

1 型糖尿病における運動誘発性遅発低血糖の発症機序の解明 – 1 型糖尿病患者の新規運動ガイドライン作成に向けて –

神戸大学 佐藤 幸治
(共同研究者) 立命館大学 藤田 聡

To Reveal the Mechanism of Exercise-Induced Delayed Onset of Hypoglycemia in Type 1 Diabetes – For Development of New Exercise Guideline in Type 1 Diabetes Patients –

by

Koji Sato

*Graduate School of Human Development and Environment,
Kobe University*

Satoshi Fujita

Faculty of Sport and Health Science, Ritsumeikan University

ABSTRACT

Type 1 diabetes patients often suffered from exercise-induced hypoglycemia especially, nocturnal and delayed onset of hypoglycemia after exercise. In the present study, we characterized potential mechanisms for the development of delayed onset of exercise-induced hypoglycemia in type 1 diabetes by performing animal studies. We assessed the blood glucose levels and glucose metabolic pathway activation over time in streptozotocin (STZ) injected rats, STZ rats with exercise (STZ+EX), and control rats with exercise (CON+EX). Moreover, samples were taken at 1h, 3h and 5h after exercise in three groups, and was used for microarray analysis.

Although blood glucose levels of STZ rats and CON+EX rats did not differ significantly before and after exercise (0 h to 5 h), the blood glucose levels of STZ+EX rats were significantly lower than those of STZ group at 3 h ($P < 0.05$). In skeletal muscles, Akt phosphorylation level and GLUT4 translocation were significantly increased at 1 h in both CON and STZ groups and were lowered to negligible levels within 3 h. In contrast, in the STZ+EX group, Akt phosphorylation, and GLUT4 translocation was maintained by 5 h, indicating sustained glucose metabolism in STZ+EX group. In microarray analysis, 447 genes of insulin signaling and 79 genes of type 1 diabetes were found in this study, and selected 3 genes which may concern GLUT4 regulation, especially Oncostatin M (Osm) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were increased at 3h and 5h after exercise in STZ+EX group.

In summary, we showed that a single bout of aerobic exercise induced prolonged enhancement of GLUT4 translocation may be involved in the induction of hypoglycemia.

要 旨

本研究は、1型糖尿病モデルラットを用いて、中強度の一過性運動が骨格筋糖代謝活性の変動およびその関連遺伝子を同定することを目的とした。

6週齢のオス Wistar ラットにストレプトゾトシン (STZ) を投与し、1型糖尿病モデルラットを作製した。3日後、コントロール群 (STZ CON)、運動群 (STZ+EX)、正常のラットの運動群 (CON+EX) に分け、両 STZ 群にインスリンを投与 (0.5U/kg) し、正常血糖を確認後 (0h)、STZ+EX 群は中強度のトレッドミル走 (15m/min, 30min, 傾斜なし) を行った。血液および骨格筋サンプルは 0h, 1h, 3h, 5h で採取した。また、それぞれの群の 1h, 3h, 5h のサンプルをマイクロアレイ法による遺伝子発現変動解析をそれぞれ施行した。その後、pathway 解析を施行し、運動による遅発性低血糖発症に関与する可能性が高いインスリン経路系遺伝子を選定した。

血糖値は、STZ+EX 群は 3h で他の群に比べ有意に低下した。骨格筋の GLUT4 translocation は CON+EX, STZ CON 群で、1h で有意に増加し、3h で減少したが、STZ+EX 群においては、3h, 5h で有意な亢進が見られた。マイクロアレイ法による遺伝子発現解析において、CON+EX, STZ CON 群では運動直後および1時間後で Oncostatin M (Osm), Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) が増加していた。しかしながら、STZ+EX 群においては、運動3, 5時間後に Osm および STAT3 の遺伝子発現が増加していた。

1型糖尿病において中強度の運動は骨格筋の GLUT4 の継続的な亢進が遅発性の低血糖を誘発している可能性がある。また Osm および STAT3 発現の遅延が GLUT4 translocation の継続的な亢進に関与している可能性が示唆された。

緒 言

1型糖尿病患者は小児期での発症が多く、治療

としては、脳死臓器移植や臓器移植を受けるか、血糖測定を実施しながら、生涯にわたって毎日数回の自己注射またはポンプによるインスリン投与を続ける以外に治療法はなく、糖尿病患者の90%以上を占める生活習慣病である2型糖尿病とは原因も治療の考え方も異なる。運動においても、運動強度、運動時間、運動の種類により、血糖値や内分泌ホルモンの変動も2型糖尿病とは異なる。アメリカ糖尿病学会(ADA)によるエクササイズガイドラインにおいて、1型糖尿病患者患者は運動前の血糖値測定、補食のタイミング、インスリン投与量の制限という記述しかなく¹⁾、運動強度、時間、種類による血糖値の変動や運動に伴う低血糖のリスクに関しては不明な点が多い。健常者においては、中高強度の運動中、運動後は常に血糖値は保たれた状態になるが、1型糖尿病患者において3時間後に急激に血糖値が低下すること、さらに、運動に対して血糖値増加作用のあるエピネフリンやノルエピネフリンの分泌が遅延することも報告されている²⁾。また、サッカーやバスケットボール等の競技スポーツにおいても、運動後に遅発性の低血糖を起こす頻度が多いことが報告されており³⁾、現在までの研究から、1型糖尿病患者において運動による遅発性の血糖値の低下が起こる理由として考えられる原因は、ホルモンの分泌、血糖値減少に関わる糖代謝経路活性、その他にも炎症性サイトカインの異常分泌であるが、未だ低血糖が遅発する原因や機序は明らかでない。

以上のことから、本研究では、骨格筋糖代謝経路活性に着目し、正常ラットの運動群、1型糖尿病ラットの運動群およびインスリン投与のみ群に分け、運動1時間、3時間、5時間後にそれぞれ、血液、骨格筋を採取して糖代謝調節経路の活性を検討することを目的とした。さらに、運動による遅発性低血糖発症機序を解明するため、運動1時間、3時間、5時間後のそれぞれの群のサンプル

をマイクロアレイ法にて遺伝子発現変動解析を施行し、関連する遺伝子を同定した。

1. 研究方法

1.1 対象

Wistar ラット (6週齢; 日本クレア株式会社) にストレプトゾトシン (STZ) を 55mg/kg 投与し、1型糖尿病モデルラットを作製した。ラットは National Institutes of Health (NIH) の “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” に沿って飼育した。全てのラットは、室温が $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に設定され、照明が12時間毎に点灯と消灯を繰り返して行う飼育室で飼育した。水分および食事は自由摂取とした。本実験は、立命館大学が定める動物実験規定に基づき、立命館大学生命倫理委員会の審査・承認を得て実施した。

1.2 実験手順

STZ 投与3日後、コントロール群 (STZ CON)、運動群 (STZ+EX) の2群にランダムに分け、また、対照群として、正常ラット運動群 (CON+EX) を加えた。両 STZ 群にはインスリン (0.5U/kg) を投与し、正常血糖であることを確認したのち、運動を行った (トレッドミル走, 15m/min, 30分間, 傾斜なし)。STZ+EX と CON+EX において、運動前 (各 n=5)、運動直後 (各 n=5)、1h (各 n=5)、3h (各 n=5)、5h (各 n=5) 後にそれぞれの群の血液および骨格筋を採取し、直ちに、液体窒素にて急速冷凍し、 -80°C にて保存した。

1.3 細胞質と細胞膜のタンパク分画

筋サンプルにおける GLUT4 translocation は細胞膜および細胞質での GLUT4 タンパク発現によって解析を行った⁴⁾。最初に、buffer A (20 mM Tris [pH 7.4], 1 mM EDTA, 0.25 mM EGTA, 0.25 M sucrose, 1 mM DTT, 50 mM NaF, 25 mM sodium

pyrophosphate, 40 mM β -glycerophosphate) に筋サンプルを入れホモジネートし, 100,000×g で1時間遠心を行ったのち, 上清を 1mM EDTA と 1.2 と 0.8M の sucrose が入った Tris buffer に移した. そのまま静置し, 200 μ L を取り, buffer A に混ぜ膜画分とした. 次に, 筋サンプルを buffer B (20 mM Tris [pH 7.4], 1 mM EDTA, 70 mM KCl, 3 mM magnesium acetate, 2 mM CaCl_2) に入れ, 1 時間室温で静置し, ホモジネートした. その後, 100,000×g で1時間遠心し, 上清を質画分として保存した. GLUT4 translocation の値は, 細胞質と細胞膜の GLUT4 タンパク量の差で評価した.

1.4 電気泳動およびウエスタンブロット法

ウエスタンブロット法にて筋サンプルにおけるタンパク質発現量の解析を行った. 各サンプルは Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加した lysis buffer を用いてホモジネートし, 15000×g で遠心し, 上清を回収した. 得られた上清中のタンパク質 (30 μ g) を 10% のアクリルアミドゲルを用いて電気泳動・分離 (SDS-PAGE) し, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に転写した. このメンブレンを skim milk で1時間ブロッキングし, tris-buffered saline (TBS-T, pH7.6) で 1000 倍希釈した phosphorylated-Akt Ser473, total-Akt 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) 溶液にて 4°C で一晩インキュベートした. このメンブレンを洗浄し, TBS-T で 3000 倍希釈した anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) を 1 時間室温でインキュベートし, その後メンブレンを洗浄し, 化学発光試薬 (ECL select, Western Blotting Detection System, GE HealthCare, Little Chalfont, UK) を用いて目的のタンパク質を検出した. 各筋サンプルのバンドは画像解析ソフト ImageJ (National Institute of

デサントスポーツ科学 Vol. 38

Health, Bethesda, MD, USA) で定量化した.

1.5 マイクロアレイによる網羅解析

保存しておいたラットの骨格筋から ISOGEN の定法に従い total RNA を抽出した後に, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) で, total RNA の精製を行なった. マイクロアレイ法による解析は, Agilent SurePrint G3 Rat GE 8 x 60K v2 Microarray によりおこなった. 100ng の TotalRNA 量で Cy3 標識の合成を行い, 0.6 μ g の Cy 標識 cDNA を用いてハイブリダイゼーションを行なった. 2 群間の有意差検定は Student's t-test (SPSS 10.0Jfor windows, SPSS Japan Inc., Tokyo, Japan) を行い, 有意水準は $P < 0.05$ とした.

2. 実験結果

2.1 血糖値変動

CON+EX 群の血糖値は, 運動前後で有意な変動はなかった. また, STZ CON 群もインスリン投与により, 血糖値はインスリン投与 1 時間から 3 時間後に徐々に低下しているが統計的な差は見られなかった. しかしながら, STZ+EX 群において, 運動 3 時間後に急激に低下し, 他の群に比べ有意な低下が見られた (図 1).

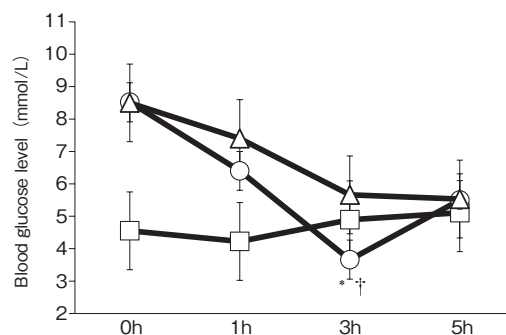


図1 The effect of a single bout of exercise on plasma glucose level

White square: CON+EX, White circle: STZ+EX, White triangle: STZ CON. * $P < 0.05$ vs 0h, † $P < 0.05$ vs STZ. Values are mean \pm SE

2.2 Akt リン酸化活性, GLUT4 translocation 骨格筋糖代謝調節経路である Akt のリン酸化

活性において、CON+EX, STZ CON 群は運動、あるいはインスリン投与により1時間後に有意に増加し、5時間後までに緩やかに低下したが、STZ+EX 群において、運動1時間後に Akt リン酸化活性が亢進し、その亢進は運動5時間後まで持続した (図2)。また、GLUT4 translocation も同様に、CON+EX, STZ CON 群は、運動、あるいはインスリン投与により1時間後に有意に増加し、緩やかに5時間後には低下したが、STZ+EX 群においては、運動3時間後に有意に増加し、その増加は5時間後まで持続した (図3)。

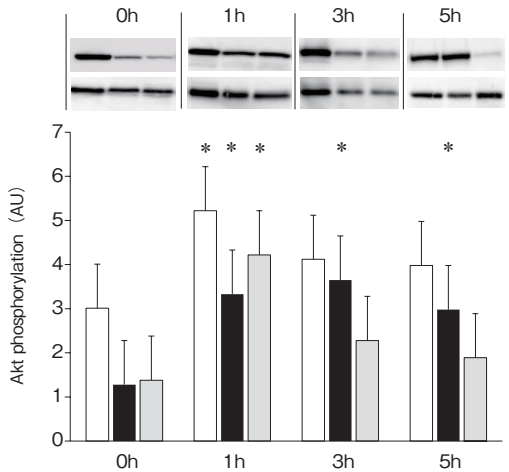


図2 The effect of a single bout of exercise on Akt phosphorylation Ser⁴⁷³ relative to total protein
White bar: CON+EX, Black bar: STZ+EX. Gray bar: STZ with insulin treatment. * P < 0.05 vs 0h. Values are mean ± SE.

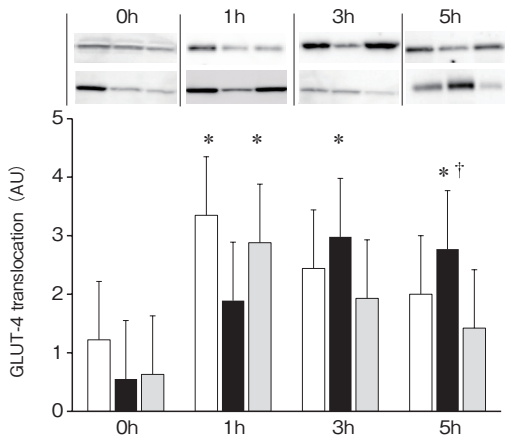


図3 The effect of a single bout of exercise on level of GLUT-4 translocation
White bar: CON+EX, Black bar: STZ+EX. Gray bar: STZ with insulin treatment. * P < 0.05 vs 0h, † P < 0.05 vs STZ. Values are mean ± SE

2.3 マイクロアレイ法による遺伝子発現変動

マイクロアレイ法にて、CON+EX 群の運動1時間、3時間、5時間後 vs STZ+EX 群の運動1時間、3時間、5時間後、さらには、STZ CON 群の運動1時間、3時間、5時間後 vs STZ+EX 群の運動1時間、3時間、5時間後の遺伝子発現変動の比較を行なった。さらには、pathway 解析を行い、STZ+EX 群の運動1時間、3時間、5時間後において他の群に比べて発現が多い336個の insulin signal pathway の遺伝子および79個の1型糖尿病関連遺伝子を同定した。その他にも、PPAR signaling, Cytokine receptor, Fatty acid metabolism 等の遺伝子も同定された (表1)。

表1 The pathway name, sum of detected genes and p-value which compared between CON+EX or STZ CON and STZ+EX

PathName	sum	minimum of pvalue
PI3K-Akt signaling pathway	336	0.0000
Pathways in cancer	400	0.0000
FoxO signaling pathway	136	0.0001
Glutamatergic synapse	115	0.0003
Adherens junction	74	0.0004
p53 signaling pathway	71	0.0007
MAPK signaling pathway	259	0.0009
NF-kappa B signaling pathway	95	0.0010
Apoptosis	141	0.0012
Serotonergic synapse	125	0.0025
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	104	0.0031
Fatty acid metabolism	54	0.0035
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	29	0.0040
Rap1 signaling pathway	217	0.0059
Cholinergic synapse	112	0.0072
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	82	0.0081
cAMP signaling pathway	197	0.0087
Jak-STAT signaling pathway	151	0.0124
TOII-like receptor signaling pathway	97	0.0169
TGF-beta signaling pathway	86	0.0179
B cell receptor signaling pathway	74	0.0182
Cytokine-cytokine receptor interaction	221	0.0226
GnRH signaling pathway	93	0.0244
Calcium signaling pathway	188	0.0262
Cardiac muscle contraction	81	0.0369
GABAergic synapse	90	0.0383
PPAR signaling pathway	82	0.0392
TNF signaling pathway	110	0.0482

考 察

本研究では、正常ラットの運動群、1型糖尿病モデルのインスリン刺激群に比べ1型糖尿病モデルラットの運動群において、運動3時間後に急激に血糖値が低下することが明らかとなった。また、骨格筋糖代謝経路であるAktのリン酸化活性において、1型糖尿病モデルラットの運動群では、活性が運動3時間後にピークに亢進し、5時間後までその亢進が持続していること、さらには、GLUT4 translocationにおいても通常、運動後1時間後までに亢進するが、1型糖尿病モデルラットにおいては、運動3時間後に有意に増大し、5時間後も持続して亢進していることが明らかとなった。さらに、Oncostatin M (Osm) と STAT 3 の増加により GLUT4 translocation を抑制するが、マイクロアレイ法による遺伝子変動解析および pathway 解析により、1型糖尿病モデルラットの運動群のみ遅延して Osm と STAT 3 が増加することが明らかとなった。

先行研究において、1型糖尿病患者では、運動や身体活動の刺激による、エピネフリンやノルエピネフリン濃度の変動に健常者と比べ違いがあることが報告されている⁵⁾。Schneiderらの報告では、中強度の有酸素性運動を60分行った時、健常者は運動直後にエピネフリン、ノルエピネフリンが増加し、運動60分後に低下したが、1型糖尿病患者は、運動中、直後においてもエピネフリンやノルエピネフリンの増加は低いことが分かっている⁵⁾。1970~80年代の先行研究においても、1型糖尿病患者の一過性の運動において、インスリン拮抗ホルモンの分泌は、異常であると報告されている^{6,7,8)}。以上のことから、1型糖尿病患者における運動による遅発性の低血糖はインスリン拮抗ホルモンの分泌異常の可能性があり、今後、運動による拮抗ホルモンの変動および、脳組織の解析を行う必要がある。

本研究では、1型糖尿病モデルラットにおいて、一過性の中強度の運動がAktリン酸化活性の持続した亢進、およびGLUT4 translocationの亢進が遅延して起こった。正常ラットにおいて運動直後および1時間後にOsm、STAT3が増加しているが、ST2 + EX群において3時間、5時間後に遺伝子発現が増加し、正常ラットの運動に対する反応と比べて遅延していることが明らかとなった。Osmは一般的には、成長/分化因子の一つで、神経新生、骨形成や造血の調節に関与すると言われているが、その他にinterleukin-6 (IL-6)などのサイトカインの分泌を促進することが知られている。さらに、OsmやIL-6等のサイトカインによって活性化されるのが、Signal Transducers and Activator of Transcription 3 (STAT3)で、すでに、STAT3の増加がGLUT4 translocationが抑制されることは報告されているが⁹⁾、1型糖尿病における運動によるOsmやSTAT3の増加の遅延がGLUT4 translocationの持続的な亢進に関与することは明らかとなっていなかった。今後、リアルタイムPCR法にてOsmやSTAT3の遺伝子発現および、Osmをノックアウトした1型糖尿病モデルラットにおける検討が必要である。

結 論

以上のことから、1型糖尿病ラットにおける一過性の中強度運動は、血糖値の低下を遅延させるが、骨格筋においてGLUT4 translocationの亢進の遅延および継続的な亢進が影響している可能性が示唆された。また、GLUT4 translocationの亢進の遅延には、OsmやSTAT3活性の遅延が関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Colberg S.R., Sigal R.J., Yardley J.E., Riddell M.C., Dunstan D.W. et al., Physical activity 1 lexercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association, *Diabetes Care.*, **39**:2065-2079 (2016)
- 2) Maran A., Pavan P., Bonsembiante B., Brugin, E., Ermolao A., Avogaro A., Zaccaria M., Continuous glucose monitoring reveals delayed nocturnal hypoglycemia after intermittent high-intensity exercise in nontrained patients with type 1 diabetes. *Diabetes. Technol. Ther.*, **12**: 763-768 (2010)
- 3) Campbell M.D., West D.J., bain S.C., Kingley MIC, Foley P., Kilduff L., Turner D., Gray B., Stephens J.W., Bracken R.M., Stimulated games activity vs continuous running exercise:A novel comparison of the glycemic and meatbolic responses in T1DM patients. *Scand. J. Med. Sci. Sports.*, **25**:216-222 (2015)
- 4) Sato K., Iemitsu M., Aizawa K., and Ajisaka R., Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **294**: E961-968 (2008)
- 5) Schneider S.H., Vitug A., Anathakrishan R., Khachadurian A.K., Impaired adrenergic responses to prolonged exercise in type 1 diabetes.*Metabolism.*, **40**:1219-1225 (1991)
- 6) Gerich J.E., Langlois M., Noacco C., Karam J.H., Forsham P.H., Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes. *Science.*, **182**:171-173 (1973)
- 7) Santiago J.V., Clarke W.L., Shah S.D., Epinephrine, norepinephrine, glucagon, and growth hormone release in association with physiological decrements in the plasma glucose concentration in normal and diabetic man. *J. Clin. Endocrinol. Meta.*, **51**:977-883 (1980)
- 8) Boli G., Defeo P., Compugnacci P., Abnormal glucose counter regulation in insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes.*, **32**:134-141 (1983)
- 9) Zhang K., Guo W., Yang Y., Wu J., JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBP β transcription. *J. Cell. Biochem.*, **112**:488-497 (2011)