

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25750331

研究課題名(和文) 乳酸による骨格筋ミトコンドリア新生のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of skeletal muscle mitochondrial biogenesis by lactate

研究代表者

星野 太佑 (Hoshino, Daisuke)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教

研究者番号：70612117

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、乳酸が骨格筋ミトコンドリア増殖を引き起こすのか、摘出筋を用いた実験系とC2C12筋管細胞の電気刺激の系で検証した。その結果、摘出筋に対する10mM乳酸刺激は、ミトコンドリアの新生を抑制した。しかし、この時乳酸添加24時間後では、培地中の乳酸濃度が25mMを超えており、非生理学的な高い乳酸濃度であった。電気刺激による乳酸濃度の増加は、C2C12筋管細胞のPGC-1 $\alpha$ のmRNA量を増加させた。以上の結果から、筋収縮に伴うような乳酸濃度の増加は、転写制御を介してミトコンドリアの新生を引き起こす可能性を示唆した。今後、乳酸濃度の濃度応答性の違いをさらに検証する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We examined whether lactate causes skeletal muscle mitochondrial biogenesis, using extracted mouse muscle incubation system and electric stimulation system to C2C12 myotubes. As a result, 24h-lactate stimulation (10 mM) for extracted mouse muscle suppressed mRNA contents of PGC-1 $\alpha$  and mitochondria. However lactate concentration exceeded 25 mM after 24 hours of lactate incubation, which was non-physiological high lactate concentration. Elevation in lactate concentration due to electrical stimulation increased the mRNA contents of PGC-1 $\alpha$  in C2C12 myotubes. These results suggest that the increase in lactate concentration associated with muscle contraction may cause mitochondrial biogenesis via transcriptional regulation. It is necessary to clarify the dose response of lactate concentration in further studies.

研究分野：運動生化学

キーワード：乳酸 ミトコンドリア 運動 転写制御 骨格筋

### 1. 研究開始当初の背景

乳酸には、ミトコンドリアを増加させるシグナル伝達因子としての役割があることがわかってきている。先行研究では、L6細胞に高濃度の乳酸を添加した場合、ミトコンドリアやMCTのmRNA量とタンパク質量が増加したことを報告している (Hashimoto et al. 2007)。また、HCT116細胞を用いた研究では、乳酸の添加により、DNAのヒストン脱アセチル化酵素の活性が抑制されたことが明らかとなっている (Latham et al. 2012)。この結果は、特定の遺伝子は不明だが、DNAからRNAへの転写の制御に乳酸が影響を与えている可能性を示唆している。これらの先行研究の結果から、乳酸がミトコンドリアの遺伝子発現を変化させる因子であることは明らかである。しかし、細胞レベルではなく、骨格筋レベルで乳酸によるミトコンドリア新生のメカニズムは明らかとされていない。乳酸による骨格筋のミトコンドリア新生のメカニズムが明らかとなれば、どのように乳酸を産生し酸化するトレーニングが効率的か、スポーツや運動処方現場など実践的に活用できる。

これまで、ミトコンドリア新生のメカニズムに、転写補助因子である Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1alpha)が関わることが明らかとされている。乳酸刺激はこのPGC-1alphaを介して、ミトコンドリア新生を引き起こすことが報告された (Hashimoto et al. 2007)。しかし、この研究では、乳酸の添加によるPGC-1alphaのmRNA量の増加は1.2倍程度であり、その増加に生理学的意味があるのか不明である。一方で、申請者らは、薬剤によって乳酸濃度を低く保った運動は、通常の高い乳酸濃度を保った運動に比べ、ミトコンドリア新生を抑制したが、PGC-1alphaの発現 (mRNAとタンパク質量)に違いはなかったことを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

乳酸が骨格筋のミトコンドリアを増加させるメカニズムは明らかとなっていない。乳酸によるミトコンドリア新生のメカニズムが明らかとなれば、どのように乳酸を活かしたトレーニングが良いのか、実践的にも大いに活用できる。そこで本研究の目的は、乳酸による骨格筋のミトコンドリア新生のメカニズムを明らかにすることであった。

### 3. 研究の方法

上記の目的を達成するために以下の2つの実験をおこなった。

- (1) ラットの滑車上部筋を摘出し、95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>のガスを注入しながら、37℃条件下のフラスコ内で乳酸10mMの濃度で、6時間もしくは24時間のインキュベーションをおこなった。ラット (~

100g)の滑車上部筋を傷を付けないように摘出し、適度なホルモン、抗生物質を含んだMEM alpha medium 2.5 mlの中に浸した。右脚を乳酸添加、左脚をコントロールとして実施した。6時間もしくは24時間後、筋をフラスコから取り出し、すぐに液体窒素で-80℃保存した。その後、real time PCR法により、PGC-1aとミトコンドリアのmRNA量を測定した。

- (2) マウス骨格筋由来のC2C12細胞を分化させ、筋管細胞にした後、2Hz、3ms、50Vの電気刺激による筋収縮をおこなった。そのときに、乳酸濃度、PGC-1aやミトコンドリアのmRNA量を計測した。

### 4. 研究成果

(1) 先行研究のL6細胞を用いた結果 (Hashimoto et al. 2007)では、乳酸10mM6時間の添加がミトコンドリア酵素のタンパク質量の増加を確認している。そこで、本研究において、まず6時間の乳酸10mMの刺激がPGC-1aとミトコンドリアの酵素のタンパク質量、mRNA量を増加させるのか検証した。その結果、6時間10mM乳酸添加による変化はみられなかった (Fig.1)。この結果から、細胞と同様の乳酸によるミトコンドリア新生を引き起こすためには、6時間では時間が短い可能性が考えられた。

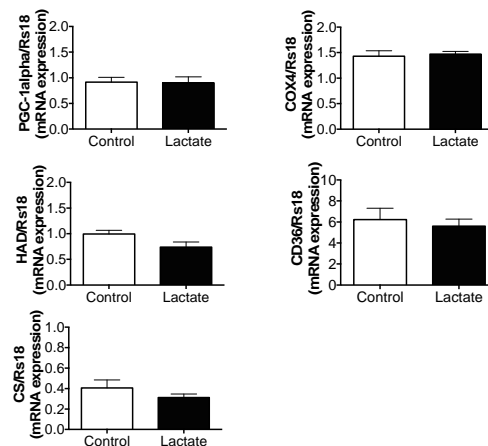


Fig.1 PGC-1alpha, Cytochrome c oxidase subunit 4 (COX4)、hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD)、fatty acid translocase/CD36 (CD36)、Citrate Synthase (CS)を Ribosomal protein 18 (Rs18)で標準化した。Control (open bar) : 乳酸なし培地のみ、Lactate (closed bar) : 培地に10mM乳酸添加。6時間後のmRNA量。

そこで、乳酸刺激を24時間おこなった。その結果、24時間後にPGC-1aとミトコンドリアの酵素(HAD、Alas)のmRNA量が有意にコントロール群に比べて、低値を示した (Fig.2)。この結果は、先行研究と反対の結果であり、mRNAレベルであるが、乳酸がミトコンドリア新生を抑制している可能性を示

唆している。この結果は、先行研究としかしながら、培地の乳酸濃度を測定してみたところ、この実験開始時点では、乳酸添加群が10mM、コントロール群は0mMであったが、インキュベーション後にはコントロール群で、11.5mM、乳酸刺激群で25mM以上であった。このことから、乳酸刺激群で、培地中の乳酸濃度が異常に高い値だったことが、この結果と関連している可能性がある。25mMは生理学的に高強度運動をした後の乳酸濃度よりも高いことから、生理学的な濃度を逸脱していると考えられる。乳酸が慢性的に高値を示す場合、ミトコンドリアの機能不全を導くことが明らかになっていることから(Ogasawara et al. 2010)、非生理学的な高い乳酸濃度が、本研究結果と関連していた可能性がある。

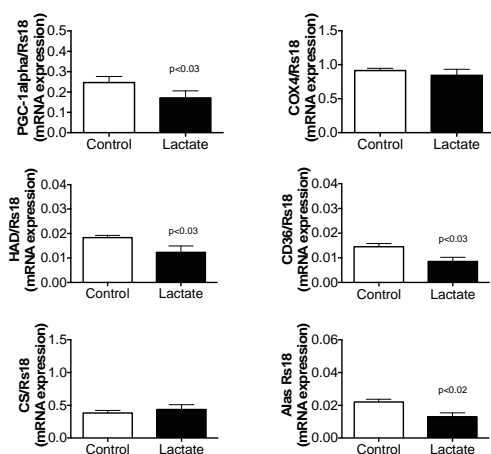


Fig.2 PGC-1alpha, COX4, HAD, CD36, CS、Aminolevulinic acid synthase (Alas)をRs18で標準化した。Control (open bar) : 乳酸なし培地のみ、Lactate (closed bar) : 培地に10mM 乳酸添加。24時間後のmRNA量。

(2)研究には、C2C12 マウス骨格筋培養細胞を用いた。乳酸濃度の増加のために電気刺激による筋収縮を用いた。16時間前に培地を交換したC2C12筋管細胞に対して、50V、3ms、2Hzの電気刺激による筋収縮を1時間おこなった。収縮後6時間後までの乳酸濃度を測定したところ、収縮後6時間後までに持続的に細胞内の乳酸濃度が3倍程度増加したことを確認した。次に、ミトコンドリアの新生の上流因子と考えられているPGC-1alphaのmRNA増加をreal time PCR法を用いて測定した。その結果、PGC-1alphaのmRNAが増加したことを確認した。よって、細胞内の乳酸濃度の増加が、ミトコンドリア新生と関連している可能性が考えられた。

(1), (2)の結果をまとめると、乳酸濃度が非生理学的に高い場合、ミトコンドリアの新生は認められなかった。しかし、筋収縮に伴うような乳酸濃度の増加は、ミトコンドリアの新生を転写制御を介して引き起こした。今後、

乳酸濃度の濃度応答性の違いをさらに検証する必要がある。

## 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4件)

1. Daisuke Hoshino, Susumu Setogawa, Yu Kitaoka, Hiroyuki Masuda, Yuki Tamura, Hideo Hatta, Dai Yanagihara. Exercise-induced expression of monocarboxylate transporter 2 in the cerebellum and its contribution to motor performance. *Neurosci Lett.* 633: 1-6, 2016. 査読有
2. Daisuke Hoshino, Yu Kitaoka, Hideo Hatta. High-intensity interval training enhances oxidative capacity and substrate availability in skeletal muscle. (review article). *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine.* 5: 13-23, 2016. 査読有
3. Daisuke Hoshino, Yuki Tamura, Hiroyuki Masuda, Yutaka Matsunaga, Hideo Hatta. Effects of decreased lactate accumulation after dichloroacetate administration on exercise training-induced mitochondrial biogenesis in mouse skeletal muscle. *Physiol Rep* 3: e12555, doi: 10.14814/phy2.12555, 2015. 査読有
4. Daisuke Hoshino, Tatsuya Hanawa, Yumiko Takahashi, Hiroyuki Masuda, Mai Kato, Hideo Hatta. Chronic post-exercise lactate administration with exercise training increases muscle glycogen concentration and monocarboxylate transporter 1 protein in mice. *J Nutr Sci Vitamin* 60: 413-419, 2014. 査読有

[学会発表](計3件)

1. 星野太佑、八田秀雄. 高強度インターバルトレーニングによる骨格筋ミトコン

ドリアの適応と乳酸. 第 168 回日本体力  
医学会関東地方会. 首都大学東京荒川  
キャンパス (東京都荒川区). 2016 年 12  
月 3 日.

2. **星野太佑**, 田村優樹, 増田紘之, 八田秀  
雄. ジクロロ酢酸摂取による運動中の  
乳酸蓄積の低下はミトコンドリアの増  
加を減衰させる. 第 68 回日本体力医学  
会大会. 日本教育会館 (東京都千代田  
区). 2013 年 9 月 23 日.
3. **Daisuke Hoshino**, Yu Kitaoka, Osamu  
Setogawa, Hiroyuki Masuda, Yuki Tamura,  
Dai Yanagihara, Hideo Hatta. Acute  
exercise increases monocarboxylate  
transporter 2 expression in mouse  
cerebellum. Experimental Biology 2013.  
Boston Convention and Exhibition Center  
(USA Boston). April 22 2013.

〔図書〕(計 1 件)

1. **星野太佑**. 乳酸摂取は運動パフォーマ  
ンスを増大させるか、八田秀雄編著、乳  
酸をどう活かすか II、杏林書院、238  
(pp218-228)、2016.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 太佑 (HOSHINO DAISUKE)

東京大学・大学院理学系研究科・特任助教

研究者番号：70612117

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )