

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：33938

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10796

研究課題名(和文) 乳酸による運動類似効果の解明と運動困難者向けの新たな筋萎縮対策法の確立

研究課題名(英文) The effect of lactate on loading-related changes in skeletal muscle mass

研究代表者

大野 善隆(OHNO, Yoshitaka)

星城大学・リハビリテーション学部・准教授

研究者番号：80440808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳酸による骨格筋萎縮の予防・回復効果ならびにメカニズムを明らかにするために、乳酸刺激の筋萎縮予防への影響、乳酸刺激の筋萎縮回復への影響、乳酸刺激の乳酸受容体シグナルへの影響を検討した。その結果、乳酸は廃用性筋萎縮の予防に寄与することが示唆されたが、筋萎縮の回復に及ぼす影響は筋線維タイプで異なる可能性が考えられた。乳酸による筋増量には、乳酸受容体およびタンパク質合成・分解を調節するAMPKが関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は実験動物を対象に、乳酸刺激による骨格筋萎縮の予防・回復効果を検討した。その結果、乳酸刺激は廃用性筋萎縮を一部抑制することが示された。この乳酸による筋増量(筋量減少の抑制)には、タンパク質分解の抑制が関与すると考えられた。乳酸が骨格筋量に及ぼす影響を明らかにする本研究の成果は、運動困難者向けの新たな筋萎縮対策法の開発に有益な情報となると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the effects of lactate on unloading-related atrophy and reloading-related regrowth of skeletal muscle. Mice were subjected to continuous hindlimb suspension for 2 weeks followed by 2-week ambulation recovery. Sodium lactate (1,000 mg/kg body weight) was orally administered to the mice. Oral administration of lactate attenuated atrophy of unloaded plantaris and soleus muscles, and decreased the phosphorylation level of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK). Lactate administration facilitated the regrowth of reloaded plantaris muscle. Administration of lactate receptor agonist increased the muscle mass in mice and the protein content in C2C12 cells. Lactate receptor and/or the downregulation of AMPK may play a role in lactate-associated increase in skeletal muscle mass.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：骨格筋 筋萎縮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋萎縮の予防・回復は健康寿命を延伸すると考えられている。筋萎縮対策の代表は運動であるが、高齢者や患者など運動困難者が存在するため、運動困難者向けの新たな対策が望まれる。

骨格筋は乳酸を分泌する一方で、骨格筋には乳酸受容体と乳酸輸送担体が存在するため、筋由来の乳酸が筋自身に影響すると考えられる。しかしながら、骨格筋に及ぼす乳酸の影響には不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、乳酸による骨格筋萎縮の予防・回復効果ならびにメカニズムを明らかにするために、実験動物を用いた筋萎縮モデルを作成し、乳酸刺激の筋萎縮予防への影響、乳酸刺激の筋萎縮回復への影響を検討した。

(2) 骨格筋には乳酸受容体が存在する。乳酸の筋増量効果における乳酸受容体の役割を調べるために、乳酸刺激の乳酸受容体シグナルへの影響を検討した。実験の対象に、実験動物および骨格筋培養細胞を用いた。

### 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、豊橋創造大学における動物実験に関する規程に従い、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、足底筋とヒラメ筋を対象筋とした。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。

#### 筋萎縮モデルの作成

マウスに2週間の後肢懸垂を負荷して、下肢の骨格筋(足底筋、ヒラメ筋)の活動量を減少させ、廃用性筋萎縮を惹起させた。廃用性筋萎縮モデル作成後、通常飼育に戻して、下肢の骨格筋の活動量を増加させ、筋萎縮からの回復を促した。

#### 乳酸ナトリウムの投与

乳酸刺激群のマウスには、後肢懸垂中の筋萎縮進行期間または後肢懸垂後の通常飼育中の筋萎縮回復期間に、ゾンデを用いて乳酸ナトリウム(乳酸)を経口投与(1,000 mg/kg体重、週5回)した。対照群には同量の水を投与した。また、乳酸の単回投与後の血中乳酸濃度を経時的に測定した。

#### 乳酸受容体アゴニストの投与

乳酸受容体刺激群のマウスには、ゾンデを用いて乳酸受容体アゴニスト(3-Chloro-5-hydroxybenzoic acid)を経口投与(週5回)した。対照群には同量の水を投与した。

#### 骨格筋量

筋萎縮進行期間および筋萎縮回復期間に、マウスの体重を測定した後、マウス後肢より足底筋およびヒラメ筋を摘出した。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、乳酸投与による骨格筋量の変化を評価した。また、乳酸受容体アゴニスト投与後の骨格筋量の変化を評価した。

(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I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。乳酸ナトリウム(乳酸)または乳酸受容体アゴニスト(3,5-dihydroxybenzoic acid)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

乳酸または乳酸受容体アゴニストの投与後、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を用いて、筋管細胞の直径を計測した。

#### 筋タンパク質量

乳酸または乳酸受容体アゴニストの投与後、タンパク質抽出液を用いてC2C12筋細胞をホモジネートし、Bradford法によりタンパク質量を測定した。

### (3) HCA1 および MCT1 の発現量、AMPK および Erk1/2 リン酸化レベル

摘出した筋組織および 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、乳酸受容体 HCA1 (hydroxycarboxylic acid receptor 1) および乳酸輸送担体 MCT1 (monocarboxylate transporter 1) の発現量、タンパク質分解に作用する細胞内シグナル伝達因子である 5'AMP-activated protein kinase (phosphorylated AMPK、total AMPK) と乳酸受容体の下流シグナルである p42/44 extracellular signal-regulated kinase-1/2 (phosphorylated Erk1/2、total Erk1/2) の発現量を測定した。全タンパク質 (total AMPK、total Erk1/2) に対するリン酸化タンパク質 (phosphorylated AMPK、phosphorylated Erk1/2) 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) 乳酸刺激の筋萎縮予防・回復に及ぼす影響

#### 血中乳酸濃度

乳酸の単回投与後に血中乳酸濃度の一過性の増加が認められた。

#### 骨格筋量

2 週間の後肢懸垂により、マウスの足底筋とヒラメ筋の重量は減少した。筋萎縮進行期間における乳酸の経口投与は、マウスの体重に影響を及ぼさなかったが、足底筋とヒラメ筋の筋重量およびタンパク質量を増加させた。乳酸投与は後肢懸垂による廃用性筋萎縮を一部抑制した。乳酸による筋萎縮の予防作用が示唆された。

後肢懸垂後の 2 週間の通常飼育により、萎縮筋の重量は増加した。筋萎縮回復期間における乳酸投与は、足底筋とヒラメ筋の筋重量の回復を促進した。乳酸投与後の足底筋とヒラメ筋のタンパク質量は異なる応答を示した。乳酸による筋萎縮の回復作用は筋線維タイプで異なる可能性が考えられた。

#### 筋管細胞直径、タンパク質量

C2C12 筋細胞への乳酸投与により、筋管細胞直径とタンパク質量は増加した。細胞外乳酸は筋量増加に作用することが示唆された。

#### HCA1 および MCT1 の発現量、AMPK リン酸化レベル

足底筋とヒラメ筋の HCA1 発現量に差は認められなかった。ヒラメ筋の MCT1 発現量は足底筋よりも高値を示した。

筋萎縮進行期間における乳酸投与は、足底筋とヒラメ筋の AMPK リン酸化レベルを低下させた。筋萎縮回復期間における乳酸投与によって足底筋の AMPK リン酸化レベルは低下したが、ヒラメ筋では認められなかった。C2C12 筋細胞への乳酸投与後、AMPK リン酸化レベルの低下が認められた。AMPK はタンパク質合成シグナルの阻害や分解シグナルの増強により、骨格筋量を負に制御すると考えられている。細胞外乳酸はタンパク質分解の抑制に作用することが示唆された。

以上の検討により、乳酸は筋萎縮の予防に寄与することが示唆された。乳酸が筋萎縮の回復に及ぼす影響は筋線維タイプで異なる可能性が考えられた。乳酸による筋増量には、AMPK リン酸化レベルの低下および血中乳酸濃度の増加が関与する可能性がある。骨格筋量の調節にはタンパク質の合成と分解のバランスが関与することから、乳酸はタンパク質分解の抑制に作用することで、筋増量 (筋萎縮の予防・回復) を促すと考えられた。

### (2) 乳酸刺激が乳酸受容体シグナルに及ぼす影響

マウスへの乳酸受容体アゴニストの経口投与は、足底筋とヒラメ筋の筋重量を増加させた。また、C2C12 筋細胞への乳酸受容体アゴニストの投与により、筋管細胞直径とタンパク質量は増加した。乳酸投与後、C2C12 筋細胞では Erk1/2 リン酸化レベルの増加が認められたが、マウスの骨格筋では異なる応答を示した。

以上の検討により、乳酸受容体刺激は骨格筋増量を引き起こすと考えられた。乳酸による筋増量のメカニズムとして、乳酸受容体の関与が示唆された。この現象の詳細なメカニズムが今後の課題である。

本研究の検討により、乳酸は廃用性筋萎縮の予防に寄与することが示唆されたが、筋萎縮の回復に及ぼす影響は筋線維タイプで異なる可能性が考えられた。乳酸による筋増量には、乳酸受容体およびタンパク質合成・分解を調節する AMPK が関与すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Ohashi K, Ito R, Ortuste Quiroga HP, Yamashita T, Goto K.	4. 巻 21
2. 論文標題 MBNL1-Associated Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis in C2C12 Myotubes and Mouse Skeletal Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21176376	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 -
1. 著者名 Ohno Y, Ando K, Ito T, Suda Y, Matsui Y, Oyama A, Kaneko H, Yokoyama S, Egawa T, Goto K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Lactate stimulates a potential for hypertrophy and regeneration of mouse skeletal muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 E869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11040869	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 -
1. 著者名 Ohno Y, Egawa T, Yokoyama S, Fujiya H, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K.	4. 巻 68
2. 論文標題 MENS-associated increase of muscular protein content via modulation of caveolin-3 and TRIM72	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiological Research	6. 最初と最後の頁 265-273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.33549/physiolres.933992	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 -
1. 著者名 Egawa T, Ohno Y, Yokoyama S, Yokokawa T, Tsuda S, Goto K, Hayashi T.	4. 巻 8
2. 論文標題 The Protective Effect of Brazilian Propolis against Glycation Stress in Mouse Skeletal Muscle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 E439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods8100439	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 -

1. 著者名 Ohno Y, Oyama A, Kaneko H, Egawa T, Yokoyama S, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K.	4. 巻 223
2. 論文標題 Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in C2C12 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Physiologica	6. 最初と最後の頁 e13042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apha.13042	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 Egawa T, Ohno Y, Goto A, Yokoyama S, Hayashi T, Goto K.	4. 巻 19
2. 論文標題 AMPK mediates muscle mass change but not the transition of myosin heavy chain isoforms during unloading and reloading of skeletal muscles in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19102954	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大野善隆, 須田陽平, 安藤孝輝, 松井佑樹, 伊藤貴史, 金子陽加里, 大山明子, 横山真吾, 江川達郎, 後藤勝正
2. 発表標題 乳酸受容体刺激が骨格筋量に及ぼす影響
3. 学会等名 第24回日本体力医学会東海地方会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野善隆, 伊藤貴史, 松井佑樹, 安藤孝輝, 須田陽平, 横山真吾, 後藤勝正
2. 発表標題 骨格筋由来乳酸による骨格筋量調整に関する基礎的研究
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大野善隆, 松井佑樹, 須田陽平, 伊藤貴史, 安藤孝輝, 横山真吾, 後藤勝正
2. 発表標題 乳酸投与がマウス骨格筋量に及ぼす影響
3. 学会等名 第23回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2018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