

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：53101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21572

研究課題名(和文) AMPキナーゼ活性が不活動誘発性骨格筋インスリン抵抗性に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effects of AMP-activated protein kinase on inactivity-induced insulin resistance

研究代表者

河本 絵美 (KAWAMOTO, EMI)

長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：40634514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：不活動は骨格筋にインスリン抵抗性を引き起こす。本研究では、ギプス固定によってヒラメ筋のAMPキナーゼ活性が低下するか検討した。その結果、ギプスを施した不活動筋において、AMPキナーゼの活性化を示すAMPキナーゼのリン酸化レベルの低下は認められなかった。また、ギプス固定によって引き起こされる筋のインスリン抵抗性を防止するために、植物由来ポリフェノールの一種であるルチンを投与したが、その防止効果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Physical inactivity induces insulin resistance in skeletal muscle. In this study, we examined whether activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) decreased in rat soleus muscle by using unilateral hindlimb immobilization model. As a result, no decrease in the phosphorylation level of AMP kinase, which indicates activation of AMP kinase, was observed in immobilized muscle. Also, in order to prevent inactivity-induced development of muscle insulin resistance, rutin which is a kind of plant-derived polyphenol was administered, but its preventive effect was not obtained.

研究分野：健康・スポーツ科学

キーワード：AMPキナーゼ 不活動 インスリン抵抗性 ルチン

1. 研究開始当初の背景

運動によって骨格筋のエネルギー基質(ATPやCrP、グリコーゲン)が減少すると、AMP依存性プロテインキナーゼ(AMPキナーゼ)が活性化される。AMPキナーゼの活性化は、糖輸送担体GLUT4の細胞膜へのトランスロケーションを促進し、筋の血糖取り込みを高める。また、アセチルCoAカルボキシラーゼ(ACC)をリン酸化することでミトコンドリアにおける脂肪酸酸化を促進する。

一方、立つ・歩くといった日常生活活動量の減少は、筋の血糖取り込みを低下させ、インスリン抵抗性を引き起こす。すなわち、不活動は骨格筋にインスリン抵抗性を誘発する。しかし、運動と対極の立場にある不活動がAMPキナーゼを不活性化させるかは不明である。

さらに、不活動由来に生じる骨格筋インスリン抵抗性の発症メカニズムの検討とともに、その防止法にも着手する必要がある。予備実験では、AMPキナーゼの薬理的活性化剤であるAICARをラットに投与すると、その後の不活動由来に生じる筋のインスリン抵抗性を防止できることを見出した。しかし、ヒトへの薬剤投与は現実的ではない。植物由来ポリフェノール・ルチンはAMPキナーゼ活性化作用を有することが報告されていることから、不活動誘発性骨格筋インスリン抵抗性を防止できる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 不活動がAMPキナーゼを不活性化させるか調べる。さらに、AMPキナーゼの基質であるACCの活性化についても同様に調べる。

(2) 植物由来ポリフェノール・ルチンが不活動由来に生じる骨格筋インスリン抵抗性を防止できるか調べる。

3. 研究の方法

(1) 不活動動物モデルの概要

Wistar系雄ラットの後肢片側の足関節を底屈位にしてギプスで固定した。後肢ヒラメ筋は、立つ・歩くといった日常動作に常に動員されている筋であるため、ギプス固定をすると不活動状態に陥る。そして、ギプス固定開始から6時間後に両肢からヒラメ筋を摘出し、Krebs Henseleit Buffer中でインスリンとともに非代謝性グルコース(2-deoxyglucose: 2DG)を取り込ませると、ギプス固定肢のヒラメ筋、つまり不活動筋のインスリン刺激時の2DG取り込みが70%程度低下する。すなわち、不活動誘発性の骨格筋インスリン抵抗性が生じる。このとき、対側のヒラメ筋は、両肢にギプスをしていないラットのヒラメ筋と同等の糖取り込み速度を有しているため、ギプス固定による過負荷の影響を受けない正常筋として不活動筋と比較対照できる。

(2) 不活動筋のAMPキナーゼ活性の評価

ギプス固定後に摘出されたヒラメ筋は、ウェスタンブロッティング法を用いたタンパク質発現量の測定に使用した。AMPキナーゼの活性化は、AMPキナーゼの172番目のスレオニン残基のリン酸化(p-AMPK)のほか、AMPKの基質であるACCのリン酸化レベルによって評価した。

(3) ルチンによる不活動筋のインスリン抵抗性防止効果の評価

ラットに体重1kgあたり200mgのルチンを経口投与し、投与から2時間後のAMPキナーゼの172番目のスレオニン残基のリン酸化(p-AMPK)レベルを測定した。さらに、ラットに体重1kgあたり200mgのルチンを経口投与し、その後にギプス固定を行った。ギプス固定から6時間後にヒラメ筋を摘出し、非代謝性グルコース(2DG)を用いた糖取り込み速度を測定した。

4. 研究成果

(1) 不活動筋のAMPキナーゼ活性の評価

ラットの後肢片側をギプスで固定し、その6時間後ならびに24時間後にヒラメ筋を摘出し、AMPキナーゼのリン酸化レベル(p-AMPK)を測定した。ギプス固定後の不活動筋では、インスリン抵抗性が生じることから、p-AMPKの発現が減少している可能性が考えられたが、ギプスを施していない対側との違いは観察されなかった(図1)。

ギプス固定から6時間後および24時間後、AMPキナーゼの基質のひとつであるACCリン酸化レベル(p-ACC)を測定したところ、両方の時間において、不活動筋のp-ACCの発現が有意に減少していた(図2)。

運動と対極の立場にある不活動が骨格筋のAMPキナーゼを不活性化させることで、筋の糖取り込みを低下させる可能性が考えられたが、本研究の結果からは、不活動筋におけるAMPキナーゼの不活性化をはっきりと示すことはできなかった。AMPキナーゼの活性化はATPの分解産物であるAMPによってアロステリックに調節される。したがって、今後は、AMP量の変化につながる筋内代謝産物としてATPやCrPの変化を詳細に調べる必要がある。

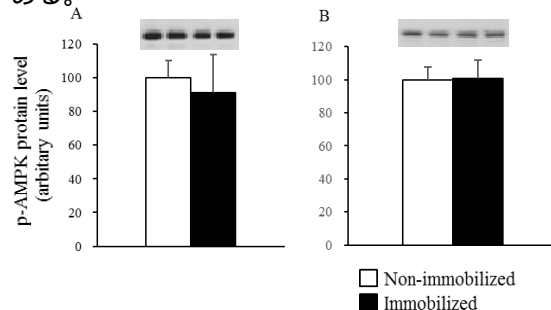


図1. ギプス固定がラットヒラメ筋のAMPキナーゼリン酸化レベルに及ぼす影響

ラットの後肢片側にギプスを施した、固定開始から6時間後(A)および24時間後(B)に両肢からヒラメ筋を摘出し、特異的抗体を用いて測定した。値は平均値±標準誤差

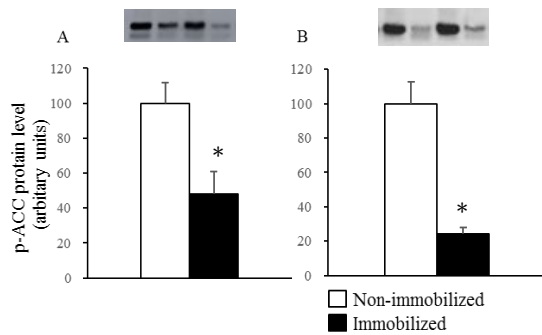


図2. ギプス固定がラットヒラメ筋の ACC リン酸化レベルに及ぼす影響

ラットの後肢片側にギプスを施した。固定開始から6時間後(A)および24時間後(B)に両肢からヒラメ筋を摘出し、特異的抗体を用いて測定した。値は平均値±標準誤差 * p<0.05 vs. Non-immobilized.

(2) ルチンによる不活動筋のインスリン抵抗性防止効果の評価

ルチンはAMP キナーゼを活性化させることが報告されている (Seo et al, 2015)。本実験では、この効果を検証するために、ルチン投与から2時間後のヒラメ筋におけるAMP キナーゼリン酸化レベルを測定したところ、対照群と比べて有意な上昇がみられた (図3)。また、同じ条件下のATP およびCrP量を測定したところ、CrP量に減少傾向が認められた (図4, p=0.052)。したがって、ルチンはAMP キナーゼ活性化作用を有することが示唆された。このことから、ルチンがギプス固定による糖取り込み低下を抑制する可能性が高まったが、その防止効果は得られなかった (図5)。

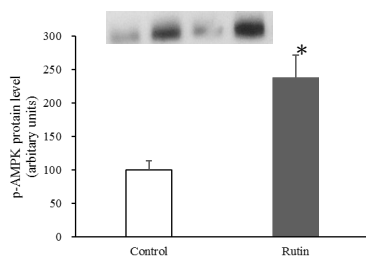


図3. ルチンがラットヒラメ筋のAMP キナーゼ活性に及ぼす影響
ルチン投与から2時間後 ラットのヒラメ筋におけるAMP キナーゼリン酸化レベルは特異的抗体を用いて測定した。値は平均値±標準誤差 *p<0.05 vs. control.

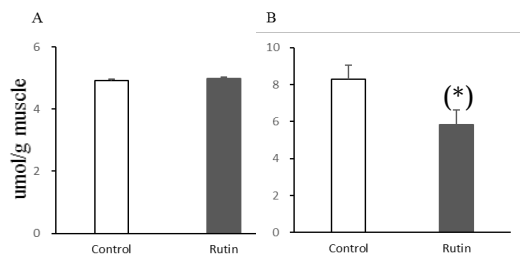


図4. ルチンがラットヒラメ筋のATPおよびCrPに及ぼす影響
ルチン投与から2時間後 ラットのヒラメ筋におけるATP(A)およびCrP(B)を酵素法によって測定した。値は平均値±標準誤差 (*)p=0.052 vs. control.

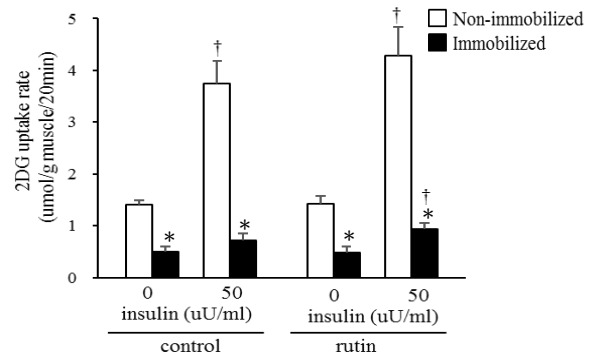


図5. ルチンがギプス固定によって生じるラットヒラメ筋のインスリン抵抗性に及ぼす影響

ルチン投与後とギプス固定を施し、固定開始から6時間後後に両肢からヒラメ筋を摘出し、特異的抗体を用いて測定した。値は平均値±標準誤差 *p<0.05 vs. Non-immobilized, †p<0.05 vs. insulin 0uU/ml

(3) まとめ

本研究では、ラットの後肢片側をギプスで固定し、ギプスを施した不活動筋にインスリン抵抗性が生じるメカニズムを検討した。不活動と対極の立場にある運動はAMP キナーゼを活性化させることで筋の糖取り込みを促進するが、不活動がAMP キナーゼの不活性化を引き起こすことをはっきりと示すことはできなかった。もしかすると、不活動には運動とは異なる独自のメカニズムが存在し、その不活動特異的なメカニズムが、ギプス固定による不活動誘発性骨格筋インスリン抵抗性を主体的に制御しているのかもしれない。

また、不活動誘発性骨格筋インスリン抵抗性の防止法として、AMP キナーゼ活性化作用を有するルチンを用いた。ルチン投与後、ギプス固定によるインスリン抵抗性を防止できるか検討したが、防止効果は得られなかった。以前の実験では、AMP キナーゼの薬理的活性化剤であるAICARによる防止効果を得ており、さらに本研究でもルチンがAMP キナーゼを活性化する結果は得ているので、投与量やタイミングによっては防止効果が得られるのかもしれない。

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)

- 1) Kawamoto E, Koshinaka K, Yoshimura T, Masuda H, Kawanaka K. Immobilization rapidly induces muscle insulin resistance together with the activation of MAPKs (JNK and p38) and impairment of AS160 phosphorylation. *Physiol Rep.* 2016 ;4(15). pii: e12876. 査読あり

(学会発表)(計3件)

- 1) 羅成圭、**河本絵美**、中川洋成、富賀裕貴、中島志穂子、田中宏暁、檜垣靖樹、川中健太郎。筋線維タイプおよび運動トレーニングが骨格筋ビタミン D 受容体発現量に及ぼす影響。第 72 回日本体力医学会大会（松山），2017.9.16-18.
- 2) 丸山裕輝、川中健太郎、**河本絵美**。ルチンがラット骨格筋グリコーゲン含量に及ぼす影響。第 72 回日本体力医学会大会（松山），2017.9.16-18.
- 3) **河本絵美**、川中健太郎。軽運動が不活動誘発性骨格筋インスリン抵抗性の改善に及ぼす影響。第 71 回日本体力医学会大会（岩手），2016.9.23-25.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河本 絵美 (KAWAMOTO, Emi)

長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：40634514