

論文審査の結果の要旨

申請者名 神 田 秀 憲

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 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。

一方平滑筋は、動静脈や脾臓などの造血・循環器、胃腸や胆管などの消化器、子宮、精管や膀胱などの泌尿生殖器等、さまざまな臓器に分布し、血液輸送や血圧の変化、消化管運動あるいは子宮や膀胱などの泌尿生殖器の調整など生体機能制御に重要な働きを担っている。その平滑筋は、電気生理学的、機械的反応から胃腸管、泌尿生殖器などに存在する phasic 筋と大動脈や気管などに存在する tonic 筋に大別され、その性質の差異として好氣的代謝への依存性が異なることが示唆されている。

平滑筋において SGLT 阻害薬である phloridzin は、高濃度 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。その収縮抑制機序は、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く、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。そこで本論文は、ショック時、飢餓状態あるいは糖尿病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て、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た。

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

2章において、ラット回腸平滑筋の高濃度 K⁺誘発性収縮における SGLT 阻害薬である phloridzin の影響について解析している。まず NaCN による好氣的代謝の抑制が平滑筋の高濃度 K⁺誘発性収縮を抑制することを示したが、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。一方、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わずかであった。さらに、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 SGLT1 と 2 の 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が、その増加は、phloridzin 追加適用により抑制された。また、phloridzin 適用によるグルコース取込み量の抑制はグルコース代謝と関連する NADH/NAD 比による解糖系の活性の低下およびホスホクレアチン含量による細胞内総エネルギーの減少を伴っていたことから、ラット回腸平滑筋の高濃度 K⁺誘発性収縮は主に SGLT1 によるグルコース取込みを介した好氣的代謝により維持されることが示唆された。以上の結果から、回腸や虹彩括約筋などの phasic 筋収縮は SGLT1 によるグルコース取込みを介した好氣的代謝により維持される可能性が示唆された。

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

3章において、ラット大動脈平滑筋の高濃度 K⁺誘発性収縮と GLUT4 活性の関連性について解析している。GLUT4 は骨格筋線維や脂肪細胞で高い発現を示すが、ラット大動脈平滑筋においては GLUT4 mRNA を発現していることが確認された。さらに、大動脈平滑筋において、インスリン適用はグルコース取込みの増加と GLUT4 の細胞膜上へのトランスロケーションを惹起することを示した。さらに、大動脈平滑筋における GLUT4 の活性化は、骨格筋と同様に PI3K/Akt 経路を介することを示した。しかし、大動脈平滑筋の収縮においてはグルコース取込みが刺激されなかったことから、大動脈平滑筋収縮維持には、外因性のエネルギー基質よりもグリコーゲンなどの内因性のエネルギー基質が優先して利用される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が、グルコース取込みの増加には AMPK 経路のみが関与し、GLUT4 トランスロケーションには PI3K/Akt および AMPK 経路の関与が示された。これらの結果は、低酸素状態における大動脈平滑筋の収縮反応には GLUT4 を介したグルコース取込み経路とおそらく GLUT1 などの AMPK 依存性グルコース輸送体を介したグルコース取込み経路が関与することを示唆している。以上より、tonic 筋であるラット大動脈平滑筋は、インスリン依存性および非依存性の GLUT4 活性化経路とそれ以外のグルコース輸送体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 をはじめとした AMPK 刺激により活性化される輸送体の関与が示唆された。本論文により、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がはじめて明らかにされた。

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。

以上のように、本論文は平滑筋収縮におけるグルコース取込み機構には、臓器差があることをはじめて示した。これらの知見は、獣医学的にも重要であるショック時、飢餓状態や糖尿病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、学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。