

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500867

研究課題名(和文) 不活動による筋インスリン抵抗性惹起の分子メカニズムの解明と予防法の開発

研究課題名(英文) Mechanisms of insulin resistance after 24 hours physical inactivity in murine soleus muscle.

研究代表者

笥 佐織 (KAKEHI, 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：不活動が骨格筋におけるインスリン抵抗性を惹起するメカニズムを明らかとすることを目的として、片側下肢を24時間固定するマウス不活動モデルを使用して、ヒラメ筋のインスリン感受性、骨格筋細胞内脂質組成、脂質代謝酵素量・活性を評価した。その結果、下肢固定は骨格筋インスリン抵抗性を惹起し、細胞内DAG蓄積と、DAG蓄積に関わる酵素の発現量・活性増加をもたらした。本研究の結果より、不活動による骨格筋インスリン抵抗性惹起の原因の一つに脂質代謝酵素の発現量・活性変化を介した細胞内DAG蓄積が関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Physical inactivity induce insulin resistance. To elucidate its mechanism, we performed hind-limb cast immobilization (HCI) for 24 hours in C57BL6J mice and investigated ex-vivo insulin-stimulated 2-deoxy glucose uptake, insulin signal transduction and lipid composition in soleus muscle. 24h HCI induced insulin resistance in skeletal muscle with impaired insulin signal. In parallel these changes, 24h HCI dramatically increased intramyocellular diacylglycerol (IMDG). Associated with the IMDG accumulation, expression and activity of lipid metabolism enzymes, which induce diacylglycerol accumulation, was increased after 24h HCI. These data suggested that 24h HCI induce insulin resistance through IMDG accumulation in skeletal muscle. Given that increased lipid metabolism enzymes activity and expression might be involved in the mechanism of IMDG accumulation by 24h HCI.

研究分野：健康科学

キーワード：骨格筋 インスリン抵抗性 骨格筋細胞内脂質 不活動

## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本における糖尿病や動脈硬化症の患者数の増加は著しく、特に、糖尿病患者数は増加の一途を辿っている。2007年の集計では、糖尿病または糖尿病が強く疑われる人は2,210万人にまで達しており、早急にその予防を考える必要がある。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、日本で行われた大規模臨床試験である Japan Diabetes Complications Study などにより糖尿病患者の平均BMIは23 kg/m<sup>2</sup>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/m<sup>2</sup>) が全体の約80%を占めていることが明らかとなった。さらにこの点に関連して、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<sup>1)</sup>、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。実際、現代では全世界の死亡数の6%が身体不活動 (Physical inactivity) に起因すると推計されており、第4番目の主要死亡リスクファクターとまでなっている。これまでの研究結果においても、非肥満の男性に3日間の高脂肪食を負荷すると、非肥満者であっても身体活動量が低い者 (1日2,000~3,000歩) は、インスリン抵抗性を惹起されることが明らかとなっており<sup>2)</sup>、このことから、非肥満者におけるインスリン抵抗性発生メカニズムとして、身体的不活動が極めて重要である可能性が示唆される。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来たが、「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

本研究の目的は、不活動による筋インスリン抵抗性発生の明確な分子メカニズムを *in vitro*, *in vivo* の実験系において解明することである。具体的には、

- (1) マウスにおいて不活動モデルによる実験を行い、不活動による筋インスリン抵抗性発生メカニズムを詳細に検討する。
- (2) マウスの実験結果を元にして、24時間の不活動によるインスリン抵抗性発生機序の解明と鍵分子について検討する。発見された分子については、*in vivo* における遺伝子導

入により機能解析を行い、詳細な分子メカニズムを解明する。

### 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、その後に腓腹筋を摘出し 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 分後に腓腹筋を摘出し、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、定量的 RT-PCR 法にてインスリンシグナルに関与する遺伝子群の発現レベルについて検討を行った。さらに、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。また、ここまでの結果より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 時間の下肢ギプス固定の結果、筋重量は変化しなかったが、固定した下肢筋でインスリン感受性が半減し、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。(図 1)

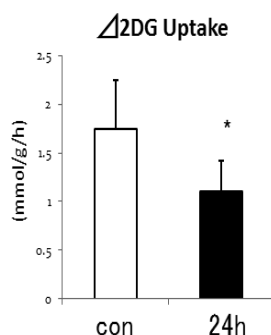


図 1  
24 時間の下肢固定による骨格筋インスリン感受性の変化

また、24 時間の下肢ギプス固定はインスリン刺激時の IRS-1 チロシンリン酸化、Akt セリン酸化の減少が確認され、この極めて短時間の不活動によってもたらされる骨格筋インスリン感受性の低下が、インスリンシグナルの減弱に関連する可能性が示唆された。

さらに、原因を解明するために、インスリンシグナルを阻害する可能性が示唆されている<sup>3)</sup>骨格筋細胞内脂質の組成を液体クロマトグラフィー質量分析にて測定した所、24 時間のギプス固定で Triacylglycerol (TAG) の蓄積量の変化は認められなかったが、大変興味深いことに、IRS-1 チロシンリン酸化の低下に関わることが報告されている diacylglycerol (DAG) の蓄積量が 2 倍以上に増加していた。(図 2)

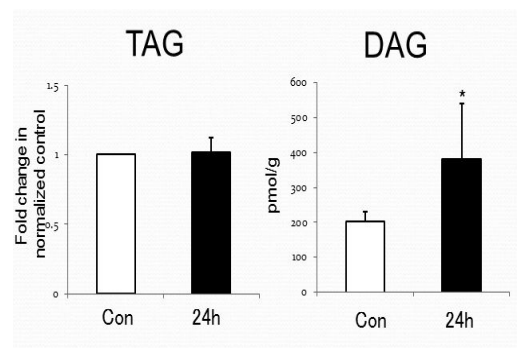


図 2  
24 時間の下肢固定による骨格筋細胞内 TAG,DAG 蓄積量の変化

また、DAG の蓄積によるインスリンシグナル減弱のメカニズムの一つとして報告されている PKC の活性化を示す、PKC の細胞膜移行量は 24 時間の下肢ギプス固定によって増大しており、24 時間の下肢ギプス固定による DAG 蓄積量の増大とインスリンシグナルの減弱の関連性が示唆された。

次に、24 時間の下肢ギプス固定による 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 時間のギプス固定によって TAG 合成酵素の一つである DGAT1 の発現量が 50%減少し、

de novo lipogenesis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・Phosphatidic acid Phosphatase 1 活性 (PAP 1 活性) が各々1.7、1.4 倍に有意に増加していた。(図3)

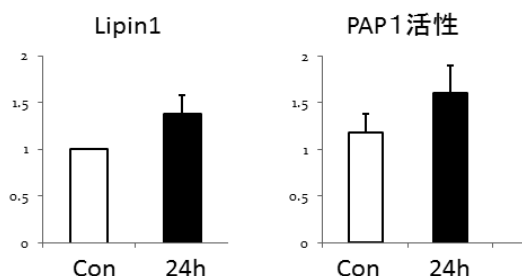


図3  
24時間の下肢固定による Lipin1 の発現量、PAP1 活性の変化

さらに、in vivo でヒラメ筋に野生型 Lipin1、と PAP1 活性を司る部分を置換した Lipin1 Asp678Glu ドミナントネガティブ変異体 (678 番目のアスパラギン酸がグルタミン酸に置換されている) をエレクトロポレーション法で導入することによって過剰発現系を作成し24時間下肢固定における Lipin1 の機能について確認したところ、24時間のギブス固定によって Lipin1 ドミナントネガティブ変異体過剰発現では Phosphatidic acid Phosphatase 1 活性の上昇は認められなかった。

以上研究結果より、不活動による骨格筋インスリン抵抗性惹起の原因の一つに Lipin1 を始めとした脂質代謝酵素の発現量・活性変化を介した細胞内 DAG 蓄積がある可能性が考えられた。今後、これらのメカニズムの更なる解明によって、不活動による骨格筋細胞内脂質蓄積を介したインスリン抵抗性惹起のメカニズムが解明されるとともに、各分子を指標とした運動様式や食事介入、薬物介入の可能性などについて様々な応用が検討可能であると考えられる。

## 参考文献

1. Tamura Y et al. J Clin Endocrinol Metab., 2005
  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.
  3. Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K et al. Diabetes. 2001 Nov;50(11):2579-84.
5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計5件)
1. Takagi M, Uno H, Nishi R, Sugimoto M, Hasegawa S, Piao J, Ihara N, Kanai S, Kakehi S, Tamura Y, Suganami T, Kamei Y, Shimizu T, Yasuda A, Ogawa Y, Mizutani S. ATM Regulates Adipocyte Differentiation and Contributes to Glucose Homeostasis. Cell Rep. 2015 Feb 11. pii: S2211-1247(15)00052-2. doi:10.1016/j.celrep. (査読あり)
  2. Watanabe T, Tamura Y, Kakehi S, Funayama T, Takeno K, Kawaguchi M, Yamamoto L, Sato F, Ikeda S, Taka H, Fujimura T, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Effects of sitagliptin on ectopic fat contents and glucose metabolism in type 2 diabetic patients with fatty liver: A pilot study: J Diabetes Investig. 2015 Mar;6(2):164-72. doi: 10.1111/jdi.12262. (査読あり)
  3. Kawaguchi M, Tamura Y, Kakehi S, Takeno K, Sakurai Y, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Ogura Y, Saga N, Naito H, Fujitani Y, Kanazawa A, Kawamori R, Watada H. Association between expression of FABPpm in skeletal muscle and insulin sensitivity in intramyocellular-lipid-accumulated

- non-obese men.: J Clin Endocrinol Metab. 2014 Sep;99(9):3343-52. doi: 10.1210/jc.2014-1896. (査読あり)
4. Ikeda S, Tamura Y, Takehi S, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Sato F, Ogihara T, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. Exercise-induced enhancement of insulin sensitivity is associated with accumulation of M2-polarized macrophages in mouse skeletal muscle. : Biochem Biophys Res Commun. 2013 Nov 8;441(1):36-41. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.005. (査読あり)
5. 田村好史, 筧 佐織, 竹野景海: 骨格筋における異所性脂肪とインスリン抵抗性; 肥満研究. 2013; 19: 175-180(査読無) [学会発表](計 13 件)
1. Takehi S, Tamura Y, Takeno K, Sakurai Y, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Kanazawa A, Fujitani Y, Kawamori R, and Watada H Accumulation of intramyocellular lipid after high-fat diet is associated with the expression of genes involved in lipid metabolism in non-obese men 3rd international conference on Recent Advances and Controversies in Measuring Energy Metabolism 2014 Tokyo
2. Takehi S, Tamura Y, Ikeda S, Kawamori R, Watada H Physical inactivity and high fat diet synergistically enhance the accumulation of intramyocellular diacylglycerol and induce insulin resistance in murine soleus muscle 50th EASD Annual Meeting 2014 Vienna, Austria
3. Takehi S, Tamura Y, Ikeda S, Kawamori R, Watada H: Physical

inactivity and high fat diet synergistically enhance the accumulation of intramyocellular diacylglycerol and induce insulin resistance in murine soleus muscle : American Diabetes Association 73st scientific sessions June 21-25, 2013 Chicago, IL, US

4. Takehi S, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Funayama T, Sato F, Ikeda S, Fujitani Y, Kawamori R, Watada H: Physical inactivity and high fat diet synergistically induce insulin resistance in skeletal muscle through PTP1B activation. American Diabetes Association 72st scientific sessions Philadelphia (US), 2012

[図書](計 1 件)

1. 高インスリン正常血糖クランプによる肝糖代謝評価法. 臨床に役立つ最新血糖管理マニュアル 医学図書出版, 東京都(日本), 271(41-46), 平成 24 年 共著者: 田村好史, 竹野景海, 筧佐織

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

筧 佐織 (KAKEHI, Saori)

順天堂大学・医学研究科・研究員

研究者番号: 00450560

### (2) 研究分担者

櫻庭 景植 (SAKURABA, Keisyoku)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号: 50175460

### (3) 連携研究者

田村 好史 (TAMURA, Yoshifumi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 80420834