

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：34411
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25350831
研究課題名(和文) 運動による骨格筋と脳のモノカルボン酸輸送担体発現効果を高めるシグナル因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the signal factors to increase the monocarboxylate transporter expression of skeletal muscle and brain by exercise

研究代表者
浜田 拓 (Hamada, Taku)

大阪体育大学・体育学部・教授

研究者番号：00466294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、一過性運動により骨格筋と同様に、脳のモノカルボン酸輸送担体(MCT)が増加する効果とそのシグナル因子を検証することであった。一過性運動により、ニューロン特異的なMCT2発現量の増加が認められた。脳部位によっては、MCT1とMCT4の発現量も増加した。さらに、運動が脳領域特異的なMCT発現量を増加する因子を検証した結果、脳内の乳酸や脳由来神経栄養因子(BDNF)は、MCT2発現量を増加させるシグナルとなる可能性が示された。本研究の結果から、運動によって、骨格筋と同様に、脳のMCT発現量が増加する。この適応にともない、ニューロンへの乳酸取り込みが増して、脳機能が高まることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study was to verify the effect of monocarboxylate transporter (MCT) expression in the brain as skeletal muscle and its signal factors to increase MCT expression by exercise. A single bout of exercise increased the neuron-specific MCT2 expression level in the brain. Moreover, MCT1 and MCT4 isoforms were increased. Moreover, the signal factors that increase the brain region specific MCT expression level were examined. The results indicated a possibility that brain lactate production and/or brain-derived neurotrophic factor (BDNF) may become a signal factor that increases the MCT2 expression level in brain. These results suggest that MCT2 expression level of the brain is increased by exercise. As a result of this adaptation phenomenon, lactate uptake ability in the neurons is increased, this can be expected that brain function may enhance.

研究分野：運動生理学

キーワード：運動 脳 骨格筋 乳酸代謝 モノカルボン酸輸送担体

1. 研究開始当初の背景

従来、脳のエネルギー源は血液由来のグルコースのみと考えられてきた。しかし、近年、アストロサイト(グリア細胞)においてグルコースを基に生成された乳酸は、ニューロン(神経細胞)で、エネルギー基質として利用することがわかってきた。モノカルボン酸輸送担体(MCT)は骨格筋と脳において、乳酸代謝活性化に重要な役割を果たしている。特に、運動時、脳においてはグルコースよりも乳酸を優先的にエネルギー基質として利用することが示唆されている。脳内のグリコーゲンはアストロサイト内で乳酸に分解され、MCT1とMCT2を介してニューロンに供給される。特に、MCT2によるニューロンへの乳酸取り込みは学習記憶の形成において必要不可欠であることが証明されている。これまでに運動によるMCT発現効果に関する研究は、骨格筋を中心とした研究が多く、運動による脳のMCT発現効果とそのシグナル因子については不明である。運動が骨格筋と同様に脳の乳酸代謝を高める効果とその分子機構に関しては解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、運動が骨格筋同様に、脳のMCT発現量を高めるか否か、その効果に及ぼすシグナル因子を検証することであった。

3. 研究の方法

1) 実験動物

実験動物として4週齢のSprague-Dawley(SD)系雄性ラット(体重100-120g)を日本クレア株式会社より購入した。ラットは、室内温度 22 ± 2 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、明暗サイクル12時間の環境下で飼育した。飼料は、実験動物用標準固形飼料(CE-2:日本クレア株式会社)を用い、飲料水とともに自由摂取させた。

2) 一過性運動実験

全てのラットは、2日間の予備飼育後、トレッドミル運動に慣れさせるため、全てのラットに5日間の馴化を行った。トレッドミル負荷装置は、夏目製作所株式会社のKN-73モデルを使用した。

2日間の走行訓練をした後に、非運動群(コントロール群)と運動群に無作為に分類した。

運動群には、分速20mに設定して、2時間のトレッドミル走運動を課した。

3) 脳のサンプル採取

MCT発現量を定量化するため、運動群のラットは、トレッドミル走運動終了直後から24時間まで、麻酔下にて断頭により屠殺した。断頭後、氷上で速やかに大脳皮質、海馬、視床下部、脳幹を摘出した。摘出した脳サンプルは速やかにドライアイスで十分に冷却したイソペンタン内で凍結し、分析まで -80 で保存した。

4) 脳内基質濃度の測定

運動による脳内基質濃度の検証は、脳内酵素不活性化装置(MMW-05:室町機械株式会社)を用いて行った。運動終了直後に、ラットの頭部にマイクロ波(5kW、1.7秒)を照射して屠殺した。この方法は、脳内基質濃度を測定するゴールドスタンダードとされている。マイクロ波を頭部に照射して、脳内の温度を瞬間的に上昇させることで、脳内すべての分解酵素を失活させることができ、脳内基質濃度の測定を可能とする。屠殺後、ラットの脳を採取した。採取した脳サンプルはドライアイスで十分に冷却したイソペンタン内で凍結し、測定まで -80 で保存した。

5) MCTアイソフォーム発現量

MCTタンパク質発現量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロット法により、特異的抗体を用いて定量化した。

6) 血中基質濃度の測定

トレッドミル運動実験の血中におけるグルコース、乳酸濃度、ケトン体の測定は、非運動群及び運動終了直後に、ラットの頸静脈から血液を採取して行った。測定は簡易グルコース及び血中乳酸測定器を用いて行った。ケトン体の測定は、測定キットを用いて行った。

7) 乳酸投与実験

2日間の予備飼育後、乳酸を静脈投与するために、全てのラットにカテーテルを挿入する手術を行った。ペントバルビタールナトリウムを腹腔内に投与し、麻酔下にて頸部の右鎖骨上部の皮膚を切開した。右外頸静脈を露出後、カテーテル(株式会社カネカ)を挿入し、外頸静脈に固定後、カテーテルを露出し

た。挿入したカテーテルからヘパリン（持田製薬株式会社）とペニシリン（10 U/g 体重）（Meiji Seika ファルマ株式会社）を投与した後、縫合糸（株式会社シラカワ）で皮膚を縫合した。術後2日間の回復期間において乳酸投与実験を行った。乳酸投与群のラットには、頸静脈に挿入したカテーテルから乳酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社）を投与した。

8) 統計処理

多群間の比較には一元配置 ANOVA を用い、事後比較には LSD を用いた。2 群間の比較には対応のない t 検定を用いた。危険率 5%未満を有意水準とした。

4. 研究成果

1) 血中基質濃度

血中乳酸濃度は、運動開始後 30 分で非運動群に対して増加した。この増加は運動終了まで持続した。また、血中のケトン体も運動の時間依存的に上昇を示した。

2) 脳内基質濃度

一過性運動時に脳の乳酸は急性に増加した。また、ケトン体の1つ、ヒドロキシ酪酸も大脳皮質で急性に増加した。これらの結果は、乳酸やケトン体は運動時に脳のエネルギー基質になりえることを示している。

3) 運動による脳内 MCT 発現量の効果

脳のニューロン特異的な MCT2 発現効果は、大脳皮質、海馬、視床下部において、一過性運動終了後 5~10 時間で増加して、その効果は 24 時間まで持続することを明らかにした。脳領域によっては、MCT1 と MCT4 の発現量も増加した。しかしながら、脳幹における MCT 発現量は増加されなかった。これらの結果は、一過性運動による脳の MCT 発現効果は脳領域特異的に増加することが示唆された。

さらに、本研究では、運動が脳の MCT 発現量を増加させるシグナル因子を検証した。運動中に脳において生成される乳酸が MCT2 発現量を増加させるシグナル因子になるとの仮説を検証するため、運動による脳内の乳酸を定量化した。その結果、一過性運動によって大脳皮質、海馬、視床下部で乳酸が上昇したが、脳幹では、運動による乳酸の上昇はみられなかった。この結果は、運動終了後に MCT2

発現量が増加した脳領域と一致した。これらの知見から、運動中に脳において乳酸が増加し、これが MCT2 発現量を増加させるシグナルとなる可能性が推測される。

さらに、本研究では、乳酸以外の分子にも着目した。ニューロンへの乳酸供給を担う MCT2 が増加した脳領域では、脳由来神経栄養因子 (BDNF) とその受容体 (TrkB) が増加することを明らかにした。また、アストロサイト特異的な MCT4 が増加した視床下部では低酸素誘導因子 (HIF-1) の増加も見られた。

4) 乳酸投与による脳内乳酸動態の検証

乳酸投与に血中の乳酸濃度が上昇すると、脳内の乳酸濃度も上昇するか否かを検証した。その結果、血中と各脳領域における乳酸濃度は、投与前と比べて乳酸投与後、急性に上昇を示した。乳酸投与後の血中と各脳領域における乳酸濃度との関係を検討した結果、血中と各脳領域における乳酸濃度との間には有意な相関関係が認められた。さらに、血中と全脳領域の乳酸濃度との関係においても、正の高い相関が認められた。先行研究においては、脳内グリコーゲンは、中強度・持久性運動開始後では、減少しないことが示されている (Matsui et al. J. Physiol. 2011)。一過性の中強度・持久性運動開始における脳内乳酸濃度は、血中由来を介して上昇し、MCT 発現量に影響する因子となる可能性が推測される。

以上の研究成果より、一過性の中強度・持久性運動により脳の乳酸や MCT タンパク質発現量は急性に増加することを明らかにした。その運動の発現効果は、脳の領域特異的に高められ、乳酸、BDNF、HIF-1 等のシグナル分子の関与が示唆された。運動による脳の MCT 発現効果は、骨格筋と同様な適応効果が示され、脳の MCT 増加を介してニューロンへの乳酸取り込みが増え、脳機能が高まる可能性が期待できる。

< 引用文献 >

Matsui T, et al. Brain glycogen decreases during prolonged exercise. J Physiol 589: 3383-3393, 2011.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Hamada T, Takimoto M, Regulation of the acute exercise-induced expression of the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 in skeletal muscle, J. Phys. Fitness Sports Med., 査読なし, 2巻, 2013, 85-92

Takimoto T, Takeyama M, Hamada T. Possible involvement of AMPK in acute exercise-induced expression of monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 mRNA in fast-twitch skeletal muscle. Metabolism, 査読有り, 62巻, 2013, 1633-1640
DOI: 10.1016/j.metabol.2013.06.010.

Takimoto T, Hamada T, Acute exercise increases brain region-specific expression of MCT1, MCT2, MCT4, GLUT1, and COX IV proteins, J. Appl. Physiol., 査読有り, 116巻, 2014, 1238-1250
DOI: 10.1152/jappphysiol.01288.2013.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 拓 (HAMADA, Taku) 大阪体育大学・
大学院スポーツ科学研究科・教授
研究者番号: 00466294

(2) 研究分担者

林 達也 (HAYASHI, Tatsuya) 京都大学・
大学院人間・環境学研究科・教授
研究者番号: 00314211