

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11466

研究課題名(和文) 糖尿病予防に向けた新規骨格筋糖代謝調節経路の解明

研究課題名(英文) New candidate for prevention of type 2 diabetes focus on skeletal muscle glucose metabolism signaling

研究代表者

佐藤 幸治 (Sato, Koji)

神戸大学・人間発達環境学研究科・准教授

研究者番号：20584022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋細胞におけるOSMRサブユニットgp130の遺伝子欠損が、インスリン刺激による糖代謝関連シグナル伝達経路および糖取り込みに及ぼす影響を検討することを目的とした。結果として、gp130欠損により、STAT 3のリン酸化が低下した。また、gp130欠損した骨格筋細胞において、細胞外のOSM濃度が有意に増加し、インスリン刺激による骨格筋糖代謝調節シグナル活性が通常、インスリン添加により亢進するのに対し、gp130欠損した細胞において有意に低下していた。これらのことから、細胞外(血中)OSM濃度の過剰な増加は、骨格筋細胞におけるインスリン作用の鈍化を引き起こす可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、運動トレーニングによる2型糖尿病予防に向けた新規骨格筋糖代謝調節経路を確立するために、OSMRサブユニットgp130の遺伝子欠損がSTAT3の活性を抑制し骨格筋糖代謝調節経路の活性を抑制するか否かを明らかにすることを目的とした。これまで、OSMの過剰発現は癌細胞の増殖や、肝疾患、自己免疫疾患の発症に関連するという報告がなされてきたが、2型糖尿病における骨格筋糖代謝不全との関連を示す研究は行われてこなかった。本研究で、新規の骨格筋糖代謝調節機構を同定し、さらに、本研究の結果から、今後、肥満症や2型糖尿病発症予防に向けた、運動・栄養介入法の分子基盤が確立される可能性がある。

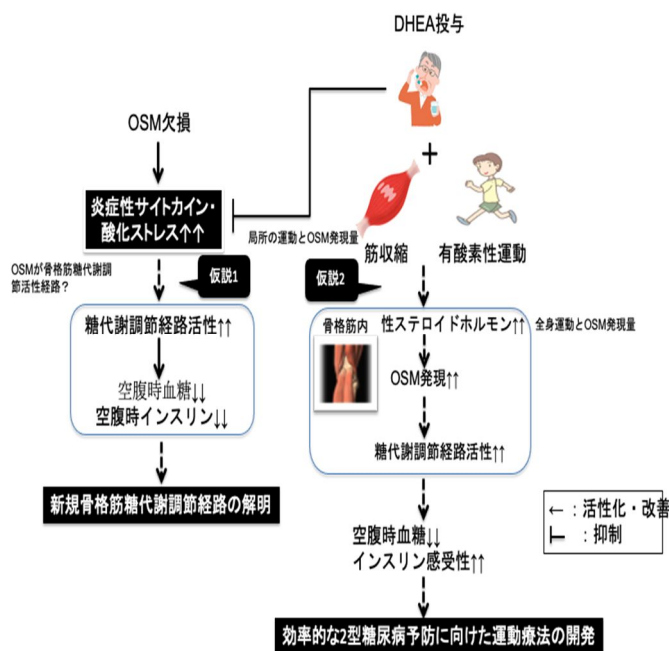
研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to investigate the effects of OSMR subunit gp130 knockdown on insulin-stimulated glucose metabolism-related signaling pathways and glucose uptake in skeletal muscle cells. siRNA-mediated gp130 knockdown was conducted in C2C12 muscle cells, and insulin was added and incubated for 1 h. The cells were cultivated to analyze the mRNA levels of gp130, phosphorylation of STAT3, and glucose metabolism-regulated signaling pathways, and OSM levels in the culture medium were analyzed. PI3-kinase activity and Akt Thr 308 phosphorylation were significantly decreased in gp130^{-/-}. The insulin-stimulated increase in glucose uptake rate was significantly attenuated in gp130^{-/-}. In the culture medium, OSM levels were significantly lower in gp130^{+/+} compared to gp130^{-/-} cell. In conclusion, the knockdown of gp130 caused a decrease in STAT 3 phosphorylation and resulted in the attenuation of insulin-mediated glucose metabolism signaling in skeletal muscle cells.

研究分野：健康科学

キーワード：糖尿病 骨格筋 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

糖尿病や肥満症の発症は、炎症マーカーの上昇、免疫機能の低下とも関連している。現在までに申請者らは、運動による骨格筋糖代謝調節にオンコスタチン M (OSM) や OSM 発現を調節しているシグナル伝達兼転写活性化因子 3 (STAT3) が関与していることも明らかにしている (Sato, unpublished data)。OSM は、抗炎症作用を持つサイトカインであり、OSM 受容体を欠損させたマウスでは、肥満症や 2 型糖尿病を発症しやすいことが解明されている (Komori et al., J Biol Chem, 2014)。また、糖尿病モデルマウスにおいて OSM を過剰発現させると、コレステロール、中性脂肪、空腹時血糖が改善することが明らかとなっている (Komori et al., Diabetologia, 2015)。したがって、抗炎症作用を有する性ステロイドホルモンの増加に伴い、OSM 発現が増加し、2 型糖尿病に由来する炎症反応を抑制することにより、糖尿病により活性が低下している骨格筋糖代謝調節を亢進する可能性があり、OSM の発現増大は、2 型糖尿病予防に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、運動トレーニングや DHEA 投与が OSM 発現に与える影響及び、OSM の増大や減少が骨格筋糖代謝調節経路に与える影響に関しては明らかとなっていない。



本研究の概要

本研究の仮説 (右図):

1. OSM 受容体の欠損が骨格筋糖代謝調節経路の不活性化に關与する
2. 性ステロイドホルモン投与及び筋収縮による OSM 発現の増大が、骨格筋糖代謝調節経路の活性化に關与する

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋培養細胞 (C2C12) を用いて、オンコスタチン M 受容体(OSMR)のサブユニットである gp130 を遺伝子導入によりノックダウンさせ、細胞外の OSM 濃度と骨格筋糖代謝調節経路活性の関連性を検討した。また、gp130 をノックダウンした骨格筋細胞にインスリン添加を行い、骨格筋糖代謝調節経路活性が抑制されるか否かを検討した。

3. 研究の方法

培養骨格筋細胞

本研究にはマウス C2C12 骨格筋細胞(American Type Culture Collection: ATCC, Manassas, VA, USA) を用い、2 日間コンフルエントに増殖させた後、フィブロネクチンでコートしたディッシュ上で、筋芽細胞をダルベッコ改変イーグル培地/ハムズ F-12 培地 (BioWest, Nuaille, France) 中で 7 日間インキュベートした。その後、細胞を分化させて筋管を発達させ、実験に使用した。7 日目、細胞は筋管を形成し、インスリン (1µg/mL; Eli Lilly, Kobe, Japan) を含む無血清培地中で 1 時間インキュベートした。

siRNA による gp130 ノックダウン

siRNA 実験は、先行研究に従って行った (Sun et al., J Lipid Res, 2017)。細胞を 6 ウェルプレートに入れ、8 μ L/ウェルの Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) または 15 μ L/ウェルの Oligofectamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) の存在下、100nmol/L の DNA メチルトランスフェラーゼと 1 種類の small interfering RNA または 100nmol/L のコントロール siRNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で処理した。培養後、培地を交換し、細胞を 4 日間増殖させてから収穫した。ノックダウン効率は qRT-PCR を用いて確認した。IL6ST (gp130) mRNA 発現の解析には、細胞株からの RNA を逆転写し、IL6ST 遺伝子のエクソン 1 から 3 にまたがるプライマー (F : 5'-ATTTGTGTGCTGAAGGAGGC-3'、R : 5'-AAAGGACAGGATGTTGCA-3') を用いて PCR により cDNA を増幅した。

イムノプロット分析

細胞を 20mM Tris-HCL (pH7.8)、300mM NaCl、2mM DTT、2% Nonident P-40、2mM EDTA、0.2% SDS、0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride、0.2% sodium deoxycholate、60 μ g/mL aprotinin、1 μ g/mL leupeptin でホモジナイズした。ホモジネートを 4°C で 30 分間回転させ、得られた上清のタンパク質濃度を測定した。その後、10 μ g のタンパク質サンプルを Laemmli バッファーで 96°C、7 分間熱変性させた。タンパク質濃度は、Bradford protein assay reagent (富士フイルム和光ケミカルズ、東京、日本) を用いて、ウシ血清アルブミンを標準物質として分析した。リン酸化 IRS-1 セリン 1101、Akt thr308、total-IRS-1、total-Akt およびリン酸化 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) タンパク質のウェスタンプロット分析は、先行研究を基に行った (Sato et al., 2008, 2009, 2014, 2017)。

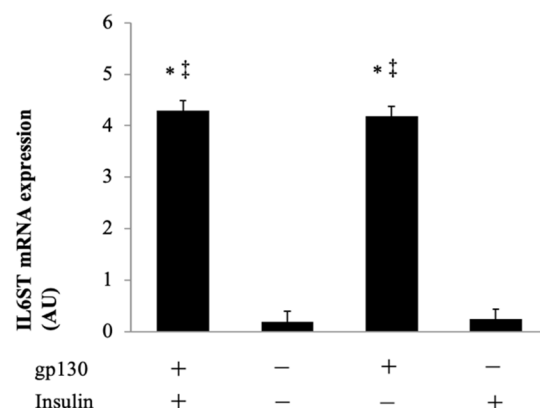
酵素免疫測定法

PI3-キナーゼ活性は ELISA キット (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA) を用いて評価した。さらに、糖取り込み解析は、先行研究 (Tucker et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2018) に従って、非ラジオアイソトープ (RI) アッセイである glucose uptake-Glo アッセイを用いて測定した。グルコース取り込みは 1 mM 2-デオキシグルコースの添加によって開始し、37°C で 20 分間放置された後、Glucose Uptake-Glo キット (Promega, Madison, WI, USA) を用いて全細胞溶解液中の細胞性 2-デオキシグルコース取り込みを測定し、製造者の指示に従って発光 (RLU) から糖取り込み速度を算出した。さらに、ELISA キット (R&D Systems Inc.) 固定化ポリクローナル抗体は OSM と IL-6 に対して用い、二次 HRP 結合抗体はモノクローナル抗体を用いた。光学濃度はマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Multiskan FC, Yokohama, Japan) を用いて 450 nm で測定した。また、全てのサンプルは二重測定を行った。

4. 研究成果

IL6ST mRNA とタンパク質の発現、および STAT 3 のリン酸化

IL6ST mRNA レベルは、コントロール (gp130+/+) と比較して、gp130 ノックダウン (gp130-/-) で有意に低下した ($P < 0.01$; 図 1)。STAT3 のリン酸化は、gp130-/- で有意に低かった ($P < 0.01$)。



糖代謝調節経路活性と糖取り込み

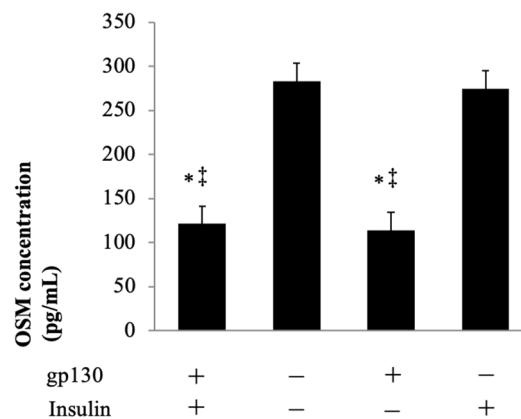
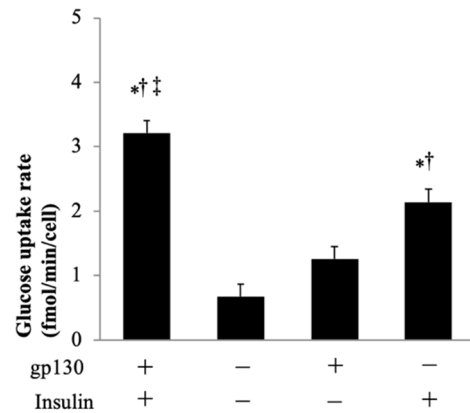
IRS-1 ser1101 のリン酸化は、インスリン刺激なしの gp130^{-/-}と gp130^{+/-}の間で有意差はなく、gp130^{+/-}の IRS-1 ser1101 のリン酸化は、gp130^{-/-}と比較してインスリン刺激により有意に増加した ($P < 0.05$)。同様に、PI3-キナーゼ活性と Akt Thr 308 リン酸化には、インスリン刺激なしの gp130^{-/-}と gp130^{+/+}の両方で有意差は見られなかった。しかし、PI3-キナーゼ活性と Akt Thr 308 リン酸化は、gp130^{+/-}に比べ、gp130^{+/+}ではインスリン刺激により有意に増加した ($P < 0.05$)。さらに、糖取り込み速度は、インスリン刺激なしのベースラインでは gp130^{-/-}でわずかに低かったが、gp130^{+/+}との差は見られなかった。インスリン刺激による糖取り込み速度の増加は、gp130^{+/+}と比較して、gp130^{-/-}細胞では有意に抑制された ($P < 0.05$; 図 2)。

細胞培養上清中の OSM と IL-6 濃度

培養上清中の OSM 濃度は、gp130^{-/-}に比べ、gp130^{+/+}で有意に低く ($P < 0.05$; 図 3)、gp130^{+/+}、gp130^{-/-}ともにインスリン刺激によって変化は見られなかった。培養上清中の IL-6 濃度は、gp130^{+/-}に比べて gp130^{+/+}で有意に高く ($P < 0.05$)。gp130^{+/-}および gp130^{-/-}ともにインスリン刺激による有意な変化は見られなかった。

本研究では、gp130 のノックダウンにより STAT 3 のリン酸化が低下し、骨格筋細胞にお

ける IRS-1Ser 1101 のリン酸化、Akt Thr 308 のリン酸化、PI3 キナーゼ活性など、インスリンを介した糖代謝調節シグナル伝達活性が低下した。さらに、この低下は、gp130 ノックダウン骨格筋細胞における糖取り込み速度の低下を引き起こした。したがって、gp130 の欠損は、細胞外 OSM を増加させ、IL-6 レベルを低下させることで、骨格筋におけるインスリン刺激による糖代謝調節シグナル伝達経路の活性化を阻害し、糖取り込みを低下させる可能性があることが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koji Sato, Kaori Seto	4. 巻 26
2. 論文標題 The effect of Dioscorea esculenta powder on prostaglandin E2 and cytochrome c oxidase subunit 2 levels, menstrual pain, and premenstrual syndrome in young women: A randomized double-blind controlled trial.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrition and Health	6. 最初と最後の頁 889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/02601060221130889.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kouhei Masumoto, Koji Sato, Kazuhiro Harada, Kenta Yamamoto, Mariko Shiozaki	4. 巻 106
2. 論文標題 Emotional valence of self-defining memories in older adults: A longitudinal study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Consciousness and Cognition	6. 最初と最後の頁 103431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.concog.2022.103431.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koji Sato, Hinata Kihara, Yoka Kumazawa, Koki Tatara	4. 巻 90
2. 論文標題 Oral chronic sulforaphane effects on heavy resistance exercise: Implications on inflammatory and muscle damage parameters in young practitioners.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 111266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nut.2021.111266.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koji Sato, Yoka Kumazawa, Tetsuya Kimura	4. 巻 1
2. 論文標題 Effects of acute aerobic exercise and menstrual cycle on immune responses in young women	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gynecological and Reproductive Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 27-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.53260/grem.223014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takumi Yokokawa, Kohei Kido, Koji Sato, Tatsuya Hayashi, Satoshi Fujita	4. 巻 11
2. 論文標題 Altered expression of synaptic proteins and adhesion molecules in the hippocampus and cortex following the onset of diabetes in nonobese diabetic mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.15673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 幸治
2. 発表標題 1型糖尿病における中強度運動による遅発性低血糖の発症機序
3. 学会等名 第77回日本体力医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 幸治
2. 発表標題 1型糖尿病患者における運動による遅発性低血糖発症機序と予防に向けた栄養介入
3. 学会等名 日本スポーツ栄養学会 第9回大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 幸治
2. 発表標題 運動・栄養による中高齢者の肥満・糖尿病予防に向けた基礎的研究
3. 学会等名 京都滋賀体育学会第153回大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤 幸治
2. 発表標題 肥満を基盤とする代謝性疾患予防に向けた新たな 運動療法・栄養介入の可能性
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0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
研究協力者	藤田 聡 (Fujita Satoshi) (80451863)	立命館大学・スポーツ健康科学部・教授 (34315)	
研究協力者	木戸 康平 (Kido Kohei) (50822730)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員 (82626)	

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