

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560344

研究課題名(和文)脳機能亢進をもたらす乳酸の新規生理機能の解明

研究課題名(英文)The significance of lactate on improved brain function

## 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・准教授

研究者番号：70511608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、運動効果の分子機序としての乳酸が、認知機能などの脳機能にどのような影響をもたらすかを探究し、認知症改善への応用を目指すものである。そして、認知症の予防または改善に効果的な運動・栄養処方の確立のための学術的基礎の構築を目的とした。神経細胞に対する乳酸添加や、実験動物に対する運動と乳酸サプリメント併用の結果から、乳酸が脳機能の亢進に寄与する可能性を示唆する結果を得た。また、ヒトを対象とした実験から、乳酸代謝と神経活動の亢進が認知機能亢進に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to assess the relevance of lactate, which is an "exercise-induced physiological molecule", on brain function such as cognitive function. The treatment of lactate on the cultured neuron and animal with exercise training suggested the possibility that lactate might improve neuronal function. Furthermore, in the human study, we suggest that augmented lactate metabolism and neuronal activity may be important factors for exercise-induced improvement of cognitive function. These findings may provide insight into development of the effective ways of exercise training and/or nutritional support on cognitive function.

研究分野：運動生理・生化学

キーワード：認知機能 運動 乳酸 実行機能

## 1. 研究開始当初の背景

脳の神経細胞（ニューロン）の主要なエネルギー基質はグルコースとその分解産物である乳酸である。脳にはニューロン以外にアストロサイトと呼ばれるニューロンの数倍以上存在する細胞があり、解糖系によって産生した乳酸をニューロンに供給し、その代謝活動を支える重要な役割を果たしている。一方、ニューロンは比較的長期の記憶に多大なエネルギーを要する。逆に、ニューロンのミトコンドリア機能（エネルギー産生）は加齢とともに減退し、(アルツハイマー型)認知症などの疾患発症の要因となる。したがって、ニューロンへの乳酸の供給ならびにミトコンドリア機能の亢進が、記憶力や認知機能の向上に繋がる可能性がある(仮説)。申請者は、運動によって産生される乳酸が骨格筋や脂肪細胞のミトコンドリア増殖および乳酸輸送体増加を惹起することを明らかにしていることから、外的に乳酸をニューロンに供給すること、ならびに乳酸刺激によってニューロンの乳酸輸送体やミトコンドリアを増加させることにより、ニューロンの重要なエネルギー源である乳酸利用が高まり、記憶や認知機能が亢進するのではないかという発想に至った(仮説)。

## 2. 研究の目的

認知症患者は世界で増加の一途をたどっているが、学術的基礎研究が不足しており、具体的な対抗策は極めて乏しい。本研究は、外的に乳酸をニューロンに供給することで、ニューロンへのエネルギー基質の供給ならびにミトコンドリア機能の亢進を誘発し、記憶力や認知機能の向上をもたらすことが可能であると仮説をたて、その検証を細胞から生体レベルで統合的に遂行することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)細胞を対象とした研究では、ラットの胎仔からニューロンの初代培養細胞を作製し、乳酸を添加した際の神経機能に関わる各種タンパク質発現を検討した。

(2)また、実験動物に対して乳酸を基軸としたサプリメントを投与し、運動を併用した際の、脳機能に関わる各種タンパク質発現を検討した。

(3)ヒトを対象とした研究では、運動強度や様式を変えることで、乳酸産生量や蓄積量に差異を引き起こした場合の認知実行機能を評価した。

## 4. 研究成果

(1)ラットの胎仔から海馬ニューロンの初代培養細胞を作製し、乳酸を添加した際の神経機能に関わる各種タンパク質発現を検討した(Yokokawa et al., 2014; 横川ら、2015)。

乳酸は、ミトコンドリアバイオジェネシスの誘導に関わるタンパク質の発現を調節す

る転写因子である CREB/ATF family の CREB、及び ATF2 の上流のタンパク質である p44/42 MAPK の有意なリン酸化の亢進、及び CaMKIV のリン酸化の増加傾向をもたらした。20mM の乳酸刺激は p44 MAPK のリン酸化を添加後 5 分、10 分の時点で有意に増加させた。同様に、p42 MAPK においても乳酸添加後にリン酸化の亢進が観察され、30 分までリン酸化が亢進した。CaMKIV に関しては有意な増加は観察されなかった。

p44/42 MAPK 及び CaMKIV は転写因子である CREB 及び ATF2 をリン酸化及び活性化し、ミトコンドリアバイオジェネシスの決定因子として示唆されている PGC-1 の発現を上方制御する。同様に、ミトコンドリアバイオジェネシスを正に制御すると示唆されている Sirt1 についても、CREB の活性により制御されていることが報告されている。以上から、初代神経培養細胞に対する乳酸添加が CREB 及び ATF2 のリン酸化をもたらす、PGC-1 及び Sirt1 発現を増加させる可能性の検証を行った。

初代神経培養細胞に対する 20 mM の乳酸添加は、添加 10 分後において CREB のリン酸化の亢進をもたらした。一方、ATF2 に関しては有意な増加は見られなかったが、添加 10 分後及び 30 分後において増加傾向が観察された。

以上の結果から、PGC-1 の発現増加がもたらされる可能性が考えられたことから、RT-PCR 及び WB 法により PGC-1 の遺伝子及びタンパク質発現を測定したが、双方において乳酸添加に伴う増加は観察されなかった。一方、PGC-1 と同様に CREB により発現が制御されていることが報告されている Sirt1 に関しては、20 mM の乳酸添加 24 時間後において有意にタンパク質発現が増加することが観察された。

上記のように、乳酸により CREB のリン酸化がもたらされ、PGC-1 の核内移行を制御することでミトコンドリアバイオジェネシスを正に制御する Sirt1 の発現量が増加することが確認されたため、次に乳酸添加がミトコンドリアタンパク質の発現を増加させる可能性の検証を行った。

乳酸添加はミトコンドリアマーカータンパク質の遺伝子発現並びにタンパク質発現の増加をもたらした。初代神経培養細胞に対する 20 mM 乳酸の 3 時間の添加は、ミトコンドリア電子伝達鎖の構成タンパク質である COXIV の遺伝子発現を有意に増加させた。同様に、タンパク質発現においても、24 時間の乳酸添加により COXIV の有意な増加が観察された。同じくミトコンドリアマーカータンパク質である VDAC のタンパク質発現においても、24 時間の乳酸刺激により有意な増加が見られた。また、ミトコンドリアに局在する抗酸化酵素であり、神経変性疾患との関わりも報告されている SOD2 及びミトコンドリア機能を脱アセチル化により制御する Sirt3 のタ

ンパク質発現に関しても有意な増加をもたらした。

神経細胞の正常な機能発揮におけるミトコンドリアの重要性や、神経変性疾患がミトコンドリア機能不全と強く関係しているとの知見から、本研究は、乳酸が神経細胞における細胞内シグナル応答を惹起し、ミトコンドリアバイオジェネシスを誘導することにより、脳機能の亢進や神経変性疾患の予防に寄与する可能性を示唆するものである。

(2) 9 週齢雄性ラットをコントロール群 (Con)、運動群 (Ex)、運動 + 乳酸投与群 (Ex+Lac) の 3 群に分け、運動はトレッドミル走運動を強制走行装置を用いて、20 m/min の速度で 30 分間走行させることを週に 3 回、4 週間行った。Ex+Lac 群には経口投与により毎日乳酸サプリメントを投与した。その結果、Con 群と比して、PGC-1、SOD1、Sirt3 の発現量は Ex 群で有意に増加したが ( $p < 0.05$ )、Ex+Lac 群では一層それらのタンパク質の発現量は増加した ( $p < 0.01$ )。一方、COXIV の発現量増加は Ex 群では認められなかったが、Ex+Lac 群では Con 群や Ex 群と比して、有意に発現量が増加した。このことから、単に持久性運動を行うよりも、運動と乳酸サプリメントを併用することで、脳のミトコンドリアバイオジェネシスなど、機能亢進に関わると考えられるタンパク質発現を効果的に増加させる可能性が示唆された (塚本ら、2014)。

(3) 従来、認知機能を亢進させるために効果的な運動処方とされてきた中強度定常運動と比較して、高強度運動を間断的に繰り返し実施する高強度間欠的運動を実施した方が、運動後の認知機能の亢進がより長い時間持続することをヒトを対象に明らかにした。この研究により、高強度間欠的運動は、認知機能を効果的に改善させるための運動処方となりうる可能性が示された (Tsukamoto et al., *Physiol Behav* 2016b)。

また、高強度運動を間断的に繰り返し実施する高強度間欠的運動を、1 時間の休息を挟んで 2 回実施すると、1 回目の運動と比較して 2 回目の運動による乳酸産生量が少なくなると明らかにした。さらに、上述した我々の報告 (Tsukamoto et al. *Physiol Behav*, 2016b) では、高強度間欠的運動が、運動後の認知機能の亢進をより長い時間持続させることを報告したが、同じ運動強度、実施時間、運動様式の運動であるにもかかわらず、2 回目の高強度間欠的運動のように乳酸産生量が少なくなると、亢進した認知機能の持続性が損なわれてしまうことを明らかにした。この研究により、運動による認知機能亢進の持続性に、運動誘発性の乳酸産生量が重要な役割を担っている可能性が示された Tsukamoto et al., *Physiol Behav* 2016a)。競技性スポーツなどで、競技開始直後および競技終盤に頻繁に見受けられる認知機能の

低下には、乳酸が関与している可能性が考えられるが、脳の乳酸代謝と認知機能の直接的な関係については更なる検証が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1) Tsukamoto H, Suga T, Takenaka S, Tanaka D, Takeuchi T, Hamaoka T, Isaka T, Ogoh S, and Hashimoto T. Repeated high-intensity interval exercise shortens the positive effect on executive function during post-exercise recovery in healthy young males. *Physiology and Behavior* 160: 26-34, 2016a. (査読有り)

2) Tsukamoto H, Suga T, Takenaka S, Tanaka D, Takeuchi T, Hamaoka T, Isaka T, and Hashimoto T. Greater impact of acute high-intensity interval exercise on post-exercise executive function compared to moderate-intensity continuous exercise. *Physiology and Behavior* 155: 224-230, 2016b. (査読有り)

3) Lund A, Secher NH, Hirasawa A, Ogoh S, Hashimoto T, Schytz HW, Ashina M, Sørensen H. Ultrasound tagged near infrared spectroscopy does not detect hyperventilation-induced reduction in cerebral blood flow. *The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 76(1): 82-87, 2015. (査読有り)

4) Ogoh S, Tsukamoto H, Hirasawa A, Hasegawa H, Hirose N, and Hashimoto T. The effect of changes in cerebral blood flow on cognitive function during exercise. *Physiological Reports*, 2(9): e12163, 2014. (査読有り)

5) Tsukamoto H, Hashimoto T, Hirasawa A, Hasegawa H, and Ogoh S. Effect of hyperventilation-induced decrease in cerebral blood flow on cognitive function in healthy students. *Japanese Journal of Physiological Anthropology*, 19(4): 225-232, 2014. (査読有り)

[学会発表](計 10 件)

1) 田中大智, 菅 唯志, 塚本敏人, 武中沙葵, 浜岡隆文, 橋本健志, 伊坂忠夫 運動後認知機能亢進に及ぼす運動と音楽の併用効果の検討. 日本体力医学会, Sep 20, 2015. 和歌山県民文化会館 (和歌山県)

2) 武中沙葵, 塚本敏人, 菅唯志, 田中大智,

浜岡隆文, 伊坂忠夫, 橋本健志. 運動後の実行機能亢進を持続させるための最適な運動実施時間の検討. *日本体力医学会*, Sep 19, 2015. 和歌山県民文化会館 (和歌山県)

3) 塚本敏人, 菅唯志, 武中沙葵, 田中大智, 伊坂忠夫, 小河繁彦, 橋本健志. 運動による乳酸産生量と実行機能亢進の関係性. *日本体力医学会*, Sep 19, 2015. 和歌山県民文化会館 (和歌山県)

4) 塚本敏人, 菅唯志, 石橋彩, 武中沙葵, 後藤一成, 海老久美子, 伊坂忠夫, 橋本健志. 運動前のココア飲料摂取が高次脳機能に与える影響. 第 2 回 *日本スポーツ栄養学会*, July 5, 2015. 立命館大学 BKC キャンパス (滋賀県)

5) Tsukamoto H, Suga T, Takenaka S, Takeuchi T, Tanaka D, Hamaoka T, Isaka T, and Hashimoto T. Local resistance exercise improves cognitive executive function in a dose-dependent manner. *Brain&Brain PET - ISCBFM*, June 28, 2015. Vancouver (Canada)

6) Tsukamoto H, Suga T, Takenaka S, Tanaka D, Takeuchi T, Hamaoka T, Isaka T, and Hashimoto T. The effect of high-intensity interval exercise and moderate-intensity continuous exercise on executive function in post-exercise recovery. *20th European College of Sport Science*, June 24, 2015. Malmo (Sweden)

7) 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*, May 16, 2015. 立命館大学 BKC キャンパス (滋賀県)

8) Yokokawa T, Morimura N, Mishina M, Tanaka H, Fujita T, Iwanaka N, Hayashi T, Hashimoto T. Re-assessment of mitochondrial biogenesis-related signaling pathways in neuron. *日本分子生物学会*, Nov 27, 2014. 神戸ポートアイランド (兵庫県)

9) Tsukamoto H, Hashimoto T, Hirasawa A, Hasegawa H, and Ogoh S. Effect of hyperventilation-induced decrease in cerebral blood flow on cognitive function in healthy students. *61th American College of Sport Medicine*, June 1, 2014. Orland (USA)

10) 塚本敏人, 横川拓海, 橋本健志. 運動と乳酸主体のサプリメント併用による脳内

ミトコンドリア関連因子活性化の検証. 第 69 回 *日本体力医学会*, Sep 19, 2014. 長崎大学 (長崎県)

〔その他〕  
ホームページ等  
立命館大学スポーツ健康科学部ニュース一覧  
<http://www.ritsumei.ac.jp/shs/news/article.html?id=216>

立命館大学スポーツ健康科学部ニュース一覧  
<http://www.ritsumei.ac.jp/shs/news/article.html?id=193>

## 6. 研究組織

### (1) 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・准教授  
研究者番号: 70511608