

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

順天堂大学 洪 永 豊
(共同研究者) 大阪工業大学 石 道 峰 典
順天堂大学 町 田 修 一

The Molecular Mechanisms of Exercise on Skeletal Muscular Water and Prevention of Postmenopausal Sarcopenia

by

Yung-Li Hung, Shuichi Machida
Juntendo Univ.
Minenori Ishido
Osaka Institute of Technology

ABSTRACT

We investigated the effects of estrogen on AQP4 and NKCC1 in the skeletal muscle by using estrogen-deficient animals following resistance exercise training. Female adult rats (10 weeks old) were divided into the following 6 groups: sham sedentary, sham climbing training, ovariectomy sedentary, ovariectomy climbing training, ovariectomy plus estrogen treatment sedentary, and ovariectomy plus estrogen treatment climbing training groups. The estrogen deficiency is caused by the ovariectomy. After 8 weeks of climbing training, the weight of the flexor hallucis longus (FHL) muscles were significantly increased in the sham climbing training group but not in the ovariectomy climbing training group. On the contrary, ovariectomy plus estrogen treatment resulted in exercise-induced muscle hypertrophy. AQP4 and NKCC1 protein expressions tended to be decreased after ovariectomy, and the estrogen treatment reversed this decrease

of AQP4 and NKCC1 in ovariectomized animals. Nevertheless, these differences regarding protein expression among the groups were not significant. Therefore, these data suggest that estrogen regulated exercise-induced muscle hypertrophy but did not affect the expressions of AQP4 and NKCC1 in the skeletal muscle.

要 旨

本研究では、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のAQP4とNKCC1に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。10週齢雌ラットを偽処置群、偽処置運動群、卵巣摘出群、卵巣摘出運動群、卵巣摘出+エストロゲン投与群、卵巣摘出+エストロゲン投与運動群の6群に群分け、卵巣摘出60日後からトレーニングおよび投与後を実施した。8週間後、長母趾屈筋を摘出し、ウェスタンブロット法でAQP4とNKCC1のタンパク質を検出した。トレーニングによって偽処置運動群では長母趾屈筋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、エストロゲンを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有意な増加が認められた。エストロゲン状態およびトレーニングによって骨格筋のAQP4とNKCC1タンパク質発現量に影響が生じる可能性が示唆されたが、有意な変化は認められなかった。本研究の成果より、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タンパク質の関与は少ない可能性が示唆された。

緒 言

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¹⁾、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²⁾。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³⁾。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⁴⁾。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⁵⁾。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⁶⁾。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。

筋線維内水分量の制御には、水チャンネルであるアクアポリン4（aquaporin-4, AQP4）とイオンチャンネルである $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ 共輸送体1（NKCC1）が重要なチャンネルとして知られている。AQP4とNKCC1の2つのチャンネルは遅筋線維よりも速筋線維の発現量が多いことが特徴である^{7,8)}。AQP4は筋線維内外の水分子の移動を制御するこ

とで浸透圧の調節に寄与している。除神経による筋萎縮では、AQP4の減少が認められている⁹⁾。また、顕著な筋萎縮が認められるデュシェンヌ型筋ジストロフィーの骨格筋では、AQP4が減少し¹⁰⁾、筋線維内水分量の低下が報告されている¹¹⁾。一方、NKCC1は細胞内にNa⁺とK⁺及びCl⁻を取り込み浸透圧の調節を行うことで骨格筋の水分子移動の制御に関与している¹²⁾。最近、NKCC1阻害薬であるループ利尿薬服用によって、サルコペニア発症リスクが高くなることが報告されている¹³⁾。以上より、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AQP4とNKCC1の2つのチャンネルがサルコペニア発症に関与する可能性が考えられる。

サルコペニアの予防・改善には運動が重要である。興味深いことに、運動トレーニングによって骨格筋内のAQP4のタンパク質発現量が増加することが報告されている¹⁴⁾。さらに、過負荷によって肥大した骨格筋においても、AQP4のタンパク質発現量が増加する¹⁵⁾。一方、運動トレーニングによって骨格筋のNKCC1のタンパク質発現量が増加することも認められている。さらに、NKCC1阻害剤は、マウスの運動性筋肥大を抑制することが報告されている¹⁶⁾。以上の知見より、運動トレーニングによってAQP4とNKCC1の2つのチャンネルの発現量が増加し、筋線維の大きさ(サイズ)を調整している可能性が示唆されている。しかし、サルコペニアや閉経後の女性を対象にした場合、すなわち、エストロゲンの分泌が低下した状態での運動トレーニングが骨格筋のAQP4とNKCC1に及ぼす影響は明らかではない。そこで本研究では、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のAQP4とNKCC1に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

1. 方法

1. 1 実験動物

8週齢のF344雌性ラット(n = 18)を日本チャールス・リバー株式会社から購入した。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運動(OVX+E-CT)群(n = 3)。なお、本実験は順天堂大学動物実験委員会によって承認された(H29-01)。

1. 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、3cm程度の切り込みを入れ、卵巣を摘出した。摘出後は、滅菌済み縫合用糸を用いて止血し、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。

1. 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(ナカライデスク株式会社)を挿入した。8週間のエストロゲン投与を行った。

1. 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¹⁷⁾。

1. 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。

1. 6 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ー T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてビーズ破砕機でホモジナイズした。遠心分離(12,000rpm, 10分, 4℃)後に上清を回収し、タンパク質濃度をBCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) で測定した。その後、サンプルバッファー (Bio-Rad Laboratories) 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、一次抗体として、AQP4 (Abcam) と、NCKK1 (Abcam) をそれぞれ4℃で一晩反応させた。その後、室温で二次抗体を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。

1. 7 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。

2. 結果

2. 1 体重と最大負荷重量

体重を図1に示す。OVX-Sed群はSham-Sed群より有意な体重の増加を認めた。OVX+E-Sed群とOVX-Sed群は体重の有意な差を認められなかった。8週間20回のクライミング運動によって最大負荷重量が約3倍の増加を認めた(図2)。Sham-CT群はOVX-CT群とOVX+E-CT群より、最大負荷重量が高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

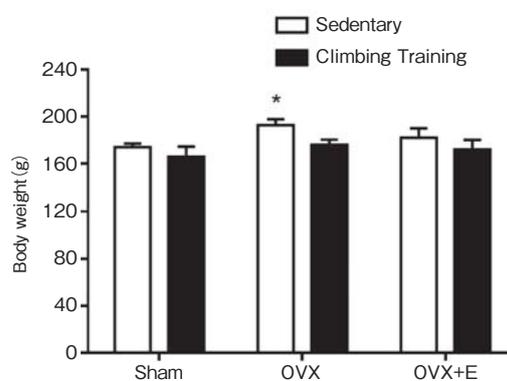


図1 体重

*: vs. Sham sed group, p<0.05

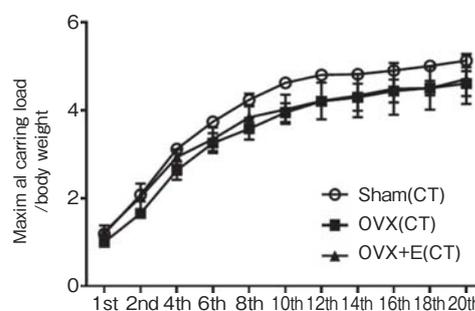
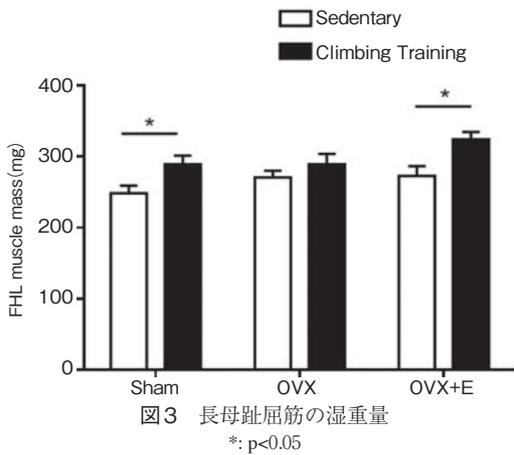


図2 最大負荷変化

2. 2 長母趾屈筋の湿重量

図3は本研究の長母趾屈筋の湿重量の結果を示す。Sham-CT群の筋湿重量は、Sham-Sed群より有意に増加した(16.3%)。OVX-CT群とOVX-Sed群の間では有意な差は認められなかった。OVX+E-CT群は、OVX+E-Sed群より有意に増加した(18.7%)。



2. 3 骨格筋のAQP4とNKCC1のタンパク質発現量

運動トレーニングによって骨格筋のAQP4とNKCC1のタンパク質発現量が増加することが認められている^{14,16)}。骨格筋のAQP4とNKCC1のタンパク質は図4と図5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

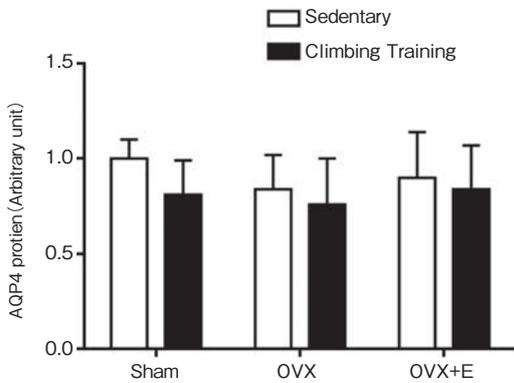


図4 長母趾屈筋のAQP4タンパク質発現量

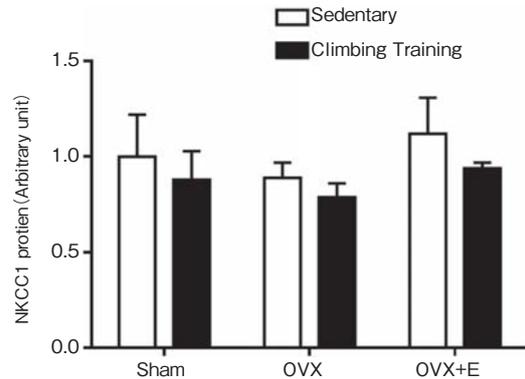


図5 長母趾屈筋のNKCC1タンパク質発現量

ることを認めていたが、運動トレーニングの影響を認められなかった。

3. 考 察

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共に筋線維内水分量が低下することが知られている³⁾。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⁴⁾。閉経後の女性では下半身のむくみ等の水分代謝の不調が認められ、その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。そこで本研究では、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のAQP4とNKCC1に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

本研究では、運動性筋肥大モデルとしてクライミング運動トレーニングを用いた。先行研究では、8週間20回のクライミング運動によって最大負荷重量が287%増加した¹⁷⁾が、本研究においても約3倍の増加を認め(図2)、偽処置運動群において長母趾屈筋の湿重量に増加が認められた。しかし、エストロゲンが低下した状態では、運動性筋肥大が認められなかった。一方、トレーニング期間中にエストロゲン投与を行った群では、筋肥大が認められ、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。

本研究では、エストロゲン状態により骨格筋の水分量を制御するAQP4とNKCC1のタンパク質の発現が影響を受ける可能性が示唆された。本研究ではサンプルサイズが小さかったため、統計的な差は認められなかった可能性があった。先行研究では、持久性運動トレーニングによって骨格筋内のAQP4のタンパク質発現量が増加することが報告されている¹⁴⁾。さらに、自発走運動によって骨格筋のNKCC1のタンパク質発現量が増加することも認められている¹⁶⁾。しかしながら、クライミング運動トレーニングを行った本研究においては、骨格筋のAQP4とNKCC1のタンパク質発現量の影響を認められなかった。AQP4とNKCC1は筋線維において優位に発現する^{7,8)}。このことから、運動トレーニングの種類によって、動員される筋線維タイプによって骨格筋のAQP4とNKCC1のタンパク質発現量に与える影響が異なると考えられた。一方、運動トレーニングを検討した先行研究では、雄性実験動物を用いられていたが、本研究では雌性ラットを用いた。我々の予備実験において、雄性ラットを用いたクライミング運動トレーニングによってAQP4タンパク質発現の増加を認めている（未発表）。今後、クライミング運動トレーニングがAQP4やNKCC1等の水およびイオンチャンネルのタンパク質発現に及ぼす性差の影響については、詳細に検討する必要がある。

4. 結 論

本研究により、エストロゲンは運動性筋肥大に関与することが示唆されたが、骨格筋のAQP4とNKCC1の関与は少ない可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の遂行にご助成賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に心よりお礼申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、デサントスポーツ科学 Vol.41

多大なるご協力を賜りました順天堂大学の棗寿喜特任助教、越智千里さん、小杉力さん、中野大輝さんに深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Aloia J.F., Vaswani A., Flaster E., Ma R., Relationship of body water compartments to age, race, and fat-free mass, *J. Lab. Clin. Med.*, **132**(6) :483-90(1998)
- 2) Vignos P.J. Jr, Lefkowitz M., A biochemical study of certain skeletal muscle constituents in human progressive muscular dystrophy, *J. Clin. Invest.*, **38** (6) :873-81(1959)
- 3) Yamada Y., Schoeller D.A., Nakamura E., Morimoto T., Kimura M., Oda S., Extracellular water may mask actual muscle atrophy during aging, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **65**(5) :510-6(2010)
- 4) Yamada Y., Yoshida T., Yokoyama K., Watanabe Y., Miyake M., Yamagata E. et al., The extracellular to intracellular water ratio in upper legs is negatively associated with skeletal muscle strength and gait speed in older people, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **72**: 293-298(2017)
- 5) Sawai A., Tochigi Y., Kavaliouva N., Zaboronok A., Warashina Y., Mathis B.J. et al., MRI reveals menstrually-related muscle edema that negatively affects athletic agility in young women, *PLoS One*, **13**: e0191022(2018)
- 6) Stachenfeld N.S., Taylor H.S., Effects of estrogen and progesterone administration on extracellular fluid, *J. Appl. Physiol* (1985), **96**(3) :1011-8(2004)
- 7) Frigeri A., Nicchia G.P., Verbavatz J.M., Valenti G., Svelto M., Expression of aquaporin-4 in fast-twitch fibers of mammalian skeletal muscle, *J. Clin. Invest.*, **15**:102(4) :695-703(1998)
- 8) Zhao H., Hyde R., Hundal H.S., Signalling mechanisms underlying the rapid and additive stimulation of NKCC activity by insulin and hypertonicity in rat L6 skeletal muscle cells, *J. Physiol.*, **1**:560(Pt 1) :123-36(2004)
- 9) Ishido M., Nakamura T., Marked decrease of aquaporin-4 protein is independent of the changes in α 1-syntrophin and TRPV4 levels in response to denervation-induced muscle atrophy in vivo, *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **38**(2) :175-181(2017)
- 10) Frigeri A., Nicchia G.P., Repetto S., Bado M.,

- Minetti C., Svelto M., Altered aquaporin-4 expression in human muscular dystrophies: a common feature? *FASEB J.*, **16**(9) :1120-2(2002)
- 11) McDonald C.M., Carter G.T., Abresch R.T., Widman L., Styne D.M., Warden N. et al., Body composition and water compartment measurements in boys with Duchenne muscular dystrophy, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, **84**(7) :483-91(2005)
- 12) Lindinger M.I., Leung M., Trajcevski K.E., Hawke T.J., Volume regulation in mammalian skeletal muscle: the role of sodium-potassium-chloride cotransporters during exposure to hypertonic solutions, *J. Physiol.*, **589**(Pt 11) :2887-99(2011)
- 13) Ishikawa S., Naito S., Iimori S., Takahashi D., Zeniya M., Sato H., Loop diuretics are associated with greater risk of sarcopenia in patients with non-dialysis-dependent chronic kidney disease, *PLoS One*, **13**(2) :e0192990(2018)
- 14) Basco D., Blaauw B., Pisani F., Sparaneo A., Nicchia G.P., Mola M.G. et al., AQP4-dependent water transport plays a functional role in exercise-induced skeletal muscle adaptations, *PLoS One*, **8**(3) :e58712(2013)
- 15) Ishido and Nakamura, Aquaporin-4 protein is stably maintained in the hypertrophied muscles by functional overload, *Acta. Histochem. Cytochem.*, **49**: 89-95(2016)
- 16) Mandai S., Furukawa S., Kodaka M., Hata Y., Mori T., Nomura N. et al., Loop diuretics affect skeletal myoblast differentiation and exercise-induced muscle hypertrophy, *Sci. Rep.*, **7**: 46369(2017)
- 17) Hornberger T.A. Jr, Farrar R.P., Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat, *Can. J. Appl. Physiol.*, **29**(1) :16-31(2004)