

京都大学	博士（ 人間・環境学 ）	氏名	後藤 亜由美
論文題目	Effects of acute heat stress on glucose metabolism and 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in skeletal muscle（急性的な熱刺激が骨格筋糖代謝とAMPキナーゼに及ぼす影響）		
（論文内容の要旨） 近年、骨格筋細胞内に発現しているheat shock protein 72（HSP72）が、骨格筋及び生体の糖代謝を活性化させる重要因子として作用することが明らかにされてきた。HSP72は骨格筋に熱刺激を加えることでその遺伝子発現が増加するが、HSP72蛋白質発現が増加するまでには熱刺激後数時間を要する。このため熱刺激後早期に生じる糖代謝の活性化には、HSP72とは別因子の関与が想定されていたが、その詳細は不明であった。本論文は、骨格筋におけるインスリン非依存的糖輸送の主要制御因子である5' adenosine monophosphate-activated protein kinase（AMPK）に着目し、この分子が熱刺激後早期に活性化されることで骨格筋代謝が亢進するとの仮説を立て、その検証を行ったものであり、全6章から構成される。 第1章（序章）では、熱刺激と骨格筋糖代謝との関連を検討した先行研究を概説し、その大半がHSP72の増加を介した機序を示すものであったこと、しかし、HSP72では熱刺激後早期の糖代謝促進は説明できないことを記述した。そして、熱刺激がAMPKを介して作用すると想定することが可能な根拠を示すとともに、この仮説の検証が本論文の目的であることを記述した。 第2章（文献レビュー）では、HSP72について、骨格筋損傷と修復、骨格筋萎縮と筋機能低下、骨格筋の炎症、インスリン抵抗性と糖尿病の観点から概説した。さらに、ヒト骨格筋に対する温熱療法について、ホットパック・温水浴・赤外線照射・パラフィン浴などによる表層部温熱療法と、超音波やマイクロウェーブによる深部温熱療法に分けられること、両手法とも現在は主に外傷による骨格筋損傷や疼痛緩和に用いられていることを概説した。 第3章では研究方法を説明した。ラットから単離した滑車上筋を、酸素化された細胞培養培地（αMEM培地）中で熱刺激（10分間ないし30分間、42℃）を加えながらインキュベートする手法を採用したこと、この手法を通じて血液循環や体液性因子、神経系などの影響を受けず骨格筋への直接的な熱刺激について解析することが可能となったこと、骨格筋サンプルの解析手段としてreal-time reverse transcription-PCR、western blot analysis、glucose transport assay、isoform-specific AMPK activity assay、energy status assay等を行ったことを示した。 第4章では実験結果を説明し、（1）熱刺激はHSP72遺伝子Hspa1a及びHspa1bの発現を亢進させた一方で、HSP72の蛋白質発現に変化を与えなかったこと、また熱刺激は糖輸送担体GLUT4の遺伝子発現及び蛋白質発現にも変化を与えなかったこと、（2）糖輸送活性は熱刺激によって亢進し、GLUT4阻害剤cytochalasin Bによって抑制されたが、phosphatidylinositol 3-kinase阻害剤wortmanninによっては抑制されなかった			

こと、(3) 熱刺激はAMPKの酵素活性の指標である α サブユニットThr¹⁷²リン酸化を亢進させたこと、また異なる α サブユニットを持ったAMPK (AMPK α 1、AMPK α 2) をともに活性化させたこと、(4) 熱刺激による糖輸送活性化はAMPK阻害剤 dorsomorphinにて抑制されたこと、(5) AMPKは筋細胞のエネルギーレベル低下に反応して活性化するが、熱刺激はエネルギーレベルの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こと、(6) 熱刺激はAMPK以外の糖輸送制御因子であるインスリン受容体シグナル及びCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) を活性化させなかったことを記述した。

第5章では実験結果についての考察を行った。まず、本研究で得られた知見をサマリーし、(1) 熱刺激が、HSP72蛋白質の増加以前にインスリン非依存的糖輸送を亢進させると考えられること、(2) 熱刺激による糖輸送活性化はGLUT4トランスロケーションを介すると考えられること、(3) 熱刺激が筋細胞のエネルギー低下を誘導し、それに伴ってAMPKが活性化すると考えられること、また熱刺激による糖輸送活性化はAMPKの関与が考えられること、(4) 熱刺激による糖輸送活性化はインスリン受容体シグナルやCaMKIIに依存しないと考えられることを説明した。そしてこれらの考察をもとに、熱刺激が、少なくともAMPK活性化を介した機序によって、急性的に骨格筋糖代謝を亢進する作用を持つと総括した。本章ではさらに、熱刺激によってエネルギー状態が低下する機序、糖輸送促進過程におけるAMPKの生理的役割、単離筋を使用したことの実験的有用性、滑車上筋以外の骨格筋における熱刺激の意義、ヒト温熱療法への応用の可能性などについて、関連文献を引用しつつ考察した。

第6章(終章)では、本論文全体の要約を記述するとともに、結語として、熱刺激がHSP72の増加をきたすよりも早期に糖代謝を活性化させる性質を持っていること、その機序として細胞内エネルギーの低下を介したAMPKの急性的活性化が示唆されること、ヒトにおける骨格筋の熱刺激が糖代謝活性化のための臨床的実用手段となりうることを記述した。

(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り、骨格筋の糖代謝活性を亢進させることによって、個体レベルの糖代謝活性化が誘導される。骨格筋の糖代謝活性は、生理的には、運動やインスリンによって高度に促進されることが知られている。近年、実験動物や培養細胞を用いた研究で、骨格筋に熱刺激を加えることでも糖代謝活性が亢進することが報告された。そしてこの現象には、筋細胞におけるheat shock protein 72 (HSP72) の増加が関与することが明らかにされた。しかし、HSP72が有意に増加するまでには熱刺激後数時間を要する。このため熱刺激後早期(1時間以内)に生じる糖代謝活性の亢進には、HSP72以外の分子の関与が想定されたが、その詳細は明らかではなかった。申請者は、糖代謝活性化因子として知られる5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) が、運動中の骨格筋で急性的に活性化されることに着目し、「骨格筋への熱刺激は、運動に類似した機序によって急性的なAMPK活性化を惹起し、その結果として糖代謝が亢進する」という仮説を立て、その検証を行った。

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培地中でインキュベートする手法を採用した。熱刺激は、筋血流や血中インスリン濃度など骨格筋糖代謝に影響する多様な変化を惹起することが知られている。そこで単離筋を用いた実験系を採用することで、これら混乱因子の影響を排除し、熱刺激が骨格筋へ及ぼす直接的作用を解析することが可能となった。

最初に申請者は、単離筋へ短時間(30分間以内)の熱刺激(42℃)を加えると、HSP72の遺伝子発現量が亢進する一方で、HSP72の蛋白質発現量が変化しないことを示した。またこの実験条件が、筋細胞内への糖取り込みを司る糖輸送担体GLUT4の遺伝子発現量や蛋白質発現量を変化させないことを示した。そしてこれらの確認をもとに、熱刺激がAMPKの活性化指標である α サブユニットThr¹⁷²リン酸化を亢進させること、異なる α サブユニットを持ったAMPK (AMPK α 1及びAMPK α 2) をともに活性化させることを明らかにした。AMPKは細胞内エネルギーレベルの減少に反応して活性化することが知られているが、申請者は、熱刺激が筋細胞のエネルギーレベルの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減少させることを示した。また申請者は、熱刺激が、骨格筋糖代謝の律速段階である糖輸送活性を上昇させることを確認するとともに、AMPK阻害剤dorsomorphin及びGLUT4阻害剤cytochalasin Bによって糖輸送活性が抑制されることを示した。さらに、熱刺激は、AMPKとは異なる機序により糖輸送を制御するインスリン受容体シグナルを変化させず、熱刺激による糖輸送活性は、インスリン受容体シグナルの主要分子phosphatidylinositol 3-kinaseの阻害剤wortmanninによって抑制されないことを示した。また、骨格筋糖輸送との関連が示唆されるCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIが熱刺激によって活性化されないことも示した。以上の結果は、熱刺激が、HSP72が増加していない急性期においても糖代謝を亢進させる作用を持つこと、熱刺激が筋細胞のエネルギー低下を誘導してAMPKを活性化させること、熱刺激

による糖代謝活性化にはAMPK活性化を介した糖輸送活性の亢進が寄与することを強く示唆するものであった。これらの研究成果は、国際専門誌Physiological Reports 第3巻 第11号（2015年発行）に掲載された。

本論文は、熱刺激が急性的な糖代謝活性化作用を有することをラット単離筋にて確認するとともに、この現象の成立にAMPKが深く関与する実験的証拠を提示した学術的意義の高いものである。また、これまでに、ヒトや実験動物における骨格筋への熱刺激が、糖代謝疾患やインスリン抵抗性を改善させる可能性を示した報告はあったが、その大半が熱刺激の反復効果を検討したものや、熱刺激後数時間以上経過した非急性期を検討したものであった。一方、本論文は、骨格筋への熱刺激がAMPK活性化を介して急性的な糖代謝活性化作用を持つ可能性を新しく提唱した画期的なものである。以上より、本論文は、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28年1月15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、合格と認められた。

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： 年 月 日以降