

令和元年6月6日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26702029

研究課題名(和文) 生体内乳酸濃度調節による抗肥満の基礎基盤の開発とその応用

研究課題名(英文) Manipulation of blood lactate concentration against obesity

研究代表者

橋本 健志 (Hashimoto, Takeshi)

立命館大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70511608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、乳酸が脂肪・筋の形態や代謝を正に制御し得る生理的ストレス、すなわち運動効果の分子機序であるとの観点から、生体内乳酸濃度を調節することで、低強度・低ボリュームの運動でも効果的に脂肪を減少させ、同時に筋量の減少を抑止し、根本的に肥満を予防・改善することが可能とする新規パラダイムを検証することを目的とした。細胞、動物、ヒトと多角的に研究を進め、乳酸を基軸としたサプリメントを摂取することにより、骨格筋の成長を促し(萎縮を抑止)、脂肪を効果的に減少させること、加えて糖代謝の改善に寄与する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康増進に対する運動効果は周知の事実であるが、そのメカニズムは多面的である。その中で、運動(特に高強度の運動)誘発性の乳酸が運動効果の分子機序の一つとして機能し得ることを、細胞、動物、ヒトを対象とした多角的な実験的検証から明らかにした。このことは、特に乳酸産生を促すような運動の有用性を示唆するとともに、サプリメントなど、外的に乳酸を付加することの有用性も示唆しており、広く万人に有効な肥満と代謝疾患の予防・改善に繋がる知見を提供し得た。

研究成果の概要(英文)：I have been focusing on the lactate metabolism, and found that it functions as an inducer of cell signaling in skeletal muscle cells (e.g., increased mitochondrial biogenesis and myogenesis) and adipocytes (e.g., increased lipases expression). The aim of this study was to examine whether manipulation of blood lactate concentration can be a therapeutic strategy against obesity and metabolic disorder by reducing fat mass and preventing muscle atrophy. I found that the supplementation of lactate-based compound elicits muscle hypertrophy, reduces fat mass, and improves glucose metabolism. These findings suggest that lactate may be a beneficial molecule against obesity and metabolic disorder.

研究分野：運動生理・生化学

キーワード：代謝疾患 運動 サプリメント 加齢 筋肥大 サルコペニア 糖代謝 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームが問題とされる中、科学的根拠に基づいた効果的な抗肥満法を策定し、生活習慣病を予防・改善することは急務である。従来、生活習慣病に対する介入成果には、長期間にわたる運動・栄養療法が必要であり、そのプログラム実施中にドロップアウトする人が極めて多い。特に、高齢者では、肥満と筋量減少の負の連鎖（筋量減少 身体活動量の低下 肥満 身体活動量の低下 筋量減少）が問題視されているが（Roubenoff, 2000）筋量増大のための筋力トレーニングと、抗肥満のための有酸素性運動の両方を長期間継続することは困難であると考えられる。また、肥満を改善するための食事量の制限は、かえって筋量の減少をもたらす。そのため、効果的に脂肪を燃焼し脂肪蓄積を抑えながらも、筋量の減少を抑止するような運動・栄養処方が、運動意欲の亢進と運動習慣の継続をもたらす、肥満の根本的な予防・改善につながると考えられる。

研究代表者はこれまでに脂肪細胞と骨格筋細胞のエネルギー代謝、特に乳酸と脂質代謝の制御機構を中心に研究を進め、単なる疲労物質と誤解されていた乳酸が運動効果の分子機序として作用し、脂肪をエネルギー源として活発に燃焼する骨格筋のミトコンドリアを増加させること（Hashimoto et al., 2007）脂肪細胞の脂肪分解活性を増大させること（Hashimoto et al., 2013）を明らかにした。そして、骨格筋の脂質利用をターゲットとして運動内容を決定するだけでなく、脂肪細胞の脂肪分解の亢進を考慮すれば、運動効果が増大する可能性を見出した（Hashimoto et al., 2013）。さらなる乳酸の生体内有効分子としての発展性として、研究代表者は乳酸の添加で、筋の増殖・分化に関与する転写因子マイオジェニンの遺伝子発現が増加することを認めている（Hashimoto et al., 2007）ことから、筋成育の亢進にも作用し得る可能性を考えた。すなわち、効果的な抗肥満に、脂肪細胞の脂肪分解の亢進と筋細胞のミトコンドリア機能ならびに筋成育の亢進の両方が必要であると考えられたが、生体内の乳酸濃度を調節することで達成できる可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究は、乳酸が脂肪・筋の形態や代謝を正に制御し得る生理的ストレス、すなわち運動効果の分子機序であるとの観点から、生体内乳酸濃度を調節することで、週2回の歩行運動など低強度・低ボリュームの運動でも効果的に脂肪を減少させ、同時に筋量の減少を抑止し、根本的に肥満を予防・改善することが可能とする新規パラダイムを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

研究期間で、培養細胞、動物、ヒトを対象に実験を連動的に推進し、生体内乳酸濃度調節を基盤とした効果的かつ効率のよい画期的な抗肥満法の開発を目指すこととした。

### 研究(1)：乳酸濃度調節の培養細胞に及ぼす影響

3T3-L1 脂肪細胞 / C2C12 骨格筋細胞の増殖・分化過程で経時的に乳酸を、濃度や添加時間、頻度を変えて添加し、次の解析を実施した。脂肪：脂肪分解関連タンパク質の発現変化や脂肪分解活性；骨格筋：生育状況・形態的变化、ミトコンドリア電子伝達系や細胞の分化・増殖、筋タンパク質合成に関わるタンパク質の発現変化を組織化学的・生化学的解析によって解析した。併せて、乳酸と類似の特長が示唆されたカフェインを細胞に添加し、比較検討ならびに相加的な効果の検証を行った。

### 研究(2)：実験動物を用いた、乳酸を基軸としたサプリメント（乳酸サプリメント）の投与と低強度・低ボリューム運動トレーニングとの併用の効果検証と分子機序の解明

健全ラット：i) プラセボ投与群、ii) プラセボ投与 + 運動群、iii) 乳酸サプリメント投与 + 運動群に群分けし、4 週間飼育した。運動はトレッドミルを用いた走運動（20m/min, 30min）を1日おきに実施した。骨格筋の形態・代謝特性の変化を検証した。

肥満ラット：高脂肪食を与えて肥満を呈したラットを、i) プラセボ投与群、ii) プラセボ投与 + 運動群、iii) 乳酸サプリメント投与 + 運動群に群分けし、5 週間飼育した。運動は自発性回転運動器を用いた走運動を1日おきに実施した。サプリメントと運動の併用が、肥満抑制や代

謝改善に及ぼす影響を検証した。

研究(3): ヒト臨床試験: 中年女性を対象とした、乳酸サプリメント摂取の抗肥満効果の実践的検証

中年女性(40~49歳)17名を乳酸サプリメント飲用群とプラセボ飲用群に分け、3ヶ月間それらを毎日飲用してもらった。MRI法とインピーダンス法による全身および部位別の体組成(筋・脂肪量)の計測、骨格筋<sup>1</sup>H MRSと血液分析によって得られる筋内外脂質特性の相互関係を検討した。

#### 4. 研究成果

研究(1): C2C12骨格筋細胞の分化過程で乳酸を基軸とした乳酸カフェイン混合物(乳酸サプリメント)を添加し、細胞の分化・増殖、筋タンパク質合成に関わるタンパク質の発現変化を免疫抗体染色法やウエスタンブロッティング法、生化学的解析によって解析した。その結果、細胞増殖や筋核数の増加を観察した。また、筋形成制御因子の増加も認められた。さらに、筋タンパク質合成に関わるシグナルの活性化も認められた。

研究(2): 健康なラットに対して4週間の持久性走運動を実施し、併せて上述の乳酸を基軸とした混合物(サプリメント)を投与し、筋肥大・形成に及ぼす効果を検討した。その結果、運動を単独で負荷した場合と比較して、サプリメント投与を併用した際、筋形成制御因子や筋タンパク質合成に関わるタンパク質の増加に加えて、筋重量の増加が認められた。このことから、当該サプリメントを併用することで、持久性運動であってもより効果的に筋量増加を誘発できる可能性が示唆された。

食餌誘発性の肥満ラットを対象に、乳酸を基軸とした乳酸カフェイン混合物(乳酸サプリメント)の脂肪減少(抗肥満)に対する効果検証と、分子メカニズムの解明に取り組んだ。具体的に、回転運動器による自発的走運動と乳酸サプリメント投与を併用し、内臓脂肪や皮下脂肪重量、ならびに脂肪組織や骨格筋における脂質代謝に関連するタンパク質の発現を解析した。運動単体に比較して、乳酸サプリメントを併用することにより体重や、特に皮下脂肪の顕著な減少を認めた。しかしながら、脂肪組織における脂質代謝関連タンパク質の発現量には、一部のタンパク質を除いて顕著な違いは認められなかった。また、骨格筋組織においても、脂肪燃焼亢進に関わるタンパク質の発現量には顕著な違いは認められなかった。一方、リパーゼの発現量の増加が認められた。サプリメントが抗肥満に及ぼす影響の詳細なメカニズムについては今後の更なる検討を要する。予備的に、国際共同研究にて、サプリメントの摂取後、一過的に脂肪燃焼が高まることを認めており、その作用メカニズムについての詳細な解析が必要である。また、乳酸サプリメントの摂取によって、糖負荷試験の成績が向上した。このことから、乳酸サプリメントの摂取は、肥満や糖尿病の改善に寄与し得る可能性が示唆された。

研究(3): 一方、中年女性17名を対象に、3ヶ月間にわたる乳酸を基軸とした乳酸カフェイン混合物(乳酸サプリメント)の飲用効果をランダム化比較試験にて検討したところ、プラセボコントロール群と比較して、サプリメント群で体重、体脂肪量、体脂肪率の有意な減少を認めた。今後は、被験者数を増やして、再確認する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10件)

以下、すべて査読有り

- 1 Hashimoto T, Yokokawa T, Narusawa R, Okada Y, Kawaguchi R, and Higashida K. A lactate-based compound containing caffeine in addition to voluntary running exercise decreases subcutaneous fat mass and improves glucose metabolism in obese rats. *Journal of Functional Foods*. 56:84-91, 2019. doi: 10.1016/j.jff.2019.03.007
- 2 Horii N, Uchida M, Hasegawa N, Fujie S, Oyanagi E, Yano H, Hashimoto T, and Iemitsu M.

- “Resistance training prevents muscle fibrosis and atrophy via down-regulation of C1q-induced Wnt signaling in senescent mice.” *FASEB Journal*. 32(7):3547-3559, 2018. doi: 10.1096/fj.201700772RRR.
- 3 Hashimoto T, Tsukamoto H, Takenaka S, Olesen N.D., Petersen L.G., Sørensen H, Nielsen H.B., Secher N.H., Ogoh S. “Maintained exercise-enhanced brain executive function related to cerebral lactate metabolism in men.” *FASEB Journal*. 32(3):1417-1427, 2018. doi: 10.1096/fj.201700381RR.
  - 4 Horii N, Hasegawa N, Fujie S, Uchida M, Miyamoto-Mikami E, Hashimoto T, Tabata I, and Iemitsu M. High-intensity intermittent exercise training with chlorella intake accelerates exercise performance and muscle glycolytic and oxidative capacity in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312(4), 520-528, 2017. doi: 10.1152/ajpregu.00383.2016
  - 5 Takakura H, Ojino M, Jue T, Yamada T, Furuichi Y, Hashimoto T, Iwase S, and Masuda K. Intracellular oxygen tension limits muscle contraction-induced change in muscle oxygen consumption under hypoxic conditions during Hb-free perfusion. *Physiological Reports*, 5: e13112, 2017. doi: 10.14814/phy2.13112
  - 6 Yamada T, Takakura H, Jue T, Hashimoto T, Ishizawa R, Furuichi Y, Kato Y, Iwanaka N, and Masuda K. Myoglobin and the Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Complex IV. *The Journal of Physiology* 594(2): 483-495, 2015. doi: 10.1113/JP270824
  - 7 Yamauchi J, Kurihara T, Yoshikawa M, Taguchi S, and Hashimoto T. Specific characterization of regional storage fat in upper and lower limbs of young healthy adults. *SpringerPlus* 4: 402, 2015. doi: 10.1186/s40064-015-1181-6
  - 8 Yokokawa T, Sato K, Iwanaka N, Honda H, Higashida K, Iemitsu M, Hayashi T, and Hashimoto T. Dehydroepiandrosterone activates AMP kinase and regulates GLUT4 and PGC-1 $\alpha$  expression in C2C12 myotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463: 42-47, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.013
  - 9 Takakura H, Furuichi Y, Yamada T, Jue T, Ojino M, Hashimoto T, Iwase S, Hojo T, Izawa T, and Masuda K. Endurance training facilitates myoglobin desaturation<sup>2</sup> during muscle contraction in rat skeletal muscle. *Scientific Reports*, 5:9403, 2015. doi: 10.1038/srep09403
  - 10 Oishi Y, Tsukamoto H, Yokokawa T, Hirotsu K, Shimazu M, Uchida K, Tomi H, Higashida K, Iwanaka N, and Hashimoto T. Mixed lactate and caffeine compound increases satellite cell activity and anabolic signals for muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, 118(6): 742-749, 2015. doi: 10.1152/jappphysiol.00054.2014

〔学会発表〕(計 26件)

- 1 橋本健志. 栄養介入の分子作用機序解明と抗サルコペニアへの応用. *日本スポーツ栄養学会*, 2018.
- 2 Kume W, Yoshikawa M, Yasuda J, and Hashimoto T. Acute effect of resistance exercise and substantial breakfast on muscle breakdown in healthy young men. *European College of Sport Science 23th Congress*, 2018.
- 3 Sakushima K, Yoshikawa M, and Hashimoto T. Hypoxia promotes skeletal muscle differentiation in C2C12 skeletal muscle cells. *European College of Sport Science 23th Congress*, 2018.
- 4 Yoshikawa M, Sakushima K, Kume W, Usami K, Hosokawa M, Miyashita K, Nishino H, and Hashimoto T. Ameliorative effect of Fucoxanthin on decreased skeletal muscle mass in mice. *European College of Sport Science 23th Congress*, 2018.
- 5 Tsukamoto H, Olesen ND, Petersen LG, Sørensen H, Nielsen HB, Secher NH, Ogoh S and Hashimoto T. “Cerebral energy metabolism and executive function after repeated high-intensity interval exercise with decreased lactate concentration.” *American college of sports medicine's 64<sup>th</sup> Annual Meeting*, 2017.
- 6 Tsukamoto H, Olesen ND, Petersen LG, Sørensen H, Nielsen HB, Secher NH, Ogoh S and Hashimoto T. “Relationship of brain lactate uptake, cerebral hemodynamics, and executive function after high intensity interval exercise in humans.” *Berlin BRAIN & BRAIN PET*, 2017.
- 7 Hashimoto T and Osaki T. The effect of hypoxia on skeletal muscle characteristic. *The 94th Annual meeting of the Physiological Society of Japan*, 2017.
- 8 Yoshikawa M, Fujita T, Hosokawa M, Miyashita K, Nishino H, and Hashimoto T. Fucoxanthinol attenuates triacylglycerol content in mature adipocytes and oxidative stress-induced muscle atrophy in skeletal muscle cells. *Obesityweek*, 2016.
- 9 Kim J, Yoo C-S, Hashimoto T, Tomi H, Kawasaki M, Lim K. Lactate and Caffeine treatment can increase fat oxidation on resting metabolic rate in rats. *The 67th Annual meeting of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2016.
- 10 Yoo C-S, Kim J, Hashimoto T, Tomi H, Kawasaki M, Teramoto N, Lim K. Effect of Caffeine and Lactate mixture treatment on gene expressions related to energy metabolism in rat skeletal muscle. *The*

67th Annual meeting of Korean Society of Food Science and Nutrition, 2016.

- 11 橋本健志. 生体内における乳酸の役割. 第16回日本抗加齢医学会総会, 2016.
- 12 Tsukamoto H, Suga T, Takenaka S, Tanaka D, Takeuchi T, Hamaoka H, Isaka T, Ogoh S and Hashimoto T. The impact of exercise-induced lactate on executive function after high-intensity interval exercise in humans. 63th American College of Sport Medicine, 2016.
- 13 Yokokawa T, Sato K, Narusawa R, Kido K, Mori R, Iwanaka N, Hayashi T, and Hashimoto T. Dehydroepiandrosterone activates 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase and suppresses adipogenesis in 3T3-L1 cells. 日本分子生物学会, 2015.
- 14 Hashimoto T, Kurihara T, Homma T, Yoshikawa M, Narusawa R, Shimazu M, Uchida K, Kawasaki M, Tomi H, and Hamaoka T. Lactate-based compound containing caffeine supplementation effectively decreases fat mass in middle-aged Japanese women. Obesityweek, 2015.
- 15 成澤諒子, 横川拓海, 東田一彦, 橋本健志. 乳酸主体の飲用物が脂肪分解関連タンパク質発現に及ぼす影響の解析. 日本体力医学会, 2015.
- 16 大崎智彦, 横川拓海, 木戸康平, 岩中伸壮, 橋本健志. テオフィリンがC2C12骨格筋細胞における糖・脂質代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響. 日本体力医学会, 2015.
- 17 横川拓海, 大崎智彦, 岩中伸壮, 林達也, 橋本健志. C2C12骨格筋細胞において、カルシウムシグナルならびにAMP kinaseがPGC-1 related coactivatorの遺伝子発現に及ぼす影響の検討. 日本体力医学会, 2015.
- 18 Sakamoto S, Ono T, Murakoshi M, and Hashimoto T. Effect of lactoferrin on lipolytic activity upon catecholamine stimulation in 3T3-L1 adipocytes. 20th European College of Sport Science, 2015.
- 19 横川拓海, 守村直子, 三品昌美, 藤田隆司, 田中秀和, 林達也, 橋本健志. 神経細胞においてp38 MAPKおよびcAMPシグナルはPGC-1 familyの発現を制御する. 第62回日本生化学会近畿支部例会, 2015.
- 20 Yokokawa T, Morimura N, Mishina M, Tanaka H, Fujita T, Iwanaka N, Hayahi T, and Hashimoto T. Re-assessment of mitochondrial biogenesis-related signaling pathways in neuron. 日本分子生物学会, 2014.
- 21 Yokokawa T, Sato K, Iwanaka N, Honda H, Higashida K, Fujita T, Hayahi T, and Hashimoto T. Dehydroepiandrosterone activates 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase in L6 myotubes. 日本生化学会, 2014.
- 22 Hashimoto T, Yokokawa T, and Higashida K. Lactate-based compound containing caffeine effectively decreases fat mass with low intensity exercise training. Obesityweek, 2014.
- 23 Hashimoto T, Oishi Y, Yokokawa T, Iwanaka N, Tsukamoto H, and Higashida K. Lactate-based compound containing caffeine effectively increases muscle mass in rats. Integrative Physiology of Exercise, 2014.
- 24 Iwanaka N, Yokokawa T, Fujita T, Masuda K, and Hashimoto T. Caffeine Treatment Stimulates Myoglobin Synthesis via cAMP Signaling in L6 Skeletal Muscle Cells. Integrative Physiology of Exercise, 2014.
- 25 Yoshikawa M, Kurihara T, Taguchi S, Yamauchi J, and Hashimoto T. The relationship between subcutaneous fat and intramuscular lipid in human limb. 19th European College of Sport Science, 2014.
- 26 Hashimoto T, Oishi Y, Yokokawa T, Tsukamoto H, Iwanaka N, and Higashida K. Lactate-based supplement with caffeine effectively induces satellite cells activity and anabolic signals for muscle hypertrophy in rats. 61th American College of Sport Medicine, 2014.

〔図書〕(計 4件)

- 1 塚本敏人, 橋本健志. 「運動の健康への効用について」 自動車技術70(10): 77-82, 2016.
- 2 橋本健志. 「運動によるミトコンドリア活性化: 乳酸の役割」 アンチ・エイジング医学 日本抗加齢医学会雑誌 井上聡, 森野勝太郎 監修、株)メディカルレビュー社 Vol.11 No. 3: 42-50, 2015.
- 3 橋本健志. 「脂質代謝」 ニュー運動生理学 II 宮村実晴 監修、真興交易(株) 医書出版部: 25-34, 2015.
- 4 橋本健志. 岩中伸壮. 「持久性運動能力とその分子基盤」 進化する運動科学の研究最前線、NTS: 116-123, 2014.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。