

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：12612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K13184

研究課題名(和文) 筋収縮によって筋細胞間を移動する代謝産物のバイオイメージング

研究課題名(英文) Bioimaging of metabolite transported between muscle cells by contraction.

研究代表者

田中 嘉法 (Tanaka, YOSHINORI)

電気通信大学・大学院情報理工学研究科・研究員

研究者番号：40791249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：筋収縮によって産生された乳酸は、隣接する筋線維において利用される機構の存在が報告されているが、筋収縮後の細胞外環境で生じる高乳酸塩状態の生理学的な役割は明らかとなっていない。本研究は、細胞外高乳酸塩濃度の環境下で筋収縮を負荷した際の細胞内pH及び乳酸濃度、筋発揮張力の関係性を検証した。細胞外の高乳酸レベルは安静時の細胞内乳酸値の増加を誘導し、この値は筋収縮後においても持続した。筋張力の疲労耐性は細胞外の高値乳酸条件下で増加した。また、細胞外の高乳酸濃度の違いは細胞内pH値に影響しなかった。本研究は、細胞内の乳酸バイオイメージング評価モデルによって筋収縮時の乳酸代謝動態の特性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は生体内環境を保った状態において、筋線維内の水素イオン及び乳酸塩の動態を評価した。この評価モデルはin vivoバイオイメージング技術と乳酸観察用の新規蛍光タンパク質を応用した独自性の高い生理学研究である。乳酸は筋疲労と関係する物質として認識されることが多い一方、本研究において明らかにされた基質としての利用がエネルギー代謝において重要な役割を持っている。このようなエネルギー代謝の理解は、適切な運動処方や運動トレーニングなどの実践に貢献できる知見であると思われる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that lactic acid produced by muscle contraction is used as effective energy substrate in adjacent muscle fibers. However, the physiological significance of high lactate in the extracellular environment during muscle contraction has not been clarified. Therefore, this study examined the relationship between intracellular pH and lactate concentration, and muscle tension during muscle contractions under extracellular high lactate concentration. High extracellular lactate levels induced an increase in intracellular lactate levels at rest, which maintained even after muscle contractions. Fatigue tolerance of muscle tension was significantly increased by extracellular high lactate conditions. In addition, the difference in extracellular lactate concentration did not affect the intracellular pH level during muscle contractions. This study clarified the characteristics of lactate metabolism during muscle contractions using in vivo bioimaging model.

研究分野：生理学

キーワード：骨格筋 乳酸 細胞内pH in vivoバイオイメージング 筋疲労

1. 研究開始当初の背景

20 世紀の初頭に「乳酸」の生理学的な意義が指摘されてから、乳酸と疲労との関連性について多くの研究がなされ「乳酸-アシドーシス-疲労」という筋疲労の概念が確立された。ところが、その後の研究では、生理的溫度において pH_i は張力低下に影響を及ぼさないこと (Pate et al., 1995 Westerblad et al. al., 1997) や、乳酸を負荷した筋線維において筋疲労が生じなかったこと (Posterino et al., 2001) や、乳酸の産生と密接な関係にある pH_i の低下が筋疲労を誘発しなかったこと (Adams et al., 1991) などから「乳酸-アシドーシス-筋疲労」という考え方を否定する知見も報告されてきた。さらに、乳酸は効率的なエネルギー源として、「細胞間における乳酸シャトル」により、他の筋線維のエネルギー基質として利用されると考えられている (Brooks, 1998)。また、脳や、心臓において、乳酸がエネルギー基質として重要であることが報告されている (Brooks, 2009)。ATP 合成を考えた場合、解糖系によるグルコースの分解によって生じるピルビン酸を酸化的リン酸化に利用することよりも、乳酸を直接ピルビン酸へ変換する方が効率的である。しかしながら、骨格筋における乳酸利用の直接的な知見は少なく、*in vivo* 環境下での証明はなされていない。「細胞間乳酸シャトル説」による乳酸代謝動態を解明するために *in vivo* 環境下での実証が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、「筋収縮中及び収縮後において、収縮筋線維とその周辺にある筋線維間で、細胞間乳酸シャトルが生じている」という仮説を立てた。そして、乳酸感受性蛍光タンパク質による乳酸動態の直接観察及び、蛍光指示薬による細胞内水素イオン動態 (pH_i) 観察から「細胞間乳酸シャトル説」を証明できると考えた。そこで、本研究の目的は、(1) 収縮前後の pH_i 動態、(2) 乳酸動態を *in vivo* バイオイメージングを用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 被験動物

本研究では、雄性の Wistar 系ラット、体重 247-344 g、10-14 週齢を用いた。全ての実験は、電気通信大学実験委員会による承認を得たものであり、本学動物実験等規程にしたがって行われた。

(2) モデル作成

麻酔下において、ラットの正中線から 2 cm 程度皮膚を切開し、右脊柱僧帽筋を露出した。露出した脊柱僧帽筋に乳酸感受性蛍光タンパク質 (Laconic) を注入した。プラスミド DNA 注入後、速やかにエレクトロポレーターによりエレクトロポレーションを行った。その後、切開部位を縫合糸で縫合し、感染症の予防のため蒸留水で希釈した 5% ヒビテン溶液を塗布した。1 週間の通常飼育の後、乳酸観察用のモデル動物として使用した。

(3) 実験プロトコル

乳酸の負荷による pH と lactate 動態及び発揮張力について、以下の 3 グループで比較した。

グループ 1: アイソメトリック (ISO) 単収縮を負荷した群 (ISO)

グループ 2: L-lactate (20 mM) 溶液を筋へ負荷し、2 Hz の単収縮を負荷した群 (ISO + L-LAC)

グループ 3: D-lactate (20 mM) 溶液を筋へ負荷し、2 Hz の単収縮を負荷した群 (ISO + D-LAC)

ISO 単収縮は電気刺激 (4 ms, 9 V, 2 Hz) によって誘発し、10 分間負荷した。蛍光画像の取得は収縮開始 10 分前から収縮終了後 20 分後まで 5 分毎に取得した。収縮開始の 10 分前から L-lactate 溶液 (グループ 2) もしくは D-lactate 溶液 (グループ 3) を筋に負荷し、観察終了まで持続的に溶液に浸した。

(4) 張力測定

上記のそれぞれの刺激負荷時における発揮張力は、運動装置のひずみ計を介したコンピューター (Power Book, Dell) と解析装置 (Mac Lab/8c, AD Instruments Pty. Ltd.) においてモニターし、解析ソフト (Chart 7, AD Instruments Pty. Ltd.) を用いて定量した。筋疲労の指標として、10 分間の収縮の 10 秒間の張力を平均 (T) し、1 回目の筋発揮張力 (T_0) からの変化を相対値化 (T/T_0) してグラフ化した。

(5) イメージング分析

ラット個体ならびに露出した脊柱僧帽筋は 37°C ガラスプレート (Kitazato Supply) に静置した。脊柱僧帽筋は 37°C の KHB 溶液に常に浸る状態に置き、蛍光顕微鏡にて観察した。はじめに、明視野像によって筋線維の状態と血流が保持されていることを確認し、血管の分岐を目印として観察領域を選択した。蛍光画像の撮影ではキセノンランプを光源として用いた。細胞内乳酸観察時には、430 nm のフィルターを通して励起光を照射し、480 nm と 535 nm の蛍光フィルターを通し、W-VIEW システム、高感度 CMOS デジタルカメラ (ORCA, 浜松ホトニクス) 及びイメージキャプチャソフト (NIS-Element, ニコン) を用いて 2 枚の蛍光画像を同時に取得し、レシオ画像を作成した。細胞内 pH 観察は、445 nm と 500 nm のフィルターを通して二種類の励起光を照射し、535 nm の蛍光波長フィルターを通して 2 枚の蛍光画像を取得した。蛍光画像は、乳酸測定と同様のカメラ及びソフトを用いてレシオ画像を作成した。

4. 研究成果

(1) 筋細胞内 pH (pH_i) と筋発揮張力の関係

Fig. 1 は、L-もしくは D-乳酸溶液 (20 mM) を負荷し、単収縮を筋へ施した時の筋細胞内 pH (pH_i) 及び筋発揮張力の相対値変化を示している。Fig. 1A は、撮影開始時 (-10 min) 及び実験終了時 (30 min) の各群の蛍光比画像を示している。ISO + D-LAC 群で 30 min 後に画像上で pH_i の上昇が観察されたものの、その他の群で変化は観察されなかった。Fig. 1B は、Fig. 1A を数値化したものである。 pH_i は、収縮前の安静時において、全群で同様の動態を示した。収縮後においても群間で pH_i 動態に有意な変化は観察されなかった。さらに、収縮前後の pH_i の変化においても、

全群で有意な変化は観察されなかった。Fig. 1C は筋発揮張力変化を示している。ISO のみでは、10 分後に収縮開始から 40% 減少したが、L-LAC 群及び D-LAC 群は約 20% の減少であった (ISO: 0.61 ± 0.05 , ISO + L-LAC: 0.82 ± 0.06 , ISO + D-LAC: 0.78 ± 0.05)。ISO 群は、L-及び D-LAC 群と比較して、有意に筋発揮張力が低下していた ($P < 0.05$)。しかしながら、L-LAC 群と D-LAC 群間に有意な差は観察されなかった。

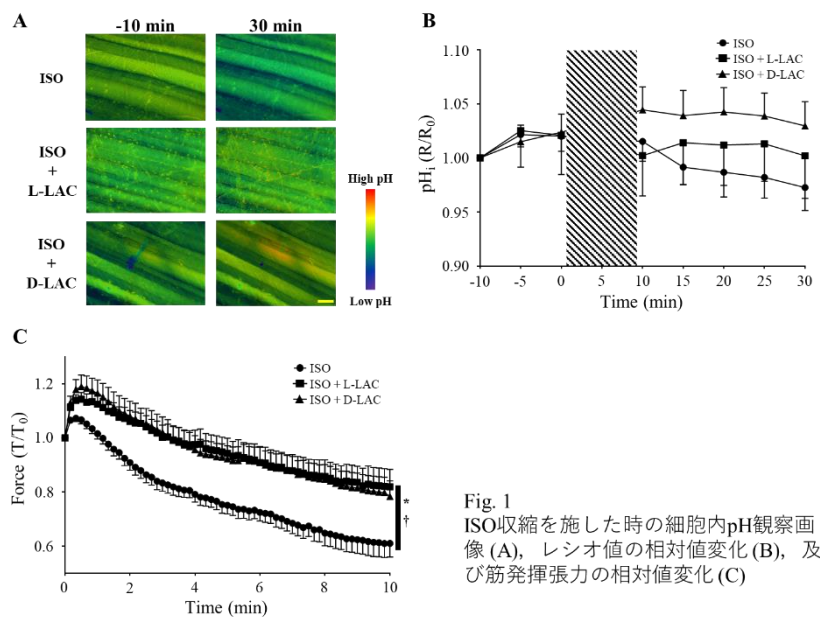


Fig. 1
ISO収縮を施した時の細胞内pH観察画像 (A), レシオ値の相対値変化 (B), 及び筋発揮張力の相対値変化 (C)

(2) 筋細胞内乳酸と筋発揮張力の関係

Fig. 2 は、L-もしくは D-乳酸溶液 (20 mM) を負荷し、単収縮を筋へ施した時の筋細胞内乳酸濃度及び筋発揮張力の相対値変化を示している。Fig. 2A は、撮影開始時 (-10 min) 及び実験終了時 (30 min) の各群の蛍光比画像を示している。ISO 群及び、ISO + D-LAC 群では画像に変化は観察されなかったものの、ISO + L-LAC 群では、画像が赤みがかかり細胞内 lactate 濃度の上昇が観察された。Fig. 2B は、Fig. 2A を数値化したものである。ISO 群において細胞内乳酸濃度は収縮前後で変化は観察されなかった。また、D-LAC 群では、D-lactate を負荷したにもかかわらず、収縮前後で有意な変化は観察されなかった。L-LAC 群では、L-lactate を負荷した直後から細胞内乳酸濃度が有意に上昇し、それは収縮後においても上昇したままであった (-5 min: R/R₀ = 1.10, 30 min: R/R₀ = 1.07, $P < 0.05$ vs. -10 min)。Fig. 2C は各群の筋発揮張力を示している。ISO のみでは、pH 観察群と同様に 10 分後に収縮開始から 35% 減少し、L-Lactate 及び D-Lactate では約 8%

の低下であった (ISO: 0.68 ± 0.05 , ISO+L-LAC: 0.91 ± 0.07 , ISO + D-LAC: 0.92 ± 0.07). pH_i 観察時と同様に, ISO 群は, L-及び D-LAC 群と比較して, 有意に筋発揮張力が低下していた ($P < 0.05$). pH_i 観察群と乳酸観察群のモデルの違いが ISO, L-LAC, D-LAC の動態に影響を及ぼすことはなかった.

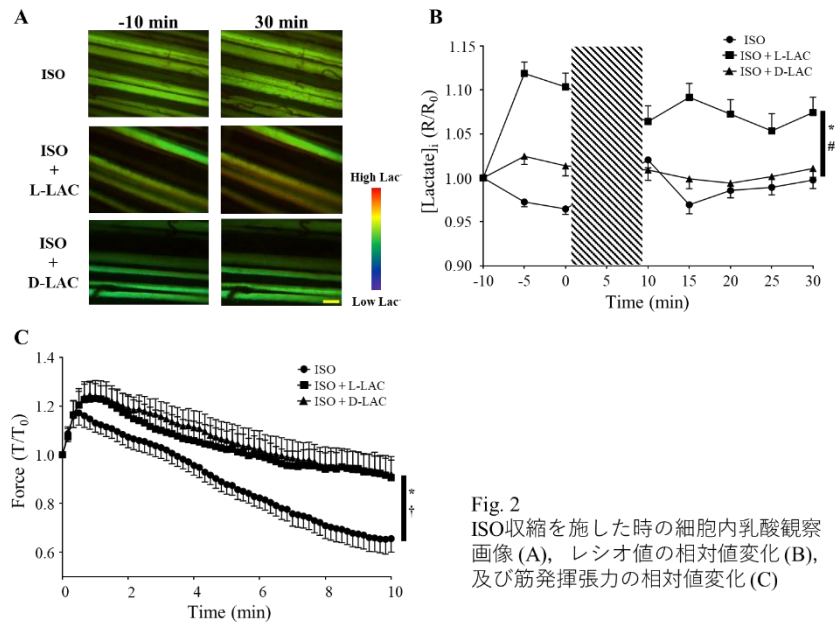


Fig. 2
ISO収縮を施した時の細胞内乳酸観察画像 (A), レシオ値の相対値変化 (B), 及び筋発揮張力の相対値変化 (C)

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 1件）

1. 著者名 Takagi Ryo, Tabuchi Ayaka, Asamura Tomoyo, Hirayama Seiya, Ikegami Ryo, Tanaka Yoshinori, Hoshino Daisuke, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 320
2. 論文標題 In vivo Ca ²⁺ dynamics during cooling after eccentric contractions in rat skeletal muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R129 ~ R137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpregu.00253.2020	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 -

1. 著者名 Tabuchi Ayaka, Eshima Hiroaki, Tanaka Yoshinori, Nogami Shunsuke, Inoue Naoki, Sudo Mizuki, Okada Hidetaka, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 127
2. 論文標題 Regional differences in Ca ²⁺ entry along the proximal-middle-distal muscle axis during eccentric contractions in rat skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 828 ~ 837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jappphysiol.01005.2018	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中 嘉法, 狩野 豊.
2. 発表標題 持続的な筋収縮における細胞外の高濃度乳酸の影響
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田淵 絢香, 田中 嘉法, 高木 領, 白川 英樹, 狩野 豊.
2. 発表標題 運動誘発性の損傷骨格筋に特徴的な細胞内カルシウムイオン変動パターン
3. 学会等名 第75回 日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中嘉法, 秋本崇之, 狩野豊.
2. 発表標題 細胞外高濃度乳酸環境と持続的な筋発揮張力の関係性
3. 学会等名 第74回 日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 嘉法, 狩野 豊.
2. 発表標題 in vivoバイオイメージングによる強縮刺激時の乳酸蓄積動態観察
3. 学会等名 第73回日本体力医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanaka Y, Poole DC, Kano Y.
2. 発表標題 Effects of lactate administration on intracellular pH and contractile performance during rhythmic muscle contractions.
3. 学会等名 65th Annual Meeting of the American College of Sports Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 嘉法, 狩野 豊.
2. 発表標題 乳酸負荷が持久性の筋収縮における筋細胞内pHと筋発揮張力に及ぼす影響.
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017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
---------	---------