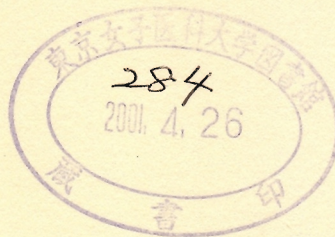


骨格筋細胞の糖輸送におけるATP感受性カリウム(KATP)
チャネルの生理的意義

(課題番号 11671138)

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金(基盤研究C)研究成果報告書

(平成13年3月)



研究代表者 植田 太郎
(東京女子医科大学医学部助教授)



骨格筋細胞の糖輸送における ATP 感受性カリウム (KATP) チャンネル
の生理的意義

(課題番号 11671138)

平成 11 年度~平成 12 年度科学研究費補助金(基盤研究 C)研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 植田 太郎
(東京女子医科大学医学部助教授)

はしがき

インスリンの主要な標的組織である骨格筋の糖輸送機構における ATP 感受性カリウム(KATP)チャネルの役割は、現在不明である。過去の研究の中には、いくつかこれに関連した成績が認められる。すなわち 1) ラット摘出灌流心において KATP チャネル閉口薬トルブタミドは糖の取り込みと酸化を促進する。2) ラット後肢灌流系において KATP チャネル閉口薬グリクラジドは糖取り込みを促進し、同開口薬ジアゾキシドはこれと拮抗的に抑制する。3) KATP チャネルの Kir6.2 遺伝子をノックアウトしたマウスでは *in vivo* におけるインスリン感受性が亢進する等であり、これらの成績は骨格筋における糖輸送に KATP チャネルの関与を示唆している。しかしながら、*in vivo* あるいは *ex vivo* におけるこれらの作動薬の効果は血管平滑筋の KATP チャネルを介する血流動態の変化に起因する可能性を否定できない。したがって *in vitro* において骨格筋細胞の糖輸送に対する KATP チャネル開口薬および閉口薬の直接的効果を観察し、骨格筋細胞の糖輸送における KATP チャネルの役割を検討した。

研究組織

研究代表者: 植田 太郎 (東京女子医科大学医学部助教授)
研究分担者: 渡部 ちづる (東京女子医科大学医学部助手)

研究経費

平成 11 年度	2,500 千円
平成 12 年度	1,000 千円
計	3,500 千円

研究発表

(1) 学会誌等

Wasada T, Watanabe C, Nakagami T, Iwamoto Y

Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels are involved in insulin-mediated glucose transport in humans. *Metabolism* 48 (4): 432-436, 1999

Taro Wasada, Takashi Yano, Masahiko Ota, Naoko Yui, Yasuhiko Iwamoto

ATP-sensitive potassium channels modulate glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. *Endocrine Journal* (in press)

(2) 口頭発表

植田太郎、渡部ちづる、中神朋子、岩本安彦

ヒト骨格筋細胞の糖取り込みにおける ATP 感受性 K チャネル(KC)の関与

第 97 回日本内科学会総会 平成 12 年 4 月 7 日

Wasada T, Watanabe C, Nakagami T, Iwamoto Y

Effects of potassium channel openers on glucose uptake by cultured human skeletal muscle cells

59th Annual Scientific Meeting of American Diabetes Association
平成 11 年 6 月 15 日

植田太郎、矢野 崇、太田雅彦、渡部ちづる、岩本安彦

ヒト骨格筋細胞の糖取り込みにおける ATP 感受性 K チャネルの関与
第 4 回日本心血管内分泌代謝学会 平成 12 年 11 月 25 日

研究成果

3. 正常ヒト培養骨格筋細胞の糖取り込みにおける ATP 感受性 K チャネル開口薬(opener)および閉口薬(blocker)の効果

<方法>

1) 骨格筋細胞の調整

正常ヒト骨格筋細胞株 SkMC(宝酒造)を 10%FBS 他数種の成長因子を含む増殖培養液 SkGM 中で 37°C、5%CO₂ 下に培養した。サブコンフルエンスに達した後、トリプシン/EDTA 入り HEPES 緩衝液で細胞を剥離。再度 SkGM に浮遊し、12 穴プレートに 1ml あて分注した。4~6 日後、コンフルエンスに達した後、細胞を 2%FBS を含む分化培養液へ移し、さらに 6~10 日培養を継続すると筋管細胞 myotube へ分化した。以下、成熟分化した筋管細胞を実験に供した。

2) 糖取り込み率の測定

(i) インスリン刺激による 2-deoxy-D-glucose(2-DG)の取り込み

高濃度のスルホニル尿素(SU)薬による細胞傷害を回避するために、グリベンクラミド(30-100 μ M)またはグリクラジド(300-3000 μ M)は蛋白含有分化培養液中に添加し、さらに 18 時間培養を継続した。洗浄後、細胞を PCO-

400(10-100 μ M)またはニコランジル(100-3000 μ M)、2-DG(10 μ M)、ついでインスリン(1 μ M)を加え、さらに 20 分後、³H-2-DG(25KBq/ml)を添加して、15 分後に上清を吸引除去し、反応停止液で細胞を 3 回洗浄した。0.4N NaOH を加え細胞を融解し、融解液の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。2-DG の取り込み率は ³H-2-DG (細胞内) × 2-DG (培養液) ÷ ³H-2-DG (培養液) から算出した。サイトカラシン B(25 μ M)存在下の 2-DG の取り込みを非特異的取り込み率とし、これを減じて算出した。

(ii) 高糖濃度刺激による糖取り込み

筋管細胞をグリベンクラミド(30-100 μ M)またはグリクラジド(300-3000 μ M)と蛋白含有分化培養液中で培養し、洗浄後 PCO-400(10,100 μ M)および 5 または 25mM 糖を含んだ取り込み用培養液に浮遊させ 60 分間培養した。ついで ³H-3-O-methyl glucose(³H-3-OMG)を添加し、前述の如く 30 分後に反応を止め、細胞内外の放射活性を測定した。細胞への糖

取り込みは ^3H -3-OMG(細胞内)×糖(培養液)÷ ^3H -3-OMG(培養液)として算出した。

[2] 正常ヒト培養骨格筋細胞の糖取り込みにおける PKC の関与

(1) PCO-400 による糖取り込み抑制に対する PKC 活性化の影響

分化した SkMC を uptake solution(US)で 3 回洗浄後、同 US 中で final 0.1% DMSO もしくは 100 μM PCO-400 存在下で 50 分間培養、その後、final 0.1% DMSO もしくは PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 10-100nM を添加、その 10 分後に US で希釈した final 1 μM のインスリンもしくは US を添加した。その 20 分後に ^3H -2-DG を添加し、15 分間インキュベート後、細胞内への ^3H -2-DG 取り込みを測定した。

(2) SkMC 細胞の膜分画 PKC 活性に対するインスリン、PCO-400、PMA の影響

分化 SkMC を冷 US で 2 回洗浄後、冷 homogenate buffer (20mM Tris, pH7.5, 0.25M sucrose, 1.2mM EGTA, 2.5mM MgCl_2 , 0.1mM PMSF, 50mM mercapto-ethanol, 0.4mM leupeptin)を well あたり 0.7ml 添加、セルスクレイパーで細胞を剥離後、2well 分を一つのチューブに pool した。その後、超音波ホモジナイザーを用い細胞を破碎、4°C、100,000 g、30 分遠心した。沈殿を PKC 測定 kit の buffer (50mM Tris, pH7.5, 5mMEDTA, 10mM EGTA, 50 $\mu\text{g/ml}$ PMSF, 10mM ベンザミジン)で溶解し、酵素溶液とした。さらに一部の実験ではさらに DEAE 画分(0.05-0.15M KCl)を採取し、酵素源とした。PKC 活性の測定は市販のキット(BIOTRA Protein kinase C enzyme assay system, Amersham-Pharmacia)を用いて測定した。

<結果>

1. インスリンの 2-DG 取り込み刺激に対する KATP チャンネル作動薬の効果

図 1、2 に示す如く、PCO-400 およびニコランジルはインスリンによる 2-DG の取り込み促進を用量依存的に抑制した(100 μM PCO-400: $p < 0.05$: 600 μM ニコランジル: $p < 0.01$)。PCO-400 (100 μM)の抑制はグリベンクラミド 100 μM またはグリクラジド 3000 μM で有意に解除された($p < 0.01$ 、図 3)。

2. 高濃度糖の 3-OMG 取り込み刺激に対する KATP チャンネル作動薬の効果

インスリン非存在下に 25mM 糖は対照(5mM)に比べ 250%の糖取り込み増加を示した($p < 0.01$)。この糖取り込み増加は PCO-400 により用量依存的に

抑制された(図 4)。一方、グリベンクラミドおよびグリクラジドはこの抑制を用量依存的に解除した(図 5)。

3. PCO-400 の 2-DG 取り込み抑制に対するホルボールエステル(PMA)の効果
PMA10-100nM の添加は、PCO-400 100 μ M により抑制された糖取り込みを回復した(図 6)。しかしながら、PMA は PCO-400 非存在下でも単独で糖取り込みを有意に増加した(データ未提出)。
4. 骨格筋細胞膜分画の PKC 活性に対するインスリン、PCO-400、PMA の影響
インスリンによる膜分画 PKC の活性上昇は見られなかった。再遠心、酵素溶解液や buffer の変更あるいは DEAE 画分による比較でもインスリンによる PKC 活性の上昇は見られなかった。同様に、PCO-400 添加による PKC 活性の変化は見られなかった。しかし PMA の添加によって総 PKC 活性は 4 倍に上昇した(表 1)。

<考察>

ヒト正常骨格筋細胞株の培養系において、インスリンおよび高糖濃度刺激下の糖取り込みに対する KATP チャンネル作動薬の効果を検討した。並行培養実験後の光顕およびメチレンブルー超染色検査により、細胞の viability は保たれていた。インスリンおよび高濃度糖による糖取り込み促進は KATP チャンネル開口薬(PCO-400、ニコランジル)により抑制され、閉口薬(グリベンクラミド、グリクラジド)で抑制が解除された。今回の実験ではインスリンをはじめ使用薬物の濃度が高く、はたして生理的効果であるか否かの疑問点が残る。本細胞株に発現した糖輸送担体の isoforms は検討していないが、高糖刺激により 2.5 倍の特異的糖取り込み増加が観察された事実から、少なくとも一部は GLUT4 の関与を示すと考えられる。なぜなら高糖刺激において GLUT4 が translocation することは既知の事実である。ただ培養細胞では筋線維や筋組織片に比べ糖取り込み率の低いことが指摘されている。

今回の興味ある成績として、インスリンおよび高糖濃度刺激による糖取り込みの細胞内シグナル経路は異なることが知られているが、両刺激に対して KATP チャンネル作動薬の効果はほぼ同等であったことである。シグナル経路の違いは、例えば、筋小胞から Ca^{2+} 放出を抑制するダントロレンは高糖刺激による糖取り込みを抑制するがインスリンによる糖取り込みには影響せず、一方、PI3 キナーゼの阻害薬ワートマニンがインスリンによる糖取り込みを抑制するが高糖刺激による糖取り込みには影響を与えないなどの成績から明らかで

ある。このように異なる経路において KATP チャンネル開口薬 PCO-400 は同等の効果を示したことから、両過程に共通した作用点を持つことが推定された。この点に関し、これまでの成績を勘案すると、インスリンはある種の PKC isoform を活性化し、インスリンの糖輸送効果は PKC 阻害薬で一部抑制され、一方、高糖刺激では GLUT4 と共に PKC の膜表面への移動が導かれることから、両者に共通する分子機構として PKC の役割に注目した。従って本研究では PKC の活性化薬 PMA を使用し、KATP チャンネル開口薬への効果および PKC の活性化を検討した。PMA の添加により細胞内 PKC は約 4 倍に増加した。PCO-400 によるインスリン刺激下の糖取り込み抑制は PMA の濃度依存性に回復した。この結果は PKC が KATP チャンネルに抑制的に作用することを示し、過去の成績とも一致している。しかしインスリン刺激および PCO-400 による抑制下において、粗膜および部分精製膜分画の PKC 活性には有意な変化は認められなかった。従って、KATP チャンネル作動薬の効果は細胞内 PKC の変動を介するものではないことが推定される。

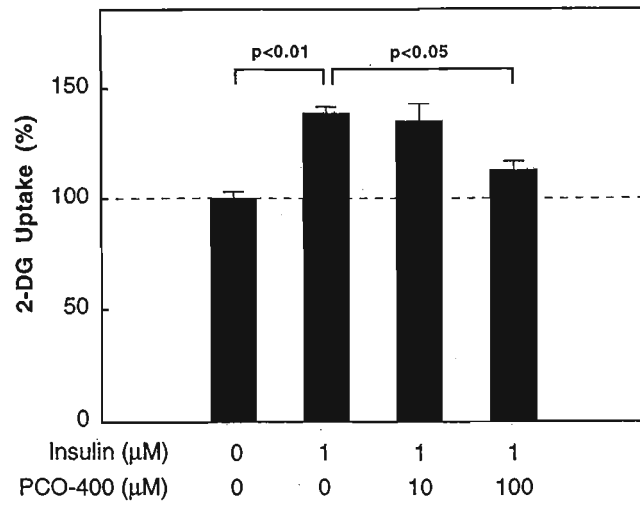
結論として、ヒト正常骨格筋細胞におけるインスリンあるいは高糖濃度刺激による糖取り込みは、KATP チャンネルの開口により抑制され、閉口により促進されることを証明した。しかしその機構については PKC を介さないことは推定されるが、それ以上の詳細は明らかにしえなかった。さらに今後の検討が必要である。

表 1 Measurements of membrane-associated PKC activity

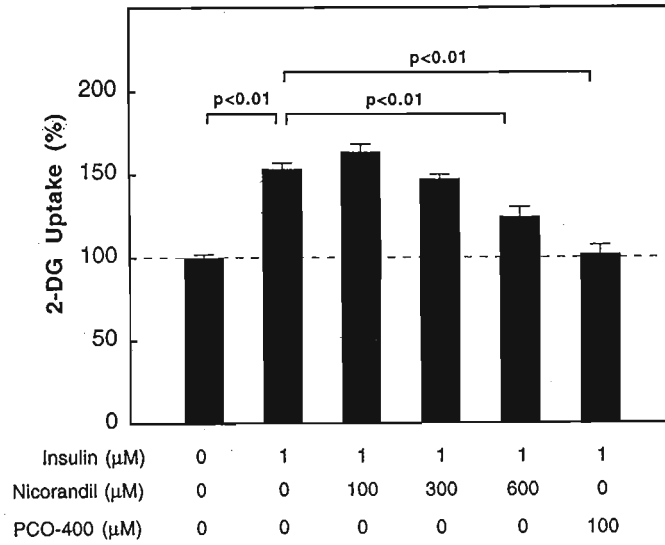
	Control	Ins	Ins+PCO	PMA	PMA+PCO
<hr/>					
Ca ²⁺ , PL +					
Crude extract	100±5	92±4	95±5	443±13	441±24
DEAE fraction	100±11	85±21			
Ca ²⁺ , PL -					
Crude extract	100±7	104±3	100±4	271±5	285±20
<hr/>					

PKC activity / protein was expressed in relative value to control as 100, n=3-6, PL: phospholipid, ins: insulin 1 μ M, PCO:PCO-400 100 μ M, PMA: PMA 100nM, mean±SE

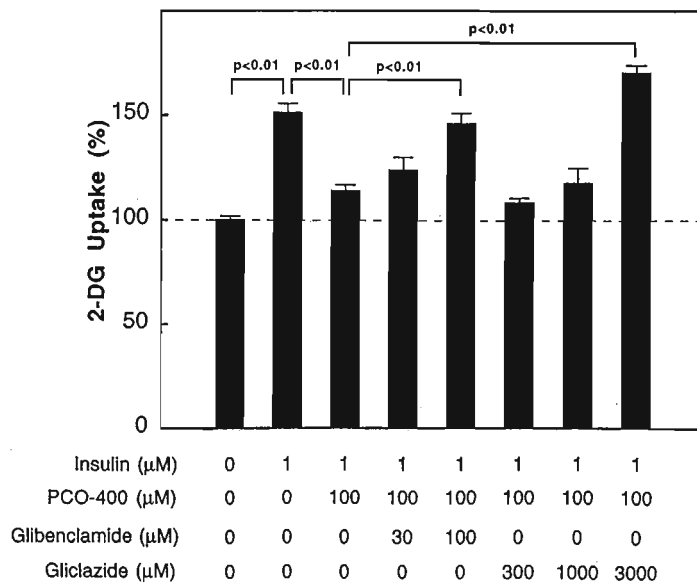
☒ 1



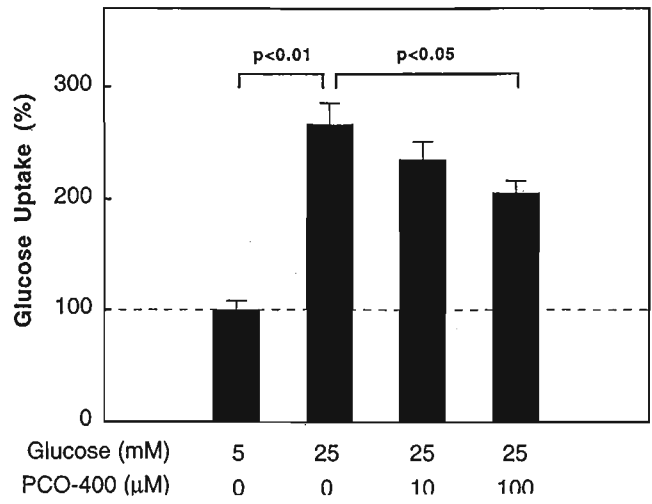
☒ 2



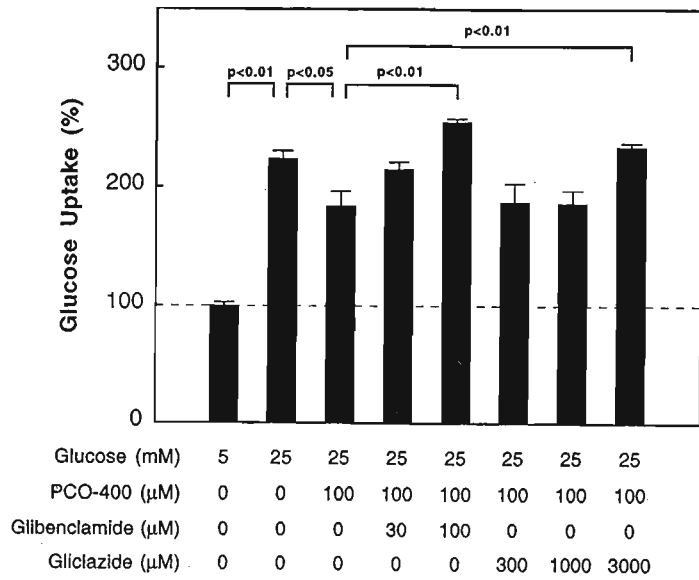
☒ 3



☒ 4



☒ 5



☒ 6

