

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11029

研究課題名(和文) 骨格筋の質と量に関わる鍵分子としてのLipin1の基礎的検討

研究課題名(英文) Twenty-four hours physical inactivity induce insulin resistance in the muscle.

研究代表者

寛 佐織 (Takehi, 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) 3,400,000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、soleus, plantarisの評価を行った。24時間の固定はインスリン感受性を低下させたが、この現象に対するメカニズムは筋線維タイプによって差異がみられた。遅筋優位のsoleusではLipin1の発現量、活性変化による細胞内DAG蓄積、一方、速筋優位のplantarisではPTP1Bによるインスリンシグナル減弱の可能性が示唆された。以上より、身体不活動によってインスリン感受性低下メカニズムには筋線維タイプによる差がみられることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における糖尿病患者の平均BMIは23 kg/m²と正常レベルであることを考えると、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。その点において不活動のインスリン抵抗性惹起メカニズムが明らかになることは、これからの健康寿命増進や医療経済への貢献は計り知れないものであると思われる。

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 the mechanism by which inactivity induces skeletal muscle insulin resistance, we immobilized the unilateral lower limb of mice for 24 hours and assessed soleus and plantaris as a model of inactivity. However, the mechanism of this phenomenon was different among muscle fiber types. The mechanism of this phenomenon was different depending on the muscle fiber type. In soleus, which is predominantly slow-twitch muscle, there was intracellular DAG accumulation due to changes in Lipin1 expression and activity, while in plantaris, which is predominantly fast-twitch muscle, it was suggested that PTP1B may reduce insulin signaling.

These results indicate that the mechanism by which physical inactivity reduces insulin sensitivity differs among muscle fiber types.

研究分野：健康科学

キーワード：骨格筋 インスリン感受性 不活動 骨格筋細胞内脂質

1. 研究開始当初の背景

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、日本人の糖尿病患者の平均 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ている。さらに、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²⁾。実際、身体不活動は骨格筋に対して、筋力や活動力の低下に直接関わる「量」を減少させるだけでなく、メタボリックシンドロームや 2 型糖尿病の最も重要な病態の一つであるインスリン抵抗性を惹起することにより、骨格筋の「質」を低下させることも明らかとなっている。そのため、身体不活動による疾患の発症を予防するうえで、骨格筋の「量」と「質」両面へのアプローチが必須となる。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きたが、「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

これまで申請者らは、不活動により活性化するフォスファチジン酸脱リン酸化酵素 (Lipin1) が、不活動による骨格筋の「量」と「質」の低下における重要な鍵分子である可能性を明らかにしてきた。本研究では、これまでの知見をもとに不活動が骨格筋の量と質を低下させる過程における Lipin1 の詳細な役割を、*in vitro*, *in vivo* における機能解析により明らかにすることである。また、不活動が骨格筋質の低下に与える影響が骨格筋線維タイプによって異なるのかについても明らかにし、不活動が全身の骨格筋に対して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する。

3. 研究の方法

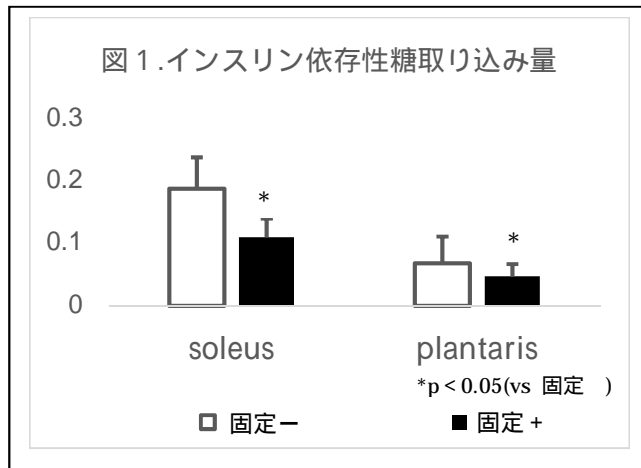
8-9 週齢 C57BL6J 雄性マウスに対して、マウス廃用性筋萎縮モデルである後肢ギプス固定を 24 時間行い、その後に遅筋優位の soleus, 速筋有意の plantaris を摘出し *ex vivo* にてインスリン感受性を 2-[³H]deoxy-D-glucose の取り込みで評価した。また、後肢ギプス固定 (24 時間) 後に overnight fasting の状態でインスリンを静脈注射し、その 5 分後に筋を摘出し、免疫沈

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。

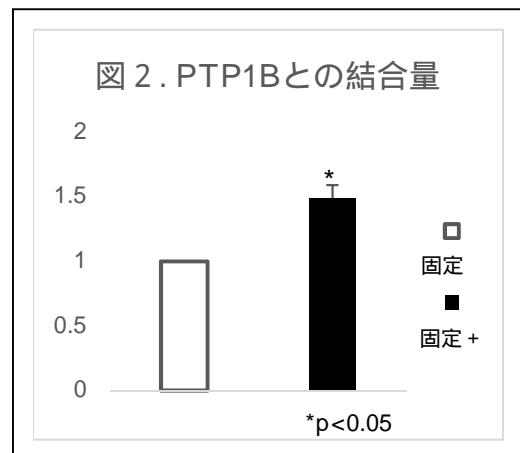
4 . 研究成果

24 時間の下肢ギブス固定の結果、soleus, plantaris ともに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有意に減少し (図 1)、不活動は極めて短時間の内にインスリン

抵抗性を惹起させることが明らかとなった。またこれに伴って、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ており、24 時間の不活動はインスリンシグナル伝達を減弱させることが明らかとなった。そこで、インスリンシグナル減弱の原因となる骨格筋細胞内脂質の蓄積について調査したところ、細胞内 triacylglycerol、セラミドについては



soleus, plantaris ともに蓄積量は変化しなかったが、インスリン受容体のレベルで PKC の活性化を介してインスリンシグナルを阻害することが知られている diacylglycerol は soleus のみで蓄積量の増加が認められ、それに伴い PKC の細胞膜移行量も増加していた。さらに、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 時間のギブス固定によって 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 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。また、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。これらの結果より、soleus における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。一方、細胞内脂質量に変化のなかった plantaris においては、インスリン受容体の細胞内へのインターナライゼーションを要せずインスリン受容体と結合し、インスリン情報伝達を負に調節する Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) について、固定での発現量に変化はみられなかったものの、インスリン受容体との結合量が有意に



増加しており（図2）、PTP1Bがplantarisにおける固定による骨格筋インスリン感受性低下を調節する可能性が示唆された。

これらの結果より、不活動による骨格筋インスリン抵抗性惹起の原因には骨格筋筋線維タイプにおけ差異が認められ、遅筋が多いsoleusではLipin1の発現量・活性変化を介した細胞内DAG蓄積、plantarisではPTP1Bによるインスリンシグナル減弱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 Jun;90(6):3191-6. doi: 10.1210/jc.2004-1959.
- 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

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Sugimoto D, Tamura Y, Takeno K, Kaga H, Someya Y, Kakehi S, Funayama T, Furukawa Y, Suzuki R, Kadowaki S, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 104
2. 論文標題 Clinical Features of Nonobese, Apparently Healthy, Japanese Men With Reduced Adipose Tissue Insulin Sensitivity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab.	6. 最初と最後の頁 2325-2333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2018-02190.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki R, Tamura Y, Takeno K, Kakehi S, Funayama T, Furukawa Y, Kaga H, Sugimoto D, Kadowaki S, Someya Y, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Three days of a eucaloric, low-carbohydrate/high-fat diet increases insulin clearance in healthy non-obese Japanese men.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40498-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kadowaki S, Tamura Y, Someya Y, Takeno K, Kaga H, Sugimoto D, Kakehi S, Funayama T, Furukawa Y, Suzuki R, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Fatty Liver Has Stronger Association With Insulin Resistance Than Visceral Fat Accumulation in Nonobese Japanese Men.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Endocr Soc.	6. 最初と最後の頁 1409-1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/js.2019-00052. eCollection 2019 Jul 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaga H, Tamura Y, Takeno K, Kakehi S, Someya Y, Funayama T, Furukawa Y, Suzuki R, Sugimoto D, Kadowaki S, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Giacca A, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Higher C-Peptide Level During Glucose Clamp Is Associated With Muscle Insulin Resistance in Nonobese Japanese Men.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Endocr Soc	6. 最初と最後の頁 1847-1857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/js.2019-00167. eCollection 2019 Oct 1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kaga H, Tamura Y, Takeno K, Kakehi S, Someya Y, Funayama T, Furukawa Y, Suzuki R, Sugimoto D, Kadowaki S, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Giacca A, Sato H, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Shape of the glucose response curve during an oral glucose tolerance test is associated with insulin clearance and muscle insulin sensitivity in healthy non-obese men.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 874-877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13227.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato M, Tamura Y, Someya Y, Takeno K, Kaga H, Kadowaki S, Sugimoto D, Kakehi S, Funayama T, Furukawa Y, Suzuki R, Nakagata T, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Sato H, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Characteristics associated with elevated 1-h plasma glucose levels during a 75-g oral glucose tolerance test in non-obese Japanese men.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 1520-1523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki N, Tamura Y, Takeno K, Kakehi S, Someya Y, Funayama T, Furukawa Y, Kaga H, Suzuki R, Sugimoto D, Kadowaki S, Sato M, Nakagata T, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Sato H, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Both higher fitness level and higher current physical activity level may be required for intramyocellular lipid accumulation in non-athlete men.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61080-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, Nakamura K, Kurebayashi N, Murayama T, Kakigi R, Sakurai T, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 126
2. 論文標題 Dysfunction of muscle contraction with impaired intracellular Ca ²⁺ handling in skeletal muscle and the effect of exercise training in male db/db mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Appl Physiol (1985)	6. 最初と最後の頁 170-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00048.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sugimoto D, Tamura Y, Takeno K, Kaga H, Someya Y, Kakehi S, Funayama T, Furukawa Y, Suzuki R, Kadowaki S, Nishitani-Yokoyama M, Shimada K, Daida H, Aoki S, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 104
2. 論文標題 Clinical Features of Nonobese, Apparently Healthy, Japanese Men With Reduced Adipose Tissue Insulin Sensitivity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 2325-2333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2018-02190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki R, Tamura Y, Takeno K, Kakehi S, Funayama T, Furukawa Y, Kaga H, Sugimoto D, Kadowaki S, Someya Y, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Three days of a eucaloric, low-carbohydrate/high-fat diet increases insulin clearance in healthy non-obese Japanese men.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40498-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kakehi S, Tamura Y, Kubota A, Takeno K, Kawaguchi M, Sakuraba K, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of blood flow restriction on muscle size and gene expression in muscle during immobilization: A pilot study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physiol Rep.	6. 最初と最後の頁 e14516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14516.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kakehi S, Tamura Y, Takeno K, Ikeda SI, Ogura Y, Saga N, Miyatsuka T, Naito H, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Endurance Runners with Intramyocellular Lipid Accumulation and High Insulin Sensitivity Have Enhanced Expression of Genes Related to Lipid Metabolism in Muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 3951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm9123951.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, Kakigi R, Hashimoto R, Funai K, Kawamori R, Watada H.	4. 巻 1
2. 論文標題 A chronic high-fat diet exacerbates contractile dysfunction with impaired intracellular Ca ²⁺ release capacity in the skeletal muscle of aged mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Appl Physiol (1985)	6. 最初と最後の頁 1153-1162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00530.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------