけた骨格筋の修復過程においてエストロゲンの性ホルモンの影響を考察する。また、損傷を引き起こした骨格筋における HSP70 とエストロゲンの関連性及び損傷筋の修復過程を検討する。

3. 研究の方法

実験動物および飼育環境

Wistar ラット (オス 14 週齢) (体重 280-320g) を用いた。コントロール群 (C 群) (n=2)、エストロゲン投与群 (E 群) (n=2)、BPVC 投与群 (B 群) (n=6)、エストロゲン及び BPVC 投与群 (EB 群) (n=6)、計 16 匹を用いる。水と飼料は自由摂取とした。また、飼育環境は室温 22 ± 2 に常時維持し、照明は 12 時間の明暗サイクルとした。エストロゲン投与開始してから損傷筋の採取を行うまで、毎回エストロゲン投与前に体重を量った。

すべての実験プロトコルは、桐蔭横浜大学動物倫理委員会規定に従って行った。

エストロゲン投与

E 群および EB 群には、 β -estradiol 3-benzoate (SIGMA) 1 匹あたり 40ug/kg をオリーブオイル (AJINOMOTO) に溶解させ計 1ml としたものを、ラットの首の後ろに 12 日間皮下投与した。C 群および B 群にはオリーブオイルのみ 1ml を 12 週間皮下投与した。

今回のエストロゲン投与量の決定は、成熟したメスラットにおけるエストロゲン濃度の平均値とおよそ同量になるように調整された値である。

筋損傷作成

ペントバルビタール(共立製薬株式会社)を 1 匹当たり 50ml/kg、腹腔内投与した麻酔下で行った。B 群 EB 群にはエストロゲン投与 5 日後に麻酔下で右足の前脛骨筋に 0.5%塩酸ブピバカイン (bupivacaine hydrochloride) (SIGMA) 5ml を 3 箇所に分け注射し、筋損傷を作成した。処理後、ゲージに戻し覚醒するまで保温した。今回使用した塩酸ブピバカイン (BPVC) は長時間作用性の局所麻酔剤で、神経膜のナトリウムチャンネルをブロックし、神経における活動電位の伝道を可逆的に抑制し、一時的に知覚神経及び運動神経を遮断する。

また、本剤は筋細胞膜を破壊することで注入箇所強い壊死を引き起こすが、筋細胞の基底膜、血管、末梢神経、神経接合部は破壊されないため、速やかで完全な再生筋を得ることができる。さらに再生線維形態は均一で再現性があるため、生化学的分析など量的検討を行うのに適している。

筋サンプル採取

損傷筋作成 3、5、7 日後のラットをそれぞれ麻酔下で失血死させたのち前脛骨筋を採取した。C 群と E 群は損傷筋作成 3 日後のラットと同時に作成した。採取した筋は筋湿重量測定後、直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結を行ったのち、 -80°C にて凍結保存した。解剖点の被験動物は 15 終齢だった。

Western Blotting

SDS-PAGE で分離したゲルから PVDF メンブレンのタンパク質のプロットングは 1.5ℓ の Transfer buffer (10 × Tris-Glycine) 中で行った。あらかじめゲルと同じ大きさに切った PVDF (7.5 × 10.5 cm) を用意した。電気泳動終了後、ゲルをテンプレートから外し、Transfer

buffer に浸漬させた。陰極側から、パット・ろ紙・ゲル・メンブレン・ろ紙の順でサンドイッチ板を閉じた。これを Transfer buffer の入った Transfer 槽(Model525BR BIO-RAD 社) にセットし、20V の低電圧で、18~20 時間電気転写を行った。

ブロッキング終了後、メンブレンを取り出し、ゼラチン末 (関東化学) 5%を添付した TBS-T (KCl, NaCl, Tris-base, Tween20) で 1 時間ブロッキングした後、5000 倍希釈した 1 次抗体の HSP70 抗体 (Purified Mouse Anti-Hsp70) を室温で 1 時間浸漬し、TBS-T でメンブレンを洗浄 (15 分 × 1 回、5 分 × 3 回) し、10000 倍希釈した 2 次抗体 (HPP Goat Anti-mouse Ig) を添加し、室温で 1 時間浸漬し、再び TBS-T で洗浄 (15 分 × 1 回、5 分 × 3 回) し、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) をメンブレンに浸した。クリアポット (OPP, 約 95 × 130 mm) でシーリングし、Light-Capture (ATTO) で目的抗体シグナルを検出した。

検出したバンドはパーソナルコンピュータに取り込み、画像分析ソフト CS Analyser を用いて、各サンプルのバンドと毎回スタンダードとして泳動したサンプルとの量比を算出した。

HE 染色

前処置として脱パラフィンを行う。キシロール (10 分間 × 2) 、100%エタノール(1 分間 × 2)、95%エタノール (1 分間 × 2) 、70%エタノール (1 分間 × 2) にそれぞれ浸透させた後、水を変えながら流水洗を 5・6 回行う。脱パラフィンを行い水洗した後に、ヘマトキシリンを 5~15 分 浸透させる (各種のヘマトキシリン液により時間を調節する)。水洗を数回行い、1.0%塩酸アルコールに 5~20 秒浸透させ分別させ、流水洗は 10~20 分行い色出しを行う。エオジンは 2~30 分浸透させ、数回水洗し、70%アルコール(5 秒・5 分)、

100%アルコール(1 分 × 3 回)、フェノール・キシレン(1 分 × 1 回)、キシレン(2 分 × 2 回) の順で洗浄した後封入 (エンテランキシレン) した。

筋サンプルは、C 群および E 群ともに飼育から 9 日目に採取したものをを用い、B 群および BE 群はプロピバカイン投与 3 日目(B3)、5 日目 (B5) 、7 日目 (B7) に採取したものを染色した。

HE 染色⁸⁾は、光学顕微鏡で全体像を確認することができ、細胞核を紫色に、細胞質を赤色に染めることができる。染色法の中で最もヘマトキシリン・エオジン重染色法であり、染色法がほとんどすべての染色の中心をなすものであって、病理組織学に絶対欠かせない染色法であるものであることから選定した。

4 . 研究成果

4-1 結果

体重の変化

各群それぞれ平均値をその日の体重とした。エストロゲン投与群に減少傾向がみられ、全群の BPVC 投与時に体重が減少したが、それ以外で大きな変化はなかった。

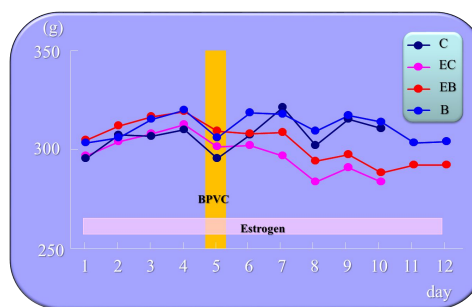


Fig.1. 12 日間の実験動物の体重の変化

筋湿重量の変化

C 群および E 群、B3 群および EB3 群、B5 群および EB5 群、B7 群および EB7 群の間での非投与筋および BPVC 投与筋それぞれの筋湿重量に差はなかった。BPVC 投与 3 日後に

においては、B3 群および BE3 群ともに一時的に筋湿重量が増加した。しかし、その後減少し、投与 7 日目には投与前よりも値が低かった。非投与筋においては全ての群に差はなかった。

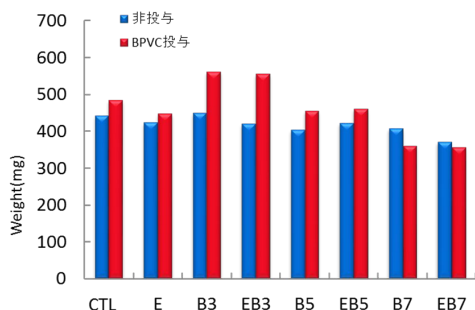


Fig.2. 7日間の実験動物の筋湿重量の変化

HSP70 タンパクの発現

C 群および E 群においては HSP70 発現量に差はなかった。BPVC 投与 3 日目、EB 群でのみ HSP70 の発現がみられ、5 日目にピークに達し 7 日目には減少した。BPVC 投与 5 日目 (B5) に HSP70 発現がみられ、7 日目 (B7) にはさらに増加した。EB 群については 5 日目がピークと考えられるが、B 群については発現が 7 日目まで遅延した。

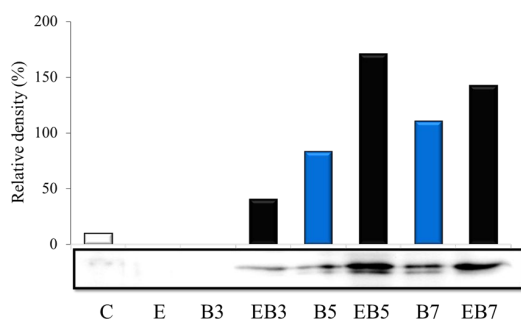


Fig.3. HSP70 タンパク発現

HE 染色による筋断面画像

B 群では投与から 3 日目 (B3) から筋細胞の損傷が確認でき、5 日目 (B5) に損傷細胞が最も多くなり、7 日目 (B7) には損傷細胞が低下した。EB 群では、3 日目 (EB3) に損傷を確認することができ、5 日目 (EB5) も 3

日目と同等の損傷細胞の割合であり、7 日目 (EB7) には損傷細胞が減少した。

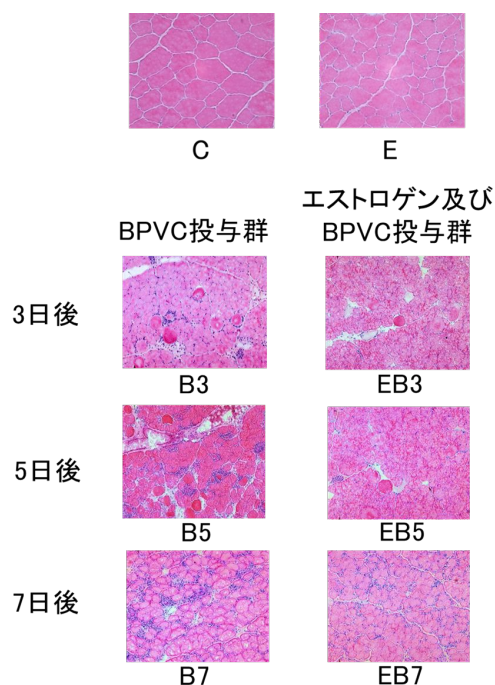


Fig4. HE 染色による筋断面画像

4-2 考察

本研究では雄ラットを使用し、平常時と損傷後の骨格筋においてエストロゲン投与の有無が HSP70 発現へ与える影響を検討した。結果より、EB5 の HSP70 発現が他の群と比較して著しく高かった。これは B5 群と比較してわかるように、エストロゲンが影響していると考えられる。B 群は BPVC 投与から 7 日目まで HSP70 発現が増加傾向にあるが、EB 群は 5 日目に発現が著しく高いことから、エストロゲンは骨格筋損傷後早期から発現を促進する可能性が考えられる。また、HE 染色による筋断面画像で損傷割合を B 群と EB 群を比較した場合 EB 群は細胞の損傷割合が低いことから、エストロゲン投与を行うことで HSP70 の発現を高め、損傷を抑制し、修復期間も短期的にすることが可能であると考えられる。

卵巣切除した雌ラットにエストロゲン投与を行うと平常時の HSP70 発現を促進し運動 24 時間後の HSP70 発現を抑制することが

報告されている。しかし本研究ではE群ではHSP70発現がみられずC群でHSP70発現がみられたことにより、平常時のHSP70発現を促進するという結果は得られなかった。これは雄ラットにエストロゲン投与を行ったため、エストロゲンの影響だけではなく男性ホルモン、または他の影響が関与している可能性があるため、同様の結果が得られなかったと考えられる。また、今回使用した骨格筋は前脛骨筋 (Type I) の速筋線維であることから、HSP70の発現は筋線維タイプの影響を受け、Type Iで顕著である。よって今回の対象筋に Type I を用いたことがその一因である可能性がある。

本研究での課題として、今回対象筋として扱ったのが Type I であり、Type II の HSP70 発現を検討しなかったこと、雄ラットにエストロゲン投与したことによる性ホルモンの他の影響が考えられること、損傷筋作成後の HSP70 発現を作成後から 7 日目までしか観察していないため、7 日目以降の免疫組織学的な知見からは損傷筋を考察していないことなどが挙げられる。よって、7 日目以降の観察を行う必要がある。

4-3 引用文献

- 1) Liu Y, Gampert L, Nething K, Steinacker JM. response and function of skeletal muscle heat shock protein 70. *Front Biosci*. 2006; 11:2802-2,2006
- 2) Garramone RR Jr, Winters RM, Das DK, Dechers PJ. Reduction of skeletal muscle injury through stress conditioning using the heat-shock response. *Plast reconstr surg*,93:1242-1247,1994.
- 3) Lepore DA, Hurley JV, Stemart AG, Morrison WA, Anderson PL. Prior heat stress improves

survival of ischemic-reperfused skeletal muscle in vivo. *Muscle Nerve*,23:1847-1855,2000

4) P.M. Tiidus, N.M. Bestic, R. Tupling. Estrogen and Gender Do Not Affect Fatigue Resistance of Extensor Digitorum Longus Muscle in Rats. *Physiol. res.*48:209-213,1999

5) E. Bombardier, C. Vigna, S. Iqbal, P.M. Tiidus, and A. R. Tupling Effects of ovarian sex hormones and downhill running on fiber-type-specific HSP70 expression in rat soleus. *J Appl Physiol* 106:2009-2015,2009

6) 横関 利子、山川 純ら、「マウス骨格筋に及ぼす性ホルモンの影響の組織化学的研究 : III. 卵巣摘出マウスに対するエストロゲンならびにプロゲステロンの作用 : 運動生理学的研究 I」, *体力科学* 32(6), 410, 1983.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

T. Sakurai Mechanisms of skeletal muscle damage, repair, and regeneration. *JPFMS* submitted 2017

〔学会発表〕(計 2 件)

T. Sakurai, The effect of estrogen on the recovery process of damaged skeletal muscles –Using HSP70 as a marker–, 20th Annual Congress of the European College of Sport Science (Malmö University, Malmö, Sweden) 平成 27 年 6 月

桜井智野風, 石橋祐理子, 櫻村修生: 女性ホルモンが骨格筋ダメージの修復に及ぼす影響、第 71 回日本体力医学会大会(盛岡) 平成 28 年 9 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜井智野風 (Sakurai Tomonobu)

桐蔭横浜大学・スポーツ科学研究科・教授
研究者番号: 30235220