

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 博士（人間・環境学）                                                                                                                                                                                                                                                           | 氏名 | 江川 達郎 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | MULTIPLE EFFECTS OF CAFFEINE ON SKELETAL MUSCLE GLUCOSE TRANSPORT AND UPSTREAM SIGNALING EVENTS -ACTIVATION OF 5'AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE AND SUPPRESSION OF INSULIN SIGNAL TRANSDUCTION-<br>（カフェインによる骨格筋糖輸送およびその関連シグナルに及ぼす相互作用に関する研究—AMPキナーゼ活性化とインスリンシグナル伝達抑制—） |    |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |       |
| <p>2型糖尿病（以下、糖尿病）は、我が国のみならず世界的にも罹病患者数が急増しており、その予防策の確立が急務となっている。近年の疫学的調査において、コーヒーや緑茶の習慣的摂取が糖尿病発症リスクを低くすることが報告されたことから、これらの主要含有成分であるカフェインが糖尿病予防効果を持つ可能性が示唆された。しかし、その一方で、カフェイン摂取は、糖尿病患者のインスリン感受性を急性的に低下させることも報告されている。骨格筋は体内最大の糖代謝器官であるとともに、個体のインスリン感受性を規定する重要な機能を有している。本論文は、カフェインが糖尿病予防効果を有する可能性を分子的観点から解明することを目的として、カフェインが骨格筋糖代謝およびその関連シグナルに及ぼす影響を解析したものである。</p> <p>近年、骨格筋に存在するリン酸化酵素5'AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化が糖・脂質・エネルギー代謝の活性化を誘導して抗糖尿病作用をもたらすことが明らかにされてきた。カフェインのAMPKに対する作用については先行研究が複数存在するが、AMPKを活性化することを示唆する研究とそうでない研究があり、結果が不一致である。そこで第1の検討として、カフェインが骨格筋AMPKの活性化作用を持つかどうかについての解析を行った。基本的な実験方法として、ラットの滑車上筋（速筋）およびヒラメ筋（遅筋）を単離し、酸素化されたクレブス緩衝液中でインキュベートする手法を用いた。この手法により、血液循環や体液性因子、神経系、消化器系などの影響を除外し、骨格筋に対するカフェインの直接的な作用を解析することが可能となった。</p> <p>その結果、カフェインは滑車上筋においては1 mM、15分以上、ヒラメ筋においては3 mM、15分以上の刺激によりAMPKの活性化指標であるAMPK<math>\alpha</math> Thr<sup>172</sup>リン酸化を2倍以上に亢進することが明らかとなった。骨格筋には、<math>\alpha</math>1サブユニットを含有するAMPK分子（AMPK<math>\alpha</math>1）と<math>\alpha</math>2サブユニットを含有するAMPK分子（AMPK<math>\alpha</math>2）とが存在するが、カフェインは低濃度（1 mM）でAMPK<math>\alpha</math>1のみを活性化し、高濃度（<math>\geq</math> 3 mM）ではAMPK<math>\alpha</math>1とAMPK<math>\alpha</math>2をともに活性化した。また、カフェインは1 mM、3 mMのいずれの濃度においてもインスリン非依存性糖輸送活性を促進した。次に、以上の作用が生理的条件下において惹起されるかについて、カフェインをラット生体内に投与する手法を用いて検討した。生理食塩水に溶解したカフェイン（5 mg/kg体重）をラット尾静脈より投与し、投与60分後に麻酔下にて滑車上筋を摘出し解析した。その結果、AMPK<math>\alpha</math> Thr<sup>172</sup>リン酸化の亢進、AMPK<math>\alpha</math>1の活性化、インスリン非依存性糖輸送の促進が認められ、単離筋実験を支持する結果となった。カフェイン投与60分後の血漿中カフェイン濃度は約50 <math>\mu</math>Mと生理的範囲であった。以上の結果から、カフェインは骨格筋においてAMPKを活性化する作用を持つことが示された。</p> <p>次に、第2の検討として、カフェインがインスリンシグナルを阻害し、インスリン依存性糖輸送を抑制する可能性を、第1の検討と同様の単離筋を用いた手法により解</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |       |

析した。その結果、カフェイン（3 mM、15分間刺激）は、インスリンシグナルを促進させる方向に作用するinsulin receptor substrate-1（IRS-1） Tyr<sup>612</sup>リン酸化、phosphatidylinositol-3 kinase Tyr<sup>458</sup>リン酸化、Akt Ser<sup>473</sup>リン酸化を阻害するとともに、インスリン依存性糖輸送活性を25%減弱することが明らかとなった。また、インスリンシグナルに対して抑制的に作用するIRS-1 Ser<sup>307</sup>リン酸化とその制御因子inhibitor  $\kappa$ B kinase（IKK） Ser<sup>176/180</sup>のリン酸化をそれぞれ亢進させた。さらに、単離筋をIKK阻害剤であるcaffeic acidで前処理すると、カフェインによるIRS-1 Tyr<sup>612</sup>およびAkt Ser<sup>473</sup>、インスリン依存性糖輸送の阻害作用が弱められた。また、生理量のカフェイン（5 mg/kg体重）を尾静脈より投与したところ、インスリンによるIRS-1 Tyr<sup>612</sup>及びAkt Ser<sup>473</sup>のリン酸化の抑制が認められた。以上の結果から、カフェインはIKK/IRS-1 Ser<sup>307</sup>のリン酸化を介してインスリンシグナルを抑制し、インスリン依存性糖輸送を阻害することが示唆された。

第1の検討結果は、カフェインが骨格筋AMPK活性化を介した糖尿病予防効果をもたらす可能性を支持するものである。一方、第2の検討結果は、カフェインがIKK/IRS-1 Ser<sup>307</sup>経路を介してインスリン感受性を低下させ、糖尿病を悪化させる可能性を示している。近年の研究で、AMPKの反復的な活性化に伴ってインスリン感受性が増強することが知られていることから、本研究から得られる帰結として、「カフェイン摂取は急性的にインスリン感受性を悪化させるものの、長期的な摂取によるAMPKの反復的活性化によって糖尿病予防効果が誘導される」との仮説を提唱した。本研究は、カフェインが骨格筋糖代謝に与える影響に関する基礎的知見とともに、カフェイン含有飲料が糖尿病予防効果を誘導する分子機序を解明する上で重要な知見を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

本申請論文は、カフェインが2型糖尿病（以下糖尿病）の予防効果を有する可能性を分子的観点から解明することを目的として、カフェインが骨格筋糖代謝およびその関連シグナルに及ぼす影響を解析したものである。

骨格筋は体内最大の糖代謝器官であるとともに、個体のインスリン感受性を規定する重要な役割を担っている。近年、カフェインが骨格筋において、糖・脂質・エネルギー代謝を制御するリン酸化酵素5'AMP-activated protein kinase (AMPK)を活性化する作用を持ち、その結果として、インスリン非依存性糖輸送、糖輸送担体GLUT4の増加、脂質代謝の促進などの抗糖尿病的な生体反応を生じる可能性が報告された。しかし、カフェインはAMPKを活性化しないとの報告もあり、一致した見解が得られていなかった。そこで申請者は、第1の検討として、カフェインが骨格筋のAMPKを活性化するかどうかついての詳細な解析を行った。

基本的な実験方法として、申請者は、ラットの滑車筋（速筋）およびヒラメ筋（遅筋）を単離し、酸素化されたクレブス緩衝液中でインキュベートする手法を用いた。この手法により、血液循環や体液性因子、神経系、消化器系などの影響を除外した条件で、カフェインの骨格筋に対する直接的な作用を検討することが可能となった。

その結果、カフェインは、滑車筋において1 mM、15分以上、ヒラメ筋において3 mM、15分以上の刺激により、AMPK活性化の指標となる $\alpha$ サブユニット Thr<sup>172</sup>リン酸化を非刺激時の2倍以上に亢進することが明らかとなった。骨格筋には、 $\alpha 1$ サブユニットを含有するAMPK分子 (AMPK $\alpha 1$ ) と $\alpha 2$ サブユニットを含有するAMPK分子

(AMPK $\alpha 2$ ) とが存在するが、カフェインは低濃度 (1 mM) ではAMPK $\alpha 1$ のみを活性化し、高濃度 ( $\geq 3$  mM) においてAMPK $\alpha 1$ とAMPK $\alpha 2$ をともに活性化した。さらに、1 mM、3 mMのいずれの濃度においても、カフェインはインスリン非依存性糖輸送活性を有意に促進した。

次に申請者は、AMPK活性化が、生体において生理的濃度のカフェインによって惹起されるかについて検討した。生理食塩水に溶解したカフェイン (5 mg/kg体重) をラット尾静脈より投与し、投与60分後（血漿中カフェイン濃度約50  $\mu$ M）、麻酔下にて滑車筋を摘出し解析した。その結果、AMPK $\alpha$  Thr<sup>172</sup>リン酸化の亢進、AMPK $\alpha 1$ の活性化、インスリン非依存性糖輸送の促進が認められ、単離筋での実験を支持する結果となった。

これらの結果は、カフェインが骨格筋においてAMPK活性化作用を有することを明示するものであり、カフェインが骨格筋AMPKの活性化を介して糖尿病予防効果をもたらす可能性を支持する学術的価値の高いものである。本研究結果は、Metabolism誌 (58:1609-1617, 2009) およびActa Physiologica誌 (201:227-238, 2011) に掲載された。

カフェインによる骨格筋AMPKの活性化が明らかになった一方、カフェインが急性的にインスリンシグナルを阻害し、インスリン依存性糖輸送を抑制する作用を持つ可能性が報告されていた。この作用は糖尿病の発病を誘導する可能性を持つものである。そこで申請者は、第2の検討として、カフェインがインスリンシグナル伝達分子およびインスリン依存性糖輸送にどのような影響を持つかを解析した。

第1の検討と同様の単離筋を用いた手法により、カフェインが骨格筋インスリンシグナルおよびインスリン依存性糖輸送に及ぼす影響を検討した。その結果、カフェイン (3 mM、15分間刺激) はインスリンシグナル伝達分子のリン酸化 (insulin receptor substrate-1 (IRS-1) Tyr<sup>612</sup>、phosphatidylinositol-3 kinase Tyr<sup>458</sup>、Akt Ser<sup>473</sup>のリン酸化) を阻害し、インスリン依存性糖輸送活性を25%減弱した。さらにカフェインは、インスリンシグナルの抑制的リン酸化 (IRS-1 Ser<sup>307</sup>とその制御因子である

inhibitor  $\kappa$ B kinase (IKK) Ser<sup>176/180</sup>のリン酸化)を亢進した。これらの作用は、IKK

阻害剤であるcaffeic acidで前処理することで抑制された。また、生理量のカフェイン(5 mg/kg体重)を尾静脈より投与したところ、単離筋の結果と同様に、IRS-1 Tyr<sup>612</sup>、Akt Ser<sup>473</sup>リン酸化の抑制が認められた。

以上の結果から、カフェインはIKK/IRS-1 Ser<sup>307</sup>のリン酸化を介してインスリン依存性糖輸送を阻害する作用を持つことが示唆された。本研究結果は、カフェインが骨格筋のインスリン感受性を低下させる分子機序を提示したものであり、学術的価値の高いものである。本研究結果は、Journal of Applied Physiology誌(111:1629-1636, 2011)に掲載された。

糖尿病は、我が国のみならず世界的にも罹病患者数が急増しており、その予防策の確立が急務となっている。申請者は第1、第2の検討で得られた結果をもとに「カフェイン摂取は急性的にインスリン感受性を悪化させるものの、長期的なAMPKの反復活性化による抗糖尿病作用により予防効果が誘導される」という独自の仮説を提唱している。この仮説はカフェインの長期投与実験による検証を必要とするものではあるが、複数の疫学的研究において示されてきたカフェイン含有飲料(コーヒー、緑茶など)の糖尿病予防効果を説明する学術的・社会的意義の高い仮説である。また、本論文は、人間の基本的生理機能である糖代謝が、環境中から日常的に摂取するカフェインに対していかに応答するかの分子機序を提示したものでもあり、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24年2月6日、論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果、合格と認めた。

Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日：            年            月            日以降