

# 博士論文

## レジスタンス運動による 2 型糖尿病改善に 関わる筋内の性ステロイドホルモンの 新たな役割の解明 (Elucidation of the novel role of muscle sex steroid hormones in improving type 2 diabetes through resistance training)

2021 年 3 月

立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科  
スポーツ健康科学専攻博士課程後期課程

堀居 直希

# 立命館大学審査博士論文

## レジスタンス運動による 2 型糖尿病改善に 関わる筋内の性ステロイドホルモンの 新たな役割の解明

(Elucidation of the novel role of muscle sex steroid  
hormones in improving type 2 diabetes through  
resistance training)

2021 年 3 月

March 2021

立命館大学大学院スポーツ健康科学研究科  
スポーツ健康科学専攻博士課程後期課程

Doctotal Program in Sport and Health Science

Graduate School of Sport and Health Science

Ritsumeikan University

堀居 直希

HORII Naoki

研究指導教員：家光 素行教授

Supervisor: Professor IEMITSU Motoyuki

—目次—

第1章 緒言 (P. 1-10)

第2章 研究目的 (P. 11)

第3章 【研究課題 I】 (P. 12-32)

「習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与するか否かの検討」

3-1. 緒言 (P. 12-13)

3-2. 方法 (P. 13-17)

3-3. 結果 (P. 17-26)

3-4. 考察 (P. 26-32)

3-5. 小括 (P. 32)

第4章 【研究課題 II】 (P. 33-50)

「一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の糖取り込みおよび筋タンパク合成シグナル経路の亢進に関与するか否かの検討」

4-1. 緒言 (P.33-35)

4-2. 方法 (P. 35-39)

4-3. 結果 (P. 39-46)

4-4. 考察 (P. 46-50)

4-5. 小括 (P. 50)

第5章 総合討論 (P. 51-60)

第6章 結論 (P. 61)

謝辞 (P. 62)

参考文献 (P. 63-80)

## 原著論文の一覧

本博士論文は、以下の副論文を中心にまとめたものである。

### 研究課題 I

#### 【副論文】

- 1 Horii Naoki, Sato Koji, Mesaki Noboru, Iemitsu Motoyuki. Increased muscular 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone in response to resistance training relates to skeletal muscle mass and glucose metabolism in type 2 diabetic rats. *PLoS One*, 11(11): e0165689, 2016.

### 研究課題 II

#### 【副論文】

- 2 Horii Naoki, Hasegawa Natsuki, Fujie Shumpei, Uchida Masataka, Iemitsu Motoyuki. Resistance exercise-induced increase in muscle 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone contributes to the activation of muscle Akt/mTOR/p70S6K- and Akt/AS160/GLUT4-signaling pathways in type 2 diabetic rats. *FASEB J*, 34(8): 11047-11057, 2020.

略語一覧 Abbreviation

ACSM: American College of Sports Medicine

ACTH: adrenocorticotrophic hormone

ADA: American Diabetes Association

Akt: protein kinase B

AMPK: 5' AMP-activated protein kinase

AS160: Akt substrate of 160 kDa

AUC: area under the curve

CaMKII: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II

CSA: cross sectional area

DHEA: dehydroepiandrosterone

DHT: 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

E2: estradiol

FSH: follicle-stimulating hormone

GLUT4: glucose transporter 4

HbA1c: hemoglobin A1c

HE: Hematoxylin-Eosin

HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance

HRP: horseradish peroxidase

HSD: hydroxysteroid dehydrogenase

IDF: International Diabetes Federation

IRS1: insulin receptor substrate 1

LC-MS/MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LETO: Long-Evans Tokushima Otsuka

LH: luteinizing hormone

mTOR: mammalian target of rapamycin

OGTT: oral glucose tolerance test

OLETF: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty

1RM: one repetition maximum

PGC-1 $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

P450arom: aromatase cytochrome P450

P450c17: cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase

P450scc: cholesterol side-chain cleavage enzyme

p70S6K: ribosomal protein S6 kinase

QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index

SDS: sodium dodecyl sulfate

Ser: serine

TBC1D1: TBC1 domain family member 1

Thr: threonine

$\dot{V}O_{2peak}$ : peak oxygen uptake

ZEB1: zinc finger E-box-binding homeobox 1

## 第1章 緒言

### 社会的背景

国際糖尿病連合（IDF: International Diabetes Federation）は、2019年に世界の20-79歳の9.3%にあたる4億6,300万人が糖尿病を患っており、2030年には5億7,800万人、2045年には7億人に増大すると推定している（IDF. 2019）。また、2019年に世界の糖尿病の治療および合併症に関わる医療費は、世界の総医療費の10%を占める約83兆円に上り、世界経済を低迷させる要因の1つとなっている（IDF. 2019）。50歳の糖尿病患者と非糖尿病患者の予後を比較すると、糖尿病患者が6-7年早期に要介護者となり、約5年早く死亡することが報告されている（Bardenheier et al. 2016）。これらのことから、糖尿病を予防・改善させることは、世界的に問題視されている医療費の削減や人々の健康寿命の延伸、生活の質（quality of life）の向上に大きく貢献することができると考えられる。

### 2型糖尿病における筋内のインスリン感受性の低下と骨格筋量の減少

糖尿病とは、血液中のブドウ糖（血糖）の量が慢性的に高くなる代謝性疾患であり、三大合併症と呼ばれる神経障害や網膜症、腎症だけでなく、心血管疾患などの合併症を引き起こし、死亡リスクを増大させることが報告されている（Cheung et al. 2010; Deshpande et al. 2008; Haffner et al. 1998; Huxley et al. 2006; Ritz. 1997; Ritz et al. 1999）。米国糖尿病学会（ADA: American Diabetes Association）は、次の①～④の基準値を用いて糖尿病の診断を実施している（ADA. 2018）：① 8時間以上の絶食状態での空腹時血糖値が126mg/dl以上（正常値: 100mg/dl [5.6mmol/l] 未満、糖尿病予備軍: 100-125mg/dl [5.6-6.9mmol/l]）、② 75g経口糖負荷試験（OGTT: oral glucose tolerance test）から2時間後の血糖値が200mg/dl以上（正常値: 140mg/dl [7.8mmol/l] 未満、糖尿病予備軍: 140-199mg/dl [7.8-11.0mmol/l]）、③ 過去1-2ヵ月間の平均血糖値を反映し、血糖コントロールの指標として用いられるヘモグロビンA1c（HbA1c: hemoglobin A1c）が6.5%以上（正常値: 5.6%以下、糖尿病予備軍: 5.7-6.4%）、④ 口渇、多飲、多尿、体重減少などの糖尿病の症状を示し、食事の時間と関係なく測定した随時血糖値が200 mg/dl [11.0 mmol/l] 以上。糖尿病は、膵臓のランゲルハンス島のβ細胞が破壊されることで血糖値を低下させるインスリン分泌が著しく低下し、慢性的な高血糖状態が持続する1型糖尿病と、遺伝的な要因によるインスリン分泌の低下あるいは肥満や運動不足、加齢などの環境的な要因が主因となり、インスリン作用が減弱（インスリン感受性の低下）し、慢性的に高血糖状態が引き起こされる2型糖尿病に大別される。世界

中の糖尿病患者の 90%以上が 2 型糖尿病である (Petersmann et al. 2019)。骨格筋はインスリンによる糖取り込み・利用の亢進に関わる生体内で最大の組織であり、健常者では、インスリン刺激により 70%以上の糖が骨格筋に取り込まれ、利用される (Baron et al. 1988; DeFronzo et al. 1985; DeFronzo. 1998; Zierath et al. 2000)。骨格筋の糖取り込み・利用の機序の 1 つには、インスリンが骨格筋の細胞膜上に存在するインスリン受容体 (insulin receptor) と結合し、その下流シグナルである筋内のインスリン受容体基質 1 (IRS1: insulin receptor substrate 1) および phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、protein kinase B (Akt)、Akt substrate of 160 kDa (AS160) リン酸化活性の増大が関与する (Hajdуч et al. 1998; Krook et al. 2004; Lee et al. 1995; Lund et al. 1995; Petersen and Shulman. 2018; Ryder et al. 2001; Wang et al. 1999; Zierath et al. 2000)。その後、糖輸送担体であるグルコーストランスポーター4 (GLUT4: glucose transporter 4) を細胞質から細胞膜に移送 (トランスロケーション) させ、骨格筋の糖取り込み・利用を亢進させる (Hajdуч et al. 1998; Krook et al. 2004; Lee et al. 1995; Lund et al. 1995; Petersen and Shulman. 2018; Ryder et al. 2001; Wang et al. 1999; Zierath et al. 2000)。一方で、2 型糖尿病では健常者と比較して、インスリン刺激による骨格筋の糖取り込み・利用が約半分に低下することが報告されている (Baron et al. 1988; DeFronzo et al. 1985; DeFronzo. 1998; Zierath et al. 2000)。2 型糖尿病では、筋内の IRS1 および PI3K、Akt、AS160 リン酸化活性、細胞質および細胞膜 GLUT4 総タンパク発現およびトランスロケーションが低下している (Björnholm et al. 1997; Dohm et al. 1991; Goodyear et al. 1995; Horii et al. 2019; Krook et al. 2000; Ryder et al. 2000; Sato et al. 2011, 2017) (Figure 1)。加えて、インスリン感受性の低下は、筋タンパク分解を促進させ、糖取り込み・利用の亢進に関わる生体内で最大の組織である骨格筋量を減少させることが報告されている (Hirata et al. 2019; Tanaka et al. 2018)。また、骨格筋量の減少は、さらなるインスリン感受性の低下を引き起こし、2 型糖尿病をさらに重症化させる (Almurdhi et al. 2016; Atlantis et al. 2009; Kim et al. 2019; Srikanthan et al. 2010, 2011) (Figure 2)。したがって、2 型糖尿病の予防・改善には、筋内の IRS1/PI3K/Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路および骨格筋量を増大させ、インスリン感受性および糖取り込み・利用を改善させることが重要である。



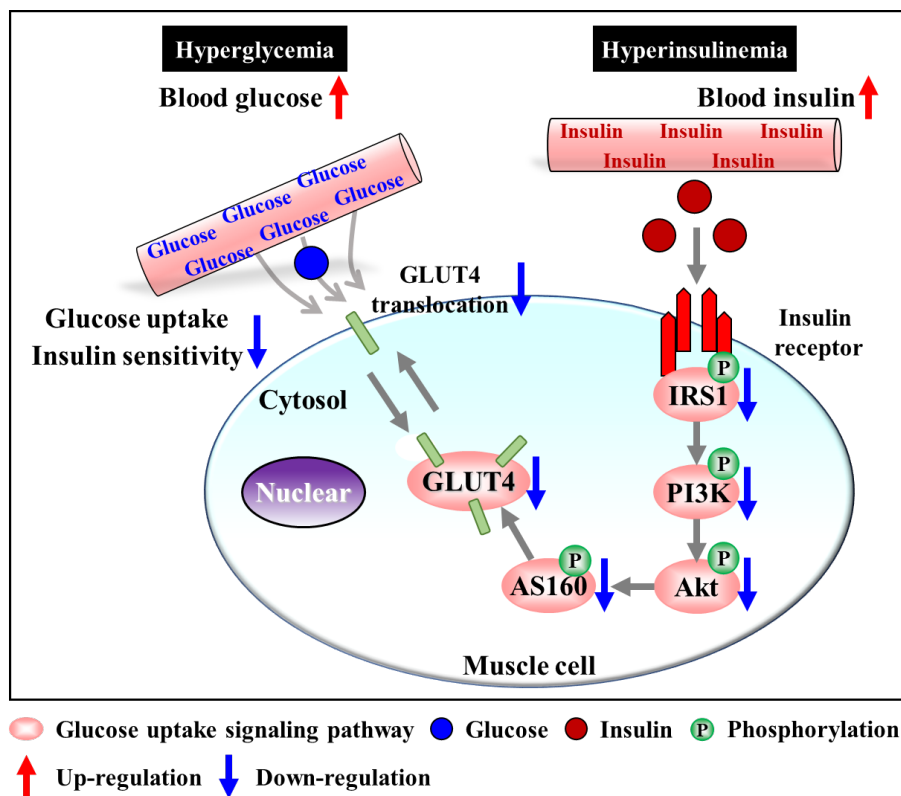


Figure 1: Muscle glucose uptake and signaling pathway in type 2 diabetes (T2DM) compared with healthy.

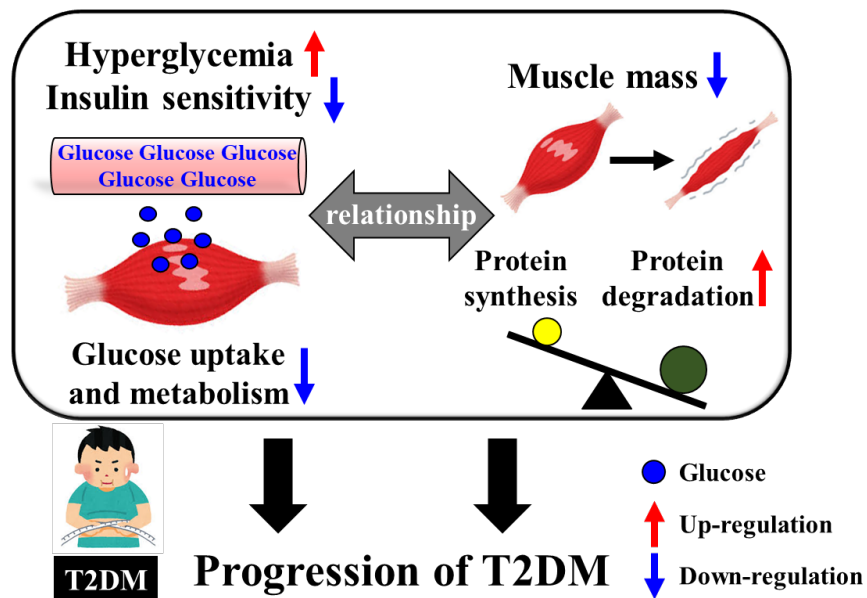
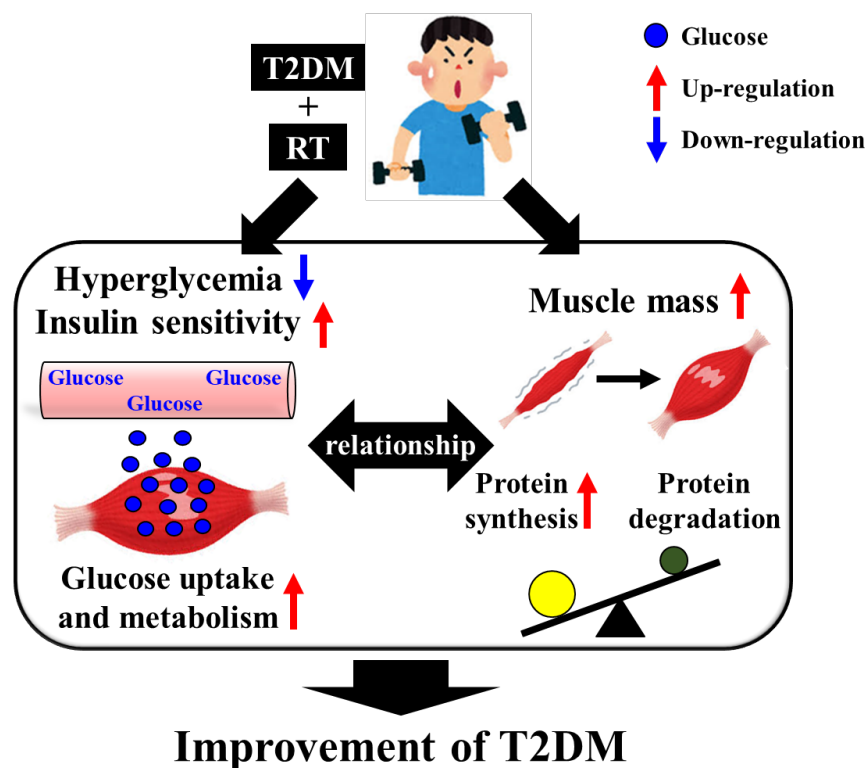


Figure 2: Mechanism of the progression in T2DM.

## 2 型糖尿病における習慣的な運動効果

2 型糖尿病を予防・改善させる最初の療法として、生活習慣の改善（運動療法および食事療法）が推奨されている（Nathan et al. 2009）。その中で、ADA と米国スポーツ医学会（ACSM: American College of Sports Medicine）は共同で、2 型糖尿病の運動のガイドラインを発表しており、3 日/週、合計 150 分以上/週の中強度（最大酸素摂取量の 40-60%）の有酸素性運動に加えて、大筋群を含む 5-10 種目の中強度（最大挙上重量 [1RM: one repetition maximum] の 50%）または高強度（1RM の 60-80%）のレジスタンス運動を 2-3 日/週実施することを推奨している（Colberg et al. 2010）。2 型糖尿病を対象とした有酸素性運動（サイクリングおよびトレッドミル走、ウォーキング）によるシステマティックレビューおよびメタ解析において、60-85%予備心拍数および 50-85%最高酸素摂取量（ $\dot{V}O_{2peak}$ : peak oxygen uptake）、3.6-5.2 metabolic equivalents の運動強度を 3 日/週、平均 52.5 分、平均 4.8 ヶ月の実施は、空腹時血糖値を 0.90mmol/L、HbA1c を 0.46%、インスリン抵抗性の指標として用いられる HOMA-IR（homeostasis model assessment of insulin resistance: 空腹時インスリン濃度 [ $\mu$ U/ml] × 空腹時血糖値 [mg/dl] / 405 で算出 [正常値: 1.6 以下、インスリン抵抗性あり: 2.5 以上]）を 0.80 減少させることが報告されている（Yang et al. 2014）。また、レジスタンス運動のシステマティックレビューおよびメタ解析において、5-10 種目、1RM の 30-100%運動強度を 3 日/週、平均 4.8 ヶ月の実施は、空腹時血糖値を 0.87mmol/L、HbA1c を 0.32%、HOMA-IR を 0.73 減少させることが報告されている（Yang et al. 2014）。加えて、2 型糖尿病を対象とした習慣的なレジスタンス運動と有酸素性運動の効果を比較したシステマティックレビューおよびメタ解析において、有酸素性運動の方が高血糖改善効果は高いことが報告されている（Schwingshackl et al. 2014）。一方で、習慣的なレジスタンス運動は、筋肥大を誘発させるため、2 型糖尿病により生じるインスリン感受性の低下と骨格筋量の減少の両方を改善させる（Frontera et al. 1988; Yang et al. 2014）（Figure 3）。現在まで、有酸素性運動による 2 型糖尿病の高血糖改善効果に関する分子機序は数多くの先行研究によって報告されているが（Douen et al. 1990; Friedman et al. 1990; Goodyear et al. 1990; Goodyear and Kahn. 1998; Horii et al. 2019; Jessen et al. 2011; Jessen and Goodyear. 2005; Kido et al. 2016; Ryder et al. 2001; Sato et al. 2017; Treebak et al. 2014; Vendelbo et al. 2014）、レジスタンス運動による分子機序を解明した研究は極めて少ない。科学的根拠に基づいた 2 型糖尿病の予防・改善のための運動療法を構築するために

は、習慣的なレジスタンス運動による2型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関する分子機序を解明することが必要不可欠である。

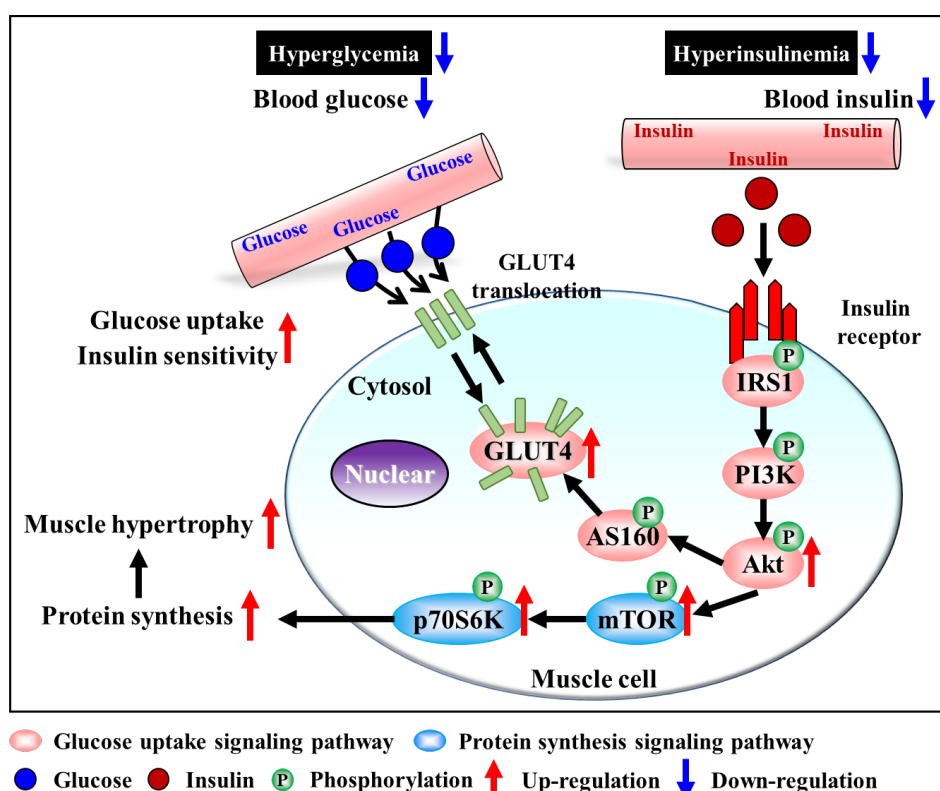


**Figure 3: Effects of chronic resistance training (RT) on glycemic control and muscle hypertrophy in T2DM.**

習慣的なレジスタンス運動による2型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果の分子機序

2型糖尿病モデルラットにおける8週間のレジスタンス運動は、空腹時血糖値およびOGTTから2時間後までの血糖値の上昇曲線下面積（AUC: area under the curve）を低下させ、筋内の細胞質 GLUT4 総タンパク発現を増大させることが報告されている（Kim et al. 2015）。また、2型糖尿病モデルラットにおける6週間のレジスタンス運動は、筋内の Akt リン酸化活性を増大させる（Kido et al. 2018）。したがって、習慣的なレジスタンス運動は、2型糖尿病により低下した筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の増大を介して、糖取り込み・利用を亢進させることが示されている（Figure 4）。習慣的なレジスタンス運動による筋肥大効果は、筋タンパク合成の促進が慢性的に繰り返されることによって生じることが知られている（Baar and Esser. 1999; Brook et al. 2015; Damas et al. 2016; Dreyer et al. 2006; Drummond et al. 2009; Goodman et al. 2011; Phillips et al. 1997; Strasser and Pesta. 2013）。筋タ

ンパク合成を促進させる分子機序の1つには、筋内のAktリン酸化活性の増大を介した、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質（mTOR: mammalian target of rapamycin）およびリボソームタンパク質S6キナーゼ（p70S6K: ribosomal protein S6 kinase）リン酸化活性の増大が関与することが報告されている（Katta et al. 2009）。これらの先行研究から、習慣的なレジスタンス運動による2型糖尿病の筋肥大効果は、筋内のmTOR/p70S6Kシグナル経路の亢進の繰り返しが関与することが示されている（Figure 4）。しかしながら、2型糖尿病における習慣的なレジスタンス運動が、筋内のAkt/GLUT4シグナル経路およびmTOR/p70S6Kシグナル経路の亢進を調節する分子機序は明らかでない。

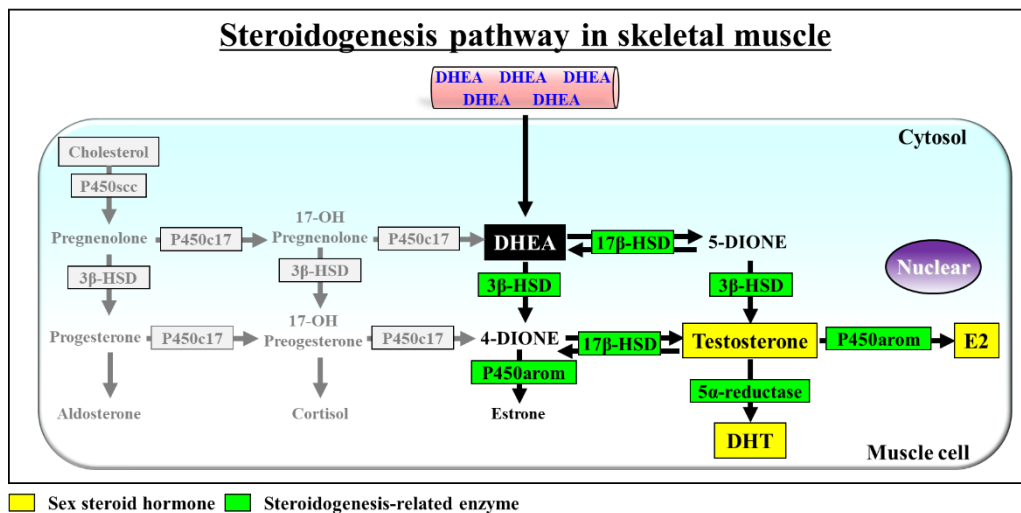


**Figure 4: Regulation of signaling pathways of muscle glucose uptake and protein synthesis in T2DM by chronic RT.**

#### 筋内の性ステロイドホルモン合成

テストステロンやエストロゲンなどの性ステロイドホルモンは、生殖器の発育や機能調節、精子や卵胞の成熟に重要なホルモンである（Gruber et al. 2002; Holm et al. 2011）。その他に、テストステロンによる筋タンパク合成作用（Bhasin et al. 1996; Brodsky et al. 1996）やエストロゲンによる筋のエネルギー代謝の亢進（Ikeda et al. 2019）など、性ステロイド

ホルモンは生体内における様々な役割を担うことが報告されている。性ステロイドホルモンは、コレステロールを材料にして、cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc)、cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase (P450c17)、3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD)、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase、aromatase cytochrome P450 (P450arom) などの性ステロイドホルモン合成酵素によって代謝・合成される (Labrie et al. 2005; Payne and Hales. 2004)。また、主に副腎から分泌される、性ステロイドホルモンの前駆体: デヒドロエピアンドロステロン (DHEA: dehydroepiandrosterone) は、3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD により、テストステロンに代謝・合成され、テストステロンから 5 $\alpha$ -reductase を介して、活性型テストステロンであるジヒドロテストステロン (DHT: 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone)、P450arom を介してテストステロンからエストラジオール (E2: estradiol) が代謝・合成される (Labrie et al. 2005)。従来、性ステロイドホルモンは、主に精巣や卵巣、副腎などの内分泌腺で代謝・合成され、血液循環を介して様々な末梢組織に作用すると考えられてきた。しかしながら、近年では、脳や肝臓、腎臓、骨格筋などの他臓器においても、性ステロイドホルモン合成酵素の発現が認められ、局所的に性ステロイドホルモンを代謝・合成できることが報告されている (Aizawa et al. 2007; Labrie et al. 2005; Sato et al. 2008)。健常モデルラットにおける組織中のテストステロン濃度は、精巣および卵巣と比較して、脳、肝臓、腎臓、骨格筋で低値を示すが、脳、肝臓、腎臓、骨格筋の臓器間で差は認められないことが報告されている (Aizawa et al. 2007)。また、健常モデルラットにおける組織中の E2 濃度は、卵巣と比較して、精巣、脳、肝臓、腎臓、骨格筋で低値を示すが、骨格筋は肝臓、腎臓よりも高値を示すことが報告されている (Aizawa et al. 2007)。骨格筋では、3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase、P450arom mRNA およびタンパク発現は検出されているが、P450scc および P450c17 mRNA 発現は検出されていない (Aizawa et al. 2010)。また、成熟した筋管細胞における DHEA の添加は、培養液上にテストステロンおよび DHT、E2 を濃度依存的に分泌させることが示されている (Aizawa et al. 2007; Sato et al. 2008)。したがって、骨格筋は DHEA から性ステロイドホルモンを代謝・合成できる能力を有していることが明らかにされている (Figure 5)。



**Figure 5: Sex steroid hormones and steroidogenesis-related enzymes in skeletal muscle.**

#### 筋内の性ステロイドホルモン濃度の変動と高血糖改善および筋肥大効果の関連性

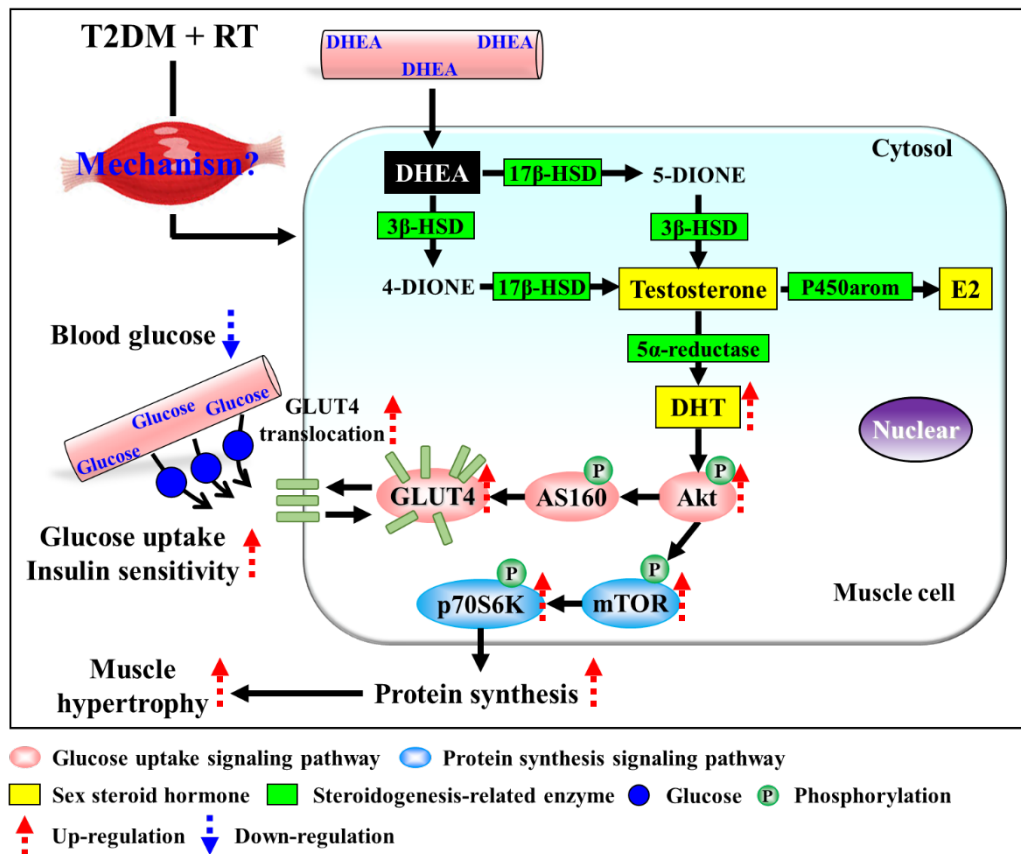
ストレプトゾトシン投与によってインスリン分泌が著しく低下している状態のラットにおける DHEA の単回投与は、インスリン分泌低下による高血糖状態の改善および筋内の Akt リン酸化活性の増大、GLUT4 トランスロケーションを亢進させることが報告されている (Sato et al. 2009)。さらに、DHT を代謝・合成する酵素である 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与は、DHEA の単回投与による高血糖改善および筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させる (Sato et al. 2009)。また、健常モデルラットにおける 3 週間の皮下からの DHT 投与を実施した先行研究では、筋横断面積、筋内の mTOR および p70S6K リン酸化活性を増大させることが報告されている (Zeng et al. 2017)。精巣摘出手術の施行により、全身のアンドロゲン分泌能が著しく低下するラットに対する単回の DHT 皮下注射は、筋内の p70S6K リン酸化活性を増大させる (Xu et al. 2004)。それゆえに、筋内の DHT 濃度の増大は、インスリン非依存的に高血糖改善および筋肥大効果に関与する可能性が考えられる。一方で、2 型糖尿病モデルラットでは、健常モデルラットと比較して、筋内の DHEA、DHT 濃度および 3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現が低値を示す (Sato et al. 2013)。2 型糖尿病モデルラットおよびモデルマウスにおいて、DHEA の慢性投与は、インスリン感受性および高血糖状態の改善に関与する (Berdanier et al. 1993; Coleman et al. 1982; Muller and Cleary. 1985; Sato et al. 2011)。その分子機序には、DHEA の投与により、筋内の DHT 濃度が増大し、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進が関与することが報告されている (Sato et al. 2011)。したがって、2 型糖尿病により低下した筋

内の DHT 濃度の増大は、インスリン非依存的に高血糖改善および筋肥大効果に関与し、その分子機序として高血糖改善効果に筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路、筋肥大効果に筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の亢進が関与する可能性が考えられる。

## 2 型糖尿病の習慣的な運動による筋内の性ステロイドホルモン濃度の増大と高血糖改善および筋肥大効果の関連の可能性

2 型糖尿病モデルラットにおける 6-8 週間の有酸素性運動は、筋内の DHEA および DHT 濃度を増大させ、筋内の PI3K 活性、Akt および AS160 リン酸化活性の増大、GLUT4 トランスロケーションの亢進を介して、高血糖状態の改善に関与する可能性が報告されている (Sato et al. 2011, 2012, 2013, 2017)。また、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与は、習慣的な有酸素性運動による高血糖改善および筋内の PI3K/Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させる (Sato et al. 2013)。近年、高齢者における 12 週間のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、筋量および筋力の増大効果と正の相関関係を示すことが報告されている (Sato et al. 2014b)。そのため、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与する可能性が考えられる。しかしながら、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与するか否かは明らかではない。

そこで本研究は、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与し、その分子機序として高血糖改善効果に筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路、筋肥大効果に筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の亢進が関与すると仮説を立てた (Figure 6)。



**Figure 6: Effects of chronic RT on improvement of hyperglycemia and muscle hypertrophy via increase in muscle DHT synthesis in T2DM (The hypothesis in this study).**



## 第2章 研究目的

本研究は、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与するか否かを検討することを目的とした。本研究の目的を達成するために、以下の 2 つの研究課題を設定した。

### 【研究課題 I】

「習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与するか否かの検討」

### 【研究課題 II】

「一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の糖取り込みおよび筋タンパク合成シグナル経路の亢進に関与するか否かの検討」

### 第3章 【研究課題 I】

「習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与するか否かの検討」

#### 3-1. 緒言

習慣的なレジスタンス運動は、2 型糖尿病のインスリン感受性の増大および糖取り込み・利用を亢進させ、高血糖状態を改善させる (Bacchi et al. 2012; Boulé et al. 2003; Church et al. 2010; Sigal et al. 2007; Snowling and Hopkins. 2006; Umpierre et al. 2011; Yang et al. 2014)。習慣的なレジスタンス運動による骨格筋の糖取り込み・利用を亢進させる分子機序の 1 つとして、2 型糖尿病により低下した筋内の Akt リン酸化活性および細胞質 GLUT4 総タンパク発現を増大させることが報告されている (Kido et al. 2018; Kim et al. 2015; Krisan et al. 2004; Tabata et al. 1999; Yaspelkis et al. 2002)。また、習慣的なレジスタンス運動による筋肥大効果は、筋内の Akt リン酸化活性の増大を介した mTOR および p70S6K リン酸化活性の増大の繰り返しに関与する (Baar and Esser. 1999; Brook et al. 2015; Damas et al. 2016; Dreyer et al. 2006; Drummond et al. 2009; Goodman et al. 2011; Phillips et al. 1997; Strasser and Pesta. 2013)。したがって、習慣的なレジスタンス運動は、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与し、その分子機序として高血糖改善効果に筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路、筋肥大効果に筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の亢進が関与することが示されている。

性ステロイドホルモンは、筋タンパク合成やエネルギー代謝の亢進など、生体内における様々な役割を担う (Bhasin et al. 1996; Brodsky et al. 1996; Ikeda et al. 2019; Usui et al. 2014; Yoshioka et al. 2006)。骨格筋内で DHEA は、3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD により、テストステロンに代謝・合成され、その後、テストステロンから 5 $\alpha$ -reductase を介して、DHT が代謝・合成される (Aizawa et al. 2007; Sato et al. 2008)。2 型糖尿病モデルラットでは、健常モデルラットと比較して、筋内の DHEA、DHT 濃度および 3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現が低下する (Sato et al. 2013)。また、2 型糖尿病モデルラットにおける DHEA の長期投与は、筋内の DHT 濃度を増大させ、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進を介して、高血糖状態を改善させる可能性が示されている (Sato et al. 2011)。さらに、高齢者における習慣的なレジスタンス運動は、筋内の DHT 濃度を増大させ、筋量の増大効果と正の相関関係が認められている (Sato et al. 2014b)。加えて、単回もしくは慢性的な皮下からの DHT 投与は、筋横断面積の増大、筋内の mTOR および p70S6K リン

酸化活性を増大させる (Xu et al. 2004; Zeng et al. 2017)。これらの先行研究の結果から、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与する可能性が考えられる。しかしながら、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与するか否かは明らかではない。

そこで研究課題 I では、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与し、その分子機序として高血糖改善効果に筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路、筋肥大効果に筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の亢進に関与するか否かを検討することを目的とした。本研究では、2 型糖尿病モデルラット (OLETF: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) を用いて、8 週間のレジスタンス運動を実施した。また、習慣的なレジスタンス運動期間中に DHT 合成を抑制することにより、高血糖改善および筋肥大効果、関連シグナル経路の亢進が減弱するか否かを検討するために、8 週間のレジスタンス運動とともに 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤を慢性投与した。

### 3-2. 方法

#### 1) 対象

本研究は、「立命館大学びわこ・くさつキャンパス動物実験委員会（倫理委員会）」の承認を受け、研究を実施した。6 週齢の雄 OLETF ラット（日本 SLC 株式会社製、Shizuoka, Japan）24 匹を 2 型糖尿病モデルラットとして用いた (Horii et al. 2019; Sato et al. 2017)。20 週齢まで安静飼育後、各群の体重および空腹時血糖値が均等になるように、2 型糖尿病安静対照群 (OLETF-Con 群) および習慣的なレジスタンス運動群 (OLETF-RT 群)、習慣的なレジスタンス運動に加えて 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤を慢性的に投与する群

(OLETF-RT+In 群) の 3 群に分類した (各群 N=8)。また、6 週齢の雄 LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラット（日本 SLC 株式会社製）8 匹を健常安静対照群 (LETO 群) として同様に安静飼育した。飼育は、室温 26 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、湿度 50 $\pm$ 5%、12 時間ごとの明暗サイクル (8:00 a.m.-8:00 p.m.) の環境下で実施し、一般用飼料 CE-2（日本クレア社製、Tokyo, Japan）および脱イオン蒸留水を自由摂取させた。5 $\alpha$ -reductase 抑制剤

(Dutasteride; Sigma 社製、Steinheim, Germany) は、オスモティックミニポンプ法 (モデル 2006; Alzet 社製、Cupertino, CA, USA) を用いて、OLETF-RT+In 群の各ラットの背面頸部から皮下に埋め込み、1 時間に 0.15 $\mu$ l ずつ、8 週間継続的に慢性投与した (Sato et al.

2013; Searls et al. 2010)。5 $\alpha$ -reductase 抑制剤は、体重 1kg あたりに 2mg をゴマ油に溶解し、オスモティックミニポンプに充填した (Sato et al. 2013)。一過性の運動の影響を除去するために、トレーニング最終の運動から 48 時間以上経過した後、かつ、食事の影響を除去するために 12 時間以上の空腹状態で体重を測定し、2%セボフルランによる吸引麻醉下にて、腹部大静脈から血液を採取した。その後、脱血による安楽死処置し、腓腹筋およびヒラメ筋、足底筋、精巣上体脂肪を摘出した。摘出した腓腹筋およびヒラメ筋、足底筋、精巣上体脂肪は、冷生理食塩水にて洗浄し、付着している血液を取り除き、組織重量を測定した。その後、液体窒素にて凍結し、分析を行うまで-80°Cで冷凍保存した。

## 2) 習慣的なレジスタンス運動

レジスタンス運動は、ラダーを用いたクライミング運動 (長さ 1.1m、グリップ幅 2.0cm、傾斜 80°) を 4×3 セット、週 3 日、8 週間実施した (Donatto et al. 2013; Horii et al. 2018; Hornberger and Farrar. 2004; Kim et al. 2012; Matheny et al. 2009)。セット間の休憩は 1 分間とした。運動介入実施の 1 週間前に、すべてのラットに対して、クライミング運動に慣れさせるために 4×1 セットのレジスタンス運動を実施した。

## 3) タンパク発現解析

摘出した腓腹筋 (100-150mg) は、ホモジェナイズバッファー: 20mM Tris HCl (pH 7.8)、300mM NaCl、2mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、2mM dithiothreitol (DTT)、2% Nonidet P-40、0.2% sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.2% sodium deoxycholate、0.5mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、60 $\mu$ g/ml aprotinin、1 $\mu$ g/ml leupeptin に protease inhibitor (Roche Science 社製、Penzberg, Upper Bavaria, Germany)、phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich 社製、St. Louis, MO, USA) を加え、ホモジェナイズした。その後、4°Cで 30 分間攪拌したサンプルは、12,000g、4°Cで 15 分間遠心し、得られた上清をタンパク抽出サンプルとした。タンパク定量は、Protein Assay Rapid Kit (Wako 社製、Tokyo, Japan) を用いて、マイクロプレートリーダー (xMark Microplate Spectrophotometer; Bio-Rad Laboratories 社製、Hercules, CA, USA) により、605nm の吸光度にて測定した。3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase、Akt、mTOR、p70S6K タンパク発現および Akt、5' AMP-activated protein kinase (AMPK)、mTOR、p70S6K リン酸化活性を Western blotting 法にて測定した (Horii et al. 2018; Sato et al. 2011)。抽出した 40 $\mu$ g タンパ

ク分画を Laemmli buffer にて、96°Cで 10 分間加熱した。各分画のタンパクは、10% SDS-polyacrylamide ゲルと泳動槽（Wako 社製）を用いて、SDS-PAGE により分離した。SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンにタンパクを 20V、60 分間の条件下にて転写した。転写されたメンブレンは、5% skim milk、0.1% Tween を含む phosphate-buffered saline (blocking buffer) を用いて、室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、5% blocking buffer にて、一次抗体: 3 $\beta$ -HSD (1: 1000; sc-30820, Santa Cruz Biotechnology 社製、Dallas、TX、USA) および 17 $\beta$ -HSD (1: 1000; sc-26963, Santa Cruz Biotechnology 社製)、5 $\alpha$ -reductase (1: 1000; #H00006715-D01P, Abnova Corporation 社製、Taipei、Taiwan)、serine (Ser) 473-phosphorylated Akt (1: 1000; #9271, Cell Signaling Technology 社製、Denvers、MA、USA)、total Akt (1: 1000; #9272, Cell Signaling Technology 社製)、threonine (Thr) 172-phosphorylated AMPK (1: 1000; #2535, Cell Signaling Technology 社製)、total AMPK (1: 1000; #2532, Cell Signaling Technology 社製)、Ser 2448-phosphorylated mTOR (1: 1000; #2971, Cell Signaling Technology 社製)、total mTOR (1: 1000; #2983, Cell Signaling Technology 社製)、Thr 389-phosphorylated p70S6K (1: 1000; #9205, Cell Signaling Technology 社製)、total p70S6K (1: 1000; #2708, Cell Signaling Technology 社製) を 4°Cで 12 時間インキュベーションした。 $\beta$ -actin (1: 3000; #4967, Cell Signaling Technology 社製) をローディングコントロールとして用いた。反応後は、メンブレンを PBS-0.1% tween にて 3 回洗浄し、二次抗体: horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit (1: 3000; Cell Signaling Technology 社製: GE Healthcare Bio-sciences 社製、Pittsburgh、PA、USA) および anti-goat (1: 3000; Santa Cruz Biotechnology 社製) immunoglobulin secondary antibodies を 5% blocking buffer で希釈し、60 分間室温にてインキュベートした。その後、PBS-0.1% tween にて 3 回洗浄したメンブレンは、発光液 (Enhanced Chemiluminescence Plus system; GE Healthcare Bio-sciences 社製) に 5 分間浸け、LAS4000 imager (GE Healthcare Bio-sciences 社製) を用いてタンパクを検出した。Image J 1.48 ソフトウェア (National Institutes of Health 社製、Bethesda、MD、USA) を用いて、3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase、Akt、mTOR、p70S6K タンパク発現量は、 $\beta$ -actin タンパク発現量を除して算出し、Akt、AMPK、mTOR、p70S6K リン酸化活性は、それぞれの総タンパク発現量を除して算出した。

#### 4) GLUT4 トランスロケーション解析

摘出した腓腹筋 (100-150mg) は、Buffer A: 20mM Tris (pH 7.4)、1mM EDTA、0.25mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)、1mM DTT、50mM NaF、25mM sodium pyrophosphate、40mM  $\beta$ -glycerophosphate、250mM sucrose を用いて、ホモジェナイズした。その後、400g、4°Cで 15 分間遠心し、不純物を除去し、上清を再び 50,000rpm で 1 時間遠心分離し、得られた上清を細胞質サンプルとして用いた。さらに、沈殿したペレットは Buffer B: 20mM Tris (pH 7.4)、1mM EDTA、0.25mM EGTA、2% Triton X-100、50mM NaF、25mM sodium pyrophosphate、40mM  $\beta$ -glycerophosphate を用いて、1 時間可溶化した。その後、50,000rpm、4°Cで 1 時間遠心し、上清を細胞膜サンプルとして用いた (Benomar et al. 2006; Kristiansen et al. 2001; Sato et al. 2011)。タンパク定量は、Protein Assay Rapid Kit (Wako 社製) を用いて、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories 社製) により、605nm にて測定した。その後、細胞質および細胞膜サンプルを用いて、GLUT4 タンパク発現量 (#07-1404, Millipore 社製、Billerica, MA, USA) を Western blotting 法にて測定した。Image J 1.48 ソフトウェア (National Institutes of Health 社製) を用いて、細胞質および細胞膜 GLUT4 タンパク発現量は、 $\beta$ -actin タンパク発現量を除して算出した。GLUT4 トランスロケーションは、 $\beta$ -actin タンパク発現量を除して算出した細胞膜 GLUT4 タンパク発現量と細胞質 GLUT4 タンパク発現量の差から算出した (Sato et al. 2011, 2017)。

#### 5) 性ステロイドホルモン濃度測定

筋内の DHEA (Enzo Life Science 社製、Farmingdale, NY, USA) および遊離テストステロン (IBL International 社製、Hamburg, Germany)、DHT 濃度 (IBL International 社製) は、酵素免疫測定法 (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用いて測定した (Sato et al. 2011)。吸光度値は、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories 社製) を用いて、DHEA 濃度は 405nm、遊離テストステロンおよび DHT 濃度は 450nm の波長で測定し、標準曲線から各ラットの DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度を算出した。また、血中 DHEA および DHT 濃度を同様の方法で測定した (Sato et al. 2011)。

#### 6) 空腹時血糖値およびインスリン濃度測定

12 時間以上の空腹状態で、腹部大静脈から血液を採取し、血糖値測定機器（TERUMO CORPORATION 社製、Tokyo、Japan）を用いて、空腹時血糖値を測定した。また、空腹時血清インスリン濃度（シバヤギ社製、Gunma、Japan）は、ELISA 法を用いて測定した。吸光度値は、マイクロプレートリーダー（Bio-Rad Laboratories 社製）を用いて、450nm の波長で測定し、標準曲線から各ラットのインスリン濃度を算出した。さらに、インスリン感受性の指標である quantitative insulin sensitivity check index（QUICKI）は、 $1/[\log \text{空腹時インスリン} (\mu\text{U/mL}) + \log \text{空腹時血糖値} (\text{mg/dL})]$  で算出した（Cacho et al. 2008; Motamed et al. 2016; Sato et al. 2012）。

#### 7) 筋横断面積測定

腓腹筋における筋線維の横断面積を測定するために、クライオスタット（LEICA Microsystems 社製、Wetzlar、Germany）を用いて、10 $\mu\text{m}$  で組織切片を作製し、Hematoxylin-Eosin（HE）染色を実施した（Liu et al. 2014）。HE 染色を実施した組織切片は、光学顕微鏡（LEICA Microsystems 社製）を用いて、 $\times 400$  倍の画像を血管周囲および筋膜部分を除く無作為に 10 ヲ所選定した。選択した画像は、Image J 1.48 ソフトウェア（National Institutes of Health 社製）を用いて、筋線維の横断面積を計測した。

#### 8) 統計処理

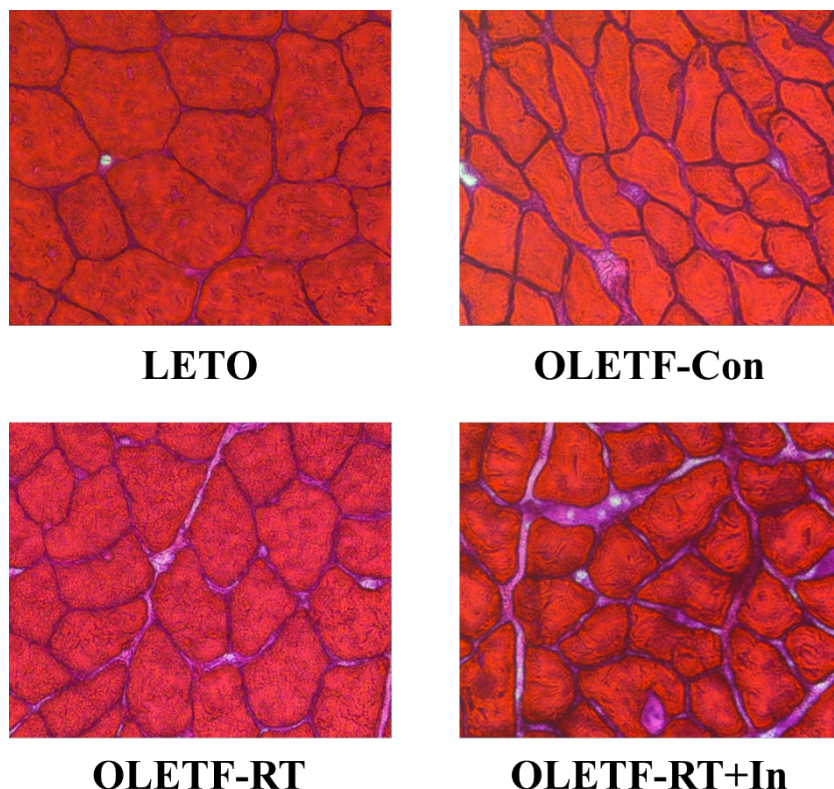
本研究結果は、すべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。4 群間の各測定項目の比較は、一元配置分散分析法により検定し、有意な差が認められた項目には、Fisher の PLSD 法を用いて post-hoc テストを実施した。さらに、各項目の相関関係は、ピアソンの相関関係によって検討するとともに、単回帰により回帰直線を求めた。危険率（P）は 5%未満を有意水準とした。すべての統計解析は、StatView 5.0（SAS 社製、Cary、NC、USA）を使用した。

### 3-3. 結果

#### 1) 体重および精巣上体脂肪、骨格筋重量、筋横断面積の比較

OLETF-Con 群の体重および精巣上体脂肪は、LETO 群と比較して有意に高値を示した（ $P < 0.05$ , Table 1）。OLETF-RT 群の体重および精巣上体脂肪は、OLETF-Con 群と比較し

て有意に低値を示したが ( $P < 0.05$ , Table 1)、OLETF-RT+In 群では OLETF-RT 群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Table 1)。また、OLETF-Con 群の腓腹筋重量および筋横断面積、ヒラメ筋、足底筋重量は、LETO 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Table 1, Figure 7)。OLETF-RT 群の腓腹筋重量および筋横断面積、ヒラメ筋、足底筋重量は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示したが ( $P < 0.05$ , Table 1, Figure 7)、OLETF-RT+In 群では OLETF-RT 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Table 1, Figure 7)。



**Figure 7: Representative histological images of cross sectional gastrocnemius muscle, stained with hematoxylin and eosin.**

## 2) 空腹時血糖値および血中インスリン濃度、QUICKI の比較

OLETF-Con 群の空腹時血糖値および血中インスリン濃度は、LETO 群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Table 1)。OLETF-RT 群の空腹時血糖値は、OLETF-Con 群と比較して有意に低値を示したが ( $P < 0.05$ , Table 1)、OLETF-RT+In 群では OLETF-RT 群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Table 1)。しかしながら、OLETF-Con 群の血中インスリン濃度は、OLETF-RT 群および OLETF-RT+In 群の 3 群間で有意な差は認められなかった (Table 1)。また、OLETF-Con 群の QUICKI は、LETO 群と比較して有意に低値を示



した ( $P < 0.05$ , Table 1)。OLETF-RT 群の QUICKI は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示したが ( $P < 0.05$ , Table 1)、OLETF-RT+In 群では OLETF-RT 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Table 1)。

**Table 1. Animal characteristics**

	LETO (N = 8)	OLETF-Con (N = 8)	OLETF-RT (N = 8)	OLETF-RT+In (N = 8)
BW (g)	480.5 $\pm$ 10.5	624.9 $\pm$ 6.0*	588.4 $\pm$ 10.6†	638.4 $\pm$ 6.9‡
Epididymal fat mass (g)	8.8 $\pm$ 0.2	16.1 $\pm$ 1.1*	13.0 $\pm$ 0.9†	15.7 $\pm$ 1.1‡
Gastrocnemius muscle mass/ BW (mg/g BW)	4.92 $\pm$ 0.15	3.33 $\pm$ 0.08*	4.25 $\pm$ 0.08†	3.61 $\pm$ 0.12‡
Soleus muscle mass / BW (mg/g BW)	0.39 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.01*	0.37 $\pm$ 0.01†	0.30 $\pm$ 0.01‡
Plantaris muscle mass / BW (mg/g BW)	0.85 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.02*	0.78 $\pm$ 0.03†	0.71 $\pm$ 0.02‡
Gastrocnemius muscle CSA ( $\mu\text{m}^2$ )	2084.1 $\pm$ 68.3	1405.9 $\pm$ 53.2*	1787.7 $\pm$ 26.2†	1572.2 $\pm$ 68.6†‡
Fasting blood glucose level (mg/dl)	109 $\pm$ 6	350 $\pm$ 13*	184 $\pm$ 19†	290 $\pm$ 28†‡
Fasting insulin level (pmol/l)	1.3 $\pm$ 0.1	10.9 $\pm$ 1.0*	10.0 $\pm$ 1.1	10.2 $\pm$ 1.0
QUICKI (AU)	0.44 $\pm$ 0.01	0.27 $\pm$ 0.00*	0.30 $\pm$ 0.01†	0.28 $\pm$ 0.00‡

Data are expressed as means  $\pm$  standard error (SE). LETO: healthy sedentary-control group, OLETF-Con: OLETF-sedentary control group, OLETF-RT: OLETF-resistance training group, OLETF-RT+In: OLETF-resistance training +5 $\alpha$ -reductase inhibitor group. \* $P < 0.05$  vs. LETO. † $P < 0.05$  vs. OLETF-Con. ‡ $P < 0.05$  vs. OLETF-RT. AU: arbitrary units, BW: body weight, CSA: cross sectional area, QUICKI: quantitative insulin sensitivity check index.

### 3) 血中性ステロイドホルモン濃度の比較

OLETF-Con 群の血中 DHEA および DHT 濃度は、LETO 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Table 2)。OLETF-RT 群および OLETF-RT+In 群の血中 DHEA 濃度は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Table 2)。しかしながら、OLETF-RT 群の血中 DHT 濃度は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示したが ( $P < 0.05$ , Table 2)、OLETF-RT+In 群では OLETF-RT 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Table 2)。

**Table 2. Plasma sex steroid hormone levels**

	LETO (N = 8)	OLETF-Con (N = 8)	OLETF-RT (N = 8)	OLETF-RT+In (N = 8)
Plasma DHEA (pg/ml)	4184.7 $\pm$ 282.4	2429.1 $\pm$ 113.9*	3482.8 $\pm$ 241.5†	3277.6 $\pm$ 221.8‡
Plasma DHT (pg/ml)	202.7 $\pm$ 14.6	51.5 $\pm$ 7.2*	99.1 $\pm$ 9.9†	15.3 $\pm$ 1.9‡

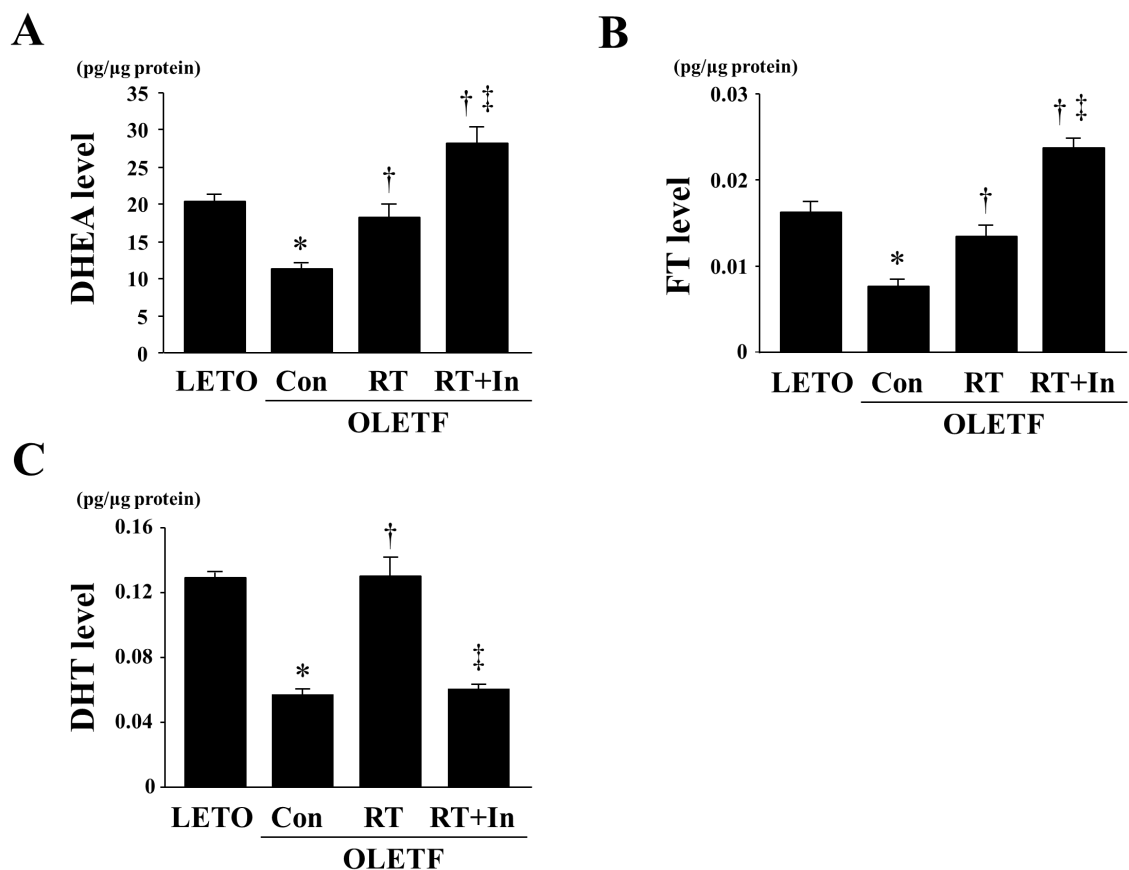
Data are expressed as means  $\pm$  SE. LETO: healthy sedentary-control group, OLETF-Con: OLETF-sedentary control group, OLETF-RT: OLETF-resistance training group, OLETF-RT+In: OLETF-

resistance training +5 $\alpha$ -reductase inhibitor group. \*P < 0.05 vs. LETO. †P < 0.05 vs. OLETf-Con.

‡P < 0.05 vs. OLETf-RT. DHEA: dehydroepiandrosterone, DHT: 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone.

#### 4) 筋内の性ステロイドホルモン濃度の比較

OLETF-Con 群の筋内の DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度は、LETO 群と比較して有意に低値を示した (P < 0.05, Figure 8A-C)。OLETF-RT 群および OLETf-RT+In 群の筋内の DHEA および遊離テストステロン濃度は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示した (P < 0.05, Figure 8A, B)。また、OLETF-RT+In 群の筋内の DHEA および遊離テストステロン濃度は、OLETF-RT 群と比較して有意に高値を示した (P < 0.05, Figure 8A, B)。しかしながら、OLETF-RT 群の筋内の DHT 濃度は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示したが (P < 0.05, Figure 8C)、OLETF-RT+In 群では OLETf-RT 群と比較して有意に低値を示した (P < 0.05, Figure 8C)。

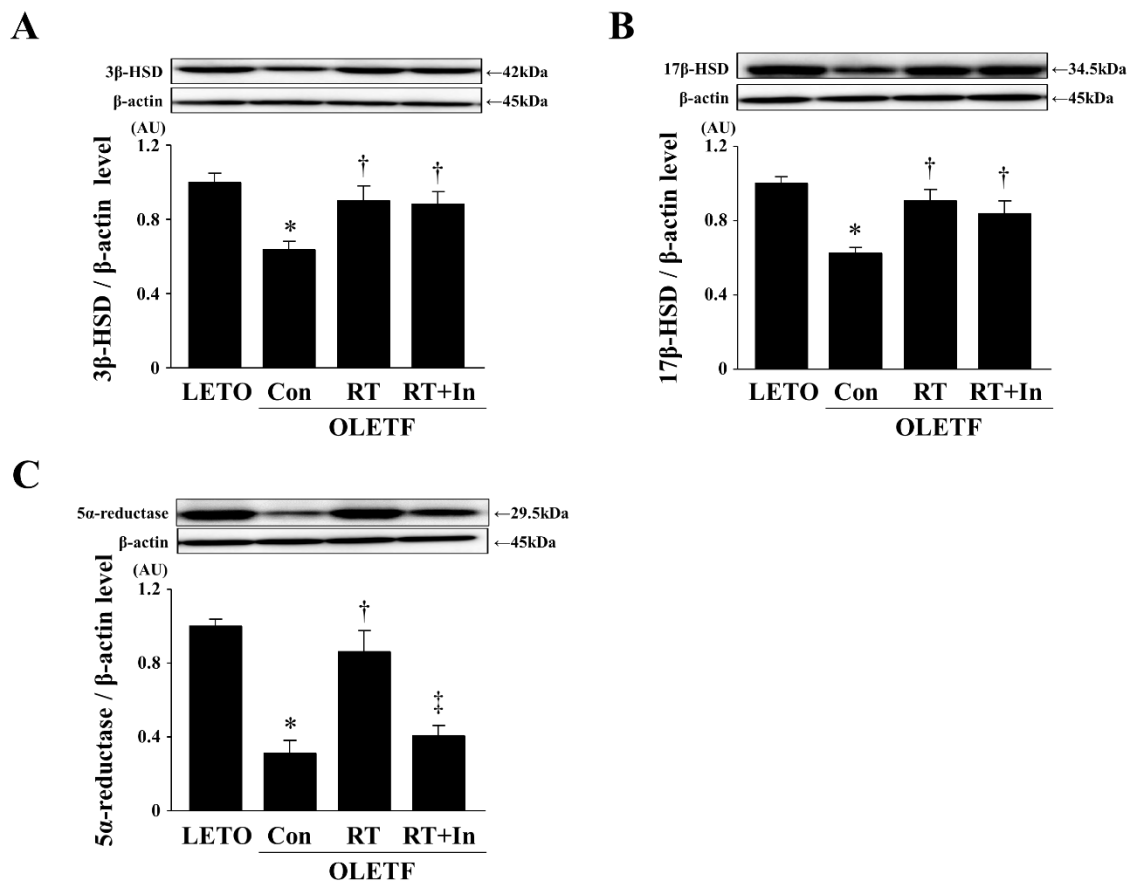


**Figure 8: Effect of chronic RT on the levels of DHEA (A), free testosterone (FT: B) and DHT (C) in the gastrocnemius muscle.**

Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  vs. LETO. † $P < 0.05$  vs. OLETf-Con. ‡ $P < 0.05$  vs. OLETf-RT.

#### 5) 筋内の性ステロイドホルモン合成酵素タンパク発現の比較

OLETF-Con 群の筋内の 3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現は、LETO 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 9A-C)。OLETF-RT 群および OLETf-RT+In 群の筋内の 3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD タンパク発現は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 9A, B)。しかしながら、OLETF-RT 群の筋内の 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示したが ( $P < 0.05$ , Figure 9C)、OLETF-RT+In 群では OLETf-RT 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 9C)。

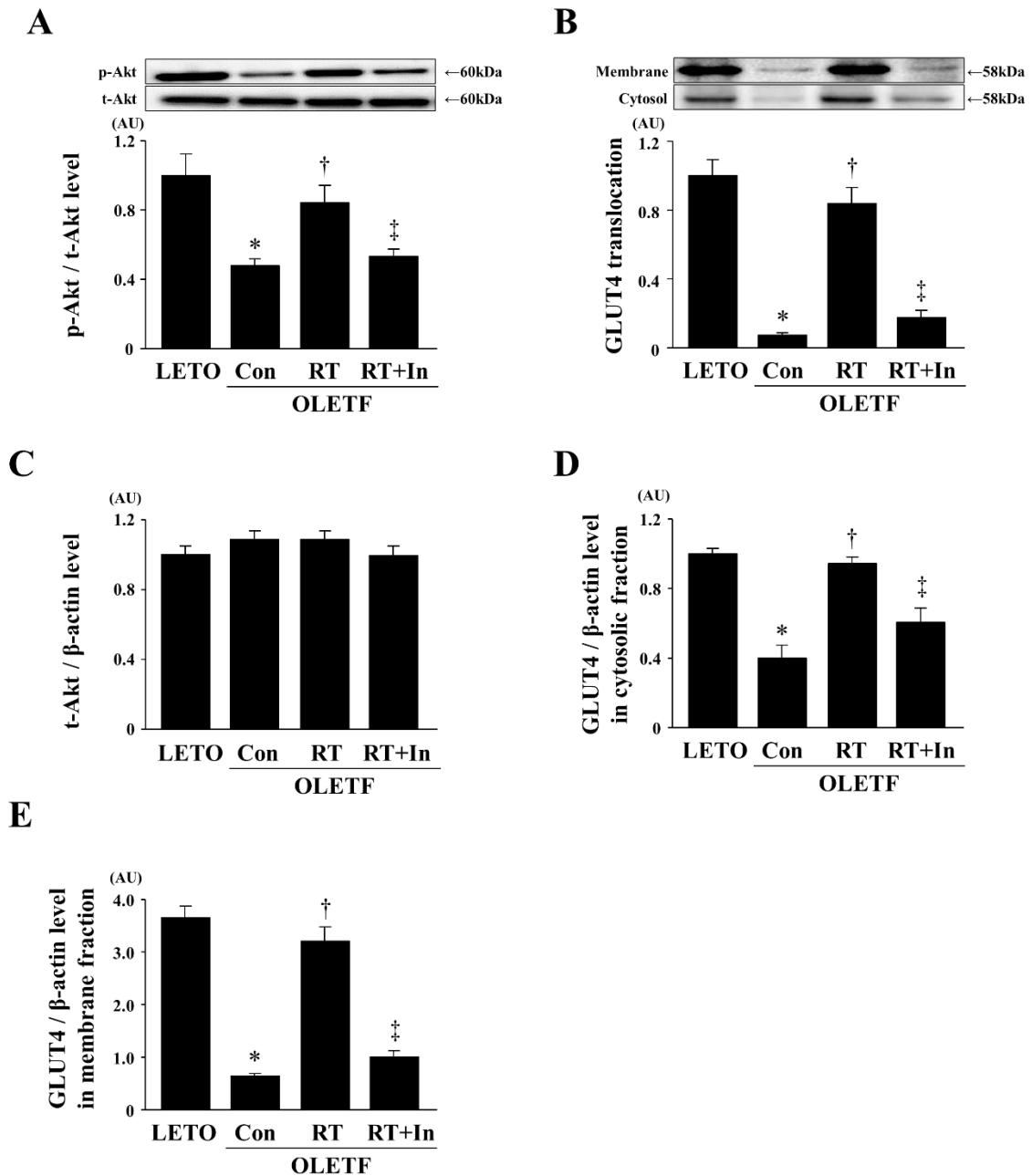


**Figure 9: Effect of chronic RT on the levels of 3 $\beta$ -HSD (A), 17 $\beta$ -HSD (B) and 5 $\alpha$ -reductase (C) protein in the gastrocnemius muscle.**

Representative images of the immunoblots and histograms of 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD and 5 $\alpha$ -reductase proteins are shown.  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The levels of 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD and 5 $\alpha$ -reductase proteins are represented as fold changes relative to the respective levels in the LETO group. AU: arbitrary units. Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  vs. LETO. † $P < 0.05$  vs. OLETF-Con. ‡ $P < 0.05$  vs. OLETF-RT.

#### 6) 筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路、Akt および GLUT4 総タンパク発現の比較

OLETF-Con 群の筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性および GLUT4 トランスロケーションは、LETO 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 10A, B)。OLETF-RT 群の筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性および GLUT4 トランスロケーションは、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 10A, B)。しかしながら、OLETF-RT+In 群の筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性および GLUT4 トランスロケーションは、OLETF-RT 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 10A, B)。また、筋内の Akt 総タンパク発現は、4 群間で有意な差は認められなかった (Figure 10C)。OLETF-Con 群の細胞質および細胞膜 GLUT4 総タンパク発現は、LETO 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 10D, E)。OLETF-RT 群の細胞質および細胞膜 GLUT4 総タンパク発現は、OLETF-Con 群と比較して有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 10D, E)。しかしながら、OLETF-RT+In 群の細胞質および細胞膜 GLUT4 総タンパク発現は、OLETF-RT 群と比較して有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 10D, E)。

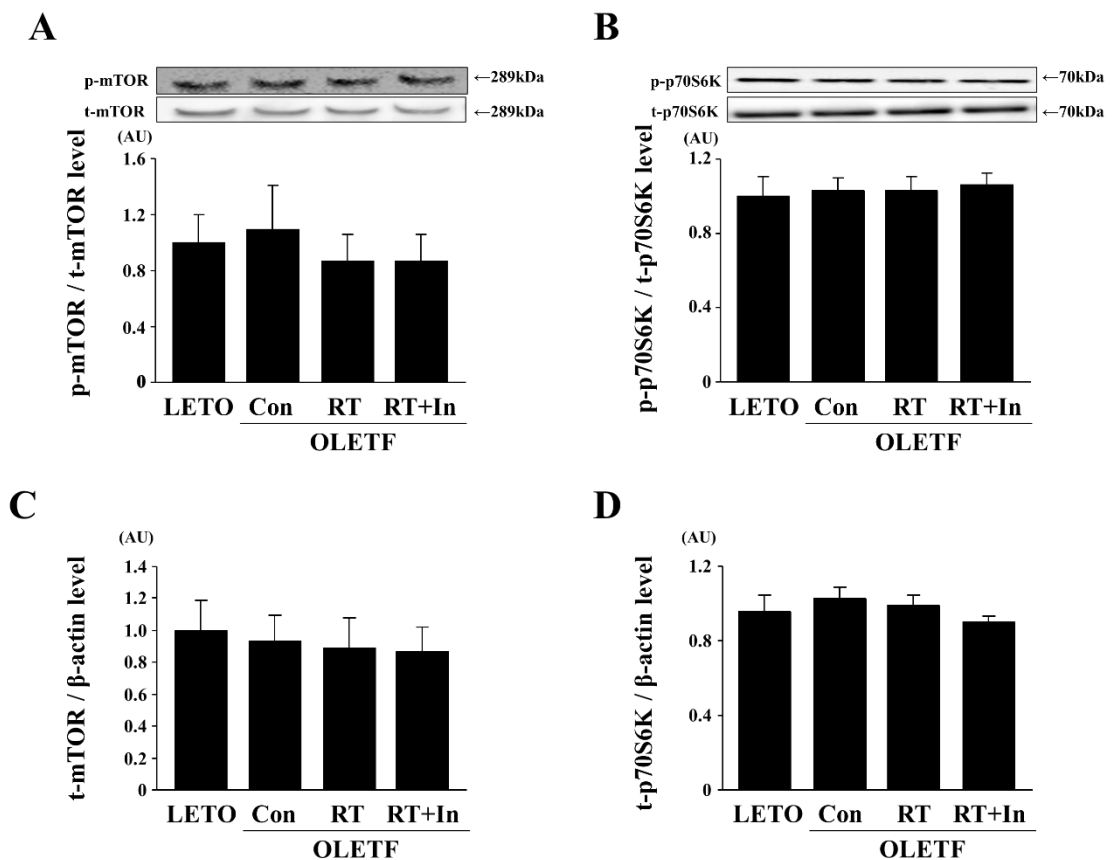


**Figure 10: Effect of chronic RT on the phosphorylation of Akt at Ser473 (A), GLUT4 translocation (B), Akt (C), cytosolic GLUT4 (D) and membrane GLUT4 protein (E) levels in the gastrocnemius muscle.**

Representative images of the immunoblots and histograms of Akt phosphorylation and protein levels, GLUT4 in cytosolic and membrane fractions are shown.  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The Akt phosphorylation and protein, GLUT4 translocation levels are represented as fold changes relative to the respective levels in the LETO group. The GLUT4 protein levels in

cytosolic and membrane fractions are represented as fold changes from the cytosol in the LETO group. AU: arbitrary units. Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  vs. LETO. † $P < 0.05$  vs. OLETF-Con. ‡ $P < 0.05$  vs. OLETF-RT.

7) 筋肉の mTOR/p70S6K シグナル経路、mTOR および p70S6K 総タンパク発現の比較  
 筋肉の mTOR<sup>Ser2448</sup> および p70S6K<sup>Thr389</sup> リン酸化活性は、4 群間で有意な差が認められなかった (Figure 11A, B)。また、筋肉の mTOR および p70S6K 総タンパク発現は、4 群間で有意な差は認められなかった (Figure 11C, D)。

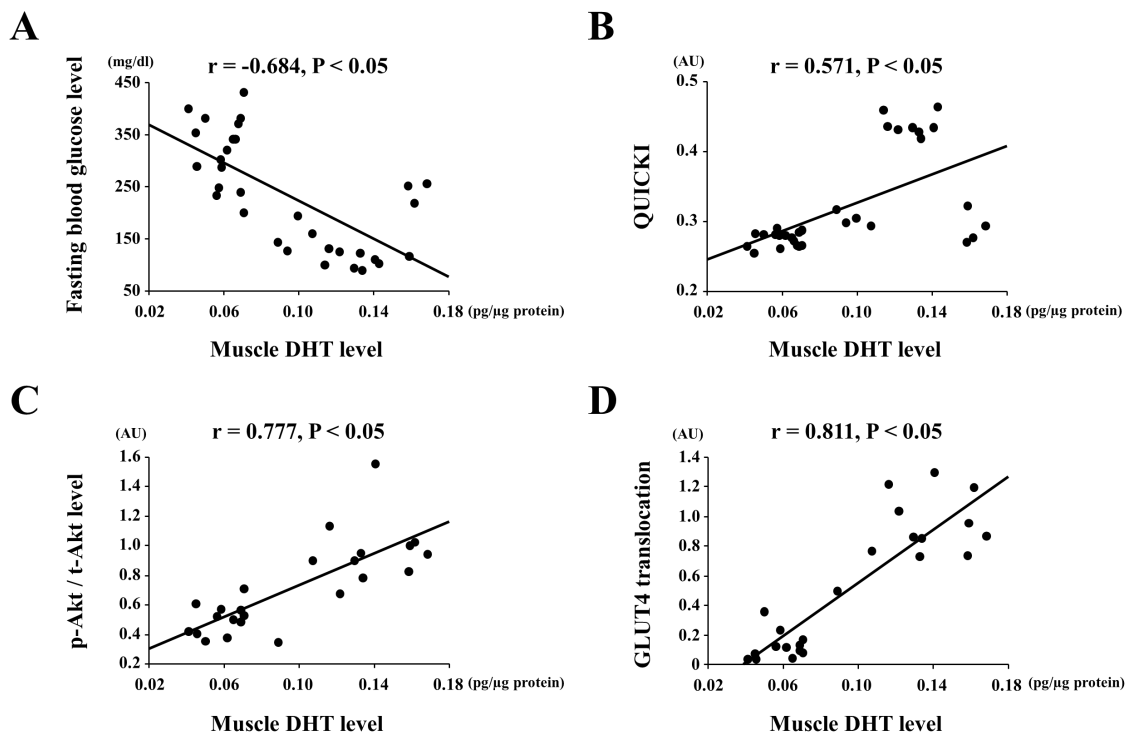


**Figure 11: Effect of chronic RT on the phosphorylation of mTOR at Ser2448 (A) and p70S6K at Thr389 (B), mTOR (C), and p70S6K protein (D) levels in the gastrocnemius muscle.**

Representative images of the immunoblots and histograms of mTOR and p70S6K phosphorylation and protein levels are shown.  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The mTOR and p70S6K phosphorylation and protein levels are represented as fold changes relative to the respective levels in the LETO group. AU: arbitrary units. Data are expressed as means  $\pm$  SE.

## 8) 相関関係

筋内の DHT 濃度と空腹時血糖値との間には、有意な負の相関関係が認められ ( $r = -0.684$ ,  $P < 0.05$ , Figure 12A)、QUICKI ( $r = 0.571$ ,  $P < 0.05$ , Figure 12B) および Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性 ( $r = 0.777$ ,  $P < 0.05$ , Figure 12C)、GLUT4 トランスロケーション ( $r = 0.881$ ,  $P < 0.05$ , Figure 12D)、腓腹筋重量 ( $r = 0.701$ ,  $P < 0.05$ , Figure 13A)、筋横断面積 ( $r = 0.684$ ,  $P < 0.05$ , Figure 13B) との間には有意な正の相関関係が認められた。また、腓腹筋重量と空腹時血糖値との間には、有意な負の相関関係が認められ ( $r = -0.806$ ,  $P < 0.05$ , Figure 14A)、QUICKI との間には有意な正の相関関係が認められた ( $r = 0.825$ ,  $P < 0.05$ , Figure 14B)。さらに、筋横断面積と空腹時血糖値との間には有意な負の相関関係が認められ ( $r = -0.761$ ,  $P < 0.05$ , Figure 14C)、QUICKI との間には有意な正の相関関係が認められた ( $r = 0.797$ ,  $P < 0.05$ , Figure 14D)。



**Figure 12: Association between the muscle DHT level and fasting blood glucose level (A), QUICKI (B), Akt phosphorylation (C), and GLUT4 translocation (D) levels in gastrocnemius muscle.**

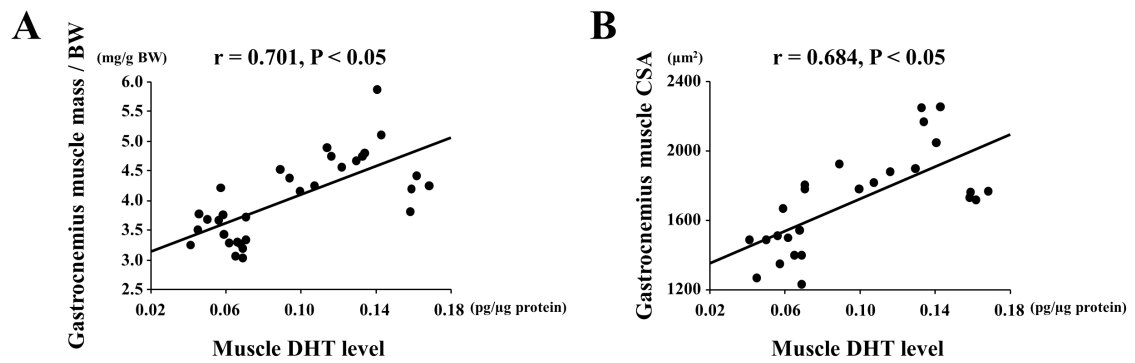


Figure 13: Association between the muscle DHT level and gastrocnemius muscle mass (A) and CSA (B).

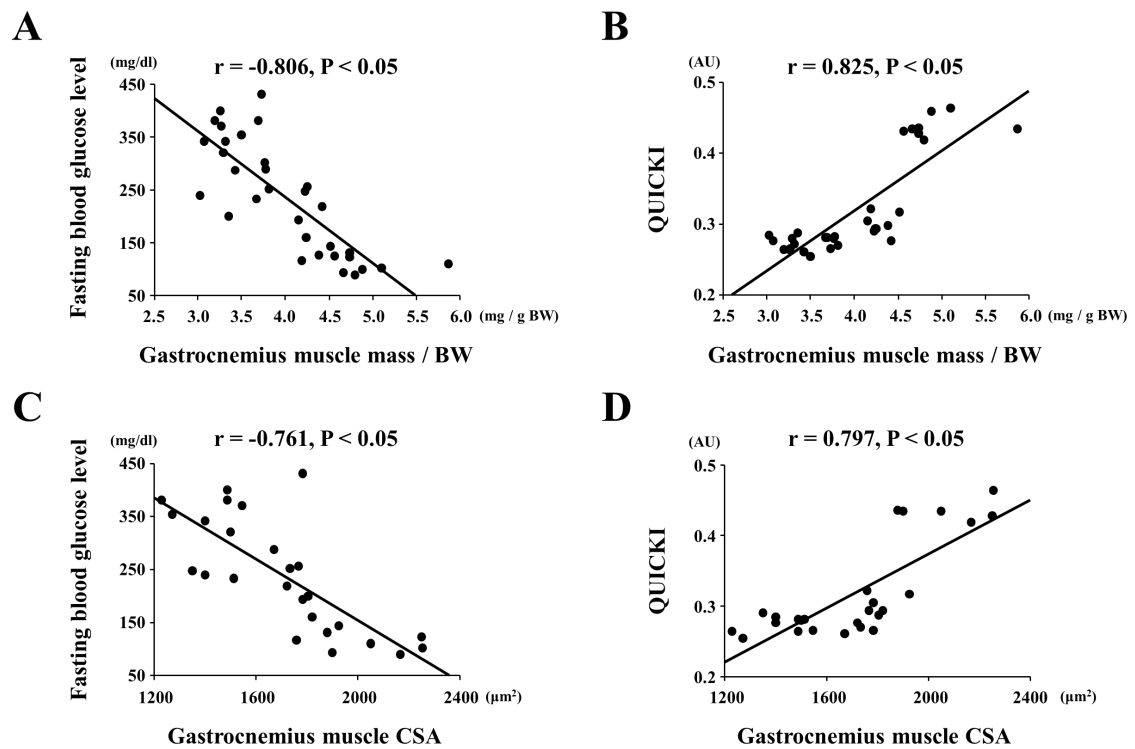


Figure 14: Association between the gastrocnemius muscle mass or CSA and fasting blood glucose level (A, C), QUICKI (B, D).

### 3-4. 考察

本研究は、8 週間のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与するか否か、その分子機序として高血糖改善効果に筋



内の Akt/GLUT4 シグナル経路、筋肥大効果に筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の亢進が関与するか否かを検討した。2 型糖尿病モデルラットにおける習慣的なレジスタンス運動は、空腹時血糖値を低下させ、インスリン感受性の指標である QUICKI および骨格筋量、筋横断面積を増大させた。また、習慣的なレジスタンス運動は、筋内の DHEA、遊離テストステロン、DHT 濃度および 3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現を増大させた。さらに、習慣的なレジスタンス運動は、筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性を増大および GLUT4 トランスロケーションを亢進させた。一方で、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与は、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大に加えて、空腹時血糖値および QUICKI の改善、骨格筋量および筋横断面積の増大、筋内の Akt<sup>Ser473</sup>/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させた。しかしながら、習慣的なレジスタンス運動および 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与による筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup> および p70S6K<sup>Thr389</sup> リン酸化活性の変動は認められなかった。また、筋内の DHT 濃度と空腹時血糖値との間には負の相関関係、筋内の DHT 濃度と QUICKI および筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性、GLUT4 トランスロケーション、骨格筋量、筋横断面積との間には正の相関関係が認められた。これらの結果から、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、2 型糖尿病モデルラットの高血糖改善および筋肥大効果に関与し、高血糖改善効果の分子機序の 1 つに、筋内の Akt<sup>Ser473</sup>/GLUT4 シグナル経路の亢進が関与する可能性が示唆された。

本研究は、習慣的なレジスタンス運動が、2 型糖尿病により低下した筋内の DHEA、遊離テストステロン、DHT 濃度および 3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現を増大させた。骨格筋内で DHEA は、3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD により、テストステロンに代謝・合成され、テストステロンから 5 $\alpha$ -reductase を介して DHT、P450arom を介して E2 が代謝・合成される (Aizawa et al. 2007; Sato et al. 2008)。それゆえに、習慣的なレジスタンス運動による筋内の 3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD タンパク発現の増大が、筋内の DHEA から遊離テストステロンの代謝・合成を促進、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現の増大が、筋内の遊離テストステロンから DHT の代謝・合成を促進させた可能性が考えられる。加えて、本研究では、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与が、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHEA および遊離テストステロン濃度をさらに増大させた。この結果は、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与が、習慣的なレジスタンス運動による筋内の 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現の増大および DHT 合成を抑制したことで、筋内の DHEA および遊離テストステロンが代謝されずに残存したことが影響していると考えられる。しかしながら、本研究では、2 型糖

尿病における習慣的なレジスタンス運動が、筋内の遊離テストステロンを代謝して、E2 合成を促進させるか否かについては明らかにすることができなかった。そのため、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT と E2 濃度の応答性を検討するためには、5 $\alpha$ -reductase と P450arom の抑制剤を慢性的に単独および併用投与した比較検討が必要である。

本研究は、習慣的なレジスタンス運動が、2 型糖尿病モデルラットの骨格筋量および筋横断面積を増大させた。一方で、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与は、習慣的なレジスタンス運動による骨格筋量および筋横断面積の増大を減弱させた。したがって、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、2 型糖尿病モデルラットの筋肥大効果に関与している可能性が示唆された。しかしながら、本研究では、習慣的なレジスタンス運動による筋内の mTOR および p70S6K リン酸化活性の変動が認められなかった。筋内の p70S6K リン酸化活性は、一過性のレジスタンス運動終了 3-6 時間後をピークに増大し、その後、徐々に発現が低下し、運動終了 48 時間後には安静時まで発現が低下することが報告されている (Baar and Esser. 1999; Coffey et al. 2007; Karagounis et al. 2010)。本研究では、一過性のレジスタンス運動の影響を除去するために、最終のレジスタンス運動終了 48 時間以上経過してから骨格筋を摘出したため、一過性のレジスタンス運動による筋内の mTOR および p70S6K リン酸化活性が安静状態の発現まで低下していたと考えられる。習慣的なレジスタンス運動による筋肥大効果は、一過性のレジスタンス運動による筋タンパク合成の促進が、慢性的に繰り返されることで誘発されることが知られている

(Baar and Esser. 1999; Brook et al. 2015; Damas et al. 2016; Dreyer et al. 2006; Drummond et al. 2009; Goodman et al. 2011; Phillips et al. 1997; Strasser and Pesta. 2013)。そのため、習慣的なレジスタンス運動による 2 型糖尿病の筋肥大効果に、筋内の DHT 濃度の増大が関与するか否かを明らかにするためには、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の亢進に関与するか否かを検討する必要がある。

習慣的なレジスタンス運動による高血糖改善効果の分子機序の 1 つには、筋内の Akt リン酸化活性および細胞質 GLUT4 総タンパク発現の増大が関与することが報告されている (Kido et al. 2018; Kim et al. 2015; Krisan et al. 2004; Tabata et al. 1999; Yaspelkis et al. 2002)。本研究も、2 型糖尿病モデルラットにおける習慣的なレジスタンス運動が、筋内の Akt リン酸化活性を増大および GLUT4 トランスロケーションを亢進させた。一方で、5 $\alpha$ -

reductase 抑制剤の慢性投与は、習慣的なレジスタンス運動による筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させた。成熟した筋管細胞における DHEA およびテストステロンの添加は、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路を亢進させるが、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の投与は、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させることが報告されている (Sato et al. 2008)。加えて、ストレプトゾトシン投与によってインスリン分泌が著しく低下している状態のラットにおける DHEA の単回投与は、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路を亢進させるが、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与は、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させる (Sato et al. 2009)。したがって、2 型糖尿病モデルラットにおける習慣的なレジスタンス運動は、筋内の DHT 濃度の増大を介して、インスリン非依存的に筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路を亢進させる可能性が考えられる。しかしながら、本研究において、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、インスリン非依存的に筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の直接的な亢進に関与するか否かは明らかにできなかった。筋内の DHT がインスリン非依存的に作用しているか否かを検討するためには、成熟した筋管細胞において、インスリンと DHT を単独および併用添加し、かつインスリン受容体抑制剤および 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の添加による影響を比較検討する必要がある。また本研究において、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、Akt リン酸化活性を亢進させる機序は明らかにできなかった。Akt リン酸化活性には、ホスホイノシチド依存性キナーゼ 1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) および mammalian target of rapamycin complex 2、インテグリン結合キナーゼ (integrin-linked kinase) が関与することが報告されている (Balendran et al. 1999; Persad et al. 2000; Sarbassov et al. 2005)。しかしながら、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大を介した筋内の Akt リン酸化活性の亢進に、これらの因子が関与するか否かは明らかではないため、今後検討する必要がある。

運動により筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路が亢進するだけでなく、筋収縮刺激は筋内の AMPK リン酸化活性を増大させ、その下流因子である TBC1 domain family member 1 (TBC1D1) リン酸化活性の増大を介して、GLUT4 トランスロケーションを亢進させることが報告されている (Kido et al. 2016)。また、成熟した筋管細胞における急性的な DHEA の添加は、筋内の AMPK リン酸化活性および GLUT4 mRNA 発現を増大させる (Yokokawa et al. 2015)。本研究において、筋内の AMPK リン酸化活性に及ぼす影響の予備的な検討 (各群 N = 3 で実施) を行った結果、習慣的なレジスタンス運動および 5 $\alpha$ -

reductase 抑制剤の慢性投与による筋内の AMPK<sup>Thr172</sup> リン酸化活性の変動は認められなかった (LETO 群:  $1.00 \pm 0.15$ , OLETF-Con 群:  $0.91 \pm 0.10$ , OLETF-RT 群:  $1.03 \pm 0.06$ , OLETF-RT+In 群:  $1.11 \pm 0.09$ ; [arbitrary units])。筋内の AMPK リン酸化活性は、一過性のレジスタンス運動終了直後から 1 時間後をピークに増大するが、運動終了 3 時間後には安静時まで発現が低下することが報告されている (Kido et al. 2016; Ogasawara et al. 2014)。本研究では、最終のレジスタンス運動終了 48 時間以上経過して骨格筋を摘出したため、一過性のレジスタンス運動による筋内の AMPK リン酸化活性が安静状態の発現まで低下していた可能性が考えられる。そのため、筋内の DHT 濃度の増大が、筋内の AMPK リン酸化活性の増大を介して GLUT4 トランスロケーションの亢進に関与するか否かを明らかにするためには、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、筋内の AMPK/TBC1D1/GLUT4 シグナル経路の亢進に関与するか否かを検討する必要がある。

本研究において、習慣的なレジスタンス運動は、細胞質 GLUT4 総タンパク発現を増大させた。慢性的なタンパク発現の増大には、mRNA の転写および翻訳の増大が関与していると考えられる。GLUT4 mRNA 発現の増大には、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\gamma$  コアクチベーター-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ : peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) と転写調節因子である myocyte enhancer factor 2 との結合の増大が関与する (Michael et al. 2001)。また、習慣的なレジスタンス運動は、筋内の PGC-1 $\alpha$  タンパク発現を増大させる (Jung et al. 2015; Kitaoka et al. 2016)。したがって、習慣的なレジスタンス運動による細胞質 GLUT4 総タンパク発現の増大は、筋内の PGC-1 $\alpha$  タンパク発現の増大を介した GLUT4 の転写調節の亢進が関与すると考えられる。一方で、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与は、習慣的なレジスタンス運動による細胞質 GLUT4 総タンパク発現の増大効果を減弱させた。さらに、筋内の DHT 濃度と筋内の PGC-1 $\alpha$  タンパク発現との間には、正の相関関係が認められる (Horii et al. 2016)。それゆえに、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、筋内の PGC-1 $\alpha$  タンパク発現の増大を介して GLUT4 の転写調節を亢進させ、GLUT4 総タンパク発現の増大に関与する可能性が考えられる。

2 型糖尿病におけるインスリン感受性の低下は、骨格筋量を減少させることが報告されている (Hirata et al. 2019; Tanaka et al. 2018)。また、骨格筋量の減少は、さらなるインスリン感受性の低下を引き起こすことも報告されている (Almurdhi et al. 2016; Atlantis et al. 2009; Kim et al. 2019; Srikanthan et al. 2010, 2011)。本研究は、2 型糖尿病モデルラットにおける習慣的なレジスタンス運動が、骨格筋量および筋横断面積を増大させ、空腹時血糖値

および QUICKI を改善させた。また、骨格筋量および筋横断面積と空腹時血糖値との間には負の相関関係、QUICKI との間には正の相関関係が認められた。したがって、習慣的なレジスタンス運動は、2 型糖尿病モデルラットのインスリン感受性および骨格筋量の両方を増大させ、2 型糖尿病の病態を改善させることを示した。また、本研究では、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与により、習慣的なレジスタンス運動による骨格筋量、筋横断面積の増大および空腹時血糖値、QUICKI の改善を減弱させることを示した。それゆえに、習慣的なレジスタンス運動による 2 型糖尿病の病態改善には、筋内の DHT 濃度の増大が関与している可能性が考えられる。

健常モデルラットと比較して、2 型糖尿病モデルラットでは、筋内の DHEA、DHT 濃度および 3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現が低値を示す (Sato et al. 2013)。本研究も、2 型糖尿病モデルラットでは、筋内の DHEA、遊離テストステロン、DHT 濃度および 3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現が低値を示した。骨格筋内で DHEA は、3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD により、テストステロンに代謝・合成され、テストステロンから 5 $\alpha$ -reductase を介して DHT が代謝・合成される (Aizawa et al. 2007; Sato et al. 2008)。それゆえに、2 型糖尿病による筋内の性ステロイドホルモン合成酵素発現の低下が、筋内の性ステロイドホルモン合成能の低下に関与している可能性が考えられる。また、肥満や糖尿病における高インスリン血症は、副腎の DHEA 合成酵素 (P450c17) の活性を抑制させることが報告されている (Nestler et al. 1992)。したがって、2 型糖尿病により生じる高インスリン血症状態が、副腎からの DHEA 供給を低下させ、筋内の性ステロイドホルモン濃度の低下に関与している可能性が考えられる。さらに、本研究において、筋内の DHT 濃度は、空腹時血糖値と負の相関関係、QUICKI、骨格筋量、筋横断面積、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路と正の相関関係が認められた。これらの結果から、筋内の DHT 濃度の低下は、2 型糖尿病により生じる高血糖状態および筋内の糖取り込みシグナル経路、骨格筋量の低下を誘発させる要因の 1 つである可能性が考えられる。

健常モデルラットと比較して、2 型糖尿病モデルラットでは、血中 DHEA 濃度が低値を示す (Hori et al. 2016; Sato et al. 2011, 2017)。本研究も、2 型糖尿病モデルラットでは、血中 DHEA 濃度が低下していた。肥満や 2 型糖尿病における血中 DHEA 濃度の低下は、内臓脂肪および心血管疾患リスク、骨粗鬆症リスクの増大に関与することが報告されている (De Pergola et al. 1996; Fukui et al. 2007, Lee et al. 2015)。本研究において、習慣的なレジスタンス運動は、2 型糖尿病により低下した血中 DHEA 濃度を増大させた。また、習

慣的な有酸素性運動は、2 型糖尿病により低下した血中 DHEA 濃度を増大させる (Horii et al. 2016; Sato et al. 2011, 2017)。したがって、肥満や 2 型糖尿病および習慣的な運動による血中 DHEA 濃度の変動は、骨格筋だけでなく、脂肪細胞および心臓、血管、骨に作用する可能性があるため、他臓器に及ぼす影響も検討する必要がある。

クライミングを用いたレジスタンス運動は、腓腹筋およびヒラメ筋、足底筋、前脛骨筋、長母指屈筋が動員され、筋肥大効果が生じる (Donatto et al. 2013; Horii et al. 2018; Hornberger and Farrar. 2004; Kim et al. 2012; Matheny et al. 2009)。本研究において、クライミングを用いた習慣的なレジスタンス運動は腓腹筋に加えて、ヒラメ筋および足底筋重量を増大させ、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与は、これらの筋線維タイプの筋肥大効果を減弱させた。3 $\beta$ -HSD および p450arom mRNA 発現は、筋線維タイプ別に差が認められるが、17 $\beta$ -HSD mRNA 発現は、筋線維タイプ別の差が認められないことが報告されている (Aizawa et al. 2007)。しかしながら、習慣的なレジスタンス運動が筋線維タイプ別の性ステロイドホルモンおよび性ステロイドホルモン合成酵素発現に及ぼす影響は明らかでないため、今後検討する必要がある。

本研究において、ほぼ同じ腓腹筋の組織重量からホモジェナイズして得られたタンパク濃度は、群間で差が認められなかった。また、すべてのサンプルのタンパク量を統一して Western blotting を実施した結果、習慣的なレジスタンス運動は、細胞質 GLUT4 総タンパク発現を増大させた。この結果から、腓腹筋の組織重量あたりの細胞質 GLUT4 総タンパク発現量は、習慣的なレジスタンス運動により増大することが示された。加えて、習慣的なレジスタンス運動は、糖取り込み・利用の亢進に関わる生体内で最大の組織である骨格筋を増大させた。したがって、習慣的なレジスタンス運動は、組織重量あたりの細胞質 GLUT4 総タンパク発現を増大させるとともに、骨格筋の総組織重量を増大させることから、糖取り込み・利用の亢進により一層作用する可能性が考えられる。

### 3-5. 小括

習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、2 型糖尿病モデルラットの高血糖改善および筋肥大効果に関与し、高血糖改善効果の分子機序の 1 つに、筋内の Akt<sup>Ser473</sup>/GLUT4 シグナル経路の亢進が関与する可能性が示唆された。

## 第4章 【研究課題Ⅱ】

「一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の糖取り込みおよび筋タンパク合成シグナル経路の亢進に関与するか否かの検討」

### 4-1. 緒言

研究課題Ⅰの結果から、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、2 型糖尿病モデルラットの筋肥大効果に関与する可能性が示唆された。しかしながら、研究課題Ⅰでは、最終のレジスタンス運動終了 48 時間以上経過した安静状態の骨格筋を用いて検討した結果、筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup>/p70S6K<sup>Thr389</sup> シグナル経路の活性化が認められなかったため、筋内の DHT 濃度の増大に関与するか否かは明らかにできなかった。習慣的なレジスタンス運動による筋肥大効果の分子機序には、一過性のレジスタンス運動による筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup> および p70S6K<sup>Thr389</sup> リン酸化活性の亢進を介した、筋タンパク合成の促進が慢性的に繰り返されることで生じることが知られている (Baar and Esser. 1999; Brook et al. 2015; Damas et al. 2016; Dreyer et al. 2006; Drummond et al. 2009; Goodman et al. 2011; Phillips et al. 1997; Strasser and Pesta. 2013)。したがって、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、筋肥大効果に関与する分子機序を解明するためには、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup>/p70S6K<sup>Thr389</sup> シグナル経路の亢進に関与するか否かを検討する必要がある。

運動誘発性の筋収縮刺激による筋内の GLUT4 トランスロケーションを亢進させる主要な因子として、Akt および AMPK リン酸化活性の増大に関与する (Jessen and Goodyear. 2005; Kido et al. 2016)。研究課題Ⅰの結果から、習慣的なレジスタンス運動による筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性は増大していたが、AMPK<sup>Thr172</sup> リン酸化活性は変化していなかった。先行研究において、一過性のレジスタンス運動による筋内の GLUT4 トランスロケーションの亢進には、筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性の増大を介した AS160<sup>Thr642</sup> リン酸化活性の促進および AMPK<sup>Thr172</sup> リン酸化活性の増大を介した TBC1D1<sup>Ser237</sup> リン酸化活性の促進が関与することが示されている (Kido et al. 2016)。研究課題Ⅰでは、最終のレジスタンス運動終了 48 時間以上経過した安静状態の骨格筋を用いて検討したため、筋内の DHT 濃度の増大を介した GLUT4 トランスロケーションの亢進効果の機序を明らかにするためには、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、Akt<sup>Ser473</sup>/AS160<sup>Thr642</sup>/GLUT4 および AMPK<sup>Thr172</sup>/TBC1D1<sup>Thr237</sup>/GLUT4 シグナル経路の亢進に関与するか否

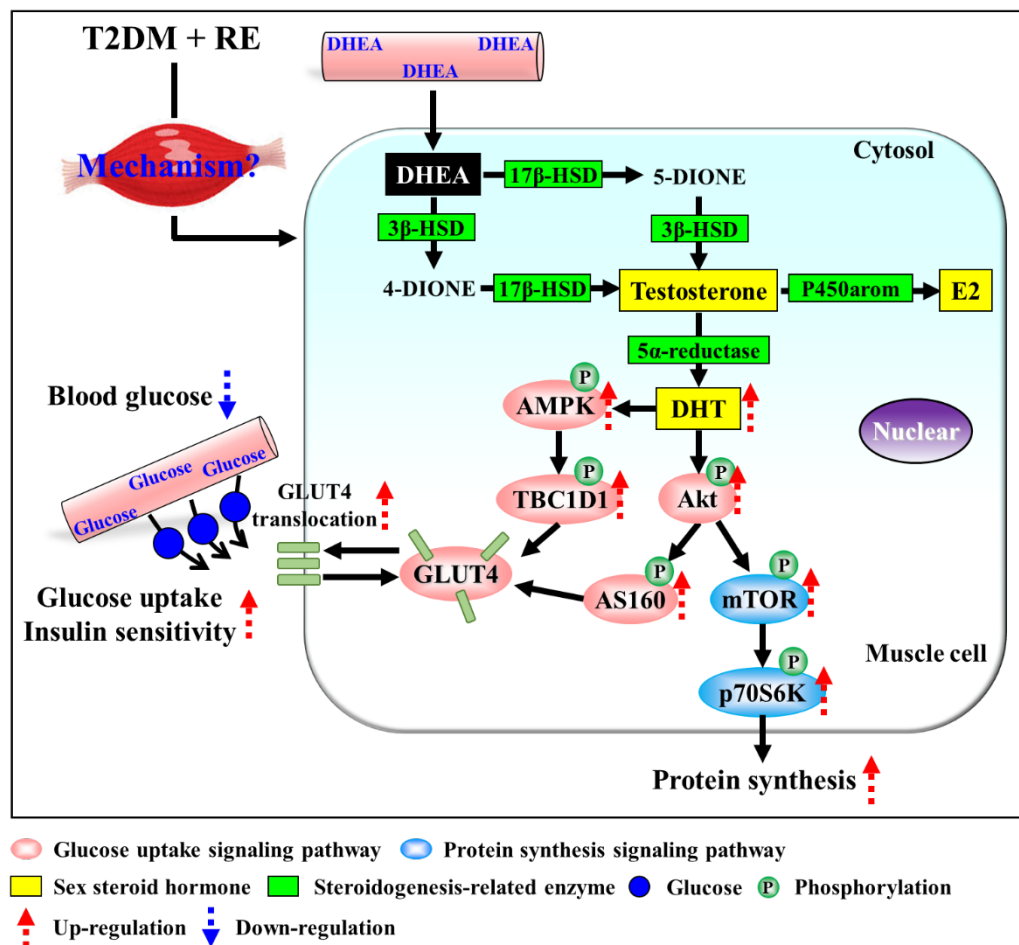
かを検討する必要がある。事実、AMPK 活性を筋特異的に欠損させたマウスの骨格筋では、筋収縮刺激による糖取り込み・利用が約半分に低下することが報告されている

(O'Neill et al. 2011) ことから、AMPK/TBC1D1/GLUT4 シグナル経路を含めた検討が必要である。

研究課題 I において、2 型糖尿病における習慣的なレジスタンス運動は、筋内の DHT 濃度を増大させることを明らかにしたが、一過性のレジスタンス運動が、筋内の性ステロイドホルモン合成酵素および DHT 濃度を増大させるか否かは明らかではない。成熟した筋管細胞における電気刺激誘発性の筋収縮刺激は、筋内のテストステロンおよび 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現、DHT 濃度を増大させることが報告されている (Son et al. 2019)。また、一過性のレジスタンス運動は、血中 DHEA およびテストステロン濃度を増大させることも報告されている (Copeland et al. 2002)。それゆえに、一過性のレジスタンス運動による筋収縮刺激は、筋内の性ステロイドホルモン合成酵素を増大させ、筋内の DHEA およびテストステロンを代謝して、DHT 合成を促進させる可能性が考えられる。

そこで研究課題 II では、2 型糖尿病における一過性のレジスタンス運動が、筋内の DHT 濃度の増大を介して、筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路および Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路、AMPK/TBC1D1/GLUT4 シグナル経路の亢進に関与するか否かを検討することを目的とした。本研究では、OLETF ラットを用いて、一過性のレジスタンス運動を実施した。また、一過性のレジスタンス運動実施前に DHT 合成を抑制することにより、筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路および Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路、AMPK/TBC1D1/GLUT4 シグナル経路の亢進が減弱するか否かを検討するために、一過性のレジスタンス運動実施前に 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤を事前投与した (Figure 15)。





**Figure 15: Effects of acute resistance exercise (RE) on signaling pathways of muscle glucose uptake and protein synthesis via increase in muscle DHT synthesis in T2DM (The hypothesis in study II).**

#### 4.2. 方法

##### 1) 対象

本研究は、「立命館大学びわこ・くさつキャンパス動物実験委員会（倫理委員会）」の承認を受け、研究を実施した。6週齢の雄 OLETF ラット（日本 SLC 株式会社製）48 匹を、2 型糖尿病モデルラットとして用いた（Horii et al. 2019; Sato et al. 2011）。20 週齢まで安静飼育後、各群の体重および空腹時血糖値が均等になるように、運動前（Pre）および運動終了直後（RE0）、1 時間後（RE1）、3 時間後（RE 3）、5α-reductase 抑制剤を一過性に事前投与し、運動前（Pre+In）および運動終了直後（RE0+In）、1 時間後（RE1+In）、3 時間後（RE3+In）の 8 群に分類した（各群 N = 6）。骨格筋の摘出は、一過性のレジスタンス運

動による筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路、Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路および AMPK/TBC1D1/GLUT4 シグナル経路の増大がピークを迎えるタイムポイントを先行研究の結果を基にグループ設定した (Kido et al. 2016; Ogasawara et al. 2014)。飼育は、室温  $26\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50\pm5\%$ 、12 時間ごとの明暗サイクル (8:00 a.m.-8:00 p.m.) の環境下で実施し、一般用飼料 CE-2 (日本クレア社製) および脱イオン蒸留水を自由摂取させた。12 時間以上の空腹状態で体重を測定し、1mg の 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤 (Finasteride; Sigma 社製) をゴマ油に溶解し、運動の開始 1 時間前に腹腔内に一過性に事前投与した (Sato et al. 2009, 2014a)。運動前および運動終了直後、1 時間後、3 時間後に、2%セボフルランによる吸引麻酔下にて、腹部大静脈から血液を採取した。その後、脱血による安楽死処置し、腓腹筋および精巢上体脂肪を摘出した。摘出した腓腹筋および精巢上体脂肪は、冷生理食塩水にて洗浄し、付着している血液を取り除き、組織重量を測定した。その後、液体窒素にて凍結し、分析を行うまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

## 2) 一過性のレジスタンス運動

レジスタンス運動は、ラダーを用いたクライミング運動 (長さ 1.1m、グリップ幅 2.0cm、傾斜  $80^{\circ}$ ) を 4 $\times$ 3 セット、セット間の休息は 1 分間で実施した (Donatto et al. 2013; Horii et al. 2018; Hornberger and Farrar. 2004; Kim et al. 2012; Matheny et al. 2009)。一過性の運動実施の 1 週間前に、すべてのラットに対して、クライミング運動に慣れさせるために 4 $\times$ 1 セットのレジスタンス運動を実施した。

## 3) タンパク発現解析

摘出した腓腹筋 (100-150mg) は、ホモジェナイズバッファー: 20mM Tris HCl (pH 7.8)、300mM NaCl、2mM EDTA、2mM DTT、2% Nonidet P-40、0.2% SDS、0.2% sodium deoxycholate、0.5mM PMSF、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin に protease inhibitor (Roche Science 社製)、phosphatase inhibitor (Sigma-Aldrich 社製) を加え、ホモジェナイズした。その後、 $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間攪拌したサンプルは、12,000g、 $4^{\circ}\text{C}$  で 15 分間遠心し、得られた上清をタンパク抽出サンプルとした。タンパク定量は、Protein Assay Rapid Kit (Wako 社製) を用いて、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories 社製) により、605nm の吸光度にて測定した。3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現および Akt、AS160、AMPK、TBC1D1、mTOR、p70S6K のリン酸化活性を Western blotting 法に

て測定した (Horii et al. 2018; Sato et al. 2011)。抽出した 40 $\mu$ g タンパク分画を Laemmli buffer にて、96°Cで 10 分間加熱した。各分画のタンパクは、10% SDS-polyacrylamide ゲルと泳動槽 (Wako 社製) を用いて、SDS-PAGE により分離した。SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンにタンパクを 20V、60 分間の条件下にて転写した。転写されたメンブレンは、3% skim milk、0.1% Tween を含む、blocking buffer を用いて、室温で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後、3% blocking buffer にて、一次抗体: 3 $\beta$ -HSD (1: 1000; sc-30820, Santa Cruz Biotechnology 社製) および 17 $\beta$ -HSD (1: 1000; sc-26963, Santa Cruz Biotechnology 社製)、5 $\alpha$ -reductase (1: 1000; #H00006715-D01P, Abnova Corporation 社製)、Ser 473-phosphorylated Akt (1: 1000; #9271, Cell Signaling Technology 社製)、total Akt (1: 1000; #9272, Cell Signaling Technology 社製)、Thr 642-phosphorylated AS160 (1: 1000; #4288, Cell Signaling Technology 社製)、total AS160 (1: 1000; #2670, Cell Signaling Technology 社製)、Thr 172-phosphorylated AMPK (1: 1000; #2535, Cell Signaling Technology 社製)、total AMPK (1: 1000; #2532, Cell Signaling Technology 社製)、Ser 237-phosphorylated TBC1D1 (1: 1000; #07-2268, Millipore 社製)、total TBC1D1 (1: 1000; #5929, Cell Signaling Technology 社製)、Ser 2448-phosphorylated m-TOR (1: 1000; #2971, Cell Signaling Technology 社製)、total m-TOR (1: 1000; #2983, Cell Signaling Technology 社製)、Thr 389-phosphorylated p70S6K (1: 1000; #9205, Cell Signaling Technology 社製)、total p70S6K (1: 1000; #2708, Cell Signaling Technology 社製)、を 4°Cで 12 時間インキュベーションした。 $\beta$ -actin (1: 3000; #4967, Cell Signaling Technology 社製) をローディングコントロールとして用いた。反応後は、メンブレンを PBS-0.1% tween にて 3 回洗浄し、二次抗体: HRP-conjugated anti-rabbit (1: 3000; Cell Signaling Technology 社製: GE Healthcare Bio-sciences 社製) および anti-goat (1: 3000; Santa Cruz Biotechnology 社製) immunoglobulin secondary antibodies を 3% blocking buffer で希釈し、60 分間室温にてインキュベートした。その後、PBS-0.1% tween にて 3 回洗浄したメンブレンは、発光液 (Enhanced Chemiluminescence Plus system; GE Healthcare Bio-sciences 社製) に 5 分間浸け、LAS4000 imager (GE Healthcare Bio-sciences 社製) を用いてタンパクを検出した。Image J 1.48 ソフトウェア (National Institutes of Health 社製) を用いて、3 $\beta$ -HSD、17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現量は、 $\beta$ -actin タンパク発現量を除して算出し、Akt、AS160、AMPK、TBC1D1、mTOR、p70S6K リン酸化活性は、それぞれの総タンパク発現量を除して算出した。

#### 4) 細胞膜抽出

摘出した腓腹筋 (100-150mg) は、Mem-PERTM Plus 膜タンパク質抽出キット (Thermo Scientific 社製、Waltham、MA、USA) を用いて、細胞質および細胞膜タンパク質を抽出した (Nooron et al. 2017; Wu et al. 2017)。タンパク定量は、Protein Assay Rapid Kit (Wako 社製) を用いて、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories 社製) により、605nm にて測定した。その後、細胞質および細胞膜サンプルを用いて、GLUT4 タンパク発現量 (#07-1404, Millipore 社製) を Western blotting 法にて測定した。Image J 1.48 ソフトウェア (National Institutes of Health 社製) を用いて、GLUT4 トランスロケーションは、 $\beta$ -actin タンパク発現量を除して算出した細胞膜 GLUT4 タンパク発現量と細胞質 GLUT4 タンパク発現量の差から算出した (Sato et al. 2011, 2017)。

#### 5) 性ステロイドホルモン濃度測定

筋内の DHEA (Enzo Life Science 社製) および遊離テストステロン (IBL International 社製)、DHT 濃度 (IBL International 社製) は、ELISA 法を用いて測定した (Sato et al. 2011)。吸光度値は、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories 社製) を用いて、DHEA 濃度は 405nm、遊離テストステロンおよび DHT 濃度は 450nm の波長で測定し、標準曲線から各ラットの DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度を算出した。また、血中 DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度を同様の方法で測定した (Sato et al. 2011)。

#### 6) 空腹時血糖値およびインスリン濃度測定

12 時間以上の空腹状態で、腹部大静脈から血液を採取し、血糖値測定機器 (TERUMO CORPORATION 社製) を用いて、空腹時血糖値を測定した。また、空腹時血清インスリン濃度 (シバヤギ社製) は、ELISA 法を用いて測定した。吸光度値は、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories 社製) を用いて、450nm の波長で測定し、標準曲線から各ラットのインスリン濃度を算出した。

#### 7) 統計処理

本研究結果は、すべて平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。8 群間の各測定項目の比較は、一元配置分散分析法により検定し、有意な差が認められた項目には、Fisher の PLSD 法を用い

て post-hoc テストを実施した。危険率 (P) は 5%未満を有意水準とした。すべての統計解析は、StatView 5.0 (SAS 社製) を使用した。

#### 4-3. 結果

##### 1) 体重および精巣上体脂肪、腓腹筋重量の比較

体重および精巣上体脂肪、腓腹筋重量は、Pre 群および RE0 群、RE1 群、RE3 群、Pre+In 群、RE0+In 群、RE1+In 群、RE3+In 群の 8 群間で有意な差は認められなかった (Table 3)。

##### 2) 空腹時血糖値および血中インスリン濃度の比較

Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群、RE3 群の空腹時血糖値は有意に低値を示し ( $P < 0.05$ , Table 3)、Pre+In 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Table 3)。しかしながら、RE0 群と比較して、RE0+In 群の空腹時血糖値は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Table 3)。また、Pre 群と比較して、RE1 群および RE3 群の血中インスリン濃度は有意に低値を示し ( $P < 0.05$ , Table 3)、Pre+In 群と比較して、RE1+In 群および RE3+In 群は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Table 3)。

**Table 3. Animal characteristics**

Group	Body Weight (g)	Epididymal fat mass (g)	GA muscle mass (g)	Blood glucose (mg/dl)	Insulin level (pmol/l)
Pre (N = 6)	586.7 $\pm$ 23.2	13.1 $\pm$ 1.4	2.2 $\pm$ 0.1	193 $\pm$ 9	7.8 $\pm$ 1.6
RE0 (N = 6)	573.9 $\pm$ 29.4	12.2 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 0.0	151 $\pm$ 5*	6.7 $\pm$ 1.6
RE1 (N = 6)	577.1 $\pm$ 27.9	12.3 $\pm$ 1.6	2.2 $\pm$ 0.1	157 $\pm$ 5*	3.2 $\pm$ 0.7*
RE3 (N = 6)	575.2 $\pm$ 30.2	11.9 $\pm$ 2.6	2.2 $\pm$ 0.1	162 $\pm$ 7*	2.7 $\pm$ 1.0*
Pre+In (N = 6)	583.3 $\pm$ 26.5	12.0 $\pm$ 1.3	2.1 $\pm$ 0.1	198 $\pm$ 11	8.5 $\pm$ 2.3
RE0+In (N = 6)	580.2 $\pm$ 19.4	13.2 $\pm$ 2.3	2.2 $\pm$ 0.1	173 $\pm$ 6†+	6.5 $\pm$ 0.8
RE1+In (N = 6)	593.9 $\pm$ 14.2	12.8 $\pm$ 1.9	2.3 $\pm$ 0.0	171 $\pm$ 7+	2.2 $\pm$ 0.8+
RE3+In (N = 6)	590.4 $\pm$ 15.8	13.5 $\pm$ 1.3	2.2 $\pm$ 0.0	178 $\pm$ 8	3.3 $\pm$ 1.0+

Data are expressed as means  $\pm$  SE. Pre: resting control, RE0: immediately after resistance exercise, RE1: 1h after resistance exercise, RE3: 3h after resistance exercise, Pre+In: resting control with the pre-treatment of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, RE0+In: immediately after resistance exercise with the pre-treatment of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, RE1+In: 1h after resistance exercise with the pre-treatment of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, RE3+In: 3h after resistance exercise with the pre-treatment of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor. \* $P < 0.05$  vs. Pre. † $P < 0.05$  vs. RE0. + $P < 0.05$  vs. Pre with 5 $\alpha$ -reductase inhibitor pre-treatment. GA: gastrocnemius.

### 3) 血中性ステロイドホルモン濃度の比較

血中 DHEA 濃度は、Pre 群および RE0 群、RE1 群、RE3 群、Pre+In 群、RE0+In 群、RE1+In 群、RE3+In 群の 8 群間で有意な差は認められなかった (Table 4)。また、Pre 群と比較して、RE1 群の血中遊離テストステロン濃度は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Table 4)。Pre+In 群と比較して、RE1+In 群の血中遊離テストステロン濃度は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Table 4)。さらに、Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群の血中 DHT 濃度は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Table 4)。しかしながら、RE0 群および RE1 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群の血中 DHT 濃度は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Table 4)。

**Table 4. Serum sex steroid hormone levels**

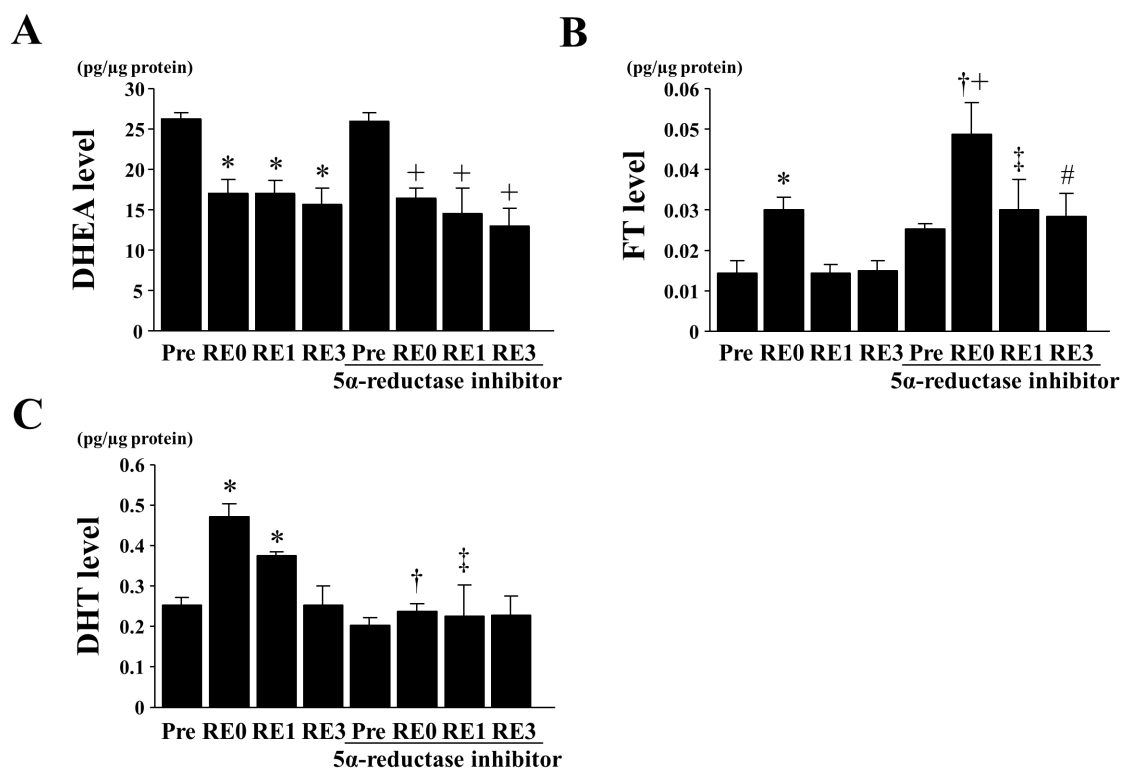
Group	Serum DHEA (pg/ml)	Serum FT (pg/ml)	Serum DHT (pg/ml)
Pre (N = 6)	2548.6 $\pm$ 198.5	7.6 $\pm$ 1.1	149.9 $\pm$ 6.9
RE0 (N = 6)	3224.9 $\pm$ 253.0	18.1 $\pm$ 5.6	306.7 $\pm$ 38.8*
RE1 (N = 6)	2807.1 $\pm$ 186.8	27.1 $\pm$ 5.1*	399.0 $\pm$ 43.1*
RE3 (N = 6)	3103.0 $\pm$ 265.7	5.8 $\pm$ 0.7	156.8 $\pm$ 26.7
Pre+In (N = 6)	2551.0 $\pm$ 170.8	16.6 $\pm$ 6.2	134.1 $\pm$ 11.5
RE0+In (N = 6)	3056.4 $\pm$ 277.5	28.3 $\pm$ 4.1	148.5 $\pm$ 9.2†
RE1+In (N = 6)	3358.9 $\pm$ 277.5	38.0 $\pm$ 11.2+	136.8 $\pm$ 6.1‡
RE3+In (N = 6)	3015.8 $\pm$ 268.6	18.4 $\pm$ 4.9	135.5 $\pm$ 4.1

Data are expressed as means  $\pm$  SE. Pre: resting control, RE0: immediately after resistance exercise, RE1: 1h after resistance exercise, RE3: 3h after resistance exercise, Pre+In: resting control with the pre-treatment of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, RE0+In: immediately after resistance exercise with the pre-treatment of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, RE1+In: 1h after resistance exercise with the pre-treatment of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, RE3+In: 3h after resistance exercise with the pre-treatment of 5 $\alpha$ -reductase inhibitor. \* $P < 0.05$  vs. Pre. † $P < 0.05$  vs. RE0. ‡ $P < 0.05$  vs. RE1. + $P < 0.05$  vs. Pre with 5 $\alpha$ -reductase inhibitor pre-treatment. DHEA: dehydroepiandrosterone, DHT: 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, FT: free testosterone.

### 4) 筋内の性ステロイドホルモン濃度の比較

Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群、RE3 群の筋内の DHEA 濃度は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 16A)。Pre+In 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群、

RE3+In 群の筋内の DHEA 濃度は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 16A)。また、Pre 群と比較して、RE0 群の筋内の遊離テストステロン濃度は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 16B)。Pre+In 群と比較して、RE0+In 群の筋内の遊離テストステロン濃度は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 16B)。RE0 群および RE1 群、RE3 群と比較して、RE0+In 群、RE1+In 群、RE3+In 群の筋内の遊離テストステロン濃度は有意に増大した ( $P < 0.05$ , Figure 16B)。さらに、Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群の筋内の DHT 濃度は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 16C)。しかしながら、RE0 群および RE1 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群の筋内の DHT 濃度は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 16C)。

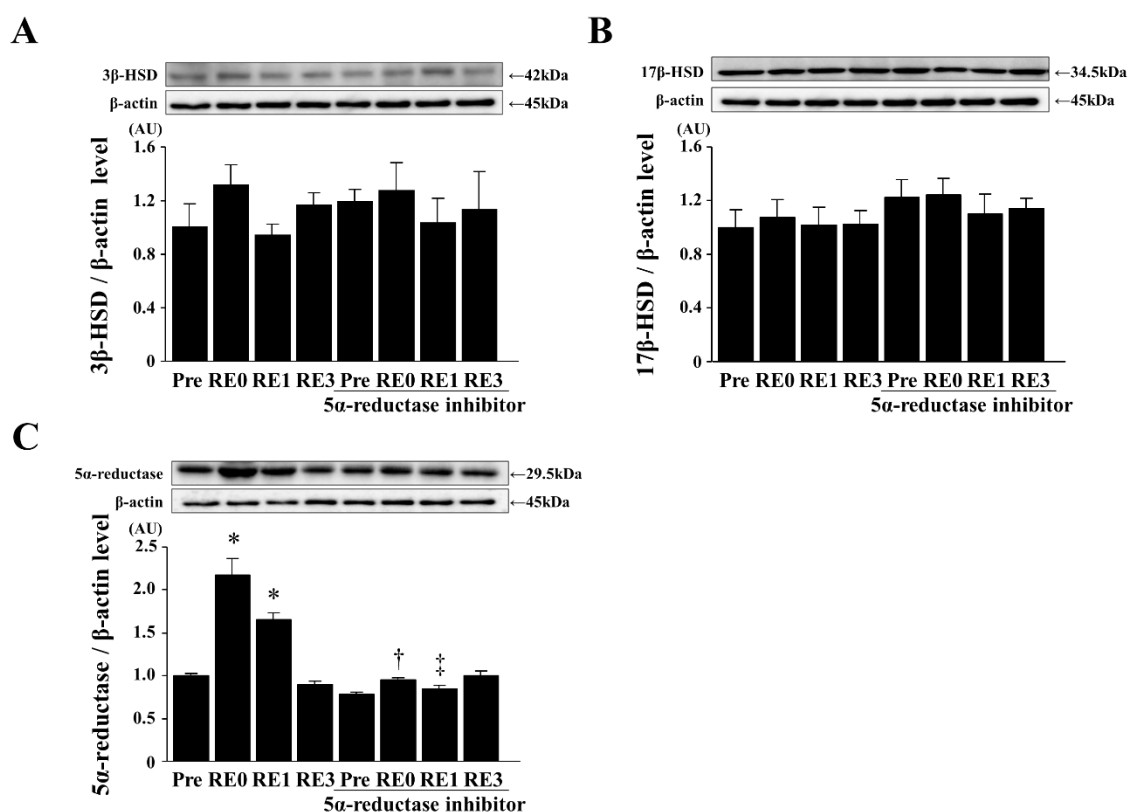


**Figure 16: Effect of acute RE on the levels of DHEA (A), FT (B) and DHT (C) in the gastrocnemius muscle.**

Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  vs. Pre. † $P < 0.05$  vs. RE0. ‡ $P < 0.05$  vs. RE1. # $P < 0.05$  vs. RE3. + $P < 0.05$  vs. Pre with 5 $\alpha$ -reductase inhibitor pre-treatment.

# 5) 筋内の性ステロイドホルモン合成酵素タンパク発現の比較

筋内の 3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD タンパク発現は、8 群間で有意な差は認められなかった (Figure 17A, B)。Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群の筋内の 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 17C)。しかしながら、RE0 群および RE1 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群の筋内の 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 17C)。



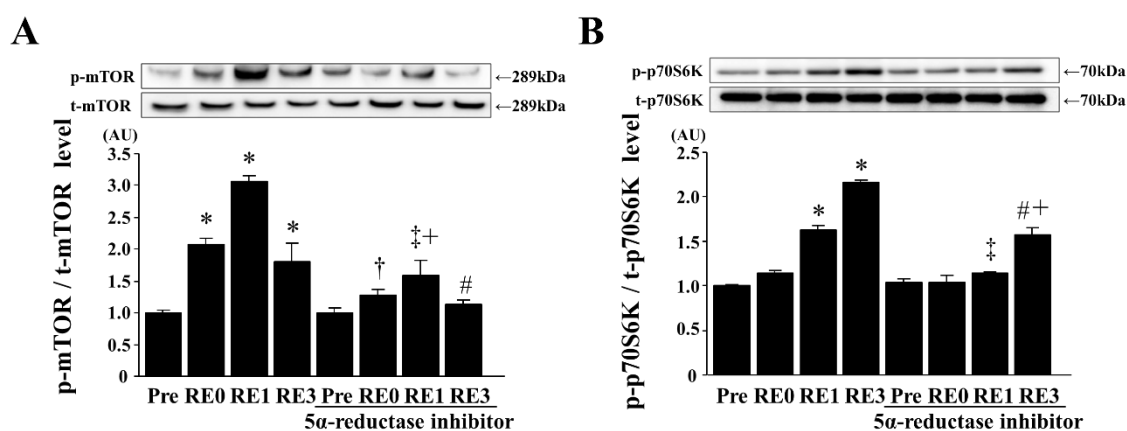
**Figure 17: Effect of acute RE on the levels of 3 $\beta$ -HSD (A), 17 $\beta$ -HSD (B) and 5 $\alpha$ -reductase (C) protein in the gastrocnemius muscle.**

Representative images of the immunoblots and histograms of 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD and 5 $\alpha$ -reductase proteins are shown.  $\beta$ -actin protein was used as an internal control. The levels of 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD and 5 $\alpha$ -reductase proteins are represented as fold changes relative to the respective levels in the Pre group. AU: arbitrary units. Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  vs. Pre. † $P < 0.05$  vs. RE0. ‡ $P < 0.05$  vs. RE1.



## 6) 筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の比較

Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群、RE3 群の筋内の m-TOR<sup>Ser2448</sup> リン酸化活性は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 18A)。しかしながら、RE0 群および RE1 群、RE3 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群、RE3+In 群の筋内の m-TOR<sup>Ser2448</sup> リン酸化活性は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 18A)。また、Pre 群と比較して、RE1 群および RE3 群の筋内の p70S6K<sup>Thr389</sup> リン酸化活性は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 18B)。しかしながら、RE1 群および RE3 群と比較して、RE1+In 群および RE3+In 群の筋内の p70S6K<sup>Thr389</sup> リン酸化活性は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 18B)。

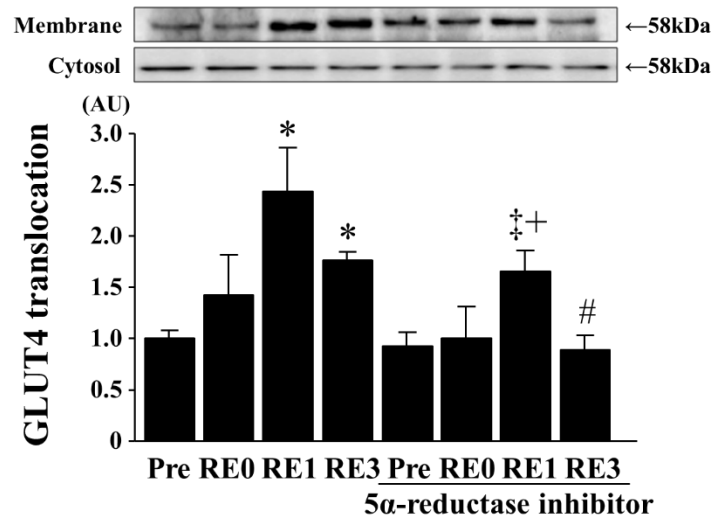


**Figure 18: Effect of acute RE on the phosphorylation of mTOR at Ser2448 (A) and p70S6K at Thr389 (B) levels in the gastrocnemius muscle.**

Representative images of the immunoblots and histograms of mTOR and p70S6K phosphorylation levels are shown. The mTOR and p70S6K phosphorylation levels are represented as fold changes relative to the respective levels in the Pre group. AU: arbitrary units. Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  vs. Pre. † $P < 0.05$  vs. RE0. ‡ $P < 0.05$  vs. RE1. # $P < 0.05$  vs. RE3. + $P < 0.05$  vs. Pre with 5α-reductase inhibitor pre-treatment.

## 7) 筋内の GLUT4 トランスロケーションの比較

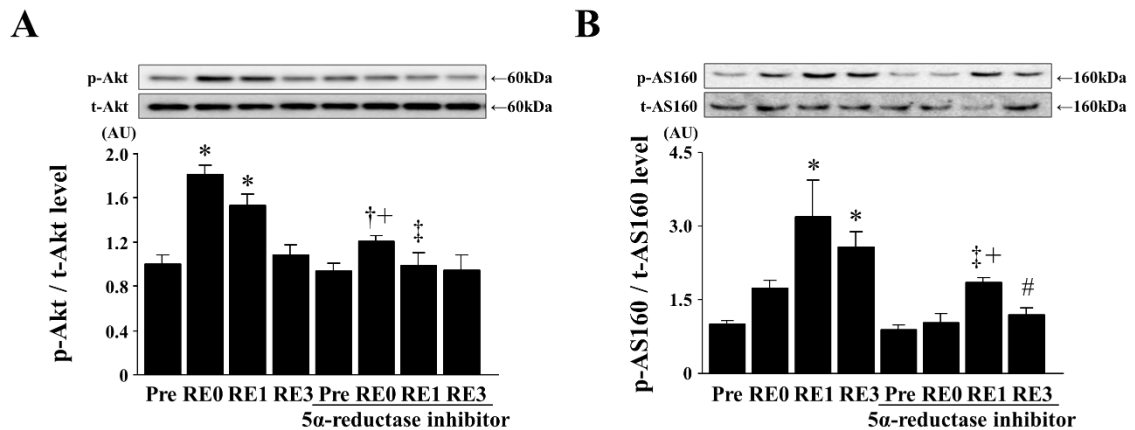
Pre 群と比較して、RE1 群および RE3 群の筋内の GLUT4 トランスロケーションは有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 19)。しかしながら、RE1 群および RE3 群と比較して、RE1+In 群および RE3+In 群の筋内の GLUT4 トランスロケーションは有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 19)。



**Figure 19: Effect of acute RE on the GLUT4 translocation level in the gastrocnemius muscle.** Representative images of the immunoblots and histograms of GLUT4 in cytosolic and membrane fractions are shown. The GLUT4 translocation levels are represented as fold changes from the Pre group. AU: arbitrary units. Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  vs. Pre. ‡ $P < 0.05$  vs. RE1. # $P < 0.05$  vs. RE3. + $P < 0.05$  vs. Pre with 5α-reductaseinhibitor pre-treatment.

#### 8) 筋内の Akt/AS160 シグナル経路の比較

Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群の筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 20A)。しかしながら、RE0 群および RE1 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群の筋内の Akt<sup>Ser473</sup> リン酸化活性は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 20A)。また、Pre 群と比較して、RE1 群および RE3 群の筋内の AS160<sup>Thr642</sup> リン酸化活性は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 20B)。しかしながら、RE1 群および RE3 群と比較して、RE1+In 群および RE3+In 群の筋内の AS160<sup>Thr642</sup> リン酸化活性は有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 20B)。

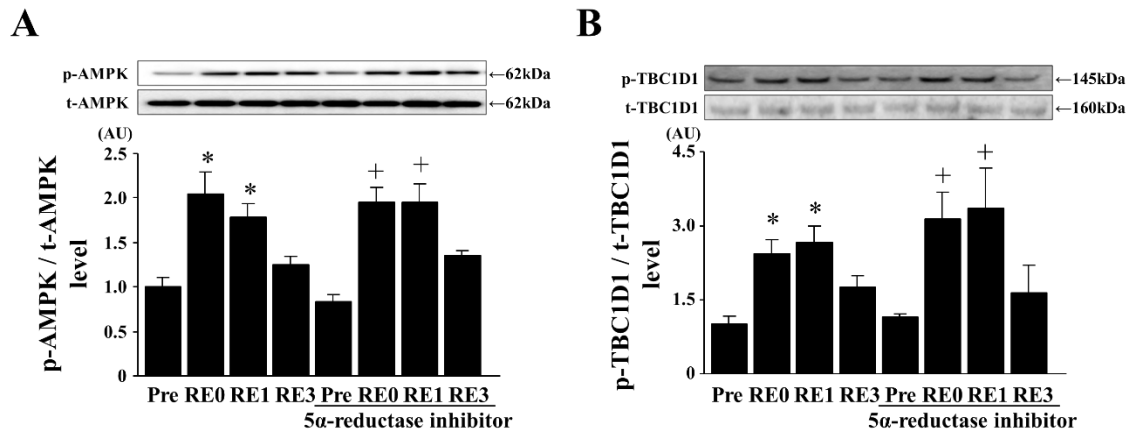


**Figure 20: Effect of acute RE on the phosphorylation of Akt at Ser473 (A) and AS160 at Thr642 (B) levels in the gastrocnemius muscle.**

Representative images of the immunoblots and histograms of Akt and AS160 phosphorylation levels are shown. The Akt and AS160 phosphorylation levels are represented as fold changes relative to the respective levels in the Pre group. AU: arbitrary units. Data are expressed as means  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$  vs. Pre. † $P < 0.05$  vs. RE0. ‡ $P < 0.05$  vs. RE1. # $P < 0.05$  vs. RE3. + $P < 0.05$  vs. Pre with 5α-reductase inhibitor pre-treatment.

#### 9) 筋内の AMPK/TBC1D1 シグナル経路の比較

Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群の筋内の AMPK<sup>Thr172</sup> リン酸化活性は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 21A)。Pre+In 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群の筋内の AMPK<sup>Thr172</sup> リン酸化活性は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 21A)。また、Pre 群と比較して、RE0 群および RE1 群の筋内の TBC1D1<sup>Ser237</sup> リン酸化活性は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 21B)。Pre+In 群と比較して、RE0+In 群および RE1+In 群の筋内の TBC1D1<sup>Ser237</sup> リン酸化活性は有意に高値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 21B)。



**Figure 21: Effect of acute RE on the phosphorylation of AMPK at Thr172 (A) and TBC1D1 at Ser237 (B) levels in the gastrocnemius muscle.**

Representative images of the immunoblots and histograms of AMPK and TBC1D1 phosphorylation levels are shown. The AMPK and TBC1D1 phosphorylation levels are represented as fold changes relative to the respective levels in the Pre group. AU: arbitrary units. Data are expressed as means  $\pm$  SE. \*P < 0.05 vs. Pre. +P < 0.05 vs. Pre with 5 $\alpha$ -reductase inhibitor pre-treatment.

#### 4.4. 考察

本研究は、2型糖尿病における一過性のレジスタンス運動が、筋内の DHT 濃度の増大を介して、筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路および Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路、AMPK/TBC1D1/GLUT4 シグナル経路の亢進に関与するか否かを検討した。2型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動は、筋内の遊離テストステロン濃度および 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現、DHT 濃度を増大させた。また、一過性のレジスタンス運動は、筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup> および p70S6K<sup>Thr389</sup> リン酸化活性を増大させた。さらに、一過性のレジスタンス運動は、筋内の Akt<sup>Ser473</sup>、AS160<sup>Thr642</sup> および AMPK<sup>Thr172</sup>、TBC1D1<sup>Ser237</sup> リン酸化活性を増大させ、GLUT4 トランスロケーションを亢進させた。一方で、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与は、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大、筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup>/p70S6K<sup>Thr389</sup> シグナル経路および Akt<sup>Ser473</sup>/AS160<sup>Thr642</sup>/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させた。しかしながら、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与による筋内の AMPK<sup>Thr172</sup>/TBC1D1<sup>Ser237</sup>/GLUT4 シグナル経路の減弱は認められなかった。したがって、2型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動は、筋内の DHT 濃度の

増大を介して、筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup>/p70S6K<sup>Thr389</sup> シグナル経路および Akt<sup>Ser473</sup>/AS160<sup>Thr642</sup>/GLUT4 シグナル経路を一過性に亢進させる可能性が示唆された。

本研究では、2 型糖尿病モデルラットの一過性レジスタンス運動により、筋内の DHEA 濃度が運動終了直後から低下し、運動終了 1 時間後および 3 時間後まで低下が持続していた。また、一過性レジスタンス運動により、筋内の遊離テストステロンおよび DHT 濃度は運動終了直後をピークに増大し、DHT 濃度の増大は運動終了 1 時間後まで持続していた。さらに、一過性のレジスタンス運動による筋内の 3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD タンパク発現の変動は認められなかったが、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現は、運動終了直後をピークに増大し、運動終了 1 時間後まで増大が持続していた。骨格筋内で DHEA は、3 $\beta$ -HSD および 17 $\beta$ -HSD により、テストステロンに代謝・合成され、テストステロンから 5 $\alpha$ -reductase を介して DHT、P450arom を介して E2 が代謝・合成される (Aizawa et al. 2007; Sato et al. 2008)。それゆえに、一過性のレジスタンス運動は、運動終了直後から筋内の DHEA を代謝して、遊離テストステロンを合成させ、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現の増大が、筋内の遊離テストステロンから DHT の代謝・合成を促進させた可能性が考えられる。一方で、本研究では、2 型糖尿病における一過性のレジスタンス運動が、筋内の遊離テストステロンを代謝して、E2 合成を促進させるか否かについては明らかにすることができなかった。先行研究において、健常モデルラットの一過性の有酸素性運動により、筋内の遊離テストステロンおよび E2 濃度が増大することが報告されている (Aizawa et al. 2008, 2010)。そのため、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT と E2 濃度の応答性を検討するためには、5 $\alpha$ -reductase と P450arom の抑制剤を事前に単独および併用投与した比較検討が必要である。しかしながら、本研究において、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与は、一過性のレジスタンス運動による筋内の遊離テストステロン濃度をさらに増大させた。もし、一過性のレジスタンス運動により筋内の P450arom が増大および E2 合成が促進されれば、DHT 合成が抑制されたことにより、筋内の遊離テストステロンはさらに増大することなく、E2 に代謝されることが考えられる。そのため、一過性のレジスタンス運動により骨格筋の E2 代謝・合成が促進している可能性は低いと考えられ、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与により、一過性のレジスタンス運動による筋内の 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現の増大および DHT 合成を抑制したことで、筋内の遊離テストステロンが代謝されずに残存したと考えられる。

本研究は、2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動が、運動終了直後から筋内の mTOR リン酸化活性を増大させ、運動終了 1 時間後をピークに、運動終了 3 時間後まで増大が持続していた。また、mTOR の下流因子である筋内の p70S6K リン酸化活性は、一過性のレジスタンス運動終了 1 時間後から増大し、運動終了 3 時間後にピークに達していた。それゆえに、本研究の一過性のレジスタンス運動による筋内の mTOR および p70S6K のリン酸化活性は、先行研究同様にシグナル経路として経時的に変化していたことが示された (Ogasawara et al. 2014)。一方で、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与は、一過性のレジスタンス運動終了後におけるすべてのタイムポイントで、筋内の mTOR リン酸化活性の増大を減弱させ、運動終了 1 時間後および 3 時間後で、筋内の p70S6K リン酸化活性の増大を減弱させた。しかしながら、一過性のレジスタンス運動による筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の亢進は、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与により完全には消失しなかった。したがって、2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動は、筋内の DHT 濃度の増大を介して、筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路を部分的かつ一過性に亢進させ、筋タンパク合成を促進させている可能性が示唆された。習慣的なレジスタンス運動による筋肥大効果は、一過性のレジスタンス運動による筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の活性化を介した、筋タンパク合成の促進が慢性的に繰り返されることで生じることが知られている (Baar and Esser. 1999; Brook et al. 2015; Damas et al. 2016; Dreyer et al. 2006; Drummond et al. 2009; Goodman et al. 2011; Phillips et al. 1997; Strasser and Pesta. 2013)。そのため、2 型糖尿病モデルラットの一過性レジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が慢性的に繰り返されることで、筋肥大を誘発させる可能性が考えられる。事実、研究課題 I では、習慣的なレジスタンス運動が、2 型糖尿病モデルラットの骨格筋量および筋横断面積を増大させたが、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与は、習慣的なレジスタンス運動による骨格筋量および筋横断面積の増大を減弱させたことが示されている。

本研究では、2 型糖尿病モデルラットの一過性レジスタンス運動により、筋内の Akt および AMPK リン酸化活性が運動終了直後をピークに増大し、運動終了 1 時間後まで増大が持続していた。また、Akt の下流因子である筋内の AS160 リン酸化活性は、一過性のレジスタンス運動終了 1 時間後をピークに増大し、運動終了 3 時間後まで増大が持続していた。さらに、AMPK の下流因子である TBC1D1 リン酸化活性は、一過性のレジスタンス運動終了直後から増大し、運動終了 1 時間後にピークに達していた。AS160 および

TBC1D1 によって調節される筋内の GLUT4 トランスロケーションは、一過性のレジスタンス運動終了 1 時間後をピークに増大し、運動終了 3 時間後まで増大が持続していた。それゆえに、本研究の一過性のレジスタンス運動による筋内の Akt/AS160/GLUT4 および AMPK/TBC1D1/GLUT4 シグナル経路の亢進は、先行研究同様にシグナル経路として経時的に変化していたことが示された (Kido et al. 2016)。一方で、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与は、一過性のレジスタンス運動終了直後および 1 時間後の筋内の Akt リン酸化活性の増大、運動終了 1 時間後および 3 時間後の AS160 リン酸化活性の増大および GLUT4 トランスロケーションの亢進を減弱させた。しかしながら、一過性のレジスタンス運動による筋内の Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路の亢進は、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与により完全には消失しなかった。加えて、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与による筋内の AMPK および TBC1D1 のリン酸化活性の増大の減弱は認められなかった。したがって、2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動は、筋内の DHT 濃度の増大を介して、筋内の Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路を部分的かつ一過性に亢進させ、糖取り込み・利用を亢進させる可能性が考えられる。

本研究では、2 型糖尿病モデルラットの一過性レジスタンス運動により、血糖値および血中インスリン濃度が低下するとともに、筋内の Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路が亢進していた。一方で、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与は、一過性のレジスタンス運動による血糖値の低下および筋内の Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させたが、血中インスリン濃度の低下は減弱させなかった。インスリンは、筋内の Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路を亢進させ、糖取り込み・利用を亢進させることが報告されている (Kido et al. 2016)。しかしながら、インスリン分泌が著しく低下している状態のラットにおける一過性のレジスタンス運動は、筋内の Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路を一過性に亢進させることが報告されている (Kido et al. 2017)。加えて、インスリン分泌が著しく低下している状態のラットにおける DHEA の単回投与は、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路を一過性に亢進させるが、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の事前投与は、筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進を減弱させることも報告されている (Sato et al. 2009)。したがって、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、筋内の Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路をインスリン非依存的に亢進させ、糖取り込み・利用を亢進させることで、一過性に血糖値を低下させる可能性が考えられる。しかしながら、本研究において、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、インスリン非依存的に筋内の Akt/AS160/GLUT4

シグナル経路の直接的な亢進に関与するか否かは明らかにできなかった。筋内の DHT がインスリン非依存的に作用しているか否かを検討するためには、成熟した筋管細胞において、インスリンと DHT を単独および併用添加し、かつインスリン受容体抑制剤および 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の添加による影響を比較検討する必要がある。

一過性のレジスタンス運動による糖取り込み・利用の亢進には、筋内のカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII: Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II) リン酸化活性の亢進に関与することが報告されている (Kido et al. 2016)。したがって、本研究においても、2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動は、筋内の CaMKII リン酸化活性の亢進に関与している可能性が考えられる。また、筋グリコーゲン量は、骨格筋の糖取り込み速度に関与する (Kawanaka et al. 1998)。しかしながら、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、筋内の CaMKII リン酸化活性の亢進および筋グリコーゲン量の変動に関与するか否かは明らかではないため、今後検討する必要がある。

#### 4-5. 小括

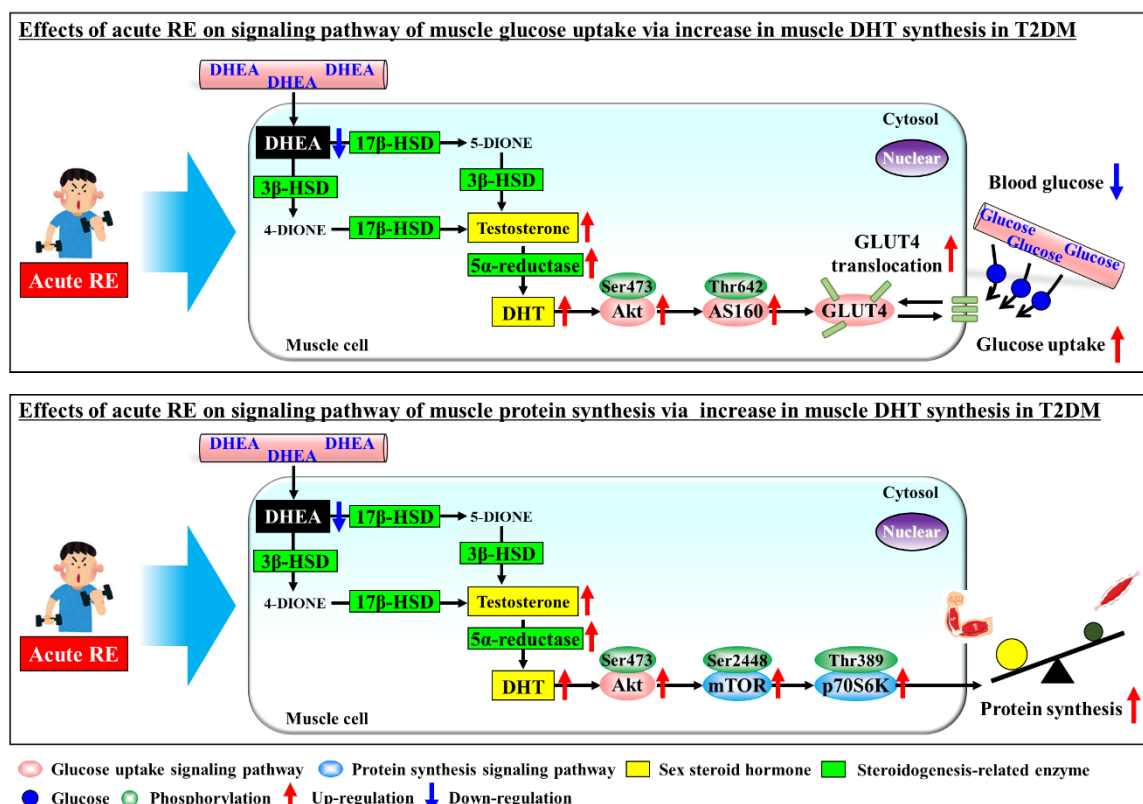
2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動は、筋内の DHT 濃度の増大を介して筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup>/p70S6K<sup>Thr389</sup> シグナル経路および Akt<sup>Ser473</sup>/AS160<sup>Thr642</sup>/GLUT4 シグナル経路を一過性に亢進にさせる可能性が示唆された。



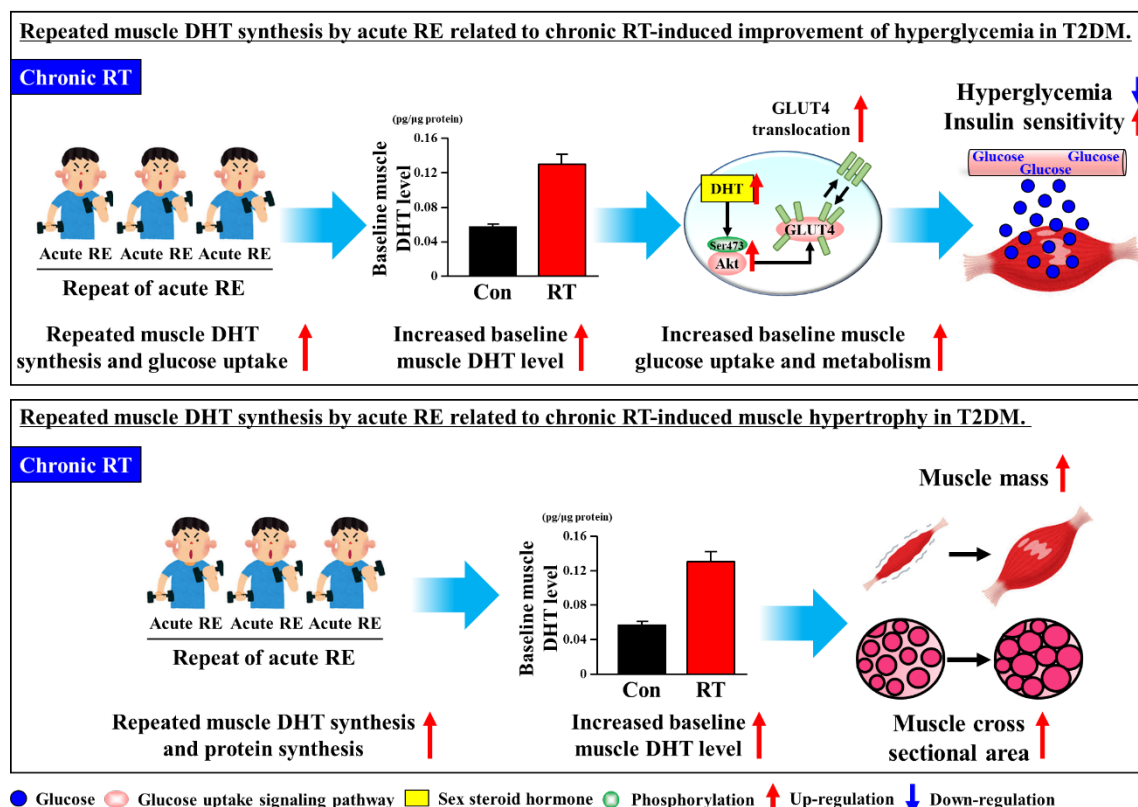
## 第5章 総合討論

### 本研究のまとめ (Figure 22, Figure 23)

本研究は、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果に関与するか否かを検討することを目的とした。研究課題 I では、8 週間のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病モデルラットの高血糖改善および筋肥大効果に関与し、高血糖改善効果の分子機序の 1 つに、慢性的な筋内の Akt<sup>Ser473</sup>/GLUT4 シグナル経路の亢進が関与する可能性を示した。研究課題 II では、2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動が、筋内の DHT 濃度の増大を介して、筋内の Akt<sup>Ser473</sup>/AS160<sup>Thr642</sup>/GLUT4 シグナル経路を一過性に亢進させ、糖取り込み・利用を亢進させる可能性を示した。加えて、研究課題 I および II の結果から、習慣的なレジスタンス運動による 2 型糖尿病モデルラットの筋肥大効果には、一過性のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大を介した筋内の mTOR<sup>Ser2448</sup>/p70S6K<sup>Thr389</sup> シグナル経路の亢進の繰り返しが関与する可能性が示された。



**Figure 22: Regulation of signaling pathways of muscle glucose uptake and protein synthesis via increase in muscle DHT synthesis in T2DM by acute RE.**



**Figure 23: Repeated muscle DHT synthesis by acute RE related to chronic RT-induced improvement of hyperglycemia and muscle hypertrophy in T2DM.**

## 習慣的なレジスタンス運動による高血糖改善および筋肥大効果に対する筋内の DHT の影響

研究課題 I では、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病モデルラットの高血糖改善および筋肥大効果に関与する可能性を示した。しかしながら、研究課題 I では、習慣的なレジスタンス運動による高血糖改善および筋肥大効果は、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与により減弱したが、完全には消失しなかった。従来から、脂肪細胞の肥大・増殖により誘発されるアディポネクチンの低下および腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) やレジスチンの増大は、インスリン感受性の低下に関与することが報告されている (Hotamisligil et al. 1993; Stepan et al. 2001; Yamauchi et al. 2002)。また、骨格筋量の調節は、インスリン様成長因子 (insulin-like growth factor 1) や成長ホルモンなどの筋量を正に制御する物質およびミオスタチンやコルチゾールなどの筋量を負に制御する物質の発現変動が関与する (Ali and Garcia. 2014; Fink et al. 2018; Negares et al. 2019; Yanagita et al. 2019)。近年では、新規物質として、骨格筋から分泌される生理活性物

質（マイオカイン）である線維芽細胞増殖因子 21（fibroblast growth factor 21）、follistatin-like 1、musclin が、骨格筋の糖取り込み・利用に関与すること、apelin、decorin、irisin が、筋タンパク合成の促進に関与することが報告されている（Coelho-Junior et al. 2019; Kanzleiter et al. 2014; Lee et al. 2017; Nishizawa et al. 2004; Vinel et al. 2018; Xu et al. 2009）。それゆえに、習慣的なレジスタンス運動による 2 型糖尿病の高血糖改善および筋肥大効果は、筋内の DHT 濃度の増大を含んだ、様々な物質の分泌変動が複合的に作用する可能性が考えられる。研究課題 I では、OLETF-Con 群と比較して、OLETF-RT 群では、空腹時血糖値: 166.0mg/dl 低下、QUICKI: 0.03 増大、骨格筋量: 0.92mg/g BW 増大、筋横断面積: 381.8cm<sup>2</sup> 増大した。習慣的なレジスタンス運動による高血糖改善および筋肥大効果に対する 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与の影響を検討するために、OLETF-RT 群と OLETF-RT +In 群の差分を算出すると、空腹時血糖値: 106.0mg/dl 低下、QUICKI: 0.02 増大、骨格筋量: 0.64mg/g BW 増大、筋横断面積: 215.5cm<sup>2</sup> 増大であった。これらの値から、習慣的なレジスタンス運動による高血糖改善および筋肥大効果の変化量に対する 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与の影響率は、空腹時血糖値: 63.9%低下、QUICKI: 66.7%増大、骨格筋量: 69.6%増大、筋横断面積: 56.4%増大であったと算出できる。したがって、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大は、インスリン感受性および高血糖改善効果に 60-70%程度関与し、筋肥大効果に 50-70%程度関与している可能性が考えられる。しかしながら、研究課題 I の 5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与は、習慣的なレジスタンス運動による筋内および血中 DHT 濃度を抑制させ、筋内の DHEA および遊離テストステロン濃度をさらに増大させた。そのため、これらの算出された値は、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大だけでなく、全身性の DHT 濃度の増大の抑制、筋内の DHEA および遊離テストステロン濃度の加算的な増大、DHEA および遊離テストステロン、DHT によって発現が調節される物質の発現変動を含めた、5 $\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与による影響率であると考えられる。

#### 女性の習慣的なレジスタンス運動による高血糖改善および筋肥大効果に対する筋内の DHT の関連の可能性

研究課題 I では、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、雄の 2 型糖尿病モデルラットの高血糖改善および筋肥大効果に関与する可能性を示した。動物実験において、雄の健常モデルラットと比較して、雌の健常モデルラットでは、筋内の

DHEA 濃度に差は認められないが、遊離テストステロンおよび DHT 濃度が低値を示すことが報告されている (Aizawa et al. 2008, 2010)。しかしながら、習慣的なレジスタンス運動に対する筋肥大および筋力の増加率は、男女でほぼ同程度であることが報告されている (Petrella et al. 2006)。また、高齢者を対象とした DHEA の補充と習慣的なレジスタンス運動の併用は、男女同程度に最大筋力を増大させることが示されている (Villareal and Holloszy. 2006)。雌ラットにおける一過性の有酸素性運動は、筋内の DHEA、遊離テストステロン、DHT 濃度および 17 $\beta$ -HSD、5 $\alpha$ -reductase タンパク発現を増大させることが報告されている (Aizawa et al. 2008, 2010)。さらに、女性における一過性のレジスタンス運動は、血中 DHEA およびテストステロン濃度を増大させる (Copeland et al. 2002)。また、雌の高齢マウスにおける DHT 単回投与は、筋タンパク合成を促進させることが報告されている (Wendowski et al. 2017)。高齢女性における 6 ヶ月の DHEA 補充は、血中 DHT 濃度を増大させ、骨格筋量を増大させる傾向にあることが示されている (Morales et al. 1998)。これらの先行研究から、女性における習慣的なレジスタンス運動は、筋内の DHEA およびテストステロンを代謝して、筋内の DHT 合成を促進させ、男性と同様に筋肥大効果を誘発させる可能性が考えられる。一方で、雌マウスにおける慢性的な皮下からの DHT 投与は、インスリン感受性の低下および高血糖状態を誘発させることが報告されており (Andrisse et al. 2018; Inada et al. 2016)、女性における DHT 濃度の過剰な増大は、高血糖改善効果に悪影響を及ぼす可能性がある。それゆえに、習慣的なレジスタンス運動による 2 型糖尿病の高血糖改善効果およびその作用機序は、性別によって異なる可能性が考えられる。加えて、卵巣摘出手術の施行により、全身のエストロゲン分泌能が著しく低下するマウスに対する慢性的なエストロゲン投与は、筋横断面積の増大および OGTT から 1 時間後までの血糖値の AUC を低下させることが報告されている (Kawakami et al. 2018; Kitajima and Ono. 2016)。また、女性における一過性のレジスタンス運動は、血中 E2 濃度を増大させる (Copeland et al. 2002)。そのため、エストロゲン分泌能が低下している女性において、習慣的なレジスタンス運動によるエストロゲン濃度の増大は、高血糖改善および筋肥大効果に関与する可能性が考えられる。

### 筋内の性ステロイドホルモンと血中性ステロイドホルモン濃度との関連性

性ステロイドホルモンは、性ステロイドホルモン合成酵素によって、コレステロールおよび DHEA から代謝・合成されることが報告されている (Labrie et al. 2005; Payne and

Hales. 2004)。骨格筋内では、DHEA が  $3\beta$ -HSD および  $17\beta$ -HSD により、テストステロンに代謝・合成され、テストステロンから  $5\alpha$ -reductase を介して DHT が代謝・合成される (Aizawa et al. 2007; Sato et al. 2008)。しかしながら、骨格筋内では、コレステロールを代謝して DHEA を合成する酵素である P450<sub>scc</sub> および P450<sub>c17</sub> mRNA 発現は検出されないことが報告されている (Aizawa et al. 2010)。研究課題 I では、2 型糖尿病モデルラットにおける習慣的なレジスタンス運動は、血中 DHEA 濃度の増大とともに筋内の DHEA 濃度を増大させた。したがって、骨格筋内では DHEA を合成することができないため、筋内の DHEA 濃度の増大は、血中から筋内への DHEA 供給の増大に依存する可能性が考えられる。次に、研究課題 I において、筋内の DHT 濃度は習慣的なレジスタンス運動によって増大した。筋内の DHT 濃度の増大は、血中から供給された DHEA を代謝・合成する場合と血中から供給されるテストステロンおよび筋内にて代謝・合成されたテストステロンの両方を代謝・合成する場合が考えられる。しかしながら、血中 DHEA およびテストステロン、筋内で代謝・合成されたテストステロンが、筋内の DHT 合成の増大にどの程度貢献しているのかは明らかにできなかった。さらに、筋内の DHT 濃度の変動も筋内および血中のどちらからも影響する可能性がある。そのため、今後、筋特異的に  $5\alpha$ -reductase 遺伝子発現を欠損させた動物に対する習慣的なレジスタンス運動の応答を検討することで、筋内の DHT 濃度の増大における筋内と血中の性ステロイドホルモン供給の貢献度について明らかにする必要がある。

### 習慣的な運動における様式、強度、時間と筋内の DHT 濃度増大の関係性および高血糖改善効果

研究課題 I において、週 3 日、8 週間のレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の約 2 倍の増大が、2 型糖尿病モデルラット (OLETF) の高血糖改善効果に 63.9%関与し、その機序には筋内の Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進が関与することを明らかにした。習慣的な有酸素性運動による高血糖改善効果に対する  $5\alpha$ -reductase 抑制剤の慢性投与の影響を検討した先行研究では、6 週間の自由回転輪を用いた有酸素性運動による筋内の約 2 倍の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病モデルラット (Zucker) の高血糖改善効果に 35.9%関与し、その機序には筋内の PI3K/Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進が関与することが報告されている (Sato et al. 2013)。しかしながら、研究課題 I と先行研究では、動物モデルおよび運動期間、運動頻度が異なるため、習慣的なレジスタンス運動および有酸素性運動による

筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病の高血糖改善効果に関与する貢献度を単純に比較することはできない。一方で、研究課題 I および先行研究の結果から、習慣的なレジスタンス運動および有酸素性運動による筋内の DHT 濃度の増大を介した 2 型糖尿病の高血糖改善効果には、同様の PI3K/Akt/GLUT4 シグナル経路の亢進が関与すると考えられる。加えて、運動様式だけでなく、低強度 ( $40\%\dot{V}O_{2peak}$  を 15 分)、中強度 ( $70\%\dot{V}O_{2peak}$  を 15 分)、高強度 ( $90\%\dot{V}O_{2peak}$  を疲労困憊まで) のサイクリング運動による血中性ステロイドホルモン分泌の応答性を比較した先行研究において、運動強度依存的に血中 DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度が増大することが報告されている (Sato et al. 2016)。したがって、レジスタンス運動および有酸素性運動の強度は、性ステロイドホルモン濃度の増大に対して重要な要素の 1 つであると考えられる。さらに、本研究のセット間の休息時間を除いた約 6 分間のレジスタンス運動 (クライミング運動 1 回に対して 30 秒×4 回を 3 セット) は、筋内の遊離テストステロンおよび DHT 濃度を増大させた。先行研究において、30 分間の一過性のトレッドミル走による有酸素性運動は、筋内の DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度を増大させることが報告されている (Aizawa et al. 2010)。それゆえに、運動時間が短い場合でも、運動強度が高ければ、性ステロイドホルモン濃度を増大させる可能性がある。

### 一過性のレジスタンス運動および有酸素性運動による筋内の DHT 合成の促進

研究課題 II では、2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動が、筋内の DHEA 濃度を低下させ、筋内の遊離テストステロンおよび DHT 濃度、 $5\alpha$ -reductase タンパク発現を増大させた。先行研究において、健常モデルラットにおける一過性の有酸素性運動は、筋内の DHEA、遊離テストステロン、DHT 濃度および  $17\beta$ -HSD、 $5\alpha$ -reductase タンパク発現を増大させることが報告されている (Aizawa et al. 2008, 2010)。成熟した筋管細胞における電気刺激誘発性の筋収縮刺激は、筋内のテストステロンおよび DHT 濃度、 $5\alpha$ -reductase タンパク発現を増大させることが報告されている (Son et al. 2019)。したがって、一過性のレジスタンス運動および有酸素性運動による筋収縮刺激が、筋内の性ステロイドホルモン合成酵素を増大させ、筋内の DHEA およびテストステロンを代謝して、筋内の DHT 合成を促進させる可能性が考えられる。従来、性ステロイドホルモンは、主に精巣や卵巣、副腎などの内分泌腺で代謝・合成され、血液循環を介して様々な末梢組織に作用すると考えられてきた。副腎皮質刺激ホルモン (ACTH: adrenocorticotrophic

hormone) は、副腎による DHEA の合成と分泌を刺激することが知られている (Lamberts et al. 1997)。また、性腺刺激ホルモンの一種である卵胞刺激ホルモン (FSH: follicle-stimulating hormone) および黄体形成ホルモン (LH: luteinizing hormone) は、精巣によるテストステロンの合成と分泌を刺激することが知られている (Lamberts et al. 1997; Marshall et al. 1973)。さらに、一過性のレジスタンス運動および有酸素性運動により、血中 ACTH および FSH、LH 濃度が増大することが報告されている (Cumming et al. 1986, 1987; Inder et al. 1998; Kraemer et al. 1991, 1998)。それゆえに、一過性のレジスタンス運動および有酸素性運動による血中 ACTH および FSH、LH 濃度の増大が、副腎および精巣による DHEA およびテストステロンの合成と分泌を刺激し、血中から筋内に供給された DHEA およびテストステロンを代謝することで、筋内の DHT 合成を促進させる可能性が考えられる。

#### 一過性のレジスタンス運動による筋血流量の増大と血中から骨格筋への性ステロイドホルモン供給・取り込みの増大の可能性

研究課題 II において、一過性のレジスタンス運動は、筋内の DHEA を代謝して、筋内の遊離テストステロンおよび DHT 合成を促進させる可能性が示唆された。一方で、一過性のレジスタンス運動による血中 DHEA 濃度の変動は認められなかった。さらに、筋内の遊離テストステロンおよび DHT 濃度は運動終了直後をピークに増大し、血中遊離テストステロンおよび DHT 濃度は運動終了 1 時間後をピークに増大した。先行研究において、ヒトを対象とした一過性のレジスタンス運動中 (1RM の 75%強度のレッグプレス 10 回×8 セットおよび 1RM の 80%強度の膝伸展運動 8 回×8 セット) の脚の血流量は、安静時と比較して増大し、骨格筋の糖取り込み・利用を亢進させることが報告されている (Durham et al. 2004)。また、一過性のレジスタンス運動による筋血流量の増大は、血中から骨格筋へのアミノ酸供給・取り込みを増大させ、筋タンパク合成を促進させることが示されている (Tipton et al. 2001)。これらの先行研究から、筋血流量の増大は、血中から骨格筋への性ステロイドホルモン供給・取り込みを増大させる可能性がある。したがって、一過性のレジスタンス運動による筋血流量の増大が、血中から骨格筋への性ステロイドホルモン供給・取り込みを増大させ、糖取り込み・利用および筋タンパク合成の促進に関与した可能性が考えられる。その結果、一過性のレジスタンス運動による血中 DHEA 濃度の変動が認められず、運動終了直後に血中遊離テストステロンおよび DHT 濃度がピークに達しなかった

と考えられる。しかしながら、研究課題 II では、一過性のレジスタンス運動により、全身に循環する血中性ステロイドホルモン濃度を測定した。筋血流量の増大による血中から骨格筋への性ステロイドホルモン供給・取り込みの増大が、骨格筋の糖取り込み・利用および筋タンパク合成の促進に関与しているか否かを検討するためには、一過性のレジスタンス運動により、筋収縮が誘発される局所的な部位から採取した血中性ステロイドホルモン濃度を測定する必要がある。

## 本研究から予想されるインパクトや波及効果

本研究において、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病モデルラットの高血糖改善および筋肥大効果に関与し、高血糖改善効果に筋内の Akt/AS160/GLUT4 シグナル経路、筋肥大効果に筋内の mTOR/p70S6K シグナル経路の亢進が関与していることを明らかにした。本研究成果は、レジスタンス運動の有効性とその分子機序の一部を明らかにし、将来的には、2 型糖尿病患者に対して、性ステロイドホルモンの増大を目指す科学的根拠に基づいた運動療法を構築するための基礎的なデータとなり、スポーツ健康科学分野および医科学的分野に対して大きく貢献することができると考えられる。さらに、性ステロイドホルモンの増大に着目した運動療法に加えて、DHEA と化学構造が類似したジオスゲニンを豊富に含有しているヤマノイモ科の一種であるトゲドコロ摂取と組み合わせることで (Raju et al. 2004; Sato et al. 2014a, 2017)、2 型糖尿病の予防・改善に対する新たなアプローチ法の提供に貢献することが期待できる。

## 本研究結果の課題

### ① 性ステロイドホルモンの測定方法および抽出方法

先行研究において、血中 DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度の測定は、ELISA および酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay)、ラジオイムアッセイ (radioimmunoassay)、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) など様々な手法が用いられている (Bardi et al. 2010; Chung et al. 2015; Enatsu et al. 2017; Kimura et al. 1998)。本研究で用いた ELISA キットは、標的となるホルモン以外のホルモンともわずかに交差反応性を示すため、本研究の筋内および血中 DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度の測定結果は過大評価している可能性がある。しかしながら、本研究の血中 DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度



は、先行研究で測定された値の範囲内であった（血中 DHEA 濃度: 50-250,000 pg/ml [Ajdzanović et al. 2009; Bardi et al. 2010; Jelodar et al. 2018; Kimura et al. 1998; Li et al. 2019]、血中遊離テストステロン濃度: 0.5-15.0 pg/ml [El-Tantawy et al. 2007; Khalil and Abdu. 2015; Shin et al. 2000; Takizawa and Horii. 2002; You et al. 2013]、血中 DHT 濃度: 90-1,000 pg/ml [AI-Trad et al. 2017; Chung et al. 2015; Enatsu et al. 2017; Lund et al. 2011; Ma et al. 2004]）。本研究はすべて同様の ELISA キットを用いて測定をしたため、本研究の結果に及ぼす影響は小さいと考えられる。加えて、本研究の筋内および血中 DHEA および遊離テストステロン、DHT 濃度は先行研究と同様の方法を用いて測定したが（AI-Trad et al. 2017; Sato et al. 2011; Pöllänen et al. 2011）、有機溶媒やカラム精製などを用いて、不純物を性ステロイドホルモンと分離除去しなかった（Fogle et al. 2007）。したがって、筋内および血中 DHEA、遊離テストステロン、DHT 濃度のより正確な値を測定するためには、有機溶媒やカラム精製後、抽出した性ステロイドホルモンを high performance liquid chromatography にて分画し、LC-MS/MS などの質量分析により性ステロイドホルモンの含有量を測定する必要がある。

## ② 筋内の性ステロイドホルモン合成酵素の転写調節因子の検討

研究課題 I では、2 型糖尿病モデルラットにおける習慣的なレジスタンス運動が、筋内の 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現および DHT 濃度を増大させた。研究課題 II では、2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動が、筋内の 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現および DHT 濃度を増大させた。それゆえに、一過性のレジスタンス運動による筋内の 5 $\alpha$ -reductase の転写調節の亢進が慢性的に繰り返されることで、長期的に 5 $\alpha$ -reductase タンパク発現を増大させている可能性が考えられる。しかしながら、これまでの研究では、5 $\alpha$ -reductase の転写調節因子は明らかではない。近年、zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1) の遺伝子を欠損させた細胞では、5 $\alpha$ -reductase mRNA およびタンパク発現を増大させることから（Herrera et al. 2019）、ZEB1 は 5 $\alpha$ -reductase の転写調節因子の 1 つの候補である可能性が考えられる。そのため、今後は筋内の 5 $\alpha$ -reductase と ZEB1 との関連性を詳細に検討することが必要かもしれない。

## 今後の展望

研究課題 I では、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病モデルラットの高血糖改善および筋肥大効果に關与する可能性を示した。一方で、2 型糖尿病患者は、高齢者または肥満を呈している場合が多く (Basu et al. 2003; Harris et al. 1998; Iozzo et al. 1999)、運動を容易に継続することは困難となる可能性がある。そのため、ヒトへの応用を考慮するためには、以下の検討が必要であると考えられる。

- ① 2 型糖尿病に対して、安全で効果的な運動療法を提供するために、筋内の DHT 濃度を増大させるための最低限必要なレジスタンス運動の強度や時間、期間を検討する必要がある。
- ② 2 型糖尿病の予防・改善には、生活習慣の改善（運動療法と食事療法の併用）が推奨されている (Nathan et al. 2009)。トゲドコロを 2 型糖尿病モデルラットに 8 週間摂取させると、筋内の DHT 濃度が増大することが報告されている (Sato et al. 2017)。また、血中性ステロイドホルモン濃度が低下しているアスリートに対する 8 週間のレジスタンス運動とトゲドコロ摂取の併用は、低下した血中 DHT 濃度を正常濃度まで増大させ、筋量および筋力をレジスタンス運動単独よりも増大させる (Horii et al. 2020)。したがって、運動効果を増強させる方法として、2 型糖尿病患者の高血糖改善および筋肥大効果に対する、習慣的なレジスタンス運動とトゲドコロ摂取の併用効果を検討する必要がある。

## 第6章 結論

本研究の結果から、習慣的なレジスタンス運動による筋内の DHT 濃度の増大が、2 型糖尿病モデルラットの高血糖改善および筋肥大効果に関与し、高血糖改善効果の分子機序に、慢性的な筋内の Akt<sup>Ser473</sup>/GLUT4 シグナル経路の亢進が関与する可能性が示唆された。また、2 型糖尿病モデルラットにおける一過性のレジスタンス運動が、筋内の DHT 濃度の増大を介して筋内の Akt<sup>Ser473</sup>/AS160<sup>Thr642</sup>/GLUT4 シグナル経路および mTOR<sup>Ser2448</sup>/p70S6K<sup>Thr389</sup> シグナル経路を一過性に亢進させる可能性が示唆された。

## 謝辞

本博士論文を執筆するにあたり、学部2回生から約8年間、学士号および修士号、本博士号を取得するまでに懇切丁寧かつ熱心なご指導、ご助言を終始賜りました指導教員である立命館大学スポーツ健康科学部教授 家光素行先生に深甚の謝意を表します。また、ご多忙の中、副査を引き受けてくださいました立命館大学スポーツ健康科学部教授 田畑泉先生、橋本健志先生、東京都立大学人間健康科学研究科教授 藤井宜晴先生には貴重なご指導、ご鞭撻を賜り、厚く御礼申し上げます。さらに、実験や分析、論文執筆に際して多くのご指導、ご協力を賜りました筑波大学体育系名誉教授 目崎登先生、神戸大学大学院人間発達環境学研究科准教授 佐藤幸治先生、立命館大学スポーツ健康科学部助教 内田昌孝先生、藤江隼平先生、立命館大学総合科学技術研究機構専門研究員 長谷川夏輝先生にも心から感謝の意を表します。さらに、日常の議論を通じて、多くの知識や示唆を頂きました家光研究室の大学院生および学部生の皆様にも、感謝の意を表します。最後に、立命館大学スポーツ健康科学部の3期生として入学したのちの4年間、同大学院同研究科博士課程前期課程での2年間、博士課程後期課程での3年間の学びを構築して頂いた教職員の皆様、ならびに心身ともに支えてくださいました両親に深く御礼申し上げます。以上の皆様に、心からの感謝の意を表して、謝辞とさせていただきます。

## 参考文献

1. Aizawa K, Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Mowa CN, Miyauchi T, Mesaki N. Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 292(2): E577-E584.
2. Aizawa K, Iemitsu M, Maeda S, Otsuki T, Sato K, Ushida T, Mesaki N, Akimoto T. Acute exercise activates local bioactive androgen metabolism in skeletal muscle. *Steroids*, 2010; 75(3): 219-223.
3. Aizawa K, Iemitsu M, Otsuki T, Maeda S, Miyauchi T, Mesaki N. Sex differences in steroidogenesis in skeletal muscle following a single bout of exercise in rats. *J Appl Physiol*, 2008; 104(1): 67-74.
4. Ajdzanović V, Sosić-Jurjević B, Filipović B, Trifunović S, Manojlović-Stojanoski M, Sekulić M, Milosević V. Genistein-induced histomorphometric and hormone secreting changes in the adrenal cortex in middle-aged rats. *Exp Biol Med*, 2009; 234(2): 148-156.
5. Al-Trad B, Al-Zoubi M, Qar J, Al-Batayneh K, Hussien E, Muhaidat R, Aljabali A, Alkhateeb H, Al Omari G. Inhibitory effect of thymoquinone on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in Wistar rats. *Phytother Res*, 2017; 31(12): 1910-1915.
6. Ali S, Garcia JM. Sarcopenia, cachexia and aging: diagnosis, mechanisms and therapeutic options - a mini-review. *Gerontology*, 2014; 60(4): 294-305.
7. Almurdhhi MM, Reeves ND, Bowling FL, Boulton AJ, Jeziorska M, Malik RA. Reduced lower-limb muscle strength and volume in patients with type 2 diabetes in relation to neuropathy, intramuscular fat, and vitamin D levels. *Diabetes Care*, 2016; 39(3): 441-447.
8. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care*, 2018; 41(S1): S13-S27.
9. Andrisse S, Billings K, Xue P, Wu S. Insulin signaling displayed a differential tissue-specific response to low-dose dihydrotestosterone in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018; 314(4): E353-E365.
10. Atlantis E, Martin SA, Haren MT, Taylor AW, Wittert GA. Inverse associations between muscle mass, strength, and the metabolic syndrome. *Metabolism*, 2009; 58(7): 1013-1022.
11. Baar K, Esser K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. *Am J Physiol*, 1999; 276(1): C120-C127.

12. Bacchi E, Negri C, Zanolin ME, Milanese C, Faccioli N, Trombetta M, Zoppini G, Cevese A, Bonadonna RC, Schena F, Bonora E, Lanza M, Moghetti P. Metabolic effects of aerobic training and resistance training in type 2 diabetic subjects: a randomized controlled trial (the RAED2 study). *Diabetes Care*, 2012; 35(4): 676-682.
13. Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, Downes CP, Alessi DR. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol*, 1999; 9(8): 393-404.
14. Bardenheier BH, Lin J, Zhuo X, Ali MK, Thompson TJ, Cheng YJ, Gregg EW. Disability-free life-years lost among adults aged  $\geq 50$  years with and without diabetes. *Diabetes Care*, 2016; 39(7): 1222-1229.
15. Bardi M, Hampton JE, Lambert KG. Fecal dehydroepiandrosterone (DHEA) immunoreactivity as a noninvasive index of circulating DHEA activity in young male laboratory rats. *Comp Med*, 2010; 60(6): 455-460.
16. Baron AD, Brechtel G, Wallace P, Edelman SV. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol*, 1988; 255(6): E769-E774.
17. Basu R, Breda E, Oberg AL, Powell CC, Man CD, Basu A, Vittone JL, Klee GG, Arora P, Jensen MD, Toffolo G, Cobelli C, Rizza RA. Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. *Diabetes*, 2003; 52(7): 1738-1748.
18. Benomar Y, Naour N, Aubourg A, Bailleux V, Gertler A, Djiane J, Guerre-Millo M, Taouis M. Insulin and leptin induce Glut4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a phosphatidylinositol 3-kinase- dependent mechanism. *Endocrinology*, 2006; 147(5): 2550-2556.
19. Berdanier CD, Parente Jr JA, McIntosh MK. Is dehydroepiandrosterone an antiobesity agent? *FASEB J*, 1993; 7(5): 414-419.
20. Bhasin S, Storer TW, Berman N, Callegari C, Clevenger B, Phillips J, Bunnell TJ, Tricker R, Shirazi A, Casaburi R. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med*, 1996; 335(1): 1-7.
21. Björnholm M, Kawano Y, Lehtihet M, Zierath JR. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo

- insulin stimulation. *Diabetes*, 1997; 46(3): 524-527.
22. Boulé NG, Kenny GP, Haddad E, Wells GA, Sigal RJ. Meta-analysis of the effect of structured exercise training on cardiorespiratory fitness in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2003; 46(8): 1071-1081.
  23. Brodsky IG, Balagopal P, Nair KS. Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men - a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996; 81(10): 3469-3475.
  24. Brook MS, Wilkinson DJ, Mitchell WK, Lund JN, Szewczyk NJ, Greenhaff PL, Smith K, Atherton PJ. Skeletal muscle hypertrophy adaptations predominate in the early stages of resistance exercise training, matching deuterium oxide-derived measures of muscle protein synthesis and mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling. *FASEB J*, 2015; 29(11): 4485-4496.
  25. Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos MP. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008; 295(5): E1269-E1276.
  26. Cheung N, Mitchell Paul, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet*, 2010; 376(9735): 124-136.
  27. Chung KS, An HJ, Cheon SY, Kwon KR, Lee KH. Bee venom suppresses testosterone-induced benign prostatic hyperplasia by regulating the inflammatory response and apoptosis. *Exp Biol Med*, 2015; 240(12): 1656-1663.
  28. Church TS, Blair SN, Cocreham S, Johannsen N, Johnson W, Kramer K, Mikus CR, Myers V, Nauta M, Rodarte RQ, Sparks L, Thompson A, Earnest CP. Effects of aerobic and resistance training on hemoglobin A1c levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2010; 304(20): 2253-2262.
  29. Coelho-Junior HJ, Picca A, Calvani R, Uchida MC, Marzetti E. If my muscle could talk: Myokines as a biomarker of frailty. *Exp Gerontol*, 2019; 127: 110715.
  30. Coffey VG, Reeder DW, Lancaster GI, Yeo WK, Febbraio MA, Yaspelkis BB, Hawley JA. Effect of high-frequency resistance exercise on adaptive responses in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 2007; 39(12): 2135-2144.
  31. Colberg SR, Albright AL, Blissmer BJ, Braun B, Chasan-Taber L, Fernhall B, Regensteiner JG, Rubin RR, Sigal RJ, American College of Sports Medicine; American Diabetes

- Association. Exercise and type 2 diabetes: American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. Exercise and type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc*, 2010; 42(12): 2282-2303.
32. Coleman DL, Leiter EH, Schwizer RW. Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice. *Diabetes*, 1982; 31(9): 830-833.
  33. Copeland JL, Consitt LA, Tremblay MS. Hormonal responses to endurance and resistance exercise in females aged 19-69 years. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2002; 57(4): B158-B165.
  34. Cumming DC, Brunsting LA 3rd, Strich G, Ries AL, Rebar RW. Reproductive hormone increases in response to acute exercise in men. *Med Sci Sports Exerc*, 1986; 18(4): 369-373.
  35. Cumming DC, Wall SR, Galbraith MA, Belcastro AN. Reproductive hormone responses to resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 1987; 19(3): 234-238.
  36. Damas F, Phillips SM, Libardi CA, Vechin FC, Lixandrão ME, Jannig PR, Costa LA, Bacurau AV, Snijders T, Parise G, Tricoli V, Roschel H, Ugrinowitsch C. Resistance training-induced changes in integrated myofibrillar protein synthesis are related to hypertrophy only after attenuation of muscle damage. *J Physiol*, 2016; 594(18): 5209-5222.
  37. De Pergola G, Zamboni M, Sciaraffia M, Turcato E, Pannacciulli N, Armellini F, Giorgino F, Perrini S. Body fat accumulation is possibly responsible for lower dehydroepiandrosterone circulating levels in premenopausal obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1996; 20(12): 1105-1110.
  38. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (Type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1985; 76(1): 149-155.
  39. DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, 1998; 37(6): 667-687.
  40. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*, 2008; 88(11): 1254-1264.
  41. Dohm GL, Elton CW, Friedman JE, Pilch PF, Pories WJ, Atkinson Jr SM, Caro JF. Decreased expression of glucose transporter in muscle from insulin-resistant patients. *Am J Physiol*, 1991; 260(3): E459-E463.
  42. Donatto FF, Neves RX, Rosa FO, Camargo RG, Ribeiro H, Matos-Neto EM, Seelaender M.



- Resistance exercise modulates lipid plasma profile and cytokine content in the adipose tissue of tumour-bearing rats. *Cytokine*, 2013; 61(2): 426-432.
43. Douen AG, Ramlal T, Cartee GD, Klip A. Exercise modulates the insulin-induced translocation of glucose transporters in rat skeletal muscle. *FEBS Lett*, 1990; 261(2): 256-260.
  44. Dreyer HC, Fujita S, Cadenas JG, Chinkes DL, Volpi E, Rasmussen BB. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2006; 576(2): 613-624.
  45. Drummond MJ, Dreyer HC, Fry CS, Glynn EL, Rasmussen BB. Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *J Appl Physiol*, 2009; 106(4): 1374-1384.
  46. Durham WJ, Miller SL, Yeckel CW, Chinkes DL, Tipton KD, Rasmussen BB, Wolfe RR. Leg glucose and protein metabolism during an acute bout of resistance exercise in humans. *J Appl Physiol*, 2004; 97(4): 1379-1386.
  47. El-Tantawy WH, Temraz A, El-Gindi OD. Free serum testosterone level in male rats treated with Tribulus alatus extracts. *Int Braz J Urol*, 2007; 33(4): 554-558.
  48. Enatsu N, Chiba K, Sumii K, Fukuda T, Okada K, Matsushita K, Fujisawa M. Dutasteride-mediated morphological changes in the genitourinary tract associated with altered expression patterns of the androgen and estrogen receptors in male rats. *Andrology*, 2017; 5(2): 347-353.
  49. Fink J, Schoenfeld BJ, Nakazato K. The role of hormones in muscle hypertrophy. *Phys Sportsmed*, 2018; 46(1): 126-134.
  50. Fogle RH, Stanczyk FZ, Zhang X, Paulson RJ. Ovarian androgen production in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92(8): 3040-3043.
  51. Friedman JE, Sherman WM, Reed MJ, Elton CW, Dohm GL. Exercise training increases glucose transporter protein GLUT-4 in skeletal muscle of obese Zucker (fa/fa) rats. *FEBS Lett*, 1990; 268(1): 13-16.
  52. Frontera WR, Meredith CN, O'Reilly KP, Knuttgen HG, Evans WJ. Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *J Appl Physiol*, 1988; 64(3): 1038-1044.
  53. Fukui M, Ose H, Kitagawa Y, Yamazaki M, Hasegawa G, Yoshikawa T, Nakamura N. Relationship between low serum endogenous androgen concentrations and arterial stiffness in

- men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2007; 56(9): 1167-1173.
54. Goodman CA, Frey JW, Mabrey DM, Jacobs BL, Lincoln HC, You Jae-Sung, Hornberger TA. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J Physiol*, 2011; 589(22): 5485-5501.
  55. Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *J Clin Invest*, 1995; 95(5): 2195-2204.
  56. Goodyear LJ, Kahn BB. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med*, 1998; 49: 235-261.
  57. Goodyear LJ, King PA, Hirshman MF, Thompson CM, Horton ED, Horton ES. Contractile activity increases plasma membrane glucose transporters in absence of insulin. *Am J Physiol*, 1990; 258(4): E667-E672.
  58. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med*, 2002; 346(5): 340-352.
  59. Haffner SM, Lehto S, Rönkämaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1998; 339(4): 229-234.
  60. Hajdúch E, Alessi DR, Hemmings BA, Hundal HS. Constitutive activation of protein kinase B alpha by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes*, 1998; 47(7):1006-1013.
  61. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, Byrd-Holt DD. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care*, 1998; 21(4): 518-524.
  62. Herrera D, Orellana-Serradell O, Villar P, Torres MJ, Paciucci R, Castellón EA, Contreras HR. Silencing of the transcriptional factor ZEB1 alters the steroidogenic pathway, and increases the concentration of testosterone and DHT in DU145 cells. *Oncol Rep*, 2019; 41(2): 1275-1283.
  63. Hirata Y, Nomura K, Senga Y, Okada Y, Kobayashi K, Okamoto S, Minokoshi Y, Imamura M,

- Takeda S, Hosooka T, Ogawa W. Hyperglycemia induces skeletal muscle atrophy via a WWP1/KLF15 axis. *JCI Insight*, 2019; 4(4): e124952.
64. Holm AC, Fredrikson MG, Theodorsson E, Palmefors LG, Karlsson PS, Joborn C, Hammar ML. Change in testosterone concentrations over time is a better predictor than the actual concentrations for symptoms of late onset hypogonadism. *Aging Male*, 2011; 14(4): 249-256.
  65. Horii N, Hasegawa N, Fujie S, Iemitsu K, Uchida M, Hamaoka T, Iemitsu M. Effects of *Dioscorea esculenta* intake with resistance training on muscle hypertrophy and strength in sprint athletes. *J Clin Biochem Nutr*, 2020; 67(3): 338-343.
  66. Horii N, Hasegawa N, Fujie S, Uchida M, Iemitsu K, Inoue K, Iemitsu M. Effect of combination of chlorella intake and aerobic exercise training on glycemic control in type 2 diabetic rats. *Nutrition*, 2019; 63-64: 45-50.
  67. Horii N, Sato K, Mesaki N, Iemitsu M. DHEA administration activates transcription of muscular lipid metabolic enzymes via PPAR $\alpha$  and PPAR $\delta$  in obese rats. *Horm Metab Res*, 2016; 48(3): 207-212.
  68. Horii N, Uchida M, Hasegawa N, Fujie S, Oyanagi E, Yano H, Hashimoto T, Iemitsu M. Resistance training prevents muscle fibrosis and atrophy via down-regulation of C1q-induced Wnt signaling in senescent mice. *FASEB J*, 2018; 32(7): 3547-3559.
  69. Hornberger Jr TA, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*, 2004; 29(1): 16-31.
  70. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 1993; 259(5091): 87-91.
  71. Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ*, 2006; 332(7533): 73-78.
  72. Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S. Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019; 191: 105375.
  73. Inada A, Fujii NL, Inada O, Higaki Y, Furuichi Y, Nabeshima YI. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and androgen on glucose metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology*, 2016; 157(12): 4691-4705.
  74. Inder WJ, Hellemans J, Swanney MP, Prickett TC, Donald RA. Prolonged exercise increases

- peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes. *J Appl Physiol*, 1998; 85(3): 835-841.
75. International Diabetes Federation (2019) IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019.
  76. Iozzo P, Beck-Nielsen H, Laakso M, Smith U, Yki-Järvinen H, Ferrannini E. Independent influence of age on basal insulin secretion in nondiabetic humans. European Group for the Study of Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84(3): 863-868.
  77. Jelodar G, Masoomi S, Rahmanifar F. Hydroalcoholic extract of flaxseed improves polycystic ovary syndrome in a rat model. *Iran J Basic Med Sci*, 2018; 21(6): 645-650.
  78. Jessen N, An D, Lihn AS, Nygren J, Hirshman MF, Thorell A, Goodyear LJ. Exercise increases TBC1D1 phosphorylation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011; 301(1): E164-E171.
  79. Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2005; 99(1): 330-337.
  80. Jung S, Ahn N, Kim S, Byun J, Joo Y, Kim S, Jung Y, Park S, Hwang I, Kim K. The effect of ladder-climbing exercise on atrophy/hypertrophy-related myokine expression in middle-aged male Wistar rats. *J Physiol Sci*, 2015; 65(6): 515-521.
  81. Kanzleiter T, Rath M, Görgens SW, Jensen J, Tangen DS, Kolnes AJ, Kolnes KJ, Lee S, Eckel J, Schürmann A, Eckardt K. The myokine decorin is regulated by contraction and involved in muscle hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014; 450(2): 1089-1094.
  82. Karagounis LG, Yaspelkis BB, Reeder DW, Lancaster GI, Hawley JA, Coffey VG. Contraction-induced changes in TNF $\alpha$  and Akt-mediated signalling are associated with increased myofibrillar protein in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, 2010; 109(5): 839-848.
  83. Katta A, Kakarla S, Wu M, Paturi S, Gadde MK, Arvapalli R, Kolli M, Rice KM, Blough ER. Altered regulation of contraction-induced Akt/mTOR/p70S6k pathway signaling in skeletal muscle of the obese Zucker rat. *Exp Diabetes Res*, 2009; 2009: 384683.
  84. Kawakami M, Yokota-Nakagi N, Uji M, Yoshida KI, Tazumi S, Takamata A, Uchida Y, Morimoto K. Estrogen replacement enhances insulin-induced AS160 activation and improves insulin sensitivity in ovariectomized rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018; 315(6): E1296-E1304.

85. Kawanaka K, Tabata I, Tanaka A, Higuchi M. Effects of high-intensity intermittent swimming on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *J Appl Physiol*, 1998; 84(6): 1852-1857.
86. Khalil WK, Abdu F. Protective effect of melatonin against zonisamide-induced reproductive disorders in male rats. *Arch Med Sci*, 2015; 11(3): 660-669.
87. Kido K, Ato S, Yokokawa T, Makanae Y, Sato K, Fujita S. Acute resistance exercise-induced IGF1 expression and subsequent GLUT4 translocation. *Physiol Rep*, 2016; 4(16): e12907.
88. Kido K, Ato S, Yokokawa T, Sato K, Fujita S. Resistance training recovers attenuated APPL1 expression and improves insulin-induced Akt signal activation in skeletal muscle of type 2 diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018; 314(6): E564-E571.
89. Kido K, Yokokawa T, Ato S, Sato K, Fujita S. Effect of resistance exercise under conditions of reduced blood insulin on AMPK $\alpha$  Ser485/491 inhibitory phosphorylation and AMPK pathway activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2017; 313(2): R110-R119.
90. Kim JS, Park YM, Lee SR, Masad IS, Khamoui AV, Jo E, Park BS, Arjmandi BH, Panton LB, Lee WJ, Grant SC.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate did not enhance high intensity resistance training-induced improvements in myofiber dimensions and myogenic capacity in aged female rats. *Mol Cells*, 2012; 34(5): 439-448.
91. Kim JY, Choi MJ, So B, Kim HJ, Seong JK, Song W. The preventive effects of 8 weeks of resistance training on glucose tolerance and muscle fiber type composition in Zucker rats. *Diabetes Metab J*, 2015; 39(5): 424-433.
92. Kim KW, Baek MO, Choi JY, Son KH, Yoon MS. Analysis of the molecular signaling signatures of muscle protein wasting between the intercostal muscles and the gastrocnemius muscles in db/db mice. *Int J Mol Sci*, 2019; 20(23): 6062.
93. Kimura M, Tanaka S, Yamada Y, Kiuchi Y, Yamakawa T, Sekihara H. Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor- $\alpha$  and restores insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. *Endocrinology*, 1998; 139(7): 3249-3253.
94. Kitajima Y, Ono Y. Estrogens maintain skeletal muscle and satellite cell functions. *J Endocrinol*, 2016; 229(3): 267-275.
95. Kitaoka Y, Nakazato K, Ogasawara R. Combined effects of resistance training and calorie restriction on mitochondrial fusion and fission proteins in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*,

2016; 121(3): 806-810.

96. Kraemer WJ, Gordon SE, Fleck SJ, Marchitelli LJ, Mello R, Dziados JE, Friedl K, Harman E, Maresh C, Fry AC. Endogenous anabolic hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise in males and females. *Int J Sports Med*, 1991; 12(2): 228-235.
97. Kraemer WJ, Häkkinen K, Newton RU, McCormick M, Nindl BC, Volek JS, Gotshalk LA, Fleck SJ, Campbell WW, Gordon SE, Farrell PA, Evans WJ. Acute hormonal responses to heavy resistance exercise in younger and older men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1998; 77(3): 206-211.
98. Krisan AD, Collins DE, Crain AM, Kwong CC, Singh MK, Bernard JR, Yaspelkis BB 3rd. Resistance training enhances components of the insulin signaling cascade in normal and high-fat-fed rodent skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2004; 96(5): 1691-1700.
99. Kristiansen S, Nielsen JN, Bourgoin S, Klip A, Franco M, Richter EA. GLUT-4 translocation in skeletal muscle studied with a cell-free assay: involvement of phospholipase D. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001; 281(3): E608-E618.
100. Krook A, Björnholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG Jr, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 2000; 49(2): 284-292.
101. Krook A, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Sending the signal: Molecular mechanisms regulating glucose uptake. *Med Sci Sports Exerc*, 2004; 36(7): 1212-1217.
102. Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C. Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol*, 2005; 187(2): 169-196.
103. Lamberts SW, van den Beld AW, van der Lely AJ. The endocrinology of aging. *Science*, 1997; 278(5337): 419-424.
104. Lee AD, Hansen PA, Holloszy JO. Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS Lett*, 1995; 361(1): 51-54.
105. Lee D, Kim H, Ahn SH, Lee SH, Bae SJ, Kim EH, Kim HK, Choe JW, Kim BJ, Koh JM. The association between serum dehydroepiandrosterone Sulphate (DHEA-S) level and bone mineral density in Korean men. *Clin Endocrinol*, 2015; 83(2): 173-179.
106. Lee HJ, Lee JO, Lee YW, Kim SA, Park SH, Kim HS. Kalirin, a GEF for Rac1, plays an important role in FSTL-1-mediated glucose uptake in skeletal muscle cells. *Cell Signal*, 2017;

- 29: 150-157.
107. Li L, Li H, Qu P, Xiao M, Zhang G, Zhang Q, Cai Y, Jin C, Yang J, Wu S, Lu X. An antagonism joint action of lead and Di-2-ethylhexyl phthalate explains an improved ability of learning and memory after combined exposure in weaning rats. *Biol Trace Elem Res*, 2019; 191(1): 126-134.
  108. Liu N, Nelson BR, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014; 111(11): 4109-4114.
  109. Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; 92(13): 5817-5821.
  110. Lund TD, Blake C, Bu L, Hamaker AN, Lephart ED. Equol an isoflavonoid: potential for improved prostate health, in vitro and in vivo evidence. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011; 13; 9: 4.
  111. Ma Z, Nguyen TH, Huynh TH, Do PT, Huynh H. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin-finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. *J Endocrinol*, 2004; 181(3): 493-507.
  112. Marshall JC, Anderson DC, Fraser TR, Harsoulis P. Human luteinizing hormone in man: studies of metabolism and biological action. *J Endocrinol*, 1973; 56(3): 431-439.
  113. Matheny RW, Merritt E, Zannikos SV, Farrar RP, Adamo ML. Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. *Exp Biol Med*, 2009; 234(2): 164-170.
  114. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, Kelly DP, Spiegelman BM. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98(7): 3820-3825.
  115. Morales AJ, Haubrich RH, Hwang JY, Asakura H, Yen SS. The effect of six months treatment with a 100 mg daily dose of dehydroepiandrosterone (DHEA) on circulating sex steroids, body composition and muscle strength in age-advanced men and women. *Clin Endocrinol*, 1998; 49(4): 421-432.
  116. Motamed N, Miresmail SJ, Rabiee B, Keyvani H, Farahani B, Maadi M, Zamani F. Optimal cutoff points for HOMA-IR and QUICKI in the diagnosis of metabolic syndrome and non-

- alcoholic fatty liver disease: A population based study. *J Diabetes Complications*, 2016; 30(2): 269-274.
117. Muller S, Cleary MP. Glucose metabolism in isolated adipocytes from lean and obese Zucker rats following treatment with dehydroepiandrosterone. *Metabolism*, 1985; 34(3): 278-284.
  118. Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, Zinman B. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, 2009; 32(1): 193-203.
  119. Negaresh R, Ranjbar R, Baker JS, Habibi A, Mokhtarzade M, Gharibvand MM, Fokin A. Skeletal muscle hypertrophy, insulin-like growth factor 1, myostatin and follistatin in healthy and sarcopenic elderly men: The effect of whole-body resistance training. *Int J Prev Med*, 2019; 10: 29.
  120. Nestler JE, McClanahan MA, Clore JN, Blackard WG. Insulin inhibits adrenal 17,20-lyase activity in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992; 74(2): 362-367.
  121. Nishizawa H, Matsuda M, Yamada Y, Kawai K, Suzuki E, Makishima M, Kitamura T, Shimomura I. Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem*, 2004; 279(19): 19391-19395.
  122. Nooron N, Athipornchai A, Suksamrarn A, Chiabchalard A. Mahanine enhances the glucose-lowering mechanisms in skeletal muscle and adipocyte cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017; 494(1-2): 101-106.
  123. Ogasawara R, Sato K, Matsutani K, Nakazato K, Fujita S. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014; 306(10): E1155-E1162.
  124. O'Neill HM, Maarbjerg SJ, Crane JD, Jeppesen J, Jørgensen SB, Schertzer JD, Shyroka O, Kiens B, van Denderen BJ, Tarnopolsky MA, Kemp BE, Richter EA, Steinberg GR. AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011; 108(38): 16092-16097.
  125. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*, 2004; 25(6): 947-970.



126. Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J, Dedhar S. Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97(7): 3207-3212.
127. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev*, 2018; 98(4): 2133-2223.
128. Petersmann A, Müller-WD, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, Heinemann L, Schleicher E. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2019; 127(S1): S1-S7.
129. Petrella JK, Kim J, Cross JM, Kosek DJ, Bamman MM. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006; 291(5): E937-E946.
130. Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol*. 1997; 273(1): E99-E107.
131. Pöllänen E, Sipilä S, Alen M, Ronkainen PH, Ankarberg-Lindgren C, Puolakka J, Suominen H, Hämäläinen E, Turpeinen U, Kontinen YT, Kovanen V. Differential influence of peripheral and systemic sex steroids on skeletal muscle quality in pre- and postmenopausal women. *Aging Cell*, 2011; 10(4): 650-660.
132. Raju J, Patlolla JM, Swamy MV, Rao CV. Diosgenin, a steroid saponin of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek), inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004; 13(8): 1392-1398.
133. Ritz E. Nephropathy in type II diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1997; 105(S2): 80-82.
134. Ritz E, Rychlík I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis*, 1999; 34(5): 795-808.
135. Ryder JW, Chibalin AV, Zierath JR. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 2001; 171(3): 249-257.
136. Ryder JW, Yang J, Galuska D, Rincón J, Björnholm M, Krook A, Lund S, Pedersen O, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR, Holman GD. Use of a novel impermeable biotinylated

- photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*, 2000; 49(4): 647-654.
137. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 2005; 307(5712): 1098-1101.
  138. Sato K, Fujita S, Iemitsu M. Acute administration of diosgenin or dioscorea improves hyperglycemia with increases muscular steroidogenesis in STZ-induced type 1 diabetic rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2014a; 143: 152-159.
  139. Sato K, Fujita S, Iemitsu M. Dioscorea esculenta-induced increase in muscle sex steroid hormones is associated with enhanced insulin sensitivity in a type 2 diabetes rat model. *FASEB J*, 2017; 31(2): 793-801.
  140. Sato K, Fujita S, Yamauchi H, Shiroya Y, Kitamura H, Minato K, Iemitsu M. The exercise-induced improvement in hyperglycemia is mediated by DHT produced in the skeletal muscle of Zucker diabetic fatty rats. *J Diabetes Metab*, 2013; 4(1): 239.
  141. Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Ajisaka R. DHEA improves impaired activation of Akt and PKC  $\zeta$ /lambda-GLUT4 pathway in skeletal muscle and improves hyperglycaemia in streptozotocin-induced diabetes rats. *Acta Physiol*, 2009; 197(3): 217-225.
  142. Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Ajisaka R. Testosterone and DHEA activate the glucose metabolism-related signaling pathway in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008; 294(5): E961-E968.
  143. Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Mesaki N, Ajisaka R, Fujita S. DHEA administration and exercise training improves insulin resistance in obese rats. *Nutr Metab*, 2012; 9: 47.
  144. Sato K, Iemitsu M, Aizawa K, Mesaki N, Fujita S. Increased muscular dehydroepiandrosterone levels are associated with improved hyperglycemia in obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011; 301(2): E274-E280.
  145. Sato K, Iemitsu M, Katayama K, Ishida K, Kanao Y, Saito M. Responses of sex steroid hormones to different intensities of exercise in endurance athletes. *Exp Physiol*, 2016; 101(1): 168-175.
  146. Sato K, Iemitsu M, Matsutani K, Kurihara T, Hamaoka T, Fujita S. Resistance training restores muscle sex steroid hormone steroidogenesis in older men. *FASEB J*, 2014b; 28(4): 1891-1897.
  147. Schwingshackl L, Missbach B, Dias S, König J, Hoffmann G. Impact of different training modalities on glycaemic control and blood lipids in patients with type 2 diabetes: a systematic

- review and network meta-analysis. *Diabetologia*, 2014; 57(9): 1789-1797.
148. Searls YM, Loganathan R, Smirnova IV, Stehno-Bittel L. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia. *Cardiovasc Diabetol*, 2010; 9: 8.
  149. Shin WY, Li SZ, Chung SS, Lee HC, Huh KB, Lim SK. Effects of cyclosporin A on sex hormone and estrogen receptor in male rat with special reference to cyclosporin A-induced osteoporosis. *Yonsei Med J*, 2000; 41(1): 61-67.
  150. Sigal RJ, Kenny GP, Boulé NG, Wells GA, Prud'homme D, Fortier M, Reid RD, Tulloch H, Coyle D, Phillips P, Jennings A, Jaffey J. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 2007; 147(6): 357-369.
  151. Snowling NJ, Hopkins WG. Effects of different modes of exercise training on glucose control and risk factors for complications in type 2 diabetic patients: a meta-analysis. *Diabetes Care*, 2006; 29(11): 2518-2527.
  152. Son BK, Eto M, Oura M, Ishida Y, Taniguchi S, Ito Ko, Umeda-Kameyama Y, Kojima T, Akishita M. Low-intensity exercise suppresses CCAAT/Enhancer-binding protein  $\delta$ /Myostatin pathway through androgen receptor in muscle cells. *Gerontology*, 2019; 65(4): 397-406.
  153. Srikanthan P, Hevener AL, Karlamangla AS. Sarcopenia exacerbates obesity associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. *PLoS One*, 2010; 5(5): e10805.
  154. Srikanthan P, Karlamangla AS. Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011; 96(9): 2898-2903.
  155. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001; 409(6818): 307-312.
  156. Strasser B, Pesta D. Resistance training for diabetes prevention and therapy: experimental findings and molecular mechanisms. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 805217.
  157. Tabata I, Suzuki Y, Fukunaga T, Yokozeki T, Akima H, Funato K. Resistance training affects GLUT-4 content in skeletal muscle of humans after 19 days of head-down bed rest. *J Appl Physiol*, 1999; 86(3): 909-914.

158. Takizawa S, Horii I. Endocrinological assessment of toxic effects on the male reproductive system in rats treated with 5-fluorouracil for 2 or 4 weeks. *J Toxicol Sci*, 2002; 27(1): 49-56.
159. Tanaka M, Masuda S, Yamakage H, Inoue T, Ohue-Kitano R, Yokota S, Kusakabe T, Wada H, Sanada K, Ishii K, Hasegawa K, Shimatsu A, Satoh-Asahara N. Role of serum myostatin in the association between hyperinsulinemia and muscle atrophy in Japanese obese patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018; 142: 195-202.
160. Tipton KD, Rasmussen BB, Miller SL, Wolf SE, Owens-Stovall SK, Petrini BE, Wolfe RR. Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 281(2): E197-E206.
161. Treebak JT, Pehmøller C, Kristensen JM, Kjøbsted R, Birk JB, Schjerling P, Richter EA, Goodyear LJ, Wojtaszewski JF. Acute exercise and physiological insulin induce distinct phosphorylation signatures on TBC1D1 and TBC1D4 proteins in human skeletal muscle. *J Physiol*, 2014; 592(2): 351-375.
162. Umpierre D, Ribeiro PA, Kramer CK, Leitão CB, Zucatti AT, Azevedo MJ, Gross JL, Ribeiro JP, Schaan BD. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2011; 305(17): 1790-1799.
163. Usui T, Kajita K, Kajita T, Mori I, Hanamoto T, Ikeda T, Okada H, Taguchi K, Kitada Y, Morita H, Sasaki T, Kitamura T, Sato T, Kojima I, Ishizuka T. Elevated mitochondrial biogenesis in skeletal muscle is associated with testosterone-induced body weight loss in male mice. *FEBS Lett*, 2014; 588(10): 1935-1941.
164. Vendelbo MH, Møller AB, Treebak JT, Gormsen LC, Goodyear LJ, Wojtaszewski JF, Jørgensen JO, Møller N, Jessen N. Sustained AS160 and TBC1D1 phosphorylations in human skeletal muscle 30 min after a single bout of exercise. *J Appl Physiol*, 2014; 117(3): 289-296.
165. Villareal DT, Holloszy JO. DHEA enhances effects of weight training on muscle mass and strength in elderly women and men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006; 291(5): E1003-E1008.
166. Vinel C, Lukjanenko L, Batut A, Deleruyelle S, Pradère JP, Le Gonidec S, Dortignac A, Geoffre N, Pereira O, Karaz S, Lee U, Camus M, Chaoui K, Mouisel E, Bigot A, Mouly V, Vigneau M, Pagano AF, Chopard A, Pillard F, Guyonnet S, Cesari M, Burlet-Schiltz O, Pahor M, Feige JN,

- Vellas B, Valet P, Dray C. The exerkinic apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nat Med*, 2018; 24(9): 1360-1371.
167. Wang Q, Somwar R, Bilan PJ, Liu Z, Jin J, Woodgett JR, Klip A. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol*, 1999; 19(6): 4008-4018.
  168. Wendowski O, Redshaw Z, Mutungi G. Dihydrotestosterone treatment rescues the decline in protein synthesis as a result of sarcopenia in isolated mouse skeletal muscle fibres. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2017; 8(1): 48-56.
  169. Wu M, Huang J, Zhang J, Benes C, Jiao B, Ren R. N-arachidonoyl dopamine inhibits NRAS neoplastic transformation by suppressing its plasma membrane translocation. *Mol Cancer Ther*, 2017; 16(1): 57-67.
  170. Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, Vonderfecht S, Hecht R, Li YS, Lindberg RA, Chen JL, Jung DY, Zhang Z, Ko HJ, Kim JK, Véniant MM. Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 2009; 58(1): 250-259.
  171. Xu T, Shen Y, Pink H, Triantafillou J, Stimpson SA, Turnbull P, Han B. Phosphorylation of p70s6 kinase is implicated in androgen-induced levator ani muscle anabolism in castrated rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004; 92(5): 447-454.
  172. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 2002; 8(11): 1288-1295.
  173. Yanagita I, Fujihara Y, Kitajima Y, Tajima M, Honda M, Kawajiri T, Eda T, Yonemura K, Yamaguchi N, Asakawa H, Nei Y, Kayashima Y, Yoshimoto M, Harada M, Araki Y, Yoshimoto S, Aida E, Yanase T, Nawata H, Muta K. A high serum cortisol/DHEA-S ratio is a risk factor for sarcopenia in elderly diabetic patients. *J Endocr Soc*, 2019; 3(4): 801-813.
  174. Yang Z, Scott CA, Mao C, Tang J, Farmer AJ. Resistance exercise versus aerobic exercise for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med*, 2014; 44(4): 487-499.
  175. Yaspelkis BB 3rd, Singh MK, Trevino B, Krisan AD, Collins DE. Resistance training increases glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*, 2002; 175(4): 315-323.

176. Yokokawa T, Sato K, Iwanaka N, Honda H, Higashida K, Iemitsu M, Hayashi T, Hashimoto T. Dehydroepiandrosterone activates AMP kinase and regulates GLUT4 and PGC-1 $\alpha$  expression in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015; 463(1-2): 42-47.
177. Yoshioka M, Boivin A, Ye P, Labrie F, St-Amand J. Effects of dihydrotestosterone on skeletal muscle transcriptome in mice measured by serial analysis of gene expression. *J Mol Endocrinol*, 2006; 36(2): 247-259.
178. You T, Disanzo BL, Arsenis NC. Aerobic exercise training attenuates obesity-related hypogonadism in male rats. *Med Sci Sports Exerc*, 2013; 45(7): 1244-1251.
179. Zeng F, Zhao H, Liao J. Androgen interacts with exercise through the mTOR pathway to induce skeletal muscle hypertrophy. *Biol Sport*, 2017; 34(4): 313-321.
180. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia*, 2000; 43(7): 821-835.