

「脂質耐性」のメカニズムに関する研究

佐藤 文彦、田村 好史、竹野 景海、綿田 裕孝

順天堂大学大学院 代謝内分泌内科学・スポーツロジックセンター

Abstract

The accumulation of intramyocellular lipid (IMCL) is regarded to be a cause of insulin resistance. On the other hand, increased accumulation of IMCL is also observed in insulin sensitive subjects (athlete's paradox). It is still unknown why these insulin sensitive subjects are insulin sensitive despite the presence of the IMCL accumulation. The understanding of this difference would eventually contribute to further understanding of pathophysiology of insulin resistance. Here, we studied 37 non-athletes, non-obese healthy men. The IMCL levels in tibialis anterior muscle were measured by ^1H -MRS and peripheral insulin sensitivity (GIR) was evaluated by euglycemic-hyperinsulinemic clamp (IIR=100mU/m²/min). Muscle biopsy sample was obtained from vastus lateralis and gene expressions were evaluated by RT-qPCR. After evaluation of IMCL and GIR, we included 17 from 37 subjects whose IMCL levels were higher than mean value. Then, we compared gene expression in skeletal muscle between subjects with upper (>11.0 mg/kg/min, n=6, HGIR group) and lower (<8.1mg/kg/min, n=6, LGIR group) tertiles of GIR in the subgroup. Although, IMCL level was not significantly different between the groups, gene expression of fatty acid transporters, CD36 and FABP, are ~2 times higher in HGIR group compared with LGIR group, while FATP gene expression level was decreased by 50% in HGIR group. The expression levels of lipid oxidative genes (CPT1, HADHB, ASCL, ACC2, PDHa, ATGL) were 1.5~4 times higher in HGIR group. While most of these gene expressions are regulated by

PPAR α and its co-activator PGC-1 α whose activity is positively regulated by AdipoR1 signal cascade, PPAR α and AdipoR1 expression levels were 2 times higher in HGIR group compared with LGIR. On the other hand, the expression levels of lipid synthesis gene (FAS) decreased by ~50% in HGIR group, while other genes (GPAT, AGPAT2, Lipin1, DGAT1) were comparable. In summary, our data suggest that higher expression level of PPAR α and adiponectin signal might be a major cause of higher insulin sensitivity despite the presence of IMCL accumulation that is typically observed in endurance athletes.

1. 緒言

2型糖尿病における病態上、重要なものの一つに骨格筋におけるインスリン抵抗性がある(1-4)。過去に行われた報告により、骨格筋細胞内に蓄積した脂質(IMCL; intramyocellular lipid) がインスリン感受性と関連することが指摘されてきている(4-6);(7; 8)。この点について、細胞内におけるIMCLに関連した物質である、ジアシルグリセロールやセラミドがインスリンシグナル伝達を阻害してインスリン抵抗性を惹起していることが、仮説として提唱されている (3)。

身体活動はIMCLの量を変化させうる (9-11)。例えば、1時間のランニングにより、IMCLが~25% 減少したことが報告されている (10)。これらのことは、比較的高強度の運動はIMCLを減少させうることを示唆している (10; 11)。しかしながら、運動を長期間続けた場合には、その変化は一様ではない。例えば、2週間の食事運動療法はIMCLを約20%減少させ、インスリン抵抗性を改善した(9)。その一方で持続的アスリートでは、IMCLが多いのにもかかわらずインスリン感受性が高い (12)。この現象はアスリートパラドックスと言われ、高強度のトレーニングによる骨格筋の適応現象と考えられる (12; 13)。この点について、最近、肥満者においても高強度の運動がアスリートと同様にIMCLを増加させうることを報告された(14)。これらのことをまとめると、軽度の身体活動 (例; 日常身体活動) はIMCLを減少し、慢性的な高強度の運動はIMCLを増加させることが示唆される。これらのメカニズムとして、骨格筋が脂質に対する耐性を持ち、インスリン抵抗性が惹起されにくいことが推測されるが、このメカニズムについては、未だ明らかとなっていない。

我々は本研究においてIMCLが増加していてもインスリン抵抗性が惹起されない状態を「脂質耐性」と定義し、それに関連する骨格筋における遺伝子発現について検討をした。

2. 研究方法

対象は非肥満の非アスリートの健常者37名とした。試験期間中は、高強度の運動は禁止とした。試験食開始7日まえから、日常身体活動量をメモリー付き加速度計で測定した。その後、すべての被験者は身体活動量を平均 \pm 10% の範囲にコントロールするように指導された。3日間の普通脂肪食後にIMCLは ^1H -MRS法で測定され、インスリン感受性は高インスリン正常血糖クランプ法で測定された。骨格筋サンプルは局所麻酔後に針生検により採取され、RNAを抽出し遺伝子発現レベルをqRT-PCR法にて測定を行った。最大酸素摂取量は過去に行われた方法と同様にしてエルゴメーターを用いて測定された(15)。

IMCLの測定は過去に行われた方法と同様に行われ (9; 15-17)、IMCL はクレアチンで補正した値を用いた。高インスリン正常血糖クランプは人工膵臓(STG22; 日機装)を用いて行われた(9)。インスリン感受性は最後の15分の糖注入率(GIR)の平均値を用いて、末梢のインスリン感受性の指標とした(9; 15-17)。全員の測定後、IMCLが平均値よりも高かった被験者17名をGIRの程度により3分割し、高いグループ(HGIR)と低いグループ(LGIR)の2群間について、骨格筋における遺伝子発現パターンについて比較を行った。

。

すべてのデータは、平均値±標準誤差で表記した。2群の差の検定はunpaired t-testで行った。統計学的な有意差は $P < 0.05$ とした。

3. 結果

HGIR群では、LGIR群に比較して有意にBMIが低く、最大酸素摂取量が高かった(data not shown)。IMCLについては両群間に有意差を認めなかった。骨格筋における遺伝子発現を比較すると、脂肪酸の取り込みに関わる遺伝子群については、CD36 と FABPはLGIR群と比較して、HGIR群において約2倍の発現量を認めたが、FATPについては発現量が50%低下していた。脂肪酸酸化にかかわる遺伝子群 (CPT1, HADHB, ASCL, ACC2, PDHa, ATGL) については1.5~4 倍HGIR 群で高い発現であった。これらの遺伝子群の発現は、AdipoR1を介したアディポネクチンシグナルが、その下流でPPAR α とその共役因子であるPGC-1 α を調節することにより、正に制御されていることが知られている。そこで、それらの遺伝子発現について検討したところ、PPAR α とAdipoR1の発現はHGIR群ではLGIR群と比較し2倍高いことが明らかとなった。その一方で、脂肪酸合成に関わる遺伝子については、FASが約50% HGIR群で低下していたが、それ以外の遺伝子群(GPAT, AGPAT2, Lipin1, DGAT1)においては両群ではほぼ同等であった。

4. 考察

本研究において、HGIR群の遺伝子発現の特徴として、脂肪酸酸化に関わる遺伝子発現が高いことが明らかとなった。その上流として、アディポネクチンシグナルやPPAR α の関与が示唆された。これらの遺伝子発現の制御が、脂質耐性のメカニズムの一部である可能性が示唆された。

アディポネクチンは、30-kDa の蛋白であり脂肪細胞から分泌される (18)。アディポネクチンは複合体を形成しており、その分子量から低分子、中分子、高分子 (high-molecular weight (HMW))アディポネクチンに分類される(18)。動物モデルにより、アディポネクチンはAdipoR1を介して骨格筋におけるAMPキナーゼやPPAR α を活性化し、細胞内脂質を減少させインスリン抵抗性を改善する可能性が示されている (19)。実際、血中のアディポネクチン濃度はIMCLと負の相関を示すことが明らかとなっている (20; 21)。しかしながら、本研究においては、LGIR群とHGIR群の間ではIMCLの差が認められなかった。このことは、脂肪酸取り込みに関わる遺伝子がHGIR群で全体的に高発現であったことが関与しているかもしれない。

それでは、脂質耐性の本質的なメカニズムは何であろうか？本研究からはその直接的なメカニズムは明らかではない。現在の所、細胞内でインスリン抵抗性を惹起する物質として、最も重要であると考えられているものの一つに、diacylglycerol (DG)がある。細胞内に中性脂肪が存在すると、その時に生じる代謝産物としてDGが増加する。例えば、げっ歯類において、FFAを静脈内投与すると、骨格筋におけるインスリン抵抗性が惹起されるが、それと同時に細胞内のdiacylglycerol (DG)の増加、セリン/スレオニンキナーゼであるプロテインキナーゼC (PKC) θ の活性化とinsulin receptor substrate (IRS)-1のセリン残基のリン酸化が観察される。IRS-1はこのリン酸化により、インスリン刺激によるチロシン残基のリン酸化が抑制され、これがIMCL蓄積によるインスリン抵抗性発生のメカニズムの一つであると推測されている(22; 23)。本研究での2群間の遺伝子発現から想定されるIMCLの蓄積は対照的であることが予想される。つまり、

LGIR群では脂質の燃焼が低下することにより蓄積し、HGIR群では脂質の取り込みを促進することがIMCL蓄積の中心的な経路であるように見える。また、それらを上流でコントロールしているのが、アディポネクチンシグナルである可能性も残される。これらの差が、細胞内脂質の質的な差を生み出し、インスリン抵抗性に与える影響が違うのかもしれない。これらの事象については、今後さらなる検討が必要である。

References

1. Boden G, Shulman GI: Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest* 32 Suppl 3:14-23, 2002
2. Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L: Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr* 22:325-346, 2002
3. Perseghin G, Petersen K, Shulman GI: Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S6-11, 2003
4. McGarry JD: Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:7-18, 2002
5. Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD, Haring HU: Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 48:1113-1119, 1999
6. Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, Loviscach M, Stumvoll M, Claussen CD, Schick F, Haring HU, Jacob S: Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 50:2579-2584, 2001
7. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Roden M, Shulman GI: Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42:113-116, 1999
8. Virkamaki A, Korshennikova E, Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, Halavaara J, Hakkinen AM, Yki-Jarvinen H: Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes* 50:2337-2343, 2001
9. Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, Choi JB, Watada H, Niwa M, Kinoshita J, Ooka A, Kumashiro N, Igarashi Y, Kyogoku S, Maehara T, Kawasumi M, Hirose T, Kawamori R: Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3191-3196, 2005
10. Decombaz J, Schmitt B, Ith M, Decarli B, Diem P, Kreis R, Hoppeler H, Boesch C: Postexercise fat intake repletes intramyocellular lipids but no faster in trained than in sedentary subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R760-769, 2001
11. Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Hunter GR: Influence of endurance running and recovery diet on intramyocellular lipid content in women: a 1H NMR study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E95-E106, 2002
12. Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE: Skeletal muscle lipid content and

insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5755-5761, 2001

13. van Loon LJ, Goodpaster BH: Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* 451:606-616, 2006

14. Dube JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Sauers SE, Goodpaster BH: Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E882-888, 2008

15. Tamura Y, Watada H, Igarashi Y, Nomiya T, Onishi T, Takahashi K, Doi S, Katamoto S, Hirose T, Tanaka Y, Kawamori R: Short-term effects of dietary fat on intramyocellular lipid in sprinters and endurance runners. *Metabolism* 57:373-379, 2008

16. Sato F, Tamura Y, Watada H, Kumashiro N, Igarashi Y, Uchino H, Maehara T, Kyogoku S, Sunayama S, Sato H, Hirose T, Tanaka Y, Kawamori R: Effects of diet-induced moderate weight reduction on intrahepatic and intramyocellular triglycerides and glucose metabolism in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3326-3329, 2007

17. Tamura Y, Watada H, Sato F, Kumashiro N, Sakurai Y, Hirose T, Tanaka Y, Kawamori R: Effects of metformin on peripheral insulin sensitivity and intracellular lipid contents in muscle and liver of overweight Japanese subjects. *Diabetes Obes Metab* 10:733-738, 2008

18. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K: Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116:1784-1792, 2006

19. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T: Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295, 2002

20. Thamer C, Machann J, Tschritter O, Haap M, Wietek B, Dahl D, Bachmann O, Fritsche A, Jacob S, Stumvoll M, Schick F, Haring HU: Relationship between serum adiponectin concentration and intramyocellular lipid stores in humans. *Horm Metab Res* 34:646-649, 2002

21. Weiss R, Dufour S, Groszmann A, Petersen K, Dziura J, Taksali SE, Shulman G, Caprio S: Low adiponectin levels in adolescent obesity: a marker of increased intramyocellular lipid accumulation. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2014-2018, 2003

22. Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G: Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B α . *Diabetes* 51:2005-2011, 2002

23. Petersen KF, Shulman GI: Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type

2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90:11G-18G, 2002