

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07181

研究課題名(和文) レドックス制御機構から見た2型糖尿病の予防・改善に対する運動の効果

研究課題名(英文) Effects of exercise on prevention and improvement of type 2 diabetes from perspective of redox system

研究代表者

都築 孝允 (Tsuzuki, Takamasa)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・助教

研究者番号：20780068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、運動がインスリン抵抗性を改善するメカニズムをレドックス制御機構に着目して明らかにすることを目的とした。正常マウスの骨格筋において、キサンチンオキシダーゼ(XO)の薬理的阻害により、運動後に生じる細胞内シグナル伝達の活性化が減弱され、Nrf2遺伝子発現の増加が抑制された。一方、肥満マウスにおいては、XO阻害剤の投与は運動後のシグナル伝達の活性化を抑制せず、インスリン感受性の増加にも影響を与えなかった。これらの結果は、運動時のROS産生が細胞内シグナル伝達や遺伝子発現に与える影響はインスリン抵抗性の状態によって異なる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine the underlying mechanism by which exercise improves insulin resistance from the perspective of redox homeostasis. In lean mice, but not in obese mice, administration of a xanthine oxidase (XO) inhibitor attenuated the activation of intracellular signal transduction and gene expression-related antioxidants following a single bout of exercise. Moreover, the XO inhibitor did not affect increased insulin sensitivity after exercise in obese mice. These results suggest that the effects of reactive oxygen species generation during exercise on intracellular signaling transduction and gene expression in skeletal muscle differ according to insulin resistance status.

研究分野：運動生理学

キーワード：運動 肥満 2型糖尿病 レドックス制御機構 酸化ストレス 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

肥満や2型糖尿病といったインスリン抵抗性を主徴とする疾患は、慢性的な軽度の炎症や酸化ストレスの亢進と関連しており、近年では酸化-還元反応(レドックス)のバランスの不均衡が発症要因の一つとして認識されてきた(Watson JD, Lancet, 2014)。一方で、運動は肥満や糖尿病といった代謝疾患の予防・改善に効果的であることが明らかにされてきたが、運動時には活性酸素種(ROS)の発生が増加し、酸化ストレスを亢進させてしまうことも知られている(Vina J et al., IUBMB Life, 2000)。つまり、運動は、インスリン抵抗性の惹起に關与する酸化ストレスを増加させるにもかかわらず、インスリン抵抗性の予防・改善に効果的であるというパラドックスが存在する。

このパラドックスを解消するための糸口として、我々はレドックス制御機構における主要な転写因子である Nuclear erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) に着目し、基礎研究を実施してきた。Nrf2は酸化ストレスなどにさらされると、細胞質から核内に移行し、抗酸化タンパク質の遺伝子発現を増加させ、抗酸化能力の獲得または向上に貢献していると考えられている。つまり、ROSの増加(酸化ストレスの亢進)は、Nrf2を介した抗酸化適応を引き起こすために重要である可能性が考えられる。これまでに我々は、2型糖尿病モデル動物の骨格筋において、一過性の持久的運動の直後に酸化ストレス指標が増加するとともに、核内のNrf2発現が増加し、抗酸化に關連する遺伝子発現が増加することを見出している。しかしながら、運動がレドックス制御機構をどのように調節し、インスリン抵抗性に影響を与えているのかは明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、運動がインスリン抵抗性を予防・改善するメカニズムをレドックス制御機構に着目して明らかにするために、以下の2つのテーマについて検証した。

### (1) 運動と NOX および XO の阻害剤投与の組合せが骨格筋の細胞内応答に与える影響

近年では、生体内で発生した ROS は細胞内のイベント(シグナル情報伝達など)を引き起こすトリガーとなることが明らかにされてきており、ROS 産生の増加は Nrf2 の活性化を引き起こすことが明らかにされている。一方、抗酸化物質の投与は運動による抗酸化適応を妨げる可能性が示唆されている(Ristow et al., PNAS, 2009)ため、運動による酸化ストレスの亢進はその後の適応において重要であると考えられる。

そこで、本研究ではまず、ROS の発生源に着目し、運動時の ROS 産生に關与するこ

とが知られている NADPH オキシダーゼ(NOX)およびキサンチンオキシダーゼ(XO)の阻害剤の投与と運動の組み合わせにより、糖代謝に關わる細胞内シグナル伝達や抗酸化に關連する遺伝子発現にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

### (2) 運動と XO の阻害剤投与の組合せが運動後の骨格筋におけるインスリン抵抗性に与える影響

運動によりインスリン抵抗性を改善できることは多くの研究で明らかにされているが、運動時の ROS 発生源の阻害がインスリン抵抗性の改善にどのような影響を与えるのかは不明である。そこで、(1)と同様に ROS の発生源である XO 阻害剤の投与と運動の組合せにより、肥満ラットの骨格筋におけるインスリン抵抗性にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 運動と NOX および XO の阻害剤投与の組合せが骨格筋の細胞内応答に与える影響

4週齢の雄性 C57BL6/J マウスを用い、8週間通常飼育をした。12週齢時に以下の4群に群分けした; 1) コントロール(CON)群、2) 運動(Ex)群、3) 運動+XO 阻害剤投与(Ex+Allo)群、4) 運動+NOX 阻害剤投与(Ex+Apo)群。

運動を負荷する3群には、12週齢時に、動物用トレッドミルを用いて、15 m/min で60分間の一過性走運動を実施した。運動開始の30分前に Ex+Apo 群には NOX の阻害剤である Apocynin (20mg/kg) を、Ex+Allo 群には XO の阻害剤である Allopurinol (20mg/kg) を腹腔内投与した。CON および Ex 群には偽処置として DMSO を腹腔内投与した。運動直後に血液および腓腹筋を摘出し、血中乳酸濃度および酸化ストレスの指標として d-ROMs、BAP を測定した。また、ウェスタンブロット法および RT-PCR 法を用いて、骨格筋の糖代謝および抗酸化に關連のタンパク質発現および遺伝子発現を分析した。

### (2) 運動と XO の阻害剤投与の組合せが運動後の骨格筋におけるインスリン抵抗性に与える影響

4週齢の雄性 C57BL/6J マウスを通常食(STD)群と高脂肪食(HFD)群に分け、さらに HFD 群をコントロール(CON)群、運動(Ex)群、運動+XO 阻害(Ex+Allo)群に群分けした。Ex 群および Ex+Allo 群には、12週齢時に動物用トレッドミルを用いて 10 m/min で60分間の一過性走運動を実施した。Ex+Allo 群には運動開始の30分前に XO 阻害剤である Allopurinol (20mg/kg) を腹腔内投与し、STD 群、CON 群および Ex 群には DMSO を投与した。(1)と同様に、運動直後に血液および腓腹筋を摘出し、ウェスタンブロット法および

RT-PCR法を用いて、骨格筋の糖代謝および酸化還元関連のタンパク質発現および遺伝子発現を分析した。加えて、運動直後に門脈から生理食塩水またはインスリン(0.5 U/kg)を注入し、5分後に腓腹筋を摘出し、ウェスタンブロット法を用いて、インスリンシグナル系のタンパク質のリン酸化を分析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 正常マウスにおいて、XO および NOX の阻害剤投与は運動後の骨格筋における糖代謝および酸化還元に関わるシグナル応答および遺伝子発現を減弱させる

正常マウスを用いて、NOX および XO の阻害剤投与後に一過性運動を行わせたところ、CON 群と比較して、運動を行った3群でいずれも血中乳酸濃度が有意に増加した( $p < 0.05$ )が、3群間には有意な差は認められなかった。このことから、NOX および XO の阻害剤投与は運動強度に影響を与えず、3群とも同等の運動が負荷されたことを示している。しかしながら、一過性運動後の血中d-ROMs値は、CON 群と比較して、Ex 群で有意に上昇した( $p < 0.05$ )が、Ex+Allo 群および Ex+Apo 群においてはd-ROMs値の上昇が抑制された。つまり、NOX または XO 由来の活性酸素の発生が抑制された可能性を示している。一方、酸化力の指標であるBAPは群間に有意な差は認められなかった。

次に、一過性運動後の骨格筋におけるAMPKシグナルおよびMAPKシグナルのリン酸化率を分析したところ、AMPK およびその下流のACCのリン酸化率は、CON 群と比較して、Ex 群で有意に高値を示した( $p < 0.05$ )が、Ex+Allo 群および Ex+Apo 群では有意な増加は認められなかった(図1)。ROS産生の増加により、AMPKの活性化が亢進することが明らかにされているため、この結果はNOX および XO の阻害剤投与により、ROS産生が抑制されたため、運動によるAMPKリン酸化増加が抑制されたと考えられる。

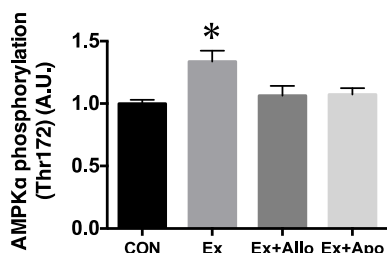


図1. AMPKのリン酸化  
\* $p < 0.05$  vs. CON, † $p < 0.05$  vs. Ex

また、MAPKシグナル伝達の分子であるERK1/2 および p38 MAPKについては統計的に有意な差は認められなかったが、AMPKシグナルと同様に、CON 群と比較して、Ex 群でリン酸化が増加傾向を示し、Ex+Allo 群および Ex+Apo 群では運動後のリン酸化は増加せず、CON 群と同等の値を示した。

酸化還元に関連する遺伝子として、一過性運

動後の骨格筋におけるNFE2L2 およびPPARGC1A mRNA発現を分析した。NFE2L2 およびPPARGC1A mRNA発現はともに、CON 群と比較して、Ex 群で有意に増加した( $p < 0.05$ )が、Ex+Allo 群および Ex+Apo 群ではその増加は抑制された(図2)。これらの遺伝子発現はAMPKの活性化の影響を受けるため、NOX および XO 阻害剤の投与によりAMPKのリン酸化が抑制されたことにより遺伝子発現の増加も抑制されたと考えられる。

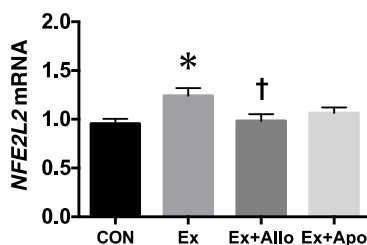


図2. NFE2L2遺伝子発現  
\* $p < 0.05$  vs. CON, † $p < 0.05$  vs. Ex

つまり、正常マウスでは運動時のNOX および XO 由来のROS産生は、その後のシグナル伝達および遺伝子発現を調節するために重要な役割を果たす可能性が示唆される。

##### (2) 肥満マウスにおいて、XO の阻害剤投与は運動後の骨格筋における糖代謝および酸化還元に関連するシグナル応答に影響を与えない

高脂肪食を摂取させた肥満マウスのCON 群では、STD 群と比較して、血漿インスリン濃度が有意に高値を示した( $p < 0.05$ )が、Ex 群および Ex+Allo 群では運動直後にインスリン濃度が有意に低下していた( $p < 0.05$ )。一方、酸化ストレス指標であるd-ROMs値は、STD 群と比較して、肥満マウスの全ての群で有意に高値を示したが、肥満マウスの3群間には有意差は認められなかった。

高脂肪食摂取による肥満マウスの腓腹筋において、AMPKのリン酸化率は、CON 群と比較してEx 群および Ex+Allo 群で増加傾向を示した。下流のACCのリン酸化は、STD 群と比較してCON 群で有意に低下したが、Ex 群および Ex+Allo 群はCON 群と比較して有意に増加した( $p < 0.05$ )。しかしながら、いずれの項目においてもEx 群と Ex+Allo 群の間には有意差は認められなかった。

これらの結果より、肥満マウスではすでに酸化ストレスが高い状態であるため、運動によるさらなる酸化ストレスの亢進は見られず、運動後の細胞内シグナル伝達経路の活性化に関して、ROS発生源の阻害剤投与の影響も見られなかった。運動とROS発生源の阻害剤の組合せについては、より詳細に検討していく必要がある。

##### (3) 肥満マウスにおいて、XO 阻害剤の投与は運動後の骨格筋におけるインスリン感受性の増加に影響を与えない

一過性運動後の骨格筋におけるインスリン感受性を評価するために、門脈からインスリンを注入し、摘出した骨格筋において、インスリンシグナル経路で主要な分子であるAktのリン酸化を分析した。

インスリン刺激によるAktのリン酸化率は、STD群と比較してCON群で有意に低下したが、Ex群およびEx+Allo群はCON群と比較して有意に増加し ( $p < 0.05$ )、STD群と同等の値を示した。しかしながら、Ex群とEx+Allo群の間に有意差は認められなかった。

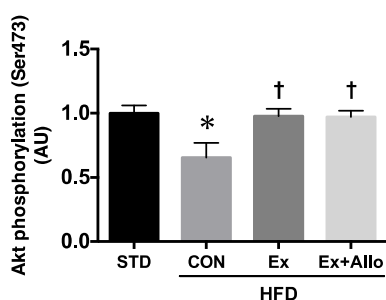


図3. インスリン刺激によるAktのリン酸化  
\* $p < 0.05$  vs. CON, † $p < 0.05$  vs. Ex

つまり、肥満マウスにおいて低下したインスリン感受性は、一過性運動後に改善するが、XO阻害剤の投与は運動によるインスリン感受性の改善の程度に影響を与えないことを示唆している。

これらの結果より、ROS発生源の阻害剤投与が運動後の細胞内シグナル伝達や遺伝子発現に与える影響は、個体のインスリン抵抗性の状態によって異なる可能性が示唆される。今後は、効果的な運動処方を提案するためには、様々な運動様式との組合せを検討していく必要がある。

#### <引用文献>

Watson JD. Type 2 diabetes as a redox disease. *Lancet*, 383(9919): 841-3, 2014.

Vina J et al. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, 50(4-5): 271-7, 2000.

Ristow M et al. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *PNAS*, 106(21): 8665-70, 2009.

#### 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 1 件)

Tsuzuki T, Goto A, Yoshihara T, Furuichi S, Tsukioka K, Naito H. NADPH oxidase and Xanthine oxidase inhibition attenuates the activation of AMPK signaling after a single bout

of endurance exercise in mouse skeletal muscle. *Juntendo Medical Journal Vol. 64 Suppl 1*: 107-113, 査読無, 2018.

[学会発表](計 2 件)

Tsuzuki T 他, NADPH oxidase and xanthine oxidase inhibition attenuates the activation of AMPK signaling after a single bout of exercise in mouse skeletal muscle. *International Academy of Sportology*, 2017.

都築孝允 他, NADPH オキシダーゼおよびキサンチンオキシダーゼの阻害は運動後における骨格筋の AMPK シグナルの活性化を減弱させる. 第 72 回日本体力医学会大会, 2017.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

都築 孝允 (TSUZUKI, Takamasa)

順天堂大学・大学院スポーツ健康科学研究科・助教

研究者番号: 20780068

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

内藤 久士 (NAITO, Hisashi)

後藤 佐多良 (GOTO, Sataro)

吉原 利典 (YOSHIHARA, Toshinori)