

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500565
 研究課題名 (和文) 骨格筋糖取り込み機序における酸化ストレス及び筋収縮刺激の相互作用の
 解明
 研究課題名 (英文) Oxidative stress- and muscle contraction-stimulated glucose transport
 in rat skeletal muscle
 研究代表者
 檜垣 靖樹 (HIGAKI YASUKI)
 福岡大学・スポーツ科学部・准教授
 研究者番号：10228702

研究成果の概要 (和文) : 骨格筋は生体のグルコース調節の重要な器官である。運動刺激をはじめとする様々な刺激が骨格筋の糖取り込みを亢進させるが、そのメカニズムは明らかでない。本研究では骨格筋収縮により生じる酸化ストレスが、骨格筋糖取り込み亢進機序に関与するという仮説を検証した。その結果、過酸化水素刺激による骨格筋糖取り込みの亢進が認められた。そのメカニズムとしては、PI3 キナーゼの下流にあるといわれる AktThr³⁰⁸ のリン酸化の関与が明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : Skeletal muscle is an important tissue for glucose homeostasis. Although there are numerous physiological and pharmacological perturbations can increase glucose transport in skeletal muscle, the signaling mechanisms that lead to transport activations are still poorly defined. In the current study, we determined the effects of acute exposure of skeletal muscle to pharmacological agents that produce reactive oxygen species (ROS) and then assessed potential signaling mechanisms that might mediate the effects of these agents on glucose transport. We found that the acute exposure of muscle to ROS is a potent stimulator of skeletal muscle glucose uptake, and that this occurs through the phosphorylation of AktThr³⁰⁸.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・スポーツ科学

キーワード：エネルギー代謝と活性酸素

1. 研究開始当初の背景

インスリン抵抗性を呈するヒトを対象とした研究では、酸化ストレスは糖

の処理能を障害することが報告されているが、我々は、急性と慢性の影響は異なると考えている。酸化ストレスが

筋の糖取り込み能に及ぼす影響は、細胞内環境の状態や暴露された時間的経過によって異なると思われるが、これらを検討した研究は我々の知る限り見当たらない。

活性酸素種は、組織の傷害や炎症を引き起こしがんのリスクとなることから、酸化ストレスに対する防御システムに関する研究が数多く行われてきたが、情報伝達としての役目やエネルギー代謝の調節に関する研究は非常に少ない。

2. 研究の目的

ヒポキサンチン+キサンチンオキシダーゼ刺激によって発生する過酸化水素が骨格筋の糖取り込み亢進を引き起こすメカニズムを明らかにし、筋収縮刺激との相互作用を検討することを目的とする。

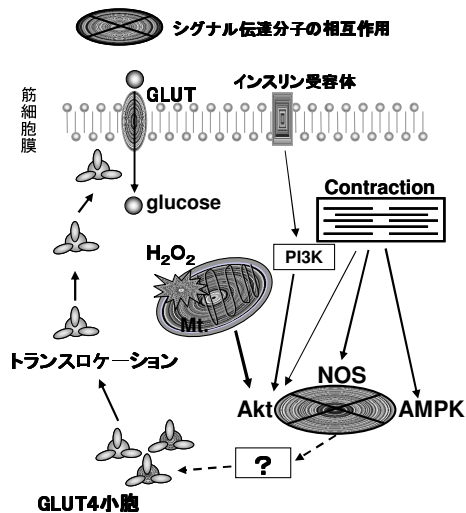


図1. 骨格筋の糖取り込み亢進機序における相互作用の想定図

3. 研究の方法

(1) 糖取り込み能の評価について

下図の実験系で、アイソトープでラベルされた $[^{14}\text{C}]$ -Mannitol及び $[^3\text{H}]$ -2-deoxy glucoseを用いて、2-deoxy-glucose uptakeを測定し糖取り込み能を評価する。

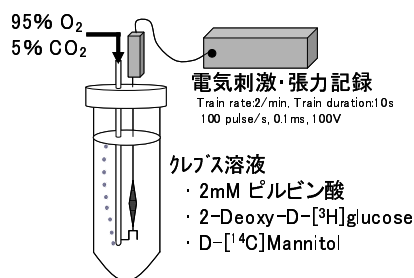


図2. 糖取り込み装置の概要



図3. 実験装置

(2) 被験動物

SD系雄ラット及びC57BL/6Jマウスを用いた。骨格筋は頸椎脱臼後、速やかに下肢EDL筋及びSoleus筋を摘出した。摘出筋は、糸で両側を固定し改良した筋固定器具へ装着し、KRB液に浸した。KRB液は予め、アルミブロック恒温槽を用いて37度に保ち、95% O_2 及び5% CO_2 ガスを充填した。KRB液内には酸化ストレス刺激として、キサンチンオキシダーゼあるいは過酸化水素を用いた。

Sample	0	30	35	40	50 (min)
Exp.	KRB buffer	↓	↓	↓	↓
		± insulin H_2O_2 or XO			

図4. 実験プロトコール

(3) AktThr³⁰⁸のリン酸化の定量

摘出した筋サンプルは、20mM Tris-HCl (pH7.4)バッファーでホモジナイズ後、上清を分離した。上清サンプルの蛋白濃度を測定後、80 μg の蛋白量を用いてSDS-PAGEによりAkt蛋白を分離した。5%のnonfat milkを含むTBS-Tで1時間、室温にてブロッキングした。1次抗体はCell Signaling Technology社を用いた。

4. 研究成果

本研究期間(2007~2009年度)に、研究代表者が所属を異動したため(2008.4 佐賀大学より福岡大学へ)、RI関連実験装置の移設と再セットアップに時間を要した。また、新規モデルとしてマウス摘出筋での検討を追加で行った。

(1) マウスの摘出筋を用いたインスリン刺激の糖取り込みについて

これまで、ラットの単離骨格筋を用いた研究を展開してきたが、今回、実験機器の移設もありマウスモデルの構築もあわせ

て実施した。

その結果、図 5 (A&B) に示すように Soleus 筋及び EDL 筋ともに 300nM のインスリン刺激で 2 倍以上の糖取り込みが観察された。

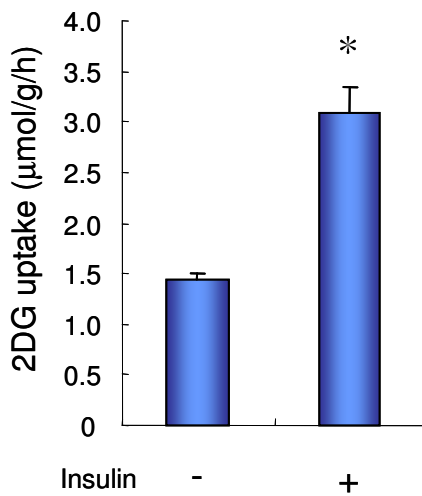


図 5-A. マウス Soleus 筋のインスリン刺激による糖取り込み速度

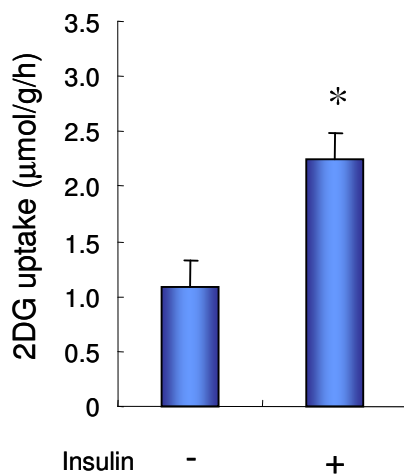


図 5-B. マウス EDL 筋のインスリン刺激による糖取り込み速度

(2) Superoxide dismutase (SOD) の添加は、ヒポキサンチン+キサンチンオキシダーゼ刺激による糖取り込みを抑制するか？

SOD はスーパーオキシドラジカルを分解する効果を持つ。ヒポキサンチン+キサンチンオキシダーゼ刺激 (Hx+XO) は、過酸化水素のほかスーパーオキシドラジカルを発生させるため、Hx+XO 刺激による骨格筋の糖取り込み亢進は、どちらの因子が引き金となっているか、不明である。そこで、薬理的な方法で両者あるいは一方の影響

であるか、検討した。その結果、Hx+XO による骨格筋糖取り込み亢進は、カタラーゼにより完全にブロックされ、SOD では抑制されなかった。

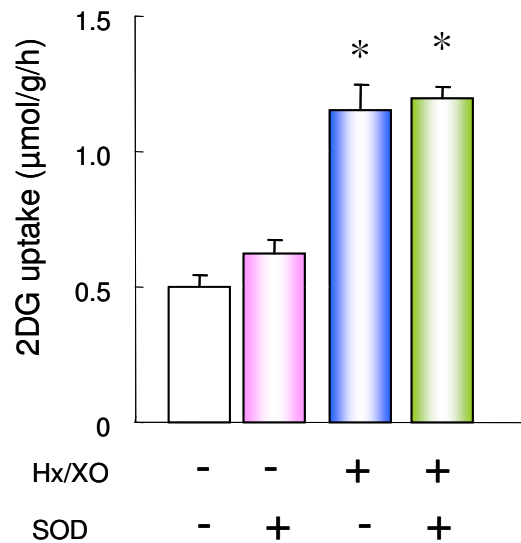
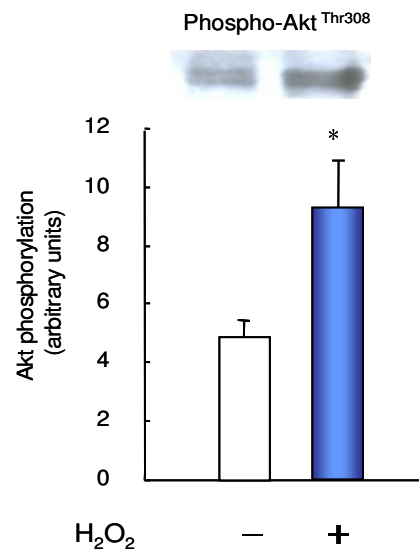


図 6. SOD は XO/HX による骨格筋糖取り込みを抑制しない

(3) 過酸化水素刺激による AktThr³⁰⁸ のリン酸化

すでに我々は、過酸化水素刺激に対する AktSer⁴⁷³ のリン酸化を報告したが、今回新たに AktThr³⁰⁸ のリン酸化を検討したところ、約 2 倍の高値を示した。



今までの研究結果を総合すると、過酸化水素刺激による骨格筋糖取り込み亢進機序には、AMP キナーゼの活性化を介するシグナルではなく、PI3 キナーゼさらには AktSer⁴⁷³ と AktThr³⁰⁸ のリン酸化を介する

シグナルの関与が明らかとなった。筋収縮と酸化ストレスによるシグナル伝達因子として、Akt を介する共通経路の存在を示唆する結果である。

現在、一酸化窒素に関するシグナルもあわせて検討しており、引き続き研究を進めていく予定である。また、酸化ストレスと遺伝子修飾、例えばDNAのメチル化との関連性も報告されている。糖取り込みを制御する遺伝子のエピジェネティックな変化も是非、解析していきたい。

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 13 件)

- ① 桧垣靖樹、清永明：高血圧。臨床スポーツ医学。26, 130-137, 2009. 査読無
- ② 桧垣靖樹、田中宏暁：運動処方への構成。日本臨床：身体活動・運動と生活習慣病－運動生理学と最新の予防・治療－。67(2)：363-369, 2009. 査読無
- ③ Higaki Y, Mikami T, Fujii N, Hirshman MF, Koyama K, Seino T, Tanaka K, Goodyear LJ.: Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. Am. J. Physiol. 294(5): E889-897, 2008. 査読有
- ④ 桧垣靖樹：運動における膵臓（内分泌）のはたらき－インスリン分泌機構の適応－。体育の科学。58(10), 705-710, 2008. 査読無
- ⑤ 桧垣靖樹、田中宏暁：脂質異常症の運動療法。最新医学。63(2), 70-82, 2008. 査読無

[学会発表] (計 20 件)

- ① Higaki Y, Taguchi N, Nishida Y et. al: Association between physical activity and high-sensitivity C-reactive protein in a healthy Japanese population. 国際疫学会西太平洋地域学術会議兼第 20 回日本疫学会学術総会（埼玉県立大学）。2010. 1. 10.
- ② 桧垣靖樹：ラウンドテーブルディスカッション、幼児・児童の健康問題を考える、保健統計の立場から。第 58 回九州体育・スポーツ学会。2009. 9. 6. 崇城大学
- ③ 桧垣靖樹：糖尿病予防に運動が効く理由。第 82 回日本産業衛生学会、労働者問題研究会。2009. 5. 21. 福岡国際会議場
- ④ 桧垣靖樹、三上俊夫、小山勝弘、清野哲

也、藤井宣晴：酸化ストレスは PI3 キナーゼ経路を介して骨格筋の糖取り込みを亢進させる。第 63 回日本体力医学学会大会、2008. 9. 18. 体力科学 57(6), 767, 2008. 大分

- ⑤ 桧垣靖樹、田口尚人、原めぐみ、中村和代、南里妃名子、今泉猛、坂本龍彦、堀田美加子、新地浩一、田中恵太郎：身体活動量と耐糖能異常リスクに関する研究。第 18 回日本疫学会 2008. 1. 26 第 18 回日本疫学会学術総会講演集 18(1)：185, 2008. 東京
- ⑥ 桧垣靖樹、木村裕美、佐々木香苗、松元圭太郎、相良朋子、真名子香織、荒尾恵介、久野一恵：低栄養状態の高齢者に対する栄養補助食品摂取の効果－身体活動量の視点より－ 第 11 回日本病態栄養学会年次学術集会。2008. 1. 12 日本病態栄養学会誌 10(4) 483, 2008. 京都

[図書] (計 4 件)

- ① 桧垣靖樹、藤谷順三、朝倉書店、健康づくりハンドブック、2010、29-33, 372-383.
- ② 桧垣靖樹、真興交易(株) 医学出版部、身体トレーニングの科学、2009、405-410.
- ③ 桧垣靖樹、医学出版、健康と運動の疫学入門、2008、204-210.
- ④ 桧垣靖樹、講談社、最新これでなっとく使えるスポーツサイエンス、2007、31-32, 136-137, 140-141.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桧垣靖樹 (HIGAKI YASUKI)

福岡大学・スポーツ科学部・准教授

研究者番号：10228702

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：