

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：32305

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12707

研究課題名(和文) 運動トレーニングによるプリン作動性シグナルの亢進と健康増進作用との関連について

研究課題名(英文) Relationship between enhanced purinergic signalling in skeletal muscle and health promoting effects of exercise training

研究代表者

松岡 功 (Matsuoka, Isao)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：10145633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：有酸素運動は、糖尿病や高血圧などの生活習慣病を改善することが示されているが、その機序は明らかでない。この研究では、細胞内エネルギー物質であるATPが運動時に骨格筋から放出され、骨格筋細胞のG蛋白質共役型P2Y2受容体を刺激し、インスリンと同様にグルコース取り込みを促進することを実証した。ATPの作用は、インスリン誘発作用に関与する機構(PI3キナーゼ-Akt経路)とは異なり、運動中に骨格筋で活性化される経路であるAMPキナーゼ活性化によって媒介された。これらの結果は、運動中に細胞外ATPが増加し、インスリン非依存的に特異的受容体を刺激することにより耐糖能を改善することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Aerobic exercise has been shown to improve lifestyle-related diseases such as diabetes and hypertension, but its mechanism is not clear. In this study, we have demonstrated that ATP, an intracellular energy substance, was released from skeletal muscle during exercise, stimulated the G protein-coupled P2Y2 receptor in skeletal muscle cells and promoted glucose uptake as similar to insulin-induced effect. However, unlike the mechanism involved in insulin-induced effects (PI 3 kinase-Akt pathway), the action of ATP was mediated by AMP kinase activation, a pathway known to be stimulated in skeletal muscle during exercise. These results suggest that extracellular ATP increased during exercise, improves glucose tolerance via stimulation of specific receptor in a insulin-independent manner.

研究分野：プリン作動性シグナルの薬理的解析

キーワード：運動トレーニング 骨格筋 糖取り込み グルコース輸送体4 ATP P2Y2受容体 細胞外ATP
P分解酵素 AMPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

運動療法は糖尿病、高血圧などの生活習慣病の予防・治療の基本であるが、耐糖能や血管機能改善など運動による有益な効果がどのような機構によるかは十分に明らかにされていない。最近、骨格筋でインスリンに依存しない糖取り込みの促進が注目され、この背景には細胞内のエネルギーバランスを感知するAMPキナーゼ (AMPK)の活性が上昇し、骨格筋の糖取り込みに関与するグルコーストランスポーター4 (GLUT4)が細胞膜上へ移行して糖取り込みを促進する機序が示唆されている。しかし、AMPKを活性化させる機序については知られていない。一方、骨格筋は収縮弛緩運動により循環器系を始め種々の生理機能の調節に影響する生理活性物質を放出することが知られている。我々はそのような物質の一つであるATPの役割に注目した。ATPは細胞内のエネルギー通貨として重要な役割を果たしているが、最近の研究から、細胞はこの貴重なATPを細胞外に放出し、細胞外情報伝達物質として生体機能制御に利用していることが明らかになってきた。実際、細胞外ATPを認識する受容体は、イオンチャンネル型のP2X受容体およびG蛋白共役型のP2Y受容体が同定され、P2Xには7種類 (P2X₁₋₇)、P2Yには8種類 (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14})のサブタイプあり、全身のほぼすべての器官に複数の受容体発現が認められている。その役割は神経伝達の調節、血栓形成、免疫応答の活性化、平滑筋収縮などが知られていて、アレルギーや炎症性疾患のトリガーとして

の働きが解明されている。また、細胞外には多様なATP分解酵素が存在し、細胞外ATP濃度を低く保ち受容体の反応性を担保している (図1)。骨格筋では古くから収縮に伴い細胞外にATPを放出することが知られていたが、骨格筋の糖代謝に及ぼすATPの作用や、それを媒介する受容体、ATPの作用を消去する分解酵素の発現とその役割は十分理解されていない。

2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究では運動により骨格筋から放出されるATPに注目し、骨格筋におけるATPの糖代謝に及ぼす作用を検討し、受容体および細胞外ATP分解酵素から細胞内情報伝達機構まで一連のプリン作動性シグナル伝達の役割を細胞レベルおよび個体レベルで解析することを目的とした。

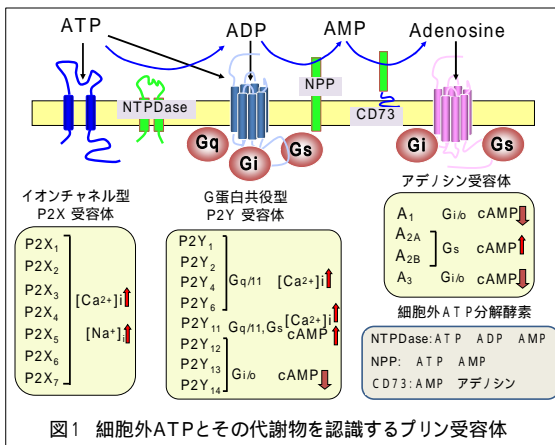
3. 研究の方法

(1) L6-ラット骨格筋芽細胞を用いた実験

骨格筋の培養細胞としてmycタグで標識したGLUT4を安定発現するL6ラット骨格筋芽細胞を用いた。L6細胞は10%牛胎児血清を含むDMEM培地で維持し、血清を1%に低下させることによりmyotubeに分化させた。細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)の変化はFura-2蛍光法でモニターし、糖取り込みは蛍光分子をグルコースに結合した2-NBDG (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-D-glucose)を用いて測定した。細胞の遺伝子発現は、細胞より全RNAを抽出し、逆転写酵素によりcDNAに変換後、定量的リアルタイムPCR法で解析した。細胞内のAkt、AMPK、低分子量G蛋白質のRabGAPであるAS160およびTBC1D1のリン酸化はウエスタンブロットで解析した。

(2) ラットおよびマウスの運動負荷モデルの実験

全ての動物実験は高崎健康福祉大学動物実験委員会の承認を得た実験計画に従って実施した。実験にはWister系雄性ラットおよびC57BL/6雄性マウスを用いて、運動負荷は小動



物用トレッドミルまたは回転かご式自発運動装置を用いて行った。動物の血糖変化は尾静脈より採血した血液を用いて、グルコースオキシダーゼ法で比色定量した。骨格筋の収縮による ATP の放出は、ヒラメ筋を摘出し、50 Hz、1 ms、3 秒間の電気刺激による収縮反応の前後で測定した。骨格筋の遺伝子発現の変化は腓腹筋より RNA を抽出して解析した。血管機能はマウスの腸管膜動脈をクレブスリンゲル液で 5 ml/min の定流量還流を行い、還流液中に薬物を投与後、還流圧の変化をモニターし評価した。

4. 研究成果

(1) L6 骨格筋細胞の糖取り込みに及ぼす ATP の作用

L6 骨格筋細胞を ATP で刺激すると、濃度依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められた。種々のヌクレオチドの反応性を検討した結果、ATP と UTP がほぼ同じ反応を惹起した(図2)。RT-PCR で L6 細胞に発現するプリン受容体を解析した結果、 $P2Y_2$ 受容体の発現が顕著であった。この受容体は ATP と UTP に応答する事から $P2Y_2$ 受容体が Ca^{2+} 応答を媒介していると考えられた。また、L6 細胞を ATP および UTP で刺激する 2-NBDG の細胞内への取り込みが促進し(図3)、同時に GLUT4 の細胞膜への移行が促進していた。さらに、L6 細胞の $P2Y_2$ 受容体を siRNA でノックダウンすると、ATP による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、グルコース取り込みの促進、GLUT4 の細胞膜への移行が抑制された(図4)。以上の結果から、L6 細胞では ATP は $P2Y_2$ 受容体を介して GLUT4 の細胞膜への移行を促進し、糖取り込みを増大させると考えられた。

次に ATP とインスリンの糖取り込み作用を比較した。インスリンは Akt のリン酸化を惹起したが、AMP キナーゼのリン酸化は起こさなかった。一方、ATP 刺激は Akt の活性化は起こさず、AMP キナーゼのリン酸化を惹起した(図5)。この結果と一致して、インスリンによる糖取り込みは、PI3 キナーゼ-Akt シグナルを阻害するウォルトマニ

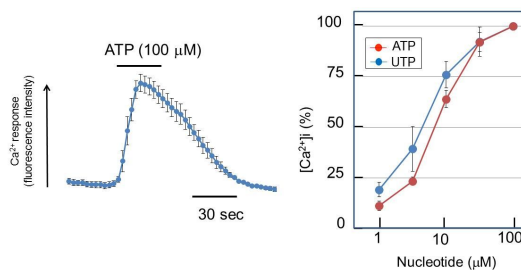


図2 L6 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす ATP の作用
左: ATP 100 μ M を作用させた時の 8 個の細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変化の平均値 \pm 標準誤差、右: 異なる濃度の ATP と UTP の Ca^{2+} 濃度に及ぼす作用

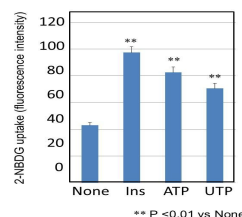


図3 L6 細胞の 2-NBDG 取込みに及ぼすインスリン、ATP および UTP の作用 インスリン (0.1 μ M)、ATP (100 μ M) および UTP (100 μ M) を作用させ、2-NBDG の取り込みを測定した。平均値 \pm 標準誤差 (n = 6)

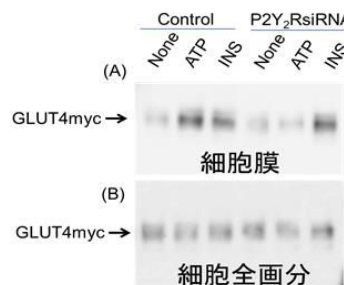


図4 ATP およびインスリンによる L6 細胞の GLUT-4 細胞膜移行に及ぼす $P2Y_2$ 受容体ノックダウンの影響 L6 細胞に $P2Y_2$ 受容体 siRNA を導入しインスリン (0.1 μ M) および ATP (100 μ M) で刺激し、全細胞画分(下)と細胞膜(上)の GLUT-4 をウエスタンブロットで同定した。

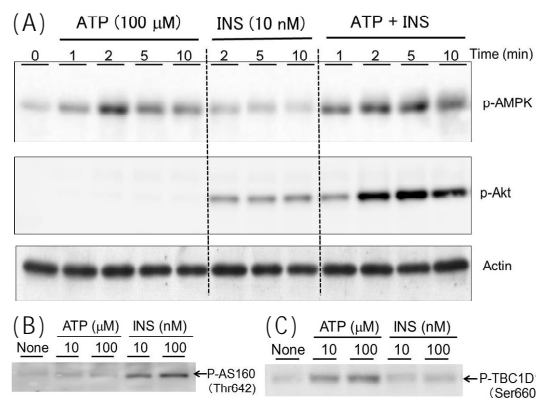


図5 L6 細胞の ATP およびインスリンによる AMPK、Akt、AS160 および TBC1D1 のリン酸 (A)(B,C) およびインスリンと ATP で 1、2、5、10 分間刺激し、AMPK(上) および Akt(中) のリン酸化を検討した。試料の対象としてアクチン(下)を用いた。(B,C) 細胞を ATP (10, 100 μ M) およびインスリン (10, 100 nM) で 5 分間刺激し、AS160 (B) と TBC1D1 (C) のリン酸化を検討した。

ンで阻害されたが、ATP による糖取り込みは阻害されなかった。逆に、AMP キナーゼ阻害薬の Compound C は ATP による糖取り込みを阻害したが、インスリンの反応には影響しなかった。以上の結果から、ATP とインスリンは異なるメカニズムで骨格筋の GLUT4 の細胞膜への移行を促進していると考えられた。GLUT4 は通常は細胞内小胞に局在しており、刺激による細胞膜への移行は低分子量 G 蛋白質の Rab が重要な役割を果たすと考えられている。Rab の機能調節は Rab の GTP 分解活性の活性化因子である AS160 や TBC1D1 により負に制御されており、Akt は AS160 を AMPK は TBC1D1 をリン酸化し、負の制御を解除すると考えられている。これと一致して L6 細胞でもインスリンは AS160 を、ATP は TBC1D1 を選択的にリン酸化することが認められた(図5)。以上の結果から、L6 細胞では ATP は P2Y₂ 受容体を介して主に AMP キナーゼシグナルを活性化し、GLUT4 の細胞膜への移行を促進すると考えられた。

(2) マウス運動負荷モデルでの実験

細胞レベルでは、ATP が P2Y₂ 受容体を介してインスリン非依存的に糖取り込みを促進させる結果が得られたが、生体内で同じような効果が得られるか検証した。まず、マウスヒラメ筋を摘出し、電気刺激による収縮を惹起すると、反応液中への ATP 放出が認められた(図6)。このヒラメ筋に発現する ATP 受容体を解析した結果、P2Y₁ 受容体と共に P2Y₂ 受容体の発現が認められた(図7)。摘出標本では 2-NBDG を用いた糖取り込み上昇は検出限界の問題で評価できなかったため、運動負荷モデルを用いて、耐糖能を検討した。実験開始当初は、ラットおよびマウスを使用しトレッドミルで運動負荷を行った。しかし、トレッドミルでの慢性運動負荷は、グルコース負荷による耐糖能の改善作用を示さず、逆に悪化させる結果が得られた。これは、マウスやラットにとって休息時間の昼間に強制運動負荷を行うことによりストレスがかかり、交感神経系の亢進による膵臓 細胞からのインスリ

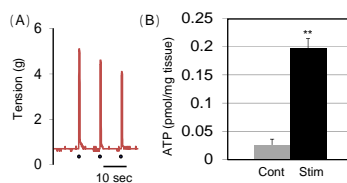


図6 マウスヒラメ筋収縮による ATP 放出 (A) 摘出ヒラメ筋を 50 Hz、1 ms、3 秒間の電気刺激() を 10 秒間隔で 3 階刺激し、刺激前後で反応液の ATP をルシフェリンルシフェラーゼ法で測定した。平均値 ± 標準誤差 (n = 4) **P < 0.01

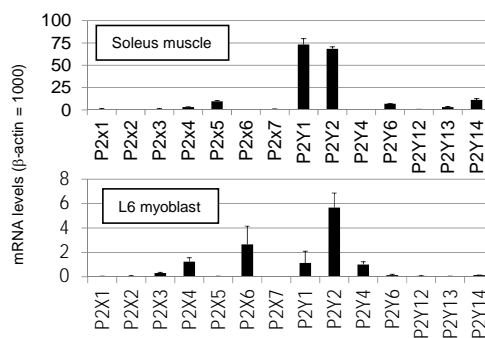


図7 マウスヒラメ筋および L6 細胞のプリン受容体遺伝子発現

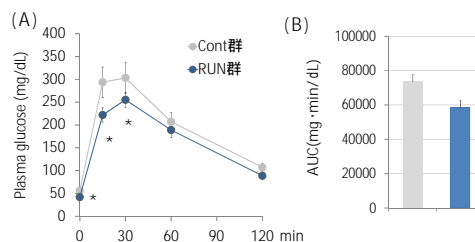


図8 マウスの耐糖能に対する運動負荷の影響 A: 回転かごを用いて 3 週間の運動負荷を実施した RUN 群マウスと運動負荷していない Cont 群マウスに対するグルコース負荷試験の結果。B: A の経時変化について、血糖値推移の曲線化面積(AUC)を算出した。平均値 ± 標準誤差 (n=6) (* : P < 0.05、cont v.s. run)

ン分泌能の低下が運動によるメリット打ち消すためではないかと考えられた。そこで、以後の実験には回転かご式自発運動装置を用いて実験を行った。この装置でマウスを飼育すると平均して一晩に 5000 ~ 8000m 走行が認めら、4 週の期間で運動量に変化はなかった。体重や随時血糖値は、運動負荷の有無により大きな影響を受けなかった。しかしながら、糖負荷試験を行ったところ、運動負荷 3 週目において、非運動群に対して耐糖能が有意に向上した(図8)。また、運動負荷をかけたマウスの骨格筋では P2Y₂ 受容体の発現増加もめられた。P2Y₂ 受容体には特異的な阻害薬がなく、最終的な結論を得るために

は骨格筋の P2Y₂ 受容体をノックアウトした動物を導入して実験することが必須であるが、今回はその検証までは行うことが出来なかった。糖尿病や高脂肪食負荷モデルを用いた実験と共に、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

Ito M, Egashira S, Yoshida K, Mineno T, Kumagai K, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Michio Ui M, Matsuoka I. Identification of novel selective P2Y₆ receptor antagonists by high-throughput screening assay. *Life Sciences* 180: 137-142, 2017

(DOI: 10.1016/j.lfs.2017.05.017)

Yoshida K, Ito M, Matsuoka I. Divergent regulatory roles of extracellular ATP in the degranulation response of mouse bone marrow-derived mast cells, *Int Immunopharmacol* 43:99-107, 2017.

(DOI: 10.1016/j.intimp.2016.12.014)

Li L, Matsuoka I, Sakamoto K, Kimura J, Differential effects of lysophosphatidylcholine and ACh on muscarinic K⁺, non-selective cation and Ca²⁺ currents in guinea-pig atrial cells. *Fukushima J Med Sci.* 62: 27-35, 2016.

(DOI: 10.5387/fms.2015-23)

Yoshida K, Ito M, Matsuoka I. P2X₇ receptor antagonist activity of the anti-allergic agent oxatomide. *Eur J Pharmacol.* 767:41-45, 2015. (DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.002)

[学会発表] (計 13 件)

伊藤政明, 小島卓也, 篠原康誉, 松岡功: 運動負荷によるマウス耐糖能と腸間膜動脈血管機能の改善, 日本薬学会第 137 年会, 3/26, 2017.

深澤翔平, 吉田一貴, 伊藤政明, 松岡功: L6 筋芽細胞の P2 受容体を介した糖取り込み促進作用. 日本薬学会第 137 年会, 3/26, 2017.

Yoshida K, Ito M, Matsuoka I: Identification and characterization of the antihistamine oxatomide as a P2X₇ receptor antagonist. 第 10 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 前橋, 11/5, 2016.

伊藤政明, 小島卓也, 松岡功: マウスの耐糖能及び腸間膜動脈血管機能に及ぼす運動トレーニングの効果, 135 回 日本薬理学会関東部会, 浜松, 10/8, 2016.

松岡功, 深澤翔平, 山田沙織, 内津潤紀, 木村麻莉子, 李周炫, 内久根夢希, 篠原康誉, 吉田一貴, 伊藤政明: 骨格筋の糖取り込みにおよぼすプリン作動性シグナルの役割, 第 15 回生命科学研究会, 東京, 6/24-25, 2016.

伊藤政明, 山田沙織, 内津潤紀, 木村麻莉子, 李周炫, 内久根夢希, 篠原康誉, 吉田一貴, 松岡功: 運動負荷によるマウス耐糖能改善における骨格筋プリン作動性シグナルの関与, 日本薬学会第 136 年会, 横浜, 3/29, 2016.

吉田一貴, 伊藤政明, 松岡功: 癌細胞増殖における P2X₇ 受容体の役割. 第 6 回薬学部研究発表会, 3/14, 2016

Fukasawa K, Yoshida K, Ito M, Matsuoka I, Involvement of P2Y₂ receptors in ATP-induced glucose uptake in L6 myoblast cells. 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 3/10, 2016.

Yoshida K, Ito M, Matsuoka I, Regulation of mast cell degranulation by purinergic signaling. 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 3/9, 2016

中島 千里, 染谷 理恵, 伊藤 政明, 松岡 功: 骨格筋の細胞外 ATP 分解酵素発現におよぼす運動負荷の影響, 第 133 回日本薬理学会関東部会, 千葉, 10/10, 2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 功 (Isao Matsuoka)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号: 10145633

(2) 研究分担者

伊藤 政明 (Masaaki Ito)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号: 30438759

(3) 研究協力者

吉田 一貴 (Kazuki Yoshida)

大学院生