

平成 24 年度
順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科 修士論文

持久的トレーニングが有する
2 型糖尿病改善効果における体温上昇の
役割に関する研究

所 属 スポーツ健康科学領域
スポーツ医科学分野
氏 名 都築 孝允
論文指導教員 内藤 久士

合格年月日 平成 25 年 2 月 25 日

論文審査員 主査 細見 修

副査 形本 静夫

副査 内藤 久士

目次

第1章 緒言	1
第2章 関連文献の考証.....	3
第1節 2型糖尿病と血糖調節機構	3
第2節 骨格筋における糖取り込みに関わる分子機構.....	4
(1) 糖輸送担体	4
(2) インスリン依存的シグナル経路.....	5
(3) インスリン非依存的シグナル経路	5
第3節 温熱処置がインスリン抵抗性および耐糖能に与える影響	7
第3章 実験方法.....	9
第1節 実験動物および飼育条件	9
第2節 トレーニングプロトコル	9
第3節 体温の測定	9
第4節 腹腔内糖負荷試験	10
第5節 被験筋の摘出.....	10
第6節 生化学的分析.....	10
(1) サンプル処理	10
(2) HSP72 分析	11
(3) GLUT4 分析	11
(4) インスリン濃度の定量.....	12
第7節 統計処理.....	12
第4章 結果	13
第1節 体重および臓器重量.....	13
第2節 運動時の体温上昇	13
第3節 腹腔内糖負荷試験	14
第4節 骨格筋における HSP72 発現量.....	14
第5節 骨格筋における GLUT4 発現量.....	15

第 5 章 考察	16
第 6 章 結論	19
第 7 章 要約	20
謝辭	21
引用文献.....	22
英文要約.....	27
略語表	
Table 1-2	
Fig. 1-6	

第1章 緒言

身体活動量の低下や運動不足は、生活習慣病を引き起こす主な要因であると言われている。現在、生活習慣病の中でも2型糖尿病の罹患率は世界中で増加し続けており、大きな社会問題になっている。2型糖尿病は骨格筋を含む様々な器官・臓器におけるインスリン抵抗性の増加や高血糖が特徴であり、病態が進行すると様々な合併症を引き起こすため2型糖尿病の予防・改善に向けた取り組みが急務である。

これまで、2型糖尿病の予防・改善において、運動が効果的であることが多くの研究により明らかにされてきた。Goodyearら¹⁰⁾は、インスリン抵抗性や耐糖能異常を有するラットおよび糖尿病ラットにおいて、持久的トレーニングは耐糖能を改善し、血糖の恒常性の維持に貢献することを示している。運動が耐糖能を改善するメカニズムに関して、筋収縮によるインスリン非依存的なシグナル伝達経路を介した骨格筋への糖取り込みの改善やトレーニングによる糖輸送担体 (Glucose transporter 4 ; GLUT4) の発現量の増加などが中心的な役割を担っていることが明らかにされてきた⁷⁾¹¹⁾¹⁶⁾²¹⁾。しかしながら、運動により2型糖尿病の改善に至るメカニズムについては十分には明らかにされておらず、検討の余地が残されている。

ところで、1999年にHooperら¹⁸⁾が、糖尿病患者に対して3週間の“Hot-tub therapy”を実施し、空腹時血糖および糖化ヘモグロビン (HbA1c) が有意に改善したことを報告して以来、体温上昇が2型糖尿病の改善に貢献している可能性が示唆されてきた。そのメカニズムの一端を担う分子として考えられているのが、熱ストレスにより誘導され、細胞を保護する働きを有する熱ショックタンパク質 (Heat shock protein: HSP) である。骨格筋において、炎症性サイトカインやストレスキナーゼであるc-Jun N-terminal kinase (JNK) やInhibitor κ B kinase (IKK) が活性化することでインスリン抵抗性を惹起することが知られている²⁰⁾⁴⁰⁾が、HSPはこれらの活性を抑制することが報告されている⁸⁾³⁴⁾。実際に、高脂肪食摂取によりインスリン抵抗性を増加させたラットに対して、体温を約41°Cまで上昇させる温熱処置を12週間行うことで、骨格筋におけるHSP72発現が増加し、インスリン抵抗性が改善することが示されている¹³⁾。また、HSPは運動によっても誘導されることが多くの研究により明らかにされており²⁶⁾³⁰⁾³⁷⁾、運動時の体温上昇およびそれに伴うHSPの発現増加が、運動による2型糖尿病の改善に貢献している可能性が考えられる。しかしながら、体温上昇を伴わない運動が耐糖能を改善するか否かは明らかではなく、運動時の体温上昇の有無が2型糖尿病の改善に与える効果が異なるか否かについて検討した

研究はない。

そこで、本研究では持久的トレーニングが有する 2 型糖尿病改善効果における体温上昇の役割について検討するために、トレーニング時の体温上昇の有無が 2 型糖尿病ラットの耐糖能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。本研究では、運動時に体温上昇を伴うトレーニングは骨格筋における HSP の発現増加を引き起こし、2 型糖尿病ラットの耐糖能の改善に与える影響が大きいと仮説を立てた。

第2章 関連文献の考証

2型糖尿病は、生活習慣病の一つであり、様々な合併症を引き起こす重篤な代謝疾患であるため、その予防・改善に向けた取り組みが急務であると考えられる。そこで、まず2型糖尿病の病態および主な特徴である高血糖を引き起こす血糖調節機構の破綻についてまとめる。次に、糖の利用において重要な組織である骨格筋に焦点を当て、骨格筋における糖取り込みに関わる分子機構について、インスリンおよび筋収縮による影響の観点から考証する。さらに、近年、インスリン抵抗性の改善に対する標的分子としてHSPが注目されてきたことから、温熱処置によるHSPの誘導がインスリン抵抗性に与える影響について考証する。

第1節 2型糖尿病と血糖調節機構

糖尿病は、インスリン作用不足による慢性高血糖を主徴とする代謝異常を伴う疾患群であり、その成因により「1型糖尿病」「2型糖尿病」「その他の特定の機序、疾患によるもの」「妊娠糖尿病」に分類される¹⁾。糖尿病患者のうち約9割が2型糖尿病であり、患者数は現在も世界中で増加し続け、大きな社会問題に発展している。2型糖尿病は食生活の乱れや運動不足により、骨格筋や肝臓、脂肪組織などにおけるインスリン受容器の感受性の低下、いわゆる末梢組織におけるインスリン抵抗性の増加が生じることで引き起こされると考えられている。

通常、血糖値は膵臓のランゲルハンス島 α 細胞から分泌されるグルカゴンや β 細胞から分泌されるインスリンといったホルモンにより、ある一定範囲内に収まるように調節されている。空腹や絶食時にはグルカゴンの分泌量が増加し、肝臓におけるグリコーゲンの分解や糖新生の亢進により血糖値を上昇させる。一方、食後などに血糖値が上昇すると血糖降下作用を有する唯一のホルモンであるインスリンの分泌量が増加する。インスリンの作用により、肝臓ではGLUT2を介した糖取り込みが増加し、グリコーゲンの合成が促進される一方で、グリコーゲンの分解および糖新生が抑制され、血中へのグルコースの放出が減少する。また、糖を取り込み、利用する器官である骨格筋や脂肪組織においては、GLUT4を介した糖取り込みが促進する。さらに、インスリンが直接 α 細胞に作用しグルカゴンの産生を抑制する。これらのメカニズムを介して血糖値を低下させる。このように、正常な状態では血糖調節に関与するホルモンの拮抗作用により血糖値の恒常性が維持されている。

ところが、糖尿病では様々な器官において血糖調節機構の破綻が見られ、血糖値が正常範囲を超えて高い状態が慢性的に続くと言われている。2型糖尿病の場合、インスリンを分泌する膵臓では、2型糖尿病の発症前から発症初期にかけて末梢組織のインスリ

ン抵抗性の増加に伴い、代償的にインスリンの分泌量を増加させ、血糖値を正常に維持するが、慢性的に高血糖が続くことでβ細胞が疲弊し、インスリンの分泌量は低下する³⁹⁾。また、肝臓においてもインスリン抵抗性に伴う糖代謝障害も慢性的な高血糖と深く関連している。2型糖尿病患者の肝臓において、グルコース分解および糖新生の増加により、糖産生の増加が示されている²⁵⁾。また、糖新生を亢進する要因の一つとして、糖新生系酵素遺伝子発現が増加していることも示されている²⁵⁾。さらに、骨格筋や脂肪組織については、インスリン抵抗性の増加に伴い糖取り込みが減少する。特に脂肪組織については、肥満の原因と考えられている脂肪組織の肥大が生じ、インスリン感受性を促進するアディポネクチンなどの善玉アディポサイトカインの分泌を低下させ、反対に、遊離脂肪酸や Tumor necrosis factor-α (TNF-α) といった悪玉アディポサイトカインの分泌を増加させることが知られている²⁸⁾。

以上のように、2型糖尿病を発症すると様々な器官において血糖調節機構の破綻が観察され、食事や運動といった介入がどのように血糖調節機構を改善させるのか、また各臓器の相互関係について明らかにすることが、今後の研究において重要であろう。

第2節 骨格筋における糖取り込みに関わる分子機構

骨格筋は身体における最大の代謝器官であり、健常者において糖の7割以上が骨格筋で利用されている。また、糖尿病患者においても全身の糖の総利用量の減少が骨格筋における糖利用の低下により引き起こされていることが示されている⁵⁾。つまり、骨格筋における糖代謝異常が全身の耐糖能の低下と強く関連していることが考えられる。

(1) 糖輸送担体

骨格筋は血中から細胞内に糖を取り込み、利用することで、全身の血糖調節に貢献している。骨格筋への糖取り込みは、糖輸送担体を介した受動拡散によって行われる。ほ乳類の細胞では多くの糖輸送担体のアイソフォームが発現し、その発現パターンは組織特異的である。マウス、ラットおよびヒトの骨格筋では主に GLUT4 が発現し、骨格筋への糖取り込みに関与している。インスリンや筋収縮といった刺激は、GLUT4 を細胞内プールから細胞膜および T 管にトランスロケーションさせることで糖取り込みを増加させるが、筋収縮はインスリンが欠乏している状態でも GLUT4 のトランスロケーションを亢進することが知られている¹¹⁾。

一方、長期的なトレーニングを行わせると GLUT4 発現量が増加することが知られており¹¹⁾、GLUT4 発現量が増加した筋においてインスリン刺激および筋収縮による最大糖取り込み速度が上昇することが報告されている²²⁾³⁶⁾。つまり、骨格筋細胞内において GLUT4 発現量が増加すると、インスリンや筋収縮などに応じて、細

胞膜へトランスロケーションする GLUT4 が増えることを示しており、トレーニング効果として GLUT4 発現量を増加させることは、骨格筋への糖取り込みを増加させ、耐糖能を改善するために重要な要因である。

(2) インスリン依存的シグナル経路

インスリンは血糖値を調節するホルモンのうち血糖降下作用をもつ唯一のホルモンであり、骨格筋への糖取り込みにおいてインスリンの働きが非常に重要である。

インスリン刺激による糖取り込みにおける主要なシグナル経路は Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / Protein kinase B/Akt (Akt) 経路であり、この経路は、インスリンがインスリン受容体 (Insulin receptor; IR) に結合することにより、インスリン受容体基質 1 (Insulin receptor substrate-1; IRS-1) のチロシン残基がリン酸化し、PI3K/Akt 経路の主要なタンパク質である PI3K に情報が伝達されることで活性化する⁶⁾。PI3K が活性化すると、その下流のタンパク質である Akt がリン酸化する。Akt のリン酸化は、糖取り込みの亢進やグリコーゲン合成といったインスリンに対する応答を生じさせるために必要であり、インスリン依存的シグナル経路において中心的な役割を果たしている¹⁶⁾。また、Akt のリン酸化を介して、その下流に位置する Akt substrate 160 (AS160) がリン酸化することで、GLUT4 が細胞内から細胞膜へトランスロケーションし、糖取り込みが促進する。

このインスリン依存的シグナル経路は、加齢、高脂肪食摂取、肥満および 2 型糖尿病などにより誘発されるインスリン抵抗性の状態において障害を受ける。インスリン抵抗性状態では、TNF- α などの炎症性サイトカインや JNK、IKK といったストレスキナーゼの活性化により、インスリンシグナル経路の最も上流にある IRS-1 のセリン残基がリン酸化され、チロシンリン酸化が抑制される⁴¹⁾。そして、下流のインスリンシグナル経路に障害をきたすことが報告されている²⁰⁾⁴⁰⁾。実際に、Anai ら²⁾は肥満のモデル動物である Zucker ラットの骨格筋において、IRS-1 発現量および PI3K の活性が低下していることを報告している。さらに、Gupte ら¹²⁾¹³⁾は、加齢または高脂肪食摂取により、Akt および AS160 のリン酸化が低下し、インスリン依存的シグナル経路が減弱することを示している。このように、インスリン依存的シグナル経路の活性の低下は骨格筋への糖取り込みの低下と密接に関連している。

(3) インスリン非依存的シグナル経路

運動や筋収縮はインスリン刺激と同様に骨格筋への糖取り込みにおいて重要な因子であり¹⁶⁾、運動による糖取り込みの亢進は、高エネルギーリン酸の濃度変化のよう

な細胞内のエネルギー状態の変化や筋収縮による筋小胞体から放出されることで増加する細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加などによって引き起こされることが知られている⁷⁾¹⁶⁾。

AMP-related protein Kinase (AMPK) は α 、 β 、 γ サブユニットからなるヘテロ三量体のタンパク質で、エネルギー感受性の高い酵素であり細胞内のエネルギー状態を感知する働きがある⁷⁾。AMPK は、運動による ATP の減少や AMP の増加により触媒サブユニットである α サブユニットがリン酸化されることで活性化し、糖取り込みを調節することが明らかにされてきた。実際に、Hayashi ら¹⁵⁾は、AMPK の活性化剤である 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) とともに、ラットの摘出筋をインキュベートすることで糖の取り込みが亢進することを示した。また、筋収縮を引き起こした際も AMPK が活性化し、それに伴い骨格筋への糖取り込みも亢進することを示した。これらのことから、AMPK の活性化は筋収縮による糖取り込みを調節する一つの要因であることが明らかである。

また、筋収縮による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加も GLUT4 のトランスロケーションを引き起こし、糖取り込みを亢進させることが知られている¹⁷⁾。実際に、筋小胞体からの Ca^{2+} の放出を誘導するカフェインや W-7 という薬剤を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させたところ、糖取り込みが増加したことが示されている⁴⁴⁾。対照的に筋小胞体からの Ca^{2+} の放出を抑制するダントロレンを用いた場合、骨格筋への糖取り込みが抑制されることも明らかにされている⁴⁴⁾。また、 Ca^{2+} は細胞内に存在にする Calmodulin と複合体を形成し、 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) を活性化する。骨格筋に発現する CaMK ファミリーには CaMK キナーゼ (CaMKK) - α 、- β を含め、CaMK I α 、- β 、- δ 、CaMK II β_M 、- δ 、- γ といったアイソフォームが存在し、これらは Ca^{2+} /calmodulin が活性化するために必要である⁴²⁾。Wright ら⁴³⁾は、 Ca^{2+} /calmodulin の拮抗阻害剤である KN-62 および KN-93 により、筋収縮およびカフェインによる筋小胞体からの Ca^{2+} の放出を抑制し、骨格筋への糖取り込みが減少したことを示している。これらのことから、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は AMPK の活性化と同様に、運動による糖取り込みの調節に関与する重要な因子であると言える。

以上のように、運動や筋収縮による糖取り込みに関して、AMPK や CaMK シグナルが重要な役割を担っていることは明らかであるが、その下流のシグナル経路や糖取り込みの亢進の機序については未だ不明な点が多く残されており、今後さらなる研究が必要である。

第3節 温熱処置がインスリン抵抗性および耐糖能に与える影響

1999年に Hooper ら¹⁸⁾が、糖尿病の患者に対して1日30分の“Hot-tub therapy”を週6日、3週間実施したところ、空腹時血糖およびHbA1cが有意に改善したことを初めて明らかにした。この報告により、温熱処置による生体内での応答が2型糖尿病の改善に影響を与える可能性が示唆されてきた。温熱処置による主な生理的応答は体温の上昇であり、体温上昇に伴い心拍数、換気量および血流量の増加や酵素活性の亢進といった様々な変化が生じる。その中でも近年では、主に熱ストレスにより骨格筋で劇的に誘導されるHSPの働きが注目されている。骨格筋において、インスリン抵抗性を引き起こす一つの要因は、JNK、IKKなどのストレスキナーゼの活性化によるインスリンシグナル経路の障害であると考えられているが²⁰⁾⁴⁰⁾、HSPはこれらのストレスキナーゼの活性化を抑制する働きを有しているため、インスリン抵抗性や耐糖能の改善に対する新たな分子標的であると考えられている。実際に、培養細胞を用いた研究により、熱ストレスによるHSP72の発現増加がアポトーシスを誘導する薬剤の投与やUV刺激によるJNKの活性化を抑制することが報告されている⁸⁾³⁴⁾。

また、これらの関連が2型糖尿病患者においても示されており、例えばKurucz ら²⁴⁾はHSPが2型糖尿病患者の骨格筋におけるインスリン抵抗性の発症に関与しているか否かを明らかにするために、健常者および2型糖尿病患者から筋を採取し、HSP72 mRNA レベルを調べた。その結果、2型糖尿病患者の骨格筋におけるHSP72 mRNA レベルは、健常者と比較して有意に低いことが示された。さらに、HSP72 mRNA レベルとグルコースクランプ試験における糖取り込み量の間に関連が認められ、HSP72 mRNA レベルが低いほど、糖取り込み量が低いことを報告している。また、Hooper ら¹⁹⁾は、ストレスキナーゼの活性を引き起こすような炎症反応とインスリン感受性の障害および、それに続くHSPの低下といった負の循環が2型糖尿病を引き起こしている可能性を示唆している。これらの事実から、温熱処置などの外的刺激によりHSP発現を増加させることが、インスリン抵抗性を改善するための効果的な対抗策になる可能性が考えられる。

実際、Chung ら³⁾は高脂肪食摂取によりインスリン抵抗性誘導したマウスに対して、遺伝的または薬理的な方法でHSP72を過剰発現させることで、JNKの活性を低下させ、インスリン抵抗性を改善したことを示している。また、Gupte ら¹³⁾は高脂肪食摂取によりインスリン抵抗性を誘導したラットに対して、直腸温を約41°Cまで上昇させる温熱処置を週1回、12週間行うことで、骨格筋のHSP72の発現増加を誘導し、インスリン抵抗性を改善したことを報告している。

まとめると、温熱処置による体温の上昇およびHSP発現の増加は、ストレスキナー

ぜの抑制を介して、インスリン抵抗性の改善に関与している。しかしながら、運動による2型糖尿病の改善においても、体温の上昇およびそれに続くHSP発現の増加が貢献している可能性が考えられるものの、運動時の体温上昇の有無が2型糖尿病の改善に影響を与えるかどうかは明らかにされていない。

第3章 実験方法

第1節 実験動物および飼育条件

本研究の被験動物として、2型糖尿病のモデル動物である Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) を用いた。雄性の OLETF は、4週齢時に大塚製薬から配給され、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間の明暗サイクルに調節された順天堂大学さくらキャンパス内の生物環境調整装置内で飼育した。実験動物は動物実験用のケージ ($17 \times 26 \times 37 \text{ cm}$) 内にて、3匹ずつ飼育され、餌および水は自由に摂取できるように与えた。毎週定時に体重を測定した。

なお、本実験は順天堂大学実験動物委員会によって承認された。

第2節 トレーニングプロトコル

本研究は、運動時の体温上昇の有無が2型糖尿病ラットの耐糖能の改善に与える影響を明らかにするために、Hamilton ら¹⁴⁾のトレーニングプロトコルを参考に行った。彼らは、 4°C の低温環境下では、運動による体温の上昇および心筋における HSP 発現の増加が抑制されることを示している。また、同様のトレーニングプロトコルを用いて、Ogura ら³²⁾は骨格筋においても、低温環境下では HSP 発現の増加が抑制されることを示している。つまり、このトレーニングプロトコルは、運動時の体温上昇および HSP 発現を調節するのに、適した運動モデルであると考えられる。

OLETF は25週齢時に、無作為に安静群 (Sed, $n=9$)、常温トレーニング群 (OTr, $n=9$)、および低温トレーニング群 (CTr, $n=9$) のいずれかに分類した。25~35週齢までの10週間、OTr および CTr はそれぞれ室温が 25°C の常温環境および 4°C の低温環境で動物用トレッドミルを用いた走運動を1回60分、週5日行った。各運動の前後で、定期的に直腸温を測定した。運動は $10 \sim 15 \text{ m/min}$ 、10分から始め、トレーニング効果を考慮し、トレーニング期間中に速度および時間を漸増させていき、最終的に 20 m/min 、60分に達した (Table 1)。

第3節 体温の測定

本研究では、運動時の体温の変化を評価するために、各運動の前後において温度計 (LT-8, Gram Corporation) を被験動物の肛門から 5 cm 程度挿入し、直腸温を測定した。運動の前後における体温の測定は、常温環境下 (25°C) で行った。つまり、OTr 群は運動前および運動終了直後にトレッドミル上で直腸温を測定した。一方、CTr 群は常温環境下 (25°C) で運動前の直腸温を測定した後、低温環境 (4°C) に移動し60分の運動を行わせ、運動終了後、直ちに常温環境下 (25°C) に移し、速やかに直腸温を測

定した。被験動物の直腸温の測定は運動終了後、10 分以内に完了した。データは、トレーニング期間の最後 3 日間の平均値を用いた。

第 4 節 腹腔内糖負荷試験

トレーニング前 (25 週齢)、および 9 週目のトレーニング終了 (34 週齢) の 48 時間後に全ての動物に対して腹腔内糖負荷試験 (Intraperitoneal glucose tolerance test; IPGTT) を行った。15 時間の絶食後、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) により麻酔を施し、空腹時血糖 (0 分) の測定を行い、続いて腹腔内にグルコース (1 g/kg) を注入した。グルコース注入後、30 分、60 分、120 分で採血を行い、自己検査用グルコース測定器 (グルテスト Neo スーパー、アークレイ社) を用いて血糖値を測定した。また、採血時にエッペンチューブ 200 μ l 程度の血液を採取し、常温で 30 分放置した後、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた血清は分析まで -80°C で凍結保存した。

第 5 節 被験筋の摘出

トレーニング期間の最後の運動終了 48 時間後、実験動物にペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) で麻酔を施し、腹下大静脈から採血を行った。その後遅筋であるヒラメ筋および速筋である足底筋を摘出し、液体窒素で凍結しウェスタンブロット分析まで -80°C で保存した。本研究の運動様式はランニングであることから、足関節の屈筋群に運動の影響が大きいことが考えられるため、ヒラメ筋および足底筋を分析に用いた。

第 6 節 生化学的分析

(1) サンプル処理

本研究では、遅筋であるヒラメ筋および速筋である足底筋を被験筋とした。被験筋に付着した血液や腱、軟部組織などを取り除き、はさみで数十回ミンチした後、筋重量の 7 倍量の冷却したホモジネートバッファー (50 mM HEPES, 4 mM EGTA, 10 mM EDTA, 50 mM β -glycerophosphate, 25 mM NaF, 5 mM Na_3VO_4 , 0.1% Triton-X100, complete EDTA-free) を加え、細胞破碎装置を用いてホモジナイズした。その後、 4°C 、12,000 g で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。得られた上清のタンパク質濃度は Bovine serum albumin をスタンダードとした BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology 社) を用いて測定した。各サンプルのタンパク質濃度が等しくなるようにホモジネートバッファーを加え、等量の 2 \times サンプルバッファーで各サンプルのタンパク質量を 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ に調整した。その後、サンプルをドライブロックバス (EB-603、AS ONE) を用いて 95°C で 5 分間加熱し、タンパク質を変性させた。ただし、糖輸送

担体である GLUT4 分析用のサンプルは加熱処理を行わずに用いた。

(2) HSP72 分析

HSP72 発現量を分析するために、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 法を用いてタンパク質を分子量ごとに分離した。各レーンにタンパク量が 20 μg になるように等量のサンプルをロードし、分子量マーカーと共に定電圧 (150V) で 1 時間電気泳動した。濃縮ゲルの組成は 4% Acrylamide、125 mM Tris-HCl pH6.8、0.0375% Ammoniumpersulfate (APS)、0.1% SDS、0.167% N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine (TEMED) で、分離ゲルの組成は 10% Acrylamide、375 mM Tris-HCl pH8.8、0.0312% APS、0.1% SDS、0.067% TEMED であった。泳動後、ミニトランスブロットセル (Bio-Rad) を用いて定電圧 (100V) で 1 時間通電し、タンパク質をニトロセルロース膜に転写した。転写後、Tween-Tris Bufferd Saline (T-TBS) (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) で数回洗浄し、5% (w/v) Skim milk/T-TBS で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、T-TBS で 10 分 \times 3 回洗浄し、5% (w/v) Skim milk/T-TBS で 1 : 2000 に希釈した一次抗体 (Anti-HSP70 Alkaline Phosphatase Conjugate ; Stressgen, SPA-810AP) を用いて室温で 1 時間インキュベートした。一次抗体反応後、T-TBS で 10 分 \times 3 回洗浄し、バンドを可視化するために Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad) を用いて発色した。蒸留水で発色反応を止めた後、メンブレンをスキャナーでデジタル画像としてコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (NIH Image 1.63, NIH) を用いて各バンドのタンパク質を定量した。

(3) GLUT4 分析

GLUT4 発現量を分析するために、それぞれ 10 μg のタンパク質を含むサンプルを 1 時間、定電圧 (150V) で SDS-PAGE によって分離した。濃縮ゲルの組成は 4% Acrylamide、125 mM tris-HCl pH6.8、0.0375% APS、0.1% SDS、0.167% TEMED で、分離ゲルの組成は 12% Acrylamide、375 mM Tris-HCl pH8.8、0.0312% APS、0.1% SDS、0.067% TEMED であった。泳動後、ミニトランスブロットセル (Bio-Rad) を用いて定電圧 (100V) で 1 時間通電し、タンパク質を PVDF 膜に転写した。転写後、T-TBS で数回洗浄し、5% (w/v) Skim milk/T-TBS で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、T-TBS で 10 分 \times 3 回洗浄し、5% (w/v) Skim milk/T-TBS で 1 : 2000 に希釈した一次抗体 (Rabbit Anti-Glucose Transporter 4 ; AbD Serotec, 4670-1704) を用いて室温で 2 時間インキュベートした。一次抗体反応後、T-TBS で 10 分 \times 3 回洗

浄し、5% (w/v) Skim milk/T-TBS で希釈した二次抗体 (HRP-linked Anti-rabbit IgG ; Cell Signaling Technology、#7074) を用いて室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体反応後、T-TBS で 10 分×3 回洗浄し、バンドを可視化するために、ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare) を用いて冷却 CCD カメラ (Light Capture、ATTO、AE-6972) で発光検出し、デジタル画像としてコンピュータに取り込み、画像解析ソフト (CS Analyzer 2.0、ATTO) を用いて分析した。

(4) インスリン濃度の定量

インスリンは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、商品のマニュアルに従い測定した。簡潔に述べると、抗ラットインスリン抗体を固相化させたマイクロプレートの各ウェルに 95 μ l の検体希釈液および 5 μ l の標準曲線用インスリン溶液または検体を添加し、4°C で 2 時間静置した。その後、洗浄液で数回洗浄し、酵素標識ラットインスリン抗体溶液を各ウェルに 100 μ l 分注し、常温で 30 分間反応させた。洗浄液で数回洗浄した後、酵素基質溶液を各ウェルに 100 μ l 分注し、遮光下常温で 40 分間反応させた。その後、反応停止液を 100 μ l 加え、吸光度を測定した。標準曲線用インスリン溶液の吸光度より標準曲線を作成し、検体の吸光度からインスリン濃度を算出した。

第 7 節 統計処理

全てのデータは平均値±標準偏差で表した。運動前後の体温のデータおよび IPGTT により得られた血糖値とインスリンのデータは、2 元配置分散分析 (群 × 時間) を行った後、Bonferroni's post hoc test を用いて検定した。その他のデータは 1 元配置分散分析を行った後、Tukey's post hoc test を用いて検定した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

第4章 結果

第1節 体重および臓器重量

実験期間中における被験動物の体重の経時的な変化を Fig.1 に示した。体重は、Sed 群と比較して OTr 群においてはトレーニング開始3週目から、CTr 群においては4週目から有意に低い値を示した ($P<0.05$)。各群のトレーニング期間終了時の体重は Sed 群 ; 680.2 ± 32.3 g、OTr 群 ; 571.3 ± 28.3 g、CTr 群 ; 598.0 ± 41.9 g であり、OTr および CTr 群において運動トレーニングによる有意な体重減少が観察された ($P<0.05$)。しかしながら、トレーニングの条件間に差は見られなかった。

10 週間のトレーニング終了後のヒラメ筋、足底筋、心臓、肝臓、白色脂肪の重量および体重あたりの重量を Table 2 に示した。ヒラメ筋、足底筋、心臓、肝臓、白色脂肪の重量は、Sed 群 ; 190.8 ± 10.1 mg、 425.7 ± 15.9 mg、 1099.1 ± 28.6 mg、 8.4 ± 1.0 g、 17.4 ± 3.0 g、OTr 群 ; 180.7 ± 4.6 mg、 434.6 ± 24.4 mg、 1113.4 ± 28.6 mg、 6.9 ± 0.9 g、 9.9 ± 1.7 g、CTr 群 ; 179.8 ± 7.1 mg、 432.4 ± 24.2 mg、 1135.7 ± 91.0 mg、 7.3 ± 0.7 g、 12.7 ± 1.9 g であり、Sed 群と比較して OTr 群および CTr 群において肝臓および白色脂肪の重量が有意に減少した ($P<0.05$)。また、体重あたりの重量は Sed 群 ; 0.28 ± 0.02 mg/g、 0.63 ± 0.05 mg/g、 1.62 ± 0.06 mg/g、 12.38 ± 0.90 mg/g、 25.47 ± 3.40 mg/g、OTr 群 ; 0.32 ± 0.02 mg/g、 0.76 ± 0.06 mg/g、 1.95 ± 0.08 mg/g、 12.02 ± 1.26 mg/g、 17.24 ± 2.52 mg/g、CTr 群 ; 0.30 ± 0.02 mg/g、 0.73 ± 0.06 mg/g、 1.88 ± 0.05 mg/g、 12.35 ± 0.43 mg/g、 21.32 ± 3.01 mg/g であり、ヒラメ筋の体重あたりの重量においては、Sed 群と比較して OTr 群のみ有意に増加し ($P<0.05$)、足底筋、心臓および白色脂肪の体重あたりの重量は Sed 群と比較して両トレーニング群において有意に増加した ($P<0.05$)。

第2節 運動時の体温上昇

OTr 群および CTr 群における運動前後の体温の変化を Fig.2 に示した。データは、トレーニング期間の最後の3回分のデータの平均値を示している。OTr 群および CTr 群の運動前の体温は、それぞれ 37.97 ± 0.48 、 38.26 ± 0.30 °C であり、群間に差はなかった。一方、運動後ではそれぞれ 40.55 ± 0.41 、 38.01 ± 0.35 °C であり、OTr 群においてのみ有意な体温の上昇が認められ ($P<0.05$)、CTr 群においては運動前後で有意な変化は見られなかった。また、OTr 群における運動後の体温は CTr 群より有意に高かった ($P<0.05$)。

第3節 腹腔内糖負荷試験

トレーニングを開始する前に糖尿病を発症しているかを評価するために、IPGTTを行った。トレーニング前においては、血糖値を測定した全てのタイムポイント（0分、30分、60分および120分）において、3群間に差はなく、グルコース注入後2時間で血糖値は200 mg/dl以上を維持しており、全ての実験動物に糖尿病が発症していることを確認した²³⁾。また、9週目のトレーニング終了48時間後に糖尿病の改善の程度を評価するために、再びIPGTTを行い、IPGTT中の血糖値の経時変化および血糖曲線下面積をFig.3に示した。グルコース注入前における血糖値はSed群;215.0 ± 39.8 mg/dl、OTr群;146.6 ± 33.1 mg/dl、CTr群;137.3 ± 21.4 mg/dlであり、OTr群およびCTr群はSed群と比較して有意に低かった（P<0.05）。グルコース注入後、Sed群と比較して、OTr群は30分後および60分後において、CTr群は60分後および120分後において、血糖値が有意に低かった（P<0.05）。しかしながら、トレーニング条件間に差はなかった。また、血糖曲線下面積においても、Sed群;30291.7 ± 4918.5 mg/dl・min、OTr群;22152.5 ± 4386.9 mg/dl・min、CTr群;22989.4 ± 2665.1 mg/dl・minであり、OTr群およびCTr群はSed群と比較して有意に低い値を示した（P<0.05）。しかしながら、OTr群とCTr群の間に差は見られなかった。

また、IPGTT中のインスリン濃度の経時変化およびインスリン曲線下面積をFig.4に示した。グルコース注入前のインスリン濃度は、Sed群;2.40 ± 0.76 mg/dl、OTr群;1.21 ± 0.43 mg/dl、CTr群;1.64 ± 0.26 mg/dlであり、Sed群と比較してOTr群のみ有意に低い値を示した（P<0.05）。グルコース注入の30、60、120分後において、Sed群と比較してOTr群およびCTr群のインスリン濃度は有意に低い値を示し（P<0.05）、30分後においてCTr群はOTr群より有意に高い値を示した（P<0.05）。また、インスリン曲線下面積はSed群;392.6 ± 59.3 mg/dl・min、OTr群;143.3 ± 32.4 mg/dl・min、CTr群;217.5 ± 52.1 mg/dl・minであり、OTr群およびCTr群はSed群と比較して有意に低い値を示した（P<0.05）が、CTr群はOTr群より高い値を示した（P<0.05）。

第4節 骨格筋におけるHSP72発現量

10週間のトレーニング期間終了後のヒラメ筋(A)および足底筋(B)におけるHSP72発現量をFig.5に示した。データはSed群に対する相対値で表し、ヒラメ筋(A)においてはSed群で1.00 ± 0.09、OTr群で1.13 ± 0.12、CTr群で1.10 ± 0.14であり3群間に有意な差は認められなかった。

一方、足底筋(B)においてはSed群で1.00 ± 0.17、OTr群で1.82 ± 0.17、CTr

群で 1.61 ± 0.15 であり、OTr 群および CTr 群は Sed 群と比較して有意に高い値を示し ($P<0.05$)、また、CTr 群は OTr 群と比較して有意に低い値を示した ($P<0.05$)。

第 5 節 骨格筋における GLUT4 発現量

10 週間のトレーニング期間終了後のヒラメ筋(A)および足底筋(B)における GLUT4 発現量を Fig.5 に示した。データは Sed 群に対する相対値で表し、ヒラメ筋 (A) においては Sed 群で 1.00 ± 0.22 、OTr 群で 1.46 ± 0.29 、CTr 群で 1.31 ± 0.22 であり、OTr 群は Sed 群と比較して有意に高い値を示した ($P<0.05$)。

一方、足底筋 (B) においては Sed 群で 1.00 ± 0.22 、OTr 群で 1.38 ± 0.24 、CTr 群で 1.32 ± 0.14 であり、OTr 群および CTr 群は Sed 群と比較して有意に高い値を示した ($P<0.05$)。

第5章 考察

本研究の目的は常温環境（25℃）または低温環境（4℃）で10週間のトレーニングを行い、トレーニング時の体温上昇の有無が2型糖尿病ラットの耐糖能に与える影響を明らかにすることであった。本研究は、運動トレーニングによる2型糖尿病の改善効果において、運動時の体温上昇が果たす役割について検討した最初の研究である。以下に本研究で得られた結果について考察する。

本研究では、2型糖尿病のモデル動物であるOLETFを用いた。OLETFは、離乳後から過食と肥満を呈し、若齢より高脂血症や高インスリン血症が観察される。そして、25週齢の雄においてほぼ全ての個体が糖尿病と診断されることが報告されている²³⁾。本研究においても、25週齢時に腹腔内糖負荷試験により全ての実験動物が糖尿病を発症していることを確認した。

一般的に、長期的な運動トレーニングの効果として、体重の維持または減少が挙げられ、特に肥満者に対する有酸素的なトレーニングは脂肪量を減少させることでインスリンの働きを改善することが報告されている⁴⁾。本研究においても、トレーニング開始2～3週目から有意な体重減少が見られた。さらに、絶対的な筋重量に変化はなく、脂肪重量が有意に減少していることから、本研究における体重の減少は主に脂肪量の減少と関連しており、2型糖尿病の改善に対するトレーニング効果としては十分であったと考えられる。

本研究では、トレーニング時の体温上昇の有無が2型糖尿病ラットの耐糖能に与える影響を検討するために、OLETFに対して体温上昇を生じる常温環境（25℃）および体温上昇を生じない低温環境（4℃）³²⁾で10週間の持続的なトレーニングを行った。そして、運動トレーニングによる耐糖能の改善効果を評価するために、IPGTTにより血糖値およびインスリンの測定を行った。その結果、IPGTT時の血糖値は、両トレーニング群で有意に改善したが、トレーニング条件間に差は認められなかった。また、インスリンにおいても、両トレーニング群で有意な改善が見られたが、OTr群において改善の程度はCTr群と比較して有意に大きかった。このことは、体温上昇を伴う常温環境下でのトレーニングの方が体温上昇を伴わない低温環境下でのトレーニングよりも耐糖能の改善、特にインスリン抵抗性に与える効果が大きいことを示唆している。また、このような全身的な耐糖能の改善は、持続的なトレーニングによる骨格筋のインスリン抵抗性の改善により一部説明ができると考えられる。

これまで、骨格筋におけるインスリン抵抗性が増加する機序として、JNKやIKK β といったストレスキナーゼの活性により、インスリンシグナル経路に障害を生じ、糖取り込みが減少することが明らかにされている¹²⁾。それに対して、HSP72はこれらのス

トレスキナーゼの活性を抑制することでインスリン感受性を改善することが報告されている³⁾⁹⁾¹³⁾。本研究では、足底筋において両トレーニング群で HSP72 発現量の有意な増加が見られたが、体温上昇を伴う常温トレーニング群の発現量は、低温トレーニング群よりも有意に高値を示していた。これは、体温上昇による HSP72 の発現増加が先に示したインスリン抵抗性の改善に対するトレーニングの効果において重要な役割を担っている可能性を示唆している。しかしながら、本研究で体温上昇を抑えるために参考にした Ogura らの研究においては、低温環境下での運動において HSP72 発現量の増加はほとんど見られず³²⁾、本研究の結果と一致しなかった。運動による HSP の誘導において、運動時の体温上昇が最も大きな要因として考えられるが、Skidmore ら³⁸⁾は、低温下 (14℃) で体温上昇を防ぎながら運動をさせても HSP70 が誘導されることを報告しており、筋収縮そのものや運動に伴う様々な変化が HSP を誘導する要因となる可能性が指摘されている。また、Ogata ら³¹⁾は、一過性の運動後において 24 時間後まで HSP72 の有意な発現増加が観察されるのに対して、長期的なトレーニングでは HSP72 の有意な発現増加が 2 週間持続することを報告しており、持続的な HSP72 発現の増加は運動の反復に対する骨格筋細胞内の適応である可能性を示唆している。したがって、本研究では、Ogura らの先行研究³²⁾が 9 日間の運動であったのに対して、トレーニング期間が 10 週間と比較的長期間であったため、常温トレーニング群よりは低いものの、体温上昇を生じない環境下でのトレーニングにおいても HSP72 発現量の増加が見られたのかもしれない。

対照的に、ヒラメ筋では両トレーニング群において HSP72 発現量の有意な増加は認められなかった。これまで、HSP72 の発現パターンは骨格筋特異的であり、大部分を遅筋線維が占めるヒラメ筋では、速筋線維優位な足底筋と比較して HSP72 の応答が早いことが明らかにされている。Oishi ら³³⁾は、ヒラメ筋では熱ストレスを加えた直後から増加し、4 時間後にピークを示した後、安静レベルまで戻るのに対して、足底筋では 24~48 時間後にピークを示すことを報告している。本研究のようなトレーニングによる HSP72 の誘導においても、その発現の経時的な変化は類似しており、本研究では最後の運動を行った 48 時間後に骨格筋を摘出したために、ヒラメ筋における発現量が安静レベルまで戻っていた可能性が考えられる。これらのことから、ヒラメ筋においては、両トレーニング群において HSP72 発現量に有意な増加が見られなかったのではないかと考えられる。

さらに、本研究では、骨格筋の糖取り込みに直接的に関与する糖輸送担体である GLUT4 発現量についても分析を行った。骨格筋の糖取り込み量と GLUT4 発現量は非常に強く相関しており、さらに GLUT4 発現量は運動トレーニングにより増加すること

が示されている¹³⁾。本研究は、ヒラメ筋においては OTr 群にのみ有意な増加が見られ、足底筋では両トレーニング群で有意に増加していた。

運動トレーニングによる GLUT4 発現量の増加は GLUT4 mRNA の増加と一致していることが明らかにされており³⁵⁾、GLUT4 発現量の増加は GLUT4 遺伝子の転写促進によるものであると考えられる。また、運動は GLUT4 発現に必要な転写因子である Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) および GLUT4 Enhancer Factor (GEF) の DNA 結合を増加させ、GLUT4 発現の増加に関与していることが報告されている²⁹⁾。これらの応答を促進する因子については明らかではないが、MEF2 は、ラットの脳において熱ストレスに応答して活性化する可能性が示唆されている²⁷⁾。ヒラメ筋において OTr 群でのみ GLUT4 発現量が有意に増加したが、骨格筋においても同様の応答が生じているのであれば、体温上昇を伴うトレーニングの方が MEF2 を介した GLUT4 発現の増加を促進させ、糖取り込みの改善に効果的に作用する可能性が推察される。しかしながら、体温上昇が GLUT4 発現量の増加に果たす役割を明らかにするためには、今後さらなる研究が必要である。

以上のことから、2 型糖尿病を発症したラットの耐糖能を改善するためには、体温上昇を伴う運動の方が効果的であり、その要因として骨格筋における HSP72 および GLUT4 の発現増加が関与している可能性が示唆される。

第6章 結論

10週間の持続的トレーニングは2型糖尿病を発症したラットの耐糖能を改善するが、その改善には運動時の体温上昇の有無が一部影響を与える可能性が示唆された。

第7章 要約

運動は体温の上昇や骨格筋の熱ショックタンパク質 (HSP) の発現増加を引き起こし、これらが耐糖能の改善に貢献する可能性が示唆されている。一方で、4°Cの低温環境下での運動では、体温上昇および HSP 発現増加が抑制されることが報告されている。しかしながら、運動時の体温上昇の有無により耐糖能に与える影響が異なるか否かは明らかではない。

そこで、本研究は運動トレーニング時の体温上昇の有無が 2 型糖尿病ラットの耐糖能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

2 型糖尿病モデル動物である OLETF を安静 (Sed) 群、常温トレーニング (OTr) 群および低温トレーニング (CTr) 群に群分けした。OTr 群および CTr 群はそれぞれ常温環境 (25°C) および低温環境 (4°C) で、動物用トレッドミルを用いて 10~20 m/min で 60 分の運動を週 5 日、10 週間行った。また、各運動の前後に直腸温を測定した。9 週目のトレーニング終了 48 時間後に腹腔内糖負荷試験を行い、血糖値とインスリン濃度を分析した。また、最後の運動終了 48 時間後にヒラメ筋および足底筋を摘出し、ウェスタンブロット法を用いて HSP72 および GLUT4 発現量を分析した。

運動後における OTr 群の直腸温は $40.55 \pm 0.41^{\circ}\text{C}$ であり、運動前 ($37.97 \pm 0.48^{\circ}\text{C}$) より有意に上昇しており、また CTr 群 ($38.01 \pm 0.35^{\circ}\text{C}$) と比較して有意に高い値を示した ($P<0.05$)。腹腔内糖負荷試験において、OTr 群および CTr 群の血糖値の経時的な変化および血糖曲線下面積は Sed 群より有意に低値を示した ($P<0.05$) が、両トレーニング群間に差は見られなかった。一方、インスリン濃度は両トレーニング群とも Sed 群と比較して有意に低値を示した ($P<0.05$) が、CTr 群における 30 分後のインスリン濃度は OTr 群と比較して有意に高く ($P<0.05$)、インスリン曲線下面積においても CTr 群は OTr 群より有意に高値を示した ($P<0.05$)。ヒラメ筋における HSP72 発現量は群間で有意差は見られなかった。一方、足底筋における OTr 群および CTr 群の HSP72 発現量は Sed と比較して 1.82 倍および 1.61 倍であり有意に高値を示した ($P<0.05$) が、CTr 群は OTr 群より有意に低値を示した ($P<0.05$)。ヒラメ筋における OTr 群および CTr 群 GLUT4 発現量は Sed 群と比較して 1.46 倍および 1.31 倍であり、OTr 群のみ有意に高値を示し ($P<0.05$)、足底筋における OTr 群および CTr 群 GLUT4 発現量は 1.38 倍および 1.32 倍であり、両トレーニング群とも有意に高値を示した ($P<0.05$)。

本研究の結論として、10 週間の持続的トレーニングは 2 型糖尿病を発症したラットの耐糖能を改善するが、その改善には運動時の体温上昇の有無が一部影響を与える可能性が示唆された。

謝辞

本稿の執筆にあたり、多くの先生、博士研究員ならびに運動生理学研究室の大学院生の方々にご指導、ご協力をいただきました。特に、筑波大学附属病院水戸地域医療センターの小林裕幸先生には、研究の進行に関して多くの助言や協力をいただきました。また、新潟医療福祉大学の川中健太郎先生には、GLUT4の分析に関してご指導いただきました。心から感謝致します。

引用文献

- 1 American Diabetes Association., (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes care* 33 Suppl 1, S62-69.
- 2 Anai, M., Funaki, M., Ogihara, T., Terasaki, J., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., and Asano, T., (1998). Altered expression levels and impaired steps in the pathway to phosphatidylinositol 3-kinase activation via insulin receptor substrates 1 and 2 in Zucker fatty rats, *Diabetes* 47 (1), 13-23.
- 3 Chung, J., Nguyen, A.K., Henstridge, D.C., Holmes, A.G., Chan, M.H., Mesa, J.L., Lancaster, G.I., Southgate, R.J., Bruce, C.R., Duffy, S.J., Horvath, I., Mestril, R., Watt, M.J., Hooper, P.L., Kingwell, B.A., Vigh, L., Hevener, A., and Febbraio, M.A., (2008). HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (5), 1739-1744.
- 4 Colberg, S.R., Albright, A.L., Blissmer, B.J., Braun, B., Chasan-Taber, L., Fernhall, B., Regensteiner, J.G., Rubin, R.R., and Sigal, R.J., (2010). Exercise and type 2 diabetes: American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. Exercise and type 2 diabetes, *Med Sci Sports Exerc* 42 (12), 2282-2303.
- 5 DeFronzo, R.A., (1988). The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM, *Diabetes* 37 (6), 667-687.
- 6 Folli, F., Saad, M.J., Backer, J.M., and Kahn, C.R., (1992). Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat, *The Journal of biological chemistry* 267 (31), 22171-22177.
- 7 Fujii, N., Jessen, N., and Goodyear, L.J., (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 291 (5), E867-877.
- 8 Gabai, V.L., Meriin, A.B., Mosser, D.D., Caron, A.W., Rits, S., Shifrin, V.I., and Sherman, M.Y., (1997). Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance, *The Journal of biological chemistry* 272 (29), 18033-18037.
- 9 Geiger, P.C. and Gupte, A.A., (2011). Heat shock proteins are important mediators of skeletal muscle insulin sensitivity, *Exerc Sport Sci Rev* 39 (1),

- 34-42.
- 10 Goodyear, L.J., Hirshman, M.F., Knutson, S.M., Horton, E.D., and Horton, E.S., (1988). Effect of exercise training on glucose homeostasis in normal and insulin-deficient diabetic rats, *J Appl Physiol* 65 (2), 844-851.
 - 11 Goodyear, L.J. and Kahn, B.B., (1998). Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity, *Annu Rev Med* 49, 235-261.
 - 12 Gupte, A.A., Bomhoff, G.L., and Geiger, P.C., (2008). Age-related differences in skeletal muscle insulin signaling: the role of stress kinases and heat shock proteins, *J Appl Physiol* 105 (3), 839-848.
 - 13 Gupte, A.A., Bomhoff, G.L., Swerdlow, R.H., and Geiger, P.C., (2009). Heat treatment improves glucose tolerance and prevents skeletal muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet, *Diabetes* 58 (3), 567-578.
 - 14 Hamilton, K.L., Powers, S.K., Sugiura, T., Kim, S., Lennon, S., Tumer, N., and Mehta, J.L., (2001). Short-term exercise training can improve myocardial tolerance to I/R without elevation in heat shock proteins, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 (3), H1346-1352.
 - 15 Hayashi, T., Hirshman, M.F., Kurth, E.J., Winder, W.W., and Goodyear, L.J., (1998). Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport, *Diabetes* 47 (8), 1369-1373.
 - 16 Hayashi, T., Wojtaszewski, J.F., and Goodyear, L.J., (1997). Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle, *The American journal of physiology* 273 (6 Pt 1), E1039-1051.
 - 17 Holloszy, J.O. and Hansen, P.A., (1996). Regulation of glucose transport into skeletal muscle, *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 128, 99-193.
 - 18 Hooper, P.L., (1999). Hot-tub therapy for type 2 diabetes mellitus, *N Engl J Med* 341 (12), 924-925.
 - 19 Hooper, P.L. and Hooper, P.L., (2009). Inflammation, heat shock proteins, and type 2 diabetes, *Cell Stress Chaperones* 14 (2), 113-115.
 - 20 Hotamisligil, G.S., (2006). Inflammation and metabolic disorders, *Nature* 444 (7121), 860-867.
 - 21 Jessen, N. and Goodyear, L.J., (2005). Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle, *J Appl Physiol* 99 (1), 330-337.
 - 22 Kawanaka, K., Tabata, I., and Higuchi, M., (1997). More tetanic contractions

- are required for activating glucose transport maximally in trained muscle, *J Appl Physiol* 83 (2), 429-433.
- 23 Kawano, K., Hirashima, T., Mori, S., Saitoh, Y., Kurosumi, M., and Natori, T., (1992). Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain, *Diabetes* 41 (11), 1422-1428.
- 24 Kurucz, I., Morva, A., Vaag, A., Eriksson, K.F., Huang, X., Groop, L., and Koranyi, L., (2002). Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance, *Diabetes* 51 (4), 1102-1109.
- 25 Lin, H.V. and Accili, D., (2011). Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease, *Cell Metab* 14 (1), 9-19.
- 26 Locke, M., Noble, E.G., and Atkinson, B.G., (1990). Exercising mammals synthesize stress proteins, *The American journal of physiology* 258 (4 Pt 1), C723-729.
- 27 Maroni, P., Bendinelli, P., Tiberio, L., Rovetta, F., Piccoletti, R., and Schiaffonati, L., (2003). In vivo heat-shock response in the brain: signalling pathway and transcription factor activation, *Brain Res Mol Brain Res* 119 (1), 90-99.
- 28 Matsuzawa, Y., Funahashi, T., and Nakamura, T., (1999). Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances, *Ann N Y Acad Sci* 892, 146-154.
- 29 McGee, S.L. and Hargreaves, M., (2006). Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33 (4), 395-399.
- 30 Naito, H., Powers, S.K., Demirel, H.A., and Aoki, J., (2001). Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats, *Med Sci Sports Exerc* 33 (5), 729-734.
- 31 Ogata, T., Oishi, Y., Higashida, K., Higuchi, M., and Muraoka, I., (2009). Prolonged exercise training induces long-term enhancement of HSP70 expression in rat plantaris muscle, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296 (5), R1557-1563.
- 32 Ogura, Y., Naito, H., Akin, S., Ichinoseki-Sekine, N., Kurosaka, M., Kakigi,

- R., Sugiura, T., Powers, S.K., Katamoto, S., and Demirel, H.A., (2008). Elevation of body temperature is an essential factor for exercise-increased extracellular heat shock protein 72 level in rat plasma, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294 (5), R1600-1607.
- 33 Oishi, Y., Taniguchi, K., Matsumoto, H., Ishihara, A., Ohira, Y., and Roy, R.R., (2002). Muscle type-specific response of HSP60, HSP72, and HSC73 during recovery after elevation of muscle temperature, *J Appl Physiol* 92 (3), 1097-1103.
- 34 Park, H.S., Lee, J.S., Huh, S.H., Seo, J.S., and Choi, E.J., (2001). Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase, *EMBO J* 20 (3), 446-456.
- 35 Ren, J.M., Semenkovich, C.F., Gulve, E.A., Gao, J., and Holloszy, J.O., (1994). Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle, *The Journal of biological chemistry* 269 (20), 14396-14401.
- 36 Rodnick, K.J., Henriksen, E.J., James, D.E., and Holloszy, J.O., (1992). Exercise training, glucose transporters, and glucose transport in rat skeletal muscles, *The American journal of physiology* 262 (1 Pt 1), C9-14.
- 37 Salo, D.C., Donovan, C.M., and Davies, K.J., (1991). HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise, *Free Radic Biol Med* 11 (3), 239-246.
- 38 Skidmore, R., Gutierrez, J.A., Guerriero, V., Jr., and Kregel, K.C., (1995). HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature, *The American journal of physiology* 268 (1 Pt 2), R92-97.
- 39 Weir, G.C., Laybutt, D.R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S., and Sharma, A., (2001). Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes, *Diabetes* 50 Suppl 1, S154-159.
- 40 Wellen, K.E. and Hotamisligil, G.S., (2005). Inflammation, stress, and diabetes, *J Clin Invest* 115 (5), 1111-1119.
- 41 Werner, E.D., Lee, J., Hansen, L., Yuan, M., and Shoelson, S.E., (2004). Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302, *The Journal of biological chemistry* 279 (34), 35298-35305.
- 42 Witczak, C.A., Jessen, N., Warro, D.M., Toyoda, T., Fujii, N., Anderson, M.E.,

- Hirshman, M.F., and Goodyear, L.J., (2010). CaMKII regulates contraction- but not insulin-induced glucose uptake in mouse skeletal muscle, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298 (6), E1150-1160.
- 43 Wright, D.C., Hucker, K.A., Holloszy, J.O., and Han, D.H., (2004). Ca²⁺ and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions, *Diabetes* 53 (2), 330-335.
- 44 Youn, J.H., Gulve, E.A., and Holloszy, J.O., (1991). Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction, *The American journal of physiology* 260 (3 Pt 1), C555-561.

英文要約

Abstract

The effects of elevation of body temperature during exercise training on
glucose tolerance in type 2 diabetic rats

Takamasa TSUZUKI

Exercise elevates body temperature, resulting in increased heat shock protein (HSP) expression in skeletal muscle. This increase of HSP expression has been suggested to contribute to improved glucose tolerance. However, it is unclear whether exercise in the absence of increased body temperature can improve glucose tolerance.

PURPOSE: To examine the effects of elevation of body temperature during exercise training on glucose tolerance in type 2 diabetic rats.

METHODS: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, which are type 2 diabetes models, were randomly divided into three groups: sedentary (Sed: n = 9), animals trained in ordinary environmental conditions (OTr: n = 9) or those trained in cold environment (CTr: n = 9). Exercise training conducted five days a week for 10 weeks at 25°C for OTr animals and at 4°C for CTr animals. A rectal thermometer monitored a rise in body temperature during exercise. An intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed for each group before and after the training period. Soleus and plantaris muscles were sampled under anesthesia 48 hours after the last exercise session. Expression of HSP72 and glucose transporter 4 (GLUT4) was analyzed by Western blot.

RESULTS: Body temperature significantly increased in OTr animals ($40.55 \pm 0.41^\circ\text{C}$), whereas body temperature in CTr animals ($38.01 \pm 0.35^\circ\text{C}$) remained similar after exercise. The areas under the curve of glucose and insulin determined by IPGTT were smaller for OTr and CTr animals than the Sed group, indicating improved glucose tolerance after training. The values of glucose were similar between OTr and CTr groups, whereas the value of insulin in CTr animals was higher than OTr animals. No significant differences in HSP72 expression were observed among the three OLETF groups in the soleus muscle. In the plantaris

muscle, however, both OTr and CTr animals expressed higher levels of HSP72 than the Sed group, with increased HSP72 expression being greater for OTr animals. In the soleus muscle, GLUT4 expression in OTr group was significantly higher than the Sed group. In the plantaris muscle, GLUT4 expression was significantly increased in the OTr and CTr groups, compared with the Sed group.

CONCLUSION: It is suggested that elevation of body temperature during exercise training partly affects to improve glucose tolerance in type 2 diabetic rats.

略語表

AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	AMP-related protein kinase
APS	Ammoniumpersulfate
AS160	Akt substrate 160
ATP	Adenosine triphosphate
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
DNA	Deoxyribonucleic acid
GLUT	Glucose transporter
GEF	GLUT4 enhancer factor
HSP	Heat shock protein
IR	Insulin receptor
IRS-1	Insulin receptor substrate-1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
IKK	Inhibitor of κ B kinase
MEF2	Myocyte enhancer factor 2
mRNA	messenger ribonucleic acid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
IPGTT	Intraperitoneal glucose tolerance test
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine
TNF- α	Tumor necrosis factor- α

Table 1. Exercise training protocol

	Number of training week									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Intensity (m/min)	10-15	10-17.5	10-17.5	10-20	12.5-20	15-20	15-20	17.5-20	20	20
Duration (min)	10-40	40-60	60	60	60	60	60	60	60	60
Grade (°)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Animals in exercise training groups were trained using motor-driven animal treadmill for 10 weeks in a climate-controlled room at 25°C or 4°C.

Table 2. Absolute and relative weight of skeletal muscle, heart, liver and white adipose tissue.

	Sed	OTr		CTr	
Absolute weight					
Skeletal muscle (mg)					
Soleus	190.8 ± 10.1	180.7 ± 4.6		179.8 ± 7.1	
Plantaris	425.7 ± 15.9	434.6 ± 24.4		432.4 ± 24.2	
Heart (mg)	1099.1 ± 28.6	1113.4 ± 28.6		1135.7 ± 91.0	
Liver (g)	8.4 ± 1.0	6.9 ± 0.9	*	7.3 ± 0.7	#
White adipose tissue (g)	17.4 ± 3.0	9.9 ± 1.7	*	12.7 ± 1.9	#
Relative weight					
Skeletal muscle (mg/g)					
Soleus	0.28 ± 0.02	0.32 ± 0.02	*	0.30 ± 0.02	
Plantaris	0.63 ± 0.05	0.76 ± 0.06	*	0.73 ± 0.06	#
Heart (mg/g)	1.62 ± 0.06	1.95 ± 0.08	*	1.88 ± 0.05	#
Liver (mg/g)	12.38 ± 0.90	12.02 ± 1.26		12.35 ± 0.43	
White adipose tissue (mg/g)	25.47 ± 3.40	17.24 ± 2.52	*	21.32 ± 3.01	#

Skeletal muscle, heart, liver and white adipose tissue from sedentary (Sed), trained in ordinary temperature (OTr) and cold temperature (CTr) rats were sampled under anesthesia 48 hours after the last exercise session. Values are mean ± SD. *P<0.05; Sed vs. OTr, # P<0.05; Sed vs CTr.

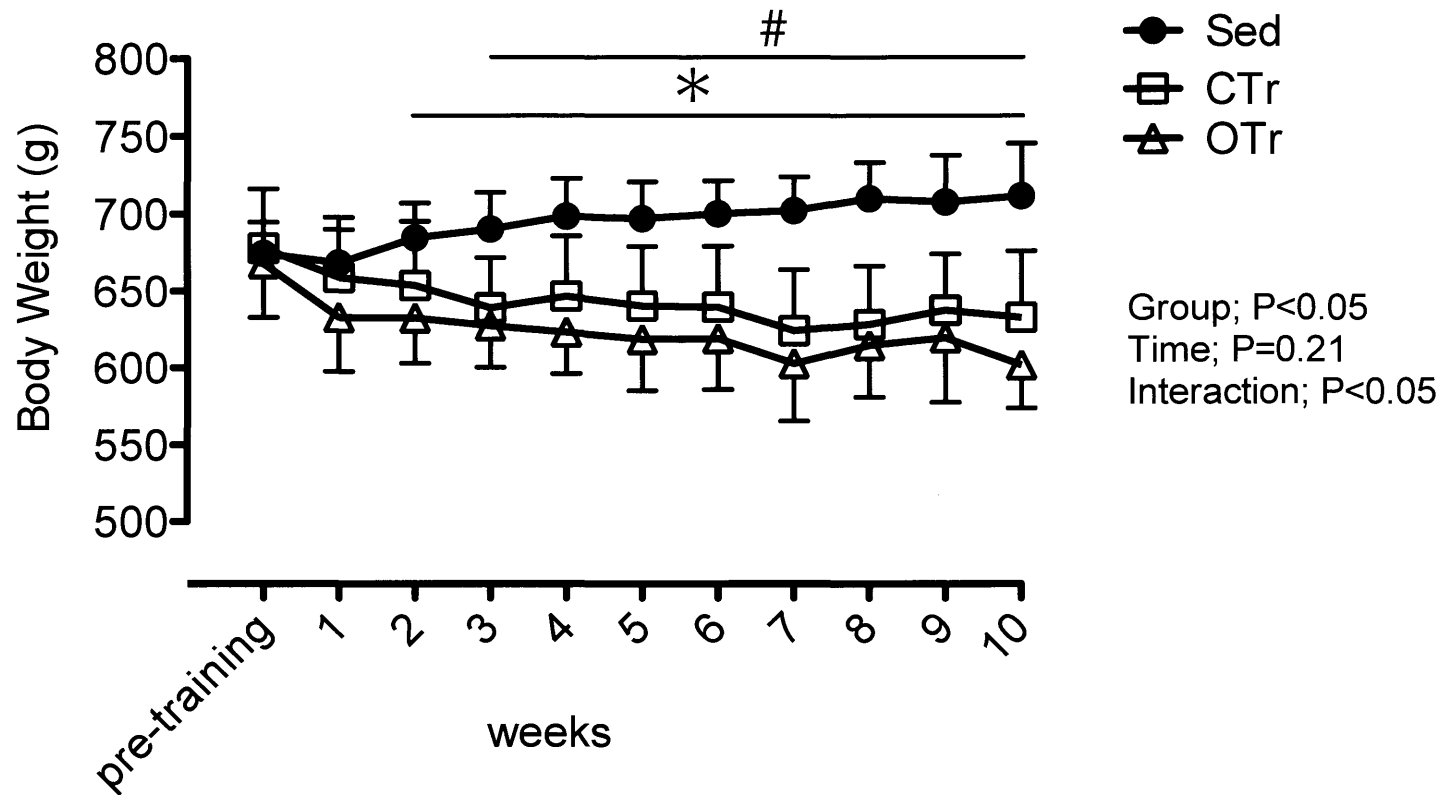


Fig.1 Changes of body weight from sedentary (Sed), trained in ordinary temperature (OTr) and cold temperature (CTr) rats during exercise training period. Values are mean \pm SD.
 *P<0.05 Sed vs OTr, # P<0.05 Sed vs CTr.

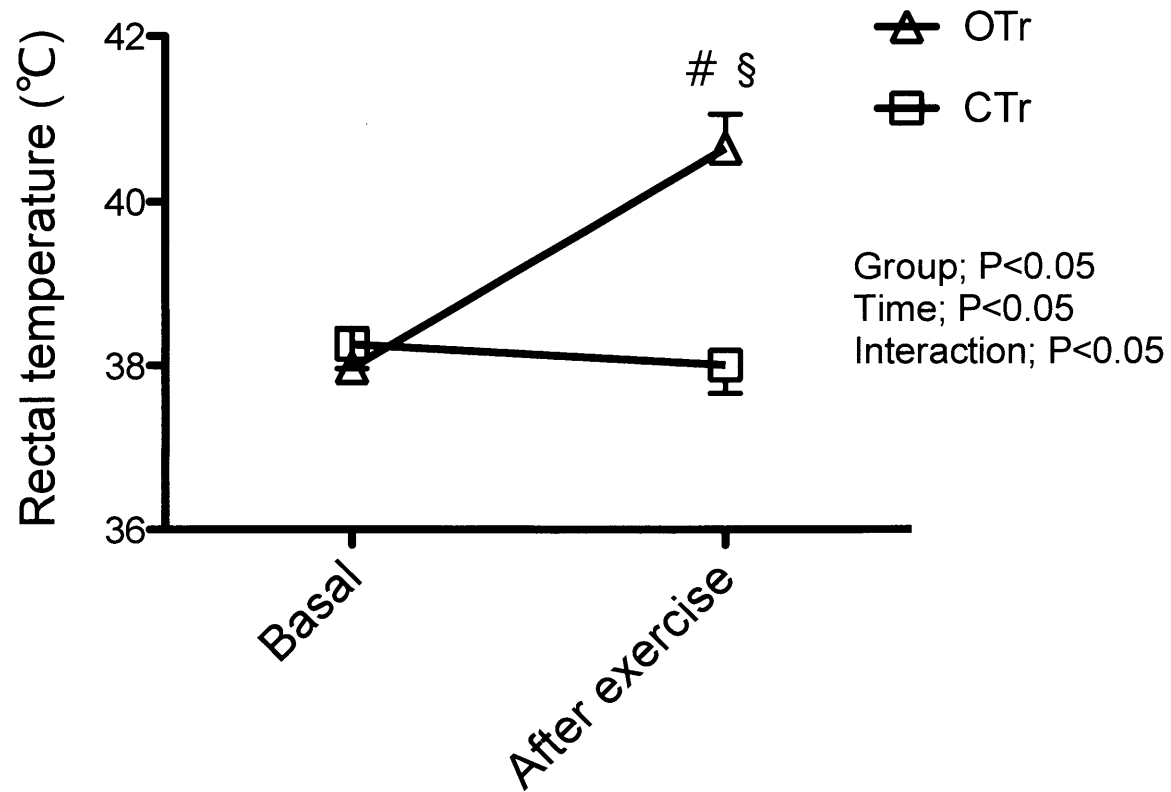


Fig.2 Changes in rectal temperatures of animals in exercise under ordinary temperature (25°C) (OTr) and cold temperature (4°C) (CTr). The values of the last three bouts of exercise were averaged. Values are mean \pm SD.

P<0.05; Different from CTr after exercise, § P<0.05; Different from basal OTr.

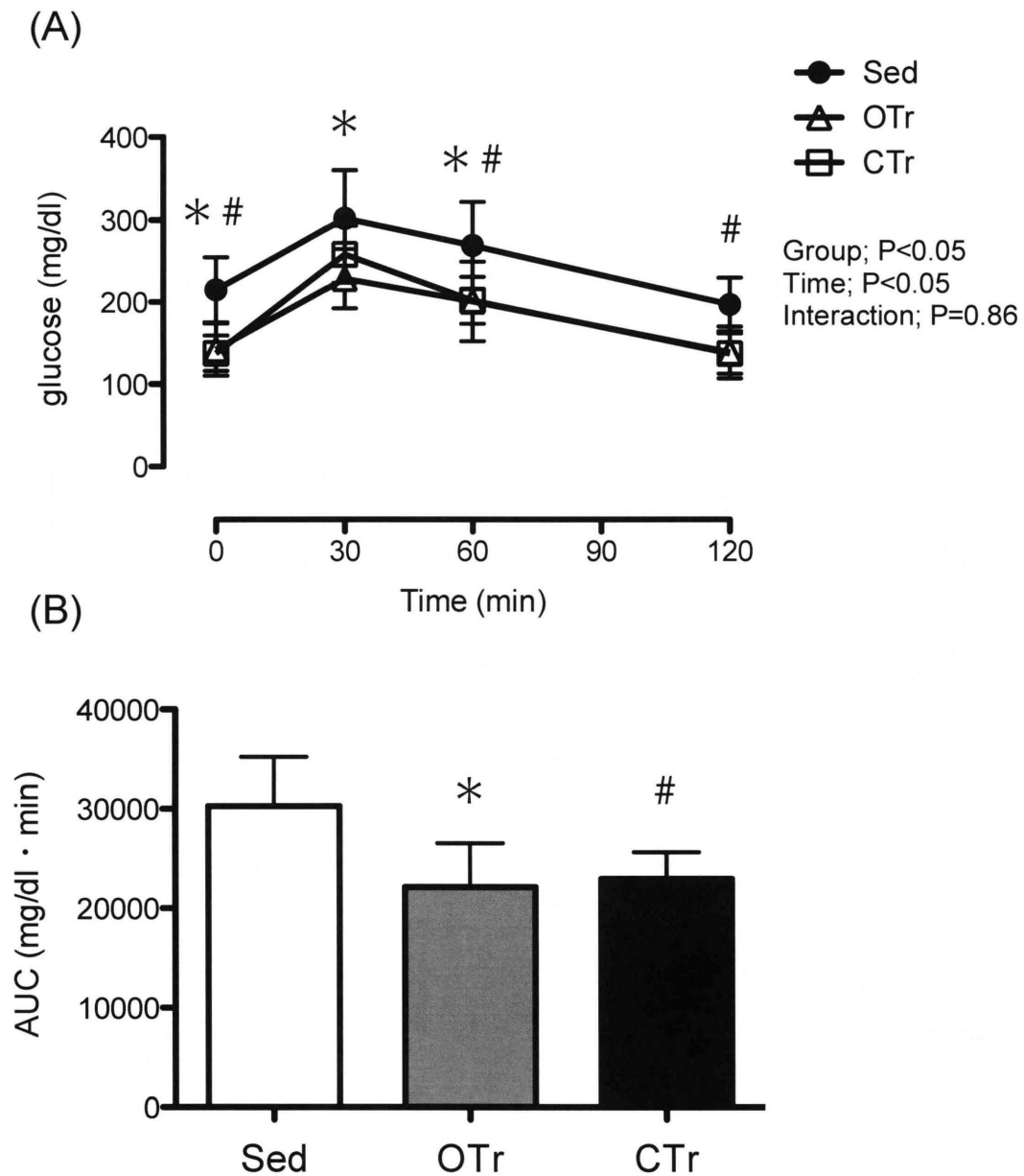


Fig.3 (A) Time course and (B) area under the curve (AUC) of glucose from sedentary (Sed), trained in ordinary temperature (OTr) and cold temperature (CTr) rats determined by IPGTT performed after week 9 exercise training session. Values are mean \pm SD. *P<0.05; Sed vs OTr, #P<0.05; Sed vs CTr.

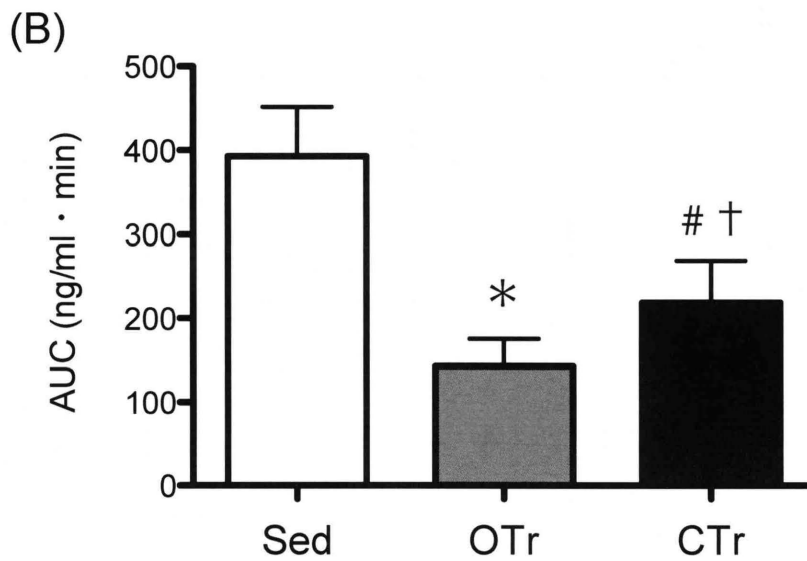
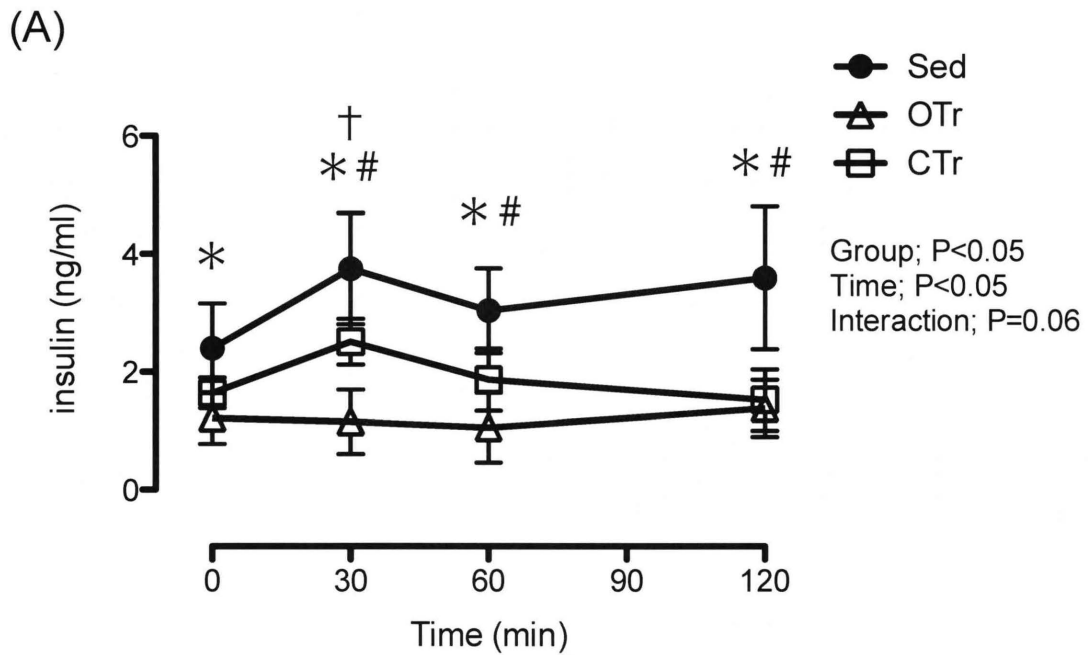
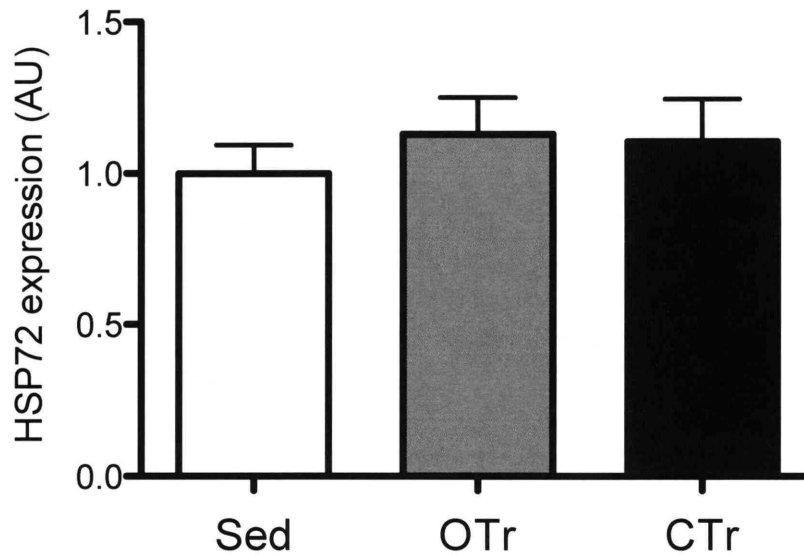


Fig.4 (A) Time course and (B) area under the curve (AUC) of insulin from sedentary (Sed), trained in ordinary temperature (OTr) and cold temperature (CTr) rats determined by IPGTT performed after week 9 exercise training session. Values are mean \pm SD. *P<0.05; Sed vs. OTr, # P<0.05; Sed vs CTr, † P<0.05; OTr vs CTr.

(A) Soleus



(B) Plantaris

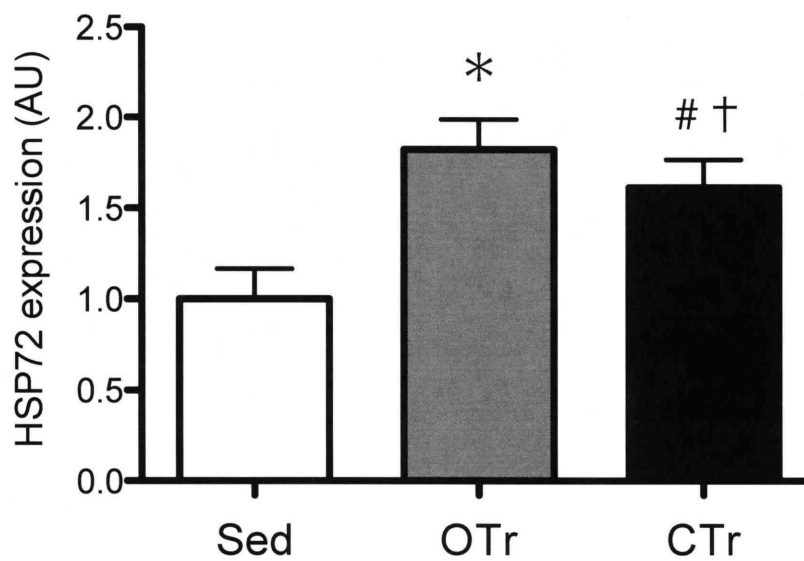
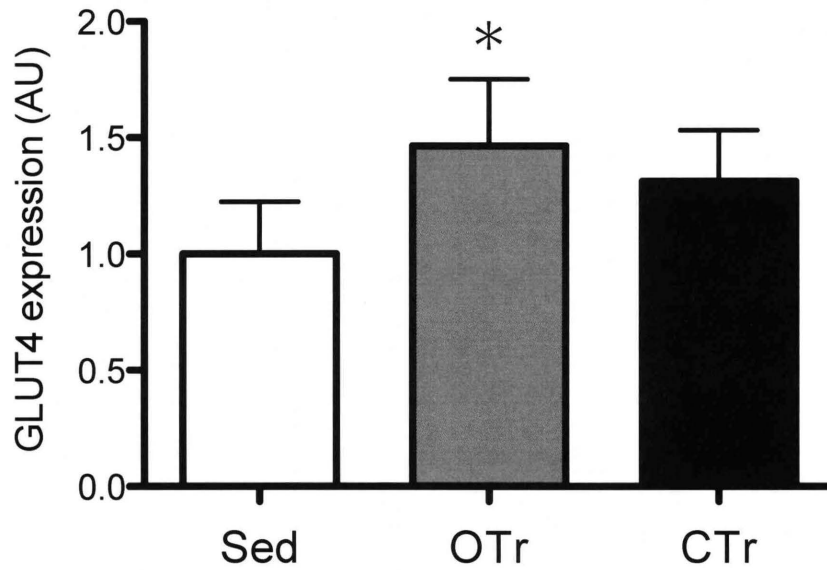


Fig.5 The expression of heat shock protein 72 (HSP72) in (A) soleus and (B) plantaris muscles from sedentary (Sed), trained in ordinary temperature (OTr) and cold temperature (CTr) rats after exercise training period. Values are mean \pm SD. * P <0.05; Sed vs. OTr, # P <0.05; Sed vs CTr, † P <0.05; OTr vs CTr.

(A) Soleus



(B) Plantaris

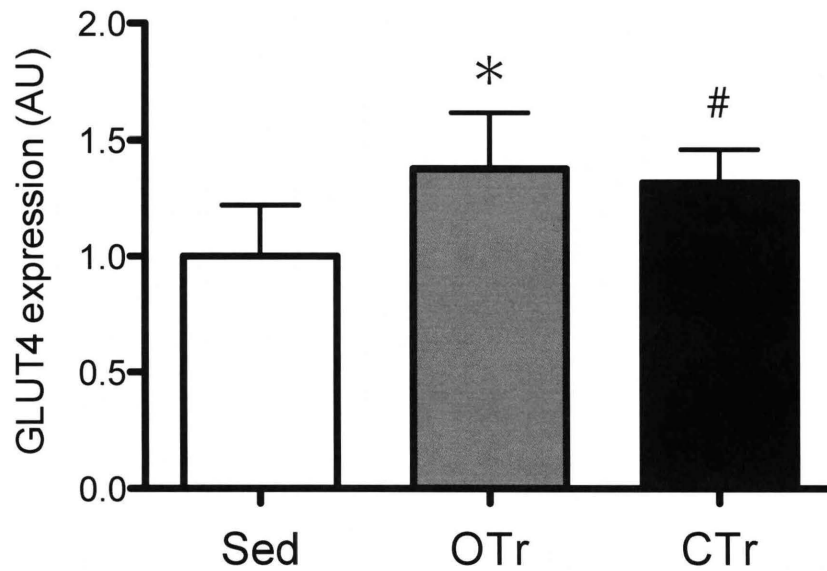


Fig.6 The expression of glucose transporter 4 (GLUT4) in (A) soleus and (B) plantaris muscles from sedentary (Sed), trained in ordinary temperature (OTr) and cold temperature (CTr) rats after exercise training period. Values are mean \pm SD. *P<0.05; Sed vs. OTr, # P<0.05; Sed vs CTr.