

平成30年 4月27日現在

機関番号：33930

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12942

研究課題名(和文) 乳酸は骨格筋の再生に有効か？

研究課題名(英文) Does lactate facilitate regeneration of injured skeletal muscle?

研究代表者

大野 善隆(OHNO, Yoshitaka)

豊橋創造大学・保健医療学部・講師

研究者番号：80440808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳酸が損傷骨格筋の再生過程に及ぼす影響を解明するために、乳酸による損傷骨格筋の応答、乳酸の骨格筋形成への影響を検討した。その結果、乳酸は損傷骨格筋の筋重量の増大を引き起こすと共に、筋衛星細胞数の増加を引き起こすことが確認された。また、乳酸は筋管細胞の直径や核数、Erk1/2シグナルの活性化を引き起こすことが確認された。したがって、乳酸は損傷骨格筋の再生を促すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the effects of lactate on the regeneration of injured skeletal muscle. Cardiotoxin (CTX) was injected into mouse tibialis anterior (TA) muscle. Oral administration of sodium lactate increased the muscle weight and number of Pax7-positive nuclei in CTX-injected TA muscle. Mouse myoblast C2C12 cells were differentiated to form myotubes. Lactate was administered to the differentiation medium. Lactate administration increased the diameter of C2C12 myotubes in a dose-dependent manner. Lactate administration also increased myonuclei number and upregulated the p42/44 extracellular signal-regulated kinase-1/2 (Erk1/2) signaling. These observations suggest that lactate may have a positive effect on the regeneration of injured skeletal muscle.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：骨格筋 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨格筋は可塑性に富んだ器官であり、運動(筋活動)量の増減に適応して構造的・機能的に変化する。安静臥床など不活動は筋萎縮だけでなく、損傷筋の再生遅延を引き起こす一方、運動など活動量増加は筋再生を促進させることが報告されている。このように損傷骨格筋の再生は筋活動量の影響を受けることが報告されているが、そのメカニズムには不明な点が多い。

(2) 損傷骨格筋の再生には、骨格筋組織幹細胞である筋衛星細胞が重要であると考えられている。筋活動量の増減に伴う筋衛星細胞の活性応答が筋再生調節に関わると考えられているが、そのメカニズムは未解明である。損傷筋の回復を目指す運動器リハビリテーションの発展のために、筋衛星細胞活性化のメカニズム解明は重要な研究課題である。

(3) 乳酸は骨格筋細胞から分泌される。近年、乳酸により筋衛星細胞の調節因子が増加することが報告された。しかしながら、乳酸が損傷骨格筋の再生に及ぼす影響は未解明である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、乳酸が損傷骨格筋の再生過程に及ぼす影響を解明するために、実験動物を用いた損傷骨格筋モデルを作成し、乳酸による損傷骨格筋の応答を検討した。

(2) 骨格筋再生時には筋衛星細胞由来の筋芽細胞が融合し、筋管細胞を経て新たな筋線維が形成される。そこで実験の対象に、培養骨格筋細胞を用い、乳酸が筋芽細胞の融合ならびに筋管細胞の形成に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

本研究は動物実験ならびに培養細胞実験の2つの実験系により構成された。

本研究における動物実験は、所属機関における動物実験に関する規程に従い、所属機関の動物実験委員会による審査・承認を経て実施された。

(1) 動物実験では、雄性マウス(C57BL/6J)を用い、前脛骨筋を対象筋とした。マウスを対照群と乳酸刺激群に分類した。全てのマウスは気温約23℃、明暗サイクル12時間の環境下で飼育された。なお、実験期間中マウスは自由に餌および水を摂取できるようにした。

筋損傷モデルの作成

麻酔下にて、マウスの前脛骨筋にカルディオトキシン(cardiotoxin, 0.1 mL、10 μmol/L)を注射して筋損傷および筋再生を

惹起させた。

乳酸ナトリウムの投与

乳酸刺激群のマウスには、カルディオトキシン注射後、乳酸ナトリウム(乳酸)を、ゾンデを用いてマウスに経口投与(1000mg/kg体重、週5回)した。

対照群には同量の水を投与した。

骨格筋量

カルディオトキシン注射後1および2週目に、マウスの体重を測定した後、マウス後肢より前脛骨筋を摘出した。筋周囲の結合組織を除去した後、筋重量を測定し、液体窒素およびイソペンタンを用いて急速凍結して保存した。体重あたりの筋重量を算出し、骨格筋量の変化を評価した。

筋衛星細胞数

Pax7を指標に前脛骨筋組織における筋衛星細胞数を評価した。凍結した筋組織を薄切し、凍結切片を作成した。免疫組織学的手法を行い、抗Pax7抗体、抗Laminin抗体によりPax7陽性核、基底膜を検出した。さらに、核をDapi(4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)により染色した。Pax7は筋衛星細胞の核に特異的に発現するタンパク質であり、基底膜下のPax7陽性核が筋衛星細胞と判定できる。筋細胞あたりのPax7陽性核を算出し、筋衛星細胞数の変化を評価した。

(2) 培養細胞実験では、マウス筋芽細胞由来C2C12を用いた。タイプコラーゲンがコーティングされた培養プレートを用い、C2C12を増殖培地にて培養しサブコンフルエント状態にまで増殖させた。その後、分化培地に交換して培養することで筋管細胞に分化させた。

乳酸刺激群には乳酸(0~20 mM)を分化培地に添加して培養した。対照群には同量の水を添加した。

筋管細胞直径

乳酸添加後に筋管細胞を顕微鏡下で観察および撮影した。画像解析ソフトウェアImage Jを用い、筋管細胞の直径を計測した。

筋タンパク質量

乳酸添加後にC2C12筋細胞を、タンパク質抽出液を用いてホモジネートし、Bradford法によりタンパク質量を測定した。

筋管細胞内核数

乳酸添加後に免疫組織学的手法を行い、筋管細胞を抗Myosin抗体、核をDapiにより染色した。蛍光顕微鏡下で撮影した細胞像において、筋管細胞内の核数を測定し、評価した。

Erk1/2、p90RSKリン酸化レベル

乳酸添加後に C2C12 筋細胞を、protease inhibitor と phosphatase inhibitor を含むタンパク質抽出液を用いてホモジネートした後、Bradford 法によりタンパク質量を測定した。

さらに、得られた試料を用いて、ウェスタンブロット法により、骨格筋の形成に関わる細胞内シグナル伝達因子である p42/44 extracellular signal-regulated kinase-1/2 (phosphorylated Erk1/2、total Erk1/2) と p90 ribosomal S6 kinase (phosphorylated p90RSK、total p90RSK) の発現量を測定した。全タンパク質 (total Erk1/2、total p90RSK) に対するリン酸化タンパク質 (phosphorylated Erk1/2、phosphorylated p90RSK) の割合から相対的リン酸化レベルを算出し、評価した。

4. 研究成果

(1) 乳酸が損傷骨格筋の応答に及ぼす影響

骨格筋量

カルディオトキシン注射および乳酸投与によるマウスの体重の変化は認められなかった。カルディオトキシン注射後に、前脛骨筋の重量の減少が認められた。実験期間中に筋重量の増加が認められた。一方、乳酸投与により、前脛骨筋の重量の増加が促進された。体重あたりの筋重量も乳酸の投与により、有意な増加が認められた。

筋衛星細胞数

カルディオトキシン注射後 1 週目に、前脛骨筋の筋衛星細胞数の有意な増加が認められた。さらに、乳酸投与は筋衛星細胞数の増加を促進させた。

以上の実験動物を用いた検討により、乳酸は筋損傷後の筋重量の回復および筋衛星細胞の増殖を促進することが示唆された。

(2) 乳酸が筋芽細胞の融合ならびに筋管細胞の形成に及ぼす影響

筋管細胞直径、筋タンパク質量、筋管細胞内核数

分化培地への乳酸添加量の増加に伴い、筋管細胞直径および筋タンパク質量が有意に増加した。乳酸添加により筋管細胞内核数も有意に増加した。

Erk1/2、p90RSK リン酸化レベル

乳酸添加後に Erk1/2 リン酸化レベルおよび p90RSK リン酸化レベルの有意な増加が認められた。

以上の培養細胞を用いた検討により、乳酸は Erk1/2 シグナルを活性化させることで、骨格筋の形成を促すことが示唆された。

本研究の検討により、乳酸は損傷骨格筋の筋重量の増大を引き起こすと共に、筋衛星細胞数の増加を引き起こすことが確認された。また、乳酸は筋管細胞の直径や核数、Erk1/2 シグナルの活性化を引き起こすことが確認された。したがって、乳酸は損傷骨格筋の再生を促すことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Ohno Y, Matsuba Y, Hashimoto N, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K, Suppression of myostatin stimulates regenerative potential of injured antigravitational soleus muscle in mice under unloading condition、International Journal of Medical Sciences、査読有、13、2016、680-685 DOI:10.7150/ijms.16267.

Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Yasuhara K, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Okita M, Origuchi T, Goto K, Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading、Acta Physiologica、査読有、217、2016、325-337 DOI:10.1111/apha.12692.

Egawa T, Ohno Y, Goto A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Hayashi T, Goto K, Caffeine affects myotube size as well as regulates protein degradation and protein synthesis pathways in C2C12 skeletal muscle cells、Journal of Caffeine Research、査読有、6、2016、88-96 DOI:10.1089/jcr.2015.0034.

Egawa T, Tsuda S, Goto A, Ohno Y, Yokoyama S, Goto K, Hayashi T, Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in mice、The British journal of nutrition、査読有、117、2017、21-29 DOI:10.1017/S0007114516004591.

[学会発表](計4件)

大野善隆, 後藤勝正, 微弱電流刺激が筋再成長に伴う細胞膜タンパク質の変化に及ぼす影響、第 51 回日本理学療法学会大会、2016 年

大野善隆，横山真吾，江川達郎，杉浦崇夫，大平充宣，吉岡利忠，後藤勝正、骨格筋量の調節における乳酸受容体の役割、第 71 回日本体力医学会大会、2016 年

大野善隆，横山真吾，後藤勝正、乳酸刺激による Erk1/2 の活性化が骨格筋肥大に及ぼす影響、第 52 回日本理学療法学術大会、2017 年

大野善隆，安藤孝輝，伊藤貴史，須田陽平，松井佑樹，横山真吾，江川達郎，後藤勝正、筋衛星細胞の活性化に乳酸が及ぼす影響、第 72 回日本体力医学会大会、2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 善隆 (OHNO, Yoshitaka)

豊橋創造大学・保健医療学部・講師

研究者番号：80440808