

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01729

研究課題名(和文) 不活動による骨格筋機能障害の分子機序の解明と予防法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of muscle insulin resistance induced by physical inactivity and establishment of prevention method.

研究代表者

笥 佐織 (KAKEHI, saori)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：00450560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：不活動の骨格筋インスリン抵抗性惹起メカニズムを明らかとするため、不活動モデルとしてマウスの片側下肢を24時間固定し、ヒラメ筋の評価を行った。結果、固定はインスリン感受性低下と細胞内DAG蓄積とインスリンシグナル減弱を惹起した。また、DAG生成の律速酵素であるLipin1の発現量、活性が増加した。野生型・異性体Lipin1の各々過剰発現系を用いて検討した結果、Lipin1が固定によるDAG蓄積とインスリン感受性低下に關与している可能性が示唆された。以上より、身体不活動によるインスリン感受性低下を予防するための標的分子としてLipin1が重要であることが予想される。

研究成果の概要(英文)：Physical inactivity (PI) has been shown to impair muscle insulin sensitivity (M-IS); however, its mechanisms have not been elucidated yet. To elucidate them, we used 24h hind-limb cast immobilization (HCI) for PI model in mice. We found that 24h HCI increased intramyocellular diacylglycerol (IMDG), while IM triacylglycerol (TG) was not changed. In parallel with IMDG accumulation, M-IS and insulin signaling were reciprocally impaired. The IMDG accumulations were also accompanied by increased expression level and activity of Lipin1, an enzyme converting phosphatidate to DG. The HCI induced IMDG accumulation and impaired M-IS in soleus muscle were prevented by dominant negative Lipin1 overexpression in the muscle. Finally, we found the possibility that 24h HCI in human also induce IMDG accumulation and Lipin1 expression. These results suggested that 24h HCI increase IMDG and decrease M-IS. Increased Lipin1 activity is at least partly involved in the mechanisms.

研究分野：運動科学

キーワード：不活動 骨格筋 インスリン感受性 細胞内脂質

1. 研究開始当初の背景

近年、日本における糖尿病や動脈硬化症の患者数の増加は著しく、特に、糖尿病患者数は増加の一途を辿っている。2007年の集計では、糖尿病または糖尿病が強く疑われる人は2,210万人にまで達しており、早急にその予防を考える必要がある。肥満によりもたらされるインスリン抵抗性は、2型糖尿病、メタボリックシンドロームの上流に位置していると考えられ、動脈硬化症進展の根本的原因として認識されてきた。しかし、日本で行われた大規模臨床試験である Japan Diabetes Complications Study などにより糖尿病患者の平均BMIは23 kg/m²と正常レベルであること、心血管系イベントによる死亡は非肥満患者 (BMI < 25 kg/m²) が全体の約80%を占めていることが明らかとなった。さらにこの点に関連して、1H- magnetic resonance spectroscopy (MRS)法による肝臓、骨格筋における細胞内脂質 (異所性脂肪) の測定、安定同位体ブドウ糖を用いた肝臓、骨格筋の精密なインスリン抵抗性測定を使用した検討で、非肥満者においても、骨格筋や肝臓に異所性脂肪が蓄積しているとインスリン抵抗性が発生する、食事療法は主に肝臓、運動療法は主に骨格筋の異所性脂肪を減少させインスリン抵抗性を改善させることが明らかとなっている。これらのことより、これまでの“肥満こそがインスリン抵抗性の源流である”ことを提言するような研究成果は、日本人や東アジアで多く見受けられる非肥満の病態にはほとんど合致していないことが明らかとなり¹⁾、日本人などの東洋人の糖尿病や動脈硬化症の病態を考える上で、非肥満者に認められるインスリン抵抗性の病態生理学の確立が必要であると考えられる。

この点に関して、これまで我々の研究グループでは、身体不活動 (Physical Inactivity) が非肥満者のインスリン抵抗性の原因であ

るという仮説のもと、ヒトを対象として研究を進めてきた。実際、現代では全世界の死亡数の6%が身体不活動 (Physical inactivity) に起因すると推計されており、第4番目の主要死亡リスクファクターとまでなっている。これまでの研究結果においても、非肥満の男性に3日間の高脂肪食を負荷すると、非肥満者であっても身体活動量が低い者 (1日2,000~3,000歩) は、インスリン抵抗性を惹起されることが明らかとなっており²⁾、このことから、非肥満者におけるインスリン抵抗性発生メカニズムとして、身体的不活動が極めて重要である可能性が示唆される。しかしながら、現在まで「運動がいかにしてインスリン抵抗性を改善するか」という研究は数多くなされ、そのメカニズムが詳細に検討されて来たが、「身体不活動がどのようにしてインスリン抵抗性を惹起するか」については、ほとんど検討されていない。

以上のことより、身体不活動がインスリン抵抗性を惹起するメカニズムを検索するために、動物を用いて不活動モデルを作成し、短期間の不活動がインスリン抵抗性を惹起するかどうか検討を行い、そのメカニズムの検索をおこなった。

2. 研究の目的

本研究では、短期間の不活動による筋インスリン抵抗性発症の明確な分子メカニズムをマウス、ヒトにおける実験系と、in vitro, in vivo における候補遺伝子導入による機能解析により解明することを目的として計画を立案した

3. 研究の方法

8-9週齢 C57BL6J 雄性マウスに対して、マウス廃用性筋萎縮モデルである後肢ギブス固定を24時間行い、その後腓腹筋を摘出し ex vivo にてインスリン感受性を2-[3H]deoxy-D-glucose の取り込みで評価し

た。また、後肢ギプス固定（24 時間）後に overnight fasting の状態でインスリンを静脈注射し、その 5 分後に腓腹筋を摘出し、免疫沈降後、ウェスタンブロット法にてインスリンシグナル伝達を評価した。また、骨格筋インスリン抵抗性に関連するという報告のある骨格筋細胞内脂質の蓄積量を液体クロマトグラフィー質量分析（Liquid Chromatography Mass Spectrometry :LC-MS）を使用して測定した。さらに、身体不活動とインスリン感受性低下に関連していると判明した遺伝子に関して、発現ベクターを作成し、electroporation 法を用いた in vivo における遺伝子の機能解析を行った。

またヒトに対する影響も検討するために、下肢を 24 時間固定し、固定前と 24 時間後に外側広筋より筋生検を行って、骨格筋細胞内脂質の蓄積量を液体クロマトグラフィー質量分析で検討し、定量的 RT-PCR 法で遺伝子発現量の変化を検討した。

4 . 研究成果

24 時間の下肢ギプス固定の結果、筋重量は減少しなかったが、固定した下肢筋でインスリン感受性が半減し、不活動は極めて短時間の内にインスリン抵抗性を惹起させうることが明らかとなった。

また、24 時間のギプス固定で、骨格筋のインスリン感受性は 40%以上低下した。これに伴い、インスリン誘導下のインスリン受容体リン酸化、AKT セリンリン酸化減弱と関連し、インスリンシグナル減弱の原因となる PKC の活性化とも関連していた。この固定によるインスリン感受性低下の原因を解明するために、骨格筋細胞内脂質の組成を測定したところ、24 時間のギプス固定で Triacylglycerol (TAG)の変化は認められなかったが、大変興味深いことにインスリンシグナル低下に関わるといわれる diacylglycerol

(DAG)の蓄積量が2倍以上に増加していた。次に、DAG 蓄積の原因を調べるために各脂質代謝酵素発現量について調べたところ、わずか24時間のギプス固定によってTAG分解酵素の Adipose triglyceride lipase(ATGL)の発現量が約 1.7 倍に増加し、DAG 生合成の律速酵素であるフォスファチジン酸脱リン酸化酵素 (Lipin1) の発現量は 1.7 倍に増加していた。一方、各々の活性は ATGL では固定のよって低下傾向にあったものの、Lipin1 は Phosphatidic acid Phosphatase 1 活性 (PAP1 活性)が固定によって約 1.5 倍に増加していた。これらの結果より、固定による骨格筋インスリン感受性低下は、Lipin1 の発現量の変化を経て DAG 蓄積をもたらし、インスリン感受性を調節する可能性が示唆された。

これらの結果を受け、固定によるインスリン感受性低下における Lipin1 の影響をさらに明らかにするために、in vivo でヒラメ筋に野生型 Lipin1、Lipin1 ドミナントネガティブ変異体をエレクトロポレーション法で導入し、各々の過剰発現系を用いて検証した。野生型過剰発現系では固定による PAP1 活性が約 10 倍に増加が見られたが、Lipin1 ドミナントネガティブ変異体過剰発現では PAP1 活性の上昇は認められなかった。またこれに伴って、固定による DAG の蓄積も野生型では求められたが異性体では認められなかった。さらに、インスリン感受性をインスリン誘導下の AKT リン酸化で検討したところ、野生型では固定によってインスリン感受性の低下が有意に認められたが、異性型では有意差が認められなかった。

最後に、これらの現象がヒトにおいても観察されるかを確認したところ、24 時間の下肢固定によって骨格筋細胞内の DAG は上昇傾向にあり (N=5, P=0.06)、Lipin1 の遺伝子発現量は有意に上昇していた。

これらのことより、不活動による骨格筋イ

ンスリン抵抗性惹起の原因の一つに Lipin1 の発現量・活性変化を介した細胞内 DAG 蓄積がある可能性が考えられた。

参考文献

1. Tamura Y et al. J Clin Endocrinol Metab., 2005
2. Sakurai Y, Tamura Y, Takeno K et al. J Diabetes Investig. 2011 Aug 2;2(4):310-7. doi: 10.1111/j.2040-1124.2010.00091.x.

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. Eshima H, Tamura Y, Takehi S, Kurebayashi N, Murayama T, Nakamura K, Kakigi R, Okada T, Sakurai T, Kawamori R, Watada H. Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. Physiol Rep. 2017 Apr;5(7). pii: e13250.
2. Funayama T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Takehi S, Watanabe T, Furukawa Y, Kaga H, Yamamoto R, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Effects of alcohol abstinence on glucose metabolism in Japanese men with elevated fasting glucose: A pilot study. Sci Rep. 2017 Jan 9;7:40277.
3. Takeno K, Tamura Y, Kawaguchi M, Takehi S, Watanabe T, Funayama T, Furukawa Y, Kaga H, Yamamoto R, Kim M, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Taka H,

Fujimura T, Sawada SS, Giacca A, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Relation Between Insulin Sensitivity and Metabolic Abnormalities in Japanese Men With BMI of 23-25 kg/m². J Clin Endocrinol Metab. 2016 Oct;101(10):3676-3684.

4. Ikeda SI, Tamura Y, Takehi S, Sanada H, Kawamori R, Watada H. Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 2016 May 13;473(4):947-952.
5. Takehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Increased intramyocellular lipid/impaired insulin sensitivity is associated with altered lipid metabolic genes in muscle of high responders to a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2016 Jan 1;310(1):E32-40.

(学会発表)(計6件)

1. Takehi S, Tamura Y, Ikeda S, Kawamori R, Watada H. 62nd Annual Meeting of American College of Sports Medicine. 26-30 May 2015, San Diego USA. Mechanisms of insulin resistance after 24hours physical inactivity in murine soleus muscle
2. Takehi S, Tamura Y, Kawamori R, Watada H. Cell Symposia: Exercise Metabolism. 12-14 July 2015, Amsterdam, Netherlands. Physical inactivity and high fat diet synergistically enhance the

accumulation of intramyocellular diacylglycerol and induce insulin resistance in murine soleus muscle

3. Kakehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. 2nd Congress, International Academy of Sportology. 12 Sep 2015, Tokyo, Japan. Intramyocellular lipid accumulation after high-fat diet is associated with the gene expression involved in lipid metabolism in skeletal muscle of non-obese men
4. 筧 佐織、田村 好史、池田 真一、河盛 隆造、綿田 裕孝, 第 70 回体力医学学会大会、平成 27 年 9 月 18 日-20 日、和歌山、24 時間の脚ギプス固定は、骨格筋細胞内のジアシルグリセロールを増加させ、インスリン抵抗性を惹起する
5. 筧 佐織、田村 好史、池田 真一、加賀 直子、河盛 隆造、綿田 裕孝, 分子糖尿病学シンポジウム 平成 27 年 12 月 5 日 東京 高脂肪・不活動による骨格筋インスリン抵抗性惹起メカニズム
6. Kakehi S, Tamura Y, Kawamori R, Watada H. Cell Symposia: Exercise Metabolism. 21-23 May 2017, Gothenburg, Sweden. Effects of exercise intensity on the insulin sensitivity and lipid composition in skeletal muscle under the same calorie consumption exercise.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

筧 佐織 (KAKEHI, Saori)

順天堂大学・医学研究科・特任助教

研究者番号 : 00450560

(2)研究分担者

櫻庭 景植 (SAKURABA, Keisyoku)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号 : 50175460

(3)連携研究者

田村 好史 (TAMURA, Yoshifumi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 80420834