

平滑筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮反応

およびグルコース取込み機構の解析

(Analysis on mechanisms of glucose uptake on high

$K^+$ -induced contraction in smooth muscle)

神田 秀憲

平滑筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮反応

およびグルコース取込み機構の解析

(Analysis on mechanisms of glucose uptake on high

$K^+$ -induced contraction in smooth muscle)

神田 秀憲

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 25 年入学

(指導教授：鈴木 浩悦)

平成 29 年 3 月

## 目次

第 1 章 緒言	1
1-1 グルコース輸送体の機能および分布	1
1-2-1 平滑筋の収縮機構	3
1-2-2 平滑筋の収縮制御とエネルギー代謝	6
1-3 本研究の目的	7
第 2 章 腸管平滑筋における収縮反応とグルコース輸送体活性化の関連性 について	12
2-1 材料方法	14
2-1-1 材料	14
2-1-2 平滑筋摘出および収縮張力測定	14
2-1-3 リアルタイム RT-PCR 解析	15
2-1-4 NADH/NAD 解析	17

2-1-5 クレアチンリン酸およびアデノシン 3 リン酸分析	19
2-1-6 単離細胞の作製	20
2-1-7 2-NBDG 蛍光強度解析	21
2-1-8 統計処理	22
2-2 実験成績	24
2-2-1 ラット回腸縦走筋およびブタ虹彩括約筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮に対する低酸素および phloridzin の影響	24
2-2-2 ラット大動脈平滑筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮における phloridzin の影響	25
2-2-3 ラット回腸および大動脈平滑筋の SGLT1 および SGLT2 の mRNA 発現量の比較	25
2-2-4 ラット回腸平滑筋における解糖系活性に対する phloridzin の影響	26
2-2-5 ラット回腸平滑筋における ATP および PCr 含量に対する phloridzin の影響	26

2-2-6 ラット回腸平滑筋単離細胞におけるグルコース取込みに対する phloridzin の影響	27
2-3 考察	34
2-3-1 Phasic 筋における好氣的代謝への依存性および糖取込み	34
2-3-2 回腸平滑筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮反応におけるグルコース取込み機 構	35
第3章 Tonic 筋におけるエネルギー代謝と収縮制御	41
3-1 材料方法	42
3-1-1 材料	42
3-1-2 平滑筋摘出および収縮張力測定	42
3-1-3 RT-PCR 解析	42
3-1-4 単離細胞の作製	43
3-1-5 2-NBDG 蛍光強度解析	44
3-1-6 免疫染色による GLUT4 トランスロケーション解析	44

3-1-7 使用薬物	44
3-1-8 統計処理	45
3-2 実験成績	47
3-2-1 ラット大動脈平滑筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮に対する NaCN の影響	47
3-2-2 ラット大動脈平滑筋における GLUT4 mRNA 発現	47
3-2-3 ラット大動脈平滑筋単離細胞における蛍光グルコース取込み	47
3-2-4 ラット大動脈平滑筋単離細胞のグルコース取込み増加に対する各種 阻害薬の影響	48
3-2-5 ラット大動脈平滑筋単離細胞における GLUT4 トランスロケーション に対する NaCN の影響	49
3-2-6 ラット大動脈平滑筋単離細胞における GLUT4 トランスロケーション に対する各種阻害薬の影響	49
3-3 考察	57
3-3-1 Tonic 筋収縮における好氣的代謝への依存性およびグルコース取り込	

み機構	57
-----	----

### 3-3-2 大動脈平滑筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮反応におけるグルコース取込み

機構	58
----	----

第4章 総合考察	64
----------	----

### 4-1 Phasic 筋および tonic 筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮における SGLT の関連

性	64
---	----

4-2 血管平滑筋におけるグルコース取込み機構	68
-------------------------	----

第5章 総括	73
--------	----

### 5-1 Phasic 平滑筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮とグルコース取込みの関連性

74
----

### 5-2 Tonic 平滑筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮とグルコース取込みの関連性

75
----

5-3 まとめ	77
---------	----

謝辞



## 第1章 緒言

### 1-1 グルコース輸送体の機能および分布

グルコースは細胞活動を維持する重要なエネルギー基質の1つである。細胞内へのグルコース取込みは主に  $\text{Na}^+$ -グルコース共輸送体 (SGLT) およびグルコース輸送体 (GLUT) を介して行われる。

SGLT には 1 および 2 のサブタイプが存在し、ナトリウムおよびグルコースを共輸送することによりグルコースを細胞内へ取込むことが知られている。SGLT1 は、腎臓、心臓、小腸粘膜および骨格筋に多く発現し、SGLT2 は主に腎臓に発現している (Wright et al., 2011<sup>(60)</sup>)。SGLT1 は小腸粘膜において、経口摂取されたグルコースを管腔側より細胞内へと取込み、SGLT2 は腎臓の尿細管上皮細胞において、管腔側から  $\text{Na}^+$  およびグルコースを取込み、尿細管での再吸収の 90% に関与する。このことから、SGLT 阻害薬は糖尿病治療薬として臨床的に使用されている。

GLUT は 12 回膜貫通型輸送体であり、14 種 (表 1) のサブタイプが存在する。特に GLUT1~4 は生体の恒常性の維持に重要な役割を担っている。

中でも GLUT4 は骨格筋、心筋、脂肪、脳、腎臓といった組織に幅広く存在しており、インスリン刺激などにより細胞内の小胞より膜上へとトランスロケーションしグルコースを取込む（図 1）。GLUT4 トランスロケーションに関与するシグナルは、インスリン受容体を介した PI3 キナーゼ（PI3K）および Akt のリン酸化を伴った経路と、筋肉の収縮反応および低酸素のような ATP の減少により活性化される AMP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）のリン酸化の経路が知られている。これらのタンパク質のリン酸化により細胞内小胞に存在する GLUT4 は、細胞膜上へとトランスロケーションし、グルコースを取込む。これらのことから、GLUT4 は糖尿病治療において非常に重要な標的となる輸送体である。

このように SGLT および GLUT の分布および機能について様々な研究がなされているが、平滑筋の収縮反応とグルコース取込みの関連について十分な検討はなされていない。平滑筋組織は、気管、血管、消化管、泌尿器および生殖器と様々な部位に存在し、いずれにおいても生体の生命活動維持において非常に重要である。このことから、平滑筋の収縮反応とグルコース取込

みについての研究は、様々な代謝性疾患における基礎知見となると考えられる。

### 1-2-1 平滑筋の収縮機構

平滑筋収縮とグルコース取込み機構を考える上で、平滑筋の収縮機構を知ることが重要である。平滑筋の収縮は骨格筋や心筋と同様、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) レベルの変化によって制御されていることが知られている。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$  レベルが上昇する要因としては、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの開口または  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交換機構による細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$ 流入、あるいは細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が考えられている。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  レベルが増加すると、これがカルモジュリンと結合し  $\text{Ca}^{2+}$ -カルモジュリン複合体を形成する。この  $\text{Ca}^{2+}$ -複合体はミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) と結合し、ミオシン軽鎖キナーゼは活性型となり、ミオシン軽鎖をリン酸化する。その結果、ATP を消費してミオシンとアクチンの相互作用であるクロスブリッジが回転し、筋は収縮する。刺激が解除されると、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは閉鎖し、 $\text{Ca}^{2+}$ ポンプの

働きにより細胞外に排出され、あるいは細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位に取込まれることにより  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  レベルが減少する。これによりミオシン軽鎖キナーゼの活性は低下し、これとは逆にフォスファターゼ (MLCP) 活性が相対的に強くなり、ミオシンは脱リン酸化され、筋は弛緩する (Dillon et al. 1981<sup>(6)</sup>; Rembold and Murphy 1986<sup>(43)</sup>)。一方、受容体作動薬による平滑筋の収縮が、高濃度  $\text{K}^+$  誘発性収縮に比べ同じ  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  レベルでより大きな収縮張力を発生することから、受容体作動薬が収縮蛋白系の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性を増加させることが示されている (Morgan et al., 1984<sup>(31)</sup>; Karaki et al., 1997<sup>(23)</sup>; Somlyo and Somlyo, 2003<sup>(52)</sup>)。収縮蛋白の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性増加は、G 蛋白共役型受容体からの刺激により活性化され、C キナーゼ (PKC) の活性化を介しての MLCP 阻害蛋白質 (CPI-17) 活性化、もしくは Rho A の活性化を介しての Rho キナーゼ (RK) の活性化によると考えられている (Karaki et al., 1997<sup>(23)</sup>; Somlyo and Somlyo, 2003<sup>(51)</sup>) (図 2)。これらのシグナルは、 $\text{Ca}^{2+}$  を介さずに MLCK もしくは MLCP を制御することにより収縮を制御する。また、一部の G 蛋白共役型受容体により活性化されるアデニル酸シクラー

ゼ (AC)、NO 等により活性化されるグアニル酸シクラーゼ (GC) が細胞内に存在し、それぞれ cAMP および cGMP を合成する。cAMP および cGMP はそれぞれ A キナーゼ (PKA) および G キナーゼ (PKG) を活性化し、これらも RhoA、MLCK および MLCP を制御する (図 2)。更に、ラット回腸縦走筋において ERK および p38MAPK は MLCP を抑制することにより収縮反応を制御するという報告もある (Ihara et al., 2015<sup>(12)</sup>)。以上全てを  $\text{Ca}^{2+}$  感受性経路と呼ぶ。

さらに、平滑筋における収縮反応は全て同じではなく、張力もしくは収縮頻度の維持能力には多様性がある。このような多様性は、phasic 筋と tonic 筋に大別される (Somlyo and Somlyo 1968<sup>(50)</sup>; Horowitz et al., 1996<sup>(11)</sup>; Karaki et al., 1997<sup>(23)</sup>)。Phasic 型平滑筋は、回腸、膀胱、子宮、精管などがこれに属し、しばしば電気的スパイクと関連した収縮を発生し、高濃度  $\text{K}^+$  による収縮は初期の phasic 収縮とそれに続く持続性収縮を誘発する (Himpens et al., 1989<sup>(10)</sup>)。それに比して、大動脈および気管のような tonic 型平滑筋は電気的スパイクを伴わないゆっくりとした収縮を発生する。平滑

筋における収縮の多様性は、ミオシン軽鎖、MLCK および MLCP などの細胞内タンパク発現(Adelstein and Sellers, 1996<sup>(1)</sup>; Bárány and Bárány, 1993<sup>(2)</sup>; Dirksen et al., 2000<sup>(7)</sup>; Khalil et al., 1992<sup>(25)</sup>; Kitazawa et al., 1991<sup>(26)</sup>; North et al., 1994<sup>(38)</sup>; Szymanski et al., 1998<sup>(57)</sup>)の差異に関連することが主張されている。

#### 1-2-2 平滑筋の収縮制御とエネルギー代謝

摘出した骨格筋および心筋における低酸素条件下では、時間の差はあるが収縮反応を抑制する。平滑筋においても、骨格筋や心筋と同様に低酸素状態やエネルギー基質の欠乏により収縮反応は影響を受けるが、その変化は臓器、組織により異なることが報告されている(Ishida., 2001<sup>(16)</sup>)。モルモット小腸(Santi et al., 1963<sup>(46)</sup>) および盲腸紐(Ishida and Shibata, 1982<sup>(13)</sup>; Ishida et al., 1984<sup>(14)</sup>) といった phasic 筋では、低酸素状態により収縮は顕著に抑制されるが、ブタ冠状動脈(Rubanyi and Paul, 1985<sup>(45)</sup>; Paul et al., 1987<sup>(41)</sup>)

のような tonic 筋において低酸素状態による収縮抑制はわずかである。このように phasic 筋と tonic 筋において、好氣的代謝への依存性が異なることが知られている(Coburn et al., 1992<sup>(5)</sup>; Ishida and Paul, 1990<sup>(15)</sup>)。

一方、様々な平滑筋において等浸透圧性に置換した高濃度  $K^+$ 、 $Na^+$ 除去液は収縮に続く大きな弛緩を誘発する。その弛緩の可能性のある機序は、

1) 細胞膨潤によるもの、ウサギ大動脈 (Suzuki et al., 1981<sup>(55)</sup>)、モルモット気管 (Shimizu et al., 1984<sup>(47)</sup>) およびウシ気管 (Kaneda et al., 2012<sup>(21)</sup>) (1 型); 2) 栄養液中の  $Na^+$ 除去を原因とするグルコース利用の抑制によるもの、モルモット膀胱 (Suzuki et al., 1981<sup>(56)</sup>) およびモルモット回腸 (Shimizu et al., 1991<sup>(50)</sup>) (2 型); 3) 細胞膨潤とグルコース利用の抑制によるもの、モルモット胆嚢 (Suzuki et al., 1981<sup>(55)</sup>)、盲腸紐 (Urakawa et al., 1968<sup>(58)</sup>) およびブタ気管 (Kaneda et al., 2009<sup>(20)</sup>) (3 型) と分類されてきた。

### 1-3 本研究の目的

生体における平滑筋は、呼吸器、循環器、消化器、泌尿器と様々な臓器組織に存在し、それぞれ重要な役割を担っており、様々な代謝性疾患および治療のための投薬等を考える上において平滑筋のエネルギー代謝について検討することは非常に重要である。その一つに糖尿病があり、現在の主な治療法はインスリン製剤および SGLT 阻害薬と言った糖取込みに関与する薬剤の投与である。それら薬剤の標的受容体および輸送体は平滑筋にあるにも関わらず、平滑筋に与える影響について十分な検討はなされていない。

本研究は、phasic 筋である虹彩括約筋および回腸平滑筋と、tonic 筋である大動脈平滑筋の収縮反応と糖取りみについて比較検討し、平滑筋におけるエネルギー代謝について検討したものである。



名称	主な発現組織	機能
<b>GLUT1</b>	ほぼ全ての組織	基礎状態と脳血液関門のグルコース取込み
<b>GLUT2</b>	肝、膵臓 $\beta$ 細胞、近位尿細管、網膜、小腸（基底膜側）	グルコース低親和性
<b>GLUT3</b>	脳、神経細胞、胎盤、腎、肝、心筋、精巣、骨格筋	神経系の糖輸送に関与・GLUT1 の補足
<b>GLUT4</b>	骨格筋、心筋、脂肪組織、脳、腎	インスリン依存性グルコース取込み
<b>GLUT5</b>	小腸（刷子縁膜側）、脳、筋、脂肪組織、腎、精巣	フルクトース取込み
<b>GLUT6</b>	脾臓、白血球、脳	グルコースに低親和性
<b>GLUT7</b>	ミクロソーム糖輸送担体、肝、小腸、大腸、精巣、前立腺	フルクトース取込み
<b>GLUT8</b>	精巣、胚盤胞、脳、副腎、骨格筋、脂肪組織	精子の成熟化へのグルコース取込み・胚盤でのインスリン依存性グルコース取込み
<b>GLUT9</b>	肝、腎、胎盤	グルコース取込み
<b>GLUT10</b>	肝、膵	グルコース・ガラクトース取込み
<b>GLUT11</b>	心筋、骨格筋	筋肉特異的フルクトース取込み
<b>GLUT12</b>	心臓、前立腺、骨格筋、脂肪組織、腎、小腸、乳腺	インスリン依存性グルコース取込み
<b>GLUT13</b>	脳	H <sup>+</sup> /myo-イノシトールトランスポーター
<b>GLUT14</b>	精巣、卵巣、脳	不明

表 1 各種 GLUT の分布と機能

# GLUT4 signaling in skeletal muscle

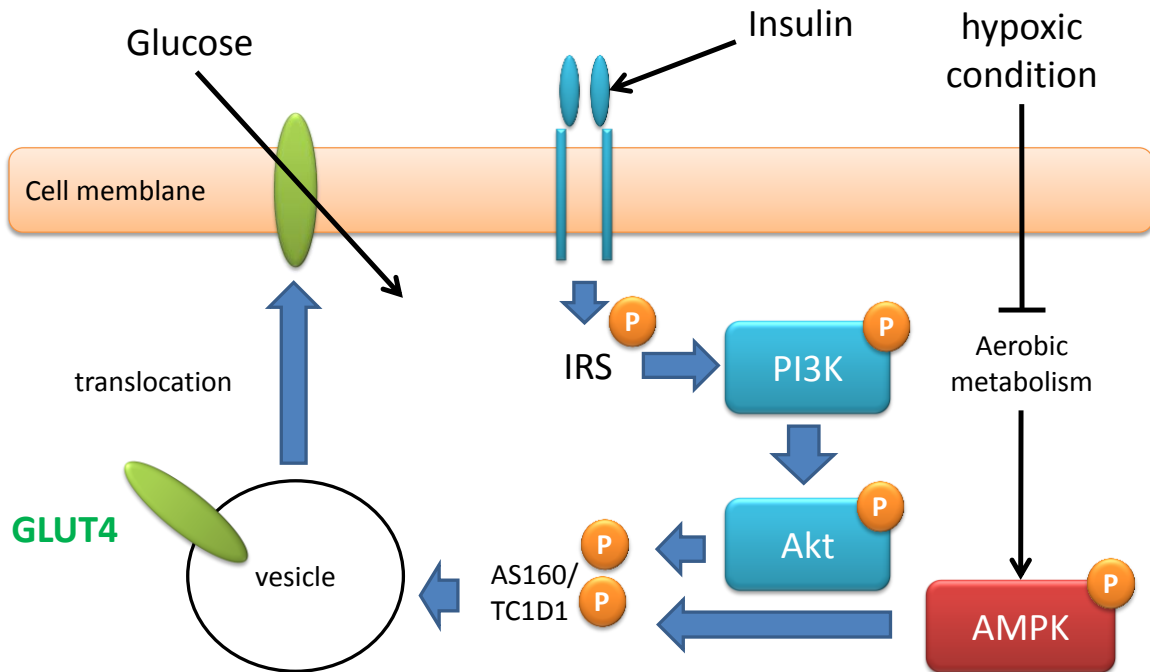


図 1 骨格筋における GLUT4 トランスロケーションシグナル

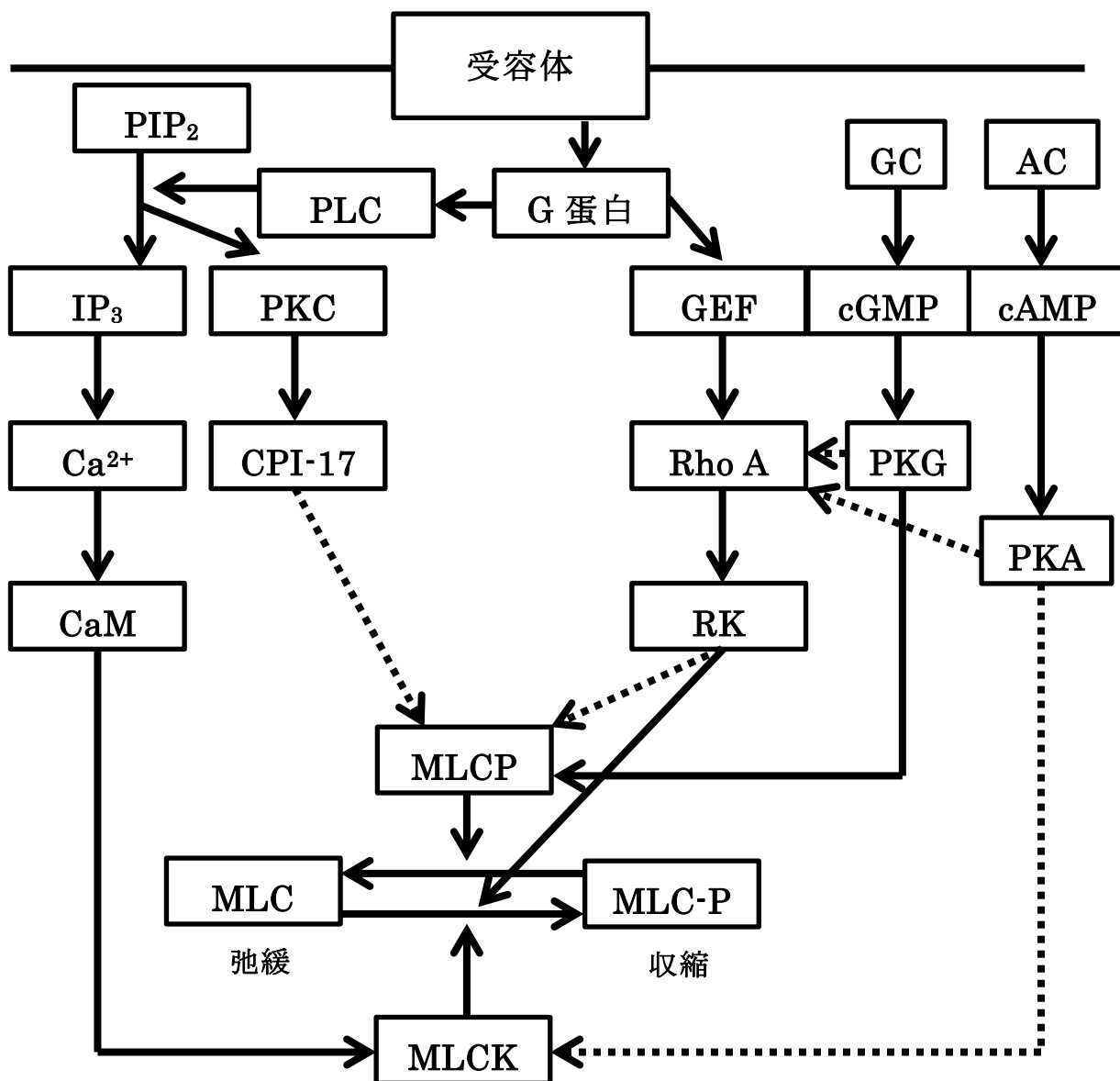


図 2 平滑筋収縮弛緩反応における  $Ca^{2+}$  感受性シグナル

—→ 促進      .....→ 抑制

AC: アデニル酸シクラーゼ、CaM: カルモジュリン、CPI-17: PKC-potentiated protein phosphatase-1、GC: グアニル酸シクラーゼ、GEF: guanine nucleotide exchange factor、MLC: ミオシン軽鎖、MLCP: MLC phosphatase、MLCK: MLC kinase、RK: Rho kinase、PKA: プロテインキナーゼ A、PKG: プロテインキナーゼ G、PKC: プロテインキナーゼ C、PLC: ホスホリパーゼ C

## 第 2 章 腸管平滑筋における収縮反応とグルコース輸送体活性化の関連性

について

はじめに

第一章で述べた通り、平滑筋は phasic 筋と tonic 筋に大別され、phasic 筋は tonic 筋に比して、高濃度  $K^+$  収縮の好気代謝への依存性が高く、また細胞外  $Na^+$  に依存したグルコース利用性への依存性も高いことが考えられる。

窒素通気による低酸素状態はモルモット盲腸紐 (Ganeshanandan et al., 1969<sup>(8)</sup>; Nakagawa et al., 1976<sup>(34)</sup>)、モルモット (Nakagawa et al., 1976<sup>(34)</sup>) とネコ (Shimizu et al., 1987<sup>(48)</sup>) 回腸およびラット子宮 (Nakagawa et al., 1976<sup>(34)</sup>) の高濃度  $K^+$  収縮を顕著に抑制した。またシアレン化合物による好氣的代謝の抑制は、モルモット回腸 (Kaneda et al., 1998<sup>(18)</sup>) と膀胱 (Kaneda et al., 2006<sup>(19)</sup>) の高濃度  $K^+$  収縮を顕著に抑制した。

一方、等浸透圧性に置換した高濃度  $K^+$ 、 $Na^+$  除去液はモルモット膀胱

(Shimizu et al., 1984<sup>(47)</sup>)、回腸 (Shimizu et al., 1991<sup>(49)</sup>)、胆嚢 (Shimizu et al., 1984<sup>(47)</sup>) および盲腸紐 (Urakawa et al., 1968<sup>(58)</sup>) において収縮に続く大きな弛緩を誘発するが、 $\text{Na}^+$ あるいはピルビン酸の添加により、弛緩は回復した。

さらに、モルモット盲腸紐において、SGLT 阻害薬である phloridzin は、高濃度  $\text{K}^+$ 収縮を抑制したが、グルコースをピルビン酸に置換した高濃度  $\text{K}^+$ 収縮を抑制しなかった (Suzuki et al., 1980<sup>(54)</sup>)。しかし、 $10^{-4} \text{ M}$  を越える高濃度の phloridzin は、好氣的代謝を抑制し、ミトコンドリアに細胞膨満を起こすことが報告されており (Keller and Lotspeich, 1959<sup>(24)</sup>)、phloridzin による平滑筋収縮の抑制とグルコース取込み阻害の関連は充分に明らかになったとはいえない。

本章では、phasic 筋である回腸および虹彩括約筋の高濃度  $\text{K}^+$ 収縮に対する窒素通気および phloridzin の影響について検討し、さらに回腸に対する phloridzin の影響についてホスホクレアチン (PCr) と ATP 含量およびグルコース取り込みの変化を調べたものである。

## 2-1 材料方法

### 2-1-1 材料

雄性ウィスターラット（250-300 g）はペントバルビタール酸ナトリウム（50 mg/kg, i.p.）による麻酔後、放血死した後、直ちに回腸、大動脈および腎臓を摘出した。ブタ虹彩括約筋は屠場より入手した。ラットを用いた研究は、日本獣医生命科学大学における実験動物委員会より認可を受けて行われた（26S-44, 27K-23, 28K-10）。

### 2-1-2 平滑筋摘出および収縮張力測定

各ブタ眼球より毛様体筋を除去した虹彩括約筋条片を 2 つ作成し、これを標本として実験に供した。ラット回腸縦走筋は、Paton and Zar（1968）<sup>(40)</sup>の方法に従って輪走筋より分離し、長さ約 15 mm、幅 5～6 mm の標本を作製した。ラット胸大動脈は、長さ 15 mm、幅 3 mm らせん状の筋条片を作製し、内腔側をこすることにより内皮細胞を除去し、これを標本として実験に供した。

作製された標本は、一端をガラス製ホルダーに絹糸で固定してマグヌス管に懸垂し、他端を張力トランスジューサー（日本光電、東京）に連結してその収縮反応を等尺性に記録した。栄養液は修正タイロッド液を用い、その組成は、136.8 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub> および 5.5 mM glucose であった。栄養液には 95 % O<sub>2</sub> および 5 % CO<sub>2</sub> の混合ガスを絶えず通気させ、浴槽の温度は 37 °C に保ち、pH 7.2 に維持した。高濃度 K<sup>+</sup> は高浸透圧性に 65 mM KCl (H-65K<sup>+</sup>) を加えた液を使用した。

### 2-1-3 リアルタイム RT-PCR 解析

摘出した腎臓、大動脈、回腸縦走筋から約 5 mg の大きさの組織片を作成し、それぞれ試験管中で TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1 ml を加え、ホモジナイザー (Polytron PT10-35、Kinematica) でよく粉砕し、チューブに回収した。室温で 5 分間静置した後クロロホルム 200 µl を添加し混和後、再び 5 分間室温で静置した。これを小型高速冷却遠心機 (MX-301、

TOMY)で 4℃、12,000 *g* で 10 分間遠心した後、分離した水層のみを別のチューブに移した。次に 2-プロパノール 600  $\mu$ l を添加してよく混合してから 5 分間室温で静置し、4℃、12,000 *g* で 10 分間遠心し、上清を除去した。さらに 70%エタノール 1 ml を加え、4℃、7,500 *g* で 10 分間遠心した。遠心後エタノールを捨て、ペレットを乾燥させてから超純水 6  $\mu$ l を加えてペレットを溶解し、mRNA を抽出した。抽出した mRNA の濃度は吸光度計( Nano Drop 1000、Thermo Fischer Scientific, MA, USA)により測定し、10 ng/ $\mu$ l に調整した。

SGLT1、SGLT2 の mRNA 量は Realtime RT-PCR を行い、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素(GAPDH) mRNA を内部標準として用いた  $\Delta\Delta$ Ct 法により相対定量した。すなわち、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (TaKaRa, 大阪)を用いて、逆転写反応 42℃ 5 min、95℃ 10 秒;PCR 反応 95℃ 5 秒、61℃ 34 秒、40cycles で反応を行い、PRISM 7000/7700 Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Forester City, CA, USA)で測定した。また、



用いたプライマーと設計に用いた配列、PCR産物の大きさは表2に示した。

#### 2-1-4 NADH/NAD 解析

回腸縦走筋を湿重量約 10mg の筋片に分け標本を作成し、張力実験と同様に薬物処置した。標本は 1 つの薬物処置につき筋片 4 本、すなわち合計湿重量が約 40mg になるようにした。その後、液体窒素で直ちに凍結させ、筋片を 2 本ずつテフロンチューブに移した。これをアマルガムミキサーを用いて 5 秒、3 回で破砕し、0.25M スクロース液 50 $\mu$ l を加え、再びアマルガムミキサーにて混和した後、さらに 0.25M スクロース液 50 $\mu$ l を加えて、遠心機で 4℃、600g で 10 分間遠心し、核を沈降させた。上清を回収し、さらにそれを 4℃、8000g で 10 分間遠心し、ミトコンドリアを沈降させた。得られた上清を抽出液とした。

抽出液中の NADH の測定は Fluorescent NAD/NADH Detection Kit (Cell Technology, California, USA) を用いた蛍光測定により行った。抽出液をチューブに NAD あるいは NADH 測定用に 50 $\mu$ l ずつ移し、NAD あ

るいは NADH ExtractionBuffer 200 $\mu$ l を各々のチューブへ添加した。

次に NAD/NADH lysisBuffer 200 $\mu$ l を添加し、60℃で 15 分加温した。

加温したチューブを冷却して、Reaction Buffer 100 $\mu$ l を添加し、最初に添加したのとは逆の ExtractionBuffer 200 $\mu$ l を各々のチューブに添加した。

その後、チューブをボルテックスにかけ、8000 *g* で 5 分間遠心した。

NADH 標準液および反応カクテル液をキット添付のプロトコールに従って作成し、96 ウェルのブラックプレートに NADH 標準液およびサンプル上清を各々 50 $\mu$ l ずつ滴定し、さらに反応カクテル液を 100 $\mu$ l 添加し、室温、遮光の条件で約 1 時間インキュベーションした。その後、530-570nm の励起波長を当て、590-600nm の蛍光を測定した。なお、キットを使用している作業は、NADH の損失を防ぐため、加温あるいはインキュベーション以外はサンプルを氷上あるいは 4℃の低温室内で行った。

実験後の評価方法としては NADH と総 NAD の蛍光量の比をとって行った。

### 2-1-5 クレアチンリン酸およびアデノシン 3 リン酸分析

筋標本含有クレアチンリン酸(PCr)およびアデノシン 3 リン酸(ATP)は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)により測定した。筋標本は修正タイロード液中で 30 分間インキュベーションされ、H-65K<sup>+</sup>により収縮させた。収縮後、phloridzin 適用を行った。その後直ちに-196℃の液体窒素により凍結させ、6%過塩素酸を加えホモジナイズした。ホモジナイズした後、遠心分離機により 15000 g、5 分で行い、0.2 ml 2M の KHCO<sub>3</sub>により中和させた。その中和物より 20 μl 以上取り出し、HPLC により測定した。

HPLC システム (島津製作所、京都市)はポンプ(LC-10AT)、システムコントローラー(SCL-10AT)、オートサンプラ(SIL-10AF)、40℃に設定したカラムオーブン(CTO-10A)、および 216nm に設定した紫外可視光光度計検出器(SPD-10Ai)により構成された。

カラムは Jupiter 4u Proteo 90A(100×4.6 mm phenomenex, CA, USA)を用い、移動相は 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および 5 mM 硫化水素テトラ・n-ブチル

アンモニウム(TBAHS)を混合し pH 6.0 に調整したものを A 液とし、A 液に対し 2/3 の割合でメタノールを加え pH 6.0 に調整したものを B 液とした。流量は 1.0 ml/分 とし、A 液 65%から開始した。最初の 14 分は 2.5%/分 の割合で B 液を増加させた。これにより B 液を 70%まで増加させ 20 分間維持し、その後 10 分間 A 液を 100%にした。これらの過程はシステムコントローラーにより自動的に行われた。検出感度は 1.0 a.u.f.s. に設定し、カラムオーブンは 40℃に設定した。PCr および ATP 濃度は  $\mu$  mol/ g wet weight として解析した。

#### 2-1-6 単離細胞の作製

作製された回腸の標本は、コラゲナーゼ (0.2 mg/ml) (Wako Pure chemical, Osaka, Japan) およびパパイン (0.2 mg/ml) (Wako Pure chemical) により 25℃で 1 時間処理し、単離した。単離された細胞は、High glucose Dalbecco modified medium (D-MEM, Wako Pure chemical) 中で  $1.0 \times 10^6$  cells/ml に調整された。調整された細胞懸濁液は、マイクロプレート内のカバーガラスの上に 300  $\mu$ l/well で入れ、5 % CO<sub>2</sub>、37℃で 1 時間培

養した。

#### 2-1-7 2-NBDG 蛍光強度解析

カバーガラス上で 1 時間培養された単離細胞を蛍光グルコース取込みの実験に用いた。培養後、培地を 1 mM の 2-(N(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG, Cayman Chemical, Michigan, U.S.A.) および hoechst33342 (1:500) (Wako Pure chemical) を含有した No-glucose D-MEM (Wako Pure chemical) に置換し、各種試薬を同時処置した。試薬処置を 20 分間した後、培地を除去し D-PBS (Wako Pure chemical) により 3 回洗浄した。その後細胞は、4 %パラホルムアルデヒドで 30 分および 2 % BSA で 4℃、20 分間処置した。その後細胞は、抗  $\alpha$ -SMA 抗体(1:800) (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A)で一昼夜処理した。その後、D-PBS (Wako Pure chemical) により 3 回洗浄され、カバーガラスごとスライドガラス上に封入され、蛍光顕微鏡 (Axio Vert 200M fluorescence microscope, ZEISS Japan, Tokyo, Japan)

により蛍光強度を測定した。

2-NBDG、hoechst33342 および  $\alpha$ -SMA fluorescence による蛍光は、Axiovert 200M (Carl Zeiss Japan) により検出された。hoechst33342 および  $\alpha$ SMA fluorescence (Cy-3) 陽性細胞を平滑筋細胞とした。2-NBDG 蛍光強度の解析には、Image J ソフトを用いた。

#### 2-1-8 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、有意差は Student の  $t$  検定を用いた。

危険率については、 $P < 0.05$  および  $P < 0.01$  を有意水準とした。

Primer	Nucleotide sequence 5'→ 3'	Product size
GAPDH F	ATGGTGAAGGTCGGTGTGAA	
GAPDH R	AATGAAGGGGTCGTTGATGG	108
SGLT1 F	TACATCAAGGCTGGGGTGGT	
SGLT1 R	AGCAGGGACAGAACGGAAAG	95
SGLT2 F	TGTGGGATGAGCAAGAGTGG	
SGLT2 R	ATGAGCAGGGCATTGAGGTT	134

表 2 リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー

## 2-2 実験成績

### 2-2-1 ラット回腸縦走筋およびブタ虹彩括約筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮に対する低酸素および phloridzin の影響

ラット回腸縦走筋標本において高浸透圧性に 65mM KCl ( $H\text{-}65K^+$ ) の適用は、一過性収縮とそれに続く持続的な収縮を示した(Fig. 3 A)。ブタ虹彩括約筋においても  $H\text{-}65K^+$ 誘発性収縮は、ラット回腸縦走筋と同様の収縮反応を誘発した (Fig. 3 B)。ラット回腸縦走筋およびブタ虹彩括約筋において窒素通気による低酸素状態は、 $H\text{-}65K^+$ 誘発性収縮をそれぞれ  $42.1 \pm 1.1\%$  および  $4.8 \pm 2.8\%$ まで有意に抑制した (Fig. 3 A, B)。さらに、ラット回腸縦走筋において phloridzin は、 $H\text{-}65K^+$ 誘発性収縮を濃度依存性に抑制し、300  $\mu\text{M}$  および 1 mM においてそれぞれ  $82.0 \pm 0.2\%$ および  $32.1 \pm 1.1\%$ まで有意に抑制し (Fig. 3 C)、同様に、ブタ虹彩括約筋において phloridzin は、 $H\text{-}65K^+$ 誘発性収縮を濃度依存性に収縮を抑制し、300  $\mu\text{M}$  および 1 mM においてそれぞれ  $83.4 \pm 2.8\%$ および  $42.4 \pm 6.1\%$ まで抑制した (Fig. 3 D)。



### 2-2-2 ラット大動脈平滑筋の高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮に対する phloridzin の影響

Tonic 筋である大動脈において H-65K<sup>+</sup>の適用は、持続的な収縮を示した (Fig. 4)。Figure 4 に示したように、ラット大動脈平滑筋において phloridzin (1 mM) の適用は、H-65K<sup>+</sup>誘発性収縮を  $86.7 \pm 3.6\%$  まで抑制したが、その抑制の程度は、ラット回腸縦走筋およびブタ虹彩括約筋に比べ小さかった。

### 2-2-3 ラット回腸および大動脈平滑筋の SGLT1 および SGLT2 の mRNA 発現量の比較

Real-time PCR により腎臓組織、回腸平滑筋、大動脈平滑筋の SGLT1 および SGLT2 の mRNA 発現の相対量の比較を行った。回腸平滑筋での SGLT1 mRNA 発現は、大動脈平滑筋のそれと比較すると顕著に高かった (Fig. 5 A)。SGLT2 の mRNA 発現は、回腸平滑筋と大動脈平滑筋で差異はみられずいずれも腎臓より明らかに低かった (Fig. 5 B)。

#### 2-2-4 ラット回腸平滑筋における解糖系活性に対する phloridzin の影響

解糖系活性はミトコンドリアを沈降させた組織上清から NAD および NADH を抽出し、蛍光法により測定した。窒素通気による低酸素条件下では、好氣的代謝が抑制され、解糖系活性が上がることから、陽性対照として用いた。

窒素通気による低酸素状態は、H-65K<sup>+</sup>存在下の NADH/NAD 比を有意に増加した (Fig. 6)。一方、H-65K<sup>+</sup>存在下の phloridzin (300  $\mu$ M, 1 mM)20 分処置は濃度依存性に NADH/NAD 比を有意に抑制した (Fig. 6)。また、ピルビン酸(5.5 mM)の追加適用は phloridzin (1 mM) による NADH/NAD 比の抑制を回復しなかった (Fig. 6)。

#### 2-2-5 ラット回腸平滑筋における ATP および PCr 含量に対する phloridzin の影響

Fig. 7 A に示したように、H-65K<sup>+</sup>存在下での 1 mM phloridzin の適用は、

PCr 含量を有意に減少した。さらに、その減少は、5.5 mM のピルビン酸の追加適用により回復した。それに対して、phloridzin およびピルビン酸の適用は、ATP 含量に影響しなかった (Fig. 7 B)。また、pyruvate の適用は、ラット回腸平滑筋の H-65K<sup>+</sup>誘発性収縮における phloridzin 誘発性弛緩を回復した (Fig. 7 C)。

#### 2-2-6 ラット回腸平滑筋単離細胞におけるグルコース取込みに対する

##### phloridzin の影響

作製された単離細胞は  $\alpha$ -SMA および hoechst により免疫染色され、2 重陽性の細胞を平滑筋細胞として蛍光グルコース (2-NBDG) 取込みについて検討した (Fig. 8 A)。

ラット回腸平滑筋単離細胞における 2-NBDG 取込みは、H-65K<sup>+</sup>適用により有意に増加した (Fig. 8 B)。その増加は、phloridzin (10, 100  $\mu$ M) 適用により濃度依存性に抑制された (Fig. 8 B)。

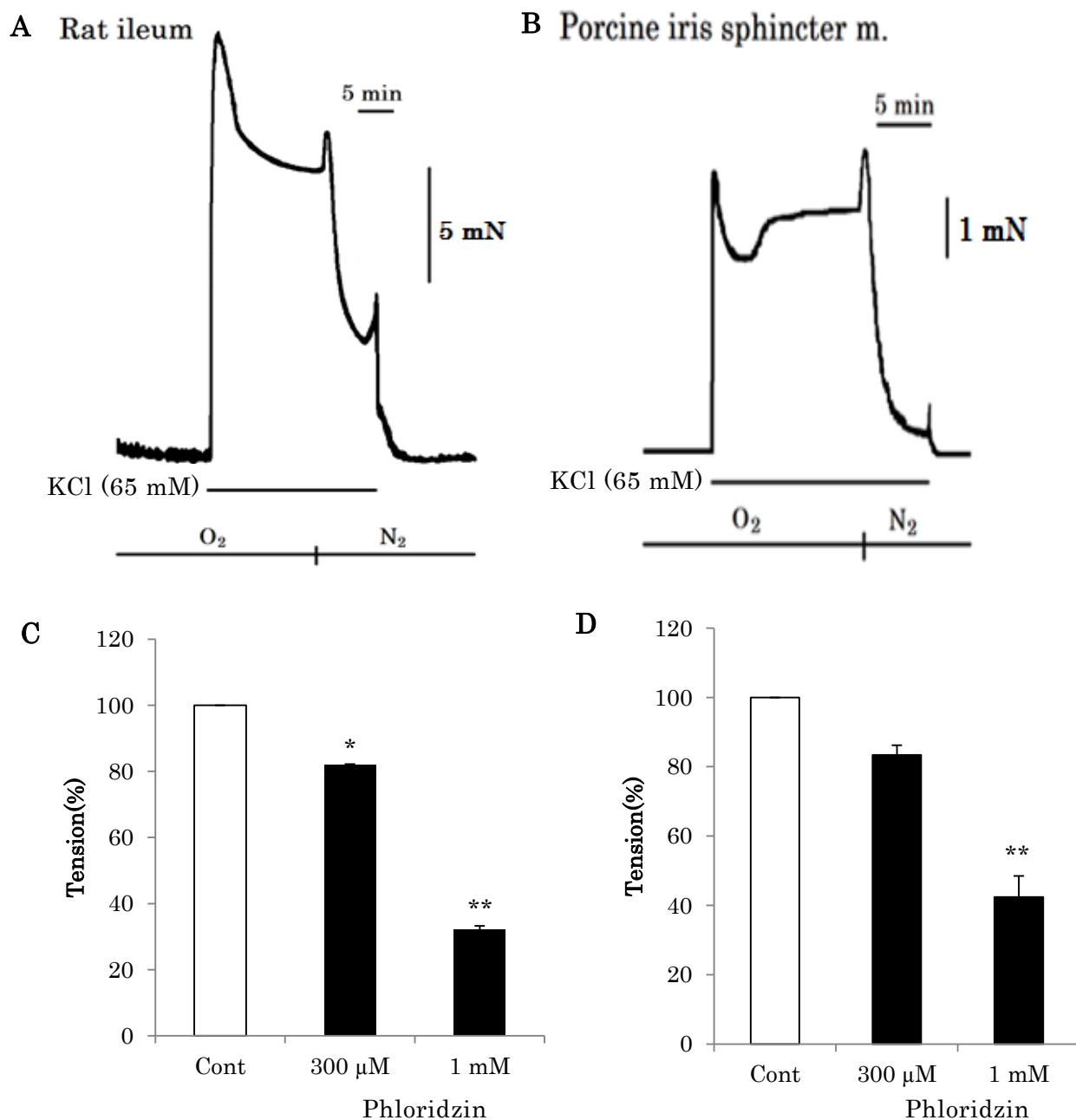


Fig. 3 回腸および虹彩括約筋の高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮に対する窒素通気および phloridzin の影響。

回腸平滑筋(A)および虹彩括約筋(B)の H-65K<sup>+</sup>誘発性収縮に対する窒素通気の影響。回腸平滑筋(C)および虹彩括約筋(D) の H-65K<sup>+</sup>誘発性収縮に対する phloridzin の影響。

Phloridzin 適用直前の張力を 100%とした。

\* :  $p < 0.05$ ; \*\* :  $p < 0.01$ , v.s. Control

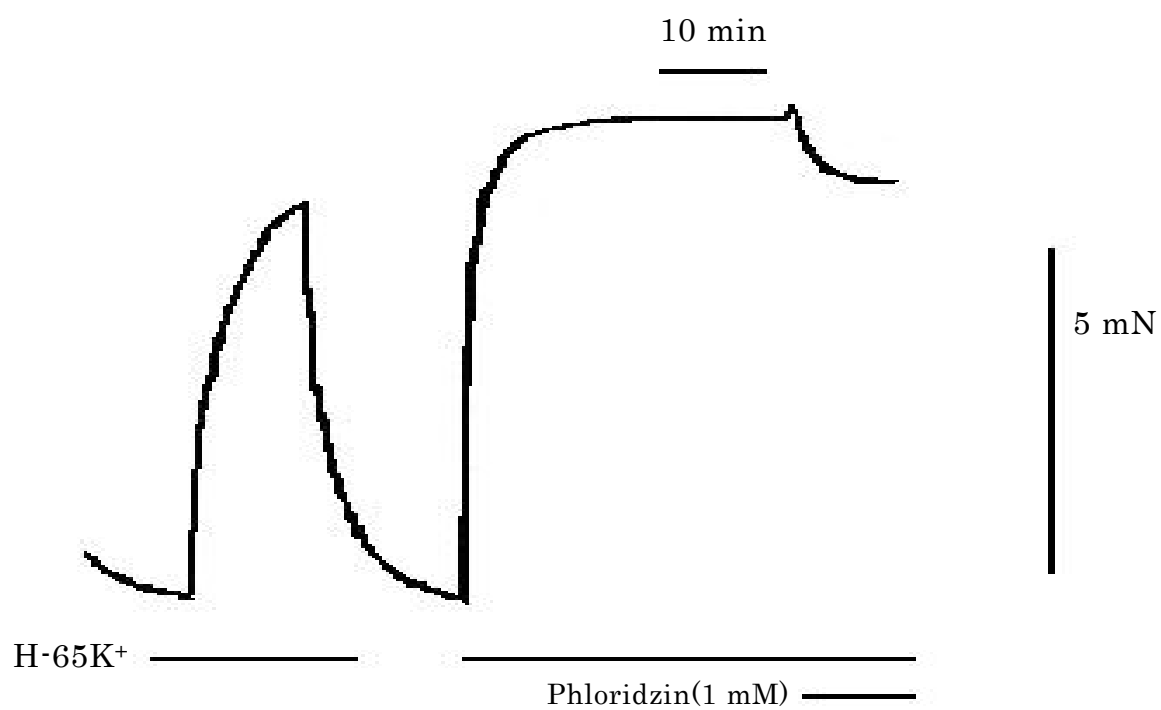


Fig. 4 大動脈平滑筋の H-65K<sup>+</sup>誘発性収縮に対する phloridzin の影響

Phloridzin の適用は、H-65K<sup>+</sup>誘発性収縮が安定した後に行った。

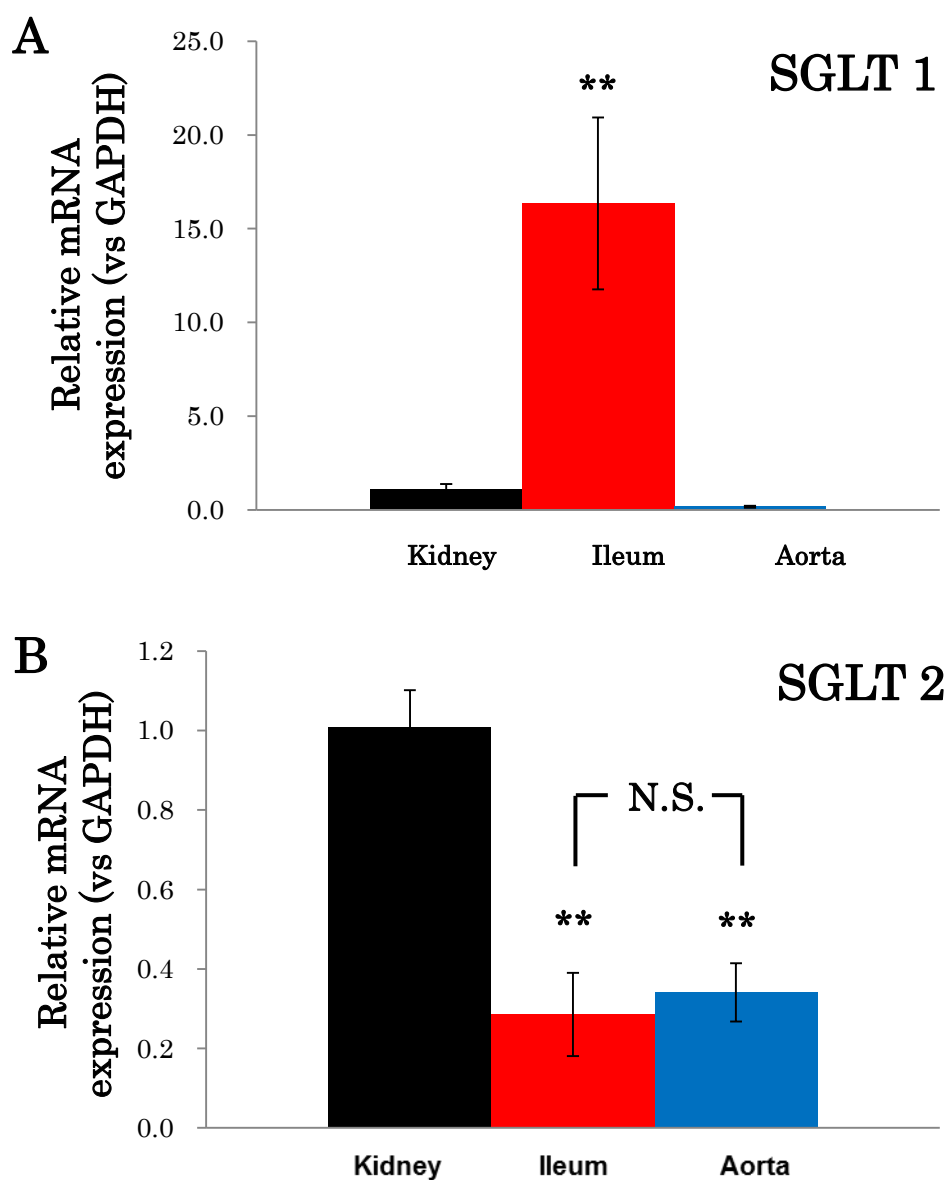


Fig. 5 腎臓、回腸および大動脈平滑筋における SGLT1 (A) および SGLT2 (B) の mRNA の発現量。

ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) の mRNA 量と SGLT1 (A) および SGLT2 (B) の mRNA 発現量の比。(N = 4)

\*\* :  $p < 0.01$ , v.s. kidney, N.S. : Not significant

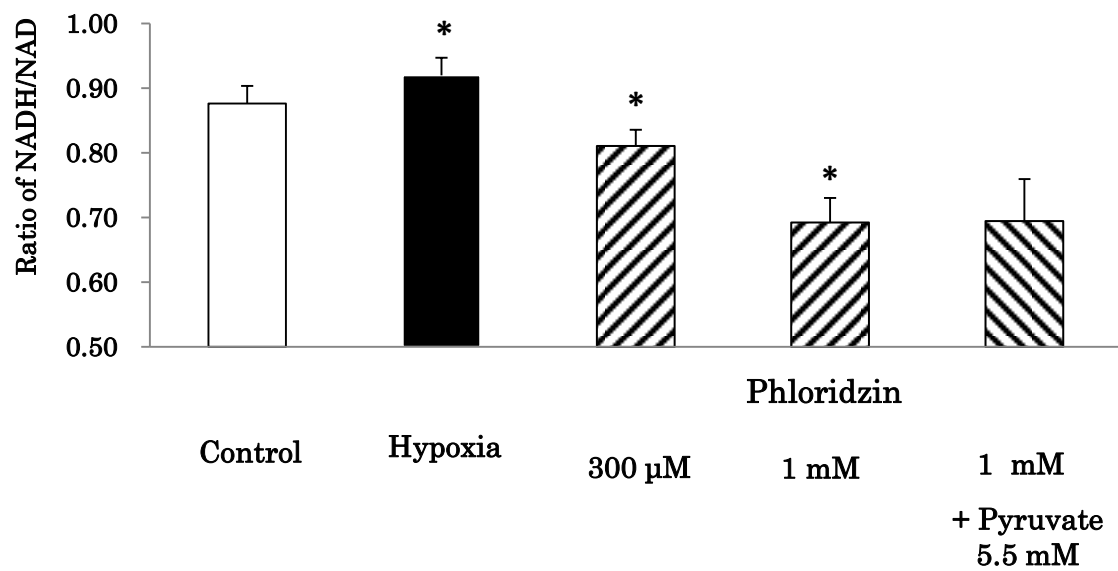


Fig. 6 回腸平滑筋における NADH/NAD 値に対する phloridzin の影響。

以下の条件でそれぞれ前処置したときの NADH/NAD の比 ; H-65K<sup>+</sup>、窒素通気、  
phloridzin(300 $\mu$ M および 1 mM)、phloridzin (1 mM) 処置後にピルビン酸。

\* :  $p < 0.05$ , v.s. Control

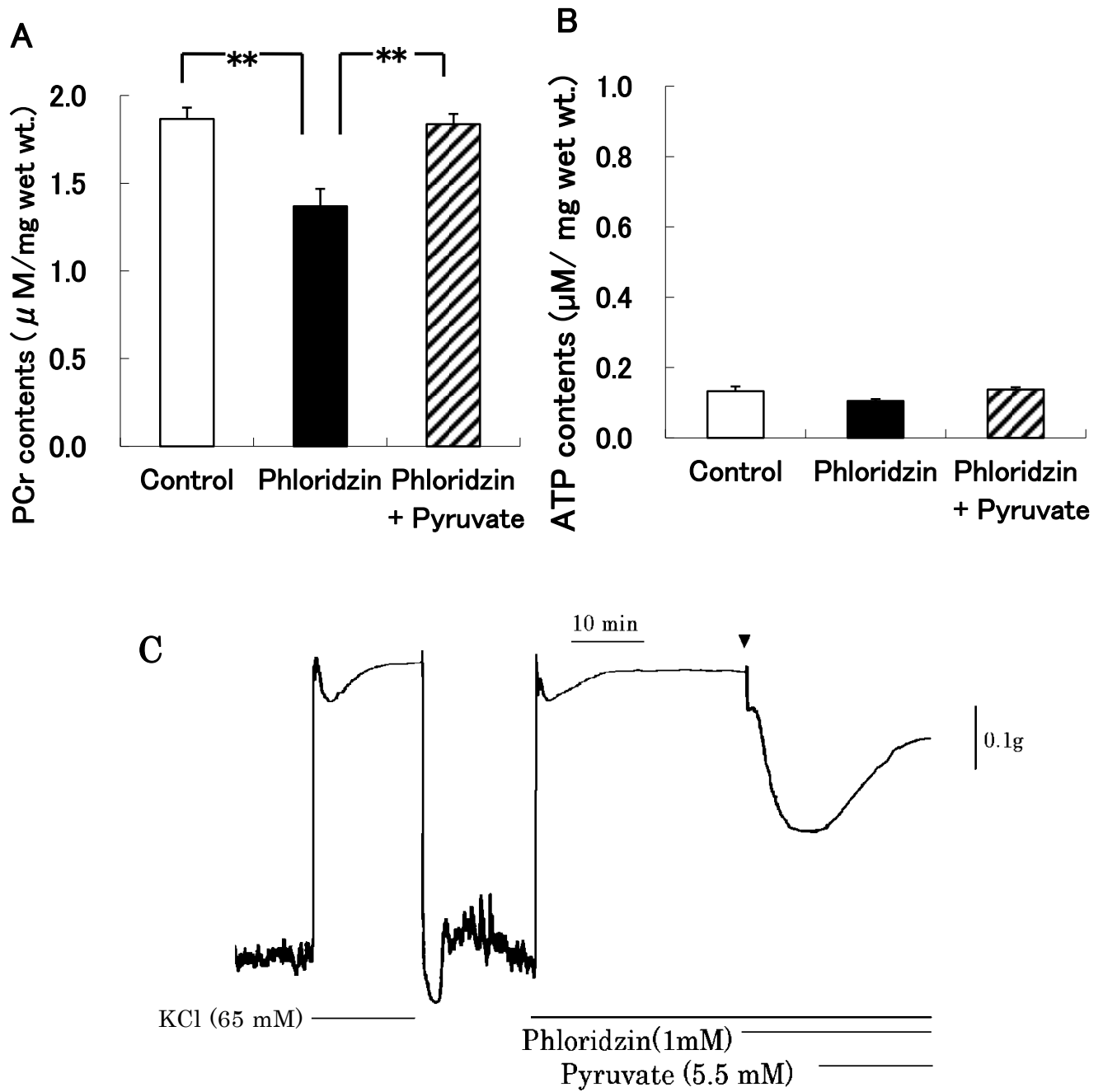


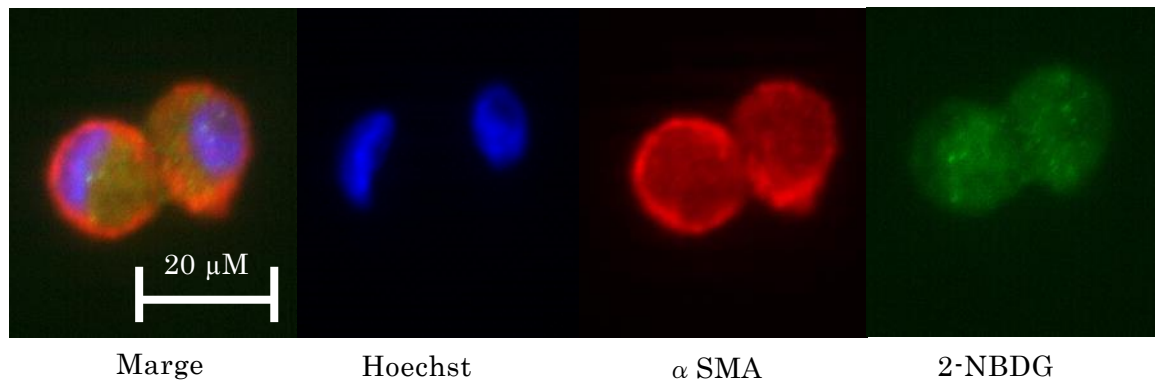
Fig. 7 ラット回腸平滑筋のホスホクレアチン (PCr) (A) および ATP (B) 含量に対する phloridzin の影響

実験に用いた試料は、全て各試薬を 20 分間処置した。処置後、凍結、抽出および測定を行った。C は、張力における phloridzin 誘発性弛緩に対する pyruvate 誘発性回復の典型図である。

\*\* :  $p < 0.01$ , v.s. phloridzin



A



B

### Rat ileum

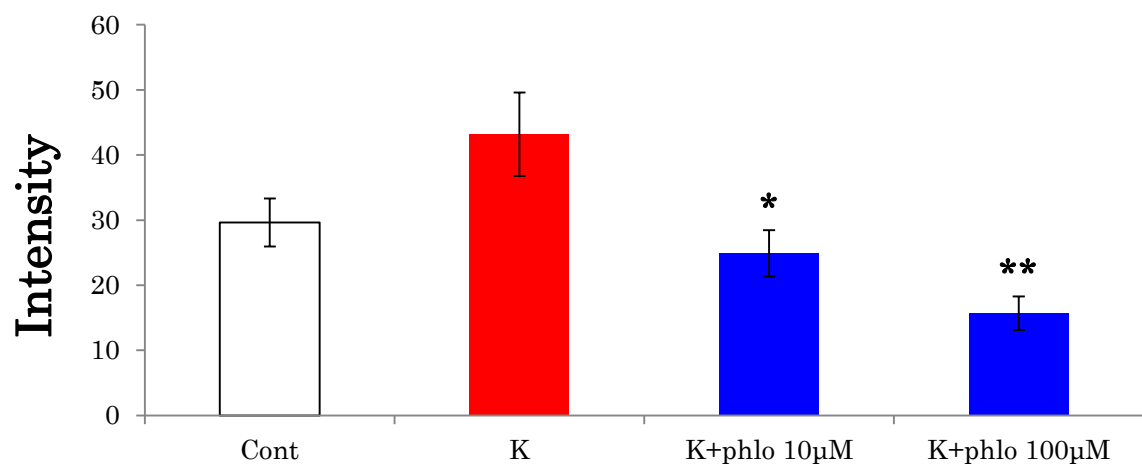


Fig. 8 ラット回腸平滑筋単離細胞における蛍光グルコース取込みに対する phloridzin (phlo) の影響

A) Hoechst; 核、 $\alpha$ SMA; 平滑筋アクチン、2-NBDG; 蛍光グルコース

B) 各種条件下における平滑筋細胞の 2-NBDG 蛍光強度

\* :  $p < 0.05$ , v.s. cont ; \*\* :  $p < 0.01$ , v.s. K (H-65K<sup>+</sup>)

## 2-3 考察

### 2-3-1 Phasic 筋における好氣的代謝への依存性および糖取込み

Phasic 筋であるラット回腸平滑筋およびブタ虹彩括約筋において窒素通気による低酸素状態は、高濃度  $K^+$ 誘発性収縮を顕著に抑制した (Fig. 3 A, B)。さらに、phloridzin は、ラット回腸平滑筋およびブタ虹彩括約筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮を有意に抑制した (Fig. 3 C, D)。一方、tonic 筋であるラット大動脈平滑筋の  $H\cdot 65K^+$ 誘発性収縮に対する phloridzin の適用では、その収縮の抑制効果は小さかった。これらの結果は、モルモット小腸 (Santi et al., 1963<sup>(46)</sup>) および盲腸紐 (Ishida and Shibata, 1982<sup>(13)</sup>; Ishida et al., 1984<sup>(14)</sup>) といった phasic 筋では、低酸素状態により収縮は顕著に抑制されるが、大動脈平滑筋は好氣的代謝にあまり依存していない (Nasu et al., 1991<sup>(37)</sup>) という報告と一致する。これらのことから、phasic 筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮は、tonic 筋のそれに比べ、好氣的代謝への依存性および phloridzin に対する感受性が高いことが示された。

### 2-3-2 回腸平滑筋の高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮反応におけるグルコース取込み機構

以下の結果に基づき、ラット回腸において phloridzin は、高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮を Na-glucose cotransporter 1 (SGLT1)を阻害することで抑制すると結論付けた。1) 回腸において、phloridzin は高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮を抑制したが、その抑制は大動脈のそれよりも、顕著に大きかった。2) 回腸において、SGLT1 mRNA 発現量は大動脈と比べ高かった。3) 高濃度 K<sup>+</sup>存在下において phloridzin は、ラット回腸 NADH/NAD 比を濃度依存性に低下させた。4)高濃度 K<sup>+</sup>存在下で phloridzin は回腸のホスホクレアチン (PCr) 含量を有意に減少した。5) phloridzin 適用は高濃度 K<sup>+</sup>誘発性 2-NBDG 取込みを抑制した。

他の細胞と同様に平滑筋においても解糖系、TCA 回路および電子伝達系の酵素が存在することが知られている。多くの研究者が平滑筋収縮の実験においてエネルギー基質としてグルコースを使用してきた。しかしながら、平滑筋収縮におけるグルコースの輸送体の役割について示す報告は少ない。

Tonic 筋であるマウス大動脈において GLUT4 阻害薬である ritonavir はグルコース取込みの阻害を介してノルアドレナリンおよびセロトニン誘発性収縮を抑制することが報告されてきた (Park et al., 2005<sup>(39)</sup>)。

一方、多くの平滑筋において等浸透圧性に置換した高濃度  $K^+$ 、 $Na^+$ 除去液は収縮に続く大きな弛緩を誘発する。その弛緩の可能性のある機序は、

- 1) 細胞膨潤によるもの、ウサギ大動脈 (Suzuki et al., 1981<sup>(55)</sup>)、モルモット気管 (Shimizu et al., 1984<sup>(47)</sup>) およびウシ気管 (Kaneda et al., 2012<sup>(21)</sup>) ;
- 2) 栄養液中の  $Na^+$ 除去を原因とするグルコース利用の抑制によるもの、モルモット膀胱 (Shimizu et al., 1984<sup>(47)</sup>) およびモルモット回腸 (Shimizu et al., 1991<sup>(50)</sup>) ;
- 3) 細胞膨潤とグルコース利用の抑制によるもの、モルモット胆嚢 (Shimizu et al., 1984<sup>(47)</sup>)、盲腸紐 (Urakawa et al., 1968<sup>(58)</sup>) およびブタ気管 (Kaneda et al., 2009<sup>(20)</sup>) と分類されてきた。このように回腸および盲腸紐のような phasic 筋の収縮反応において  $Na^+$ -グルコース共輸送体である SGLT の関与が示唆されてきた。さらに、モルモット盲腸紐において phloridzin はピルビン酸を含む高濃度  $K^+$ 液誘発性収縮に影響しなかつ

たが、グルコースを含む高濃度  $K^+$  誘発性収縮を抑制した (Suzuki et al., 1980<sup>(54)</sup>)。本研究においても、phloridzin はラット回腸平滑筋の高濃度  $K^+$  収縮を濃度依存的に抑制し、その抑制はピルビン酸により回復した。一方、phloridzin (1 mM) はラット大動脈の高濃度  $K^+$  収縮を抑制したが、その抑制は回腸のそれと比べ小さかった。これらの結果は、回腸において phloridzin による高濃度  $K^+$  誘発性収縮抑制は SGLT 阻害を介すること、および SGLT を介したグルコース取込み機構の収縮反応の維持への関連性は tonic 筋よりも phasic 筋で大きいことが示唆された。

回腸平滑筋は大動脈平滑筋に比べ、SGLT1 mRNA 発現量が有意に多かった。一方、SGLT2 mRNA 発現量は同程度であった。これらの結果は、ラット回腸において phloridzin による高濃度  $K^+$  誘発性収縮の抑制は SGLT1 の阻害に関連する可能性を示唆する。

大脳皮質において低酸素状態はグルコース代謝の過程で生成される還元型ニコチンアミドヌクレオチド (NADH) と酸化型ニコチンアミドヌクレオチド (NAD) との比 (NADH/ NAD 比) を増加させ、また溶媒中のグル

コース濃度を低下させた低グルコース状態は NADH/ NAD 比を減少した (Garofalo et al 1988<sup>(9)</sup>)。平滑筋においても低酸素状態は、NADH/NAD 比を増加することが報告されてきた (Nasu et al., 1982<sup>(36)</sup>)。これらのデータは、NADH/ NAD 比が解糖系の活性を表す指標となることを示す。

回腸平滑筋において高濃度 K<sup>+</sup>存在下で phloridzin は、NADH/NAD 比を濃度依存性に抑制した。しかしながら、ピルビン酸の追加添加はこの抑制に影響しなかった。このことから、回腸平滑筋における高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮に対する phloridzin の抑制は、グルコース取込み阻害を介した解糖系活性の抑制であることがさらに示唆された。

平滑筋におけるエネルギー代謝は、解糖系、TCA 回路、電子伝達系より ATP を生成しクレアチンをリン酸化しホスホクレアチン(PCr)として貯蔵する。

平滑筋の収縮において必要とされる ATP は、貯蔵された PCr はクレアチンキナーゼにより ADP がリン酸化され ATP になることにより供給される。

本研究において、phloridzin は高濃度 K<sup>+</sup>存在下でラット回腸平滑筋の PCr 含量を有意に低下させ、その低下はピルビン酸の追加適用により回復した。

さらに、ピルビン酸添加は phloridzin による収縮抑制を回復した。これらの結果は phloridzin による高濃度  $K^+$ 誘発性収縮の抑制は、解糖系活性の抑制によることをより強く示唆する。

SGLT1 あるいは SGLT2 を強発現させた COS-7 細胞 (Blodgett et al., 2011<sup>(3)</sup>) および HEK293 細胞 (Kanwai et al., 2012<sup>(22)</sup>) において、蛍光基質である 2-NBDG は、 $Na^+$ 依存性に取り込みが増加し、その増加は phloridzin によって抑制された。本研究において phloridzin は高濃度  $K^+$ 誘発性 2-NBDG 取込みを濃度依存性に抑制した。これらの結果は、phloridzin による高濃度  $K^+$ 誘発性収縮の抑制は SGLT を介したグルコース取込みの阻害が関与している可能性を示唆する。

Sotagliflozin のような SGLT 1 および 2 阻害薬による治験において、2 型糖尿病患者もしくは健常者における胃腸障害に対する影響の報告は限られている (Zambrowicz et al., 2013<sup>(62)</sup>, 2015<sup>(63)</sup>; Zheng and Sarr, 2013<sup>(64)</sup>)。

本研究において、phloridzin は SGLT1 阻害により高濃度  $K^+$ 誘発性収縮を抑制した。このように、本研究は sotagliflozin のような SGLT 1 および 2 阻

害剤による胃腸障害に SGLT1 阻害により胃腸運動の不活化が関与するかも知れないという可能性を示唆する。

以上を要するに、ラット回腸平滑筋における phloridzin による高濃度  $K^+$  誘発性収縮抑制は、SGLT1 を介したグルコース取込み阻害によることが示唆された。また、phloridzin は tonic 筋である大動脈よりも phasic 筋である回腸において高濃度  $K^+$  収縮をより強く抑制し、その差異は SGLT1 の発現によることが示された。



### 第 3 章 Tonic 筋におけるエネルギー代謝と収縮制御

はじめに

第 2 章より phasic 筋収縮は好氣的代謝への依存度が高く、回腸平滑筋において SGLT1 を介してのグルコース取込みが関与することが示唆された。

一方、第 1 章でも述べたが、tonic 筋収縮は低酸素状態による影響が少ない。

さらに、tonic 筋であるマウス大動脈平滑筋に GLUT4 が発現しており、インスリン刺激および受容体作動薬によりグルコース取込みが増加することが報告されている (Park et al., 2005<sup>(39)</sup>)。しかしながら、血管平滑筋におけるグルコースの取込み経路は作動薬あるいは実験条件により異なっており (Park et al., 2005<sup>(39)</sup>; Pyla et al., 2015<sup>(42)</sup>)、未だ明らかになったとは言えない。

本章では、ラット大動脈平滑筋の高濃度  $K^+$  収縮に対する低酸素条件の影響、PCR 法による GLUT4 発現および各種条件下での蛍光グルコース (2-NBDG) 取込み量の変化および GLUT4 トランスロケーションについて調べたものである。

### 3-1 材料方法

#### 3-1-1 材料

雄性ウィスターラット（250-300 g）はペントバルビタール酸ナトリウム（50 mg/kg, i.p.）により麻酔後、放血死した後、直ちに大動脈を摘出した。

ラットを用いた研究は、日本獣医生命科学大学における実験動物委員会により認可を受けて行われた（26S-44, 27K-23, 28K-10）。

#### 3-1-2 平滑筋摘出および収縮張力測定

第2章に準じて、ラット大動脈平滑筋標本作製した。

#### 3-1-3 RT-PCR 解析

第2章に準じて mRNA 抽出を行った。抽出された mRNA は、RT reagent Kit（Takara）を用いて逆転写反応 42°C 5 分、95°C 10 秒、95°C 5 秒、61°C 34 秒、40cycles で PCR 反応を行い、PCR 産物を 100 V、30 分間行い、2%アガロースのゲルを用いて泳動を行い撮影した。DNA の発色試薬に

は、ミドリグリーンダイレクト（1:10, NIPPON Genetics Co, Ltd., Tokyo, Japan）を用いた。使用したプライマーと期待される産物の大きさは表 3 に示した。

#### 3-1-4 単離細胞の作製

摘出された胸部大動脈は内腔を丁寧にこすり、内皮細胞を除去し、コラゲナーゼ（1.0 mg/ml）（Wako Pure chemical）、パパイン（0.2 mg/ml）（Wako Pure chemical）およびエラスターゼ（3.3 unit/ml）（Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Germany）により 30 分処理した後、外膜を除去した。外膜を除去された大動脈平滑筋は、コラゲナーゼ（1.0 mg/ml）、パパインおよびエラスターゼ（12.0 unit/ml）（Merck Millipore Corporation）の処理により単離した。単離された細胞は、D-MEM（Wako Pure chemical）中で  $1.0 \times 10^6$  cells/ml の密度に調整された。細胞懸濁液 300  $\mu$ l をカバーガラスを入れたマイクロプレート内に入れ、5 % CO<sub>2</sub>、37℃で 1 時間培養した。

### 3-1-5 2-NBDG 蛍光強度解析

第 2 章に準じて 2-NBDG 蛍光強度を解析した。

### 3-1-6 免疫染色による GLUT4 トランスロケーション解析

2-NBDG 以外の試薬は、第 2 章の 2-NBDG 蛍光強度解析と同様であり、それと同様の検出法を用いて行った。抗ラット GLUT4 抗体は、細胞膜外側に露出する部位の合成ペプチドを、ウサギを免疫動物として、作製した。また、一次抗体は膜上 GLUT4 に対して反応するように界面活性剤のような抗体の透過性を上げる処置は行わず、25℃で 1 時間処置した。二次抗体は、抗ウサギ IgG 抗体 (Abcam plc, Tokyo, Japan) を用いて 4℃で一昼夜処置した。

### 3-1-7 使用薬物

好氣的代謝の阻害薬として NaCN (Wako Pure chemical, Osaka, Japan) を用い、GLUT4 のインスリン依存性経路である PI3K/Akt 経路の刺激には

insulin from bovine pancreas (Sigma–Aldrich, St. Louis, Mo, USA.) を用いた。

2-NBDG 取込解析および細胞膜上 GLUT4 量解析において使用した阻害薬およびその濃度は、Akt 1/2 inhibitor, 1  $\mu$ M (Sigma–Aldrich, St. Louis, Mo, USA.)、LY294002, 10  $\mu$ M (Cell Signaling Technology Japan, Tokyo, Japan.) および Compound C, 40  $\mu$ M (Abcam Biochem., Science Park Cambridge, UK.) である。

### 3-1-8 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、有意差は Student の  $t$  検定を用いた。

$P < 0.05$  および  $P < 0.01$  を有意水準とした。

Primer	Nucleotide sequence 5'→ 3'	Product size
GAPDH F	TTTCCAGTATGTTGCGGATG	
GAPDH R	TCAGTCATTCTCATCTGGCC	452
GLUT4 F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	
GLUT4 R	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	220

表 3 リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー

## 3-2 実験成績

### 3-2-1 ラット大動脈平滑筋の高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮に対する NaCN の影響

ラット大動脈平滑筋に対して高浸透圧性の 65mM KCl (H-65K<sup>+</sup>) 適用は、持続的な収縮を示した (Fig. 9 A)。ラット大動脈平滑筋において NaCN による低酸素状態は H-65K<sup>+</sup>誘発性収縮を濃度依存性に抑制し (Fig. 9 B)、1 mM で  $74.5 \pm 3.1\%$  まで抑制した。

### 3-2-2 ラット大動脈平滑筋における GLUT4 mRNA 発現

RT-PCR 分析によりラット大動脈平滑筋における GLUT4 mRNA 発現を確認した。陽性対照は、GAPDH を用いた。ラット大動脈平滑筋において GLUT4 mRNA は発現していた (Fig. 10)。

### 3-2-3 ラット大動脈平滑筋単離細胞における蛍光グルコース取込み

作製された単離細胞は抗  $\alpha$ SMA および抗核抗体により免疫染色され、両

陽性の細胞を平滑筋細胞として蛍光グルコース(2-NBDG)取込について検討した(Fig. 11)。ラット大動脈平滑筋単離細胞における H-65K<sup>+</sup>単独および NaCN 300  $\mu$ M 同時適用は、2-NBDG 取込みを変化させなかった。インスリン (100 および 300 nM) の適用は、濃度依存性かつ有意に 2-NBDG 取込みを増加させた (Fig. 11)。さらに、H-65K<sup>+</sup>および NaCN (1 mM) 同時処置においても 2-NBDG 取込みを有意に増加した (Fig. 11 B)。

### 3-2-4 ラット大動脈平滑筋単離細胞のグルコース取込み増加に対する各種阻害薬の影響

インスリン 300 nM による 2-NBDG 取込みの増加は、Akt 1/2 inhibitor (Akt 阻害薬) および LY294002 (PI3K) 阻害薬により有意に抑制されたが、compound C (AMPK 阻害薬) は影響しなかった (Fig. 12 A)。一方、H-65K<sup>+</sup>および NaCN 1 mM による 2-NBDG 取り込みの増加は、compound C により有意に抑制され、Akt 1/2 inhibitor および LY294002 には影響されなかった (Fig. 12 B)。



### 3-2-5 ラット大動脈平滑筋単離細胞における GLUT4 トランスロケーションに対する NaCN の影響

作製された単離細胞は  $\alpha$ SMA および hoechst により免疫染色され、両陽性の細胞を平滑筋細胞として細胞膜上 GLUT4 について検討した(Fig. 13 A)。ラット大動脈平滑筋単離細胞における H-65K<sup>+</sup>単独適用は、細胞膜上 GLUT4 の量を変化させなかった。一方、H-65K<sup>+</sup>、NaCN 1 mM 同時適用およびインスリン 300 nM 適用は、細胞膜上 GLUT4 を有意に増加させた (Fig. 13 B)。

### 3-2-6 ラット大動脈平滑筋単離細胞における GLUT4 トランスロケーションに対する各種阻害薬の影響

インスリン 300 nM による細胞膜上 GLUT4 の増加は、Akt 1/2 inhibitor および LY294002 により有意に抑制された (Fig. 14 A)。Compound C 処置は、インスリン誘発性細胞膜上 GLUT4 の増加を抑制したが、その影響は有

意ではなかった。一方、H-65K<sup>+</sup>および NaCN 1 mM 同時適用による細胞膜上 GLUT4 の増加は、Akt 1/2 inhibitor、LY294002 および compound C により有意に抑制された (Fig. 14 B)。

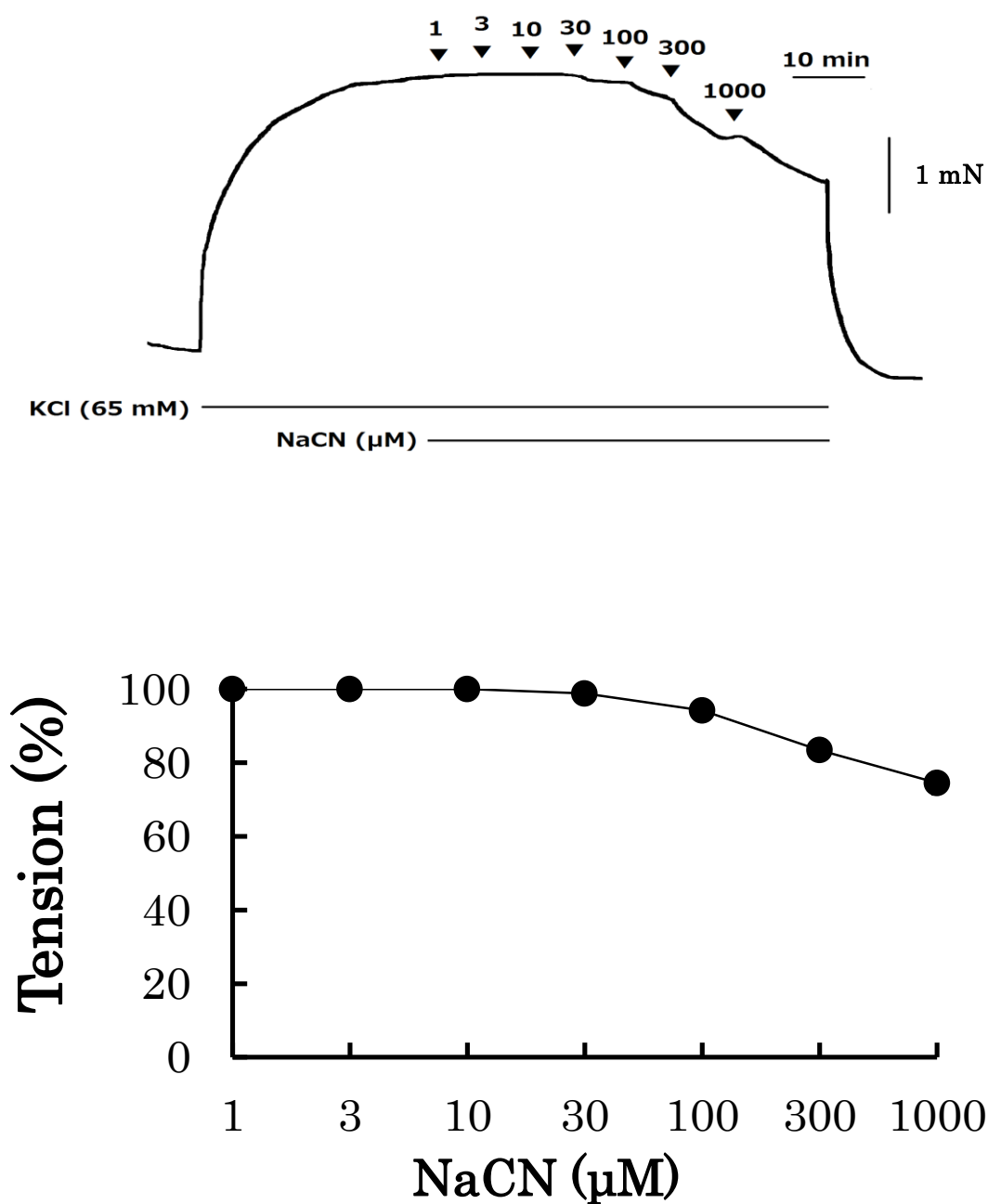


Fig. 9 ラット大動脈平滑筋に対する NaCN の影響

ラット大動脈平滑筋の  $\text{H-65K}^+$ 誘発性収縮に対する NaCN 累積適用の典型図 (A) およびその数値化したグラフ (B)。NaCN 適用直前の張力を 100% とした。

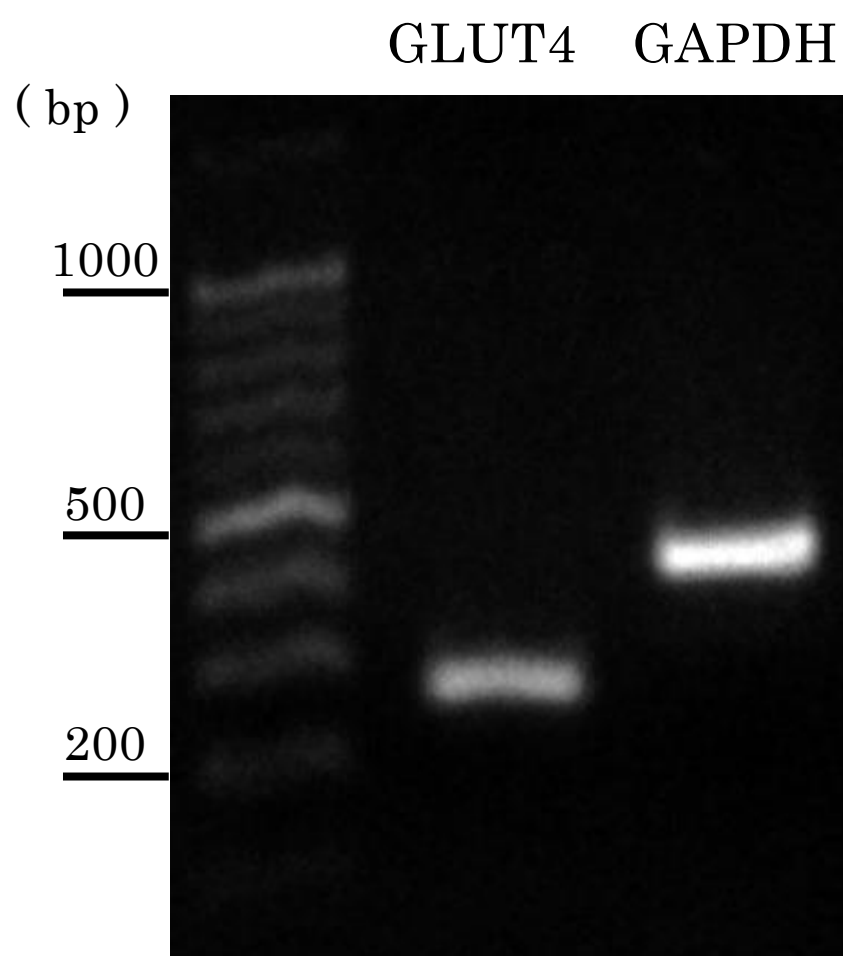
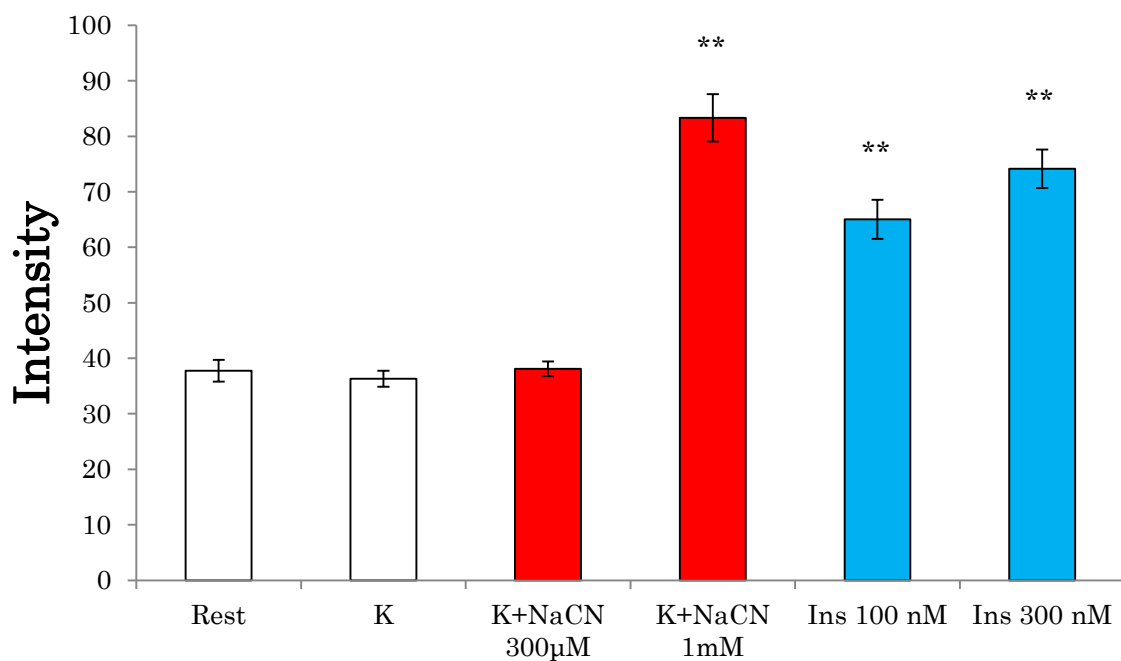


Fig. 10 ラット大動脈平滑筋における GLUT4 mRNA 発現



**Fig. 11** ラット大動脈平滑筋単離細胞における各種条件下での 2-NBDG 取り込みの変化

ラット大動脈平滑筋単離細胞における H-65K<sup>+</sup>単独 (K)、NaCN 同時処置もしくはインスリン (Ins; 100, 300 nM) 処置による蛍光グルコース (2-NBDG) 取り込み量の変化。

\*\* :  $p < 0.01$ , v.s. Rest (無処置群)

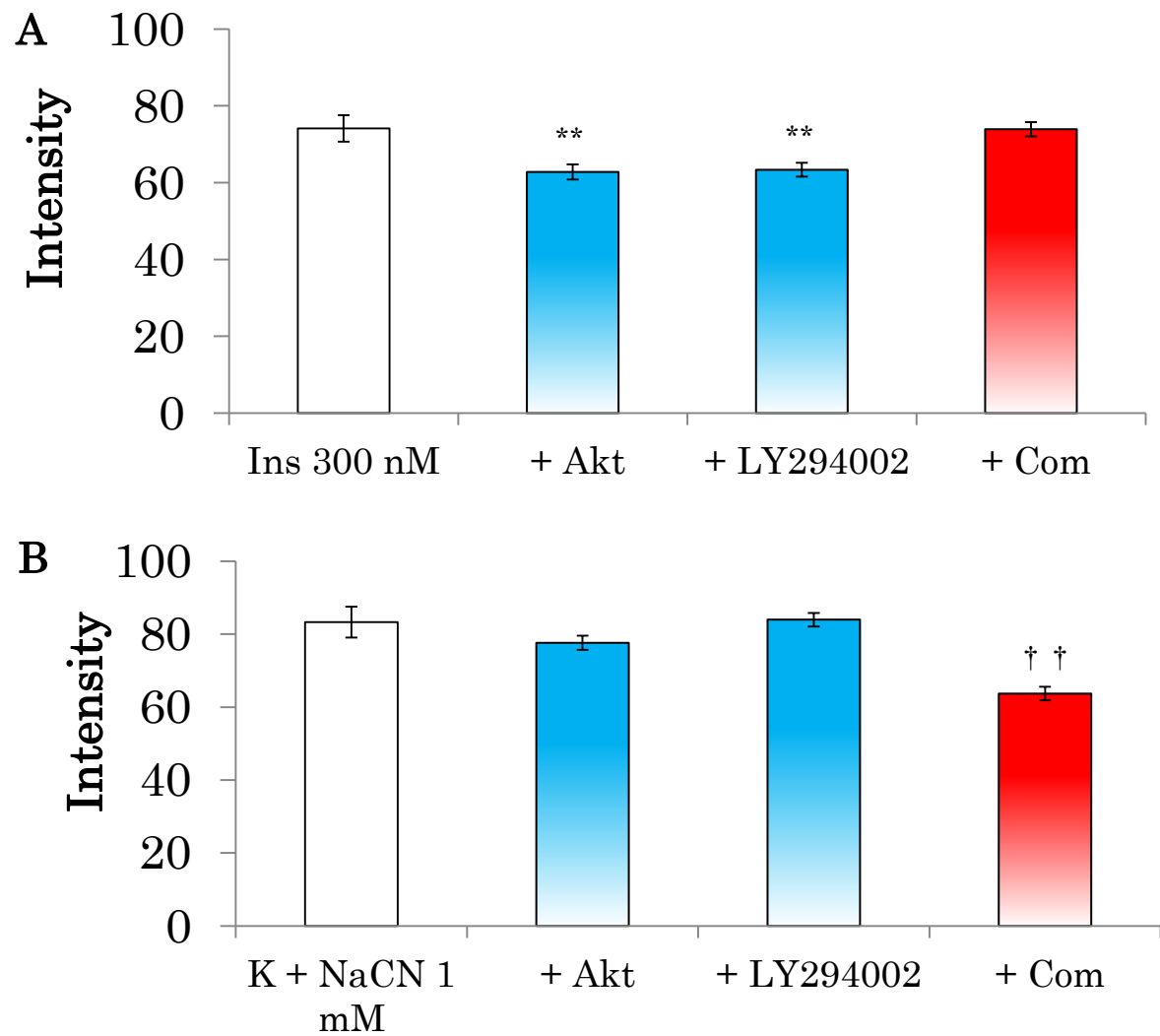


Fig. 12 ラット大動脈平滑筋単離細胞の 2-NBDG 取り込み増加に対する各種阻害薬の影響

各種阻害薬 (Akt 1/2 inhibitor, 1  $\mu$ M; LY294002, 10  $\mu$ M; Compound C, 40  $\mu$ M) を 20 分間前処置した後、インスリンもしくは H-65K<sup>+</sup>、NaCN (1 mM) 処置した。

\*\* :  $p < 0.01$  v.s. Ins 300 nM    † † :  $p < 0.01$  v.s. K + NaCN (1 mM)

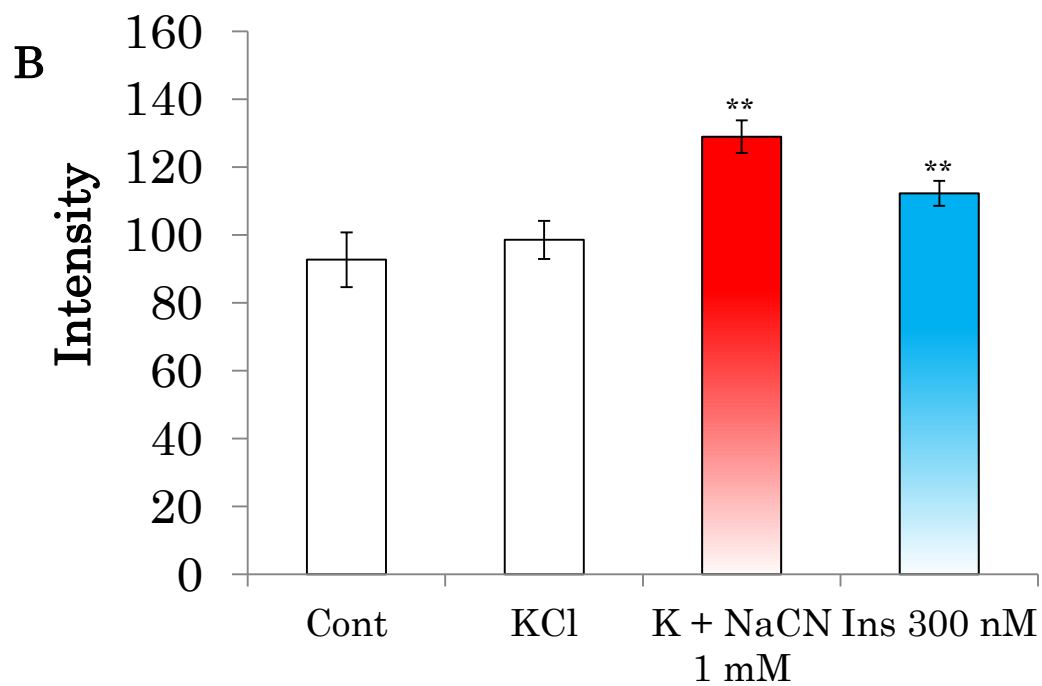
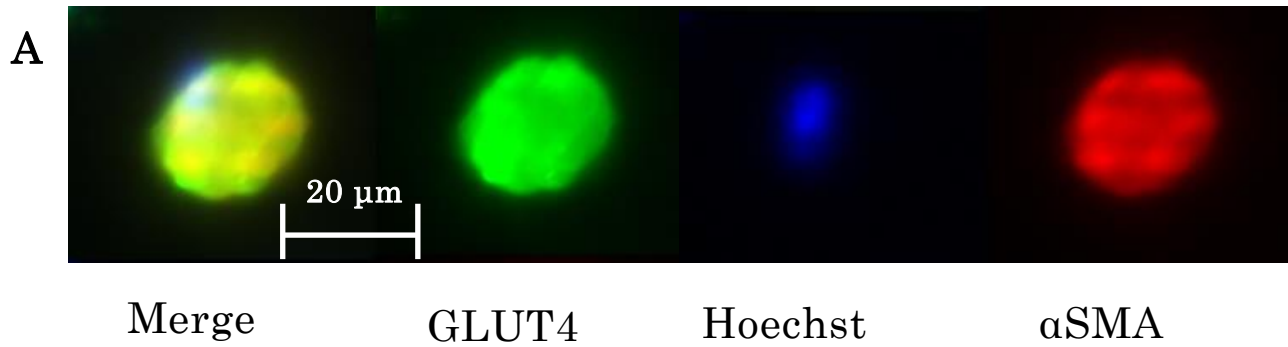


Fig. 13 ラット大動脈平滑筋単離細胞における細胞膜上 GLUT4 の変化

A) Hoechst; 核、αSMA; 平滑筋アクチン、GLU 細胞膜上 GLUT4

B) 各種条件下における平滑筋細胞の細胞膜上 GLUT4 蛍光強度

α SMA および hoechst33342 両陽性の細胞を平滑筋細胞とし、GLUT4 に対する抗体による蛍光の強度を測定した。

\*\* :  $p < 0.01$  v.s. Cont

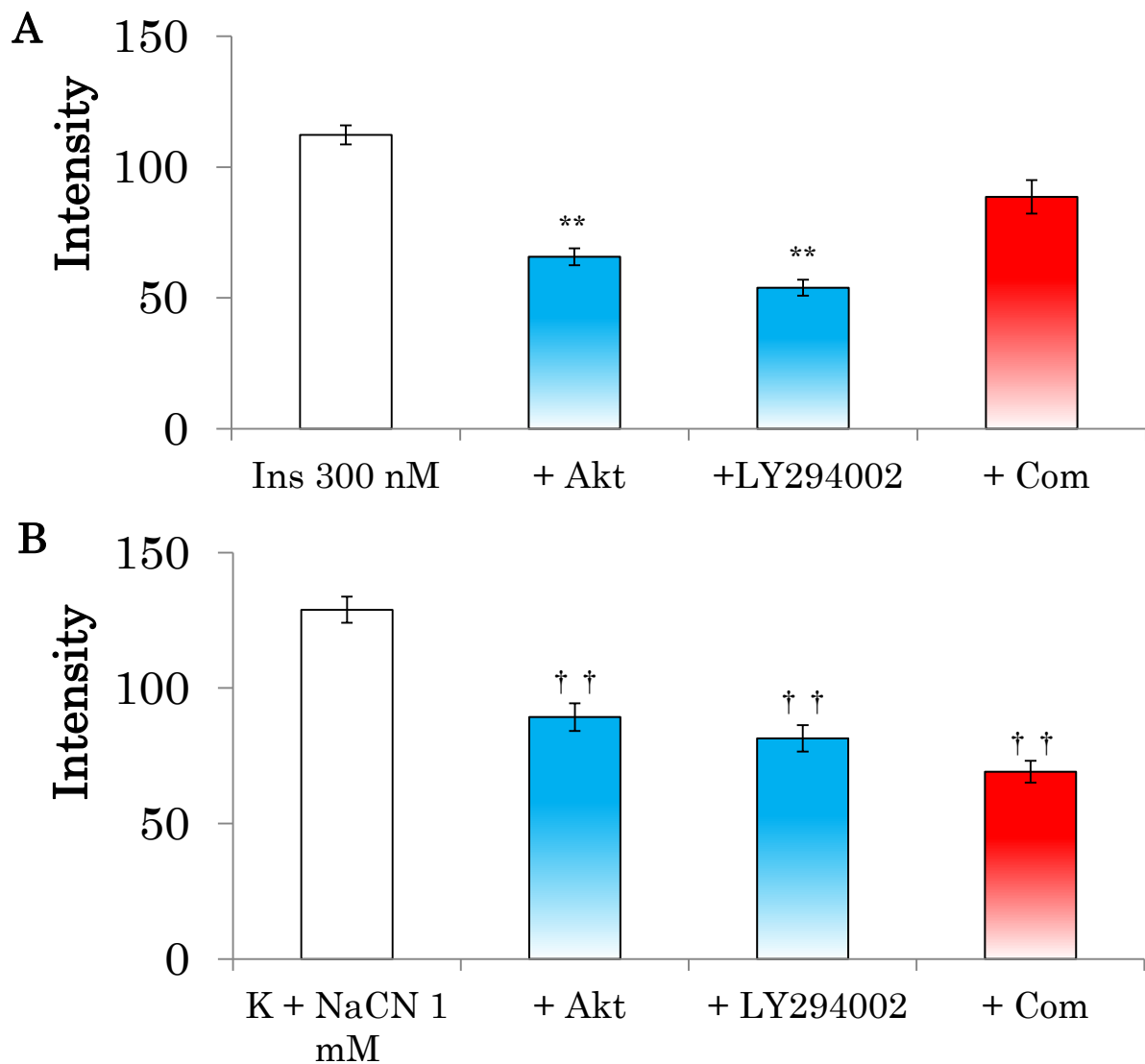


Fig. 14 ラット大動脈平滑筋単離細胞の細胞膜上 GLUT4 の増加に対する各種阻害薬の影響

各種阻害薬 (Akt 1/2 inhibitor, 1  $\mu$ M; LY294002, 10  $\mu$ M; Compound C, 40  $\mu$ M) を 20 分間前処置した後、インスリンもしくは H-65K<sup>+</sup>、NaCN (1 mM) 処置した。

\*\* :  $p < 0.01$  v.s. Ins 300 nM    † † :  $p < 0.01$  v.s. K + NaCN (1 mM)



### 3-3 考察

#### 3-3-1 Tonic 筋収縮における好氣的代謝への依存性およびグルコース取り込み機構

第 2 章では、tonic 筋であるラット大動脈平滑筋の高濃度  $K^+$  誘発性収縮に対する窒素通気下の低酸素状態および phloridzin による抑制は、phasic 筋のそれと比べ小さかった。本章の結果においても、ラット大動脈平滑筋の高濃度  $K^+$  誘発性収縮に対する NaCN 適用による好氣的代謝抑制の影響は小さかった。

大動脈平滑筋には、グルコース輸送体 4 型 (GLUT4) が存在することが報告されてきた (Park et al., 2005<sup>(39)</sup>)。本研究においても、RT-PCR 分析は、ラット大動脈平滑筋に GLUT4 が発現していることを示した。GLUT4 は、第 1 章で述べた通り、インスリン感受性グルコース輸送体であり、骨格筋においてインスリン刺激以外に収縮反応や低酸素状態といった細胞内エネルギーの枯渇により活性化することが知られている (Zorzano et al., 2005<sup>(65)</sup>)。

一方、大動脈平滑筋において低酸素状態は収縮を抑制するが、外液グルコース濃度の増加は収縮を回復する (Namm and Zucker, 1973<sup>(35)</sup>) ことから、低酸素状態ではグルコース取込み機構が活性化される可能性がある。しかし、血管平滑筋において低酸素状態におけるグルコース取込み機構の活性化について調べた報告は、ほとんどない。本研究は、血管平滑筋における低酸素時のグルコース取込み機構とそのシグナル経路をはじめて明らかにした。

### 3-3-2 大動脈平滑筋の高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮反応におけるグルコース取込み機構

大動脈平滑筋には、GLUT1 および GLUT4 が発現していることが報告されている (Miller et al., 2007<sup>(30)</sup>)。本研究においてもラット大動脈平滑筋には GLUT4 の mRNA が発現していた。GLUT1 は、ほぼ全ての細胞に存在し、細胞の恒常性の維持に必要なグルコースを取込むと考えられている (Mueckler et al., 1997<sup>(32)</sup>)。一方、GLUT4 は骨格筋や脂肪細胞に多く存在しておりインスリン受容体にインスリンが作用することにより、Akt およ

び PI3K といったシグナル経路を活性化することにより、細胞内小胞に存在する GLUT4 を膜上へとトランスロケーションさせることによりグルコースを取込む (Virkamaki et al., 1999<sup>(59)</sup>; Rowland et al., 2011<sup>(44)</sup>)。本研究においても、インスリンの適用は、大動脈平滑筋において濃度依存性に蛍光グルコースである 2-NBDG 取込みを有意に増加した。さらに、その増加は AMPK 阻害薬および PI3K 阻害薬である、Akt 1/2 inhibitor および LY294002 により抑制されたが、AMPK 阻害薬である compound C では抑制されなかった。また、インスリンは、大動脈平滑筋において、トランスロケーションにより細胞膜上の GLUT4 を増加させた。その増加は Akt 1/2 inhibitor および LY294002 により抑制されたが、compound C では抑制されなかった。これらの結果は、ラット大動脈平滑筋において GLUT4 が存在し、骨格筋および脂肪細胞と同様に PI3K/Akt 経路を介してインスリン依存性にグルコースを取込み、その経路は AMPK 経路とは独立していることを示唆する。このことは、Breen ら (2008<sup>(4)</sup>) の血管平滑筋における GLUT4 トランスロケーションシグナルについての報告と一致する。

本研究において、ラット大動脈平滑筋に対する高濃度  $K^+$  の適用は、2-NBDG 取込および細胞膜上 GLUT4 量を変化させなかった。骨格筋の収縮反応では、AMPK のリン酸化により GLUT4 がトランスロケーションすることが報告されている (Jessen and Goodyear, 1985<sup>(17)</sup>)。骨格筋を使用した研究では、腓腹筋および長趾伸筋といった部位が使用されることが多い。これらは速筋に分類されており、速筋は解糖系の活性が高いことが知られている。さらに、骨格筋に対する高頻度反復刺激は、グリコーゲン含量に影響しない (Spriet et al., 1990<sup>(53)</sup>) という報告がある。これらのことから、骨格筋のような大きな収縮張力を発生させるためのエネルギー源として外因性にグルコースを取込む必要があり、AMPK 依存性経路の感受性が高い可能性が考えられる。一方、ブタ頸動脈において、外液グルコース除去は高濃度  $K^+$  誘発性収縮への影響はわずかであり内因性のグリコーゲンが収縮維持に大きく関与することが示されてきた (Lynch et al., 1989<sup>(29)</sup>)。また、ヒトサフェナ静脈においてグリコーゲンが AMPK の活性化を抑制することが報告されている (Pyla et al., 2015<sup>(42)</sup>)。これらの知見は、血管平滑筋の収縮

が、グリコーゲンなどの内因性エネルギー基質を優先的に利用しており、エネルギー基質が十分存在する時はグルコース取込みが活性化されないことを示唆している。

高濃度  $K^+$  および NaCN 処置は、大動脈平滑筋において 2-NBDG 取込みを有意に増加させた。さらに、高濃度  $K^+$  および NaCN 処置による 2-NBDG 取込みの増加は、PI3K/Akt 経路の阻害薬では抑制されず、AMPK 阻害薬により抑制された。一方、tonic 筋であるウシ気管平滑筋において、外液グルコース除去は、高濃度  $K^+$  誘発性収縮にほとんど影響しなかったが、グルコース除去+低酸素状態では、グリコーゲン含量の低下を伴って高濃度  $K^+$  誘発性収縮は顕著に低下していた (Kaneda et al., 2012<sup>(21)</sup>)。これらの結果は、ラット大動脈平滑筋において低酸素状態は、筋収縮反応を維持するためのエネルギー基質を消費させ、その結果 AMPK 経路を介したグルコース取込みの活性化が刺激される可能性が示唆された。一方、高濃度  $K^+$  および NaCN の同時処置は、細胞膜上 GLUT4 を有意に増加させたが、その増加は PI3K/Akt 経路阻害薬および AMPK 阻害薬により抑制された。しかしなが

ら、PI3K/Akt 経路阻害薬は、高濃度 K<sup>+</sup>存在下で NaCN 誘発性 2-NBDG 取込増加を抑制しなかった。最近、GLUT4 に蛍光標識したラット心筋由来である H9c2 細胞において、AMPK の活性化に対して GLUT4 とは異なる輸送体を介したグルコース取込み経路が示された (Lee et al., 2014<sup>(27)</sup>)。また、ヒト肝癌由来である HepG2 細胞において AMPK が GLUT1 を介してグルコース取込を増加することを示唆する報告がある (Wu et al., 2014<sup>(61)</sup>)。すなわち、高濃度 K<sup>+</sup>および NaCN 処置に対する PI3K/Akt 経路阻害薬により GLUT4 トランスロケーションは抑制され、AMPK の活性化がおこり他の輸送体によるグルコース取込が代償した可能性が示唆される。これらより、ラット大動脈平滑筋の低酸素状態では、AMPK 経路を介した GLUT4 以外の輸送体によるグルコース取込の関与が強く示唆された。このように AMPK 刺激の強さによりグルコースの取込み経路が変化するという報告はなく、血管平滑筋特有の調節機構である可能性を示唆する。

以上を要約すると、ラット大動脈平滑筋では、インスリン依存性である PI3K/Akt 経路もしくは AMPK 経路を介した GLUT4 のトランスロケーシ

オンによるグルコース取込みが存在する。しかしながら、ラット大動脈平滑筋には、それ以外の取込み機構も存在しており、NaCN (300  $\mu$ M) 存在下もしくは非存在下での高濃度  $K^+$ 誘発性収縮反応では内因性のエネルギー基質、NaCN (1 mM) 単独処置による低酸素状態では GLUT4 以外の輸送機構、高濃度  $K^+$ および NaCN (1 mM) 同時処置によるさらなるエネルギーの枯渇では AMPK 経路を介した GLUT4 のトランスロケーションが重要な役割を担っている可能性が示唆された。

## 第4章 総合考察

### 4-1 Phasic 筋および tonic 筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮における SGLT の関連性

平滑筋の収縮には高濃度  $K^+$ 誘発性と受容体作動性の収縮がある。受容体作動性収縮は、緒言で述べた  $Ca^{2+}$ 感受性の増加を伴う。 $Ca^{2+}$ 感受性増加経路は、Rho キナーゼ、プロテインキナーゼ C あるいは MAP キナーゼなどの酵素による様々なタンパクのリン酸化を誘発し、ATP を消費する。これらのキナーゼの関与は、受容体作動薬の種類あるいは組織差があることが考えられている。さらに、平滑筋は組織により自律神経支配が異なり、血管平滑筋においてノルアドレナリンは収縮を誘発するが、消化管においては逆に弛緩を起こす。しかし、高濃度  $K^+$ は自律神経支配が異なる各種平滑筋組織においても収縮を誘発する。そこで本研究では、高濃度  $K^+$ 誘発性収縮を研究に用いた。

平滑筋は、その電気生理学的小および機械的反應から phasic 筋および tonic



筋に大別される (Somlyo and Somlyo 1968<sup>(50)</sup>; Horowitz et al., 1996<sup>(11)</sup>; Karaki et al., 1997<sup>(23)</sup>)。Phasic 型平滑筋は、回腸、膀胱、子宮、精管などがこれに属し、しばしば電氣的スパイクと関連した収縮を発生し、高濃度  $K^+$  による収縮は初期の phasic 収縮とそれに続く持続性収縮を誘発する (Himpens et al., 1989<sup>(10)</sup>)。一方、tonic 筋は電氣的スパイクを伴わない持続的な収縮が特徴であり、大動脈、頸動脈、冠状動脈など血管平滑筋あるいは気管平滑筋がこれに属する。

等浸透圧性に置換した高濃度  $K^+$ 、 $Na^+$  除去液は、様々な平滑筋において一過性の大きな収縮とそれに続く漸次な弛緩を示す。Phasic 筋であるモルモット膀胱 (Shimizu et al., 1984<sup>(47)</sup>)、回腸 (Shimizu et al., 1991<sup>(49)</sup>)、胆嚢 (Shimizu et al., 1984<sup>(47)</sup>) および盲腸紐 (Urakawa et al., 1968<sup>(58)</sup>) において収縮に続く大きな弛緩を誘発するが、 $Na^+$  あるいはピルビン酸の追加適用は、この弛緩反応を顕著に回復したことから、phasic 筋の収縮反応において  $Na^+$  依存性のグルコース取込み機構、すなわち、SGLT の関与の可能性が示唆されてきた。

一方、腸管におけるグルコース取込み機構が、主に SGLT1 であることと考えられている (Song et al., 2016<sup>(52)</sup>; Lehmann and Hornby., 2016<sup>(28)</sup>)。しかしながら、これらの報告は小腸粘膜における SGLT1 の機能を示すものであり、平滑筋自体における SGLT の発現およびその運動機能への関連性を示す報告はない。本研究において、phloridzin は、phasic 筋であるブタ虹彩括約筋およびラット回腸平滑筋の高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮を顕著に抑制したが、tonic 筋であるラット大動脈平滑筋においてその抑制は、phasic 筋に比べ小さかった。これは、phasic 筋および tonic 筋において主要なグルコース取込み経路が異なっており、ブタ虹彩括約筋およびラット回腸平滑筋のような phasic 筋では高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮は、SGLT を介したグルコース取込み機構の関与が大きい可能性が示唆された。そこで本研究では、ラット回腸平滑筋における SGLT1 および 2 の mRNA 発現量を調べたところ、SGLT1 mRNA は大動脈および腎臓と比較し、顕著に多く、SGLT2 mRNA に大きな差異は認められなかった。さらに、phloridzin は、ラット回腸平滑筋の高濃度 K<sup>+</sup>誘発性解糖系活性の増加を濃度依存性に有意に抑制し、細胞内ホス

ホクレアチン (PCr) 含量も有意に抑制した。TCA 回路の基質であるピルビン酸の追加適用は、phloridzin 誘発性弛緩および PCr 含量の減少を回復したが、解糖系活性には影響を及ぼさなかった。これは、phloridzin により SGLT1 が阻害されることによりグルコース取込みが減少し、細胞内エネルギーが減少することを示唆する。蛍光グルコース取込み実験においても phloridzin は、高濃度  $K^+$  誘発性グルコース取込み増加を顕著に抑制した。以上より、ラット回腸平滑筋の高濃度  $K^+$  誘発性収縮は、SGLT1 を介したグルコース取込み機構の関連性が大きいことが示唆された。

本研究において、回腸平滑筋には大動脈平滑筋に比べ SGLT1 が高発現しており、一方、大動脈平滑筋には GLUT4 が発現していた。また、高濃度  $K^+$  は回腸平滑筋のグルコース取込みを刺激したが、大動脈平滑筋において取込みを刺激しなかった。Phasic 筋は自発運動を伴うものもあり、はやい収縮反応を示すが、tonic 筋は収縮発現がゆっくりしており、腸管収縮の収縮維持は血管平滑筋のそれに比べ多量のエネルギーを消費することが示されてきた (Paul et al., 1987<sup>(41)</sup>)。一方、GLUT1 は、腫瘍細胞に高発現して

いることが知られているが、一部の腫瘍細胞では SGLT が高発現している (Szablewski, 2013<sup>(56)</sup>) ことが報告されていることから、GLUT1 と同様に、SGLT の発現の高低も細胞のエネルギー消費の高低を示す 1 つの指標になるかもしれない。また、このグルコース取込み機構の差異が phasic 筋と tonic 筋における収縮の好氣的代謝への依存性などの代謝系の差異を説明するかもしれない。

#### 4-2 血管平滑筋におけるグルコース取込み機構

大動脈平滑筋において低酸素状態は収縮を抑制するが、外液グルコース濃度の増加は収縮を回復する (Namm and Zucker, 1973<sup>(35)</sup>) ことから、低酸素状態ではグルコース輸送機構が活性化される可能性がある。さらに、マウス大動脈平滑筋において、グルコース輸送体 4 型 (GLUT4) が存在することが報告されてきた (Park et al., 2005<sup>(39)</sup>)。本研究においても、RT-PCR 分析は、ラット大動脈平滑筋に GLUT4 が発現していることを示した。

GLUT4 は骨格筋あるいは脂肪細胞において主要なグルコース輸送体であり、インスリン刺激により PI3K/Akt 経路を介して活性化されて細胞膜へトランスロケーションする。大動脈平滑筋も骨格筋、脂肪細胞と同様にインスリン刺激は PI3K/Akt 経路を介して GLUT4 をトランスロケーションすることが初めて示された。

一方、ラット大動脈平滑筋において、収縮刺激は骨格筋と異なりグルコース取込みの増加および GLUT4 のトランスロケーションを起こさなかった。

ブタ頸動脈において、外液グルコース除去の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮への影響はわずかであり内因性のグリコーゲンが収縮維持に大きく関与すること

(Lynch et al., 1989<sup>(29)</sup>) から、血管平滑筋の収縮は、グリコーゲンなどの内因性エネルギー基質を優先的に利用しており、エネルギー基質が十分存在する時はグルコース取込みが活性化されないことが示唆される。しかし、大動脈平滑筋における収縮刺激と GLUT4 の活性化に関して本研究と異なる意見もある。HIV の治療薬であるプロテアーゼ阻害剤は GLUT4 を介したグルコース取込みを抑制する (Murata et al., 2000<sup>(33)</sup>)。Park ら (2005<sup>(39)</sup>)

は、マウス大動脈においてプロテアーゼ阻害剤である *indinavir* が無刺激状態のグルコース取込みを抑制し、ノルアドレナリンおよびセロトニン収縮を抑制することを示したことから、大動脈の収縮と GLUT4 の活性化は関連している。一方、同じくプロテアーゼ阻害剤である *ritonavir* はラット大動脈の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮をフェニレフリン収縮に比べ選択的に抑制し、さらに細胞内  $Ca^{2+}$ レベルの低下を伴っていた(金田、未発表データ)。また、大動脈や頸動脈の収縮は外液グルコース除去の影響を受けにくいことから、彼らの成績は大動脈の収縮と GLUT4 の活性化の関連性を示すには十分な結果とはいえない。

ラット大動脈平滑筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮に対する NaCN による低酸素状態は、GLUT4 のトランスロケーションを伴いグルコース取込みを有意に増加させた。そのグルコース取込みの増加は PI3K/Akt 経路阻害薬では抑制されず、AMPK 阻害薬により抑制されたが、GLUT4 トランスロケーションの増加は、全ての阻害薬により抑制された。この結果より、ラット大動脈平滑筋における GLUT4 は、常時 PI3K/Akt 経路による制御を受けていること

およびグルコース取込み経路には GLUT4 以外の輸送体の関与が示唆された。また、AMPK 依存性経路を介した GLUT4 以外の輸送体 (Lee et al., 2014<sup>(27)</sup>) および GLUT1 (Wu et al., 2013<sup>(61)</sup>) の関与についての報告もある。これらより、ラット大動脈平滑筋におけるグルコース取込み機構には、GLUT4 以外の輸送体も関係し、それらは AMPK 依存性経路により制御されている可能性が考えられる。GLUT4 以外のグルコース取込み機構の関連性についてはさらなる研究が必要である。本研究は、大動脈平滑筋の高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮および好氣的代謝抑制における GLUT4 関連シグナルおよびグルコース取込み機構について初めて明らかにした。

以上を要約すると、phasic 筋であるラット回腸平滑筋においてグルコース取込み機構は、SGLT1 を介しており、高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮維持に大きく関与している可能性が示唆された。それに対して tonic 筋であるラット大動脈平滑筋では、複数のグルコース輸送体が関与しており、高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮では内因性基質であるグリコーゲン、高濃度 K<sup>+</sup>誘発性収縮に対する低酸素状態では GLUT4 および AMPK 依存性のその他の輸送体の関与が示唆

された。また、ラット大動脈平滑筋における GLUT4 トランスロケーションは、常時 PI3K/Akt 経路により調節されており、高濃度  $K^+$ 誘発性収縮に対する低酸素状態では AMPK 依存性経路も関与していることが示唆された。



## 第 5 章 総括

グルコースは細胞活動を維持する重要なエネルギー基質の 1 つである。細胞内へのグルコース取込みは主に  $\text{Na}^+$ -グルコース共輸送体 (SGLT) およびグルコース輸送体 (GLUT) を介して行われる。

平滑筋は、その電気生理学のおよび機械的反応から phasic 筋と tonic 筋に大別される。また、phasic 筋および tonic 筋の差異には好氣的代謝への依存性も異なることが示唆されてきた。さらに、平滑筋の収縮反応は臓器・組織によりグルコース取込み機構の関与が異なる可能性が示されてきた。

一方、平滑筋において SGLT 阻害薬である phloridzin は、高濃度  $\text{K}^+$  収縮を抑制するが、その抑制は平滑筋のタイプにより異なる。その弛緩機序は、SGLT を介したグルコース取込み抑制であると考えられてきたが、平滑筋において phloridzin によるグルコース取込みの変化について検討した報告は無い。また、tonic 筋である大動脈平滑筋には骨格筋や脂肪細胞と同様に GLUT4 が発現しており、インスリン刺激および受容体作動薬によりグルコースを取込むことが報告されている。GLUT4 の活性化シグナルは、刺激経

路あるいは臓器により異なる。しかしながら、血管平滑筋において、GLUT4の活性化シグナルや低酸素状態での活性化を示した報告はほとんどない。

そこで本研究は、**phasic** 筋である虹彩括約筋および回腸平滑筋の高濃度  $K^+$ 収縮に対する **phloridzin** による収縮抑制とグルコース取込みの関係について調べ、さらに、**tonic** 筋である大動脈平滑筋においてインスリン、高濃度  $K^+$ 収縮および好氣的代謝抑制による GLUT4 の活性化シグナルについて検討し、ショック時や飢餓状態などの病態における組織機能の基礎的知見を得ることを目的とした。

#### 5-1 Phasic 平滑筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮とグルコース取込みの関連性

本研究において、好氣的代謝の抑制は平滑筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮を抑制した。その抑制は、**phasic** 筋であるブタ虹彩括約筋およびラット回腸平滑筋で顕著であり、**tonic** 筋であるラット大動脈平滑筋ではわずかであった。同様に、SGLT 阻害薬である **phloridzin** は、虹彩括約筋およびラット回腸平滑筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮を顕著に抑制したが、大動脈平滑筋に対する

影響は小さかった。また、ラット回腸平滑筋には SGLT1 mRNA の発現が多く、SGLT2 mRNA 発現量は少なかった。一方、大動脈平滑筋の SGLT mRNA 発現量は低かった。さらに、ラット回腸平滑筋における高濃度  $K^+$  適用は、グルコース取込みを有意に増加させた。それに加えて、phloridzin 追加適用は、解糖系の活性化を伴って高濃度  $K^+$  誘発性グルコース取込みの増加を抑制した。これらの結果は、phasic 筋であるラット回腸平滑筋の高濃度  $K^+$  誘発性収縮は好氣的代謝への依存度が高く、収縮反応の維持に SGLT1 を介したグルコース取込みの関与が大きいことを示唆する。

## 5-2 Tonic 平滑筋の高濃度 $K^+$ 誘発性収縮とグルコース取込みの関連性

GLUT4 は骨格筋および脂肪細胞に多いが、血管平滑筋にも存在する。本研究はラット大動脈平滑筋において GLUT4 mRNA の発現を示した。さらに、血管平滑筋におけるインスリン適用は、グルコース取込みを増加および GLUT4 の細胞膜上へのトランスロケーションを惹起した。その増加は、PI3K および Akt 阻害薬により抑制されたが、AMPK 阻害薬では抑制され

なかった。この結果より、骨格筋と同様に大動脈平滑筋は、PI3K/Akt 経路を介して GLUT4 を活性化することが示唆された。しかしながら、大動脈平滑筋に対する高濃度  $K^+$ 適用は、グルコース取込みに影響しなかった。これは、骨格筋と異なり大動脈平滑筋収縮は、外因性のエネルギー基質ではなくグリコーゲンなどの内因性のエネルギー基質の関与が大きい可能性が示唆された。大動脈平滑筋の高濃度  $K^+$ および NaCN 同時適用による低酸素状態は、グルコース取込みおよび細胞膜上への GLUT4 トランスロケーションを増加させた。高濃度  $K^+$ および NaCN 同時適用によるグルコース取込みの増加は、AMPK 阻害薬によってのみ抑制されたが、GLUT4 トランスロケーションは PI3K/Akt 阻害薬および AMPK 阻害薬により抑制された。これらの結果より、大動脈平滑筋の収縮反応には GLUT4 以外の AMPK 依存性グルコース輸送体の関与が示唆された。しかしながら、その輸送体を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。以上より、tonic 筋であるラット大動脈平滑筋は、骨格筋と同様に、インスリン依存性および非依存性の GLUT4 活性化経路が存在することが示唆された。一方、大動脈平滑筋にお

ける高濃度  $K^+$ 誘発性収縮は、内因性のエネルギー基質に依存するが、好氣的代謝抑制は複数のグルコース輸送体を活性化することが示唆された。特に GLUT4 トランスロケーションは、強い AMPK 刺激により活性化されることが示唆された。本研究により、大動脈平滑筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮および好氣的代謝抑制における GLUT4 関連シグナルおよびグルコース取込み機構について初めて明らかにした。

### 5-3 まとめ

以上のことから、phasic 筋である虹彩括約筋および回腸平滑筋の高濃度  $K^+$ 誘発性収縮は好氣的代謝に依存性が高く、また収縮時に SGLT1 を介したグルコース取込みが活性化されることが示唆された。

一方、tonic 筋である大動脈平滑筋では、骨格筋や脂肪細胞と同様にインスリンに感受性である GLUT4 を介したグルコース取込み機構の存在が示された。しかしながら、骨格筋と異なり GLUT4 は大動脈平滑筋において収縮によって活性化されなかった。さらに、大動脈平滑筋において、シアン化

合物による好氣的代謝の抑制は高濃度  $K^+$ 誘発性収縮をわずかに抑制し、  
GLUT4 を介したグルコース取込みを活性化したことから、大動脈平滑筋では、低酸素状態は骨格筋と同様に GLUT4 を介したグルコース取込みを活性化することが示唆された。また、平滑筋収縮におけるグルコース取込み機構には、臓器差があることがはじめて示された。

本論文の結果は、回腸平滑筋のような自発運動や、はやい収縮反応を示す phasic 筋は主に SGLT を介したグルコース取込み機構により運動機能が維持されることが、また、大動脈のようなゆっくりとした収縮反応を示す tonic 筋は内因性エネルギー基質によって運動機能が維持されるが、低酸素時には GLUT4 をはじめとするグルコース取込み機構も運動機能の維持に関与することが示唆され、平滑筋収縮におけるグルコース取込み機構の臓器による差異をはじめて明らかにした。これらの知見は、獣医学的にも重要なショック時や飢餓状態における内臓機能の病態の解明に寄与する可能性が考えられた。

## 第 6 章 引用文献

1. Adelstein, R. S. and Sellers, J. R. 1996. Myosin structure and function. pp. 3-19. *In: Biochemistry of Smooth Muscle Contraction.* (Barany, M, edt.) Academic Press, San Diego.
2. Bárány, M. and Bárány, K. 1998. Calponin phosphorylation does not accompany contraction of various smooth muscles. *Biochim Biophys Acta.* **1179**(2):229-233.
3. Blodgett, A. B., Kothinti, R. K., Kamyshko, I., Petering, D. H., Kumar, S. and Tabatabai, N. M. 2011. A fluorescence method for measurement of glucose transport in kidney cells. *Diabetes Technol. Ther.* **13**:743-751.
4. Breen, D. M., Sanli, T., Giacca, A. and Tsiani, E. 2008. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochem Biophys Res Commun.* **374**:117-122.

5. Coburn, R. F., Moreland, S., Moreland, R. S. and Baron, C. B. 1992.  
  
Rate-limiting energy-dependent steps controlling oxidative  
  
metabolism-contraction coupling in rabbit aorta. *J. Physiol.* **448**:473–  
  
492.
6. Dillon, P. F., Aksoy, M. O., Driska, S. P. and Murphy, R. A. 1981.  
  
Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth  
  
muscle. *Science.* **211**:495-497.
7. Dirksen, W. P., Vladic, F. and Fisher, S. A. 2000. A myosin  
  
phosphatase targeting subunit isoform transition defines a smooth  
  
muscle developmental phenotypic switch. *Am. J. Physiol.*  
  
**278**:C589-600.
8. Ganeshanandan, S. S., Karaki, H., Ikeda, M. and Urakawa, N. 1969.  
  
Mechanical Response of Guinea Pig Taenia Coli in  
  
High-K/Na-deficient Medium Under Anoxia. *Jpn. J. Pharmacol.*  
  
**19**:329-330.



9. Garofalo, O., Cox, D. W. and Bachelard, H. S. 1988. Brain levels of NADH and NAD<sup>+</sup> under hypoxic and hypoglycaemic conditions in vitro. *J. Neurochem.* **51**:172-176.
10. Himpens, B., Matthijs, G. and Somlyo, A. P. 1989. Desensitization to cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> sensitivities of guinea pig ileum and rabbit pulmonary artery smooth muscle. *J. Physiol.* **413**:489-503.
11. Horowitz, A., Menice, C. B., Laporte, R. and Morgan, G. 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* **76**:967-1003.
12. Ihara, E., Yu, Q., Chappellaz, M. and MacDonald, J. A. 2015. ERK and p38MAPK pathways regulate myosin light chain phosphatase and contribute to Ca<sup>2+</sup> sensitization of intestinal smooth muscle contraction. *Neurogastroenterol. Motil.* **27**:135-146.
13. Ishida, Y. and Shibata, S. 1982. Relaxing and metabolic inhibitory action of X537A (Lasalocid) on the taenia of the guinea-pig caecum. *J*

Physiol. **333**:293-304.

14. Ishida, Y., Takagi, K. and Urakawa, N. 1984. Tension maintenance, calcium content and energy production of the taenia of the guinea-pig caecum under hypoxia. J. Physiol. **347**:149-159.
15. Ishida, Y. and Paul, R. J. 1990. Effects of hypoxia on high-energy phosphagen content, energy metabolism and isometric force in guinea-pig taenia caeci. J. Physiol. **424**:41-56.
16. Ishida, T. 2001. Smooth muscle contraction and relaxation under the hypoxia. pp. 373-380. *in*: Vascular Biology & Medicine. (edt.) Medical Review. Osaka.
17. Jessen, N. and Goodyear, L. J. 1985. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. J. Appl. Physiol. **99**:330-337.
18. Kaneda, T., Shimizu, K., Nakajyo, S. and Urakawa, N. 1998. The difference in the inhibitory mechanisms of papaverine on vascular and intestinal smooth muscles. Eur. J. Pharmacol. **355**:149-157.

19. Kaneda, T., Takeuchi, M., Shimizu, K., Urakawa, N., Nakajyo, S., Mochizuki-Kobayashi, M., Ueda, F. and Hondo R. 2006. Inhibitory mechanism of monensin on high  $K^+$ -induced contraction in guinea-pig urinary bladder. *J. Pharmacol. Sci.* **100**:133–141.
20. Kaneda, T., Kanakura, H., Yamamoto, M., Tajima, T., Urakawa, N. and Shimizu, K. 2009. Effects of High- $K^+$ ,  $Na^+$ -Deficient Solution on Contractility of the Smooth Muscles of the Porcine Trachea. *J. Vet. Med. Sci.* **71**:1209-1216
21. Kaneda, T., Fujieda, T., Eto, Y. Nagai, Y., Sasaki, N., Tajima, T., Urakawa, N. and Shimizu, K. 2012. Key role of glycogen storage in high  $K^+$ -induced contraction of the smooth muscles of the bovine trachea. *J. Vet. Med. Sci.* **74**:1277–1282.
22. Kanwal, A., Singh, SP., Grover, P. and Banerjee, S. K. 2012. Development of a cell-based nonradioactive glucose uptake assay system for SGLT1 and SGLT2. *Anal. Biochem.* **429**:70-75.

23. Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K. J. and Sato, K. 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* **49**:157-230.
24. Keller, D. M. and Lotspeich, W. D. 1959. Some effects of phlorizin on the metabolism of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **234**:987-990.
25. Khalil, R. A., Lajoie, C., Resnick, M. S. and Morgan, K. G. 1992.  $\text{Ca}^{2+}$ -independent isoforms of protein kinase-C differentially translocate in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **263**:C714-719.
26. Kitazawa, T., Masuo, M. and Somlyo, A. P. 1991. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:9307-9310
27. Lee, L., Tucci, M. A. and Benghuzzi, H. A. 2014. Effects of metformin and insulin on h9c2 rat cardiomyocytes in cell culture with elevated glucose levels. *Biomed. Sci. Instrum.* **50**:367-374.

28. Lehmann, A. and Hornby, P. J. 2016. Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **310**:G887-98.
29. Lynch, R. M., Kuettner, C. P. and Paul, R. J. 1989. Glycogen metabolism during tension generation and maintenance in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **257**:C736–C742.
30. Miller, E. J., Li, J., Sinusas, K. M., Holman, G. D. and Young, L. H. 2007. Infusion of a biotinylated bis-glucose photolabel: a new method to quantify cell surface GLUT4 in the intact mouse heart. *Am. J. Physiol Endocrinol Metab.* **292**:E1922-1928.
31. Morgan, J. P. and Morgan, K. G. 1984. Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. *J. Physiol.* **351**:155-67.
32. Mueckler, M., Hresko, R. C. and Sato, M. 1997 Structure, function and biosynthesis of GLUT1. *Biochem. Soc. Trans.* **25**:951-4.

33. Murata, H., Hruz, P. W. and Mucker, M. 2000. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. *J. Biol. Chem.* **275**:20251-20254.
34. Nakagawa, H., Gamo, S., Kajimoto, R. and Suzuki, A. 1976. Effects of ouabain on various muscle contracting drugs, with special reference to its relationship with Na, K-ATPase in the excised guinea pig seminal vesicles. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi.* **12**:217-219.
35. Namm, D. H. and Zucker, J. L. 1973. Biochemical alterations caused by hypoxia in the isolated rabbit aorta. Correlation with changes in arterial contractility. *Circ. Res.* **32**:464-470.
36. Nasu, T., Yui, K., Nakagawa, H. and Ishida, Y. 1982. Role of glycolysis in the tension development under anoxia in guinea pig taenia coli. *Jpn. J. Pharmacol.* **32**:65-71.
37. Nasu, T., Zakimi, S. and Shibata, H. 1991. Effects of hypoxia on the contractions and lactate release induced by high-K<sup>+</sup>, ouabain and

- epinephrine in guinea-pig aorta. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **99**:475-480.
38. North, A. J., Gimona, M., Lando, Z. and Small, J. V. 1994. Actin isoform compartments in chicken gizzard smooth muscle cells. *J. Cell Sci.* **107**:445-455.
39. Park, J. L., Loberg, R. D., Duquaine, D., Zhang, H., Deo, B. K., Ardanaz, N., Coyle, J., Atkins, K. B., Schin, M., Charron, M. J., Kumagai, A. K., Pagano, P. J. and Brosius, F. C. 3rd. 2005. GLUT4 facilitative glucose transporter specifically and differentially contributes to agonist-induced vascular reactivity in mouse aorta. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **25**:1596-1602.
40. Paton, W. D. and Zar, M. A. 1968. The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips. *J. Physiol.* **194**: 13-33.
41. Paul, R. J., Ishida, Y. and Rubanyi, G. 1987. Vascular smooth muscle

- metabolism and mechanisms of oxygen sensing. In: *The Pulmonary Circulation in Health and Disease*. (Will, J. A., Dawson, C. H., Wier, E. K., Buckner, C. K. eds.) Academic Press, Orland, pp 97-108.
42. Pyla, R., Pichavaram, P., Fairaq, A., Park, M. A., Kozak, M., Kamath, V., Patel, V. S. and Segar, L. 2015. Altered energy state reversibly controls smooth muscle contractile function in human saphenous vein during acute hypoxia-reoxygenation: Role of glycogen, AMP-activated protein kinase, and insulin-independent glucose uptake. *Biochem. Pharmacol.* **97**:77-88.
43. Rembold, C. M. and Murphy, R. A. 1986. Myoplasmic calcium, myosin phosphorylation, and regulation of the crossbridge cycle in swine arterial smooth muscle. *Circ. Res.* **58**:803-815.
44. Rowland, A. F., Fazakerley, D. J. and James, D. E. 2011. Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic.* **12**:672-681.
45. Rubanyi, G. and Paul, R. J. 1985. Two distinct effects of oxygen on



vascular tone in isolated porcine coronary arteries. *Circ. Res.*  
**56**:1-10.

46. Santi, R., Contessa, A. R. and Ferrari, M. 1963. Spasmolytic effect of  
the papaverine and inhibition of the oxidative phosphorylation.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**:156-159.

47. Shimizu, K., Yaguchi, S., Kometani, A., Nakajyo, S., Ozaki, H. and  
Urakawa, N. 1984. A comparative study on the contraction induced  
by high K/Na deficient solution in the trachea, gall bladder and  
urinary bladder in guinea-pig. *Jpn. J. Pharmacol.* **18**:321-331.

48. Shimizu, K., Hori, M., Mitsui, M., Hayashi, Y., Nakajyo, S. and  
Urakawa, N. 1987. The properties of a high K<sup>+</sup>-induced contraction  
in the ileal longitudinal and circular muscles of cat. *Nihon*  
*Heikatsukin Gakkai Zasshi.* **23**:47-53.

49. Shimizu, K., Kaburagi, T., Nakajyo, S. and Urakawa, N. 1991.  
Decrease in muscle tension and reduced pyridine nucleotides of the

- guinea pig ileal longitudinal smooth muscle in high  $K^+$ ,  $Na^+$ -deficient solution. *Jpn. J. Pharmacol.* **56**:53-59.
50. Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. 1968. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **159**:129-145.
51. Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. 2003.  $Ca^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* **83**:1325-1358.
52. Song, P., Onishi, A., Koepsell, H. and Vallon, V. 2016. Sodium glucose cotransporter SGLT1 as a therapeutic target in diabetes mellitus. *Expert. Opin. Ther. Targets.* **20**:1109-1125.
53. Spriet, L. L., Berardinucci, L., Marsh, D. R., Campbell, C. B. and Graham, T. E. 1990. Glycogen content has no effect on skeletal muscle glycogenolysis during short-term tetanic stimulation. *J. Appl. Physiol* (1985). **68**:1883-1888.

54. Suzuki, T., Karaki, H. and Urakawa, N. 1980. Mechanism of inhibition of contraction by high K, Na deficient solution in smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *Arch.Int.Pharmacodyn.* **248**:43-49.
55. Suzuki, T., Karaki, H. and Urakawa, N. 1981. Inhibition of contraction by swelling of vascular smooth muscle in high KCl, low Na solution. *Arch.Int.Pharmacodyn.* **250**:195-203.
56. Szablewski, L. 2013. Expression of glucose transporters in cancers. *Biochem Biophys Acta.* **1835**:164-169.
57. Szymanski, P. T., Chacko, T. K., Rovner, A. S. and Goyal, R. K. 1998. Differences in contractile protein content and isoforms in phasic and tonic smooth muscles. *Am. J. Physiol.* **275**:C684-692.
58. Urakawa, N., Ikeda, M., Saito, Y. and Karaki, H. 1968.  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake and tissue Ca of guinea pig taenia coli in isotonic high-K/Na-deficient medium. *Jpn. J. Pharmacol.* **18**:294-298.
59. Virkamaki, A., Ueki, K. and Kahn C. R. 1999. Protein-protein

interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*;103:931-943.

60. Wright, E. M., Loo, D. D. and Hirayama, B. A. 2011. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol. Rev.* **91**:733-94.

61. Wu, X. H., Chen, S. P., Mao, J. Y., Ji, X. X., Yao, H. T. and Zhou, S. H. 2013. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and glucose transporter-1 in laryngeal carcinoma. *Oncol. Lett.* **5**:261-266.

62. Zambrowicz, B., Ogbaa, I., Frazier, K., Banks, P., Turnage, A., Freiman, J., Boehm, K. A., Ruff, D., Powell, D. and Sands, A. 2013. Effects of LX4211, a dual sodium-dependent glucose cotransporters 1 and 2 inhibitor, on postprandial glucose, insulin, glucagon-like peptide 1, and peptide tyrosine tyrosine in a dose-timing study in healthy subjects. *Clin. Ther.* **35**:1162-1173.

63. Zambrowicz, B., Lapuerta, P., Strumph, P., Banks, P., Wilson, A., Ogbaa, I., Sands, A. and Powell, D. 2015. LX4211 therapy reduces

postprandial glucose levels in patients with type 2 diabetes mellitus and renal impairment despite low urinary glucose excretion. Clin. Ther. **37**:71-82.

64. Zheng, Y. and Sarr, M. G. 2013. Effect of the artificial sweetener, acesulfame potassium, a sweet taste receptor agonist, on glucose uptake in small intestinal cell lines. J. Gastrointest Surg. **17**:153-158
65. Zorzano, A., Palacín, M. and Gumà, A. 2005. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. Acta. Physiol. Scand. **183**:43-58.

## 謝辞

稿を終えるに際して、ご指導ならびに御助言を賜った以下の先生に厚く御礼申し上げます。

獣医生理学研究室 鈴木 浩悦教授

獣医薬理学研究室 浦川 紀元 名誉教授、清水 一政特任教授、

金田 剛治准教授、田島 剛助教

獣医生化学研究室 佐々木 典康准教授

研究を進めるにあたって、単離細胞の作成方法などの実験方法を御指導下さったことに対して、東京大学 獣医薬理学研究室 堀 正敏 准教授、ならびに岐阜大学 獣医薬理学研究室 松山 勇人 准教授に厚く御礼申し上げます。

最後に研究を円滑に進めるにあたり、様々な協力を賜った、永井 雄太氏をはじめとした日本獣医生命科学大学 獣医薬理学研究室の卒業生、現研究

室員の皆様、大学院および学部の同期の皆様に心から感謝致します。