

トピックス

ラット後肢骨格筋灌流法におけるAMPK活性化薬の脂質代謝に対する作用

万有製薬(株)つくば研究所

広瀬 博康, 西端 俊秀, 徳島ゆきな, 白倉 尚, 鈴木 順

はじめに

骨格筋における脂質代謝カスケードにおいて, AMP-activated protein kinase(AMPK)はその活性化により脂肪酸の取込と消費(酸化)の亢進を担っている。現在, 肥満を伴った代謝性疾患において, このAMPKを介した脂質代謝調節機能の関与が注目されているが, 骨格筋レベルでAMPKを介した脂質代謝調節の障害あるいは活性化について検討した報告は少ない。

我々は臓器灌流の一種である *in situ* 後肢骨格筋灌流法¹⁾にて, 骨格筋におけるエネルギー代謝の研究を行っている。この *in situ* 灌流法は, 種々のトレーサーを利用して脂質代謝だけでなく糖代謝について臓器・組織レベルで観測が可能であり, また, 経口吸収性や薬物代謝に問題がある化合物についても, 灌流液中一定濃度で標的臓器(本実験では骨格筋)へ血管を介して到達させて薬理的解析に用いることができるといった特徴を有する。今回, 肥満およびインスリン抵抗性を呈するラット病態モデルの骨格筋におけるAMPK活性化薬による脂質代謝の調節に関する検討を行った結果を報告する。

方法

雄性SD系ラットには5週齢より9-10週間, 高カロリー餌(D-12451, 4.7 kcal/g, 脂肪含有率24wt/wt%, 蔗糖含有率20wt/wt%, Research Diet社)を自由摂取させた高カロリー餌負荷SDラット(DIO-SD)群と正常餌(CE-2, 3.4kcal/g, 脂肪含有率4.6wt/wt%, 日本クレア)で飼育した正常餌負荷SDラット(Lean-SD)群を作製した。雄性SD系およびZucker fatty系ラット(ZF)(13~16週齢)をペントバルビタールにより麻酔し, 右大腿動脈および大腿静脈にカテーテルを挿入した。右大腿動脈より灌流液を定速注入(5 ml/min)し, 大腿静脈より回収する *in situ* 後肢骨格筋灌流¹⁾を行った。灌流液中カーボン(¹⁴C)標識したパルミチン酸を用

いて酸化量を測定し, 脂肪酸酸化の指標とした。灌流液中コールドのパルミチン酸およびグルコース濃度は, 肥満症での血中濃度を模した条件として各々1mMおよび10mMとして, その取込量を測定した。インスリン濃度は0.2mU/mlとした。AMPK活性化薬として5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside(AICAR)を2mMの濃度で処置した。

結果

本研究に用いた動物の体重および血漿中パラメーターを表に示す。DIO-SD群およびZF群では, Lean-SDラット群に比較し体重および血漿中インスリンおよび遊離脂肪酸(FFA)値が有意に高かった。とくにZFでは, 血漿中グルコースおよび中性脂肪(TG)も高値であった。

AICARはLean-SDにおいて顕著な脂肪酸取込亢進作用を示した。DIO-SDにおいて, AICARによる脂肪酸取込亢進作用は有意ではあるが, Lean-SDに比して低値を示し, ZFにおいては, その亢進作用は認められなかった(図1)。一方, 糖取込に対して, AICARは本試験で用いた全ての群において少なくとも低下作用を示さず, わずかに増加傾向を示した(図2)。脂肪酸酸化に対して, AICARはLean-

表 *in situ*灌流試験に用いたラットの体重および各種血漿パラメーター

Strain	Body weight (g)	Insulin (ng/ml)	Glucose (mg/dl)	FFA (mEq/l)	TG (mg/dl)
Lean-SD	550 ± 11	4.6 ± 0.3	149 ± 4	0.57 ± 0.04	139 ± 15
DIO-SD	634 ± 16***	5.9 ± 0.3**	159 ± 4	0.83 ± 0.09*	183 ± 21
ZF	580 ± 5*	21.0 ± 2.8***	369 ± 36***	1.24 ± 0.15***	1,113 ± 275***

Plasma samples were obtained under pentobarbital anesthesia before *in situ* assay. Regular diet-fed SD rat(Lean-SD), high calorie diet-fed SD rat(DIO-SD), and Zucker fatty rat(ZF)

Data are means ± SE for 9-19 animals in each group. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs Lean-SD

SDにおいて有意な亢進作用を示したが, DIO-SDではわずかな増加傾向であり, ZFにおいては, 脂肪酸酸化亢進作用は認められなかった(図3).

考察

我々は, 正常ラットの後肢骨格筋灌流系において, AMPK活性化薬は糖取込を低下させずに脂肪酸取込および

酸化に対して亢進作用を示すことを見出した. 骨格筋のAMPKが活性化すると, アセチルCoAカルボキシラーゼをリン酸化して活性を抑制する. その結果, マロニルCoAが減少してカルニ

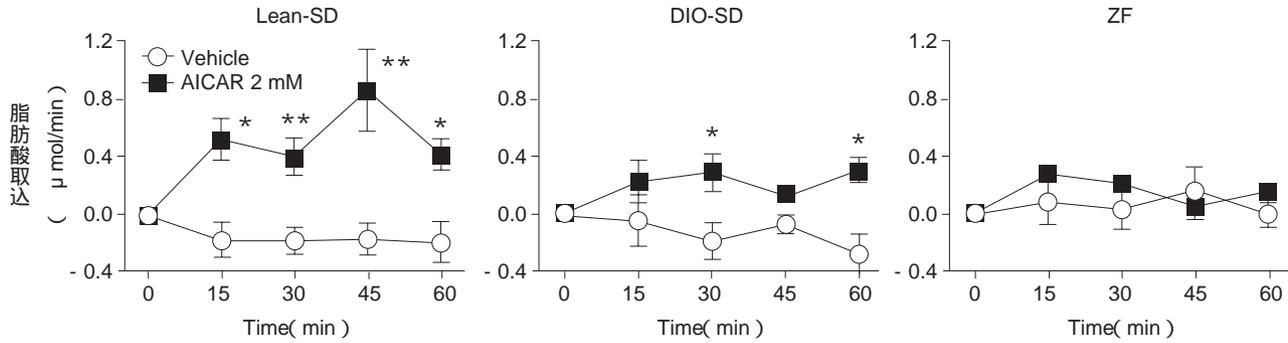


図1 正常餌負荷SDラット(Lean-SD), 高カロリー餌負荷SDラット(DIO-SD), およびZucker fattyラット(ZF)を用いた*in situ*後肢骨格筋灌流におけるAMPK活性化薬の脂肪酸取込に対する作用
Data are means \pm SE. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs vehicle-treated group.

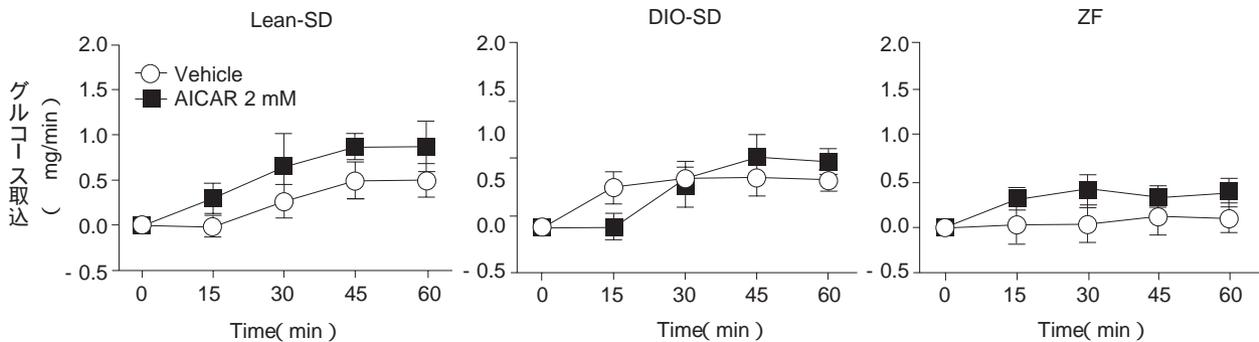


図2 正常餌負荷SDラット(Lean-SD), 高カロリー餌負荷SDラット(DIO-SD), およびZucker fattyラット(ZF)を用いた*in situ*後肢骨格筋灌流におけるAMPK活性化薬のグルコース取込に対する作用
Data are means \pm SE.

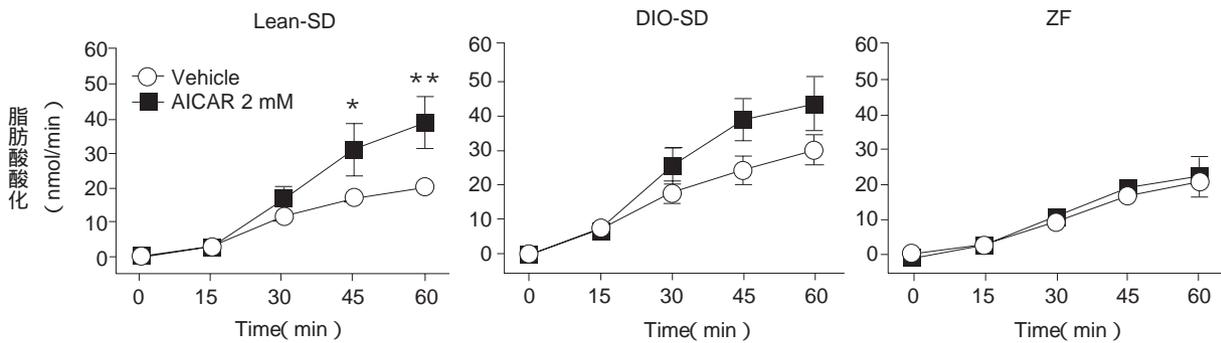


図3 正常餌負荷SDラット(Lean-SD), 高カロリー餌負荷SDラット(DIO-SD), およびZucker fattyラット(ZF)を用いた*in situ*後肢骨格筋灌流におけるAMPK活性化薬の脂肪酸酸化に対する作用
Data are means \pm SE. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs vehicle-treated group.

チンバルミトイルトランスフェラーゼ-1への抑制が解除され、長鎖脂肪酸のミトコンドリアへの輸送が亢進する²⁾。また、骨格筋AMPKの活性化はGLUT4を介した糖取込を増加することも報告されている²⁾。肥満症を模した高脂肪酸(1mM)および高グルコース(10mM)とした本実験条件下では、正常ラットにおいてAMPK活性化は糖よりむしろ脂肪酸取込を亢進させることが観察された。

次に、我々はインスリン抵抗性を示す食餌性(DIO-SD)および遺伝性(ZF)肥満ラットにおいてAICARの脂肪酸取込および酸化亢進作用への効果を検討したところ、両作用ともに著明な減弱が引き起こされていることを見出した。また、その程度はインスリ

ン抵抗性が著しく進展したZFでより顕著であった。糖尿病ラットの骨格筋においてミトコンドリア機能の障害や、AMPK活性の低下が報告されている^{3, 4)}。したがって、肥満に関連したインスリン抵抗性が惹起された病態において、骨格筋における脂肪酸酸化能が低下し、また、AMPK活性化を介した一連の脂質代謝に関する即時性調節も直接に障害を受けていることが示唆された。

以上、本試験に用いた*in situ*灌流法は、骨格筋におけるインスリン抵抗性および肥満に関連した複雑な脂質代謝障害の解明において有用な研究手段であり、メタボリックシンドロームに関する病態生理の解明や新規薬物療法の探索の一助となると考えられる。

文 献

- 1) Ruderman NB, Houghton CR, Hems R: Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism. *Biochem J* 1971, 124: 639-651.
- 2) Winder WW: Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2001, 91: 1017-1028.
- 3) Lowell BB, Shulman GI: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005, 307: 384-387.
- 4) Yu X, McCorkle S, Wang M, et al.: Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia* 2004, 47: 2012-2021.