エンドセリンによる骨格筋での インスリン抵抗性の発症機序

堀之内孝広¹⁾, 真崎 雄一¹⁾, 寺田 晃士²⁾, 三輪 聡一¹⁾

要約: インスリン抵抗性とは、骨格筋、脂肪細胞、肝臓などで、インスリンに対する感受性が低下した病態を指す。インスリン抵抗性では、インスリンによる正常なグルコース（糖）代謝が障害されているため、2型糖尿病の発症につながる。近年、社会の高齢化や都市化に伴う食生活の変化や運動量の減少によって、2型糖尿病患者が急増していることから、インスリン抵抗性の病態基盤の解明は、焦眉の課題となっている。グルコースは、脳、骨格筋、脂肪、内臓などで代謝・利用されているが、全身のグルコース利用に対する各組織の寄与率は大きく異なる。健常者の骨格筋におけるグルコース利用率は、全身の70%を占めているが、2型糖尿病患者では、骨格筋におけるグルコース利用率が特異的に半減している。このことは、骨格筋におけるインスリン抵抗性が2型糖尿病の発症に関与している可能性を示唆している。血管収縮性・炎症性ペプチドであるエンドセリン-1 (ET-1) は、インスリン抵抗性を惹起することが報告されているが、その詳細な発症機序は不明である。本研究では、ラット L6 筋管細胞を用いて、インスリンシグナルに対する ET-1 の作用を薬理的に解析した。L6 筋管細胞において、インスリンは、PI3 キナーゼの活性化を介して、Akt のリン酸化とグルコースの取り込みを促進した。ET-1 は、インスリンによる Akt リン酸化とグルコース取り込みを抑制し、この ET-1 の抑制作用は、選択的エンドセリン A 型受容体 (ET_AR) 遮断薬や選択的 G_{q/11} タンパク質阻害薬の前処理及び siRNA による内在性 G タンパク質共役型受容体キナーゼ 2 (GRK2) の発現抑制によって解除された。また、ET-1 は、Akt と GRK2 との相互作用を増強した。以上の結果から、L6 筋管細胞において、ET_AR 及び GRK2 が、ET-1 によるインスリンシグナルの抑制に関与していると考えられた。

1. はじめに

エンドセリン-1 (ET-1) は、血管内皮細胞で産生される血管収縮性・炎症性ペプチドであり(1)、糖尿病(2)や肺高血圧症(3-4)、動脈硬化症(2)といった様々な疾患の発症・進展に関与している。これらの疾患を有する患者において、血中 ET-1 濃度の上昇が認められており(5-8)、過剰に産生された ET-1 は、ETA 型受容体 (ET_AR) を介した持続性の血管収縮(9)や ET_BR のダウンレギュレーションによる血管内皮機能不全(10)、インスリン抵抗性(11-12)を惹起する。

一般に、インスリン抵抗性は、インスリン受容体 (InsR) が発現している組織において、InsR を介したシグナル伝達が障害され、インスリンに対する感受性が低下した状態を指す(13)。インスリンは、血糖降下作用を有しており、骨格筋や心筋、脂肪組織において、グルコース（ブドウ糖）の細胞内取り込みを促進し、また、肝臓において、糖新生を抑制する。骨格筋、心筋、脂肪組織には、グルコーストランスポーター 4 (GLUT4) が発現しており、インスリンは GLUT4 を介したグルコース取り込みを促進する。これらの臓器におけるグルコース利用率は大きく異なっており、健常者の場合、全身のグルコース利用のおよそ70%を骨格筋が担っている(14)。ところが、2型糖尿病患者では、健常者と比較して、骨格筋におけるグルコース利用率が特異的に半減していることが報告されている(14)。インスリンによる骨格筋へのグルコース取り込みは、細胞膜の GLUT4 発現量によって調節されているが、健常者と2型糖尿病患者との間で、骨格筋における GLUT4 タンパク質発現量に有意な差は認められていない(15)。従って、2型糖尿病患者における骨格筋で

キーワード: エンドセリン, インスリン抵抗性, G タンパク質共役型受容体キナーゼ 2, グルコーストランスポーター 4, 骨格筋細胞

¹⁾ 北海道大学 大学院医学研究院 薬理学講座 細胞薬理学教室 (〒060-8638 北海道札幌市北区北 15 条西 7 丁目)

²⁾ 滋賀医科大学 生化学・分子生物学講座 分子生理化学部門 (〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町)

E-mail: horinouc@med.hokudai.ac.jp 原稿受領日: 2017 年 12 月 18 日, 依頼原稿

のグルコース利用率の低下は、グルコース輸送を担う GLUT4 の発現量減少によるものではなく、骨格筋におけるインスリン抵抗性の発症に起因しているものと考えられている。

本稿では、著者らが見出した骨格筋細胞に発現する ET_AR を介したインスリン抵抗性の発症機序 (13) について、解説する。

2. 骨格筋細胞におけるインスリンのグルコース取り込み促進作用の分子基盤

骨格筋において、インスリンは、細胞内の GLUT4 貯蔵小胞に局在する GLUT4 の形質膜移行を促進させることによって、グルコースの細胞内取り込みを増加させる (16)。InsR は、2つの α サブユニットと 2つの β サブユニットで構成される 4 量体であり、インスリンが、InsR の α サブユニットに結合すると、InsR の β サブユニットに内在するチロシンキナーゼが活性化されて、インスリン受容体基質 (IRS) のチロシン残基がリン酸化される。ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) は、IRS のリン酸化チロシンへリクルートされ、活性化される。活性化された PI3K は、ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸をホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸に変換し、その結果、ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ 1 (PDK1) と Akt が形質膜へリクルートされる (16-17)。形質膜へ移行した Akt は、PDK1 による 308 番目のトレオニン残基 (Thr³⁰⁸) のリン酸化及び哺乳類ラパマイシン標的タンパク質による 473 番目のセリン残基 (Ser⁴⁷³) のリン酸化を受けて活性化される (16, 18-19)。活性化された Akt は、Rab GTPase 活性化タンパク質である AS160 をリン酸化することによって、GLUT4 の形質膜移行を促進する (16)。即ち、骨格筋における Akt の活性化は、インスリンによる GLUT4 を介したグルコース取り込み促進において、必要不可欠な細胞内イベントである。

3. エンドセリンによるインスリン抵抗性の発症に関する従来の知見

骨格筋における毛細血管の収縮や拡張能障害は、骨格筋へのインスリンやグルコースの送達を低下させるため、骨格筋でのインスリン抵抗性の発症に関与する (20-21)。従来、ET-1 による骨格筋でのインスリン抵抗性の発症は、ET-1 の血管収縮作用に起因する骨格筋へのインスリン送達量の減少によるものと考えられてきたが、その一方で、骨格筋に対する ET-1 の直接的なインスリンシグナル抑制作用も報告されている。例えば、健常者に ET-1 を投与した場合、骨格筋での血流

低下は認められないものの、骨格筋におけるインスリン誘発性グルコース取り込みが減少することが報告されている (22)。また、ヒト骨格筋細胞において、ET-1 は、インスリンによって促進される Akt のリン酸化とグルコース取り込みを抑制する (11)。これらの知見は、ET-1 が骨格筋に直接作用して、インスリン抵抗性を惹起することを示唆しているが、ET-1 によるインスリンシグナルの抑制機序については不明な点が多い。

4. G タンパク質共役型受容体キナーゼ 2 によるインスリンシグナルの抑制機序

G タンパク質共役型受容体キナーゼ 2 (GRK2) は、当初、活性薬が結合した G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を特異的にリン酸化することによって、GPCR の脱感作を引き起こすセリン/トレオニンキナーゼとして同定された (23)。ところが、近年、GRK2 が、シグナル分子とのタンパク質-タンパク質相互作用を介して、リン酸化非依存性に、受容体シグナルを負に制御していることが明らかにされている (24)。例えば、脂肪細胞において、InsR 刺激による G_{q/11} タンパク質の α サブユニット (G_{q/11 α}) のリン酸化は、GLUT4 を介したグルコース取り込みを促進させるが、GRK2 は G_{q/11 α} タンパク質と結合することによって、InsR シグナルを抑制する (12, 25)。また、正常な類洞内皮細胞において、ET_BR 刺激による G タンパク質の $\beta\gamma$ サブユニット (G _{$\beta\gamma$}) を介した Akt のリン酸化は、内皮型一酸化窒素合成酵素の活性化を介して、一酸化窒素産生を促進させるが、門脈圧亢進により傷害を受けた類洞内皮細胞においては、正常時よりも発現上昇した GRK2 が、Akt や G _{$\beta\gamma$} と結合することによって、ET_BR シグナルを抑制する (26)。なお、ET_BR から解離した G _{$\beta\gamma$} と GRK2 とのタンパク質-タンパク質相互作用は、GRK2 の形質膜移行を促進することから、形質膜へ移行した GRK2 による ET_BR のリン酸化も、ET_BR シグナルの抑制に関与すると考えられている (26)。

これらの知見から、著者らは、骨格筋において、ET-1 が、GRK2 の形質膜移行を促進し、その結果、GRK2 と Akt とのタンパク質-タンパク質相互作用の増強、即ち、Akt シグナルの抑制を引き起こすことによって、インスリン抵抗性が惹起されるという作業仮説を立て、以下の実験に着手した。

5. 筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導

ラット L6 骨格筋細胞株は、グルコース輸送や筋形成の研究において、広く用いられている。L6 筋芽細胞は、自発的に筋管細胞へ分化する能力を有している

が(27), 高濃度 (例. 10%) のウシ胎児血清 (FBS) が添加されている液体培地中では, FBS に含まれるトランスフォーミング増殖因子 β などの分化阻害因子によって, 筋芽細胞から筋管細胞への分化が抑制されている(28). このことから, 筋管細胞への分化誘導は, 低濃度 (例. 2%) の FBS やウマ血清 (HS) (27, 29), もしくは, 成長因子 (例. $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ウシインスリン) (30) のみを添加した液体培地に置換することによって行われている. 後述するが, インスリンによるグルコース取り込み促進は, 筋管細胞では認められるものの, 筋芽細胞では, GLUT1 による基礎グルコース取り込みにマスクされて観察されない (されにくい) ことから, 筋芽細胞を筋管細胞へ高度に分化させる必要がある. 本研究では, インスリンが筋形成促進作用を有すること(31)を利用して, 2%HS と $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ヒトインスリンを添加した液体培地を用いて, 筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導を行った(13).

6. 筋管細胞の特徴

筋芽細胞から筋管細胞へ分化する過程で, 細胞の形態や遺伝子発現などが変化する(32). まず, 筋芽細胞同士が融合し, 巨大な筋管細胞を形成するため, 単核

性の筋芽細胞が多核性の筋管細胞となる. また, 一部の多核性筋管細胞は, 自発性収縮を示す. さらに, 筋芽細胞から筋管細胞への分化は, MyoD や Myogenin などの転写制御因子群の発現誘導カスケードによって制御されているため, 転写制御因子の遺伝子発現が変動する. 例えば, MyoD は, 筋芽細胞の融合を促進させる遺伝子であることから, 分化初期の段階で, その発現が上昇する. 一方, Myogenin は, 筋管細胞の形成を促進させる遺伝子であることから, 分化後期の段階で, その発現が上昇する. 本研究では, 図1に示したように, 2%HS と $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ヒトインスリンを添加した液体培地中で筋芽細胞を7日間培養することによって, 上述の特徴を有する高度に分化した筋管細胞を得ることに成功した(13). なお, 筋管細胞の自発性収縮については, 文献13の補足データとして, Web 上 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13406/abstract>) で動画が公開されている.

7. 筋管細胞におけるインスリンによる Akt のリン酸化応答の薬理学的特徴

L6 筋管細胞に異なる濃度のインスリンを5分間処置したところ, 濃度依存的に Akt の Thr³⁰⁸ 及び Ser⁴⁷³

図1 ラット L6 筋芽細胞から筋管細胞への分化

(A) 分化誘導のプロトコール. 2%ウマ血清 (HS) と $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ヒトインスリンを添加した低グルコース液体培地で筋芽細胞を7日間培養し (2日毎に培地交換), 筋管細胞への分化を誘導した. 分化誘導後, 無血清培地でさらに2日間培養した後, Western blot 実験に供した. (B) 未分化の筋芽細胞 (Day 0) と分化した筋管細胞 (Day 7 及び Day 9) の位相差顕微鏡像. 核は, Hoechst 33342 を用いて染色した. (C 及び D) 分化マーカー遺伝子である MyoD (C) 及び myogenin (D) の mRNA 発現の経時変化. 各遺伝子発現量は, 内部標準遺伝子である 18S rRNA の mRNA 発現量で補正した. グラフは, 5例の平均値 $\pm$ 標準誤差. (文献13より改変転載)

のリン酸化レベルが上昇した (図 2A)。同様に, 300 nM インスリンによる Akt のリン酸化応答の経時変化を検討したところ, Akt の Thr³⁰⁸ 及び Ser⁴⁷³ のリン酸化レベルは, 刺激後 10 分もしくは 15 分の時点で最大に達し, 30 分以降から減少に転じた (図 2B)。しかしながら, 刺激後 30 分及び 60 分の時点において, Akt の Thr³⁰⁸ 及び Ser⁴⁷³ のリン酸化レベルは, 最大応答の約 75% を維持しており, インスリンによる Akt のリン酸化応答は, 持続性であることが明らかになった。

前述したように, インスリンによる Akt のリン酸化応答は, PI3K を介していると考えられている。PI3K の関与を薬理的に証明するため, 古くから wortmannin や LY294002 などの PI3K 阻害薬が用いられてきた。しかしながら, wortmannin や LY294002 は, PI3K 以外のキナーゼも抑制することから (33), 本研究では, LY294002 の他に, PI3K に対する選択性が極めて高い GSK2126458 (34) を用いた。300 nM インスリンを筋管細胞に 5 分間処理した時に生じる Akt のリン酸化応答は, 10 nM GSK2126458 及び 50 μ M LY294002 の前処置によって, ほぼ完全に抑制された (図 2C)。以上の結果から, 筋管細胞において, インスリンが, PI3K の活性化を介して, Akt の Thr³⁰⁸ 及び Ser⁴⁷³ のリン酸

化を促進することが確認された。

8. 筋管細胞におけるインスリンによる Akt のリン酸化応答に対する ET-1 の抑制作用

筋芽細胞から筋管細胞への分化は, 細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2 によって抑制されることが知られている (35)。筆者らは, L6 筋芽細胞において, ET-1 が, 血小板由来成長因子受容体のトランス活性化を介して, ERK1/2 を活性化することを明らかにし, ET-1 による筋芽細胞の分化阻害がインスリン抵抗性の一因になる可能性を示唆した (36)。本研究では, 筋管細胞におけるインスリンシグナルに対する ET-1 の作用を解析した。

L6 筋管細胞に 100 nM インスリンを 60 分間処理すると, Akt の Thr³⁰⁸ 及び Ser⁴⁷³ のリン酸化レベルが上昇し, このリン酸化応答は, 30 nM ET-1 の後処理によって有意に抑制された (図 3)。インスリンによる Akt のリン酸化応答に対する ET-1 の抑制作用は, 選択的 ET_A 遮断薬である BQ-123 及び選択的 G_{q/11} タンパク質阻害薬である YM-254890 の前処理によって解除されたが (図 3), 選択的 ET_B 遮断薬である BQ-788 (図 3) や選択的 G_i タンパク質阻害薬である百日咳毒素

図 2 ラット L6 筋管細胞におけるインスリンによる Akt のリン酸化応答の薬理学的特徴

(A) インスリンによる Akt のリン酸化応答の濃度-反応関係。インスリンの処理時間は全て 5 分間。(B) 300 nM インスリンによる Akt のリン酸化応答の経時変化。(C) 300 nM インスリンの 5 分間処置による Akt のリン酸化応答に対する PI3K 阻害薬 (GSK2126458 及び LY294002) の影響。グラフは, 6 例の平均値 $\pm$ 標準誤差。** $P < 0.01$ (300 nM インスリン単独との比較)。(文献 13 より改変転載)

(13), G_s タンパク質阻害薬である NF449(13) の前処置では影響を受けなかった. これらのことから, ET-1 は, ET_A R 及び ET_A R と共役する $G_{q/11}$ タンパク質の活性化を介して, インスリンシグナルを抑制していると考えられた.

$G_{q/11}$ タンパク質と共役する ET_A R に ET-1 が結合すると, 三量体 G タンパク質を構成する G_α と $G_{\beta\gamma}$ が ET-1 結合型 ET_A R から解離する. GRK2 の C 末端領域には, $G_{\beta\gamma}$ と結合するプレクストリン相同ドメインが存在するため(24), GRK2 は, 細胞膜近傍の $G_{\beta\gamma}$ ヘリクルートされ, ET-1 結合型 ET_A R をリン酸化 (不活化) する. さらに, 細胞膜近傍に集積した GRK2 は, Akt と結合し, Akt の活性化を阻害することが血管内皮細胞において報告されている(26). そこで, 骨格筋細胞において, インスリンによる Akt のリン酸化応答に対する ET-1 の抑制作用に, GRK2 が関与しているのか明らかにするため, siRNA による GRK2 発現抑制の影響を検討した. 図 4 に示したように, コントロール siRNA を導入した筋管細胞において, ET-1 によるインスリンシグナルの抑制が観察されたものの, siRNA を用いて GRK2 発現を抑制した筋管細胞においては, ET-1 の抑制作用がほぼ消失した. これらの結果は, ET-1 が GRK2 を介して, インスリンによる Akt のリン酸化応答を抑制していることを示している.

9. インスリンによるグルコース取り込み促進に対する ET-1 の抑制作用

上述の Western blot 解析から, 筋管細胞において, インスリンによって PI3K 依存性に Akt の Thr³⁰⁸ 及び Ser⁴⁷³ のリン酸化レベルが上昇し, このリン酸化応答は ET-1 によって抑制されることが明らかになった. これらの細胞応答が, グルコース取り込みに反映されているのか確認するため, トリチウム (³H) で標識された 2-デオキシ-D-グルコース ([³H]2-DG) を用いたグルコース取り込み実験を行った. 2-DG は, グルコースの 2-ヒドロキシル基が水素原子に置換されたグルコース誘導体であり, グルコースと同様に細胞内へ取り込まれるが, 解糖系による代謝を受けないため, 細胞内に蓄積する.

筋芽細胞や筋管細胞には, グルコースの基礎取り込みを担う GLUT1 とインスリンによるグルコース取り込みを担う GLUT4 が発現しているが, 分化の進行に伴って, GLUT1 発現量は経時的に減少し, GLUT4 発現量は増加する(37-38). 即ち, 筋芽細胞から筋管細胞へ分化する過程で, グルコースの基礎取り込みは減少し, インスリンによるグルコース取り込みは増大する(37-38). 従って, 高度に分化した筋管細胞では, GLUT1 発現量に対する GLUT4 発現量の比率 (GLUT4/GLUT1 発現比) が高くなるため, グルコース取り込み

図 3 ET-1 によるインスリン誘発性 Akt リン酸化応答の抑制に対する BQ-123 (選択的 ET_A R 遮断薬), BQ-788 (選択的 ET_B R 遮断薬) 及び YM-254890 (選択的 $G_{q/11}$ タンパク質阻害薬) の影響

BQ-123, BQ-788 及び YM-254890 は, インスリン刺激を行う 30 分前に処理した. ET-1 は, インスリン刺激を終了する 2 分前及び 5 分前に添加した. グラフは, 6 例の平均値 ± 標準誤差. * $P < 0.05$ (100 nM インスリン単独との比較). (文献 13 より改変転載)

図4 ET-1によるインスリン誘発性Aktリン酸化応答の抑制に対するsiRNAによるGRK2発現抑制の影響

siRNAをトランスフェクションしてから96時間後にインスリン刺激を行った。ET-1は、インスリン刺激を終了する2分前及び5分前に添加した。グラフは、6例の平均値±標準誤差。* $P < 0.05$ (100 nMインスリン単独との比較)。# $P < 0.05$ (control siRNA処理細胞との比較)。(文献13より改変転載)

図5 ラットL6筋管細胞におけるインスリンによる $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み促進の薬理学的特徴

(A) 分化誘導から $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み実験までのプロトコール。2%HSと10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ヒトインスリンを添加した低グルコース液体培地で筋芽細胞を7日間培養し(2日毎に培地交換)、筋管細胞への分化を誘導した。分化誘導後、無血清培地でさらに3日間培養した後、 $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み実験に供した。(B) インスリンによる $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み促進に対するPI3K阻害薬(GSK2126458及びLY294002)の影響。(C) インスリンによる $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み促進に対するET-1の影響。グラフは、8例の平均値±標準誤差。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (インスリン単独との比較)。(文献13より改変転載)

実験のバックグラウンドとなるGLUT1によるグルコースの基礎取り込みが減少し、インスリンによるGLUT4を介したグルコース取り込みの評価が容易になる。

図5Aに示したように、 $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み実験の場合、7日間の分化誘導後、無血清培地でさらに3日間培養した。この無血清培地を用いた培養によって、血

清飢餓に抵抗性を示す筋管細胞の基礎的な $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込みが経時的に減少し(データは示さず)、インスリンによる $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み促進が観察しやすくなる。100 nMインスリンで筋管細胞を2時間刺激したところ、 $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み速度は、およそ150%上昇し、インスリンの $[^3\text{H}]2\text{-DG}$ 取り込み促進作用は、PI3K阻害薬である10 nM GSK2126458及び50 μM LY294002

図6 ET-1によるインスリン誘発性 [³H]2-DG 取り込み促進の抑制に対するBQ-123 (選択的ET_AR遮断薬) 及びsiRNAによるGRK2発現抑制の影響

BQ-123は、インスリン刺激を行う30分前に処理した。siRNAをトランスフェクションしてから96時間後にインスリン刺激を行った。ET-1は、インスリンと同時に処理した。グラフは、8例の平均値±標準誤差。
* $P < 0.05$. (文献13より改変転載)

の前処置によって抑制された (図5B)。インスリンによる [³H]2-DG 取り込み速度の上昇は、濃度依存的であり、インスリンの濃度反応曲線から得られた pEC_{50} は 8.08 ± 0.11 、最大反応は $155 \pm 5\%$ であった (図5C)。一方、30 nM ET-1 存在下、インスリンの pEC_{50} に有意な変化は認められなかったものの、最大反応は非競合的に抑制された (図5C)。

インスリンによる [³H]2-DG 取り込み促進に対するET-1の抑制作用は、Aktのリン酸化応答と同様に、選択的ET_AR遮断薬であるBQ-123の前処理 (図6A) 及びsiRNAを用いたGRK2の発現抑制 (図6B) によって解除された。これらのことから、ET_AR及びGRK2が、ET-1によるインスリンシグナルの抑制に関与していることが明らかになった。

図7 ラットL6 筋管細胞におけるFLAG融合GRK2と内在性Aktとの分子間相互作用に対するET-1の影響

IP: 免疫沈降に用いた抗体。WCL: 全細胞抽出液。内在性Akt及びFLAG融合GRK2の検出に用いた一次抗体は、それぞれ、抗total Akt抗体及び抗FLAG-HRP抗体である。矢頭は、コントロール抗体 (normal mouse IgG) を用いた際に検出された非特異的シグナルを指す。(文献13より改変転載)

10. ET-1によるGRK2-Akt相互作用の増強

ET-1によるインスリンシグナルの抑制機序として、GRK2とAktの相互作用が関与しているのか明らかにするため、免疫共沈降法を用いて検討した。まず、レトロウイルスを用いて、FLAG融合GRK2タンパク質 (FLAG-GRK2) を安定的に発現する筋芽細胞を作製し、この筋芽細胞を筋管細胞へ分化させた。FLAG-GRK2と共沈降した内在性Akt量を解析したところ、30 nM ET-1 刺激によって、FLAG-GRK2と結合する内在性Akt量が増加した。このことから、ET-1は、GRK2とAktとの分子間相互作用を促進することによって、インスリンシグナルを抑制している可能性が示唆された。

11. おわりに

ET-1による骨格筋細胞でのインスリンシグナルの抑制機序を図8にまとめた。インスリンは、PI3Kの活性化を介して、Aktのリン酸化レベルを上昇させ、

図8 ラットL6 筋管細胞におけるET-1によるインスリンシグナルの抑制メカニズム (文献13より改変転載)

グルコース取り込みを促進する。これに対して、ET-1は、ET_ARとG_{q/11}タンパク質の活性化、ならびに、GRK2とAktの分子間相互作用の増強を介して、インスリンによるAktのリン酸化応答及びグルコース取り込み促進を抑制する。今後、ET_ARやGRK2をターゲットにしたインスリン抵抗性の治療戦略の開発が期待される。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Yanagisawa M, et al. *Nature*. 1988;332:411-415.
- 2) Pernow J, et al. *Life Sci*. 2012;91:507-516.
- 3) Rodríguez-Pascual F, et al. *Pharmacol Res*. 2011;63:463-472.
- 4) Horinouchi T, et al. *日薬理誌*. 2016;148:231-238.
- 5) Touyz RM, et al. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81:533-541.
- 6) Lerman A, et al. *N Engl J Med*. 1991;325:997-1001.
- 7) Takahashi K, et al. *Diabetologia*. 1990;33:306-310.
- 8) Ferri C, et al. *Diabetes*. 1995;44:431-436.
- 9) Horinouchi T, et al. *J Pharmacol Sci*. 2013;123:85-101.
- 10) Rubin LJ. *Life Sci*. 2012;91:517-521.
- 11) Shemyakin A, et al. *Diabetes*. 2011;60:2061-2067.
- 12) Usui I, et al. *Mol Endocrinol*. 2005;19:2760-2768.
- 13) Horinouchi T, et al. *Br J Pharmacol*. 2016;173:1018-1032.
- 14) DeFronzo RA. *Diabetes*. 1988;37:667-687.
- 15) Schalin-Jäntti C, et al. *Diabetologia*. 1994;37:401-407.
- 16) Leto D, et al. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:383-396.
- 17) Shisheva A. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;293:E536-E544.
- 18) Laplante M, et al. *Cell*. 2012;149:274-293.
- 19) Sarbassov DD, et al. *Science*. 2005;307:1098-1101.
- 20) Kubota T, et al. *Cell Metab*. 2011;13:294-307.
- 21) Goodpaster BH, et al. *Diabetes*. 2014;63:1058-1068.
- 22) Ottosson-Seeberger A, et al. *Acta Physiol Scand*. 1997;161:211-220.
- 23) Reiter E, et al. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17:159-165.
- 24) Evron T, et al. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33:154-164.
- 25) Usui I, et al. *EMBO J*. 2004;23:2821-2829.
- 26) Liu S, et al. *Nat Med*. 2005;11:952-958.
- 27) Nevzorova J, et al. *Br J Pharmacol*. 2002;137:9-18.
- 28) Heino J, et al. *J Biol Chem*. 1990;265:10181-10184.
- 29) Ruest LB, et al. *J Biol Chem*. 2002;277:5418-5425.
- 30) Jin P, et al. *J Biol Chem*. 1991;266:1245-1249.
- 31) Wu YJ, et al. *PLoS One*. 2014;9:e88450.
- 32) Bentzinger CF, et al. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:ID a008342.
- 33) Davies SP, et al. *Biochem J*. 2000;351:95-105.
- 34) Knight SD, et al. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1:39-43.
- 35) Minami M, et al. *Mol Biol Cell*. 2011;22:3508-3519.
- 36) Harada T, et al. *Life Sci*. 2014;104:24-31.
- 37) Mitsumoto Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;175:652-659.
- 38) Mitsumoto Y, et al. *J Biol Chem*. 1992;267:4957-4962.

Molecular mechanism for ET-1-induced insulin resistance in skeletal muscle cells

Takahiro Horinouchi¹⁾, Yuichi Mazaki¹⁾, Koji Terada²⁾, Soichi Miwa¹⁾

¹⁾Department of Cellular Pharmacology, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

²⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shiga University of Medical Science

Abstract. Insulin resistance is a condition where the sensitivity to insulin of the tissues expressing insulin receptor (InsR) is decreased due to a functional disturbance of InsR-mediated intracellular signaling. Insulin promotes the entry of glucose into the tissues and skeletal muscle is the most important tissue responsible for the insulin's action of decreasing blood glucose levels. Endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor and pro-inflammatory peptide, induces insulin resistance through a direct action on skeletal muscle. However, the signaling pathways of ET-1-induced insulin resistance in skeletal muscle remain unclear. Here we show molecular mechanism underlying the inhibitory effect of ET-1 on insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake in myotubes of rat L6 skeletal muscle cell line. mRNA expression levels of differentiation marker genes, MyoD and myogenin, were increased during L6 myoblasts differentiation into myotubes. Some of myotubes possessed the ability to spontaneously contract. In myotubes, insulin promoted Akt phosphorylation at Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³, and [³H]-labelled 2-deoxy-D-glucose ([³H]2-DG) uptake. The insulin-facilitated Akt phosphorylation and [³H]2-DG uptake were inhibited by ET-1. The inhibitory effect of ET-1 was counteracted by blockade of ET type A receptor (ET_AR), inhibition of G_{q/11} protein, and siRNA knockdown of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2). The exogenously overexpressed GRK2 directly bound to endogenous Akt and their association was facilitated by ET-1. In summary, activation of ET_AR with ET-1 inhibits insulin-induced Akt phosphorylation and [³H]2-DG uptake in a G_{q/11} protein- and GRK2-dependent manner in skeletal muscle. These findings indicate that ET_AR and GRK2 are potential targets for insulin resistance.