

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：12612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K19567

研究課題名（和文）乳酸が筋パフォーマンスの低下を抑制する機序の解明

研究課題名（英文）Elucidate the mechanism by which lactate inhibits muscle performance decline.

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・協力研究員

研究者番号：40791249

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋の代謝活動において産生される「乳酸」は疲労を助長するのではなく、疲労の軽減に寄与していると考えられるようになってきた。本研究は、乳酸塩感受性蛍光タンパク質を用いて、運動中の乳酸塩濃度変化を可視化するモデルを作成した。その結果、高強度の筋収縮中に、筋線維タイプによって乳酸塩濃度動態が異なることを観察した。また、乳酸の代謝には、骨格筋内のミトコンドリアが重要な役割を果たしていることから、筋収縮時のミトコンドリア機能について検討した。その結果、収縮時のミトコンドリアCa²⁺濃度の変化が筋発揮張力に直接的に影響を及ぼしていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において確立されたバイオイメーjing手法は、ホメオスタシスを維持して細胞内イオン動態の観察を可能とした。このモデルを用いて筋収縮活動時の乳酸動態とミトコンドリアCa²⁺動態の観察に成功した。乳酸とCa²⁺の細胞内での振る舞いは筋収縮の制御機構の中心であり、筋疲労の機構を解明するために特に重要である。また、本研究の研究モデルや知見は、エイジングならびに糖尿病などの代謝性疾患に付随する筋機能低下の機構解明などにも応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, lactate, which is produced during metabolic activity in skeletal muscle, has been considered to contribute to the maintenance of muscle performance rather than contributing to fatigue. In this study, a model was developed to visualise changes in lactate concentration during exercise using lactate-sensitive fluorescent proteins. The results demonstrated that lactate concentration dynamics differed between muscle fibre types during high-intensity muscle contraction. Furthermore, we examined the role of mitochondria in skeletal muscle during muscle contraction. Mitochondria play an essential role in lactate metabolism, and our findings suggest that changes in mitochondrial Ca²⁺ concentration during contraction directly influence muscle tension level.

研究分野：筋生理学

キーワード：in vivoイメージング 骨格筋 ミトコンドリア 乳酸塩 カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

近年では、代謝産物の一つである「乳酸」は筋疲労時に疲労を助長するのではなく、疲労の軽減に寄与していると考えられるようになってきた。この機構の一つとして乳酸のエネルギー基質利用が考えられている。筋収縮によって Type II 線維から乳酸塩が放出され、Type I 線維では、その乳酸塩を取り込み、ミトコンドリアにおいて利用する「細胞間における乳酸シャトルモデル」である。

本研究は、骨格筋内の乳酸塩を可視化する *in vivo* モデルを考案し、筋収縮中の筋線維毎の乳酸塩動態を観察することを試みた。さらに、乳酸塩の代謝には、骨格筋内のミトコンドリアが重要な役割を果たしていることから、本研究では、筋収縮時のミトコンドリア機能についても検討した。ミトコンドリア内のカルシウムイオン(Ca^{2+})は TCA サイクルの酵素活性を制御し、酸化的リン酸化応答を調節する(Reggiani & Marucci, 2022)。しかしながら、*in vivo* 環境において筋収縮中のミトコンドリア Ca^{2+} 動態については不明の点が多い (Rudolf et al., 2004)。本研究は、ミトコンドリアカルシウム単輸送体(mitochondrial Ca^{2+} uniporter: MCU)による筋収縮時のミトコンドリア内への Ca^{2+} 取り込みと張力発揮の関係性を検討した。

2. 研究の目的

本研究は、「収縮時は筋線維毎に乳酸塩の蓄積動態が異なる」と仮説を立て、乳酸感受性蛍光タンパク質である laconic を用いて、高強度運動後の筋線維毎の乳酸塩動態を観察する。また、「筋収縮中に MCU を介したミトコンドリア内への Ca^{2+} 取り込みが生じることにより、張力発揮が維持される」という仮説を立て、 Ca^{2+} 感受性蛍光タンパク質である 4mtD3cpV により筋収縮中のミトコンドリア内 Ca^{2+} を *in vivo* イメージングによって評価し、筋発揮張力との対応関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験動物

本研究では、雄性の Wistar 系雄性ラット（週齢 11~12 wks, $n = 12$ ）及び、C57BL/6 マウス（週齢 10~11 wks, $n = 13$ ）を用いた。すべての実験は、電気通信大学動物実験委員会による承認を得たものであり、実験等規定にしたがって行われた。

(2) モデル作成

①乳酸塩観察モデル

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。

② Ca^{2+} 観察モデル

マウス前脛骨筋 (TA) を除毛後、麻酔下でヒアルロニターゼ (40IU/uL) を 40 uL TA に注入する。注入の 50 分後にもう一度麻酔をかけ、蛍光タンパク質を TA に 40 uL 注入し、エレクトロポレーションを施す。エレクトロポレーション後、1 週間の通常飼育の後、 Ca^{2+} 観察用のモデル動物として使用した。

(3) 実験プロトコル

実験 1: 乳酸塩観察モデルを用いて、露出させた筋線維に筋収縮負荷（電圧~9V, 4 ms 幅のパルスを 100Hz の頻度で 90 秒間）を負荷し、収縮前後の乳酸塩動態を筋線維毎に観察した。

実験 2: 筋収縮時の Ca^{2+} 動態を検証するために、以下の 2 群で検証した。

CONT 群: Krebs-Henseleit Bicarbonate (KHB) 溶液を滴下し、強縮負荷を施した群

Blocker 群: MCU 阻害剤 (Ru265; Sigma-Aldrich, 500-1000 μM) を滴下し、強縮負荷を施した群

収縮負荷は、腓骨神経を電気刺激することにより誘発した。筋収縮は、刺激頻度 100 Hz, 電圧~9 V, 4 ms 幅のパルスを 700 ms 負荷した刺激を 1 回とし、3 秒間隔で 50 回負荷した(図 1)。Blocker 群では、収縮負荷の前に 30 分間の MCU 阻害剤の pre-loading を行い、観察時も MCU 阻害剤を含んだ KHB 溶液を滴下した。

実験 3:MCU 阻害剤の影響を検証するために、上記の 2 群で pre-loading 前, loading 10 分, 20 分時の最大発揮張力変化を測定した。

最大発揮張力は、刺激頻度 100 Hz, 電圧~9 V, 4 ms 幅のパルスを 700 ms 負荷した刺激を 1 回のみ負荷した。

(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。

(5) イメージング分析

①実験 1

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。

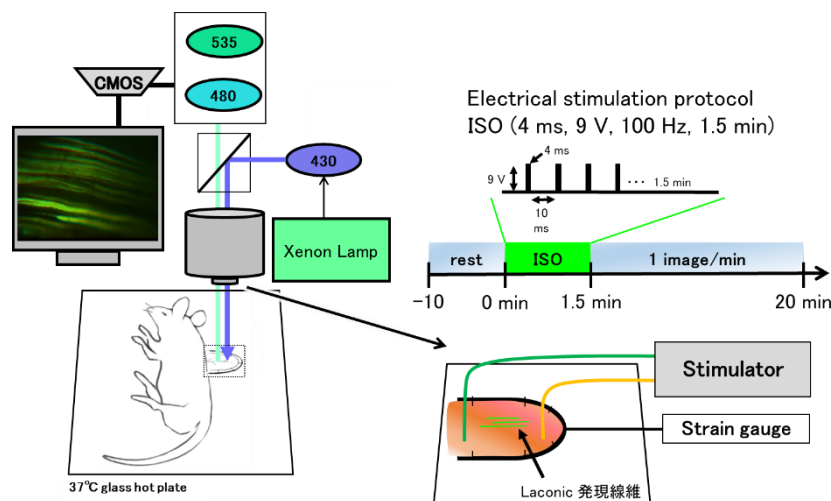


Fig. 1 *in vivo* Lactate イメージングと電気刺激プロトコル

②実験 2・3

マウス個体ならびに露出した前脛骨筋は 37°Cガラスプレート (Kitazato Supply) に静置した。前脛骨筋は 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 (Fig. 2)。

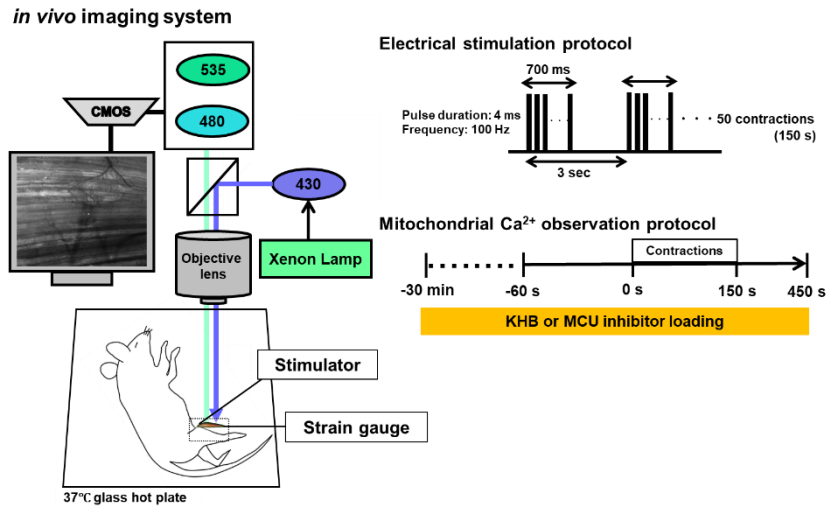


Fig. 2 *in vivo* Ca²⁺イメージングと電気刺激プロトコル及び、収縮とMCU阻害実験の時間経過

4. 研究成果

(1) 筋収縮後の筋線維毎の乳酸蓄積動態の違い

Fig. 3A は、筋収縮後の筋線維径 60 μm 以下及び 60 μm 以上の筋線維の乳酸塩動態を示している。乳酸塩は、筋収縮直後、両群で上昇が観察された (60 μm 以下; 1.05 ± 0.01 , 60 μm 以上; 1.05 ± 0.02)。その後、60 μm 以下の線維では、20 分間乳酸塩濃度は維持されていたものの (1.05 ± 0.01), 60 μm 以上の線維では、20 分間で 60 μm 以下の線維と比較して、筋線維内の乳酸濃度が低下する傾向が観察された (1.00 ± 0.01 , $P = 0.0501$ vs. 60 μm 以下)。また、Fig. 3B は、観察に使用したラット脊柱僧帽筋の筋線維 type と筋線維の割合を示している。その結果、60 μm 以下の筋線維では Type I や IIa など、大部分が酸化系線維であるのに対して、60 μm 以上では、Type IIb といった解糖系線維である可能性が示唆された。

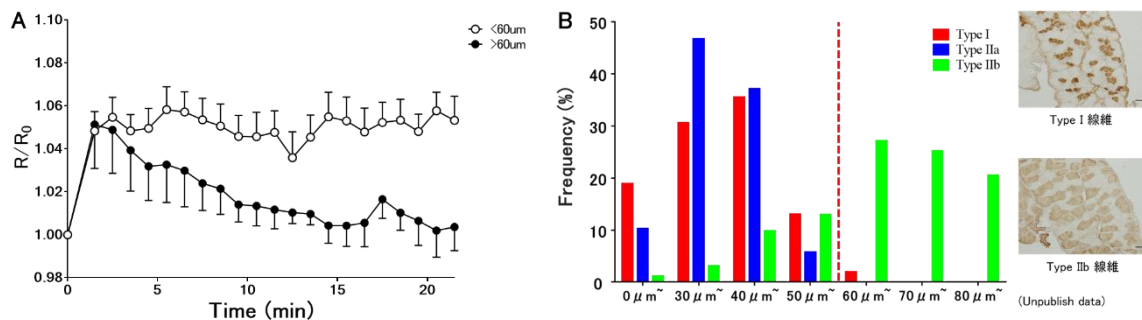


Fig. 3 A: 乳酸塩動態は、0秒の値 (R_0) を基準とした相対値 (R/R_0) で示している。
 $< 60 \mu\text{m}$: $N = 10$, $> 60 \mu\text{m}$: $N = 5$, 値はすべて Mean \pm SE で示している。
 B: 先行研究における筋線維径と筋線維 type の割合。

(2) 筋収縮時のミトコンドリア内 Ca²⁺動態と筋発揮張力の関係

Fig. 4 は、筋収縮負荷前後及び筋収縮中のミトコンドリア内 Ca²⁺動態及び、筋発揮張力変化を示している。CONT では、観察開始時にはミトコンドリア内の Ca²⁺濃度が一様であることが確認された (Fig. 4A)。収縮直後に Ratio 値は $12.2 \pm 2.2\%$ 増加し、即時的に Ca²⁺濃度が有意に増加したことが示された ($P < 0.01$ vs. -60 秒)。刺激終了時では、開始時と同レベルまでミトコンドリア内の Ca²⁺濃度が低下した。MCU 阻害条件では収縮中に Ratio 値の有意な変化は認められなかった (Fig. 4B, $P > 0.99$ vs. -60 秒)。

Fig. 4C は、収縮中の筋発揮張力の変化を示している。50 回の連続的な収縮によって、 $22.3 \pm 3.4\%$ の筋力低下が観察された。MCU 阻害条件では、1 回目から筋発揮張力の低下が観察された (CONT; 6.2 ± 0.3 vs. MCU Inhibitor; $2.6 \pm 0.7 \text{ mN} \cdot \text{m}$, $P < 0.001$)。

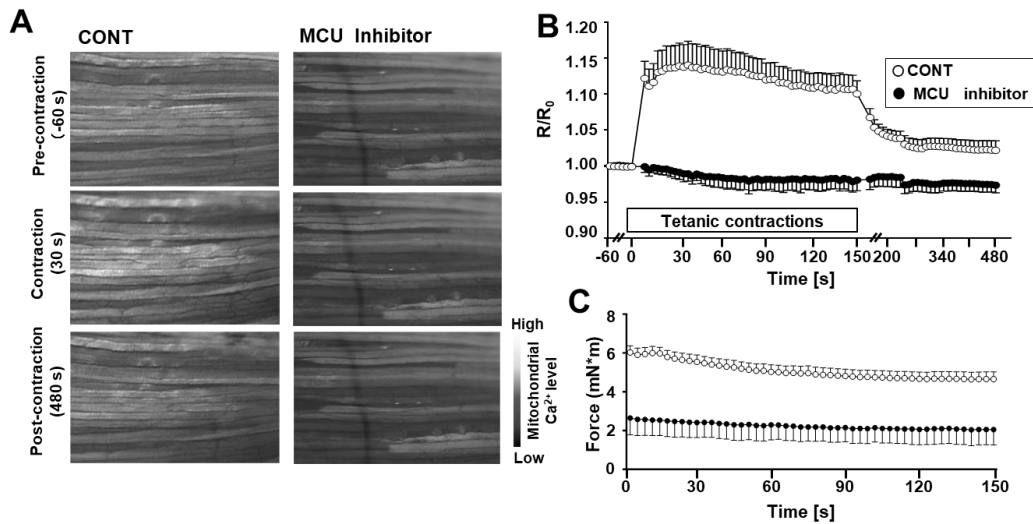


Fig. 4 A : 収縮前, 収縮中及び, 収縮後の *in vivo* バイオイメージングから得られた Ratio (F535/F480) 画像の代表例. スケールバーは $100 \mu\text{m}$ を示している. B : ミトコンドリア Ca^{2+} 動態は, 0秒の値 (R_0) を基準とした相対値 (R/R_0) で示している. C : 筋発揮張力の経時的変化. CONT : $N = 8$, MCU : $N = 4$, 値はすべて Mean \pm SE で示している.

(3) MCU 阻害剤の影響

Fig. 5 は, 30 分間の pre-loading 中の最大発揮張力変化を示している. MCU inhibitor では, pre-loading の間に 0.67 ± 0.15 まで, 最大発揮張力の低下が観察された. その一方で, KHB のみの個体では, pre-loading 期間中での筋発揮張力の低下は観察されなかった. 以上のことから, MCU Blocker 負荷時に観察される筋発揮張力の低下はプロトコルや時間経過によるものでなく, Ru265 による Ca^{2+} の流入阻害によるものであることが示唆される.

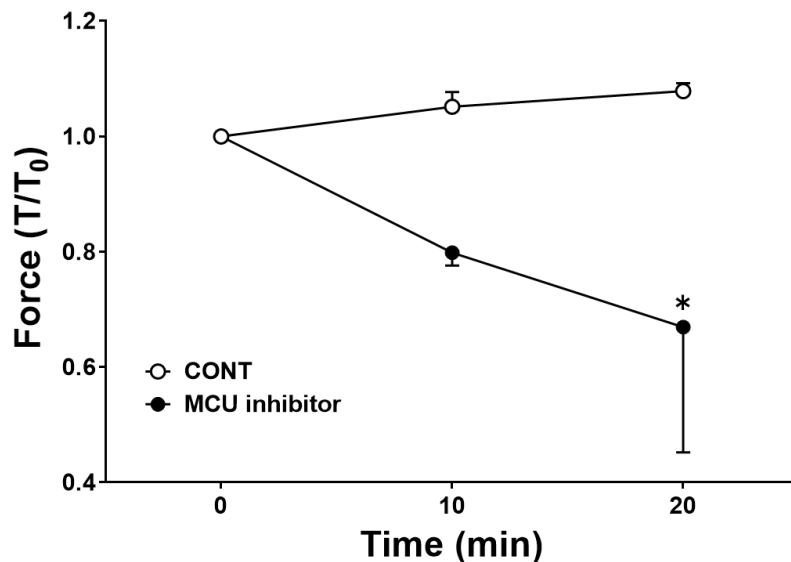


Fig. 5 30分間のpre-loading中の筋発揮張力の変化.
Mean \pm SE. Male: $N = 2$, MCU inhibitor: $N = 2$,
* $P < 0.05$ vs. CONT.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 田中 嘉法, 田淵 絢香, 白川 英樹, 狩野 豊	4. 巻 55
2. 論文標題 In vivo環境下におけるマウス骨格筋ミトコンドリア内Ca ²⁺ 動態の可視化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 59-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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, Tanaka Yoshinori, Takagi Ryo, Shirakawa Hideki, Shibaguchi Tsubasa, Sugiura Takao, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 322
2. 論文標題 Ryanodine receptors mediate high intracellular Ca ²⁺ and some myocyte damage following eccentric contractions in rat fast-twitch skeletal muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R14 ~ R27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00166.2021	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 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, Tanaka Yoshinori, Horikawa Hiroshi, Tazawa Takuto, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 119
2. 論文標題 In vivo heat production dynamics during a contraction-relaxation cycle in rat single skeletal muscle fibers	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Thermal Biology	6. 最初と最後の頁 103760 ~ 103760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtherbio.2023.103760	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 Kano Ryotaro, Tabuchi Ayaka, Tanaka Yoshinori, Shirakawa Hideki, Hoshino Daisuke, Poole David C., Kano Yutaka	4. 巻 326
2. 論文標題 In vivo cytosolic H^{2+} changes and Ca^{2+} homeostasis in mouse skeletal muscle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R43 ~ R52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00152.2023	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 田中 嘉法, 田淵 絢香, 白川 英樹, 狩野 豊	4. 巻 8
2. 論文標題 In vivo環境下におけるマウス骨格筋ミトコンドリア内 Ca^{2+} 動態の可視化	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 月刊アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 56-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中 嘉法, 田淵 絢香, 白川 英樹, 狩野 豊
2. 発表標題 In vivo環境下における筋収縮負荷時のマウスミトコンドリア内 Ca^{2+} 動態の可視化
3. 学会等名 第77回日本体力医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 嘉法, 田淵 絢香, 白川 英樹, 狩野 豊
2. 発表標題 Sex difference of mitochondrial Ca^{2+} dynamics in mouse during muscle contraction in the in vivo environment
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中 嘉法, 池上 諒2, 秋本 崇之, 狩野 豊
2. 発表標題 連続的な筋収縮負荷による筋細胞内グルコース動態の特徴
3. 学会等名 第76回 日本体力医学会
4. 発表年 2021年

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
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特異的な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
4. 発表年 2020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
---------	---------