

博士論文

運動によるインスリン抵抗性改善作用に関与する
シグナル伝達経路の解明

梅松 瞳

目次

要旨	p.3
序論	p.4-8
方法	p.9-14
結果	p.15-25
考察	p.26-31
引用文献	p.32-38
Figure Legends	p.39-44
謝辞	p.45
図	p.46-64

要旨

運動は2型糖尿病の治療法として重要であるが、その分子メカニズムについて明らかになっていないことが多い。

今回、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの解析により、CaMKKsの糖代謝に与える影響と運動による糖代謝改善メカニズムの解析を行った。

運動による糖代謝改善メカニズムの一部に、CaMKKsとマイオカインの一つとされているExercise-induced protein derived from muscle 1 (EXPM1)が関与している可能性が示唆された。

序論

世界で糖尿病患者数は年々増加の一途を辿っており、2014年の統計では18歳以上の成人の約9%が糖尿病を有すると推定されている¹。日本においても、糖尿病有病者（HbA1c 6.5%以上であるか²、糖尿病の治療を受けている者）の割合は、男性16.2%、女性9.2%であり、糖尿病有病者は増加傾向にある³。

糖尿病治療が世界的にも重要な課題となる理由の一つとして、糖尿病による合併症を挙げることができる。糖尿病の三大合併症として、網膜症、腎症、神経障害といった細小血管障害が知られているが、糖尿病による細小血管障害の抑制には血糖コントロールが重要であり、さらに、血糖コントロールが良好であるほど合併症の発症は抑制される^{4,5}。また、糖尿病は心血管障害のリスクの一つであることも明らかになっている⁶。さらに、血管障害にとどまらず、国内外からの報告のメタアナリシスの結果では、糖尿病は男性で1.14倍、女性で1.18倍の癌リスク上昇と関連していることも明らかになった⁷。これら合併症の結果もあり、日本人糖尿病患者の寿命は、糖尿病を有しない人と比較し、男性で約10歳、女性で約13歳、短縮することが明らかになっている⁸。

2型糖尿病の発症原因としては、遺伝素因と環境因子に分けることができる。日本人の2型糖尿病の発症・進行に関連した遺伝子多型は複数報告されている^{9,10}。一方で、環境因子としては食生活の欧米化（動物性高脂肪・高タン

パク食)に加え、運動不足を挙げることができる。実際に、日本人の歩数の平均値はこの10年間でさらに減少傾向にあり、このことから運動が不足している生活習慣に変化していることが分かり、結果として日本人男性の肥満者の割合は28.6%、女性は20.3%と過去20年で増加している³。

また大規模臨床試験では運動療法の有用性が示されている。Da Qing IGT and Diabetes Studyは、耐糖能異常患者において、食事療法、運動療法、またその併用は2型糖尿病発症を減少させ、生活習慣の改善が糖尿病発症予防に有効であることを示した¹¹。また、米国糖尿病予防プログラム・Diabetes Prevention Program (DPP)では、食事指導・運動指導による生活習慣介入により2型糖尿病の発症リスクは58%減少した¹²。また、同試験において、糖尿病治療薬の1つでAMP-activated protein kinase (AMPK)を活性化することでも知られているメトホルミンは2型糖尿病の発症リスクを31%低下させることが報告されている¹²。また、メトホルミンは2型糖尿病患者において、癌を抑制する可能性も指摘されている¹³。さらに、Look AHEAD studyでは、2型糖尿病患者において、食事・運動に関するライフスタイルへの介入を行うことにより、体重、運動耐容能、血糖コントロール、心血管イベントリスク因子の持続的な改善が得られることを明らかにした¹⁴。

このように、運動が糖尿病の発症および進行を予防することが複数の大

規模臨床試験で示され、運動療法は食事療法・薬物療法と並ぶ、2型糖尿病の治療法の一つとなっている。その効果は、生理学的に、運動の急性効果と慢性効果に分類することができる。運動中から運動直後数時間までの血糖値の降下は、運動の急性効果とされる。運動により骨格筋が収縮すると、アデノシン三リン酸（ATP）が消費され、アデノシン一リン酸（AMP）が増加し、AMP/ATP比が上昇し、AMPKが活性化される。活性化したAMPKはグルコース輸送体の一つであるglucose transporter 4（GLUT4）のトランスロケーションを誘導し、インスリン非依存的に骨格筋における糖取り込みを促進する¹⁵（図1）。このような運動の急性効果は運動中が最も顕著であり、その後48時間でその効果は消失してしまうため、実際の運動療法の効果としては、運動の慢性効果も非常に重要である。

運動の慢性効果の一つとしては、筋繊維の変化を挙げることができる。骨格筋は筋繊維と結合組織から構成されているが、筋繊維はType 1 fiber、Type 2a fiber、Type 2d/x fiber、Type 2b fiberに分類される。Type 1 fiberはミトコンドリアが豊富であり、乳酸の酸化ポテンシャルが高く、持久力に優れ、“遅筋繊維”と呼ばれる。一方で、Type 2 fiberは、解糖系を利用し、速い収縮に強いが、持久力で劣るといった特徴を持ち、“速筋繊維”と呼ばれる¹⁶。ヒトが有酸素運動のような持久運動を行うと、Type 2 fiberでの筋繊維内でのミトコンドリア含有量

が変化した結果、酸化ポテンシャルが増加し、Type 1 fiber への移行が生じる。

結果として、Type 1 fiber の割合が増加する¹⁷。

一方、2型糖尿病患者では、Type 2 fiber の割合が高く、Type 1 fiber の割合が低下している¹⁸。したがって、有酸素運動を持続的に行い、Type 1 fiber の割合を増加させることは、糖代謝改善の手段となる。

筋繊維タイプの移行やミトコンドリアの生合成を制御する重要な分子として、転写コアクティベーターである peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) が知られている^{19,20}。PGC-1 α は褐色脂肪や骨格筋（その中でも Type 1 fiber）に多く発現し、ミトコンドリア生合成や酸化代謝を活性化する¹⁹。また、PGC-1 α は持続的な運動で増加する。また、骨格筋で PGC-1 α を過剰発現したマウスでは、Type 1 fiber に特徴的な Troponin 1 や myoglobin が増加しており、ミトコンドリア量が増加し、最終的にはインスリン抵抗性を改善することが分かっている²¹（図 1）。

非常に重要なポイントは、AMPK の活性化や PGC-1 α の発現増加には、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) が重要な役割を果たしていることが明らかになっているが^{22,23}、骨格筋における CaMKKs の役割は未だ明らかになっていないことが多い。

また、近年、運動刺激により骨格筋から分泌される因子が他の臓器に作

用し、全身に様々な効果をもたらす可能性が示唆されている²⁴。このような分泌される因子はマイオカインと総称されているが、マイオカインの骨格筋での発現増加メカニズムや各組織に与える影響についても、解明されていない点が多い。

そこで、今回、CaMKK の二つのアイソフォームである、CaMKK α とCaMKK β の両方が欠損した CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスを用いて、CaMKKs の糖代謝に与える影響と運動による糖代謝改善メカニズムの解明を行った。

方法

動物

全ての実験は、東京大学動物実験実施規則、及び東京大学動物実験実施マニュアルに沿って行った。実験時、6-14 週齢のマウスを用いた。マウスは 22°C に管理された部屋で飼育し、12 時間ずつ明暗期を設けた。飼料は普通食（CE2、日本クレア）（組成：24.9%（重量）タンパク質、4.1%繊維、6.6%灰分、51%炭水化物、4.6%脂肪、8.9%水分）もしくは、高脂肪食（High Fat Diet 32、日本クレア）（組成：25.5%タンパク質、2.9%繊維、4.0%灰分、29.4%炭水化物、32%脂肪、6.2%水分）を用い、水、飼料ともに自由摂取とした。高脂肪食群では、高脂肪食を 2-4 週間負荷した。

5-8 週齢のオスの C57BL/6J マウスおよび 6 週齢のオスの db/db マウスは日本チャールズ・リバーより購入した。

CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス (*Camkk1^{-/-}Camkk2^{-/-}*) マウスの作製

Talal Chatila 研究室で作製されたオリジナルの *Camkk1^{+/-}Camkk2^{+/-}* マウスを C57BL/6J と 7 回戻し交配させた^{25,26}。全実験において、オスの同腹仔を用いた。

トレッドミル運動

トレッドミル運動は 10 度の傾斜をつけ、分速 15 m の運動を 50 分間、連続 3 週間施行した。トレッドミルは MK-690/8MDMD (室町機械) を使用した。運動距離・電気ショックの回数はトレッドミルの装置により測定した。運動耐容能は 50 分間の走行中に電気ショックを避けることができなかつた回数で割り計算した。

経口糖負荷試験

9 時間の絶食後、生理食塩水に溶解した D(+)-グルコース (WAKO) をマウス体重 1 kg あたり 1.5 g 単回経口投与した。投与前と投与 15、30、60、120 分後に採血を行い、血糖測定器 (グルテスト Pro、三和化学) により血糖値を測定した。

インスリン測定

経口糖負荷試験における投与前と投与 15、30 分後の血清を用い、レビス インスリン-マウス TELISA キット (シバヤギ) を用いて測定した。

インスリン抵抗性指数

経口糖負荷試験の血糖値とインスリン値より、血糖値(1 mg/ml = 1 cm)、インスリン値 (1 ng/ml = 1 cm)、また時間 (1 分 = 1 cm) として血糖値一時間曲線下面積を計算した。結果は野生型マウスの非運動群の値を 100%としたときの値を算出した。

インスリン負荷試験

3 時間の絶食後、生理食塩水に溶解した速効型インスリン ヒューマリンR(イーライリリー)をマウス体重 1 kg あたり 0.5 単位単回腹腔内投与した。投与前と投与前 0、20、40、60、80、100 分後に採血を行い、血糖測定器 (グルテスト Pro、三和化学) により血糖値を測定した。

グラフにおける、血糖値と時間を血糖値 (1 mg/ml = 1 cm) と時間 (1 分 = 1 cm) として血糖値一時間曲線下面積を計算した。結果は野生型マウスの非運動群の値を 100%としたときの値を算出した。

解剖

4 時間絶食後、解剖を行い、採取した組織は直ちに液体窒素に入れて凍結させた。脳は、全脳を摘出し、その全てを RNA 抽出に用いた。肝臓は、全肝を摘出した後、肝左葉の一部を切離したものを RNA 抽出に用いた。白色脂肪組

織は左右の精巣周囲脂肪組織から採取し、片側から採取したものを RNA 抽出に用いた。褐色脂肪組織は肩甲骨間の左右の褐色脂肪組織を採取し、そのうち片側から採取したものを RNA 抽出に用いた。骨格筋は左右の腓腹筋・ヒラメ筋を採取し、そのうち片側の腓腹筋を RNA 抽出に用いた。心臓・膵臓・脾臓は一塊に採取し、その全てを RNA 抽出に用いた。肺・腎臓は左右の臓器を摘出し、そのうち片側を RNA 抽出に用いた。

RNA 抽出および定量的 RT-PCR

組織は採取後速やかに液体窒素に入れ、凍結した臓器の一部を Isogen (日本ジーン) 液中に浸し、ポリトロンにてホモジナイズを行った。その後、クロロホルムを加えて遠心し、水層を回収した。これにイソプロパノールを加えて遠心し、得られた沈殿に 70% エタノールを加えた上でさらに遠心を行い、沈殿を RNase DNase free 水で溶解した。吸光度による定量の上で RQ1 RNase-free DNase (Promega) により DNase 処理を行い、RNA を抽出した。逆転写反応は、Random Hexamer (Applied Biosystems) および MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems) によって得られた cDNA を用いて行った。定量的 RT-PCR は Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、50°C 2 分、95°C 10 分、40 サイクルの 95°C 15 秒、60°C 1 分の条件で ABI Prism 7900 PCR

instrument (Applied Biosystems) にて行った。プライマーは Taqman® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用いた。発現量は、内在性コントロールとして Cyclophilin、18S rRNA の発現量により相対補正をした。

Ppia (Cyclophilin) : forward primer, 5'- GGTCCTGGCATCTTGTCCAT -3'

reverse primer, 5' - CAGTCTTGGCAGTGCAGATAAAA -3'

probe, 5' - CTGGACCAAACACAAACGGTTCCCA -3'

使用した Taqman probe は以下の通りである。

Rn18s (18S rRNA) ; Mm03928990_g1

Ppargc1a (PGC-1 α) ; Mm00447183_m1

Esrra (ERR α) ; Mm00433143_m1

Acadm (MCAD) ; Mm00431611_m1

mt-Co2 (COX2) ; Mm03294838_g1

Tnni1 (Troponin I) ; Mm00502426_m1

Il6 (IL-6) ; Mm00446190_m1

Fam132b (EXPM1) ; Mm00557748_m1

Pck1 (PEPCK) ; Mm00440636_m1

G6pc (G6Pase) ; Mm00839363_m1

細胞培養

マウス C2C12 myoblasts (ATCC® CRL-1772™) は、10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) を含む、90% Dulbecco's modified high glucose Eagle's medium (DMEM) で 37°C にて培養した。細胞が 80% コンフルエントになった時点で、分化維持培地 (98% DMEM, 2.5% (v/v) horse serum) に交換することにより、myocytes から myotubes への分化誘導を行った。以降、72 時間毎に分化維持培地を交換した。分化誘導 5 日目には、細胞は多核の myotubes へ分化した。

FaO 細胞 (ATCC® CRL-1578™) は、10% (v/v) FBS を含む、Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 で 37°C にて培養した。以降、48 時間毎に維持培地を交換した。血清を含まない 100% RPMI 1640 に交換し、37°C 条件下に 8 時間インキュベーションした後、full-length recombinant EXPM1 (Aviscera Bioscience) を Fao 細胞へ添加し、4 時間後に細胞を回収した。

統計学的解析

結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。2 群間の比較における有意差は Student の t 検定によって検定し、多群比較における有意差は分散分析 (analysis of variance : ANOVA) を行った上で、tukey kramer 法にて post hoc 検定を行った。

結果

野生型マウスと比べて **CaMKK α · CaMKK β** ダブル欠損マウスの摂餌量・体重に差を認めなかった

運動による糖代謝改善作用を検討するために、野生型マウスおよび **CaMKK α · CaMKK β** ダブル欠損マウスそれぞれに 3 週間のトレッドミル運動を行った。**CaMKK α · CaMKK β** ダブル欠損マウスは野生型マウスと比較し、運動耐容能に有意差は認められなかった (図 2A)。また、トレッドミル運動での走行距離に差を認めず (図 2B)、運動負荷量は同じ条件のもと評価を行った。

CaMKK α · CaMKK β ダブル欠損マウスは野生型マウスと比較し、摂餌量に差はなかった (図 3A)。さらに、野生型マウスの非運動群と運動群、**CaMKK α · CaMKK β** ダブル欠損マウスの非運動群と運動群のそれぞれの摂餌量に差はなかった (図 3A)。

また、野生型マウスと **CaMKK α · CaMKK β** ダブル欠損マウスに体重差は認められなかった (図 3B)。さらに、運動開始後 3 週間でも、それぞれの非運動群と運動群の間にも体重の有意な差は認めなかった (図 3B)。

野生型マウスでは運動により耐糖能障害が改善したが、**CaMKK α · CaMKK β** ダブル欠損マウスでは運動による耐糖能障害の改善は認められなかった

続いて、運動による耐糖能障害改善作用を検討するために、経口血糖負荷試験を行った。野生型マウスでは、運動群は非運動群に比べ、空腹時血糖値、糖負荷後血糖値ともに改善していた（図 4A）。しかし、空腹時および糖負荷後のインスリン値に差は認めなかった（図 4B）。

一方、大変興味深いことに、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは、運動群と非運動群の間に、空腹時血糖値および糖負荷後血糖値の有意な差を認めず（図 5A）、また、空腹時および糖負荷後のインスリン値にも差はなかった（図 5B）。

さらに、経口血糖負荷試験の血糖値とインスリン値よりインスリン抵抗性を評価した。野生型マウスと比較し CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスではインスリンレジスタンスインデックスが有意に上昇しており、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスはインスリン抵抗性を有することが明らかになった（図 6）。また、野生型マウスでは運動によりインスリン抵抗性が改善したが（図 6）、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは、非運動群と運動群の間に差はなく、野生型マウスで認められた運動によるインスリン抵抗性の改善が認められなかった。

そこで、インスリンに対する感受性を検討するために、インスリン負荷試験を行ったところ、野生型マウスでは、運動群では、インスリンによる血糖

降下作用が増強しており、インスリン抵抗性が改善していることが分かった (図 7A)。一方で、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは、運動によるインスリン抵抗性の改善が認められなかった (図 7B)。

さらにインスリン負荷試験での血糖値の Area under the curve (AUC) のでインスリン抵抗性を評価したところ、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスは野生型マウスに比べ、インスリン抵抗性が悪化していた (図 8)。また、野生型マウスでは運動によりインスリン抵抗性が改善していたが、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは運動によるインスリン抵抗性改善作用が認められなかった (図 8)。

これら一連の実験結果より、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスは耐糖能障害・インスリン抵抗性を有すること、さらに CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは、運動による糖代謝改善作用が認められないこと、すなわち運動抵抗性が生じていることが明らかになった。

CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの骨格筋において PGC-1 α の発現が低下していた

そこで、そのメカニズムを明らかにするために、まずは骨格筋での遺伝子発現変化を解析した。

PGC-1 α は持続的な運動で発現が増加することが知られており、運動による筋繊維の変化やミトコンドリア数・機能の制御に重要な役割を担っていることが報告されている^{19,20}。さらに大変興味深いことに、骨格筋においては、運動時の細胞内への Ca²⁺流入による CaMKKs の活性化を介して PGC-1 α の発現が増加すること、さらには AMPK によるリン酸化を介して PGC-1 α が活性化し、ミトコンドリア関連遺伝子が正に制御されることが明らかになっている^{23,27,28} (図 1)。そこで、骨格筋における PGC-1 α の発現変化を検討した。CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、PGC-1 α の発現が低下していた (図 9)。このことより、非運動群においては、CaMKKs シグナル依存的に PGC-1 α の発現量が調整されていることが明らかになった。一方で、運動群においては、野生型マウスさらには CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでも、運動により骨格筋における PGC-1 α の発現量が増加することが分かった (図 9)。このことより、運動における PGC-1 α の発現増加には、CaMKKs 非依存的なシグナルも関与していることが明らかになった。

野生型マウス、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスともに運動によりミトコンドリア関連遺伝子の発現は増加した

次に、PGC-1 α の下流に位置するミトコンドリア関連遺伝子の発現量を

検討した。核内受容体である estrogen-related receptor α (ERR α) は PGC-1 α と協調してミトコンドリア機能を制御していることが明らかになっている²⁹。そこで、骨格筋における ERR α の発現を検討したところ、野生型マウスと CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの間には差はなかったが、野生型マウス、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスともに、骨格筋での ERR α の発現は運動により上昇した (図 10A)。

次に、脂肪酸の β 酸化に関わる medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) の発現を検討したところ、野生型マウスと CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの間には差はなかった (図 10B)。一方で、野生型マウス、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスともに、運動により、骨格筋での MCAD の発現は上昇した (図 10B)。また、ミトコンドリアの膜貫通タンパク質複合体の1つである cytochrome c oxidase subunit II (COX2) の発現も ERR α 、MCAD と同様に野生型マウス、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの間には差はなかったが、野生型マウス、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスともに運動による発現上昇を認めた (図 11A)。

次に、骨格筋の筋繊維のタイプについて検討した。骨格筋の筋繊維は、ミトコンドリアに富む遅筋繊維 (赤筋、Type 1 fiber) と、ミトコンドリアに少なく解糖系による瞬発的な収縮に関与する速筋繊維 (白筋、Type 2 fiber) に大きく

分類することができる³⁰。酸化的酵素活性の高い Type 1 fiber ではミトコンドリア量と活性が高いため、糖・脂質代謝が積極的に行われ、骨格筋のエネルギー代謝の観点からも非常に重要であり、持続的な運動を継続的に行うことによってその割合は増加する。そこで、Type 1 fiber 遺伝子である Troponin 1 の発現を検討した。野生型マウスと CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスとの間に、骨格筋における Troponin 1 の発現の差は認めなかった (図 11B)。また、野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスともに運動により Troponin 1 の発現は上昇した (図 11B)。

ここまでの実験結果より、運動におけるミトコンドリア関連遺伝子、および筋繊維の変化には、CaMKKs 非依存的なシグナルも関与していることが明らかになった。一方で、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスにおいて、運動による糖代謝改善作用が認められない理由として、PGC-1 α を含むミトコンドリア関連遺伝子が関与している可能性は低いことも明らかになった。

非運動時および運動時に CaMKKs 依存的に EXPM1 の発現は増加した

運動が全身の代謝に影響を与えるメカニズムの一つとして、運動により骨格筋から分泌される生理活性物質が各臓器に作用し、糖代謝を調節していることが明らかとなり非常に注目されている²⁴。これらの生理活性物質は骨格筋か

らホルモン様タンパク質として分泌されることより、総称してマイオカインと呼ばれている²⁴。炎症性サイトカインである interleukin (IL) -6 は運動により血中濃度が上昇し、マイオカインとしても広く認識されている³¹。IL-6 は運動に反応して骨格筋より分泌され、膵β細胞からのインスリン分泌を促進し、血糖値を改善することが明らかになっている³¹。そこで、骨格筋での IL-6 の発現を検討したところ、野生型マウスと CaMKKα・CaMKKβダブル欠損マウスでは、IL-6 の発現に差は認めなかったが、野生型マウスおよび CaMKKα・CaMKKβダブル欠損マウスともに運動により骨格筋での IL-6 の発現は増加した (図 12A)。

次に、マイオカインの可能性が高く、代謝と関連する可能性が指摘されている Exercise-induced protein derived from muscle 1 (EXPM1) について検討した。EXPM1 は C1q/TNF-related protein ファミリーの1つである。マウスに回転ケージでの走行運動を行わせると、骨格筋での発現上昇および血中レベルの上昇が認められ、新規のマイオカインとして Seldin MM らにより報告された³²。そこで、EXPM1 の骨格筋における発現を検討したところ、CaMKKα・CaMKKβダブル欠損マウスでは野生型マウスと比較し、有意に発現が低下していた (図 12B)。また、大変驚くべきことに、野生型マウスでは運動により骨格筋での EXPM1 の発現は増加したが、CaMKKα・CaMKKβダブル欠損マウスでは、運動による EXPM1 の発現上昇は認められなかった (図 12B)。

以上の結果より、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの耐糖能障害・インスリン抵抗性惹起メカニズム、さらに CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスにおける運動抵抗性のメカニズムの一部として、EXPM1 が関与している可能性が示唆された。

EXPM1 は骨格筋に多く発現していた

C1q/TNF-related protein ファミリーはアディポネクチンと同様に、脂肪組織に多く発現していることが報告されている³³。次に、EXPM1 の脂肪組織を含めた代謝に重要な組織での発現量を検討した。実際には脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、胃、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、腎臓における EXPM1 の遺伝子発現を検討した。

その結果、EXPM1 遺伝子は特に骨格筋に多く発現していることが明らかになった (図 13A)。

C2C12 骨格筋細胞において、分化に伴い EXPM1 の発現量は増加した

次に *in vitro* の系で検証した。骨格筋細胞の分化に伴って EXPM1 の発現量が変化するかどうかを検討するために、C2C12 骨格筋細胞を用いて、分化前と分化誘導後の EXPM1 の発現量の変化を定量的 RT-PCR 法を用いて調べた。

EXPM1 は骨格筋細胞の分化に伴い、発現量が増加していた (図 13B)。

EXPM1 は培養肝細胞において糖新生関連遺伝子を抑制した

運動により骨格筋からの EXPM1 の分泌量は増加し、血中 EXPM1 濃度が増加することが明らかになっている³²。また大変興味深いことに、EXPM1 はアディポネクチンと相同性が高いことが分かっている。アディポネクチンは脂肪細胞から分泌される生理活性物質で、肥満 (脂肪細胞の肥大化) に伴って血中濃度は低下し³⁴、その低下が生活習慣病の原因になっていることが明らかになっている³⁵。また、アディポネクチンは肝臓においてはアディポネクチン受容体 (AdipoR)³⁶ の一つである AdipoR1 を介して、AMPK を活性化し、糖新生関連遺伝子の発現を抑制し、肝臓からの糖新生を抑制することが明らかになっている^{37,38}。そこで、まずは *in vitro* の系で、EXPM1 が糖新生関連遺伝子の発現を抑制するかどうかについて、ラット肝癌細胞 Fao 細胞を用いて検討した。Fao 細胞にリコンビナント EXPM1 を添加し、遺伝子発現について検討したところ、EXPM1 により糖新生関連酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)、Glucose 6-phosphatase (G6Pase) の発現が抑制された (図 14)。このことより、骨格筋より分泌される EXPM1 が、肝臓における糖新生を抑制する可能性が示唆された。

野生型マウスでは、運動により肝糖新生酵素の遺伝子発現が低下したが、
CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは低下しなかった

そこで、次に *in vivo* の系で肝臓での糖新生関連遺伝子の発現変化について検討した。実際には、トレッドミル運動を行った野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスを用いて、PEPCK、G6Pase の遺伝子発現について検討した。野生型マウスと比較して CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは PEPCK、G6Pase の発現が増加していた (図 15)。さらに、野生型マウスでは運動により肝臓における PEPCK、G6Pase の発現が低下していたが、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは運動によるこれら遺伝子発現の抑制効果は認められなかった (図 15)。

肥満・2型糖尿病モデルマウスでは骨格筋における EXPM1 の発現が低下していた

次に、肥満・2型糖尿病モデルマウスを用いて、EXPM1 の病態生理的意義を検討した。野生型マウスと比較して、高脂肪食負荷マウス、過食による肥満・2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスの骨格筋では、EXPM1 の発現が低下していた (図 16)。このことより、肥満・2型糖尿病におけるインスリン抵抗性惹起メカニズムの一部に骨格筋における EXPM1 の発現低下が関与し

ている可能性が示唆された。

肥満・2型糖尿病モデルマウスの骨格筋における EXPM1 の発現低下は運動により回復した

次に、高脂肪食負荷マウスに2週間のトレッドミル運動を行った。2週間の運動の有無によって、摂餌量および体重に有意な差は認められなかった(図17)。しかしながら、運動群においては骨格筋における EXPM1 の発現量は増加し(図18A)、肝臓における糖新生関連遺伝子 PEPCK、G6Pase の発現低下が認められ(図18B,C)、個体レベルでの血糖値の低下が認められた(図18D)。

考察

エネルギー収支バランスの崩れによる肥満を基盤として、耐糖能障害、脂質代謝異常、高血圧が重積するいわゆるメタボリックシンドロームは、わが国の死因の上位を占める心血管疾患の主要な原因と考えられる。現代人が抱えるこのエネルギー収支バランスの崩れは、戦後の食生活の欧米化に加え、社会全般のオートメーション化による身体活動量の低下、すなわち「運動不足」が大きく関与している^{24,39}。

また、運動療法が食事療法とともに生活習慣病の根本的な治療法となることも周知の事実である。実際に多くの大規模臨床研究の結果からも生活習慣病に対する運動の有用性が証明されている⁴⁰。一方で、運動が糖代謝を改善するメカニズムとして、運動（筋収縮）によって活性化されるカルシウムシグナル伝達系、エネルギー消費シグナル、メカニカルストレスなどの複合的な刺激による骨格筋の質の変化が重要であることが明らかになっているが、より詳細なメカニズムは明らかになっていない。

細胞内におけるカルシウムシグナル伝達機構は普遍的かつ基本的な情報伝達機構で、細胞の興奮や運動、遺伝子発現、アポトーシス、エクソサイトーシスなどに関与し、細胞の恒常性維持のためにも極めて重要なシグナルの一つと言える⁴¹。細胞内には数多くの Ca^{2+} 結合タンパク質が存在し、その中でも

calmodulin (CaM) はカルシウムシグナルの変換器として重要な役割を担っている⁴²。CaM は4つのEFハンドモチーフを持ち、それぞれにCa²⁺が結合することにより構造変化を引き起こし、特定のタンパク質に結合できるようになる⁴¹。近年までに数多くのCa²⁺/CaM依存性タンパク質リン酸化酵素が同定されているが、中でもCa²⁺/CaMカスケードの最も上流に位置するCaMKKsはシグナル伝達を統括する役割を担っており非常に注目されている^{43,44}。

CaMKKsの糖代謝に与える影響として、これまでにいくつかの報告がなされているが、いずれも中枢神経機能を介した摂食行動の変化を伴う、二次的な作用がメインとなっている。視床下部のCaMKKβは、食欲に関連する神経ペプチドY (NPY)、アグーチ関連ペプチド (AgRP) の発現を増加させ、食欲亢進に作用することが分かり、実際にCaMKKβ欠損マウスは食欲が低下し、体重減少をきたし、二次的に耐糖能障害が改善することが明らかになっている⁴⁵。また、CaMKKαは長期記憶に関与することが報告されており²⁶、CaMKKα欠損マウスは、CaMKKβ欠損マウスとは別の機序で摂餌量が増加する可能性が指摘されている。

今回、これまでに報告のない、CaMKKα・CaMKKβダブル欠損マウスを作製し解析を行ったが、このダブル欠損マウスでは、摂餌量に関しては、CaMKKαおよびCaMKKβのそれぞれの摂食に対する作用がキャンセルされ、結

果として野生型マウスと比べて、摂餌量に変化は認められなかった。そのため、代謝に重要な末梢組織での CaMKKs の機能解明に適した系となっている。

CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスは野生型マウスと比べて体重に差は認められなかったが、耐糖能障害、インスリン抵抗性が認められたことより、CaMKKs は末梢臓器でインスリン感受性を調整している分子であることが明らかになった。その責任臓器としては、まずは細胞内 Ca²⁺濃度がダイナミックに変化する骨格筋である可能性が考えられた。実際に CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの骨格筋では、代謝に重要な分子である PGC-1 α の発現量が低下し、マイオカインの一つである EXPM1 の発現量が低下していた。また肝臓においては、糖新生関連遺伝子 PEPCK、G6Pase の発現量が増加し、肝臓からの糖新生が増加し、特に空腹時の血糖値が上昇していたものと考えられる。肝臓でこれらの遺伝子が増加していたメカニズムとしては、血中の EXPM1 濃度が低下している可能性を想定しているが、肝臓における CaMKKs が欠損したことによる影響も考えられる。また CaMKK α もしくは CaMKK β のどちらの分子がより寄与しているかに関しても不明なままである。その問題点を解決するために、現在、骨格筋、肝臓それぞれの臓器特異的 CaMKK α または CaMKK β 欠損マウスの作製を行っており、これらマウスの解析により、末梢組織での CaMKKs の糖代謝における役割が明らかになるものと思われる。

また、今回の実験結果より、運動による糖代謝改善メカニズムの一部に CaMKKs が重要な役割を担っていることが明らかになった。さらに CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスを用いた実験により、運動による糖代謝改善メカニズムの一部に EXPM1 が関与している可能性が明らかになった。これまでに、EXPM1 は運動により血中濃度が増加することが明らかになっているが³²、その詳細なメカニズムは不明であった。CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの骨格筋では運動による EXPM1 発現増加が認められなかったことより、EXPM1 の発現増加には CaMKKs を介したカルシウムシグナルが重要であることが分かった。今回、骨格筋における EXPM1 の発現量の変化を検討したが、今後さらに血中の EXPM1 濃度の変化を検討することが重要である。

また、EXPM1 の糖代謝に及ぼす直接的な影響に関してはこれまで明らかになっていない。今後、gain of function の系として、EXPM1 を肥満・2型糖尿病モデルマウスに投与し、EXPM1 が直接的に耐糖能障害、インスリン抵抗性を改善するかどうか検討することが重要であると考えられる。さらに、loss of function の系として、現在、EXPM1 欠損マウスを作製しており、EXPM1 欠損マウスも CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスと同様に、耐糖能障害、インスリン抵抗性を認めるかどうか、さらには運動持久力が低下するかどうか検証することは非常に重要である。さらに、近年、加齢に伴うサルコペニアが糖代謝を悪化さ

せることが報告されている。したがって、加齢による筋肉量が減少するサルコペニアの病態では EXPM1 の血中濃度も減少する可能性があり、今後の検討が重要である。

EXPM1 は C1q/TNF-related protein ファミリーに属し、脂肪組織から分泌される生理活性物質アディポネクチンと相同性が高いことが明らかになっている³²。アディポネクチンは分子量約 30 kDa の分泌タンパクで、N 末端側のシグナル配列に続き、多量体形成に重要な役割を担うシステイン残基を有する可変領域、Gly-X-Y の繰り返し配列を特徴とするコラーゲン様領域、球状ドメインから構成されている。アディポネクチンは、生体内で AdipoR に結合し、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用等を発揮することが証明されており、アディポネクチン / AdipoR シグナルの活性化は、寿命延長効果を有することも明らかになっている^{23,36,46,47}。アディポネクチンは肝臓においては AdipoR1 を介して AMPK を活性化し糖新生を抑制すること、一方で AdipoR2 を介して PPAR α を活性化し脂肪酸燃焼を増加させることが分かっている。EXPM1 もアディポネクチンと同様に N 末端側のシグナル配列に続き、可変領域、コラーゲン様領域、球状ドメインから構成されている。今回、EXPM1 は肝細胞において糖新生関連遺伝子を抑制することを明らかにしたが、EXPM1 は AdipoR に結合し得るのか、さらには AdipoR を介して、AMPK 等を活性化し得るのかどうかは非常に重要なポイント

であり、検討しなければいけない (図 19)。

運動療法は生活習慣病の予防法、治療法として極めて重要な役割を果たすにも関わらず、生活習慣病患者の運動実施率は低いことが明らかになっている。社会全般のオートメーション化に伴う身体活動量の低下や現代人のライフスタイルを考慮に入れると、継続的に運動療法を続けることが難しい現状が浮かび上がってくる。本研究において、EXPM1 は CaMKK 依存的に発現量が増加することが明らかになった。今後、運動量と血中の EXPM1 濃度の変化を調べることにより、EXPM1 がこれまでに無い新規の運動療法の効果指標 (マーカー) として臨床応用出来る可能性が示唆された。さらに、運動療法の新たなメカニズムの解明は、運動療法の実施率の向上に一翼を担うのみならず、生活習慣病に対する根本的治療法の開発の道を切り開く可能性があり、非常に重要と考えられた。

引用文献

1. WHO | Diabetes. at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>
2. 糖尿病診断基準に関する調査検討委員会. 糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告. 糖尿病 **55**, 485–504 (2012).
3. 平成25年「国民健康・栄養調査」の結果 | 報道発表資料 | 厚生労働省. at <<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000067890.html>>
4. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N. Engl. J. Med.* **329**, 977–986 (1993).
5. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* **352**, 837–853 (1998).
6. Gu, K. Diabetes and Decline in Heart Disease Mortality in US Adults. *JAMA* **281**, 1291 (1999).
7. Noto, H., Tsujimoto, T. & Noda, M. Significantly increased risk of cancer in

- diabetes mellitus patients: A meta-analysis of epidemiological evidence in Asians and non-Asians. *J. Diabetes Investig.* **3**, 24–33 (2012).
8. 堀田 饒, 中村 二郎, 岩本 安彦, 大野 良之, 春日 雅人, 吉川 隆一 豊田 隆謙. アンケート調査による日本人糖尿病の死因 —1991~2000 年の 10 年間, 18,385名での検討—. *糖尿病* **50**, 47–61 (2007).
 9. Yamauchi, T. *et al.* A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A-C2CD4B. *Nat. Genet.* **42**, 864–868 (2010).
 10. Yasuda, K. *et al.* Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* **40**, 1092–1097 (2008).
 11. Pan, X.-R. *et al.* Effects of Diet and Exercise in Preventing NIDDM in People With Impaired Glucose Tolerance: The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* **20**, 537–544 (1997).
 12. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N. Engl. J. Med.* **346**, 393–403 (2002).
 13. Evans, J. M. M. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*

- 330**, 1304–1305 (2005).
14. Wing, R. R. Long-term effects of a lifestyle intervention on weight and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes mellitus: four-year results of the Look AHEAD trial. *Arch. Intern. Med.* **170**, 1566–1575 (2010).
 15. Goodyear, L. J., Giorgino, F., Balon, T. W., Condorelli, G. & Smith, R. J. Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and PI 3-kinase activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **268**, E987–995 (1995).
 16. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* **91**, 1447–531 (2011).
 17. Saltin, B., Henriksson, J., Nygaard, E., Andersen, P. & Jansson, E. Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **301**, 3–29 (1977).
 18. Hickey, M. S. *et al.* Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans. *Am. J. Physiol.* **268**, E453–7 (1995).
 19. Wu, Z. *et al.* Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
 20. Handschin, C. & Spiegelman, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in

- inflammation and chronic disease. *Nature* **454**, 463–469 (2008).
21. Lin, J. *et al.* Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**, 797–801 (2002).
 22. Hawley, S. A. *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* **2**, 9–19 (2005).
 23. Iwabu, M. *et al.* Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 α and mitochondria by Ca²⁺ and AMPK/SIRT1. *Nature* **464**, 1313–1319 (2010).
 24. Hawley, J. A., Hargreaves, M., Joyner, M. J. & Zierath, J. R. Integrative Biology of Exercise. *Cell* **159**, 738–749 (2014).
 25. Ageta-Ishihara, N. *et al.* Control of Cortical Axon Elongation by a GABA-Driven Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Cascade. *J. Neurosci.* **29**, 13720–13729 (2009).
 26. Blaeser, F. *et al.* Long-term memory deficits in Pavlovian fear conditioning in Ca²⁺/calmodulin kinase kinase alpha-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 9105–9115 (2006).
 27. Cantó, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺

- metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–1060 (2009).
28. Rohas, L. M. *et al.* A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7933–7938 (2007).
 29. Mootha, V. K. *et al.* Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6570–6575 (2004).
 30. Berchtold, M. W., Brinkmeier, H. & Muntener, M. Calcium Ion in Skeletal Muscle: Its Crucial Role for Muscle Function, Plasticity, and Disease. *Physiol Rev* **80**, 1215–1265 (2000).
 31. Pedersen, B. K. & Febbraio, M. a. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* **88**, 1379–1406 (2008).
 32. Seldin, M. M., Peterson, J. M., Byerly, M. S., Wei, Z. & Wong, G. W. Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J. Biol. Chem.* **287**, 11968–11980 (2012).
 33. Wong, G. W., Wang, J., Hug, C., Tsao, T.-S. & Lodish, H. F. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10302–10307 (2004).

34. Arita, Y. *et al.* Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 79–83 (1999).
35. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* **7**, 941–946 (2001).
36. Yamauchi, T. *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423**, 762–769 (2003).
37. Yamauchi, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **8**, 1288–1295 (2002).
38. Yamauchi, T. *et al.* Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* **13**, 332–339 (2007).
39. Ng, M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **384**, 766–781 (2014).
40. Gillies, C. L. *et al.* Pharmacological and lifestyle interventions to prevent or

- delay type 2 diabetes in people with impaired glucose tolerance: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **334**, 299 (2007).
41. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–529 (2003).
 42. Henzler-Wildman, K. & Kern, D. Dynamic personalities of proteins. *Nature* **450**, 964–972 (2007).
 43. Wayman, G. A. *et al.* Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* **59**, 914–931 (2008).
 44. Soderling, T. R. The Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 232–236 (1999).
 45. Anderson, K. A. *et al.* Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance. *Cell Metab.* **7**, 377–388 (2008).
 46. Okada-Iwabu, M. *et al.* A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* **503**, 493–499 (2013).
 47. Tanabe, H. *et al.* Crystal structures of the human adiponectin receptors. *Nature* **520**, 312–316 (2015).

Figure Legends

図 1. 運動の糖代謝改善メカニズム

図 2. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの運動耐容能と走行距離

- A. 運動耐容能
- B. トレッドミルの走行距離

結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

WT : n = 10, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス n = 10

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

図 3. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの摂餌量と体重

- A. 摂餌量
- B. 体重

絶食 9 時間後に測定し、結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

図 4. 野生型マウスの OGTT の結果

- A. 血糖値の推移
- B. インスリン値

絶食 9 時間後に測定し、結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10

WT : wild type, 野生型マウス

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 5. CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの OGTT の結果

- A. 血糖値の推移
- B. インスリン値

絶食 9 時間後に測定し、結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス: n = 4, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

NS, Not Significant

図 6. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスのインスリン抵抗性指数

野生型マウスの非運動群を 100%としたときの割合を、平均値±標準誤差(S.E.M.)で示した。

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 7. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの ITT の結果

A. 野生型マウス

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10

B. CaMKK α ・CaMKK β 欠損マウス

CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

結果は平均値±標準誤差(S.E.M.)で示した。

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 8. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスのインスリン感受性

ITT 施行時の(血糖値)×(時間)による面積

野生型マウスの非運動群を 100%とした割合を平均値±標準誤差(S.E.M.)で示した。

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 9. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの骨格筋での PGC1- α の発現

Ppia(cyclophilin)で相対補正し野生型マウスの非運動群を 1 とし、結果は平均値 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した。

Ppargc1a (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

WT : wild type, 野生型マウス

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 10. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの骨格筋での ERR α , MCAD の発現

Ppia(cyclophilin)で相対補正し野生型マウスの非運動群を 1 とし、結果は平均値 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した。

A. *Esrra* (estrogen related receptor, alpha)

B. *Acadm* (acyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain)

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 11. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスの骨格筋での COX2, Troponin 1 の発現

Ppia(cyclophilin)で相対補正し野生型マウスの非運動群を 1 とし、結果は平均値 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した。

A. *mt-Co2* (mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II)

B. *Tnni1* (troponin I)

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 12. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス骨格筋での IL-6, EXPM1 の発現

Ppia(cyclophilin)で相対補正し野生型マウスの非運動群を 1 とし、結果は平均値 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した。

A. *Il6* (interleukin 6)

B. *Fam132b* (family with sequence similarity 132, member B)

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10, CaMKK α · CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4, CaMKK α · CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

図 13. 各臓器および分化に伴った EXPM1 の発現

A. 各臓器での遺伝子の発現

WAT : white adipose tissues, 白色脂肪組織

BAT : brown adipose tissues, 褐色脂肪組織

SKM : skeletal muscles, 骨格筋

各群 n = 10

Ppia(cyclophilin)で相対補正し肝臓における発現量を 1 とし、結果は平均値 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した。

B. C2C12 細胞の分化過程における遺伝子発現変化

myocyte : day0 分化誘導日

myotube : day9

各群 n = 12

Rn 18s(18S rRNA)で相対補正し最大発現量を 1 とし、結果は平均値 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した。

NS, Not Significant

** $p < 0.01$

図 14. Fao 細胞における EXPM1 添加後の PEPCK および G6Pase の変化

Ppia(cyclophilin)で相対補正し EXPM1 の非添加群を 1 とし、結果は平均値 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した。

A. *Pck1* (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1)

B. *G6pc* (glucose-6-phosphatase, catalytic)

各群 n = 6

EXPM1, Exercise-induced protein derived from muscle 1

** $p < 0.01$

図 15. 野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス肝臓での PEPCK, G6Pase の発現

Ppia(cyclophylin)で相対補正し野生型マウスの非運動群を 1 とし、結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

A. *Pck1* (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1)

B. *G6pc* (glucose-6-phosphatase, catalytic)

WT : n = 5, WT + Exercise : n = 10, CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス : n = 4,
CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウス + Exercise : n = 6

WT : wild type, 野生型マウス

NS, Not Significant

** $p < 0.01$

図 16. 肥満・2型糖尿病モデルマウスにおける骨格筋での EXPM1 の遺伝子発現

Ppia(cyclophylin)で相対補正し野生型マウスの通常食群を 1 とし、結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

Fam132b (family with sequence similarity 132, member B)

WT : n = 7, HF : n = 10, db/db : n = 10

WT : wild type, 野生型マウス

HF, 高脂肪食負荷マウス

** $p < 0.01$

図 17. 高脂肪食負荷マウスの摂餌量と体重

A. 摂餌量

B. 体重

絶食 4 時間後に測定し、結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

HF : n = 12, HF + Exercise : n = 8

NS, Not Significant

図 18. 高脂肪食負荷マウスの血糖値・骨格筋における EXPM1 の発現および肝臓における PEPCK, G6Pase の発現

A. 血糖値

HF : n = 12, HF + Exercise : n = 8

B. 骨格筋における EXPM1 の発現

Ppia(cyclophylin)で相対補正し非運動群を 1 とし、結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

Fam132b (family with sequence similarity 132, member B)

肝臓における糖新生関連遺伝子の発現

Ppia(cyclophilin)で相対補正し非運動群を 1 とし、結果は平均値±標準誤差 (S.E.M.) で示した。

C. *Pck1* (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1)

D. *G6pc* (glucose-6-phosphatase, catalytic)

HF : n = 8, HF + Exercise : n = 8

** $p < 0.01$

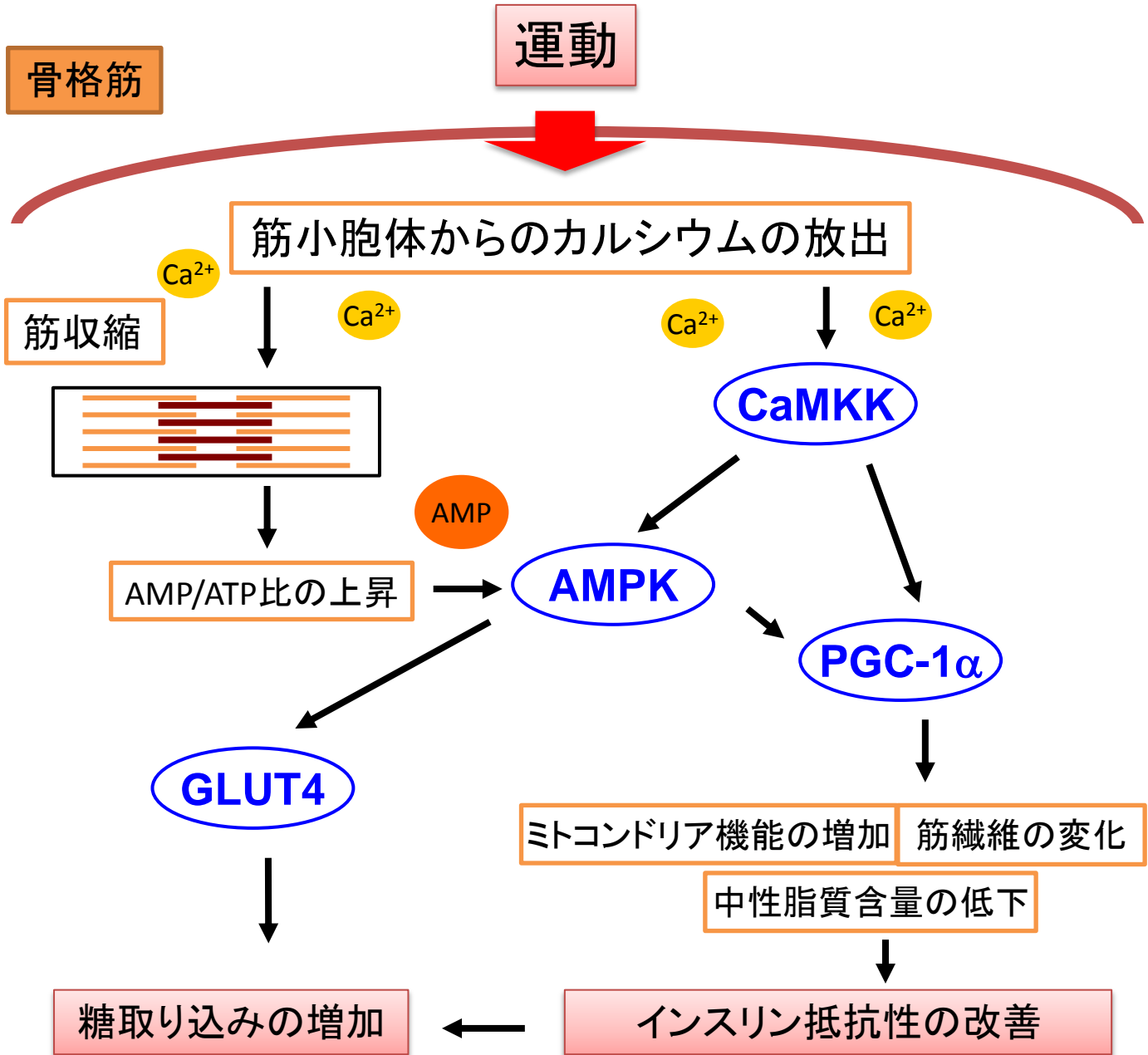
図 19. CaMKKs/EXPM1 を介した運動の糖代謝改善メカニズム (仮説)

謝辞

本研究を行うにあたり、東京大学大学院医学系研究科 糖尿病・代謝内科教授 門脇 孝 先生、また、同准教授 山内 敏正 先生、同特任准教授 岩部 真人 先生、同特任助教 岩部 美紀 先生のご指導を賜りました。

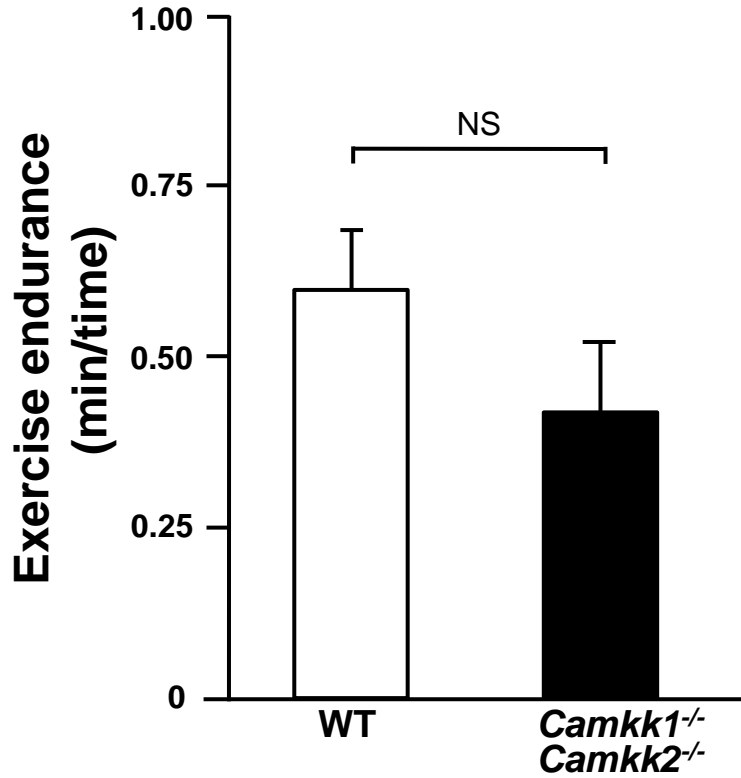
ここに深甚なる謝意を表します。

運動の糖代謝改善メカニズム

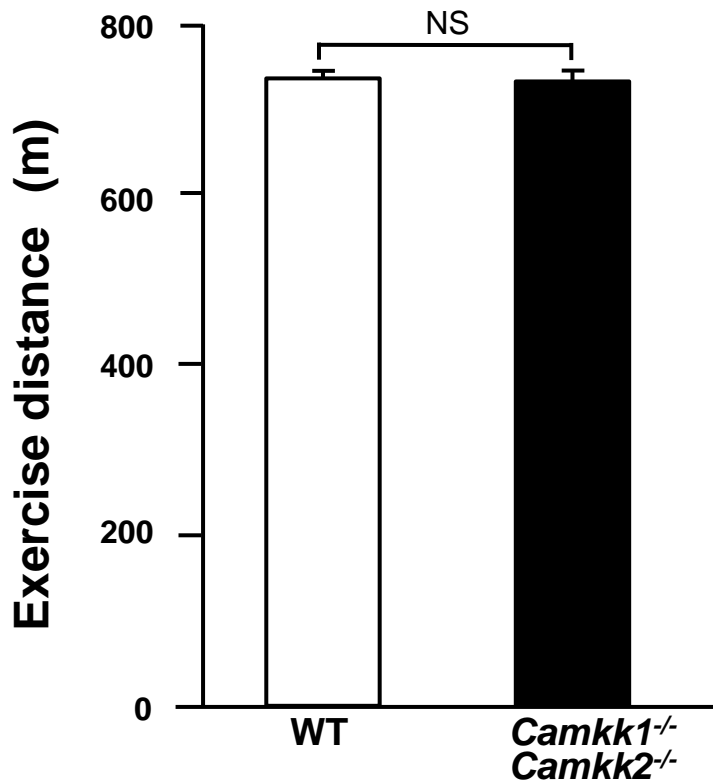


A

NS, not significant

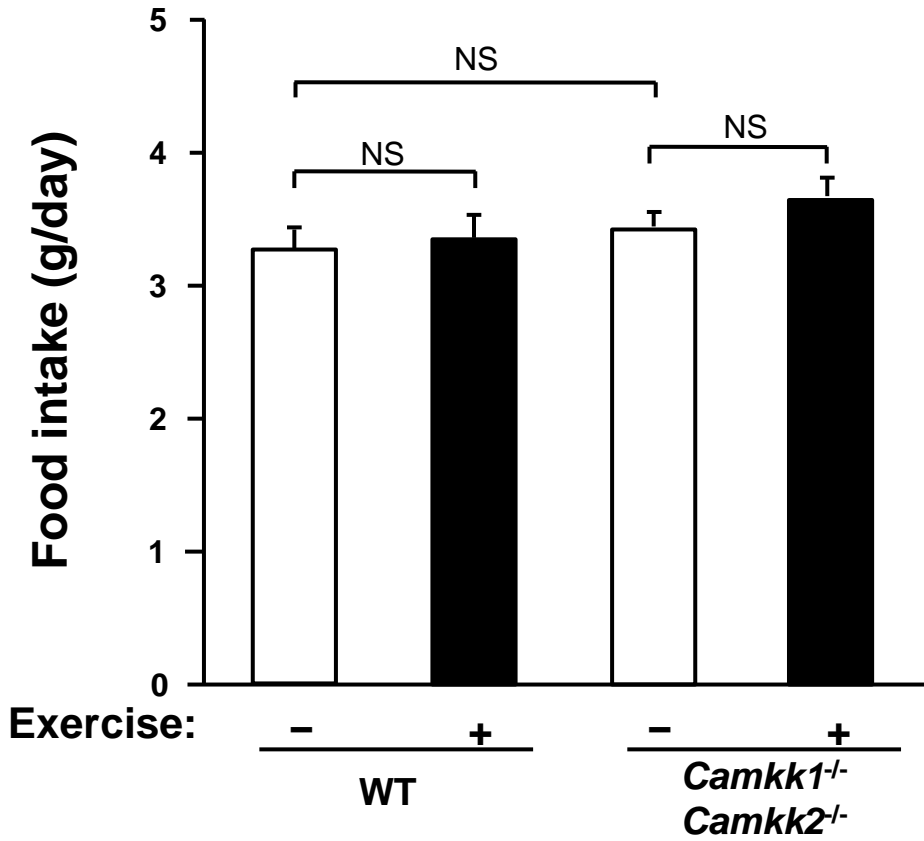


B

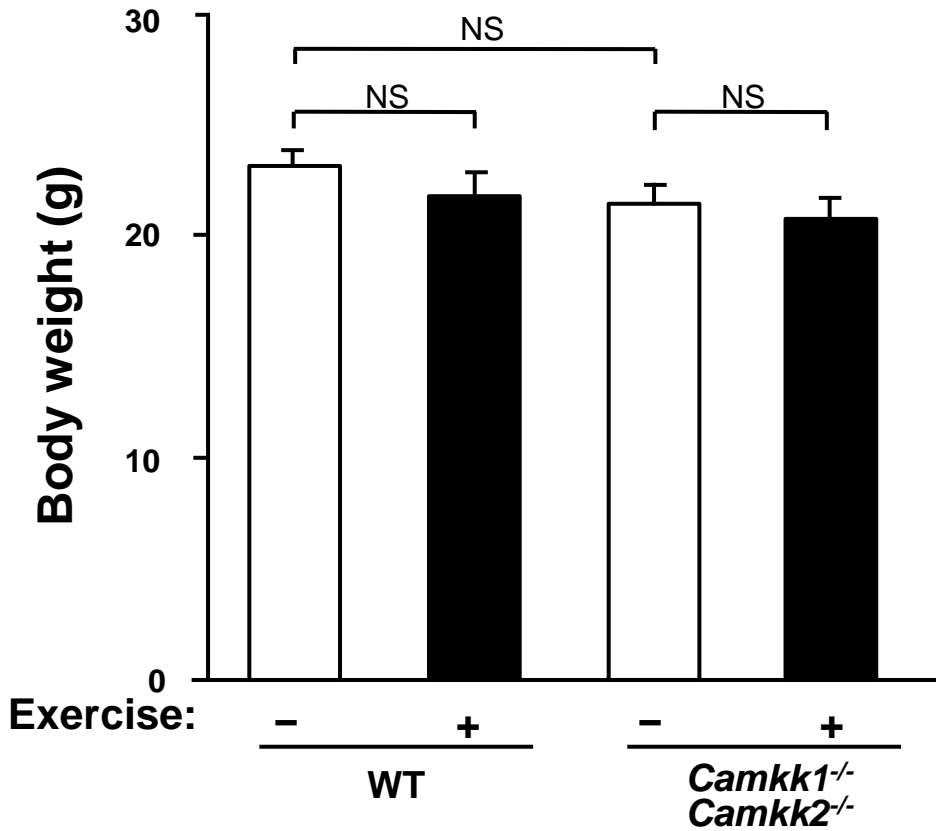


A

NS, not significant

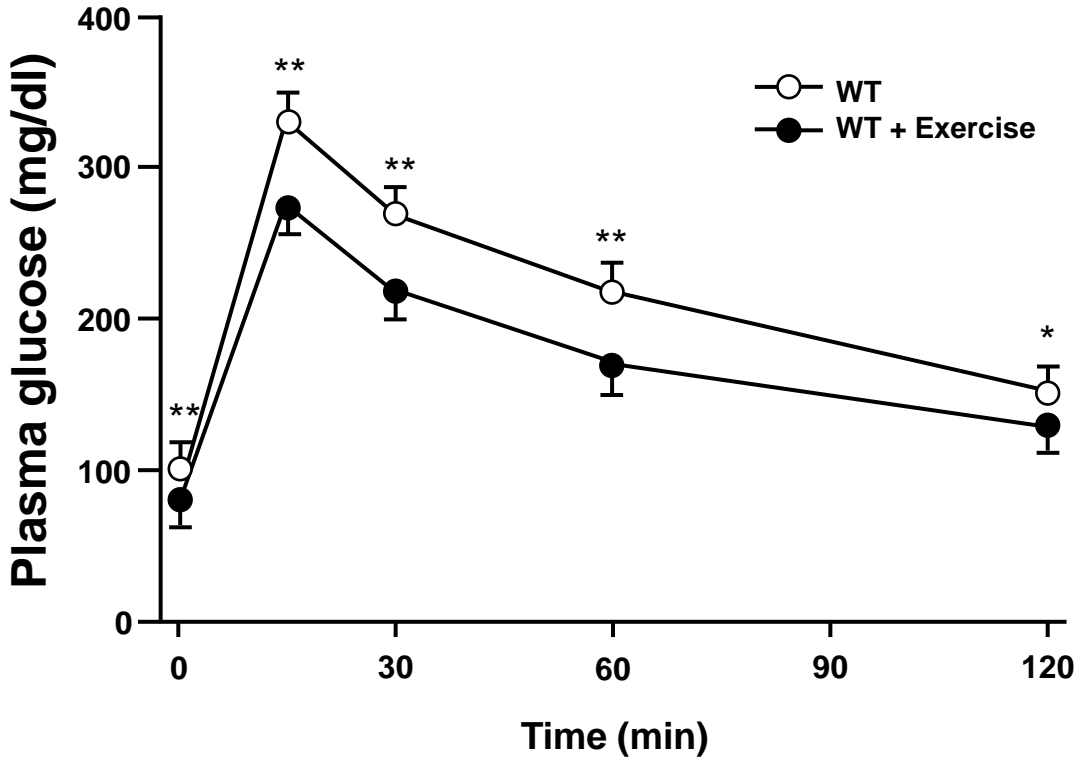


B

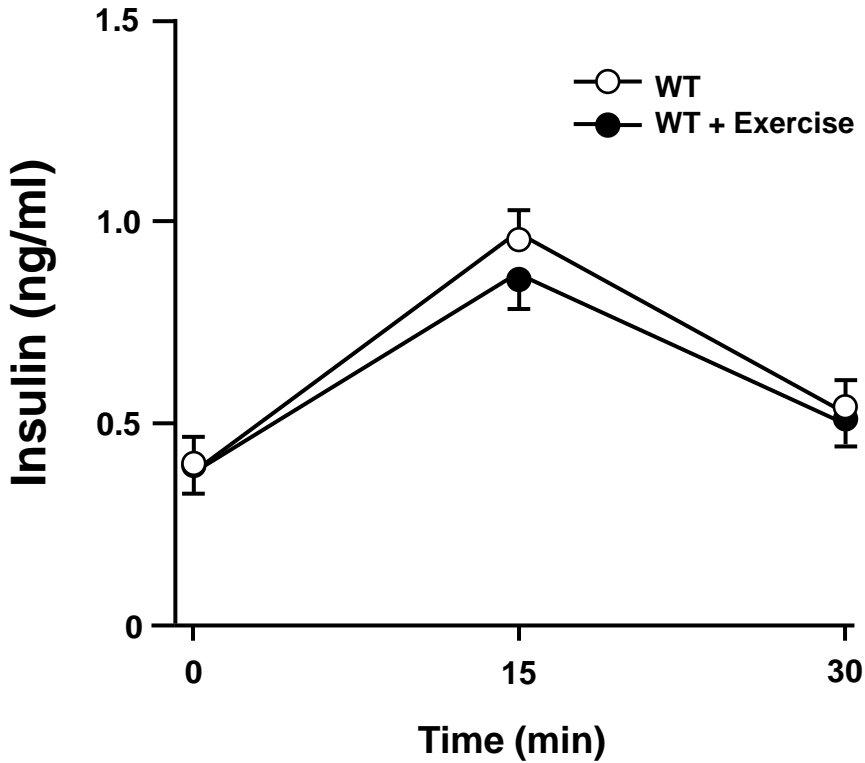


* p < 0.05, ** p < 0.01

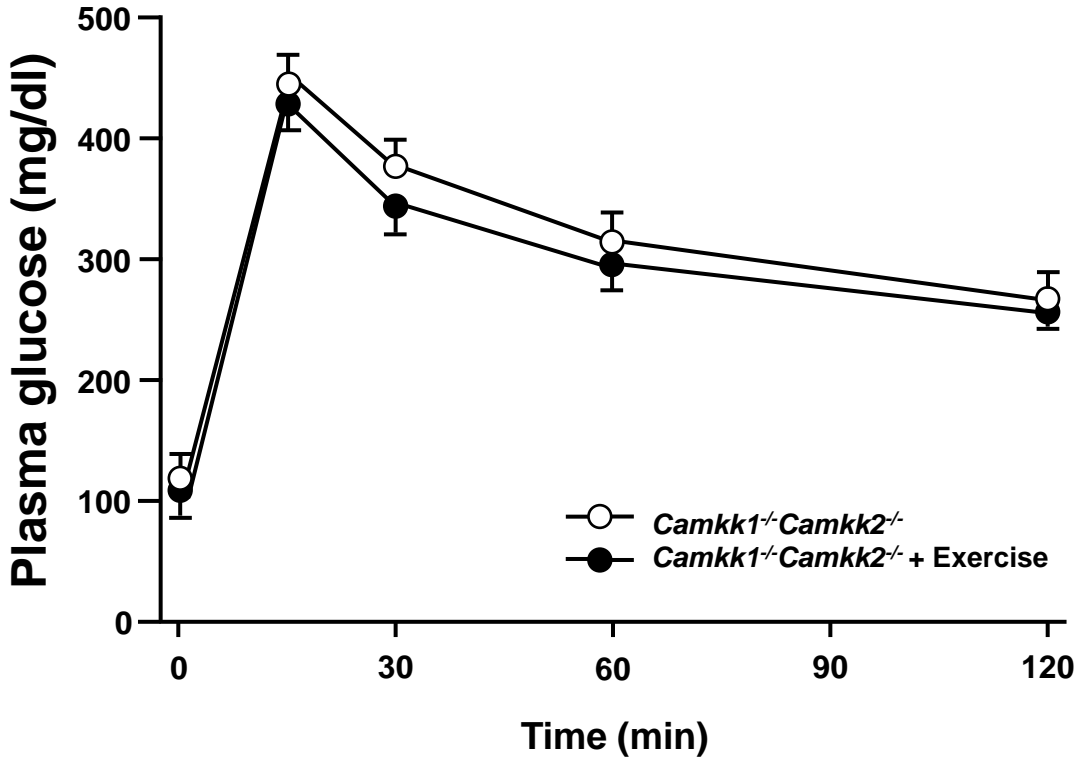
A



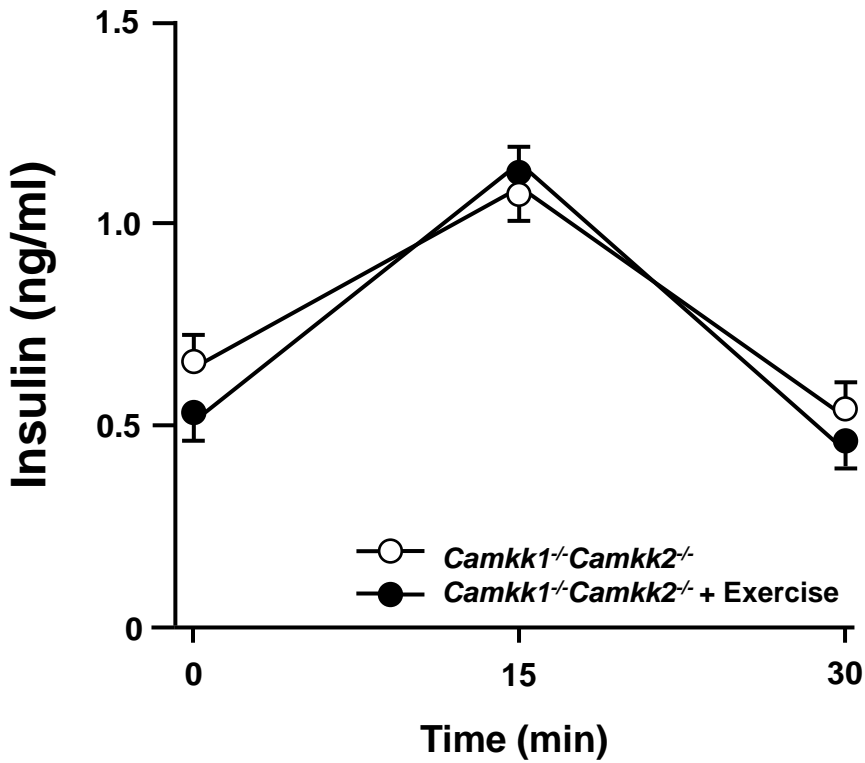
B



A

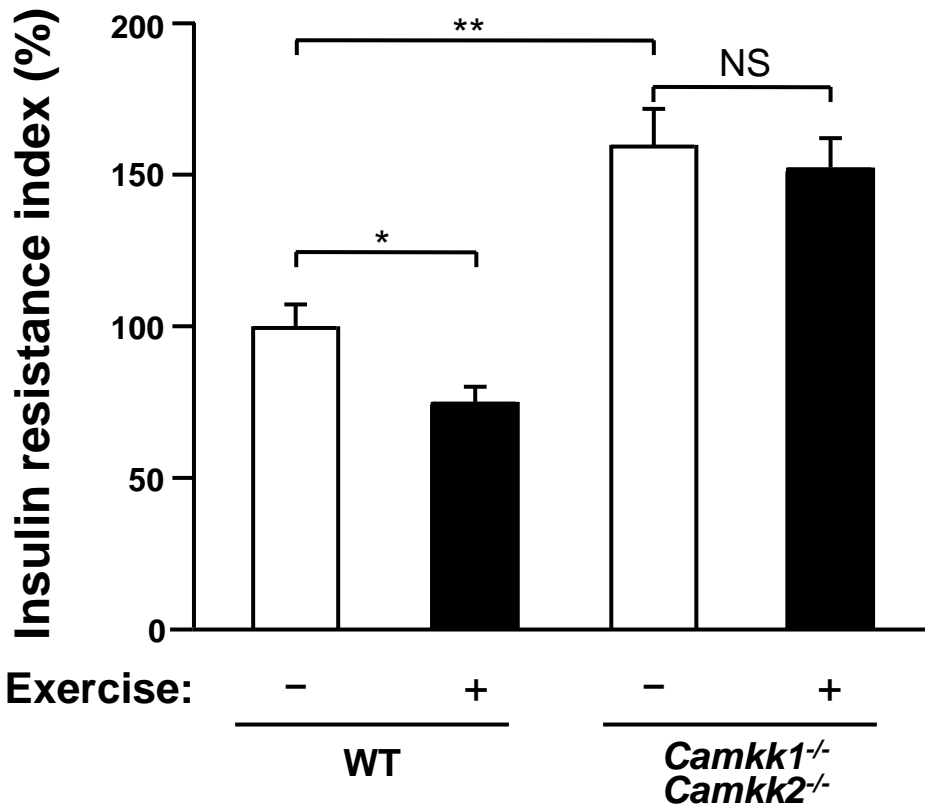


B



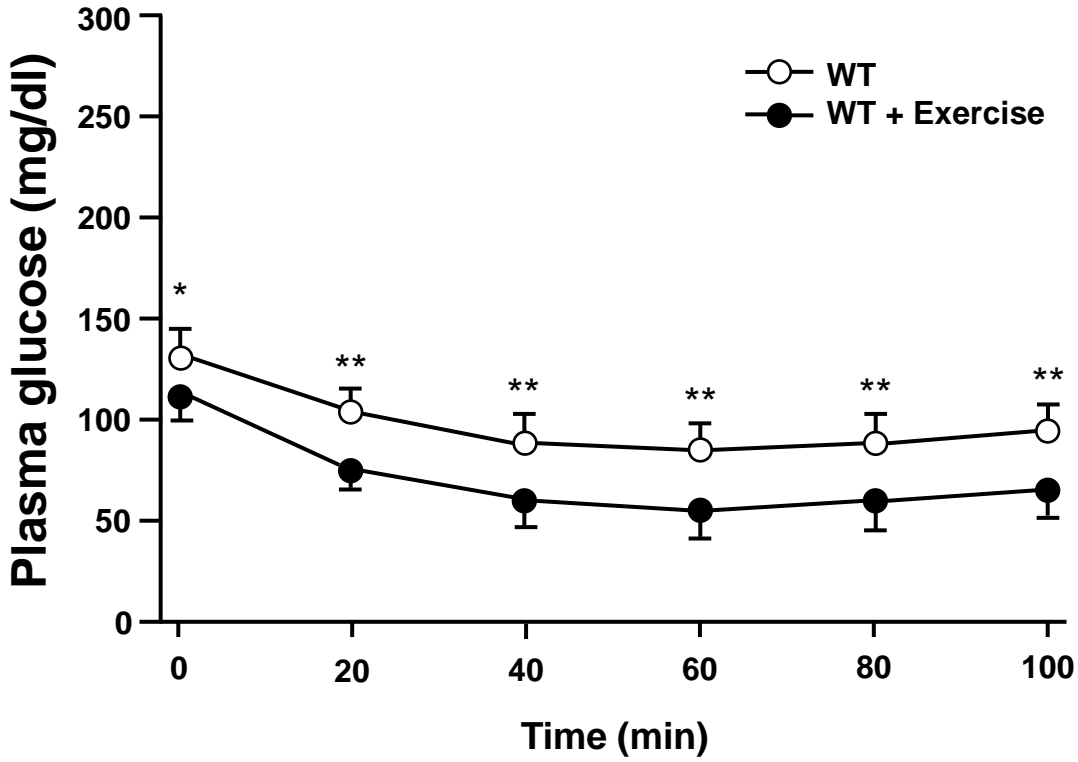
NS, not significant

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

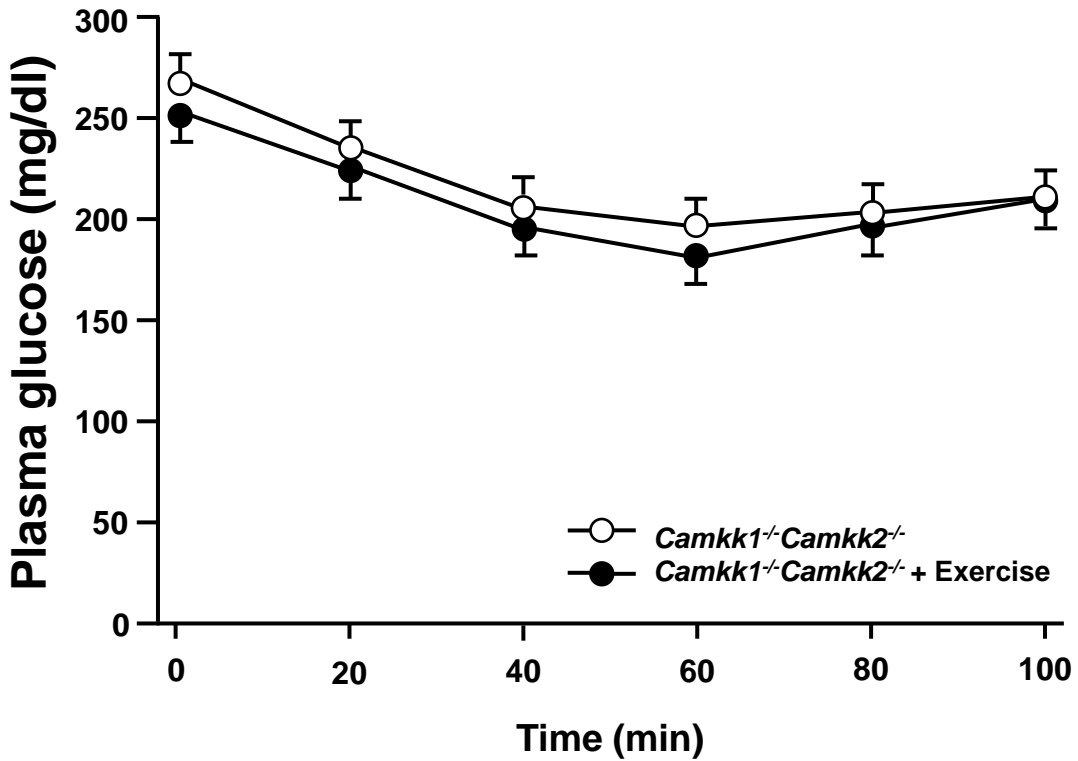


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

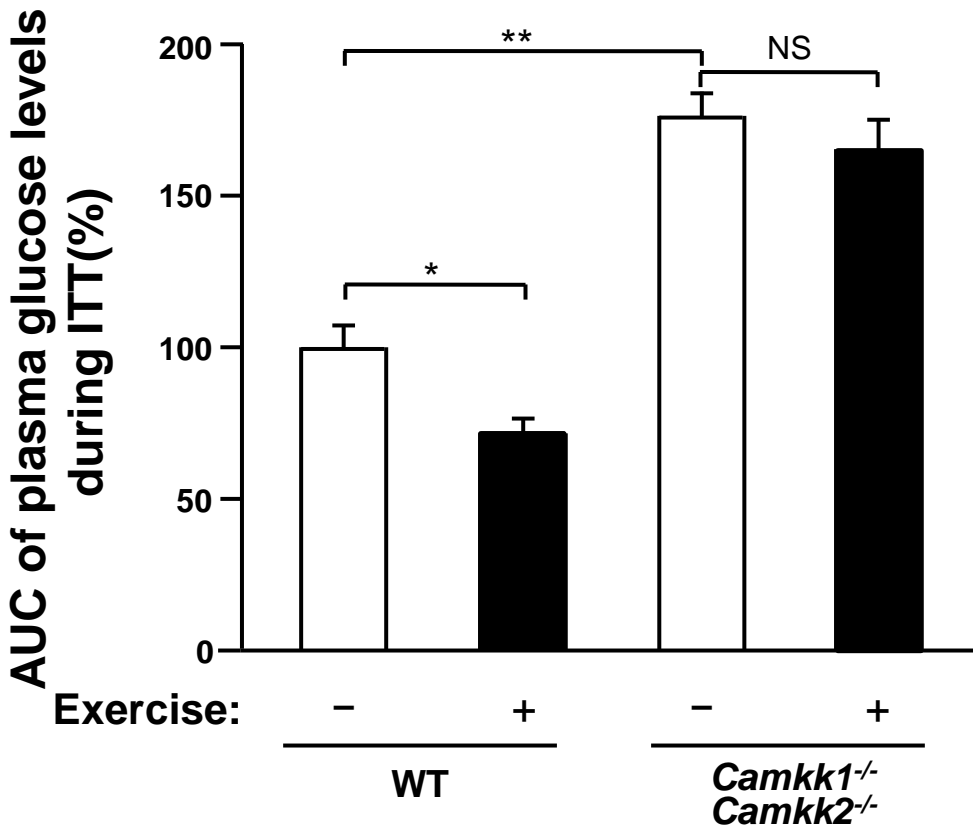
A



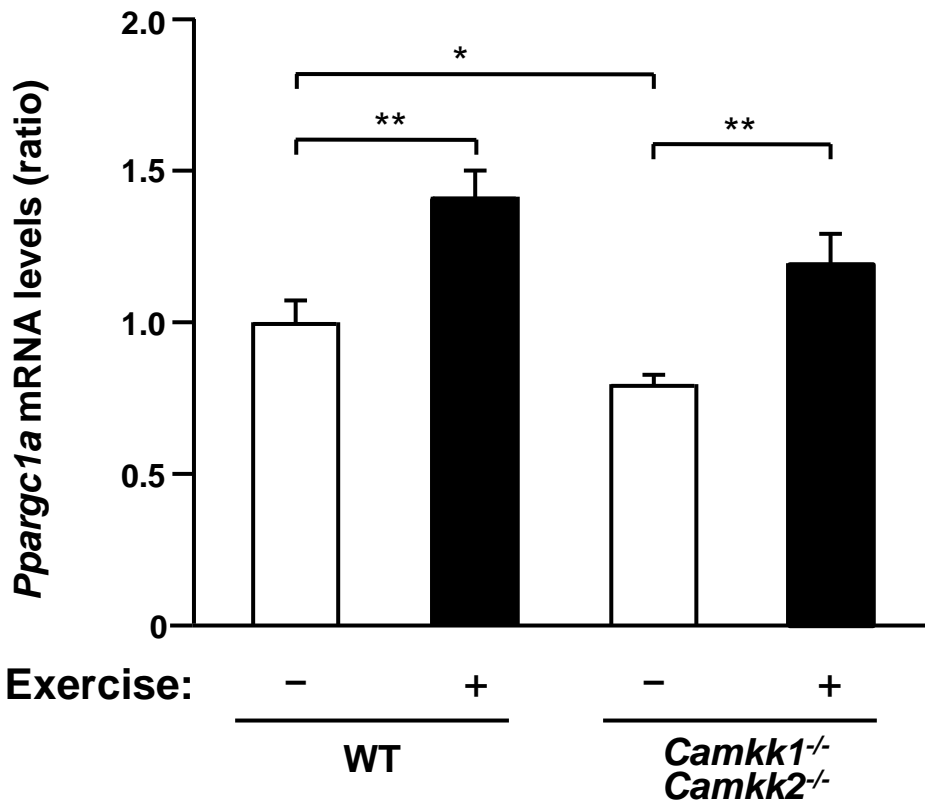
B



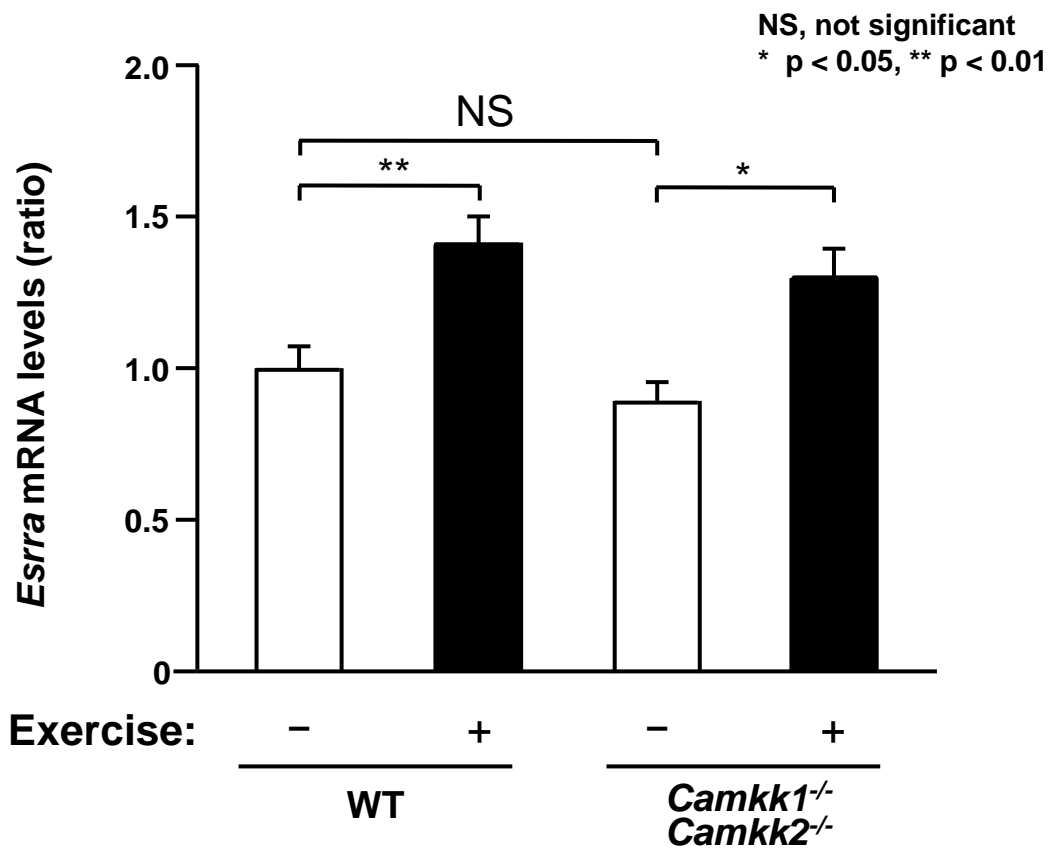
NS, not significant

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 

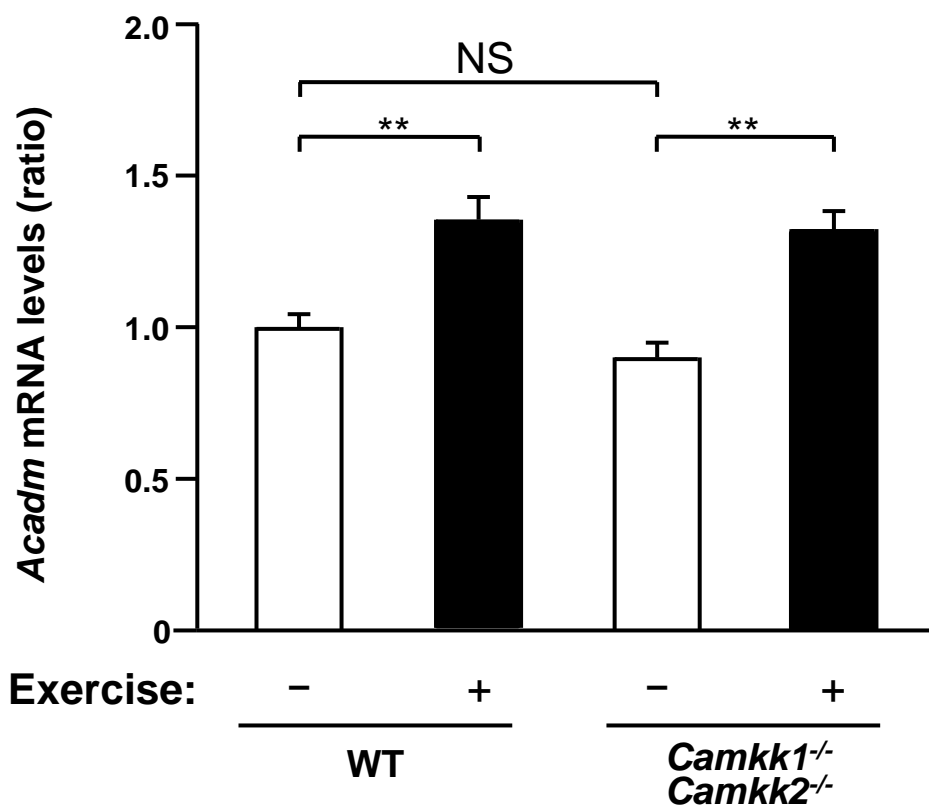
* p < 0.05, ** p < 0.01



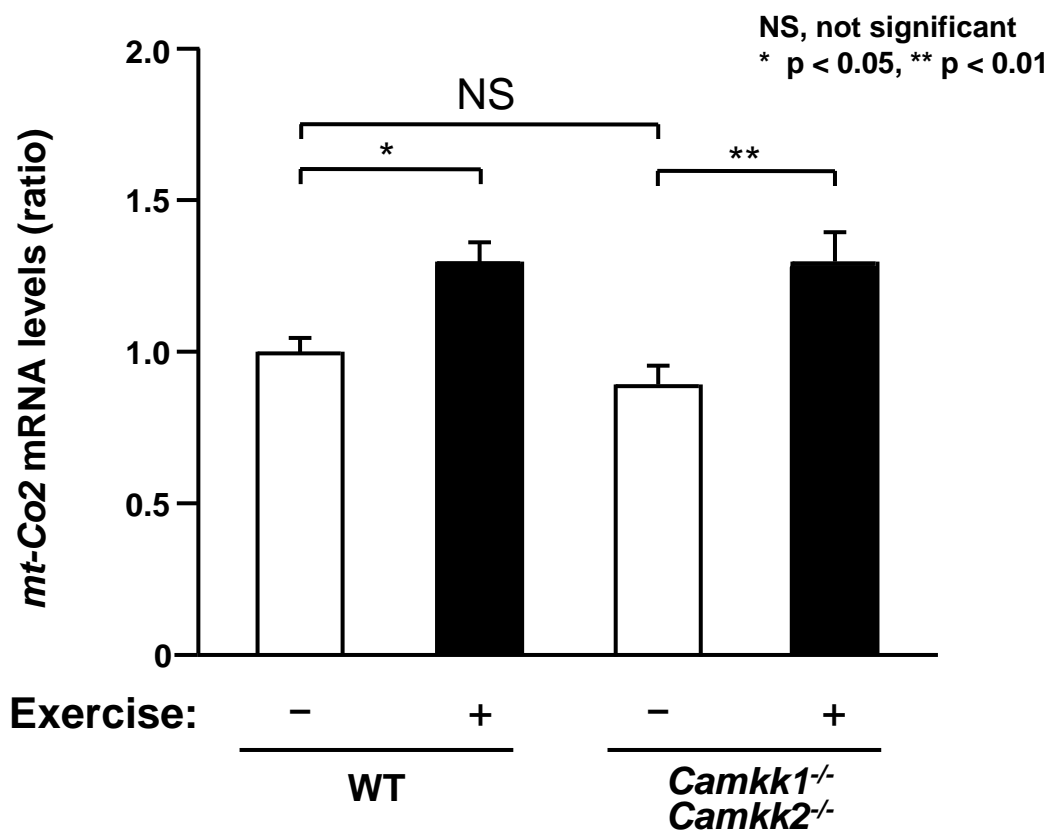
A



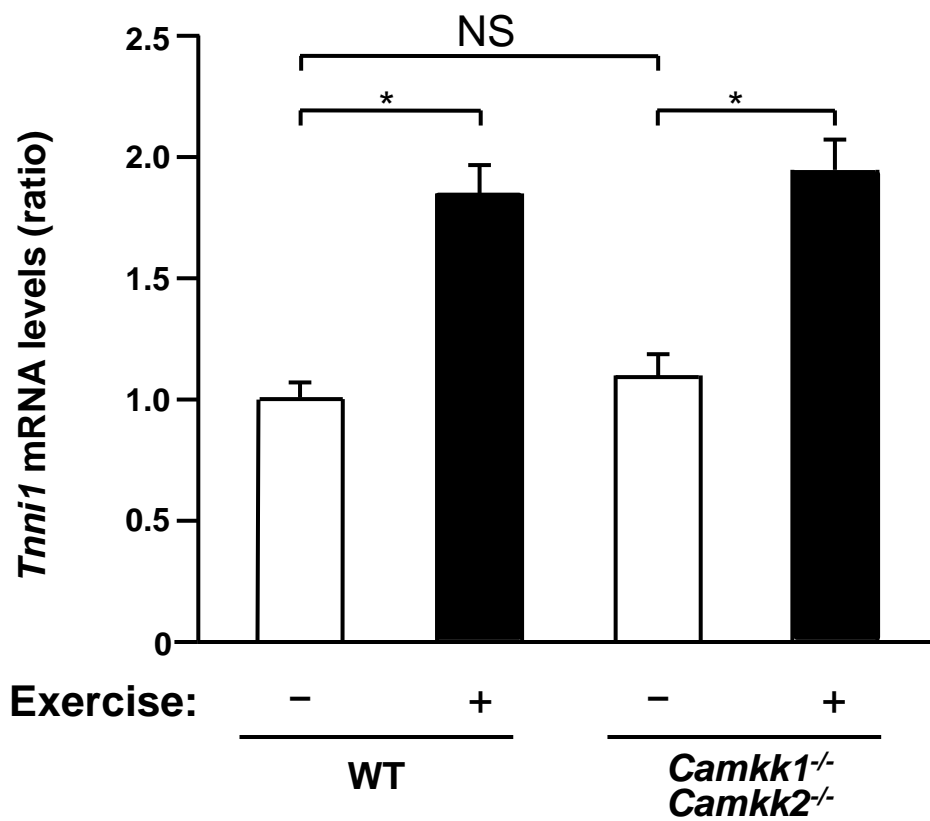
B



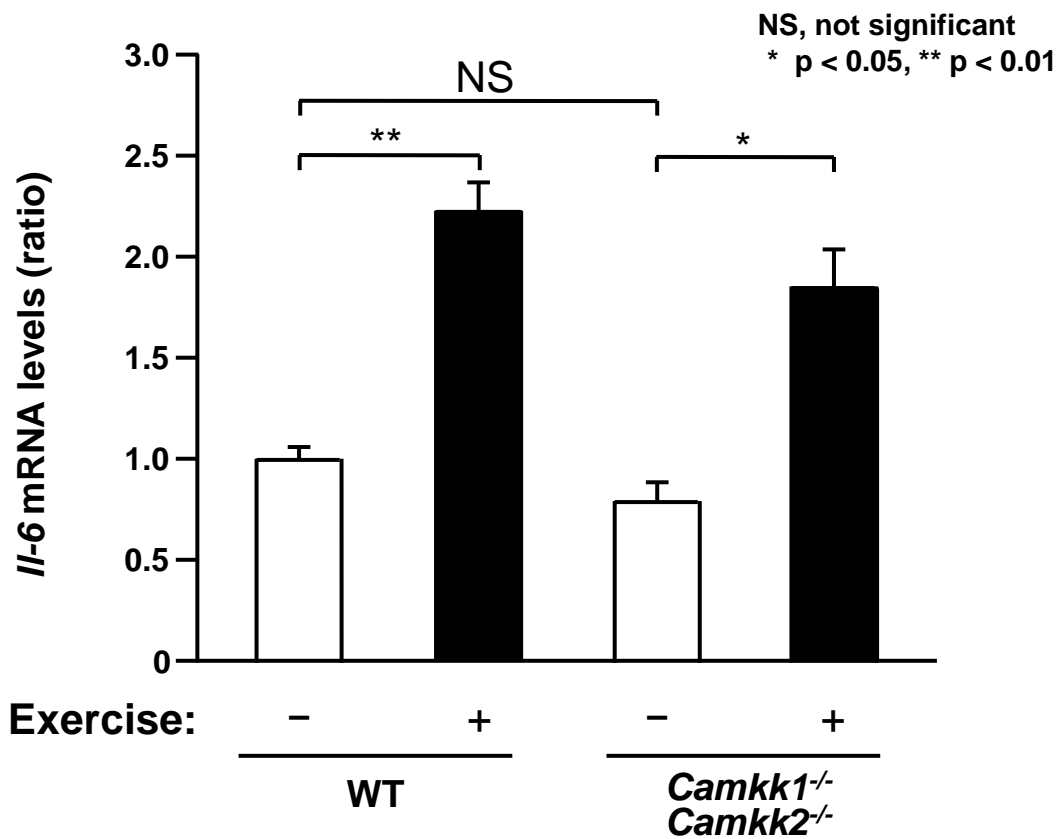
A



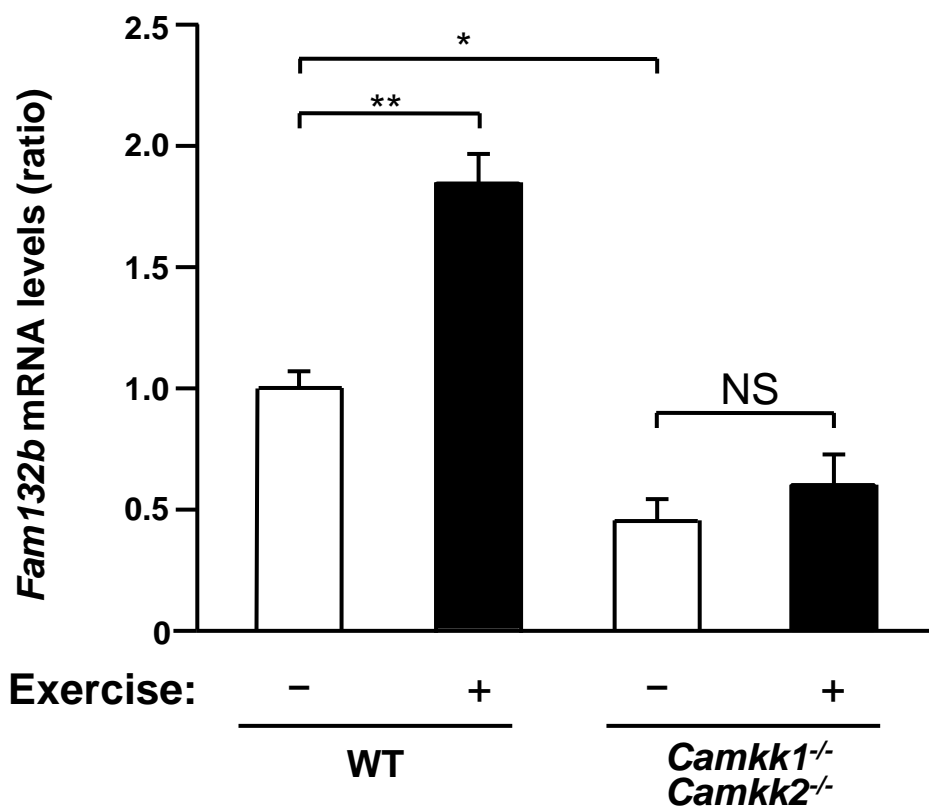
B



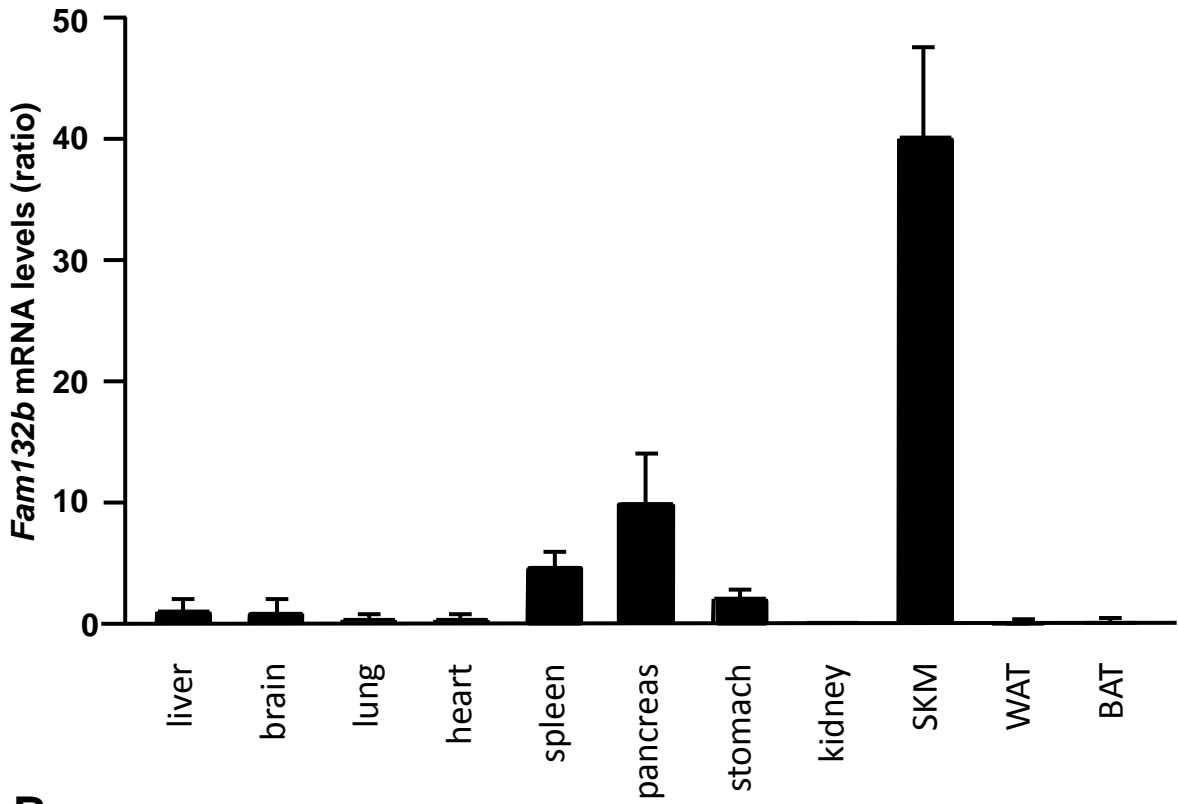
A



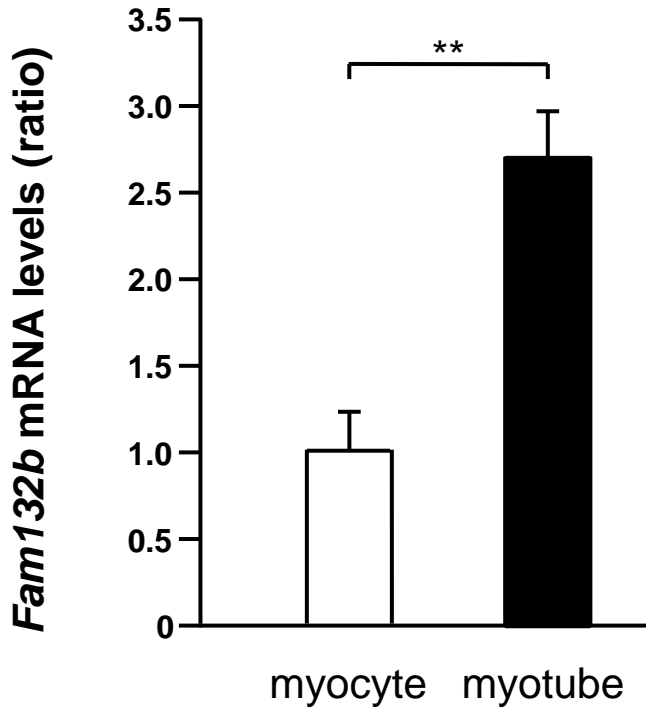
B



A

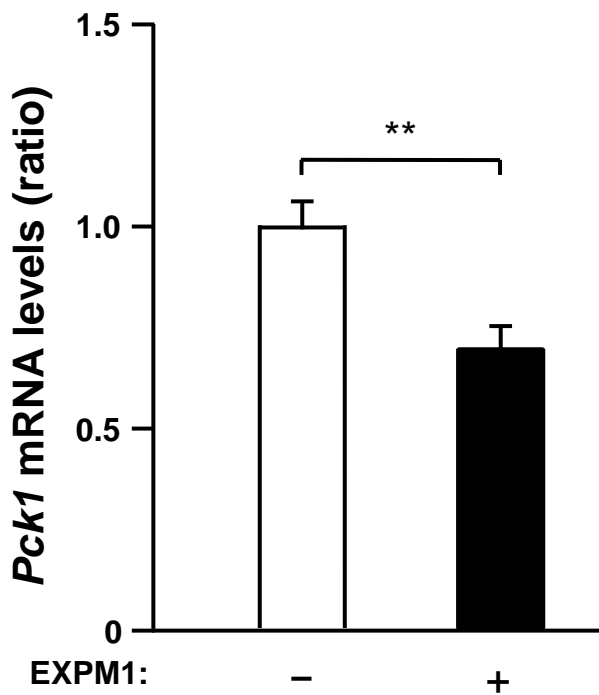


B

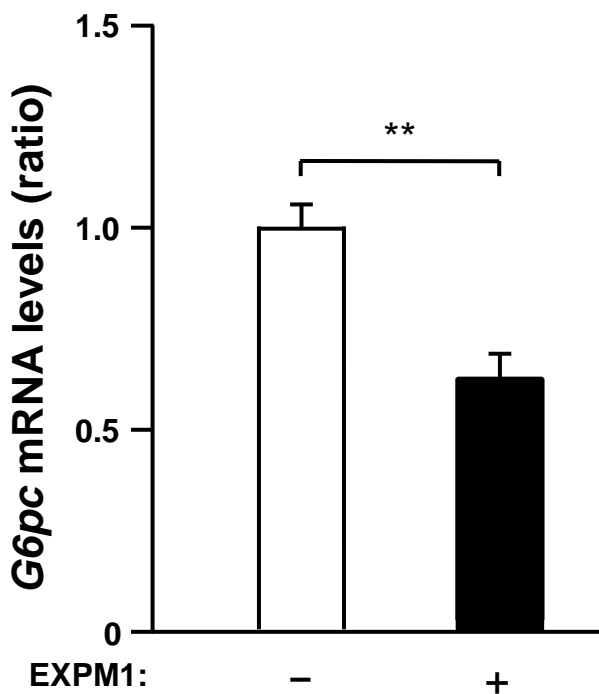


** p < 0.01

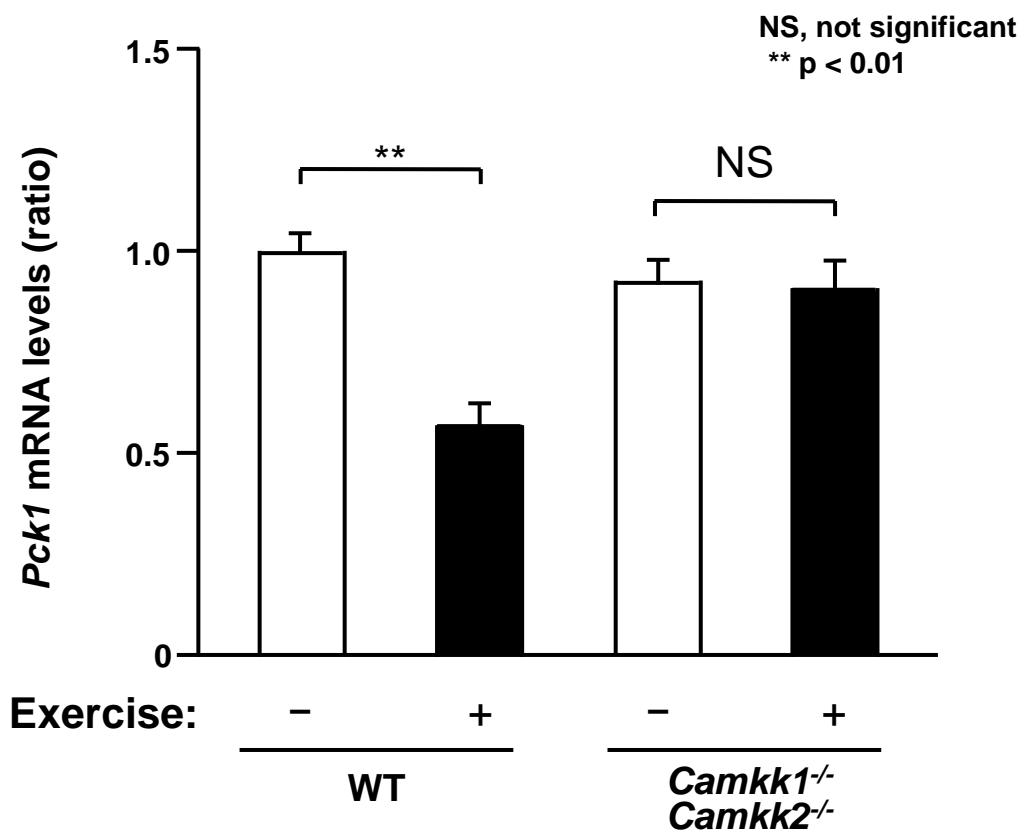
A



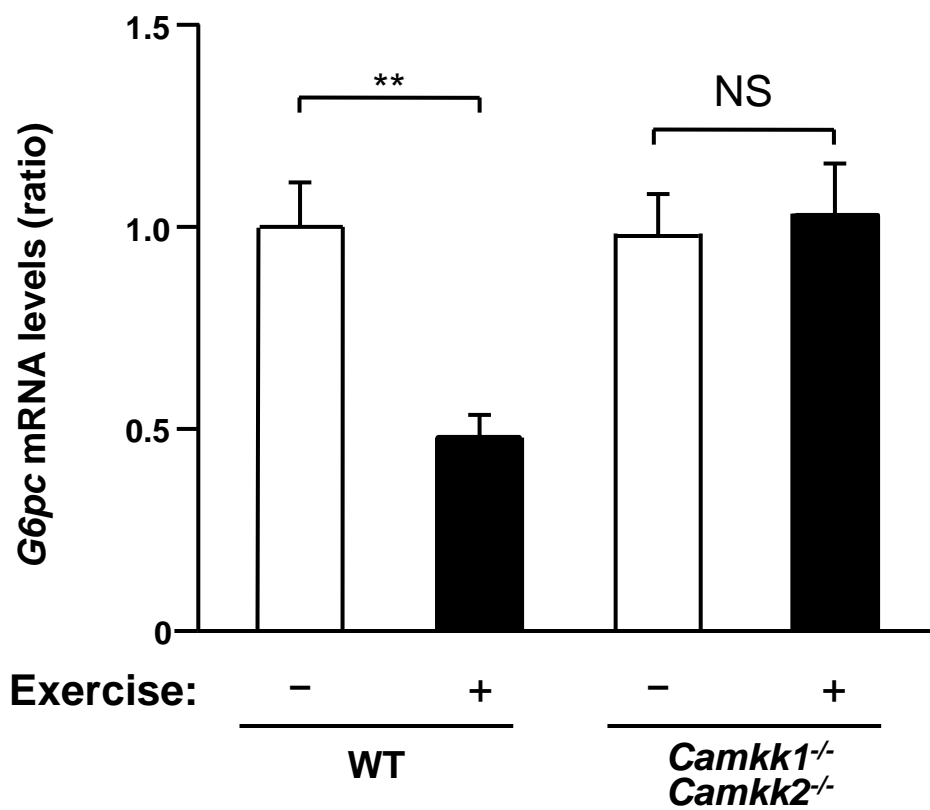
B

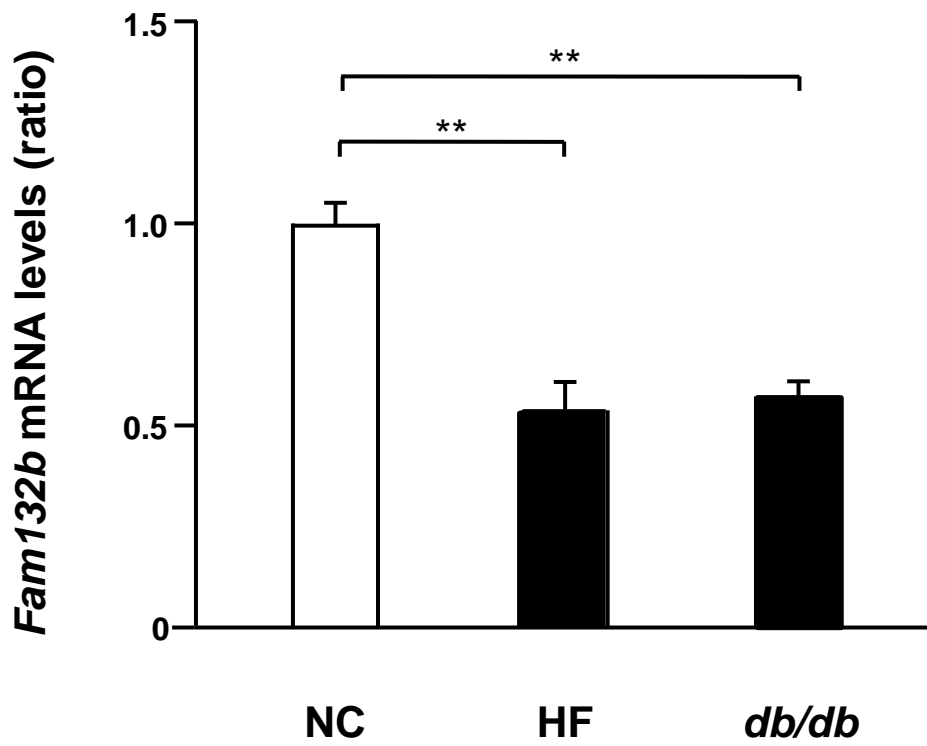


A



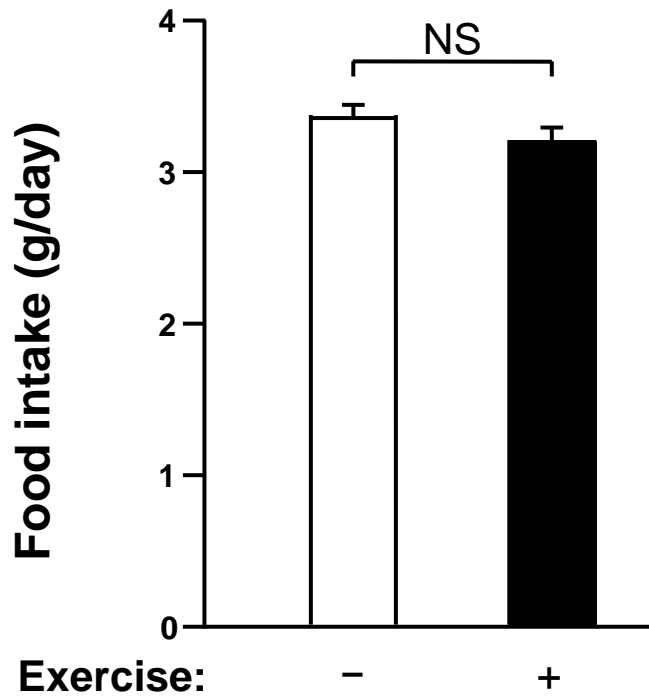
B



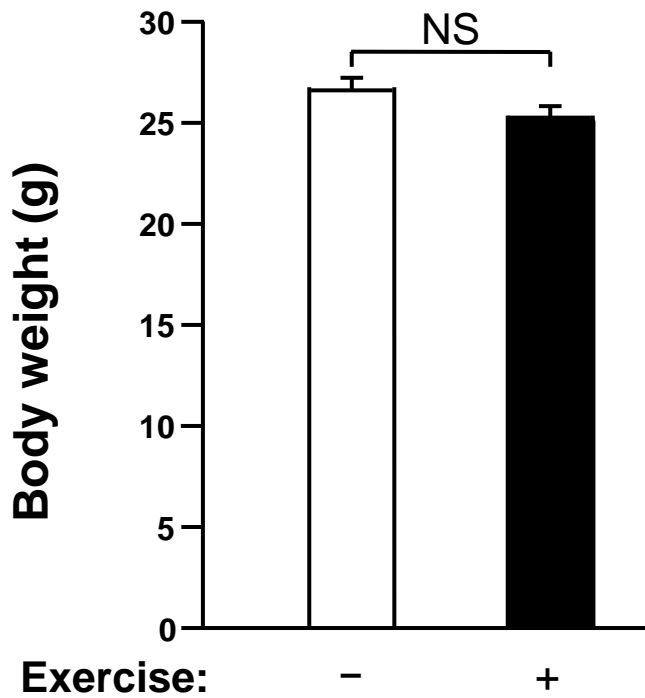
**** p < 0.01**

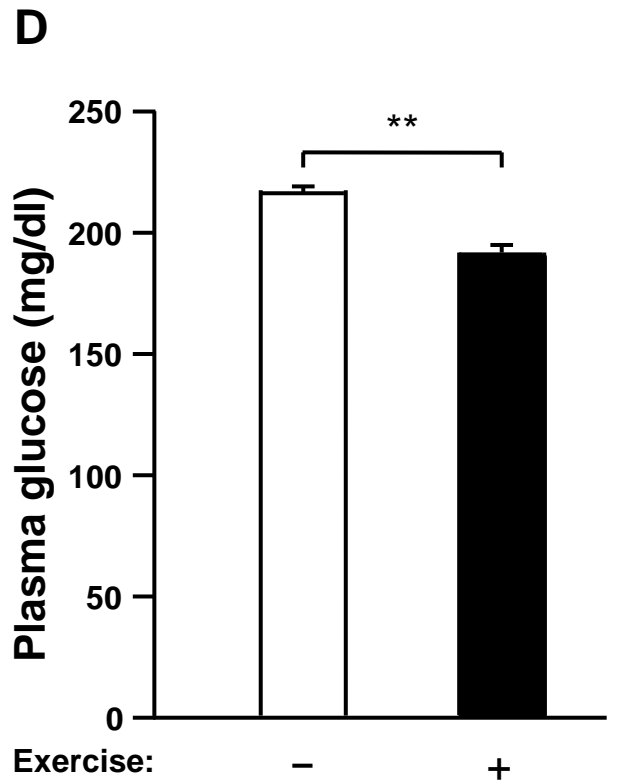
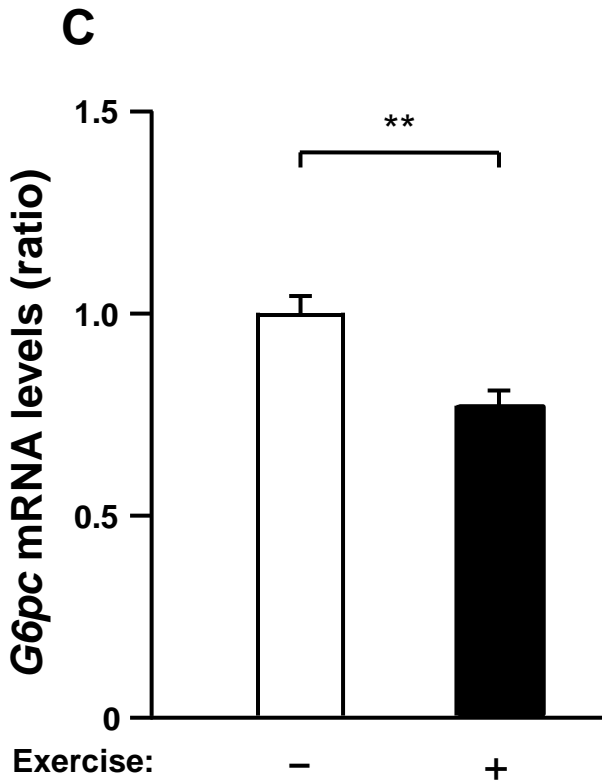
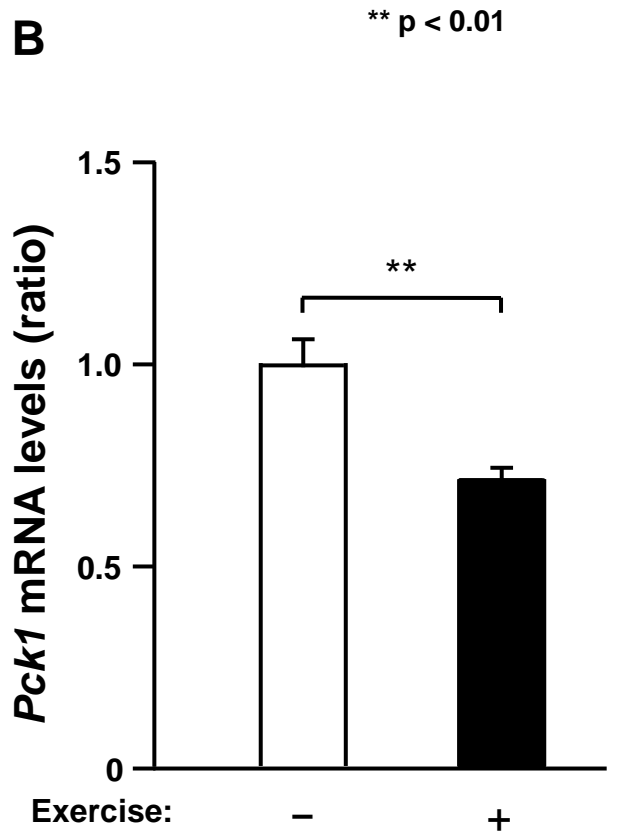
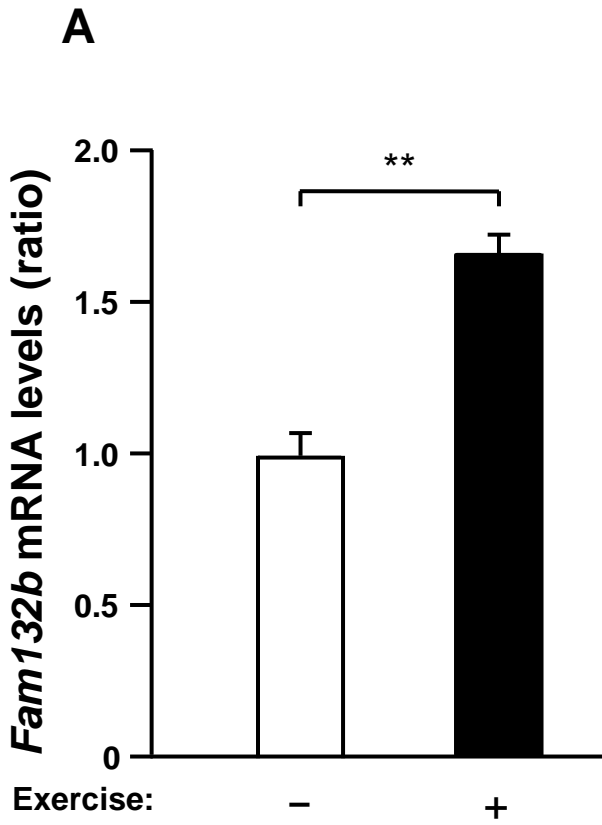
A

NS, not significant



B





CaMKKs/EXPM1を介した運動の糖代謝改善メカニズム(仮説)

