

2016 年度 博士論文要旨

学生番号	G 1 1 2 0 4	氏 名 徳毛 悠真
題 目	ラット骨格筋のパルス波刺激によるグルコーストランスポーター 4 および関連遺伝子の転写レベルの検討	
英文題目	Evaluating transcriptional levels of glucose transporter type 4 and related genes in rat skeletal muscles stimulated with pulse-wave	
<p>【目的】 グルコーストランスポーター 4 (GLUT4 : Glucose transporter type 4) は細胞膜上で細胞外から細胞内への受動輸送によるグルコースの取り込みをしている。GLUT4 はインスリン依存性の輸送体であり、骨格筋などの横紋筋に多く存在している。しかし、生活習慣病の 1 つである 2 型糖尿病ではこの GLUT4 をプールする小胞体が細胞膜へトランスロケーションができず、高血糖が持続されてしまう。この GLUT4 は微小管上を小胞などの運搬をするモータータンパク質のキネシンによって細胞膜まで順行性輸送される。また、キネシンとは逆に、モータータンパク質の細胞質ダイニンが GLUT4 を細胞膜から細胞内に取り込み、逆行性輸送によりリサイクル処理をする働きがあると考えられている。ここで、骨格筋に電気鍼刺激を与えると GLUT4 が増加することが報告されているため、同時に、キネシン、細胞質ダイニンも GLUT4 の輸送のため mRNA 相対レベルに変化が現れているはずだが、それを報告した例はない。よって、本研究では、パルス波による筋刺激により、2 型糖尿病の非薬物的治療になりうるかどうか、GLUT4、キネシン、細胞質ダイニンの転写レベルの変化を逆転写-定量 PCR により精密測定した。</p> <p>【方法】 イソフルラン吸入麻酔のもとに F344 ラット (雄、10 週齢) の両側下腿前面を皮膚切開し前脛骨筋を露出して、2 本の 25 G 注射針を 2 cm 間隔で刺入し電極とした。その後、無刺激群では麻酔のみを継続し、パルス波刺激群 (パルス電圧 5 V、パルス幅 0.7 ms) では右脚の前脛骨筋のみを 30 ppm あるいは 400 ppm で 30 分、1 時間、2 時間の 3 通りで刺激した。対照脚 (左脚の前脛骨筋) と刺激脚 (右脚の前脛骨筋) から筋試料を採取し、ホモジェナイズ後、AGPC 法により全 RNA を抽出し逆転写反応により cDNA に変換した。定量 PCR は、内在性対照遺伝子 GAPDH 用の VIC、ならびに、GLUT4 (遺伝子記号では SLC2A4)、キネシン-1 重鎖 5B (KIF5B)、細胞質ダイニン重鎖 1 (DYNC1H1)、細胞質ダイニン中間鎖 1 (DYNC1I1)、細胞質ダイニン中間軽鎖 1 (DYNC1LI1) といった標的遺伝子用の FAM の各々の蛍光強度を同時測定し、比較 C_T 法で解析して対照遺伝子に対する標的遺伝子の mRNA 相対レベル (-ΔC_T) を算出した。mRNA 相対量は 2^{-ΔC_T} となる。また、GLUT4 と血糖値の関連を検討するために、微量血液中の全血グルコース濃度を測定した。</p>		

学生番号 G 1 1 2 0 4	氏 名 徳毛 悠真
<p>算出されたデータは統計解析ソフトウェア EZR を使用してノンパラメトリック手法により評価した。</p> <p>【結果】 1時間の400 ppm パルス波刺激群 (n=7) において、対照脚に比較して刺激脚では筋組織の SLC2A4 mRNA 相対レベルに有意な上昇が認められ、mRNA 相対量の平均上昇率は 1.58 倍であった (P<0.01、Wilcoxon 符号付順位検定)。30 ppm でのパルス波刺激群 (n=7) では有意差がみられなかった (P=0.12)。パルス波刺激完了時の筋断端血液のグルコース濃度は、400 ppm パルス波刺激でのみ刺激脚で有意に低下していた (P<0.05)。KIF5B および DYNC1H1 の mRNA 相対レベルにも 400 ppm パルス波刺激群でのみ刺激脚での有意な上昇が認められ、mRNA 相対量の平均上昇率は KIF5B で 1.75 倍、DYNC1H1 で 1.65 倍であった (P<0.05)。1時間の400 ppm パルス波刺激による細胞質ダイニンの転写レベル上昇は、DYNC1H1、DYNC1H1、DYNC1LI1 のすべてのサブユニットで認められたが、30分間あるいは2時間のパルス波刺激では有意な変化がみられなかった。</p> <p>【結論】 パルス波を 30 分間あるいは2時間のパルス波刺激を与えた場合には有意差はみられなかったが、1時間の刺激を与えた場合でのみ、対照脚に比べて刺激脚における筋組織の GLUT4 mRNA レベル上昇が2倍以内ではあったが統計学的に有意に増加することが確認できた。これには、GLUT4 の細胞内から細胞膜へのトランスロケーションに必要なキネシン-1 の重鎖のみならず、細胞質ダイニンの重鎖、中間鎖、中間軽鎖の mRNA レベルの有意な上昇が伴っていた。キネシンは GLUT4 貯蔵小胞の輸送に関わっていることは知られているが、本研究により、細胞質ダイニンも GLUT4 貯蔵小胞の輸送に関わっていることが示唆された。</p> <p>本研究により、パルス波刺激した筋組織局所での血中グルコース濃度の有意な低下が同時に認められたことから、本法がグルコース利用の促進による2型糖尿病の非薬物治療法となる可能性が示唆される。</p>	