

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350908

研究課題名(和文) 不活動が骨格筋インスリン抵抗性を引き起こす機序

研究課題名(英文) The mechanism by which physical inactivity induces insulin resistance in skeletal muscle

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：「立つ・歩く」などの日常生活活動の減少、すなわち、「不活動」は骨格筋のインスリン抵抗性を引き起こし、糖尿病の原因となる。本研究では、ラットのギブス固定モデルを用いて、不活動誘発性インスリン抵抗性の仕組みについて検討した。その結果、不活動はいくつかの炎症性シグナル(JNK, p38MAPキナーゼ)の活性化を介してインスリン抵抗性を引き起こす可能性が明らかになった。また、不活動にともなってthioredoxin-interacting protein (TXNIP)などの遺伝子発現が増加するが、これらによってインスリン抵抗性が引き起こされる可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Prolonged physical inactivity induces insulin resistance in skeletal muscles. In the present study, we examined the mechanisms of the inactivity-induced development of muscle insulin resistance by using rat unilateral hindlimb immobilization model. We found evidence suggesting that inactivity-induced muscle insulin resistance is related to reduced AS160 phosphorylation and enhanced activation of the proinflammatory/stress pathways, i.e. JNK and/or p38 MAPK pathway. In addition, our results showed that inactivity-induced muscle insulin resistance is not due to the reduced mechanical stress. Moreover, in the present study, mRNA expression of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) that is known to be associated with insulin resistance was increased in immobilized inactive muscle. It may suggest the possibility that increased expression of TXNIP is involved in inactivity-induced muscle insulin resistance.

研究分野：運動生化学

キーワード：骨格筋 糖取り込み 不活動 ストレッチ インスリン抵抗性 JNK p38 MAPK TXNIP

1. 研究開始当初の背景

運動は骨格筋のインスリン感受性を上昇させる。この仕組みについては、運動にともなった筋内エネルギーレベルの低下によって活性化される AMPK が重要な役割を果たしていることが知られている。

一方、“立つ・歩く”などの運動以外の日常的身体活動 (nonexercise activity thermogenesis: NEAT)の減少、すなわち、“不活動”は筋のインスリン感受性を低下させる。つまり、不活動は骨格筋にインスリン抵抗性を誘発する。しかし、不活動は運動の鏡像現象ではなく、運動とは異なる不活動特異的な機序が存在する可能性がある。

2. 研究の目的

骨格筋における不活動誘発性インスリン抵抗性の分子機序を明らかにすることを目的として本研究を実施した。具体的には、1)インスリン情報伝達経路の不全、2)筋への機械的刺激(メカニカルストレス)の減少、そして、3)炎症性シグナリングの活性化が不活動誘発性インスリン抵抗性を引き起こす可能性について検討した。さらに、4)不活動特異的に発現が増加する遺伝子を探索して、その遺伝子がインスリン抵抗性に関与している可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 不活動実験のプロトコール

4週齢の雄性ラットについて片側のみの下肢にギブスを装着して固定した。非ギブス固定脚は対照脚とした。ギブス固定は足関節角度 160°の底屈位(底屈固定)もしくは足関節角度 50°の背屈位(背屈固定)で行った。ギブス装着後は通常ケージで飼育した。ギブス装着から6時間経過した後、両脚のヒラメ筋を摘出した。摘出した筋は糖取り込み、各種情報伝達物質の発現量やリン酸化レベルの測定に用いた。

(2) 糖取り込み解析

摘出筋をプラスチック内の Krebs Hensleit 緩

衝液中に浸しながらインスリン(0, 50, 10000 μ U/mL)で刺激した後に、2-deoxyglucose(非代謝性グルコース)の取り込み速度を評価した。

(3) ウェスタンブロットング解析

摘出された筋についてホモジナイズ後に可溶性処理を施した。サンプルを SDS ポリアクリルアミド電気泳動に流して分子量によって分けた後、PVDF 膜への電氣的転写を行った。PVDF 膜上の各種情報伝達酵素発現量とそのリン酸化レベルについて特異的抗体を用いて定量した。

4. 研究成果

(1) 基礎状態における AS160 リン酸化レベルの低下が、不活動誘発性インスリン抵抗性に関与する可能性

ラットの片脚下肢を足関節角度 160°の底屈位で6時間ギブス固定(底屈固定)した。不活動状態におかれた固定脚のヒラメ筋におけるインスリン刺激時(50ならびに 10000 μ U/mL)の糖取り込み速度は、対側の非固定脚の筋に比較して 57%および 28%低下した(図 1)。また、インスリンで刺激しない場合の基礎状態における糖取り込み速度も 72%減少した。固定脚の筋では GLUT4 タンパク質発現量の減少はみられなかった(図 2)、インスリン抵抗性は筋細胞に発現している GLUT4 総量の減少によっては説明できない。一方、固定脚の筋では、インスリン刺激による Akt キナーゼの Thr637 残基リン酸化レベル(Akt の活性指標)が低下した(図 3A)。これが不活動誘発性インスリン抵抗性に関与する可能性が考えられる。

また、基礎状態における AS160 の Thr637 残基リン酸化レベルが減少した(図 3B)。AS160 は GLUT4 を細胞内部に繋ぎ止めるアンカーの役割を果たしている。そして、AS160 がリン酸化されることで GLUT4 へのアンカー作用が低下して、インスリン刺激時に GLUT4 がトランスロケーションしやすく

なる。しかし、固定脚の不活動筋では基礎状態の AS160 リン酸化が低下しているため、GLUT4 を繋ぎ止めるアンカー作用が高まる。これによって、インスリン刺激時の GLUT4 トランスロケーションに抵抗性が生じた可能性が考えられる。

また、TBC1D1 は AS160 と同様に GLUT4 を細胞内部に繋ぎ止める働きをしているが、インスリン非依存的な GLUT4 トランスロケーションに関与している。固定脚の筋では TBC1D1 のリン酸化レベルが低下しており (図 3C)、これがインスリン非依存的な基礎状態における糖取り込み低下に関与する可能性が考えられる。

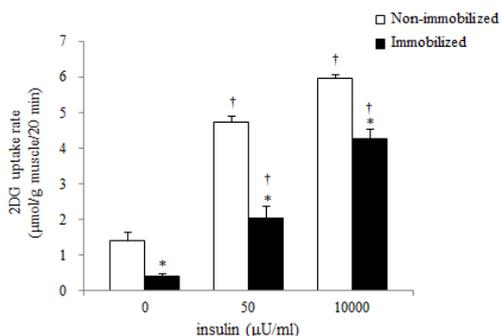


図1: ギプス固定がラットヒラメ筋の糖取り込み速度に及ぼす影響
ラットの片側下肢に足関節角度160°の底屈位で6時間のギプス固定を施した。両脚のヒラメ筋を摘出して、基礎状態ならびにインスリン濃度(50, 10000μU/ml)で刺激した際の糖取り込み速度を非代謝性グルコース2-deoxyglucose (2DG)を用いて測定した。値は平均値±標準誤差 (n=5-6)。*p<0.05 vs. Non-immobilized, †p<0.05 vs. 0μU/ml insulin

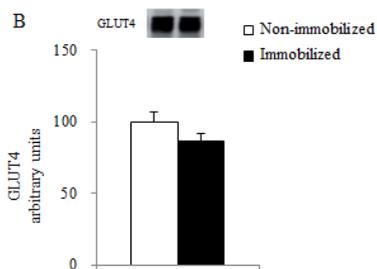


図2: ギプス固定がラットヒラメ筋の GLUT4タンパク質発現に及ぼす影響
ラットの片側下肢に足関節角度160°の底屈位で6時間のギプス固定を施した。両脚のヒラメ筋を摘出して、特異的抗体を用いて GLUT4タンパク質発現レベルを測定した。値は平均値±標準誤差 (n=8)

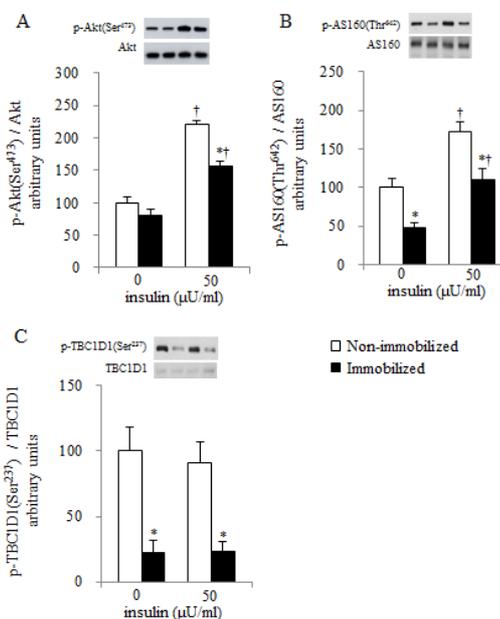


図3: ギプス固定がラットヒラメ筋のAkt, AS160ならびにTBC1D1リン酸化状態に及ぼす影響
ラットの片側下肢に足関節角度160°の底屈位で6時間のギプス固定を施した。両脚のヒラメ筋を摘出して、基礎状態ならびにインスリン(50, μU/ml)で刺激した際の情報伝達物質のリン酸化状態を特異的抗体を用いて測定した。値は平均値±標準誤差 (n=7-9)。*p<0.05 vs. Non-immobilized, †p<0.05 vs. 0μU/ml insulin

(2) 不活動にともなった筋への機械刺激(ストレッチ)の減少はインスリン抵抗性の原因ではない

下肢を足関節角度160°の底屈位でギプス固定(底屈固定)すると、ヒラメ筋は短縮状態で固定されるので能動的に筋収縮できないだけでなくストレッチによる機械刺激を失う。この機械刺激の減少が不活動誘発性インスリン抵抗性の原因となる可能性が推察される。もし、この推察が正しならば、足関節50°の背屈位でギプス固定(背屈固定)することによって、不活動状態にあるヒラメ筋にストレッチを加えて機械刺激を与えればインスリン抵抗性を防止できるはずだ。しかし、6時間の底屈固定と背屈固定による影響を比較したところ、インスリン刺激による糖取り込み速度に差はみられなかった(図4)。つまり、機械刺激を加えても不活動誘発性インスリン抵抗性を防止することはできなかった。したがって、不活動誘発性インスリン抵抗性は筋への機械刺激の減少ではなく、筋収縮量自体の減少によると推測できる。

ところで、インスリンで刺激しない基礎状

態における糖取り込みは背屈固定された筋において、底屈固定された筋よりも高かった(図4)。すなわち、不活動筋における基礎状態の糖取り込み低下をストレッチは一部防止できると考えられる。

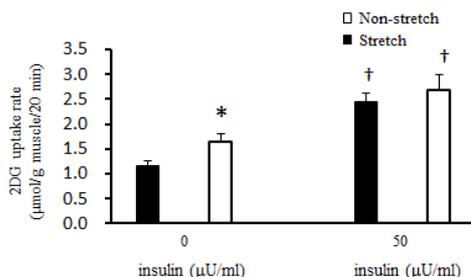


図4: 伸展固定がラットヒラメ筋の糖取り込み速度に及ぼす影響
ラットの片側下腿には足関節角度160°の底屈位で、対側の下腿は足関節50°の背屈位で6時間のギプス固定を施した。両脚のヒラメ筋を摘出して、基礎状態ならびにインスリン(50µU/ml)で刺激した際の糖取り込み速度を非代謝性グルコース2-deoxyglucose (2DG)を用いて測定した。値は平均値±標準誤差 (n=9-12)。*p<0.05 vs. stretch, †p<0.05 vs. 0µU/ml insulin

(3) JNK ならびに p38 などの炎症性シグナリング活性化が、不活動誘発性インスリン抵抗性に関与する可能性

JunN末端キナーゼ(JNK)、p38MAPキナーゼ(p38)、細胞外調節キナーゼ(ERK)、IkBキナーゼ(IKK)などの炎症性シグナリングが活性化されることがインスリン抵抗性の原因になることが報告されている。そこでこれらの炎症性シグナリング活性化が、不活動誘発性インスリン抵抗性に関与している可能性を検討した。ラットの片脚下肢を足関節角度160°の底屈位で6時間に亘ってギプス固定(底屈固定)すると、固定脚の不活動筋ではインスリン抵抗性が生じるとともに、JNKやp38のリン酸化(活性化の指標)が3倍以上に増加した(図5)。さらに、ギプスを解除すると6時間以内に低下した糖取り込み速度は元のレベルに回復するが、上昇したJNKやp38の活性も元のレベルに回復した。このことは、ギプス固定された不活動筋においてJNKやp38の活性が上昇することがインスリン抵抗性を引き起こす可能性を示唆する。一方、ギプス固定によってERKリン酸化やIkBタンパク質含量(IKK活性の指標)に変化はみられなかった(図6)。

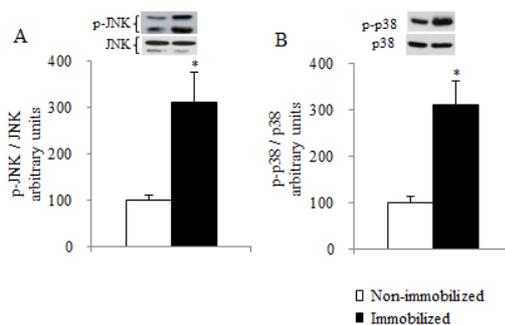


図5: ギプス固定がラットヒラメ筋のJNKならびにp38MAPKリン酸化状態に及ぼす影響
ラットの片側下腿に足関節角度160°の底屈位で6時間のギプス固定を施した。両脚のヒラメ筋を摘出して、基礎状態における炎症性シグナリングのリン酸化状態を特異的抗体を用いて測定した。値は平均値±標準誤差 (n=7-8)。
*p<0.05 vs. Non-immobilized

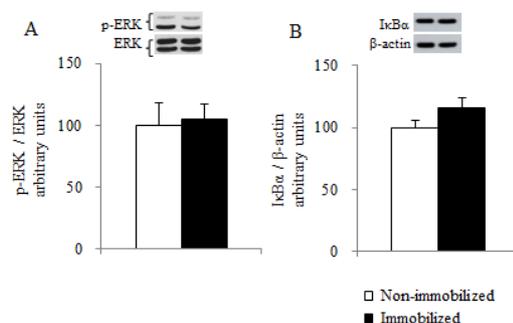


図6: ギプス固定がラットヒラメ筋のERKリン酸化ならびにIkBαタンパク質発現量に及ぼす影響
ラットの片側下腿に足関節角度160°の底屈位で6時間のギプス固定を施した。両脚のヒラメ筋を摘出して、基礎状態における炎症性シグナリングのリン酸化ならびにタンパク質発現量を特異的抗体を用いて測定した。値は平均値±標準誤差 (n=7-8)。
*p<0.05 vs. Non-immobilized

(4) TXNIP の遺伝子発現上昇が、不活動誘発性インスリン抵抗性に関与する可能性

我々は、「実験動物に転写阻害剤(アクチノマイシンD)を投与することで、不活動誘発性インスリン抵抗性を防止できる」との予備実験結果を得ている。つまり、不活動由来に何らかの遺伝子発現が引き起こされ、その遺伝子産物が筋のインスリン抵抗性を引き起こしている可能性がある。そこで、ほぼ全ての遺伝子発現状態を同時観察できるDNAマイクロアレイ(Affymetrix社製、Rat Genome 230 2.0)を用いて、底屈位のギプス固定を施した脚の不活動筋でmRNA発現が増加している遺伝子を網羅的に解析した。18種類の遺伝子についてmRNA発現量が2.5倍以上増加していたが、そのなかには、炎症性サイトカインであるCXCL1やCXCL2ケモカインが含まれていた。この遺伝子発現の結果から、

不活動由来に骨格筋では炎症性サイトカインの遺伝子発現が増加し、それ由来に JNK が活性化されることが、インスリン抵抗性の原因になるとの可能性が示唆できる。

また、以前、我々は、骨格筋内に過剰のグルコースが流入すると何らかの遺伝子発現が惹起され、その結果、インスリン抵抗性が生じることを報告している。過剰なグルコースが流入した筋において発現が増加する遺伝子のうち、thioredoxin-interacting protein (TXNIP) の mRNA 発現はギブス固定された筋でも 1.7 倍に増加していた。TXNIP は高脂肪食によって惹起されるインスリン抵抗性にも関係していることが報告されており、今後、この遺伝子と不活動誘発性インスリン抵抗性の因果関係について検討すると新たな課題を得ることができた。

(5) まとめ

本研究では、ラット片脚をギブス固定して不活動状態にするモデルを用いて、骨格筋における不活動誘発性インスリン抵抗性の分子機序を検討した。その結果、AS160 リン酸化レベルの低下、炎症性シグナリングである JNK ならびに p38 の活性化が、不活動誘発性インスリン抵抗性に関与する可能性が示された。また、不活動にともなった筋への機械的刺激(メカニカルストレス)の減少はインスリン抵抗性の原因にはならないことが示された。さらに、TXNIP の遺伝子発現上昇が、不活動誘発性インスリン抵抗性に関与する可能性も示された。

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3件)

- 1) 川中健太郎：活動の源となる糖．子どもと発育発達．第12巻、97～103頁、2014年 査読無し
- 2) Iwabe M, Kawamoto E, Koshinaka K,

Kawanaka K. Increased postexercise insulin sensitivity is accompanied by increased AS160 phosphorylation in slow-twitch soleus muscle. *Physiol. Rep.* 2014; 2: e12162 査読有り

- 3) Koshinaka K, Kawamoto E, Abe N, Toshinai K, Nakazato M, Kawanaka K. Elevation of muscle temperature stimulates muscle glucose uptake in vivo and in vitro. *J. Physiol. Sci.* 2013; 63: 409-418. 査読有り

[学会発表](計8件)

- 1) 増田紘之、吉村達彦、飯澤拓樹、川中健太郎．LT 強度未満の低強度運動は、ラットのヒラメ筋における AMPK 及び p38 を活性化させる．第70回日本体力医学会大会(和歌山)，2015.9.18-20.
- 2) 阿部夏希、安藤理恵、川中健太郎．身体トレーニングがラットの非運動性身体活動量に及ぼす影響．第69回日本体力医学会大会(長崎)，2014.9.19-21.
- 3) 河本絵美、越中敬一、吉村達彦、川中健太郎．不活動誘発性骨格筋インスリン抵抗性は JNK の活性化にともなって引き起こされる．第69回日本体力医学会大会(長崎)，2014.9.19-21.
- 4) 吉村達彦、川中健太郎．運動とインスリンが脳の糖取り込みに及ぼす影響．第69回日本体力医学会大会(長崎)，2014.9.19-21.
- 5) 吉村達彦、越中敬一、川中健太郎．非放射性グルコースアナログを用いた脳の糖取り込み測定法．第6回 脳・神経・内分泌系から運動の意義を考える会(東京) 2013.9.20.
- 6) 川中健太郎、岩部万衣子、星野英美、阿部夏希、河本絵美、越中敬一．ラットヒラメ筋における運動後のインスリン感受性上昇の機序．第68回日本体力

- 医学会大会（東京）、2013.9.21-23.
- 7) 川中健太郎、岩部万衣子、星野芙美、阿部夏希、河本絵美、越中敬一．ラットヒラメ筋における運動後のインスリン感受性上昇の機序．第68回日本体力医学会大会（東京）、2013.9.21-23.
- 8) 吉村達彦、越中敬一、川中健太郎．非放射性グルコースアナログを用いた脳の糖取り込み測定法．第6回 脳・神経・内分泌系から運動の意義を考える会（東京）、2013.9.20.
- 9) 川中健太郎．運動が骨格筋の血糖代謝機能を上昇させる機序．日本応用糖質科学会東日本支部シンポジウム（東京）、2013.7.25
- 10) 阿部夏希、河本絵美、越中敬一、川中健太郎．高脂肪食が誘発する内臓脂肪蓄積を高強度運動が防止する仕組み．第67回日本栄養・食糧学会大会（名古屋）、2013.5.25.

〔図書〕(計1件)

- 1) 川中健太郎(他34名、分担執筆)：運動生理学20講．東京：朝倉書店；2015年．

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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) (1)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

(2)研究分担者

河本 絵美 (KAWAMOTO Emi)
長岡工業高等専門学校・准教授
研究者番号：40634514