

令和元年5月29日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01812

研究課題名(和文)骨格筋分泌糖代謝改善物質の研究

研究課題名(英文)The finding of glucose metabolism improver derived from skeletal muscle

研究代表者

齋藤 従道 (SAITO, TSUGUMICHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80572619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋培養細胞は常に一定量の細胞外小胞(EVs)を分泌していることが判明した。伸展刺激により分泌されるEVsは骨格筋のみならず、脂肪細胞の糖取り込みを増加させた。さらにインスリンシグナルとは独立して、インスリン刺激による糖取り込み促進作用を有していた。また、脂肪細胞での糖輸送担体(Glut4)の発現を増加させており、これら作用は運動による耐糖能改善機構と類似していることが判明した。以上より本実験成果がこれまで十分に解明されていない運動による糖代謝改善機構の新たな機序解明に繋がること示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は食事療法、運動療法が治療の中心である。しかし、高齢、糖尿病合併症、運動器の機能不全などの理由により運動療法を享受できない患者数は相当数にのぼる。我々の発見が運動療法を模倣するのであれば、これら多くの患者に自己の細胞から細胞外小胞を人為的に増幅させ、新規の糖尿病として用いることが出来るのではないかと考えている。そのため本研究成果が糖代謝機構の解明にとどまらず、新規糖尿病治療法に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We found that the extracellular vesicles (EVs) from skeletal muscle are continuously secreted in medium. Interestingly, we confirmed that only these EVs secreted during mechanical stretched condition promote insulin-stimulated glucose uptake in not only muscle cells, but also in adipocytes, without any effects on insulin signaling. Furthermore, these EVs increased the expression of glucose transporter 4 (Glut4) in adipocytes. Because EVs increased glucose uptake in similar manner with exercise, we speculated that these findings may explain the mechanism of the exercise effect on glucose homeostasis in vivo. Based on these findings, we are going to next step to find the real improver for diabetes mellitus.

研究分野：糖尿病

キーワード：細胞外小胞 骨格筋 脂肪細胞 伸展刺激 糖取り込み

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生体の糖代謝機構は、脳、膵臓、肝臓、脂肪、筋肉などの諸臓器が独立して糖代謝を担っているのではなく、神経系、内分泌系機構を利用して他臓器の糖代謝を制御し、恒常性を維持していることが注目されている。その中で骨格筋は食後血糖の80%を消費する最大臓器であり、骨格筋の機能低下は高齢者、糖尿病・肥満症患者にとって非常に重要な問題である。そのため骨格筋の糖代謝機能を改善させることはメタボリックシンドローム患者の増加、超高齢化社会を迎える日本では国民健康に大きく寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

報告者は骨格筋培養細胞における機械的伸展刺激による糖取り込み作用を研究している。そして APPL1 (adaptor protein, phosphotyrosine interaction, pleckstrin homology domain, and leucine zipper containing 1)—PKC(protein kinase C) zeta 依存性の経路、NMIIa (nonmuscle myosin IIa)の新機能を発見した。その研究過程において、機械的刺激による糖取り込み機構には、オートクリン、パラクリン作用が存在するのではないかと想定した。そこで細胞間情報伝達物質としての細胞外小胞(EVs: extracellular vesicles)に注目した。EVsはmiRNAやタンパクなどを含有しており、それらが標的細胞に結合したり取り込まれることにより、遺伝子発現の制御や細胞内シグナル伝達を行っていることが想定されている。

予備実験にて基底状態と伸展刺激中に分泌されたEVsを骨格筋細胞(C2C12 myotubes)、脂肪細胞(3T3L1 adipocytes)に添加したところ、伸展刺激により分泌されたEVsのみ両細胞の糖取り込みを促進することを見いだした。そこで、糖代謝改善作用を有する細胞外小胞を同定し、機能解析を行うこととした。

3. 研究の方法

1. 分泌小胞の糖代謝改善作用の解析

- 1) 分泌小胞の定量を行い、伸展刺激の有無による細胞外小胞の量を解析する。
- 2) 分泌小胞を添加した脂肪細胞でのシグナル伝達機構をウェスタンブロットにより観察する。
- 3) 分泌小胞のインスリン刺激による糖取り込み作用を観察する。また、インスリン刺激伝達系への影響をシグナル伝達物質の阻害剤を用いて観察する。

2. EVs含有タンパクの網羅的解析

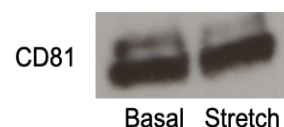
機械的伸展刺激有無の培養細胞上清から単離したEVsを質量分析装置(ショットガン法)を用いて、伸展刺激により分泌されるEVs内タンパクの発現量変化を基底状態と比較検討する。また、マイクロアレイにて小胞内small RNAの発現を解析する。

4. 研究成果

- 1, 骨格筋培養細胞は常に一定量のEVsを分泌している。

骨格筋培養細胞での伸展刺激(5時間)の有無の状態における培養液上清中のEVsを精製した。EVsの表面マーカーであるCD81をウェスタンブロットにて確認したところ、基底状態(Basal)でも伸展刺激(Stretch)中に分泌されるEVsの量に大差がなかった。つまり、培養骨格筋

図1 骨格筋培養細胞は伸展刺激の有無に関係なく細胞外小胞を分泌する。

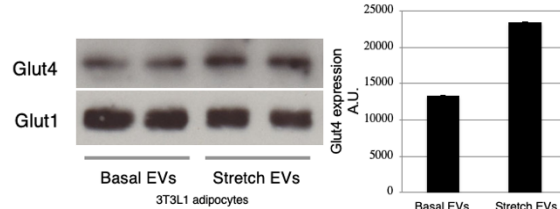


細胞は常に一定量の EVs を分泌していることが明らかとなった。(図 1)

2, 骨格筋培養細胞の伸展刺激中に分泌される EVs(Stretch EVs)は脂肪細胞での Glut4 の発現を増加させる。

Stretch EVs が脂肪細胞での糖取り込みを促進することから、糖取り込みに関与する細胞内シグナル伝達分子をウェスタンブロッティングにて検討してみたところ、特に変化を認めなかった。次に糖取り込みに重要な糖輸送担体(グルコーストランスポーター: Glut) の発現をウェスタンブロットにて確認したところ、Glut1 の発現に変化を認めなかったが、Glut4 の発現を Stretch EVs が増加することが明らかとなった。(図 2)

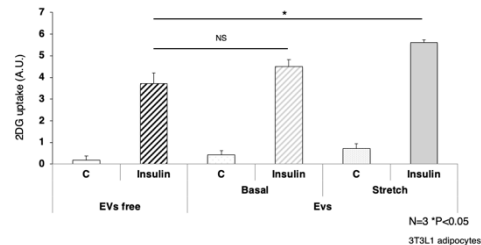
図2 伸展刺激により分泌される細胞外小胞は脂肪細胞でのGlut4発現を誘導する。



3, Stretch EVs はインスリン刺激による糖取り込みをも促進する。

Stretch EVs が骨格筋細胞のみならず、脂肪細胞においても糖取り込みを促進するため、EVs のインスリン刺激による糖取り込みへの影響を検討した。すると脂肪細胞において、EVs St はインスリン刺激による糖取り込みを有意に促進することが分かった。(図 3)

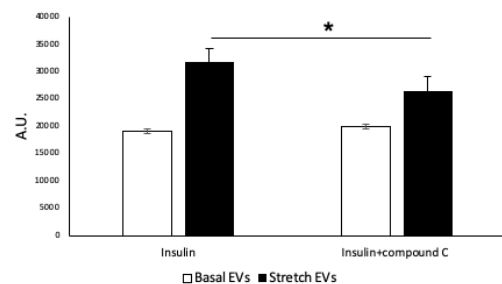
図3 伸展刺激により分泌される細胞外小胞は脂肪細胞のインスリン刺激による糖取り込みを促進する。



4, Stretch EVs のインスリン刺激による糖取り込みは一部 AMPK(AMP 活性化プロテインキナーゼ)を介している。

Stretch EVs はインスリン刺激による糖取り込みを促進するため、インスリンシグナル伝達への影響を検討した。インスリンシグナルの PI3K や PKCzeta の阻害剤を用いて検討してみたところ、Stretch EVs の糖取り込み作用を有意に阻害しなかった。しかし、AMPK の阻害剤である CompoundC を用いると、Basal EVs はインスリン刺激による糖取り込みに変化を認めなかったが、Stretch EVs は有意に低下させた (図 4)。つまり、Stretch EVs による糖取り込み機構はインスリンシグナルとは独立しており、インスリンシグナルに相加的に糖取り込みを促進している可能性が示唆された。

図4 Glucose Uptake



5, 伸展刺激の有無の EVs を精製し、マイクロアレイによる miRNA、ショットガンによるタンパクのスクリーニングを行った。刺激の有無により発現、内包する miRNA、タンパク質の発現が異なることが判明した。今後それら分子の解析を行う予定である。

以上の結果から細胞外小胞中には糖取り込みを促進する分子を含有することが示唆された (図 5)。これら

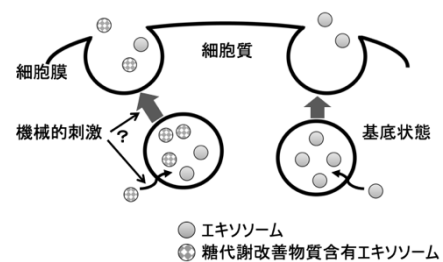


図5:エキソソーム分泌機構

糖取り込みを促進する分子を同定し、EVs が新規糖尿病治療薬になり得るかの検討が進行している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- 1) Saito T, et al. “APPL1 promotes glucose uptake in response to mechanical stretch via the PKC ζ -non-muscle myosin IIa pathway in C2C12 myotubes.” Cell Signal., 査読有, 28(11), 1694-1702 (2016)

〔学会発表〕（計 6 件）

- 1) 齋藤従道他、骨格筋培養細胞を用いた伸展刺激による糖代謝機構の解明、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 京都 2016 年 5 月
- 2) T Saito et al. APPL1 affects on glucose uptake induced by mechanical stretch in C2C12 myotubes、第 17 回国際内分泌学会 北京 2016 年 9 月
- 3) 齋藤従道他、骨格筋培養細胞における伸展刺激による糖代謝機構の解明、第 3 回北関東糖尿病研究会 前橋、 2017 年 2 月
- 4) 齋藤従道他、骨格筋機能維持における APPL1 の関与、第 38 回日本肥満学会 大阪、2017 年 10 月
- 5) 齋藤従道他、骨格筋由来細胞外小胞は骨格筋、脂肪細胞での糖取り込み機構を制御する。第 61 回日本糖尿病学会学術集会 東京、2018 年 5 月
- 6) T Saito et al. Mechanical stretch-induced extracellular vesicles improved insulin-stimulated glucose uptake in myotubes and adipocytes、第 54 回欧州糖尿病学会 ベルリン、2018 年 10 月

〔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)研究分担者: なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 齋藤 悠

ローマ字氏名: SAITO HARUKA

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。