

Title	Evidence for acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase by metformin and salicylate in rat skeletal muscles(Abstract_要旨)
Author(s)	Oshima, Rieko
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-03-23
URL	http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k19057
Right	学位規則第9条第2項により要約公開
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(続紙 1)

京都大学	博士 (人間・環境学)	氏名	大島 里詠子
論文題目	Evidence for acute activation of 5'-AMP-activated protein kinase by metformin and salicylate in rat skeletal muscles (ラット骨格筋におけるメトホルミン及びサリチル酸によるAMPキナーゼの急性的活性化に関する検討)		

(論文内容の要旨)

骨格筋は糖・脂質・エネルギー代謝を司る重要器官であり、その主要制御分子として5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) が知られている。運動は糖尿病患者において血糖降下作用を有するが、その効果の少なくとも一部は、筋収縮によって惹起される骨格筋AMPKの活性化を介した機序によるものと考えられている。本論文は、メトホルミン (metformin: MET) 及びサリチル酸 (salicylate: SAL) の血糖降下機序の解明を目的として、これらの薬剤が骨格筋AMPKの活性化作用を有する可能性を詳細に検討したものであり、全5章から構成される。

第1章では、MET及びSALの血糖降下作用について概説したうえで、研究全体の意義と目的の概略を記述した。

第2章では、既存研究のまとめとして、METの起源と歴史、2型糖尿病におけるMETの血糖降下作用、METによる肝臓での糖新生の抑制、METによる骨格筋AMPK活性化と先行研究間での相違、薬物輸送体organic cation transporter (OCT) の種類と全身における発現分布、SALの起源と歴史、炎症性サイトカイン転写調節因子nuclear factor- κ Bに対するSALの阻害効果、及びSALによるAMPK活性化に関する先行研究について概説した。

第3章では、METに関して行った研究について記述した。METの主な標的器官は肝臓とされているが、METが骨格筋に作用することも知られており、近年、肝臓と骨格筋に共通する標的分子としてのAMPKの重要性が報告された。しかし現在のところ、METと骨格筋AMPKの関連を検討した報告は少なく、また報告間の相違もあり、AMPK活性化に関する確証が得られていない。そこで、本研究では、METが骨格筋AMPK活性化作用を持つかについて、ラットから単離した滑車筋 (速筋) 及びヒラメ筋 (遅筋) をMETを含むクレブス緩衝液中でインキュベートする手法を用いることで検証を行った。その結果、METは滑車筋とヒラメ筋の両者において骨格筋細胞内に取り込まれ、濃度・時間依存的にAMPK酵素活性の指標である α サブユニットThr¹⁷²リン酸化を促進し、10 mmol/L、120分間の刺激によって最大作用を示すことが明らかになった。骨格筋には異なる α サブユニットをもったAMPK (AMPK α 1、AMPK α 2) が存在するが、METはこの両者をともに活性化した。さらにAMPKは細胞内のエネルギーレベルの低下に反応して活性化されることが知られているが、METは骨格筋のエネルギー指標であるアデノシン3リン酸、クレアチンリン酸、及び

グリコーゲン含有量を低下させた。また、骨格筋では、AMPK活性化に伴ってインスリン非依存的糖輸送が促進されることが知られているが、METはインスリン受容体シグナルに影響を与えずに3-O-methyl-D-glucose (3MG) 輸送活性を亢進させた。一方、METによるAMPK活性化及び糖輸送促進作用はOCTの阻害剤であるシメチジンによって抑制された。また、ラット生体に対するMETの腹腔内投与実験では、単離筋から得られた結果と一致して、AMPK α 1及びAMPK α 2活性が亢進した。以上の結果から、METはOCTを介して骨格筋細胞内に取り込まれ、エネルギーレベルの低下を伴った急性的AMPK活性化を惹起し、インスリン非依存的糖輸送を促進するものと結論した。

第4章では、SALに関して行った研究について記述した。解熱・鎮痛剤として古くから用いられてきたSALは、近年になって抗糖尿病作用を示すことが報告され、その作用機序にAMPKの関与が示唆されるようになった。しかし、骨格筋を対象とした報告がほとんどなく、AMPK活性化に関する確証も得られていないことから、ラット単離筋を用いた検討を行った。その結果、SALは滑車上筋とヒラメ筋の両者において骨格筋細胞内に取り込まれ、濃度・時間依存的に α サブユニットThr¹⁷²リン酸化を促進し、5 mmol/L、30分間の刺激によって最大作用を呈することが明らかになった。また、SALはAMPK α 1及びAMPK α 2をともに活性化した。さらにSALは骨格筋細胞内のエネルギー指標を低下させるとともに、インスリン受容体シグナルに影響を与えずに3MG輸送活性を促進した。以上のことより、SALはMETと同様に骨格筋細胞内に取り込まれ、エネルギーレベルの低下を伴った急性的AMPK活性化を惹起し、インスリン非依存的糖輸送を促進するものと結論した。

第5章では、本論文の要約を記述するとともに、結語として、MET及びSALが骨格筋AMPKの急性的活性化作用を持つことを述べ、骨格筋AMPKの活性化がMET及びSALの血糖降下作用に一定の役割を担っている可能性を提唱した。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

骨格筋は体内最大の糖代謝器官であるとともに、個体のインスリン感受性を規定する重要な役割を担っている。近年、運動中の骨格筋において、糖代謝の主要制御分子である5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) が急性的に活性化され、その結果として、インスリン非依存的糖輸送の促進、糖輸送担体glucose transporter 4

(GLUT4) の発現、ミトコンドリアの増加など、抗糖尿病的に作用する様々な生体反応が惹起されることが明らかにされた。本論文は、世界的に最も頻用されている血糖降下剤であるメトホルミン (metformin: MET) 及び、近年になって血糖降下作用を持つことが報告されたサリチル酸 (salicylate: SAL) の作用機序解明を目的として、これらの薬物が骨格筋AMPKの活性化作用を持つ可能性を、実験動物を用いて詳細に検討したものである。

申請者は、基本的な実験系として、ラットから単離した骨格筋を酸素化されたクレブス緩衝液中でインキュベートする手法を採用した。この手法を通じて、血液循環や体液性因子、神経系、消化器系などの影響を受けずに骨格筋への薬物の直接的作用を解析することが可能となった。また、速筋に分類される滑車筋と遅筋に分類されるヒラメ筋に対して、同一の環境で薬物を作用させることが可能となり、薬物の効果が筋タイプ特異性を持つかどうかの判定が容易になった。

申請者は、第1の研究としてMETについて解析した。その結果、METは滑車筋とヒラメ筋の両者において急性に取り込まれ、濃度・時間依存的にAMPKを活性化することが明らかになった。骨格筋には異なる活性サブユニットを持ったAMPK分子 (AMPK α 1、AMPK α 2) が存在するが、METはこの両者をともに活性化した。また、AMPKは細胞内エネルギーの低下に反応して活性化されることが知られているが、METは骨格筋のエネルギー指標 (アデノシン3リン酸、クレアチンリン酸、グリコーゲン) を減少させた。さらにMETはインスリン受容体シグナルの活性化を生じずに糖輸送活性を促進した。一方、薬物輸送体organic cation transporter (OCT) を薬理的に阻害することで、METによるAMPK活性化と糖輸送活性化がともに抑制された。また、ラットに対するMETの生体投与実験において、単離筋実験から得られた結果と同様に、AMPK α 1及びAMPK α 2活性が亢進することが確認された。これらの結果は、METがOCTを介して細胞内に取り込まれ、エネルギーレベルの低下を誘導して骨格筋AMPKを活性化する機序を明確に提示するものであり、国際専門誌 *Metabolism* 第64巻 第2号 296-304頁 (2015年発行) に掲載された。

申請者は、第2の検討としてSALについて解析し、SALが滑車筋とヒラメ筋の両者に急性に取り込まれ、濃度・時間依存的にAMPKを活性化することを示した。また、SALがAMPK α 1及びAMPK α 2の両者を活性化することを示すとともに、イン

スリン受容体シグナルの活性化を生じずに糖輸送活性を促進すること、また骨格筋のエネルギー指標を減少させることを示した。これらの研究結果は、SALが、METと同様に、エネルギーレベルの低下を誘導して骨格筋AMPKを活性化する機序を明示するものであり、国際専門誌 *Biochemical and Biophysical Research Communications* 第453巻 第1号 81-85頁（2014年発行）に掲載された。

従来、METの血糖降下作用は、主に肝臓におけるインスリン感受性改善とそれに伴う糖新生の抑制によるものと考えられてきた。これに対して、本論文は、METが骨格筋AMPKの活性化を介して血糖降下作用を発揮する実験的証拠を新しく提示したものと位置づけられる。また、本論文は、作用機序に不明な点が多かったSALの血糖降下作用についても、骨格筋AMPKの関与を示す実験的証拠を新しく提示したものである。このように、本論文は、ともに抗糖尿病作用を持つ運動とMET及びSALとの間に「骨格筋AMPKの急性的活性化」という共通機序が存在する可能性を提唱した独創的かつ学術的意義の高いものであり、人間・環境学研究科 認知・行動科学講座 身体機能論分野の研究として高く評価できる。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：2015年3月24日以降