

令和 7 年 6 月 24 日現在

機関番号：33111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2024

課題番号：21K11461

研究課題名（和文）代謝伝達物質としての乳酸から見えてきた、活動筋 - 交感神経フィードバック神経回路

研究課題名（英文）Activation of muscle-sympathetic feedback neural circuits by lactate

研究代表者

増田 紘之（Masuda, Hiroyuki）

新潟医療福祉大学・健康科学部・助教

研究者番号：10738561

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）：運動時に骨格筋で産生される乳酸は、これまで単なる疲労物質と考えられてきたが、近年、運動中に活動筋が盛んに産生する乳酸には様々な生理活性があることが分かってきた。その一つに、筋膜上の代謝受容器で乳酸が検知されると、交感神経を介してフィードバックされ、筋へのエネルギー供給の上昇が挙げられるが、どのようなフィードバック回路が関与しているのかは不明である。そこで、乳酸の投与によって、骨格筋からの求心性線維の脊髄内ターゲットと脊髄内神経回路を同定し、実際に、運動時の乳酸産生がこの神経回路を介して筋交感神経活動を促進するかどうかの確認を目的としたが、パッチクランプの技術が習得できずに実験を終了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、解明が進んでいる局所筋の乳酸代謝と、未解明である乳酸の全身反応を繋ぐ役割があり、また、乳酸の恒常性機構を解明する上での基盤となる研究と位置づけることができる。今後の継続した研究によって、これまで局所筋が対象の中心であったスポーツ科学研究に新しい展開を生み出し、「全身持久力を高めるために効果的なトレーニング処方・運動処方」の開発に応用できる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：While lactate has classically been considered as a waste product of anaerobic metabolism and a fatigue reagent, this view has changed radically in recent years. It is now established that even fully aerobic conditions, lactate is the final product of glycolysis in many cell types. Lactate can be secreted, for example, by working muscle. Striated muscle is innervated by multiple classes of sensory neurons. Specialized muscle spindles give rise to slowly conducting group and fibers. These afferents were recently characterized in detail and shown to have endings in the connective tissue layers closely associated with muscle fibers, and were mechanosensitive and metabosensitive. However, the basis of effects of lactate in the nervous system particularly on primary muscle afferents are currently unclear. The purpose of this study was to examine whether how skeletal muscle afferent by lactate promotes muscle sympathetic nerve activity through which neural circuitry.

研究分野：運動神経生理学

キーワード：骨格筋 乳酸 交感神経活動

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、さまざまな感覚神経を支配しており、とりわけ、神経線維の3群と4群は伝導速度が遅く、機械受容器や代謝受容器としての働きが知られる。これらの受容器は、筋の活動情報をキャッチし、求心性神経を介して中枢神経系へと伝える。近年、こうした求心性線維の特徴が明らかになりつつあり、この結合組織の層にある神経終末が筋線維と接近して、筋の微細なストレッチやATP、低pH、乳酸などを検知することが知られている。

しかしながら、乳酸がどのように求心性神経を介して中枢神経系へと伝えられているのか、その神経回路は明らかではない。これまでに、乳酸は嫌気代謝で生じる老廃物で疲労物質と見なされてきたが、今や好気条件でも産生する解糖系の最終産物であり、細胞内での重要なエネルギー源であることが明らかとされてきている。また、神経系においても、乳酸は、神経代謝物質として、また、配線伝達やポリウム調節、調節後修飾などのポリウム伝達における神経調節物質として、神経細胞のシグナル伝達に広く関与することが提唱されてきている。また、感覚の生物学では、乳酸は、脊髄に存在する侵害受容ニューロンへの作用によって、痛み感覚に寄与する可能性も報告されている。

ところで、乳酸が中枢神経系に伝えられると、フィードバック機構により、筋交感神経活動が亢進する可能性を考慮すると、運動中の活動筋では、血管拡張性の交感神経により血流が増加し、局所筋での乳酸代謝(エネルギー供給)の安定化に寄与するかもしれない。しかし、この機構に、どのようなフィードバック回路が関与しているのかはほとんど不明である。もし、こうした運動時に骨格筋で産生される乳酸の生理活性を理解することができれば、血中乳酸濃度などを指標とした、効果的な運動処方・トレーニング処方に繋がることが期待される。そこで、このような背景を元にして研究を開始させた。

2. 研究の目的

乳酸投与による骨格筋代謝受容器からの求心性情報がどのような神経回路を介して筋交感神経活動を促進するかを確認し(骨格筋からの求心性線維の脊髄内ターゲットと脊髄内神経回路の同定)さらに、実際の運動時に、乳酸の産生がこの神経回路を介して筋交感神経活動を促進するかどうかを確認することを目的とした。そして、以下の課題を設定した。

課題1「骨格筋からの求心性線維の脊髄内ターゲットと脊髄内神経回路を明らかにする」:これまでに代謝受容器はASICとCGRP陽性であることが知られているが、骨格筋からのこれらの線維の脊髄内投射様式は分かっていない。そこでまず課題1では、実験動物を用いて投射先を明らかにし、その先の神経回路を明らかにする。

課題2「運動中の筋交感神経活動亢進が課題1の神経回路を介するかを明らかにする」:課題1の動物実験で明らかにした神経回路が運動中に当てはまるか、実験動物にトレッドミル走行を負荷して検討する。

3. 研究の方法

実験1. 骨格筋からの求心性線維の脊髄内ターゲットと脊髄内神経回路を明らかにする

実験1-1. 骨格筋代謝受容器の脊髄内のどこに投射しているかの確認

内容: 実験動物の骨格筋にトレーサーを注入し、脊髄内の投射を調べる。この際、CGRPを免疫染色し二重に染まったものを筋代謝受容器からの終末とする。

方法: 12週齢のWistar系雄性ラットの腓腹筋にWGA(小麦胚芽凝集素)トレーサーを注入し3日の生存期間の後に還流固定を行い対応する脊髄領域を採取する。切片を作成し、WGAとCGRPに対する抗体で免疫組織化学染色を行い、二重に染まった終末の分布を観察する。予想される結果として、①投射細胞に直接シナプスしている、②インターニューロンを介した神経回路を構築している、③側角の交感神経節前細胞へシナプスする等が考えられる。

実験1-2. 脊髄後角内への乳酸投与はインターニューロンを活性化させるかの確認

内容: 実験1-1の結果を機能的に確認するため、in vivoパッチクランプによる検討を行う。

方法: 12週齢のWistar系雄性ラットにウレタン麻酔を行い、脊髄を露出させ、in vivo標本とする。実験1-1の結果から、その部位を標的にパッチクランプ記録を行う。腓腹筋に乳酸を投与した際の反応を調べることで、代謝受容器からの入力機能的であることを確認する。また、記録細胞の形態を調べることで、神経回路を明らかにする。

実験 2. 運動中の筋交感神経活動亢進が課題 1 の神経回路を介するかを明らかにする

実験 2-1. 運動中に課題 1 で得られた神経回路を介して筋交感神経活動が高まるかの確認

内容：健康増進のために用いられる LT 強度での急性運動時に、課題 1 で明らかにした神経回路の活動（①～③のうちのどれか）が高まるか検討する。

方法：12 週齢の Wistar 系雄性ラットに、LT 強度で 30 分間のトレッドミル走行を負荷する。ラットの頸静脈に装着したカテーテルから走行運動中に血液を採取して乳酸値を測定することにより、トレッドミル走行がラットの乳酸性作業閾値（LT；Lactate Threshold）に相当する運動強度を探る。このようにして得られた LT 強度運動中に、課題 1 で明らかにした神経回路の活性化を測定する。

（1）運動プロトコル

12 週齢の雄性ラットに 5 日間の予備走行トレーニング（1 日 15 分間）を行わせた。その後、ラットの頸静脈にカテーテルを留置し、3 日間の安静後に、3 分間ずつ漸増負荷トレッドミル走行を行わせ、カテーテルを通じて血液を採取した。そして、アークレイ社のラクテートプロ 2 を用い、血中乳酸濃度を測定し、LT を算出した。また、別のラットに、LT 強度未満、LT 強度、LT を超える強度で各 30 分間のトレッドミル走行運動を行わせ、各々の運動終了直後に、下肢のヒラメ筋および足底筋を摘出して凍結保存した。対照群として、安静時の各筋を摘出した。

この LT 強度運動中に、課題 1 で明らかにした神経回路の活性化を測定する。また、分速 10m（LT 強度未満）、分速 22.5m（LT 強度相当）、分速 27.5m（LT を超える強度）で各 30 分間のトレッドミル走行を行わせ、運動強度の比較も行う。

（2）ウエスタンブロッティング解析

凍結保存した筋サンプルは、この一部には、氷上下でプロテアーゼならびにホスファターゼの各インヒビターを加えてホモジナイズした後、可溶化処理を施した。筋ホモジネートは、SDS ポリアクリルアミド電気泳動させて分子量に分けた後、PVDF 膜への電氣的転写を行った。そして、PVDF 膜上の AMPK Thr172 のリン酸化タンパク質を AMPK に対する特異的抗体を用いて検出した。

実験 2-2. 運動中に乳酸を介した筋交感神経活動が高まる運動条件の検討

内容：課題 1 で確かめた神経回路がはたらく運動時間について、運動条件を検討する。

方法：実験 2-1 で実施した LT 運動について、運動時間を 60 分間ならびに 120 分間に延長した場合の課題 1 で得られた神経回路の活性化を比較し、筋交感神経活動に及ぼす影響を見る。

4. 研究成果

実験 1

実験動物の骨格筋にトレーサーを注入し、脊髄内の投射を調べた。続いて、得られた結果が代謝受容器からの入力として機能的かどうかを確認するために、脊髄後角内へ乳酸を投与し、これがインターニューロンを活性化するかどうかを確かめようとした。そこで、ラットにウレタン麻酔を行い、脊髄を露出させ、*in vivo* 標本とし、上記で得られた部位を標的に腓腹筋に乳酸を投与しながら、*in vivo* パッチクランプ記録を行おうとしたが、パッチクランプの技術が習得できずに、実験を終了した。

実験 2

（1）ラットの LT 強度の確認

から、分速 17.5m のトレッドミル走行がラットの LT に相当することを確認した。そこで、分速 10m を LT 強度未満、分速 17.5m を LT 強度下限、分速 22.5m を LT 強度上限、分速 27.5m を LT を超える強度とみなした。

（2）LT 強度に相当する中強度運動での AMPK（Thr172）リン酸化上昇の確認

LT 強度に相当する中強度運動（17.5m/分）を 30 分間行わせた運動直後の足底筋のホモジネートにおいて、Thr172 リン酸化部位における AMPK タンパク質発現量が安静時と比べて増加した（図 1）。また、LT 強度を超える運動では、中強度運動よりも更に上昇割合の増加が見られた。この結果は、先行研究の結果を支持するものであった。

まとめ

実験動物であるラットにおいて、運動中に血中乳酸濃度が高まり出す閾値である LT 強度を確かめ、この強度から活動筋細胞内のエネルギー需要の状態をよく反映する AMPK が活性化し始めることが確かめられた。しかし、骨格筋代謝受容器からの求心性情報がどのような神経回路を介して筋交感神経活動を促進するかを確認するという目的を達成することはできなかった。

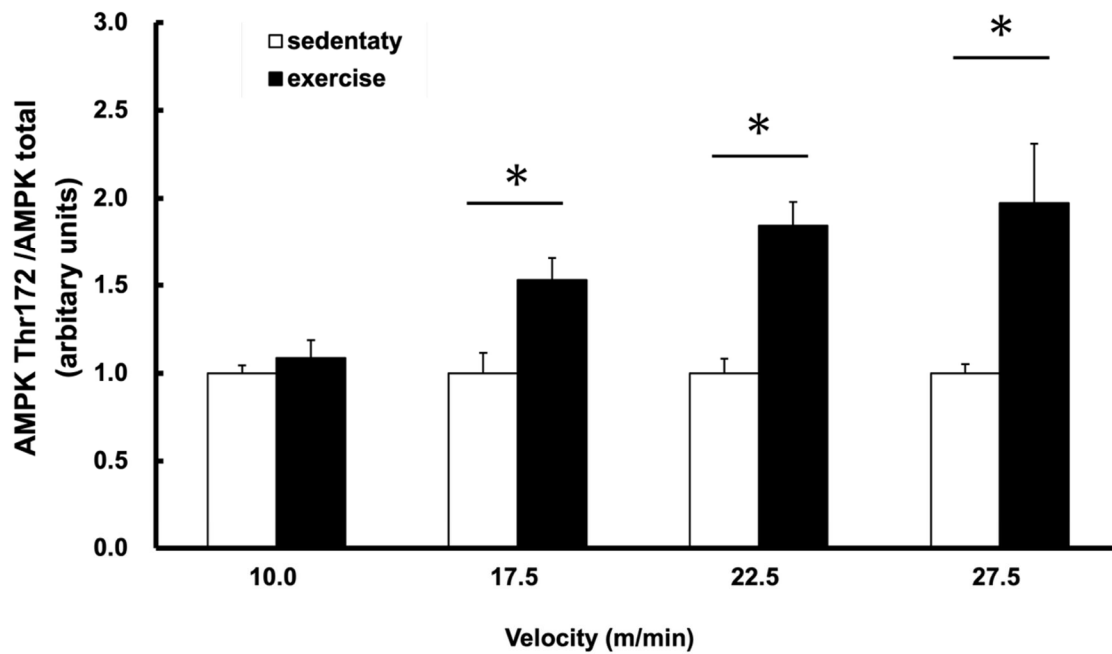


図1 30分間の運動終了直後の足底筋におけるAMPK Thr172のリン酸化量
Means \pm SE(n=8), *p<0.001 VS 同処置内安静群

引用文献

1. Peterson RA, König C, Zimmermann K, Barry CM, Wiklendt L, Brookes SJH. Effects of Lactate on One Class of Group III (CT3) Muscle Afferents. *Front Cell Neurosci* 14: 215, 2020.
2. Fujii N, Hayashi T, Hirshman MF, Smith JT, Habinowski SA, Kaijser L, Mu J, Ljungqvist O, Birnbaum MJ, Witters LA, Thorell A, Goodyear LJ. Exercise induces isoform-specific increase in 5'AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 1150–1155, 2000.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	八坂 敏一 (Yasaka Toshiharu) (20568365)	新潟医療福祉大学・健康科学部・教授 (33111)	

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