

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21776

研究課題名(和文) 不活動由来に増加してインスリン抵抗性を惹起する筋細胞内メッセンジャーの探索

研究課題名(英文) Disuse-induced muscle insulin resistance is associated with some changes in intramuscular metabolites

研究代表者

川中 健太郎 (Kawanaka, Kentaro)

福岡大学・スポーツ科学部・教授

研究者番号：80339960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)： 活発な運動によって筋細胞内のエネルギー源(グリコーゲン、CrPなど)が減少し、これを細胞内メッセンジャーとしてインスリン感受性が上昇する。一方、身体不活動(立位・歩行などの日常活動量の減少)によって骨格筋のインスリン感受性は低下するが、不活動筋ではエネルギー源が増加することはない。すなわち、不活動特異的な筋細胞内メッセンジャーが存在するはずだが、実体は不明である。

そこで、本研究では、実験動物ラットを用いて、不活動由来の筋内代謝物変化をメタボローム解析で網羅的に分析した。その結果、不活動由来のグルタミン酸の増加、あるいはコリンやサルコシンの減少がインスリン抵抗性を引き起こす可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スポーツなどの活発な運動によって筋細胞内のエネルギー源(グリコーゲン、CrPなど)が減少し、これを細胞内メッセンジャーとしてインスリン感受性が上昇する。一方、身体不活動(立位・歩行などの日常活動量の減少)によって骨格筋のインスリン感受性は低下する。本研究は不活動特異的な筋細胞内メッセンジャーの候補(グルタミン酸、コリン、サルコシンなど)を示すものであり、今後、これらの代謝物質の変化とインスリン抵抗性の因果関係を検討する。将来的には、これらの代謝物質の変化を抑制し、不活動誘発性インスリン抵抗性を防止できる処方、例えば、「食事」「機能性食品」「ストレッチ」などを用いた運動代替処方の開発に繋げる。

研究成果の概要(英文)： Exercise increases insulin sensitivity of muscle glucose uptake through a decrease in intramuscular energy sources (e.g. glycogen, ATP, CrP). In contrast, inactivity (decreased ambulatory activity) decreases insulin sensitivity, but does not increase intramuscular energy status in inactive muscle. Therefore, the mechanism of insulin resistance due to inactivity is unknown.

We performed a comprehensive metabolomic analysis to examine the effects of inactivity on muscle metabolites. The metabolome analysis revealed that inactivity-induced insulin resistance is characterized by several intramuscular metabolite profiles (e.g. glutamate, choline, and sarcosine).

研究分野：運動栄養生理学

キーワード：不活動 ギブス固定 ラット ヒラメ筋 インスリン抵抗性 メタボローム TXNIP 糖取り込み

1. 研究開始当初の背景

スポーツなどで活発に運動すると、筋細胞内のエネルギー源(グリコーゲン、ATP、CrP など)が減少する。これを細胞内メッセンジャーとしてインスリン感受性が上昇する。これは運動が糖尿病の予防・治療に有効な分子機序でもある。一方、身体不活動(立位・歩行などの日常生活活動量の減少)によって骨格筋のインスリン感受性は低下する。これは、糖尿病の発症に繋がる。しかし、不活動筋ではエネルギー源が通常の状態よりも増加することはない。すなわち、不活動の仕組みは、運動の仕組みの逆ではない。換言すれば、不活動特異的な筋細胞内メッセンジャーが存在するはずだが、実体は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、「不活動由来に筋内における代謝物濃度が変化し、これを筋細胞内メッセンジャーとしてインスリン抵抗性が生じる」との仮説を検証する。そこで、メタボローム解析を用いて、不活動由来に変化する筋内代謝物を網羅的に分析し、インスリン抵抗性との関連性を検討した。

3. 研究の方法

3 週齢のラットをコントロール群、短縮固定群、ならびに伸展固定群に分けた。コントロール群は覚醒状態で通常飼育した。短縮固定群ならびに伸展固定群の下肢には吸入麻酔下で6時間に亘ってテーピング固定を施した。短縮固定群は6時間に亘ってヒラメ筋を受動的短縮状態に保ち、伸展固定群は5時間の短縮固定後、1時間の受動的伸展を施した。同一個体の片側の筋は糖取り込み測定に供した。反対側の筋はCE-TOFMS 及びCE-QqQMS のカチオンモード、アニオンモードによる測定に供し、解糖系、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、ポリアミン・クレアチン代謝経路、プリン代謝経路、グルタチオン代謝経路、ニコチンアミド代謝経路、コリン代謝経路及び各種アミノ酸代謝経路にて主要な役割を占める116種類の代謝物質を選出して解析を行った(シー・スコープ解析)。また、別個体の筋を用いてチオレドキシソ相互作用タンパク質(TXNIP)の発現レベルをウエスタンブロッティングによって検討した。

4. 研究成果

(1) 糖取り込み (図1)

短縮固定群のヒラメ筋では、コントロール群に比べてインスリン刺激による糖取り込みが50%以下に減少した。これは不活動に由来してインスリン抵抗性が生じたことを示す。しかし、伸展固定群の糖取り込みはコントロールと差がなく、筋を受動的に伸展させるだけで、不活動由来のインスリン抵抗性を防止できることを示す。

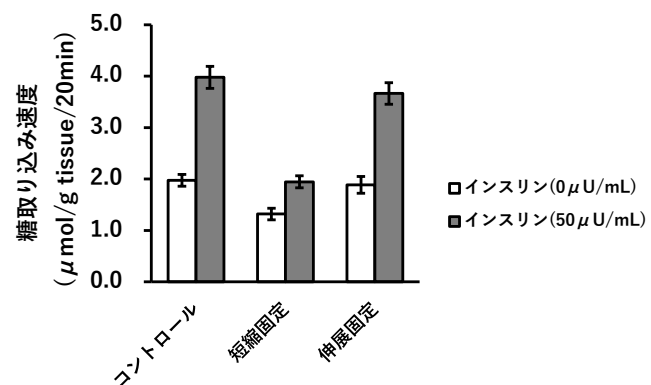


図1. 糖取り込み速度

(2) TXNIP 発現 (図2)

短縮固定群のヒラメ筋では、コントロール群に比べて TXNIP タンパク質発現レベルが 66%増加した。一方、伸展固定群ではコントロールと差がなかった。このように TXNIP タンパク質発

現量は糖取り込みと負の相関性を示した。TXNIP タンパク質はインスリン抵抗性を引き起こす可能性が示されており (Kawamoto et al. 2018, Waldhart et al. 2017)、不活動や受動的伸展による糖取り込みの変化が TXNIP によって説明できる可能性が示された。

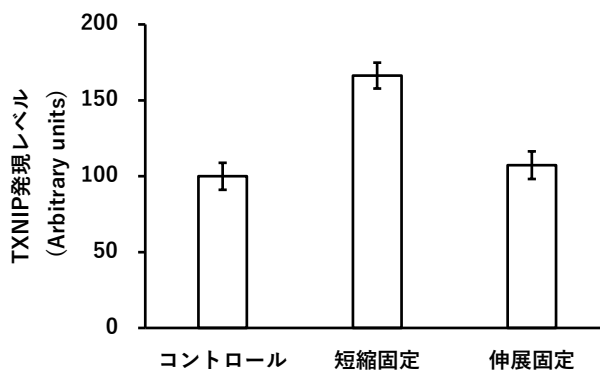


図2. TXNIP発現レベル

(3) 筋内代謝物 (表 1)

116 種類の代謝物質のうち 36 種類が短縮固定筋でコントロール筋に比べて有意な変化を示した (21 種類が増加、15 種類が減少)。このうち 15 種類の代謝物質については 2 倍以上の顕著な変化がみられた。特に、解糖系の減少 (グルコース 6 リン酸、グルコース 1 リン酸、フルクトース 6 リン酸、ピルビン酸、乳酸)、TCA 回路の増加 (オキソグルタル酸) や減少 (フマル酸、リンゴ酸、アコニット酸)、TCA 回路調節因子の増加 (カルニチン)、コリンおよびグリシン代謝経路の減少 (コリン、サルコシン)、アミノ酸の増加 (グルタミン酸) や減少 (アラニン、アスパラギン酸) が特徴的であった。そして、この 15 種類の代謝物質のうちアコニット酸とアスパラギン酸を除く 13 種類は伸展固定群でコントロール群のレベルに回復する傾向がみられた。この 13 種類の代謝産物のうち乳酸を除く 12 種類についてはインスリン刺激による糖取り込みと有意な相関関係がみられた。

12 種類の代謝物のなかで解糖系 (グルコース 6 リン酸、グルコース 1 リン酸、フルクトース 6 リン酸、ピルビン酸) や TCA 回路の代謝物 (オキソグルタル酸、フマル酸、リンゴ酸)、さらには TCA 回路の調節因子 (カルニチン) が短縮固定によって変化したのは、これらの代謝経路の流量が不活動にともなって減少したことと起因すると考えられる。しかし、これらの代謝物の変化がインスリン抵抗性の原因になっている可能性は特に考えにくい。

一方、アミノ酸であるグルタミン酸はピルビン酸とともに、アラニンアミノ基転移酵素の働きによってアラニンとオキソグルタル酸に変換された後に TCA 回路で代謝される。すなわち、エネルギー

表1. メタボローム解析結果

代謝物	短縮固定/コントロール		伸展固定/短縮固定	
	比	p値	比	p値
NADH	1.1	0.049 *	1.6	0.025 *
UDP-glucose	1.6	0.003 **	0.3	2.8E-04 ***
IMP	1.4	0.038 *	36	1.3E-04 ***
Glucose 6-phosphate	0.4	0.009 **	4.1	0.005 **
Fructose 6-phosphate	0.3	0.003 **	3.9	0.006 **
Glucose 1-phosphate	0.3	3.9E-04 ***	4.4	0.012 *
CoA	1.5	0.007 **	0.6	0.002 **
Malonyl CoA	1.8	8.3E-04 ***	0.7	0.004 **
PRPP	1.4	0.021 *	1.4	0.037 *
GDP	1.2	0.047 *	1.9	0.075
Lactic acid	0.4	0.016 *	41	9.0E-05 ***
GTP	1.2	0.001 **	0.4	1.7E-07 ***
Pyruvic acid	0.3	0.036 *	1.2	0.138
2-Hydroxyglutaric acid	1.7	0.033 *	1.2	0.251
Malic acid	0.07	0.003 **	7.5	0.004 **
2-Oxoglutaric acid	5.0	0.006 **	<1	N.A.
Fumaric acid	0.05	0.009 **	14	0.002 **
Citric acid	0.6	0.011 *	0.4	8.1E-05 ***
cis-Aconitic acid	0.5	0.012 *	0.2	0.001 **
Urea	1.6	0.033 *	1.0	0.873
Ala	0.5	0.012 *	3.5	1.8E-05 ***
Sarcosine	0.5	0.021 *	1.4	0.113
Choline	0.5	2.6E-04 ***	1.7	0.061
Ser	0.7	0.049 *	1.2	0.025 *
Creatinine	1.1	0.049 *	0.8	0.004 **
Pro	1.3	0.020 *	1.4	0.010 **
Thr	1.4	0.002 **	1.2	0.008 **
Ile	1.3	0.029 *	1.8	5.4E-04 ***
Asp	0.12	6.0E-04 ***	0.4	8.8E-05 ***
Hypoxanthine	1.3	0.018 *	31	0.010 *
Gln	1.2	0.005 **	1.2	0.003 **
Glu	3.3	2.1E-04 ***	0.5	6.6E-04 ***
Met	1.7	0.003 **	1.4	0.004 **
Carnitine	2.7	0.002 **	0.5	1.8E-05 ***
Adenosine	1.4	0.042 *	2.2	0.017 *
Argininosuccinic acid	0.7	0.040 *	1.0	0.762

ギー源として利用される。短縮固定された不活動筋ではエネルギー需要が減少するので、エネルギー源としてのグルタミン酸利用率も減少する。これがグルタミン酸の増加ならびにアラニンの減少を引き起こしたと考えられる。ちなみに、グルタミン酸の血中レベルの上昇はインスリン抵抗性の危険因子であることが報告されている (Ferrannini E et al. 2013)。筋細胞内グルタミン酸の上昇が、不活動誘発性インスリン抵抗性を引き起こす細胞内メッセンジャーである可能性については不明であるが、今後の検討課題である。

また、コリン・グリシン代謝経路におけるコリンとサルコシンはいずれも AMPK を活性化する働きを有する (Taylor et al. 2017, Walters 2018)。また、AMPK 活性化はインスリン感受性を高める (Kjobsted et al. 2015)。さらには、TXNIP タンパク質発現量を減少させる (Ra et al. 2020)。したがって、短縮固定された不活動筋におけるコリンとサルコシンの減少は、AMPK 活性低下を介して TXNIP タンパク質発現量の増加、さらにはインスリン抵抗性を引き起こす可能性がある。筋細胞内コリンならびにサルコシンの減少が、不活動誘発性インスリン抵抗性を引き起こす細胞内メッセンジャーである可能性についても今後の検討課題である。

(4) まとめ

不活動由来に筋内で代謝物濃度が増加し、これを筋細胞内メッセンジャーとしてインスリン抵抗性が生じる可能性が示された。現在、不活動由来のグルタミン酸の増加、あるいはコリンやサルコシンの減少がインスリン抵抗性を引き起こす可能性に着目している。

<参考文献>

- 1) **Ferrannini E, Natali A, Camastra S, Nannipieri M, Mari A, Adam K-P, Milburn MV, Kastenmuller G, Adamski J, Tuomi T, Lyssenko V, Groop L, Gall WE.** Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. *Diabetes*. 62: 1730-1737, 2013.
- 2) **Kawamoto E, Tamakoshi K, Ra SG, Masuda H, Kawanaka K.** Immobilization rapidly induces thioredoxin-interacting protein (TXNIP) gene expression together with insulin resistance in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 125: 596-604, 2018.
- 3) **Kjobsted R, Treebak JT, Fentz J, Lantier L, Viollet B, Birk JB, Schjerling P, Bjornholm M, Zierath JR, Wojtaszewski FP.** Prior AICAR stimulation increases insulin sensitivity in mouse skeletal muscle in an AMPK-dependent manner. *Diabetes*. 64: 2042-2055, 2015.
- 4) **Ra S-G, Kawamoto E, Koshinaka K, Iwabe M, Tomiga Y, Iizawa H, Honda H, Higaki Y, Kawanaka K.** Acute bout of exercise downregulates thioredoxin-interacting protein expression in rat contracting skeletal muscles. *Physiol Reports*. 8: e14388, 2020.
- 5) **Taylor A, Schenkel LC, Yokich M, Bakovic M.** Adaptations to excess choline in insulin resistant and Pcyt2 deficient skeletal muscle. *Biochem Cell Biol* 95: 223-231, 2017.
- 6) **Waldhart AN, Dykstra H, Peck AS, Boguslawski EA, Madaj ZB, Wen J, Veldkamp K, Hollowell M, Zheng B, Cantley LC, McGraw TE, Wu N.** Phosphorylation of TXNIP by Akt mediates acute influx glucose in response to insulin. *Cell Reports* 19: 2005-2013, 2017.
- 7) **Walters RO, Arias E, Diaz A, Burgos ES, Guan F, Tiano S, Mao K, Green CL, Qiu Y, Shah H, Wang D, Hudgins AD, Tabrizian T, Tosti V, Shechter D, Fontana L, Kurland IJ, Barzilai N, Cuervo AM, Promislow DEL, Huffman DM.** Sarcosine is uniquely modulated by aging and dietary restriction in rodents

and humans. *Cell Rep* 25: 663-676, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本田紘基、羅成圭、飯澤拓樹、中島志穂子、富賀裕貴、檜垣 靖樹、川中健太郎
2. 発表標題 受動的なストレッチはラットヒラメ筋のTXNIP発現量を減少させるとともにインスリン抵抗性を改善する
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会（鹿児島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Honda H, Ra SG, Iizawa H, Nakashima S, Tomiga Y, Higaki Y, Kido K, Kawanaka K
2. 発表標題 Passive stretch improves insulin-stimulated glucose transport together with downregulation of TXNIP in rat soleus muscle
3. 学会等名 American Physiological Society Integrative Physiology of Exercise（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村泰志、木戸康平、廣田歩夢、有川実玖、横川晶、本田紘基、増谷弘、羅成圭、川中健太郎。
2. 発表標題 TXNIPが筋収縮による骨格筋の糖取り込みに与える影響。
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会（三重）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 羅成圭、本田紘基、川中健太郎。
2. 発表標題 運動後の非活動筋における糖取り込みとTXNIPの関与。
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会（三重）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1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
研究分担者	檜垣 靖樹 (Higaki Yasuki) (10228702)	福岡大学・スポーツ科学部・教授 (37111)	
研究分担者	上原 吉就 (Uehara Yoshinari) (70373149)	福岡大学・スポーツ科学部・教授 (37111)	
研究分担者	木戸 康平 (Kido Kohei) (50822730)	福岡大学・スポーツ科学部・助教 (37111)	
研究分担者	河本 絵美 (Kawamoto Emi) (40634514)	長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授 (53101)	
研究分担者	畑本 陽一 (Hatamoto Yoichi) (90738832)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・ 栄養研究所 栄養・代謝研究部・研究員 (84420)	

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
---------	---------