

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33938

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11276

研究課題名(和文)筋由来の現象がもたらす運動類似効果と運動困難者のための筋増量法の確立

研究課題名(英文)The role of skeletal muscle-derived phenomena in exercise-independent increases 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨格筋培養細胞を対象に、筋の同化応答を促進する温熱刺激条件と乳酸刺激条件、および温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激による筋の同化応答への影響を検討した。その結果、温熱刺激は筋量増加を促進するが、刺激時間がその作用に影響を及ぼすと考えられた。生理的範囲内の低濃度および短時間の乳酸刺激は筋量増加を促進した。温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激は、それぞれの単独刺激よりもタンパク質合成および筋同化応答を促進する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は筋由来の現象である熱産生と乳酸分泌に着目し、温熱刺激と乳酸刺激およびその組合せ刺激による筋の同化応答への影響を検討したものである。組合せ刺激はそれぞれの単独刺激よりも筋同化応答を促進する可能性が考えられた。生体内では温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激のように、複数の筋由来の現象が相互に作用して筋増量に影響を及ぼすと考えられる。本研究の成果は、運動に代わる新たな筋増量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 heat and/or lactate stimulation conditions on the anabolic regulation of skeletal muscle mass using cell culture system. Mouse myoblast-derived C2C12 cells were used and differentiated to form myotubes. During the differentiation phase, heat stimulation increased the myotube diameter and the protein content in C2C12 cells. The effect of heat stimulation on muscle mass may depend on the duration of the stimulation. Mild lactate stimulation promoted the differentiation of C2C12 cells. The combination of heat and lactate stimulation upregulated anabolic intracellular signaling. These observations suggest that the combined heat and lactate stimulation may activate protein synthesis and increase muscle anabolism more than either stimulation alone.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：細胞・組織 骨格筋 筋肥大

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋量の増加は健康寿命を延伸する要因の一つと考えられている。運動や筋力トレーニングは筋増量を引き起こす方法の代表であるが、リハビリテーションの対象となる患者や高齢者では運動の実施・継続が困難な場合があるため、運動に代わる新たな筋増量法が望まれる。

骨格筋は運動機能だけでなく、熱産生機能や分泌機能を有している。例えば、熱産生や乳酸分泌に着目した温熱刺激や乳酸刺激による筋量増加作用が報告されており、その刺激条件やメカニズムが検討されている。また、生体内ではこれらの現象が相互に作用すると考えられるが、温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激による筋の同化応答への影響には不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) 本研究では骨格筋培養細胞を対象に、筋由来の現象である熱産生と乳酸分泌に着目し、筋の同化応答を促進する安全な温熱刺激条件、乳酸刺激条件を検討した。

(2) 生体内では筋由来の現象である熱産生や乳酸分泌が相互に作用すると考えられるため、温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激による骨格筋培養細胞の同化応答への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋の同化応答を促進する安全な温熱刺激条件と乳酸刺激条件を検討するために、評価指標には筋細胞の量的変化を用いた。本研究では、運動(機械的刺激)の影響を除外するために骨格筋培養細胞を実験対象に使用した。

骨格筋培養細胞

マウス骨格筋由来の筋芽細胞株(C2C12細胞)を用いた。C2C12筋芽細胞をタイプコラーゲンがコーティングされた培養プレートに播種し、CO₂インキュベーター(37℃、5%CO₂濃度)内で培養した。筋芽細胞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芽細胞から筋管細胞へ分化誘導した。

温熱刺激の負荷

分化期の筋細胞を通常の培養温度より高い38℃または39℃に設定したCO₂インキュベーター内で培養することで、温熱刺激を負荷した。温熱刺激時間外および対照群は37℃の温度条件下で培養した。

乳酸刺激の負荷

生理的範囲内の濃度(～20mM、最終濃度)の乳酸ナトリウム(乳酸)を分化培地に添加することで乳酸刺激を負荷した。乳酸刺激後に培地を新しいものに交換した。対照群には同量の水を培地に添加した。

筋管細胞直径

温熱刺激または乳酸刺激の負荷後、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、撮影した画像から筋管細胞の直径を計測した。

筋タンパク質量

温熱刺激または乳酸刺激の負荷後、プレートを氷上で冷やし、タンパク質抽出液を用いてC2C12筋細胞を溶解させた。溶解物を遠心分離し、上清を回収した。プレートリーダーを用いたBradford法により上清中のタンパク質量を測定した。

(2) 温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激による骨格筋の同化応答への影響を検討するために、評価指標には、タンパク質代謝(合成、分解)に作用する細胞内シグナルの変化を用いた。同化応答が認められた温熱刺激条件ならびに乳酸刺激条件から、より低温度かつ低乳酸濃度を組み合わせることで刺激条件を設定した。本研究では、機械的刺激の影響を除外するためにC2C12細胞を実験対象に使用した。

温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激の負荷

通常の培養温度より高い温度に設定したCO₂インキュベーター内、かつ生理的範囲内の低濃度の乳酸ナトリウム(乳酸)を添加した分化培地で筋細胞を培養することで、温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激を負荷した。

タンパク質代謝(合成、分解)に作用する細胞内シグナル伝達物質のリン酸化レベル
組合せ刺激の負荷後、プレートを氷上で冷やし、培地を除去した。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溶解させた後、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、タンパク質合成に作用する細胞内シグナル伝達物質である p42/44 extracellular signal-regulated kinase-1/2 (phosphorylated Erk1/2, total Erk1/2)、タンパク質分解に作用する細胞内シグナル伝達物質である 5'AMP-activated protein kinase (phosphorylated AMPK, total AMPK) の発現量を測定した。全タンパク質 (total Erk1/2, total AMPK) に対するリン酸化タンパク質 (phosphorylated Erk1/2, phosphorylated AMPK) 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) 骨格筋培養細胞の同化応答に影響を及ぼす温熱刺激条件と乳酸刺激条件

筋管細胞直径、タンパク質量と温熱刺激条件

C2C12 筋細胞への温熱刺激の負荷により、筋管細胞直径とタンパク質量が対照群と比較して増加した。さらに、比較的低い加温条件も筋管細胞の直径を増加、タンパク質量を増加させた。筋管細胞直径の増加を引き起こす刺激時間条件は刺激温度により異なった。また、温熱刺激時間がある程度以上長くなると、筋管細胞の直径の増加が抑制された。温熱刺激条件により、筋量増加作用が変化すると考えられた。

筋管細胞直径、タンパク質量と乳酸刺激条件

C2C12 筋細胞への乳酸刺激の負荷により、筋管細胞直径とタンパク質量が対照群と比較して増加した。さらに、生理的範囲内のより低い乳酸濃度条件ならびに短い乳酸刺激時間も筋管細胞の直径およびタンパク質量を増加させた。乳酸刺激は低濃度かつ短時間の刺激条件でも筋量増加に作用することが示唆された。骨格筋細胞の分化過程では筋細胞が互いに融合し、筋管細胞の成長(直径の増加)が生じることから、乳酸刺激は筋芽細胞の分化を促進すると考えられた。

以上の検討により、温熱刺激および乳酸刺激は骨格筋量の増加に寄与することが示唆された。骨格筋細胞の同化応答を促進する温熱刺激の至適条件には刺激時間(刺激量)が関与する可能性がある。また、生理的範囲内の低濃度および短時間の乳酸刺激条件は筋の同化応答を促進することが示唆された。

(2) 温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激による骨格筋培養細胞の同化応答

細胞内シグナル伝達物質のリン酸化レベル

低い加温条件の温熱刺激または生理的範囲内のより低い濃度条件の乳酸刺激後、C2C12 筋細胞における Erk1/2 リン酸化レベルは、対照群と比較して有意な増加が認められなかった。一方、温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激は Erk1/2 リン酸化レベルを増加させた。Erk1/2 以外のタンパク質合成に作用するいくつかのシグナル伝達物質においても、温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激によるリン酸化レベルの増加が認められた。

温熱刺激と乳酸刺激それぞれの単独刺激、およびその組合せ刺激を負荷したところ、タンパク質分解に作用する AMPK のリン酸化レベルが増加した。

以上の検討により、温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激はタンパク質合成シグナルを活性化し、筋の同化応答を促進する可能性が考えられた。同時に認められたタンパク質の分解シグナルの応答も含め、これらのメカニズムの解明が今後の課題である。

本研究の検討により、温熱刺激および乳酸刺激は筋同化応答を促進することが確認され、刺激条件がその作用に影響すると考えられた。温熱刺激と乳酸刺激の組合せ刺激は、それぞれの単独刺激よりもタンパク質合成および筋同化応答を促進する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ohno Y, Nakatani M, Ito T, Matsui Y, Ando K, Suda Y, Ohashi K, Yokoyama S, Goto K	4. 巻 72
2. 論文標題 Activation of lactate receptor positively regulates skeletal muscle mass in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological Research	6. 最初と最後の頁 465-473
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33549/physiolres.935004	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 1件）

1. 発表者名 大野善隆, 中谷直史, 伊藤貴史, 松井佑樹, 安藤孝輝, 須田陽平, 大橋和也, 横山真吾, 後藤勝正
2. 発表標題 骨格筋における乳酸受容体の活性化とERKシグナルの応答
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshitaka Ohno, Masashi Nakatani, Yohei Suda, Koki Ando, Yuki Matsui, Takafumi Ito, Kazuya Ohashi, Shingo Yokoyama, Katsumasa Goto
2. 発表標題 Lactate positively modulates skeletal muscle mass in mice regardless of loading condition
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN International Congress of Nutrition in Tokyo, Japan (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大野善隆, 宮脇拓海, 小川晃世, 杉崎智哉, 大橋和也, 中谷直史
2. 発表標題 骨格筋培養細胞の増殖と分化に影響を及ぼす熱刺激条件の検討
3. 学会等名 第28回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------	---------