

# AMP-activated protein kinase 活性化作用を有する糖尿病改善薬 メトフォルミンが骨格筋代謝特性に及ぼす影響の基礎的検討

キーワード：AMPK, メトフォルミン, 持久的トレーニング, 骨格筋代謝特性

健康科学コース

江頭 徹

## 1. 緒言

持久的トレーニングが体力の向上や代謝性疾患の予防・改善に貢献していることはよく知られている。持久的トレーニングを継続することにより、骨格筋の酸化系酵素活性の増加（ミトコンドリアの増殖）や糖輸送担体 GLUT4 蛋白発現の増加などが観察され、骨格筋の脂質代謝能や糖代謝能を高めることが多く報告されている。また、肥満者や 2 型糖尿病患者の骨格筋では酸化系酵素活性などが低下しており、病態との関連性が指摘されている。これらの背景から肥満者や代謝性疾患患者にはしばしば持久的運動が処方されている。

持久的トレーニングが骨格筋代謝特性に効果をもたらす機序の一つとして AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化が挙げられる。持久的運動の最中や直後では骨格筋内の ATP/AMP 比の減少やクレアチニン酸濃度の減少などエネルギー不足状態の状態になり、AMPK がアロステリックに活性化される。持久的トレーニング及び AMPK 特異的活性化剤 (AICAR) により慢性的に AMPK を活性化すると酸化系酵素活性の増加、ミトコンドリアの増殖、糖輸送担体 4 (GLUT4) や脱共役蛋白 3 型 (UCP3) の増加が生じることが報告されている (Frøsig et al. 2004; Suwa et al. 2003)。このことから、持久的トレーニングによる骨格筋の適応現象の少なくとも一部は AMPK を介したシグナル伝達経路を介していると予想される。

最近、糖尿病改善薬のメトフォルミンが、骨格筋の AMPK を活性化することが報告されている (Musí et al. 2002)。メトフォルミンは、2 型糖尿病患者に広く使われるピグアナイド系経口血糖降下剤である。同じピグアナイド系であるフェンホルミンでは乳酸アシドーシスによる死亡例が少なからず認められ、使用されることが少な

くなった。ところが、メトフォルミンの優れた効果に関する報告が増加し、臨床的価値が再評価されるようになってきた。しかしながら、メトフォルミンの作用機序はまだ明らかにされていない。

メトフォルミンは持久的トレーニングと同じよう AMPK 活性化作用を有することから、持久的トレーニングによる適応と同様な骨格筋の代謝適応を促している可能性がある。これらのことから、本研究は骨格筋代謝特性に及ぼすメトフォルミン慢性投与の影響を検討した。

## 2. 方法

### 1) 被検動物

被検動物は、8 週齢 Wistar 系雄性ラット (n=16) を用いた。ラットは小型ケージに 1 匹ずつ飼育し、飼育室は 12 時間毎の明暗サイクルで、室温は  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  に設定された。本実験の全ての手順は「中村学園大学における動物実験のための指針」に従った。被検動物は対照群 (n=8) とメトフォルミン投与群 (n=8) に分類した。メトフォルミン投与群は、オリエンタル酵母社製ラット飼料 MF へのメトフォルミン 1% 混餌投与を 2 週間行った。対照群は摂食量をメトフォルミン投与群に一致させた。2 週間の飼育後、4 時間の絶食後に尾部より採血して血糖 (Antsense II, 三共株式会社) および血中乳酸 (Lactate pro アークレイ株式会社) を測定した。その後、50mg/kg のペントバルビタールナトリウム腹腔内注射で麻酔し、直ちにヒラメ筋と腓腹筋を摘出した。筋重量を測定した後、得られた筋サンプルはすぐに液体窒素で凍結し、分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。筋摘出後、心臓より採血を行い、最後に精巣周囲脂肪量を測定した。血液は 30 分放置後 2000rpm で遠心し、血清を分離した。

## 2) 酵素活性

凍結された筋サンプルをホモジナイズし、酵素活性の測定に用いた。酵素活性は温度調整可能な6連セルホルダーつきUV/Vis分光測定器(日本分光JAS V-530)を用い、30°Cで行った。Hexokinase (HK; 糖取り込み), Pyruvate kinase (PK; 解糖系), Lactate dehydrogenase (LDH; 解糖系),  $\beta$ -hydroxyacyl CoA dehydrogenase ( $\beta$ -HAD; 脂肪酸の $\beta$ 酸化)活性は、340nmで測定した。Citrate synthase (CS; TCA回路)活性は、412nmで測定した。

HK分析は、100mM Tris·HCl, 0.4mM NADP, 5mM  $MgCl_2$ , 700U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, 1mM glucose, 5mM ATP, pH 7.0の条件でNADPHの増加を測定した。PK分析は、50 mM Tris·HCl, 0.1 mM KCl, 10 mM  $MgCl_2$ , 0.28 mM NADH, 1.5 mM ADP, 6 U/ml LDH, 5 mM phosphoenolpyruvate, pH 7.6の条件でNADHの減少を測定した。LDH分析は、50 mM Tris·HCl, 0.28 mM NADH, 2.4 mM pyruvic acid, pH 7.6の条件でNADHの減少を測定した。 $\beta$ -HAD分析は、100mM Tris·HCl, 0.28 mM NADH, 5 mM EDTA, 0.1 mM acetoacetyl-CoA, pH 6.9の条件でNADHの減少を測定した。CS分析は、100 mM Tris·HCl, 0.1 mM DTNB, 0.3 mM acetyl-CoA, 3.33 mM  $K_2HPO_4$ , 0.5 mM oxalacetate, pH 8.0の条件でMercaptide ionの増加を測定した。

## 3) 総 GLUT4 蛋白量

筋サンプルをホモジナイズし、25 分間遠心分離した。分離された上清を分離し、筋の蛋白濃度を判定した。その後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(10%アクリルアミド)を行った。その後、ゲルをセミドライ式ブロッティングにより蛋白をPVDFメンブレンに移した。メンブレンは1次抗体に一時間反応させ、続いて2次抗体に30分間浸した。続いてメンブレンはavidin and biotinylated horseradish peroxidase macromolecular complex techniqueを30分間行い、それからdiaminobenzidineと $H_2O_2$ によって可視化された。バンドの密度は、NIH Image 1.62 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD)を使用し判定した。

## 4) 血清インスリン測定

血清インスリン測定は、モリナガ超高感度ラットインスリン測定キット(森永生科学研究所)を用いて行った。ウェルに検体希釈液を分注し、血清検体を添加した後、4°Cで二時間反応させた。反応後、ウェルに酵素標識モット抗ラットインスリン抗体を分注し、常温で30分間静置反応させた。反応後、ウェルに酵素基質溶液を分注し、遮光および常温で40分間静置反応させた。反応後、

反応停止液を添加した。30分以内に、プレートリーダーでウェル吸光度を測定し、血清検体中のラットインスリン濃度を求めた。

## 5) 統計解析

対照群とメトフォルミン投与群の測定項目の比較は、対応のないt検定を用いて行った。統計の有意水準は5%未満とした。

## 3. 結果

### 1) 被検動物の特性

表1には投与前体重、投与後体重、精巣周囲脂肪量、総摂食量、ヒラメ筋重量、腓腹筋重量、血糖値、血中乳酸値および血清インスリン値を示している。血清インスリン値はメトフォルミン投与群が対照群よりも有意に低かった( $p < 0.01$ )。しかしながら、他の項目については対照群とメトフォルミン投与群の間に有意な差は観察されなかった。

表1 被検動物の特性

	対照群 n=8	メトフォルミン投与群 n=8
投与前体重 (g)	267±3	267±2
投与後体重 (g)	329±8	332±5
精巣周囲脂肪 (g)	3.17±0.20	2.91±0.13
総摂食量 (kcal)	947±28	930±27
ヒラメ筋重量 (mg)	120±6	127±5
腓腹筋重量 (mg)	1578±79	1659±35
血糖値 (mg/d)	127±3	124±3
乳酸値 (mM)	1.4±0.1	1.7±0.2
インスリン値 (ng/ml)	5.84±0.36	4.48±0.23*

値は平均値±標準誤差で表示した

\*は対照群との有意差を示す ( $P < 0.05$ )

### 2) 酵素活性

HK活性は、腓腹筋白色部位においてメトフォルミン投与群が対照群よりも増加していた( $p < 0.05$ )。一方、他の筋において両群に有意な差は見られなかった。PK活性は、腓腹筋白色部位においてメトフォルミン投与群が対照群よりも増加していた( $p < 0.05$ )。一方、他の筋において両群に有意な差は見られなかった。LDH活性は、いずれの筋においても両群に有意な差は見られなかった。CS活性は、全ての筋においてメトフォルミン投与群が対照群よりも有意に増加していた(ヒラメ筋、腓腹筋白色部位,  $p < 0.05$ ; 腓腹筋赤色部位,  $p < 0.01$ )。 $\beta$ -HAD活性は、ヒラメ筋においてメトフォルミン投与群が対照群よりも有意に増加していた( $p < 0.05$ )。一方、他の筋において両群に有意な差は見られなかった。

### 3) 総 GLUT4 蛋白量

総 GLUT4 蛋白量は、いずれの筋においても両群に有意な差は見られなかった。

## 4. 考察

本研究では2週間のメトフォルミン投与が、血清インスリン値を有意に低下させたが、血糖の変化は見られなかった。メトフォルミンは、低血糖を起こすことなく、正常血糖には影響を及ぼさない。本研究で用いた動物は、糖尿病モデルやインスリン抵抗性モデルではなく、正常血糖を有するラットである。先行研究において、正常マウスに3週間のメトフォルミン投与 (250 mg/kg/day) を行ったが、血糖の変化は起こらなかった (Bailey et al. 1986)。また他の研究でも、正常ラットに5日間のメトフォルミン投与 (100mg/ml) を行ったが、血糖は変化せず血清インスリン値は有意に低下していた (Zhou et al. 2001)。本研究の結果は先行研究と一致したものであり、少ないインスリンで血糖をコントロールしていることを示唆している。つまり、メトフォルミンがインスリン感受性を改善しているか AMPK を介したインスリン非依存性の経路で糖取り込みを高めている可能性が示唆された。

骨格筋酵素活性に及ぼすメトフォルミンの影響を検討した研究は少ない。Bailey らの研究では、ストレプトゾトシン誘導の糖尿病マウスへ3週間のメトフォルミン投与を行い、骨格筋における HK 活性が上昇することを報告した (Bailey et al. 1986)。本研究でも、2週間のメトフォルミン投与によって腓腹筋白色部位における HK 活性が有意に増加した。HK は、運動時や高インスリン状態における骨格筋の糖取り込みを決定する律速酵素である (Halseth et al. 1999)。Bailey らは、メトフォルミンによる HK 活性の増加を報告し、このことが糖取り込み増加を反映していることを示唆した (Bailey et al. 1986)。さらに、本研究ではメトフォルミン投与によって腓腹筋白色部位における PK 活性が有意に増加した。同じ解糖系酵素である LDH 活性は、本研究において変化が見られなかった。先行研究でも、2週間の AICAR 投与に伴う AMPK 活性の増加は、PK 活性を増加させたが、LDH 活性の変化はなかった (Suwa et al. 2003)。また、Putman らの研究で28日間の AICAR 投与を行ったが、解糖系酵素である phosphofructokinase 活性と glyceraldehyde phosphate dehydrogenase 活性には変化が見られず、LDH 活性は有意に低下した (Putman et al. 2003)。このように LDH 活性については不明な点があり、AMPK 活性化との関連性は明確になっていない。しかしながら、本研究で

はメトフォルミン投与によって HK 活性と PK 活性が増加したことから、メトフォルミンは骨格筋における糖代謝能を亢進することが示唆された。

本研究では、メトフォルミン投与によって TCA 回路の CS 活性がヒラメ筋、腓腹筋赤色部位、腓腹筋白色部位において有意に増加し、脂肪酸酸化の重要な部分を担っている  $\beta$ -HAD 活性がヒラメ筋において有意に増加した。これらの酵素はミトコンドリア内に存在する。先行研究では、CS 活性と  $\beta$ -HAD 活性が持続的トレーニングによって増加すると報告されている (Green et al. 1983 ; Durante et al. 2001 ; Siu et al. 2002 ; Frosig et al. 2003)。AICAR による AMPK 活性化によっても、ミトコンドリア酸化系酵素活性が増加している (Winder et al. 2000 ; Putman et al. 2003 ; Suwa et al. 2003)。持続的トレーニングは骨格筋における AMPK を活性化させるが (Duranter et al. 2002 ; Langfort et al. 2003 ; Frosig et al. 2003)、メトフォルミンも同様に骨格筋における AMPK を活性化させる (Zhou et al. 2001 ; Musi et al. 2002)。このことから、メトフォルミンが持続的トレーニングと類似した経路でミトコンドリアの増殖や脂質代謝の亢進を促し、それは AMPK 活性を介して起こっていると考えられた。また、メトフォルミンには肥満を助長せずに血糖値を低下させる作用を有するが、本研究で見られた代謝特性への効果が病態の改善に貢献している可能性がある。

本研究では、骨格筋内における主な糖輸送担体である総 GLUT4 蛋白量の測定を行ったが、メトフォルミン投与群と対照群の間に有意な差は見られなかった。Handberg らは、正常ラットへのメトフォルミン投与を行ったところ、ヒラメ筋における GLUT4 蛋白量の変化を認めず、腓腹筋赤色部位における GLUT4 蛋白量の有意な減少を報告している。また、同じ研究で2型糖尿病を呈する肥満 Zucker ラットへのメトフォルミン投与は、ヒラメ筋および腓腹筋赤色部位における GLUT4 蛋白量の変化を示さなかった (Handberg et al. 1993)。彼らは、高インスリン血症と糖尿病のメトフォルミンによる回復が骨格筋における GLUT4 蛋白発現とは関連しないと述べている。先行研究と本研究の結果の違いは、メトフォルミンの投与期間および投与量によるものかもしれない。AICAR 投与によって速筋の GLUT4 蛋白発現が増加する先行研究がある (Holmes et al. 1999 ; Winder et al. 2000 ; Buhl et al. 2001)。しかし、メトフォルミンは AICAR のように AMPK を特異的に活性化させるものではない。このことから、メトフォルミンには AMPK 以外の経路を介した GLUT4 蛋白発現の抑制または分解促進の作用があり、AMPK を介した効果を打ち消した可能性がある。し

かしながら、メトフォルミン投与による GLUT4 蛋白発現を検討した研究は極めて少ないため、更なる検討が必要である。

#### <要約>

本研究は、持久的トレーニングと同様に AMPK 活性を有する糖尿病改善薬メトフォルミンがラット骨格筋の代謝特性に及ぼす影響を検討した。2 週間のメトフォルミン 1% 混餌投与により、腓腹筋白色部位において糖代謝の律速酵素である HK 活性と解糖系酵素の PK 活性が増加した。また、ヒラメ筋、腓腹筋赤色部位、腓腹筋白色部位において TCA 回路の代表的酵素である CS 活性の増加が認められた。さらに、ヒラメ筋において脂肪酸 $\beta$ 酸化の律速酵素である  $\beta$ -HAD 活性が高まっていた。一方、メトフォルミンは総 GLUT4 蛋白量に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、メトフォルミンには骨格筋の糖代謝能を高め、ミトコンドリアの増殖や脂質代謝の亢進を促す作用があることが示唆された。

#### 5. 主要引用・参考文献

- Bailey CJ and Puaiah JA.** Effect of metformin on glucose metabolism in mouse soleus muscle. *Diab and Metab (Paris)* 12 : 212–218, 1986.
- Buhl ES, Jessen N, Schmitz O, Pedersen SB, Pedersen O, Holman GD, and Lund S.** Chronic treatment with 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside increases insulin-stimulated glucose uptake and GLUT4 translocation in rat skeletal muscles in a fiber type-specific manner. *Diabetes* 50 : 12–17, 2001.
- Durante PE, Mustard KJ, Park SH, Winder WW, and Hardie DG.** Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283 : E178–E186, 2002.
- Frosig C, Jorgensen SB, Hardie DG, Richter EA, and Wojtaszewski JFP.** 5-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance training in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 : E411–E417, 2004.
- Green HJ, Reichmann H, and Pette D.** Fibre type specific transformations in the enzyme activity pattern of rat vastus lateralis muscle by prolonged endurance training. *Pflugers Arch* 399 : 216–222, 1983.
- Halseth AE, Bracy DP, and Wasserman DH.** Overexpression of hexokinase II increases insulin and exercise-stimulated muscle glucose uptake in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276 : E70–E77, 1999.
- Handberg A, Kayser L, Hoyer PE, Voldstedlund M, Hanse HP, and Vinten J.** Metformin ameliorates diabetes but does not normalize the decreased GLUT4 content in skeletal muscle of obese (fa/fa) Zucker rats. *Diabetologia* 36 : 481–486, 1993.
- Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, and Winder WW.** Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* 87 : 1990–1995, 1999.
- Langfort J, Viese M, Ploug T, and Dela F.** Time course of GLUT4 and AMPK protein expression in human skeletal muscle during one month of physical training. *Scand J Med Sci Sports* 13 : 169–174, 2003.
- Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, and Goodyear LJ.** Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51 : 2074–2081, 2002.
- Putman CT, Kiricsi M, Pearcey J, MacLean IM, Bamford JA, Murdoch GK, Dixon WT, and Pette D.** AMPK activation increases uncoupling protein-3 expression and mitochondrial enzyme activities in rat muscle without fibre type transitions. *J Physiol* 551 : 169–178, 2003.
- Siu PM, Donley DA, Bryner RW, and Alway SE.** Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* 94 : 555–560, 2003.
- Suwa M, Nakano H, and Kumagai S.** Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J Appl Physiol* 95 : 960–968, 2003.
- Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, and Holloszy JO.** Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88 : 2219–2226, 2000.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, and Moller DE.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108 : 1105–1107, 2001.