

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 梅松 瞳

序論

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。このエネルギー収支バランスの崩れは、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。

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。さらに、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。

骨格筋に発現する転写コアクティベーター・peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) は、持続的な運動でさらに発現が増加し、ミトコンドリア生合成を正に制御し、筋の質を変化させる。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すことが明らかになっているが、骨格筋におけるCaMKKsの詳細な役割は明らかになっていないことが多い。

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。

結果

野生型マウスおよび CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスに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、摂餌量・体重差は認められなかった。

経口糖負荷試験・インスリン負荷試験を行ったところ、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスは野生型マウスと比較して、耐糖能障害・インスリン抵抗性を有することが明らかになった。さらに CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは、野生型マウスでは認められた、運動による糖代謝改善作用が認められなかった。

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

骨格筋の筋繊維のタイプについて検討した。酸化的酵素活性能の高い Type 1 fiber 遺伝子である Troponin 1 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。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。

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。

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・マイオカインが各臓器に作用し、糖代謝を調節していることが明らかとなり注目されている。代謝と関連する可能性が指摘されているマイオカイン X について検討した。マイオカイン X の骨格筋における発現を検討したところ、CaMKK α ・CaMKK β 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。また、野生型マウスでは運動により骨格筋でのマイオカイン X の発現は増加したが、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスでは、運動によるマイオカイン X の発現上昇は認められなかった。

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、マイオカイン X が関与している可能性が示唆された。

マイオカイン X の組織での発現量を検討した結果、マイオカイン X 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。また、C2C12 骨格筋細胞を用いて、分化前と分化誘導後のマイオカイン X の発現量の変化を調べたところ、骨格筋細胞の分化に伴い、発現量が増加した。

マイオカイン X 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肥満に伴って血中濃度は低下し、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。また、アディポネクチンは肝臓においては、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。そこで、マイオカイン X 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、Fao 細胞を用いて検討したところ、マイオカイン X により糖新生関連酵素の発現が抑制された。骨格筋より分泌されるマイオカイン X が、肝臓における糖新生を抑制する可能性が示唆された。

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、糖新生関連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糖新生関連遺伝子の発現が増加していた。さらに、野生型マウスでは運動により肝臓における糖新生関連遺伝子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。

また、野生型マウスと比較して、高脂肪食負荷マウス、肥満・2型糖尿病モデルマウスの骨格筋では、マイオカイン X の発現が低下していた。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マイオカイン X の発現低下が関与している可能性が示唆された。

高脂肪食負荷マウスにトレッドミル運動を行ったところ、摂餌量および体重に有意差は認められなかったが、運動群においては骨格筋におけるマイオカイン X の発現量は増加し、肝臓における糖新生関連遺伝子の発現低下が認められ、個体レベルでの血糖値の低下が認められた。

考察

今回、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスを作製し解析を行ったが、CaMKK α ・CaMKK β ダブル欠損マウスは野生型マウスと比べて摂餌量・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 X 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、血中のマイオカイン X 濃度が低下している可能性を想定している。

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マイオカイン X が関与している可能性が明らかになった。これまでに、マイオカイン X 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、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マイオカイン X 発現増加が認められなかったことより、マイオカイン X 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、骨格筋におけるマイオカイン X の発現量の変化を検討したが、今後さらに血中のマイオカイン X 濃度の変化を検討することが重要である。また、マイオカイン X 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、マイオカイン X を肥満・2型糖尿病モデルマウスに投与し、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。さらに、現在、マイオカイン X 欠損マウスを作製しており、マイオカイン X 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、さらには運動抵抗性を有するかどうか検証することは非常に重要である。

本研究において、マイオカイン X 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、運動量と血中のマイオカイン X 濃度の変化を調べることにより、マイオカイン X がこれまでに無い新規の運動療法の効果指標として臨床応用出来る可能性が示唆された。