

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11352

研究課題名(和文) 糖尿病運動療法の最適化を目指したAMPK/OGTクロストークの解明

研究課題名(英文) Elucidation of appropriate exercise protocol through AMPK/OGT crosstalk in T2B

研究代表者

中川 孝俊 (Nakagawa, Takatoshi)

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70359842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、AMPK/OGTクロストークを詳細に検討し糖尿病治療における運動療法を最大限発揮できるような薬物療法を提案することを目的とした。本研究課題の成果は、1. マウス筋芽細胞C2C12を使用したAMPK活性を測定する実験系として、グルコーストランスポーター4 (GLUT4) の細胞膜移行を指標とする系の確立、及び、マウス個体を用いたトレッドミル運動負荷がAMPK/OGTクロストークに与える影響を解析し、2. 適度な運動負荷がオートファジーを活性化し、そのO-GlcNAc化増加因子、Thiamet G (O-GlcNAcase阻害薬) による阻害を見出した事である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動療法は、中心的なT2B治療である。今回、細胞の栄養センサーと呼ばれるAMPKと高血糖から引き起こされるタンパク質O-GlcNAcとの関連、AMPK/O-GlcNAcクロストークの一端をin vivo運動負荷モデルにおいて観察できたことは、学術的に有意義なことである。さらなる研究が必要ではあるが、AMPK/O-GlcNAcクロストークを人工的に制御することが出来れば、現在、1000万人弱の糖尿病患者(予備群を含めるとその倍以上いると考えられる)にとって朗報となるのみならず、社会保険的意義も非常に高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Exercise is one of the most important therapies for diabetes, especially type 2 diabetes, T2B. Appropriate exercise decreases blood sugar through activation of AMP-activated kinase (AMPK) in an insulin independent manner. On the other hand, increased protein O-N-acetylglucosamine (O-GlcNAcylation) caused by high blood sugar aggravates pathogenesis of T2B. The aim of the study was to gain insight into the role of AMPK/OGT crosstalk in exercise therapy of T2B and find a way to maximize it. Achievements of the research are: 1. Establishment of in vitro assay of membrane translocation of Glut 4 using mouse myoblast cell line, C2C12 cells, by evaluating the effect of exercise with treadmill using mice on AMPK/OGT crosstalk and autophagy, then 2. Identification of autophagy in this system, 3. Induction of autophagy by appropriate exercise with treadmill using mice, which was cancelled with Thiamet G, OGA inhibitor.

研究分野：薬理学、生化学

キーワード：Exercise オートファジー

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病治療における運動による血糖値の低下及びインスリン感受性の上昇は QOL の改善や合併症予防に繋がる。糖が体内に取り込まれる場合、インスリン依存的 GLUT4 の細胞膜への移行が重要であるが、2型糖尿病の場合、インスリン耐性により GLUT4 の移行が不十分となり、結果、高血糖状態が持続する。しかし、運動を行うと2型糖尿病患者も健常人と同様に GLUT4 の細胞膜移行が起こり、糖尿病予防、及び治療効果を発揮する。この作用に AMPK が関わっている (Diabetes, 2001, 50(5), 921-927)。AMPK は、細胞の栄養センサーとして、栄養状態の悪化に伴い、同化作用抑制と異化作用亢進をもたらす分子として見出された。AMPK 活性化薬、AICAR はラット骨格筋に作用させると、GLUT4 の細胞膜移行を促進し運動したのと同じ効果を有することが示唆された。(Diabetes, 1998, 47, 1369-1373)。また、2型糖尿病モデルマウス(レプチンシグナル欠損マウス、ob/ob、db/db)においても AICAR は短期、長期的に血糖値を抑制した (BBRC, 2002, 294, 798-805)。

O-GlcNAc 化タンパク質は高血糖状態で増加し、糖尿病の病態と関連している。O-GlcNAc 化タンパク質は、O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) によって付加されるが、糖尿病では OGT と基質が共に増加する。糖尿病の運動療法では血糖値が低下するが、それに伴う、OGT や O-GlcNAc 化タンパク質の変化については報告がなかった。AMPK 活性は高血糖下では、不活化される (J. Biol. Chem., 2016, 291(11), 5664-75) が O-GlcNAc 化との関連については不明であった。

OGT が AMPK を複数箇所、O-GlcNAc 化することは以前から知られていた。修飾部位依存的に、AMPK の活性が阻害される (J. Biol. Chem., 2014, 289 (15), 10592-606)。我々も AMPK が O-GlcNAc 化され、その活性が阻害されることを報告している (Cancer science, 2017, 108, 2373-82)。近年、AMPK も OGT (OGTT444) をリン酸化して、その細胞質から核への移行をもたらす、細胞質及び、O-GlcNAc 化タンパク質のパターンに劇的な影響を与えることが示され、“AMPK と OGT のクロストーク”の存在が明らかとなった (J. Biol. Chem., 2014, 289 (15), 10592-606)。但し、他のグループからは、AMPK によるリン酸化 OGTT444 (OGTpT444) は活性には全く影響を与えないとの報告もあり (Nucl. Acid. res., 2014, 42(9), 5594-604)。機能については不明な点が多い。

AMPK が、運動によって活性化されることは知られていたが、AMPK/OGT クロストークが運動、延いては、糖尿病の運動療法効率化、あるいは、その代替療法としての可能性を探求した研究はこれまでにあまり知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究は「AMPK OGT のクロストークを理解し、運動療法を最大限発揮できるような薬物療法を提案する」ことを目的としている。具体的には、運動の効果を最大化するために運動時の AMPK 活性を最適化することである。AMPK/OGT クロストークの存在は、OGT を介して、あるいは、AMPK OGT そして、OGT AMPK という活性制御ループも運動に関わっていることを示唆している。AMPK は、これまで、オートファジー リソソーム活性といった経路により様々な病態を正負にコントロールしていることが示されているが、OGT もこのループに関与したことになる。今回、運動における、AMPK 活性の最適化、ひいては、AMPK 活性のみで運動効果を得るといった目的が達成できれば、年齢、合併症等の要因により運動量が制限されている患者に対しても十分な治療効果が期待できる。本研究の独自性は、AMPK 活性の制御因

子として OGT に注目したことである。OGT は糖尿病の病態との関連は注目されていたが、運動時の役割については殆ど目を向けられていなかった。OGT は、AMPK、mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) と同じく栄養センサーであり、運動時にその活性が変化する可能性がある。

3. 研究の方法

(In vitro)

Glut4 膜移行アッセイ

対象細胞：マウス筋芽細胞

作成法：Glut4 遺伝子の遺伝子導入

確認法：共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, SP8) あるいは、蛍光顕微鏡観察 (BZ-X800)、細胞膜特異的ビオチン化法

タンパク質発現：Western blot 法

顕微鏡観察

遺伝子発現細胞を 1×10^5 /well で 24 ウェルプレート (円形カバーグラス入) に播種。翌日、前処理薬を含んだ培地に変更、24 時間培養。その後、インスリン、AICAR で刺激。固定、細胞膜の WGA による染色の後、観察。

細胞膜ビオチン化の場合は、 $4-5 \times 10^5$ /well で 6 ウェルに播種。翌日、前処理薬を含んだ培地に変更、24 時間培養。その後、インスリン、AICAR で刺激。ビオチン化タンパク質を回収後、アビジンビーズにて、膜タンパク質を濃縮、その後、Glut4 あるいは蛍光タンパク質抗体にて Glut4 を同定。非アビジン濃縮あるいは、Pass-through タンパク質と比較検討。

(In vivo)

トレッドミルによる運動負荷

負荷前に複数回、乳酸値測定 (数値が安定するまで)。

トレッドミル内で環境になれるまで放置。その後、10 m/分程度の低速から始め、様子を見つつ、5 m/分ずつスピードを上げる。マウスの系統にもよるが、ICR であれば、20-25 m/分、C57BL/6 であれば 15-20 m/分が、適切なスピードと考えられた。疲労の基準は、30 秒以上スタート地点から離れないことを複数回繰り返した時点とした。

乳酸値を数回測定の後、安楽死、大腿の筋を採取、タンパク質サンプル作製。

Western blot 法により解析。

4. 研究成果

運動療法は、食事療法、薬物療法と並んで糖尿病治療の中心的存在である。運動により活性化した AMP-activated kinase (AMPK) がインスリン抵抗性を改善することが治療効果の中心分子である。糖尿病ではタンパク質の O-*N*-acetylglucosamine (O-GlcNAc) 化が増加し、病因となっている。近年、AMPK と O-GlcNAc 修飾を触媒する O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) は相互に基質となり、お互いの機能を正負に制御するクロストークが明らかとなった。AMPK が最大限効果を発揮出来れば治療効果を上げることが出来る。本研究では、AMPK/OGT クロストークを詳細に検討し糖尿病治療における運動療法を最大限発揮できるような薬物療法を提案することを目的としていた。

2020 年度は、マウス筋芽細胞 C2C12 を使用した in vitro の実験を中心に AMPK の O-GlcNAc 部位の同定、AMPK 活性を測定する実験系として、グルコーストランスポーター4 (GLUT4)

の細胞膜移行を指標とする系の確立等を行った。

2021年度は、2020年度に得られた知見をさらに、進めると同時に、マウス個体を用いた、トレッドミルによる運動負荷がAMPK/OGTクロストークに与える影響を解析するための基礎研究を行った。トレッドミルによる運動負荷を客観的に評価するため、疲労の指標を測定する系の開発を行った。ごく微量の血液による測定が可能な乳酸値の測定を用いた所、運動負荷(スピード+傾斜角)とほぼ比例した値が得られた。マウスを運動前にトレッドミルに数日間、順応させることにより、再現性良く運動負荷を行えるようになった。2022年度は、マウス個体を用いた実験を更に進め、Western blot法等によりサンプルの解析を行った。C57BL/6()マウスにトレッドミルにより、運動負荷をかけた結果、タンパク質O-GlcNAc化自体は、若干の増加は見られたが、大きな変化は観察されなかった。AMPKのリン酸化に関しても、同様の結果であった。一方、LC3I(分子量大)とLC3II(分子量少、活性化時増加)を見ると、運動により、LC3II/LC3I比の増加が観察され、この増加は、ThiametG(TMG、O-GlcNAc化促進試薬)により抑制された。このことは、明らかに、O-GlcNAc化が運動効果に影響を与える可能性を強く示唆した。残念ながら、AMPK/OGTクロストークを今回の計画において完全に明らかにすることはできなかったが、運動がオートファジーに影響を与える事、AMPKはオートファジーを活性化する事、そして、O-GlcNAc化は運動時のオートファジーを負に制御する可能性があること、を考え合わせると、AMPK/OGTクロストークの实在は強く示唆されており、今回の、得られた研究成果を基に、さらに研究を続けていく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazi Taheruzzaman, Nagata Abir, Nakagawa Takatoshi, Matsuzaki Takashi, Inui Shigeki	4. 巻 11
2. 論文標題 Dermal Papilla Cell-Derived Extracellular Vesicles Increase Hair Inductive Gene Expression in Adipose Stem Cells via β -Catenin Activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 202 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells11020202	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 Naka Yutaka, Okada Toshihiko, Nakagawa Takatoshi, Kobayashi Eiko, Kawasaki Yuka, Tanaka Yasuyoshi, Tawa Hideki, Hirata Yuki, Kawakami Ken, Kakimoto Kazuki, Inoue Takuya, Takeuchi Toshihisa, Fukunishi Shinya, Hirose Yoshinobu, Uchiyama Kazuhisa, Asahi Michio, Higuchi Kazuhide	4. 巻 20
2. 論文標題 Enhancement of O-linked N-acetylglucosamine modification promotes metastasis in patients with colorectal cancer and concurrent type 2 diabetes mellitus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1171 ~ 1178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.11665	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 Yokoe Shunichi, Hayashi Tetsuya, Nakagawa Takatoshi, Kato Ryuji, Ijiri Yoshio, Yamaguchi Takehiro, Izumi Yasukatsu, Yoshiyama Minoru, Asahi Michio	4. 巻 46
2. 論文標題 Augmented O-GlcNAcylation exacerbates right ventricular dysfunction and remodeling via enhancement of hypertrophy, mitophagy, and fibrosis in mice exposed to long-term intermittent hypoxia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 667 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-01088-8	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長濱渚、中川孝俊、朝日通雄
2. 発表標題 AMPK活性化プロテインキナーゼ/O-GlcNAc転移酵素クロストークの役割解明
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白川誠、中川孝俊、朝日通雄
2. 発表標題 オートファジーによるNSAIDs誘因小腸傷害治療戦略
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------