

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500687

研究課題名（和文）骨格筋細胞における糖代謝制御におよぼすストレッチの効果とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of glucose metabolism induced by stretch in skeletal muscles.

研究代表者

小原 一男（OBARA KAZUO）

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：60117611

研究成果の概要（和文）：骨格筋の受動的伸展刺激（ストレッチ刺激）誘発性糖取り込み機構について検討した。得られた結果より、骨格筋においてストレッチ刺激はインテグリン/FAK系により感受され、筋小胞体からのカルシウム遊離を引き起こすこと、また、この遊離カルシウムによりCaMKIIが活性化され糖取り込みが亢進することが示唆された。さらに、ストレッチ刺激誘発性糖取り込み機構はインスリンや収縮による糖取り込み機構とは異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Mechanism of glucose uptake induced by passive stretch stimulation (stretch) in skeletal muscle was investigated. Our results suggest that stretch is accepted by integrin/FAK and causes Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum, resulting increase in glucose uptake through CaMKII activation. Our results also suggest that stretch-induced glucose uptake involves insulin- and contraction-independent pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：筋生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：骨格筋、糖代謝、ストレッチ、インテグリン、カルシウム、GLUT4、CaMKII

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国においても、心筋梗塞や脳卒中に代表される致死的心血管疾患の頻度は着実に増加しており、その対策は急務である。心血管疾患の主要因である動脈硬化の多くは、肥満、耐糖能異常、高血圧、脂質代謝異常といった複数の原因が重積して発症することから、最近ではこれらを「メタボリックシンドローム」と呼称することで、病態解明、診断、治療の明確なターゲットとして捉えるようになった。このメタボリックシンドロームの改善には、食事療法、薬物療法とともに、運動療法が極めて重要な位置を占める。しかし、運動療法の有効性に関する科学的根拠は未だ薄弱である。一般的に運動の際には、エネルギー消費に加えて、骨格筋細胞に「受動的ストレッチ刺激」も加わる。しかし、「受動的ストレッチが骨格筋細胞に及ぼす影響」については、これまで詳細な検討は為されてこなかった。申請者らは最近、摘出マウス下肢骨格筋において、5分間という短時間の周期的(1 Hz)ストレッチにより、糖輸送担体 GLUT4 の細胞膜への移行や糖取り込みが促進されることを見出した。すなわち、運動をしなくても、骨格筋を受動的にストレッチするだけで、骨格筋細胞への糖取り込みが促進され、血糖値を下げられる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

骨格筋細胞において GLUT4 の細胞膜への移行と糖取り込みを引き起こすストレッチの刺激受容応答機構の全貌を明らかにするとともに、ストレッチを取り入れた2型糖尿病の新規治療法の開発を視野に入れて、ストレッチと薬物の併用効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 伸展刺激：マウスのヒラメ筋より作製した短冊状の筋線維標本に、リニアステップ

ングモーターを装備した自家製伸展装置を用いて、至適生体長から±2 mmの伸展量で、1 Hzの周期的ストレッチ刺激を5~30分間与えた。また、ラット由来培養筋芽細胞株であるL6細胞をコラーゲンコートしたシリコン膜製ストレッチチャンバーに播種し、多核筋管細胞(骨格筋細胞)に分化させた後、筋線維標本同様にストレッチ刺激を与えた。

(2) GLUT4の細胞内移行の測定：ストレッチ刺激後に液体窒素で凍結した筋線維標本またはL6筋管細胞をホモジナイズし、ショ糖密度勾配遠心法により細胞内小胞、細胞膜系の2つの膜分画を分取した。各分画におけるGLUT4の量は、ウェスタンブロット法にて検出した。また、蛍光抗体法を用いてGLUT4を可視化し、共焦点レーザー顕微鏡によりその細胞膜への移行を検討した。

(3) 糖取り込み量の測定：ストレッチ刺激後、2-deoxy-D-[³H]glucoseを含む栄養液中で標本を10分間静置し、細胞に取り込まれた2-deoxy-D-[³H]glucoseの放射活性を測定した。

(4) PI3-kinase/Akt系の関与：Aktのリン酸化を指標にしてPI3-kinase/Akt系の関与について検討した。Aktのリン酸化はリン酸化Akt抗体を用いてウェスタンブロット法により測定した。また、PI3-kinase特異的阻害薬LY294002やwortmanninを用いた薬理的解析を行った。

(5) Ca²⁺/カルモジュリン系の関与：骨格筋の収縮による糖取込みに関与が示唆されているCa²⁺/カルモジュリン系について検討した。細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)をFrua-2を用いて測定した。また、Ca²⁺/カルモジュリンにより活性化されるキナーゼ(CaMKII)の阻害薬KN93を用いた薬理的解析によりその関与を評価した。

(6) ストレッチ刺激を受容するメカノセンサーの同定：インテグリン機能を阻害するRGDペプチドや中和型抗インテグリン抗体を利用した薬理的解析により、また、カベオリン-3ノックアウトマウスの骨格筋を用いて、メカノセンサーの同定を行った。

4. 研究成果

(1) ストレッチ刺激誘発性糖取り込み：マウスヒラメ筋にストレッチ刺激を与えると、糖取り込みが増加した。しかし、この糖取り込み量はインスリンや収縮によるものに比べ少なかった。

(2) メカノセンサーとしてのインテグリンとカベオリン-3の関与：ストレッチ刺激誘発性糖取り込みはインテグリンを阻害する RGD ペプチドにより抑制された (図 1)。また、インテグリンが機械的刺激を受容することで活性化される focal adhesion kinase (FAK) がストレッチ刺激により活性化された。さらに、FAK 阻害薬 PF-573, 228 (PF) によりストレッチ刺激誘発性糖取り込みが抑制された (図 1)。一方、カベオリン-3 ノックアウトマウスより単離したヒラメ筋においてストレッチ誘発性糖取り込みは野生型マウスのヒラメ筋に比べやや少ない傾向が認められた。これらの結果より、ストレッチ刺激は主にインテグリンにより感受され、FAK を介して細胞内に伝達されることが示唆された。

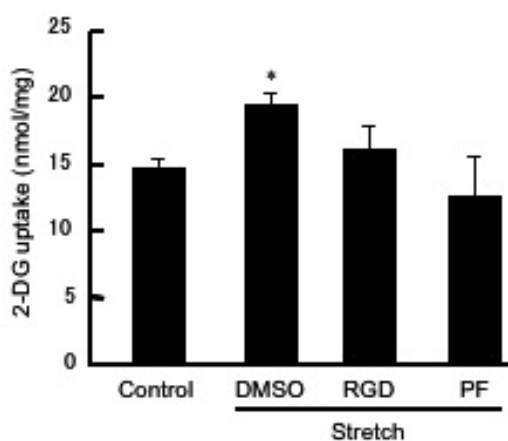


図 1 ストレッチ刺激誘発性糖取り込みに対する RGD および PF-573, 228 (PF) の作用。* $P < 0.05$ vs. without stretch.

(3) カルシウムの関与：ストレッチ刺激誘発性糖取り込みは筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離を阻害するダントロレンや、筋小胞体への Ca^{2+} 再取り込みを阻害する cyclopiazonic acid (CPA) により抑制された。また、ストレッチ刺激誘発性糖取り込みは calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) の阻害薬 KN-93 により抑制された。一方、EGTA により外液の Ca^{2+} を除去してもストレッチ刺激誘発性糖取り込みは影響されなかった。これらの結果より、ストレッチ刺激誘発性糖取り込みに、外液から流入した Ca^{2+} ではなく、筋小胞体から遊離された Ca^{2+} とそれにより活性化された CaMKII が関与する可能性が考えられる。

(4) Akt および AMPK の関与：インスリンにより Akt のリン酸化が、また、収縮により AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化が増大した。しかし、ストレッチ刺激による Akt および AMPK のリン酸化の増加は認められなかった。これらの結果より、ストレッチ刺激誘発性糖取り込みはインスリンや収縮とは異なる経路で惹起されることが示唆された。

(5) L6 筋管細胞におけるストレッチ刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化：ラット骨格筋由来培養筋芽細胞株である L6 細胞を分化させた多核筋管細胞にストレッチ刺激を加えると、一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が認められた。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は CPA により抑制されたことから、ストレッチ刺激により筋小胞体より Ca^{2+} が遊離される可能性が考えられる。

(6) L6 筋管細胞におけるストレッチ刺激による GLUT4 の細胞膜への移行：ストレッチ刺激により GLUT4 が細胞質から細胞膜へ移行した。Wortmannin はインスリンによる GLUT4 の細胞膜への移行を抑制したが、ストレッチ刺激による GLUT4 の細胞膜への移行は抑制しなかった (図 2)。この結果はストレッチ刺激誘発性糖取り込みに、インスリン経路とは異なり、

PI3-kinase/Akt 経路が関与していないことを示唆する。

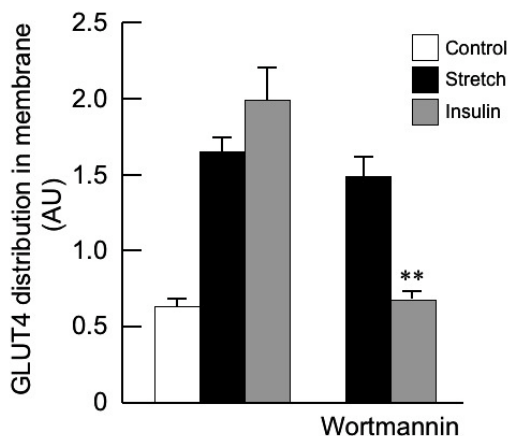


図2 ストレッチ刺激およびインスリン誘発性糖取り込みに対する wortmannin の作用. ** $P < 0.01$ vs. without wortmannin.

以上の結果より、骨格筋において、ストレッチ刺激はインテグリンにより感受され、FAK を介して細胞内に伝授されて筋小胞体から Ca^{2+} の遊離を惹起すること、また、この遊離 Ca^{2+} により CaMKII が活性化され GLUT4 の細胞膜への移行が惹起されることで糖取り込みが増加することが示唆された。さらに、ストレッチ刺激誘発性糖取り込みにはインスリンや収縮とは異なる経路が関与する可能性が考えられる。しかし、ストレッチ刺激による筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離機構は不明であり、今後の検討が必要である。

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2件)

- (1) Kazuo Obara, Kiyotaka Ukai, Tomohisa Ishikawa: Mechanism of potentiation by tea epigallocatechin of contraction in porcine coronary artery: The

role of protein kinase C δ -mediated CPI-17 phosphorylation. *European Journal of Pharmacology* 668: 414-418 (2011) 査読あり

- (2) Kazuo Obara, Ayako Mitate, Kayo Nozawa, Makiko Watanabe, Yoshihiko Ito, Koichi Nakayama: Interactive role of protein phosphatase 2A and protein kinase C α in the stretch-induced triphosphorylation of myosin light chain in canine cerebral artery. *Journal of Vascular Research* 47: 115-127 (2010) 査読あり

[学会発表] (計17件)

- (1) 小原一男: マウスヒラメ筋におけるエピガロカテキンガレートによる糖取り込みへの過酸化水素の関与について. 静岡県立大学 US フォーラム, 2011年9月27日 (静岡).
- (2) 小原一男: イヌ脳底動脈平滑筋における緑茶カテキンの収縮増強作用. 第53回日本平滑筋学会総会, 2011年8月3日 (東京).
- (3) 滝口茂幸: マウスヒラメ筋における伸展刺激誘発性糖取り込みへのインテグリン/FAK 経路の関与. 第124回日本薬理学会関東部会, 2011年6月4日 (東京).
- (4) 宇田宗晃: マウスヒラメ筋における伸展刺激誘発性糖取り込み機構. 日本薬学会第131年会. 2011年3月30日 (静岡).
- (5) 小原一男: 茶カテキンの血管平滑筋収縮増強作用における過酸化水素の役割. 筋生理の集い, 2010年12月4日 (東京).
- (6) 宇田宗晃: マウスヒラメ筋における伸展誘発性グルコース取り込み機構の解明. 平成22年度日本薬学会東海支部例会, 2010年11月28日 (静岡).
- (7) 小原一男: 人工骨格線維におけるエピガロカテキンガレートの糖取り込み作用について. 静岡県立大学 US フォーラム, 2010年8月3日 (静岡).

- (8) Koichi Nakayama: Differential role of stretch-activated molecules involved in myogenic response and cerebral vasospasm. 12th Symposium on vascular Neuroeffector mechanism, 2010年7月25日 (Odense, Denmark).
- (9) Kazuo Obara: Inhibitory role of phosphorylation of myosin light chain at threonine-9 in the mechanical activity of canine basilar artery. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology. 2010年7月20日 (Copenhagen, Denmark).
- (10) 鵜飼聖隆: ブタ冠動脈平滑筋における緑茶カテキンの収縮増強機構について. 第52回日本平滑筋学会総会, 2010年7月2日 (仙台).
- (11) 小原一男: 犬脳底動脈の伸展誘発性収縮におけるミオシン軽鎖3リン酸化の役割. 第87回日本生理学会大会, 2010年5月19日 (盛岡).
- (12) 小原一男: 血管平滑筋に対する緑茶カテキンの作用. 第39回日本心脈管作動物質学会, 2010年2月5日 (名古屋).
- (13) 小原一男: 血管平滑筋に対する茶カテキンの作用について. 筋生理の集い, 2009年12月19日 (東京).
- (14) 小原一男: 人工筋線維における糖取り込みに対するストレッチ刺激の影響について. 静岡県立大学2007USフォーラム, 2009年8月4日 (静岡).
- (15) Kazuo Obara: Involvement of protein kinase C α in the stretch-induced triphosphorylation of myosin light chain in canine cerebral artery. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009年7月31日 (京都).

(16) Kazuo Obara: Role of triphosphorylation of myosin light chain in the contraction of the canine basilar artery. Satellite Symposium of the IUPS2009, 2009年7月23日 (名古屋).

(17) 鵜飼聖隆: ブタ冠動脈平滑筋収縮に対するカテキン類の効果. 第51回日本平滑筋学会総会, 2009年7月22日 (名古屋).

[図書] (計1件)

(1) Koichi Nakayama, Kazuo Obara, Tomohisa Ishikawa, Shigeru Nishizawa: Specific Mechano-transduction signaling involved in myogenic response of the cerebral arteries. *Mechanosensitivity in Cells and Tissues. Mechano-sensitivity of the Heart*, 453-481, Springer, Dordrecht (2009).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 一男 (OBARA KAZUO)

研究者番号: 60117611