

図 1. 参加者の中性脂肪値の変化

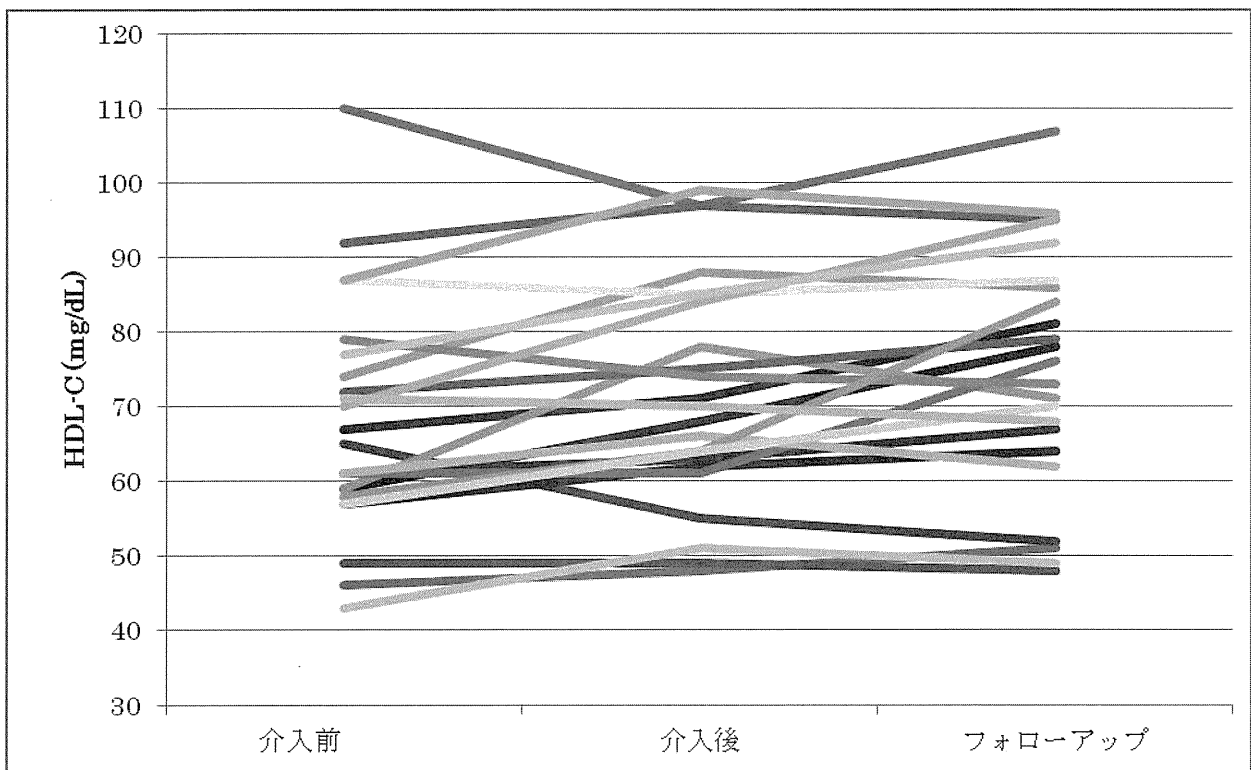


図 2. 参加者の HDL-C 値の変化

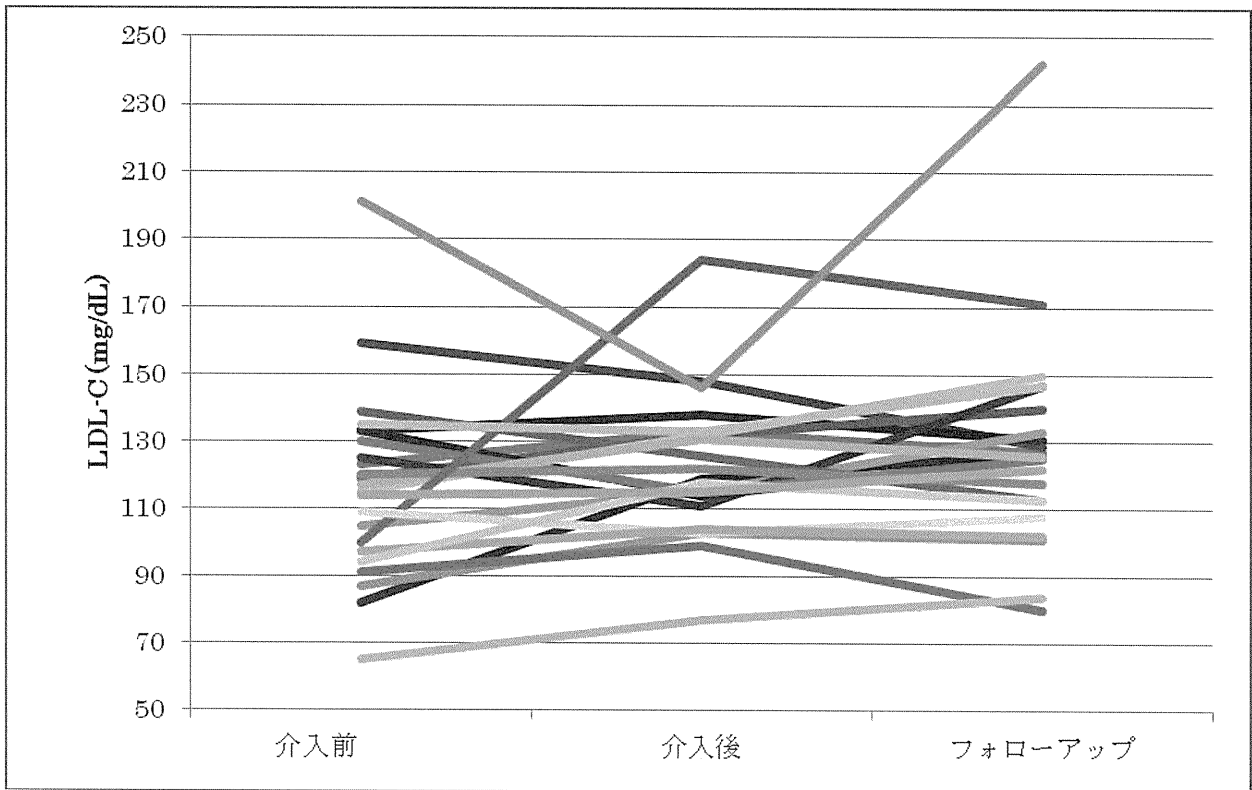


図 3. 参加者の LDL-C 値の変化

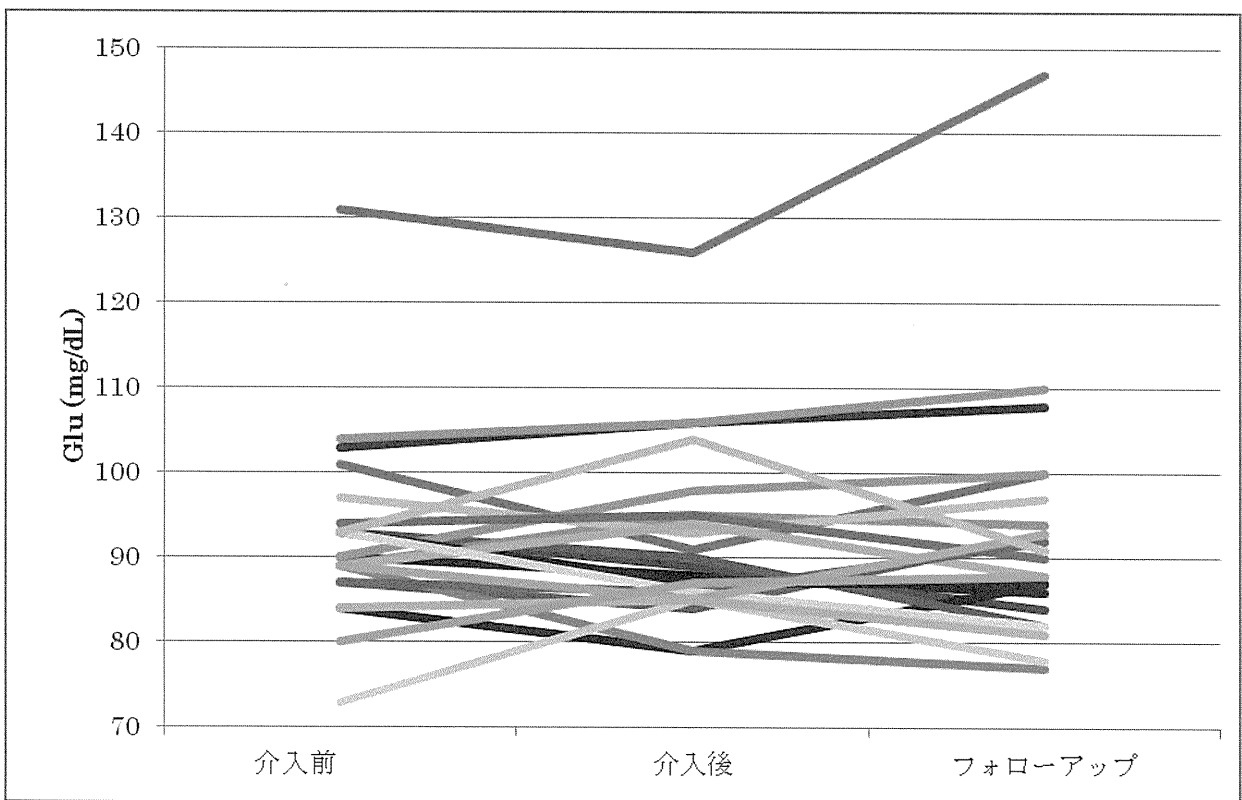


図 4. 参加者の血糖値の変化

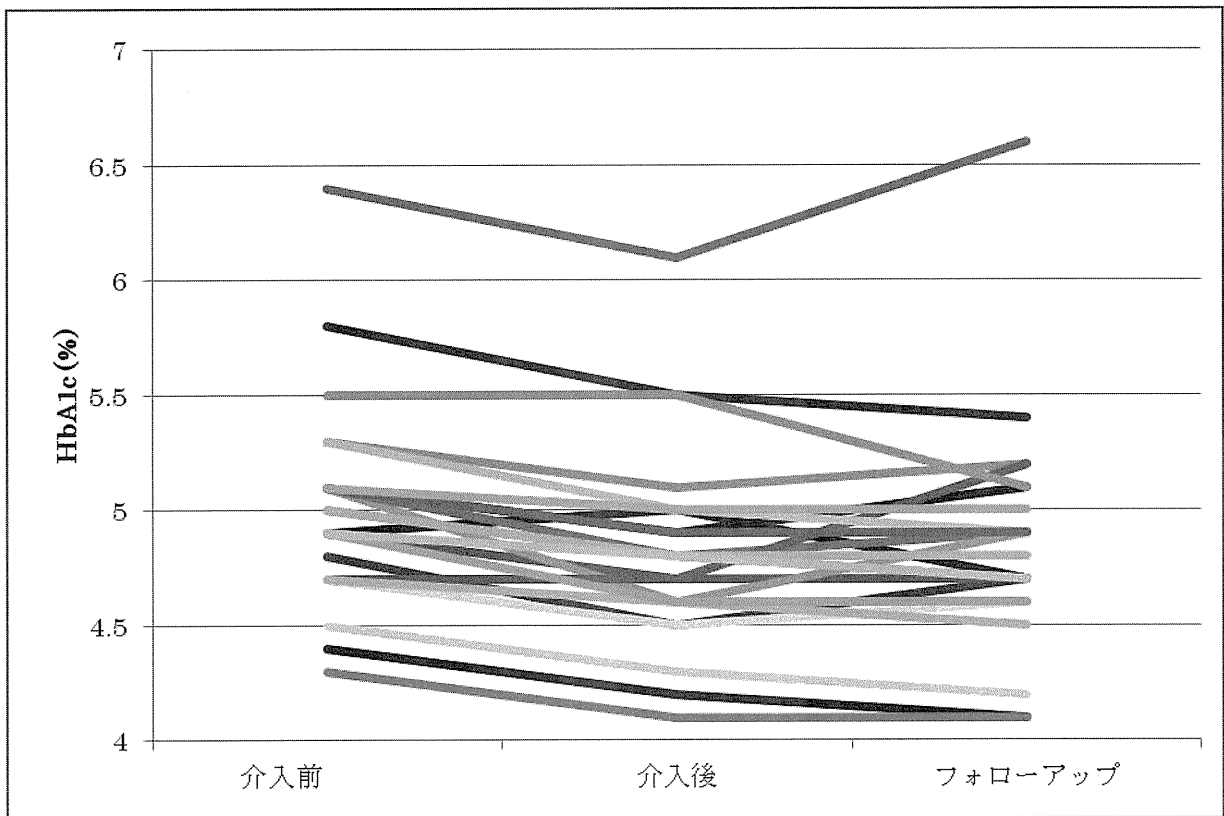


図 5. 参加者の HbA1c 値の変化

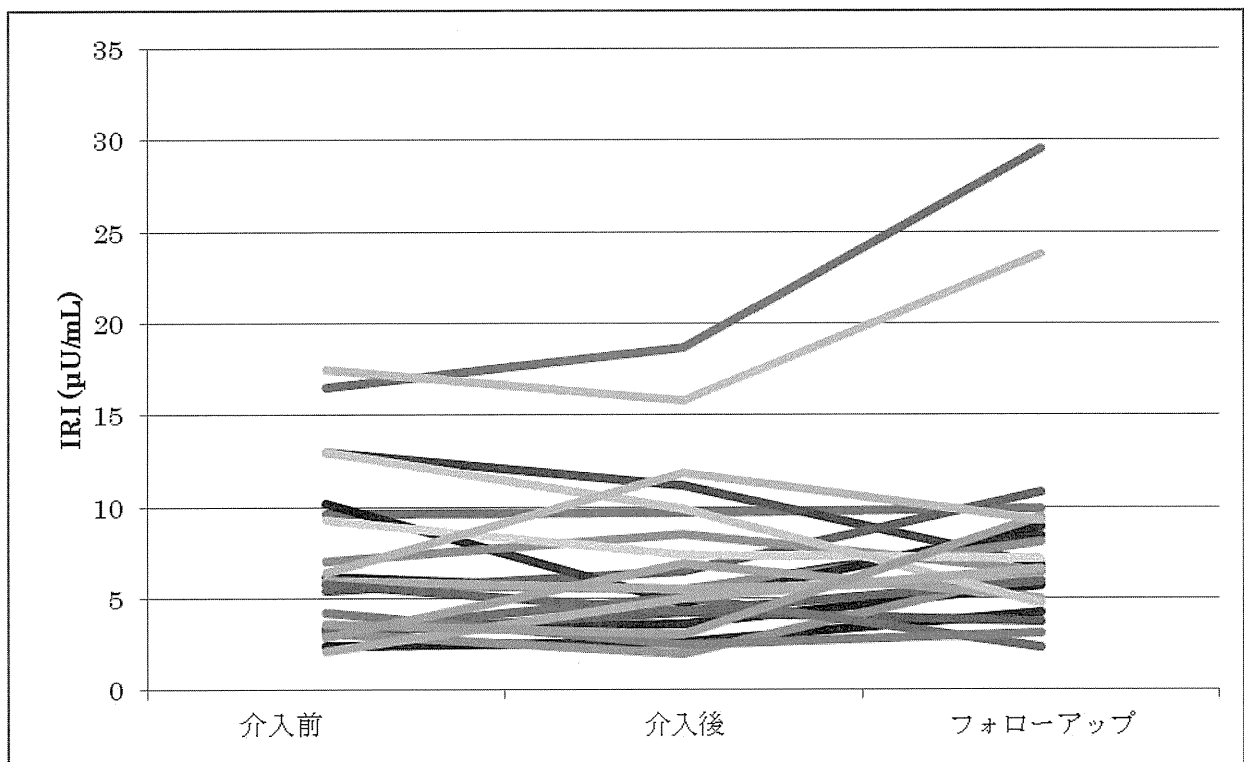


図 6. 参加者のインスリン値の変化

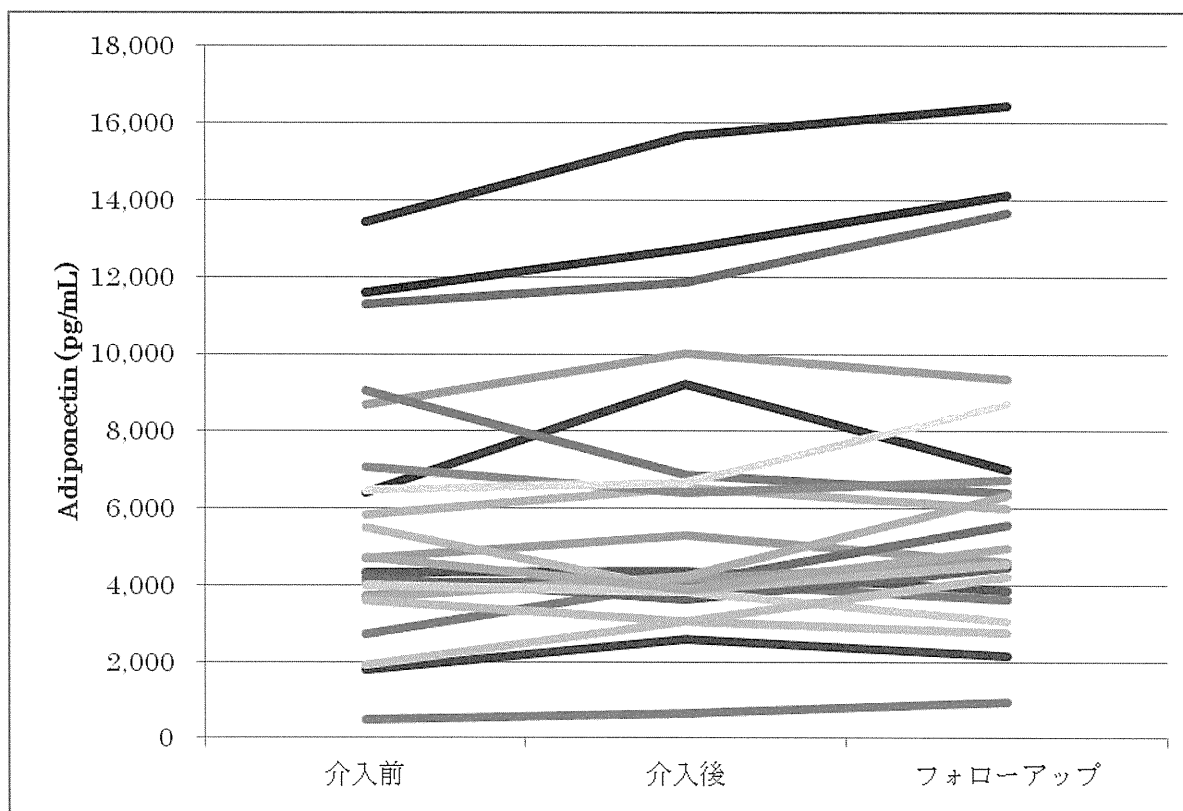


図 7. 参加者の Adiponectin 値の変化

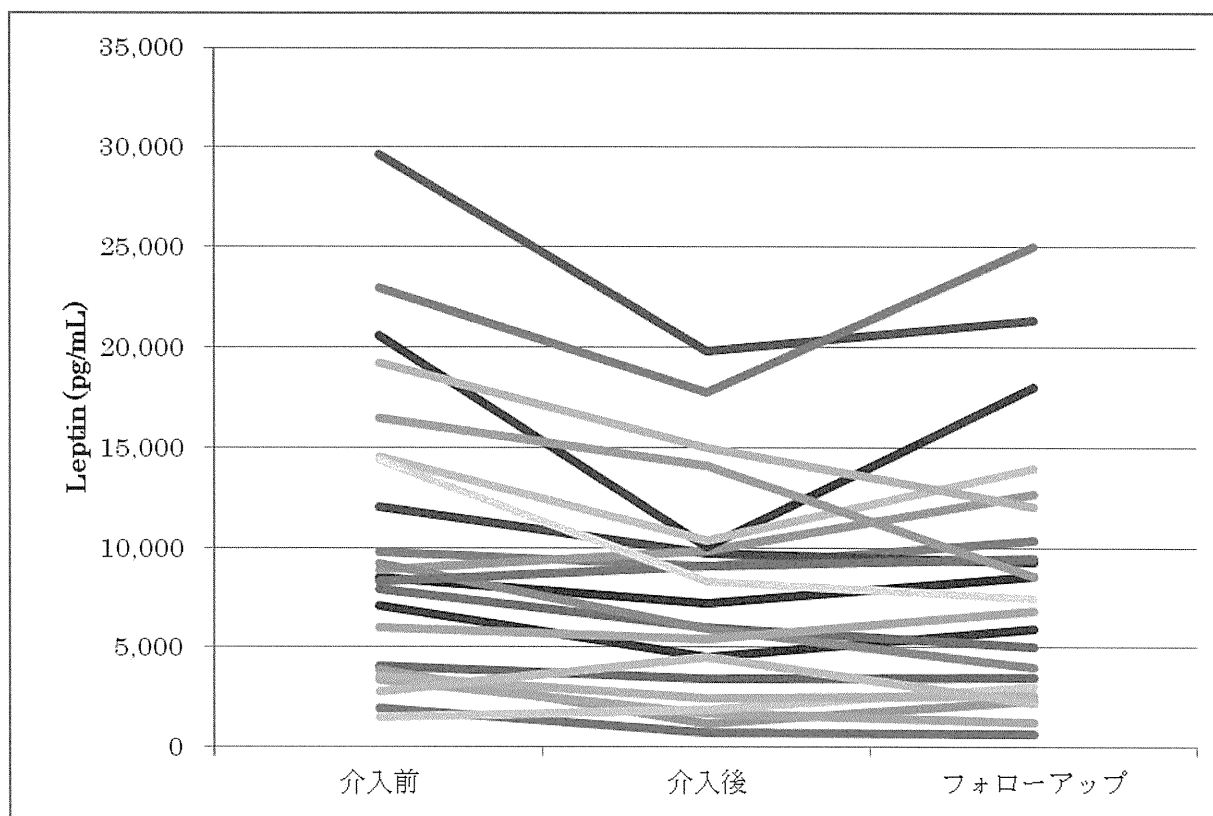


図 8. 参加者の Leptin 値の変化

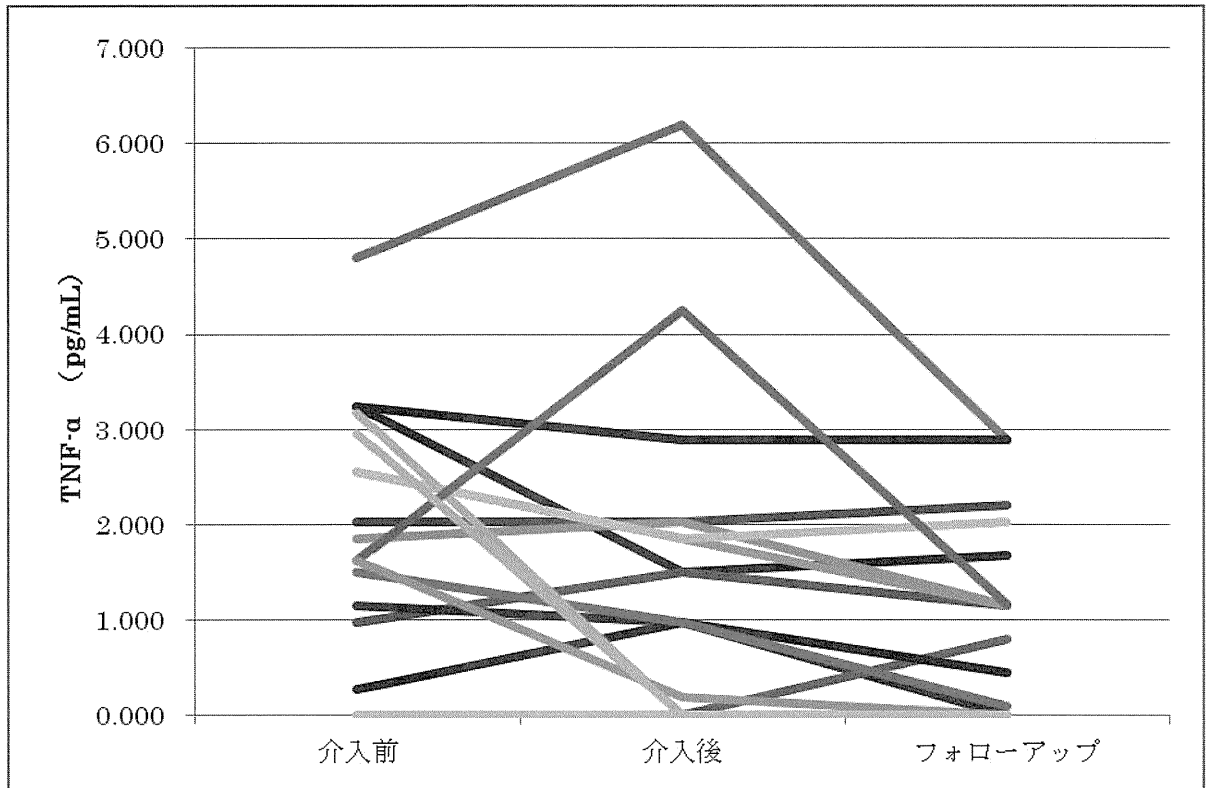


図 9. 参加者の TNF- $\alpha$  値の変化

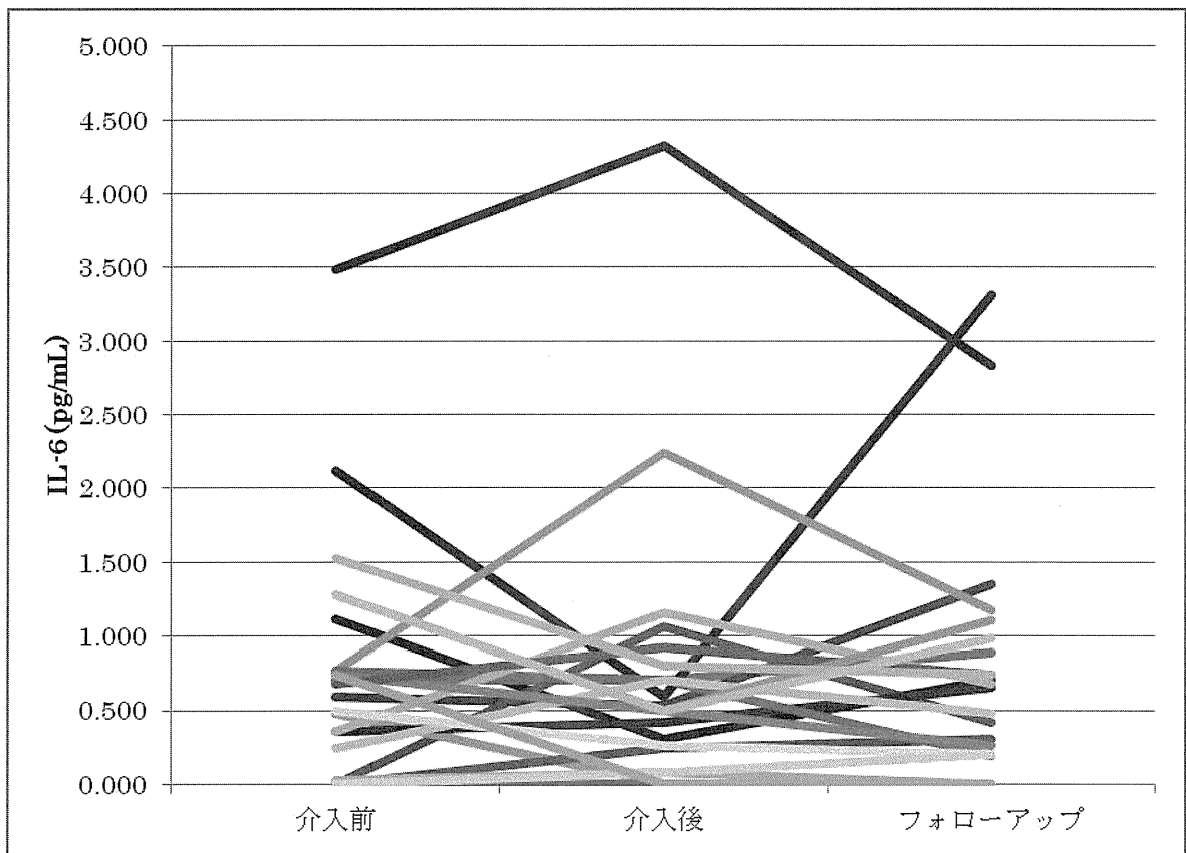


図 10. 参加者の IL-6 値の変化

## 質問紙を用いた身体活動量の評価とその活用

研究分担者 内藤 義彦

（武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科・教授）

研究要旨 本研究は、1)わが国の実情に即した身体活動量の定量的評価方法を確立すること、2)それを活用した身体活動量の過不足の診断システムを開発すること、3)身体活動量とエンドポイントとの関連を様々なコホート集団で検討することを目的としている。JALSPAQ による身体活動量評価の妥当性は検証され、より多くの研究での活用が期待される。そのためには、二つのアプローチがある。一つは身体活動量データ処理用システムの改良であり、より短時間に入力し、エラーチェックや結果通知の質の向上と迅速化が求められる。もう一つは、少数の質問項目の抽出であり、工作中的の姿勢や重いものを運ぶ仕事に関する情報が重要と考えられた。次に、近年利用が広まっている加速度計法と質問紙法とを同時に実施し、その関連性の検討から、それぞれの方法の得手・不得手があると考えられる。目的に合わせた利用を事前に検討すべきと考えられる。

### A. 研究目的

多くの国々において身体活動の不足が進行・深刻化し、それが影響する疾病が増加しつつあるという見解に対する異論は少ないだろう。しかしながら、身体活動について定量的に評価する方法が確立していない状況では説得力に欠けるところがある。

そこで、本研究全体の目的は、わが国の実情に即した身体活動量の定量的評価方法を確立することを第一とし、それを活用して身体活動量の過不足を診断する実用的な方法の開発を第二に、そしてこれらにより評価された身体活動量と疾病および健康との関連を検討することを第三としている。

第一の目的の身体活動量の評価方法の確立は、身体活動に関する疫学研究を進めていく上で前提条件ともいえるものであり、最優先課題である。これに関して、昨年の報告において、二重標識水（DLW）を用いた検討の結果、私どもが開発した公益信託動脈硬化予防研究基金統合研究用身体活動量質問票(Japan Arteriosclerosis Longitudinal

Study Physical Activity Questionnaire、以下、JALSPAQ) の比較的高い妥当性を検証し、特に質問項目の中で「工作中的の姿勢」の身体活動量（体重当たり1日消費エネルギー量、以下 TEE/BW）に対する寄与率が高いことを認めた。

また、「工作中的の姿勢」と健診データとの関連について横断的検討をした結果、1日総歩数、皮下脂肪厚、血中ヘモグロビンおよび尿酸と有意な関連を認めた。さらに、既存のコホートデータを活用し、「工作中的の姿勢」と発がんのリスクの関連を検討した結果、全がんとはU型パターンを示し、結腸がんとは立業が多いほどリスクが低いという量・反応関係を認めた。

一方、JALSPAQ は A4 サイズで2枚に収まる比較的少数の質問項目から構成されているが、疫学調査用に開発したものであり、一人当たりの調査時間は10~20分程度要する。一方、健康診断や通常の調査では、より簡便な調査票が望ましい。

そこで、本研究では、第二の目的を実現するため、JALSPAQ をベースにして、より短時間に多くの人に調査できるように質問項目の抽出を試

みる。なお、妥当性研究の成果を踏まえ、JALSPAQ オリジナル版を今後多くの場面で活用してもらうことを想定し、入力・解析・出力のプログラムを改良し、実用的な運用に備える。

次に、本研究班のために、事業所における調査に導入した3軸加速度計により評価した身体活動量と、同時に実施したJALSPAQによる身体活動量との関連を検討することによって、両法の利点・欠点を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. JALSPAQにおける有用性の高い質問項目の抽出とその妥当性の検討

厚生労働科学研究費補助金（主任研究者：田中茂穂）において、性・年齢・ライフスタイルに関して多様な226名の対象を集めて、二重標識水（DLW）法による消費エネルギー量を評価し、同時に実施したJALSPAQの妥当性を検討した。本研究では、このデータを用い、疫学調査や健康診断など多数の対象とした活用方法を考慮し、少数の質問項目を組み合わせた身体活動量スコアの作成を試みた。DLWによるTEE/BWを目的変数として、各質問項目との関連性を、相関分析および $\chi^2$ 検定により検討した。次に、重回帰分析により、互いに独立な複数の身体活動指標から、変数増減法により有意な指標を抽出し、これらを組み合わせて身体活動量スコアを作成した。なお、このスコアはTEE/BWまたはTEEの推定量を意味するものではなく、相関が高く、身体活動量の多寡を表すものと考えられる。

### 2. 質問紙による身体活動量評価のためのデータ処理用システムの改良

現在、JALSPAQは統合研究用に作成されたソフトで入力され、身体活動量が計算・出力されている。身体活動量を推定することが主目的であり、分かりやすく指導に役立つ結果票としての配慮が乏しい。そこで、新たに大量処理に対応し指導に役立つよう、入力時・計算時のチェックログ

クを強化したソフトの改良を行った。その特長と成果を検討した。

### 3. 3軸加速度計による身体活動量と質問紙法による身体活動量との関連

分析対象は、本研究事業において3軸加速度計（omron社、Active style Pro、以下、活動量計）とJALSPAQによる身体活動量調査を実施することができた1事業所の2010年の調査参加者373名である。

本検討では、休日を含め5日以上活動量計を装着し、1日当たり1時間以上の自転車利用または1時間の重いものを運ぶ労働のした者を除いた342名を解析対象とした。

先に論じた妥当性の高い質問項目および身体活動量スコアと活動量計から得られる身体活動量指標との関連を検討し、関連性の高いものと低いものの違いから、両者が把握する身体活動の質的な差異について考察した。

### 4. 倫理面への配慮

本研究における既存データを用いた研究は、既に当該研究において倫理委員会の承認を受けている。また、事業所の身体活動量に関するデータは、九州大学の倫理審査委員会の承認を受け身体活動以外の情報は無いので、倫理的な問題は生じがたいと考えられる。

## C. 研究結果

### 1. JALSPAQにおける有用性の高い質問項目の抽出とその妥当性の検討

DLWにより算出したTEE/BWおよびTEEとJALSPAQによるものとのSpearmanの順位相関係数は各々0.346、0.742であった（図1、論文発表1より作成）。

ここで、JALSPAQにおける仕事に関する質問項目のうち、重労働に関する情報は活動時間に関する回答値が高く過剰評価になる可能性が高く、TEE/BWの推定に用いなかった。そこで、本検討

では、1週間の重労働の時間と TEE および TEE/BW との相関を検討したところ、ともに有意な正の相関 ( $r=0.467, 0.457$ ) を認めた。そこで、TEE/BW を目的変数として、仕事時間と仕事中の姿勢で算出された仕事によるメッツ時、同様に家事、歩行・自転車による移動、運動、運動以外の余暇活動によるメッツ時、重労働の時間、性、年齢を説明変数にしてステップワイズ法による重回帰分析を行った結果、重労働時間と仕事によるメッツ時のみが有意な説明変数として抽出された。そこで、この二つの変数の回帰係数と切片を用いて推定される TEE/BW およびこれに体重を乗じて推定される TEE と、DLW による両指標との間の Spearman の順位相関係数は各々 0.392、0.786 (図 2)、Pearson の相関係数は各々 0.523、0.813 であり、これまでのロジックで算出した値よりも高かった。なお、このスコアは仕事による身体活動量を反映しているので、これに移動や運動によるメッツ時を加えた指標でも同様の検討を行ったが、相関係数はすこし低下した。

## 2. 質問紙による身体活動量評価のためのデータ処理用システムの改良

これまでの疫学研究に用いてきた身体活動量に関する指標を出力するだけでなく、エクササイズガイド 2006 で導入されたエクササイズも換算できるようにした。また、性・年齢に応じた身体活動量の基準範囲と比較して、身体活動量の多寡を判定し、身体活動の内容(ドメイン)に応じて、どの場面で身体活動量を増やすべきかアドバイスを提示するシステムを試作した。ただし、性・年齢に応じた基準範囲について、今のものは仮に設定したもので、正式には公益信託日本動脈硬化予防研究基金統合研究における数万名のデータに基づき設定する予定である。

## 3. 3軸加速度計による身体活動量と質問紙法による身体活動量との関連

DLW との検討 (図 3) と同様、活動量計によ

る TEE/BW および TEE と JALSPAQ による身体活動量指標の関連を検討した結果、仕事中の姿勢と TEE/BW (図 4) は明らかな量・反応関係を認めた。同様に、1日当たり平均歩数 (図 5)、エクササイズ数とも明らかな量・反応関係を認めた。一方、活動量計による TEE/BW と JALSPAQ による TEE/BW や身体活動量スコアとの関連を検討した結果では、ともに有意であるが、順位相関係数が 0.30 レベルの比較的弱い相関しか認めなかった。また、重いものを運ぶ日数 (図 6) や週当たり総時間とは一定の傾向を認めなかった。

## D. 考察

JALSPAQ の妥当性に関する論文の公表により、今後の JALSPAQ を用いた疫学研究に対する信頼性は増すものと考えられる。

既に、いくつか JALSPAQ を使用した研究が行われており、糖尿病患者に対する大規模調査研究 (学会発表 2, 3) や地域住民における自律神経機能と身体活動に関する研究 (学会発表 4) が進行している。今後、希望する研究者が増えてくる事態も想定する必要があるが、現状では、限定された統合研究参加コホートに対して準備されたものになっている。そこで、本研究では、妥当性の確立した JALSPAQ を柱とし、より広く身体活動量評価が可能になるようシステム化を図っている。疫学研究のみならず指導など様々な場面で活用できるよう、入力から結果出力まで一貫して処理出来、しかも単なる数値データの返却にとどまらず、被調査者に分かりやすい判定結果を出力できるようにしたいと考えている。

さらに、特に、健康診断や保健指導での利用を想定して JALSPAQ を基にして簡便化した身体活動量評価方法を検討した。有用な少数の質問項目の抽出が必要であり、「仕事中の姿勢」は少なくとも勤労者の身体活動量を推し量るには大変有用な質問項目と考えられる。さらに、DLW を用いた妥当性研究のデータを再解析すると、これまで無視してきた重いものを運ぶ仕事に関する情報



が1日消費エネルギー量に強く関連していることが判明した。そこで、これまでの仕事に重いものを運ぶのに要する総仕事を加味した身体活動量スコアを用いたところ、DLWによる消費エネルギー量との関連性が向上した。ここでは、仕事日数、総仕事時間および仕事時の姿勢に重いものを運ぶ時間、体重という少数の質問項目だけで、1日総消費エネルギー量に対する寄与率が6割を占めるという結果である。

もともと、寄与率に関しては、身体活動量スコアは重回帰分析で導出したものなので、過大評価している可能性がある。しかしながら、少数の質問項目で比較的精度の高い身体活動量評価方法ができる可能が高いと考えられた。

次に、歩行・走行だけでなく、DLWとの妥当性研究を通じて様々な身体活動量を高精度に評価できるとされる3軸加速度計を用いて、JALSPAQの身体活動量指標との関連性を検討した。その結果、仕事時の姿勢は、これまでの他の方法による身体活動量との関連性の結果と同様、TEE/BWや1日当たり平均歩数と密接な関連を認めたと、重いものを運んだり、上半身中心の運動をしたり、ストレッチや水泳など歩行・走行以外の運動をしたり、自転車に乗ったりしても、活動量計の測定値にはあまり影響しないと考えられた。すなわち、3軸といえども、加速度計では、身体活動量の全部を把握しきれない。一方、質問紙は本人の記憶と強度の判断に頼るので、精度の低下や外れ値が出現するリスクが高い。

各方法の利点・欠点を理解し、状況に合わせて、選択することが必要と考えられる。

今後は、JALSPAQを用いて身体活動量の過不足の診断に使用可能か、本研究班に属する事業所や地域集団に対して記述疫学あるいは横断的研究も試みたいと考える。

## E. 結論

日本人を対象とした疫学研究や保健指導において適用可能な身体活動質問紙を開発し、DLWを

用いた妥当性研究により一定の妥当性を確認できた。これを踏まえ、JALSPAQを活用した研究や現場での応用を展開すべきであり、そのためのシステム構築が必要である。また、身体活動量を評価するために、近年、3軸加速度計が広く用いられるようになったが、質問紙と加速度計とで、互いに得手不得手があり、それぞれの利点を活かした利用に配慮すべきと考えられた。

## F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kazuko Ishikawa-Takata, Yoshihiko Naito, Shigeho Tanaka, et al. Use of Doubly Labeled Water to Validate a Physical Activity Questionnaire Developed for the Japanese Population. *Journal of Epidemiology*, 21(2): 114-121, 2011.
- 2) 井上 茂, 岡 浩一郎, 内藤義彦, 他. 身体活動のトロント憲章日本語版: 世界規模での行動の呼びかけ. *運動疫学研究*, 13(1): 12-29, 2011.

### 2. 学会発表

- 1) Yoshihiko Naito, Kazuko Takata, Shigeho Tanaka, et al. Sedentary Occupation, Its Validity and Risk for Colon Cancer. the 59<sup>th</sup> ACSM Annual Meeting (Indianapolis, USA), 2011年5月. MSSE. 2011; 43(5): 576
- 2) 大屋 純子, 中神 朋子, 内藤 義彦, 他. 身体活動エネルギー量と総白血球数、白血球分画の関係 栗橋ライフスタイルコホート 10. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会(札幌), 2011年5月.
- 3) Oya Junko, Nakagami Tomoko, Naito Yoshihiko, et al. Association of total and differential white blood cell counts with physical energy expenditure. 12th Symposium of the international diabetes epidemiology group (Sharjah, UAE), 2011年12月.

- 4) 齊藤功、森浩実、内藤義彦、他. 地域住民の自律神経系機能と耐糖能に関する横断的研究：東温スタディ. 第 22 回日本疫学会学術集会（東京），2012 年 1 月.

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

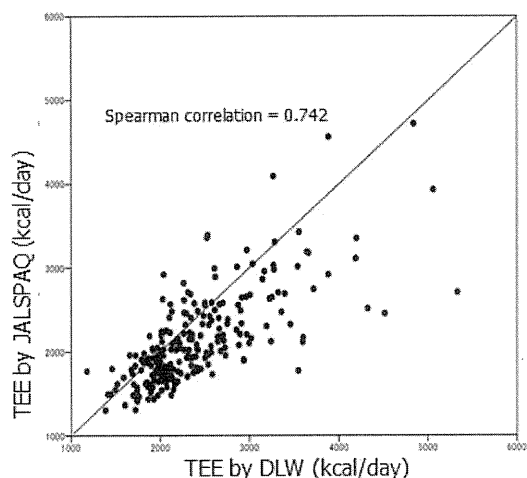


図1. 二重標識水と JALSPAQ との  
両法による1日消費エネルギー量の相関

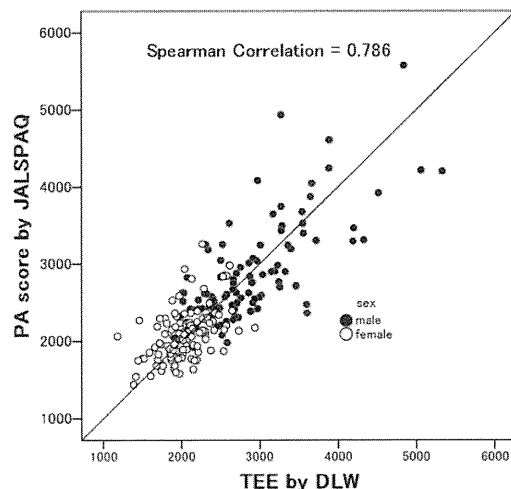


図2. 二重標識水による消費エネルギー量と  
JALSPAQによる身体活動量スコアとの相関

The mean of TEE/BW<sub>DLW</sub> by posture at work

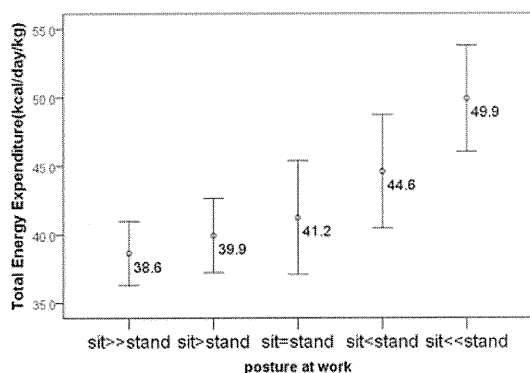


図3. 工作中的の姿勢の区別にみたDLW  
による1日消費エネルギー量の比較

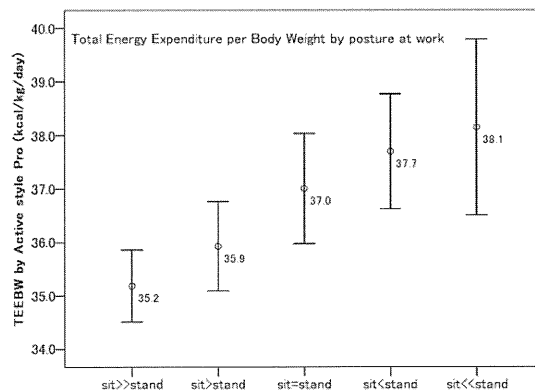


図4. 工作中的の姿勢の区別にみた活動  
量計による消費エネルギー量の比較

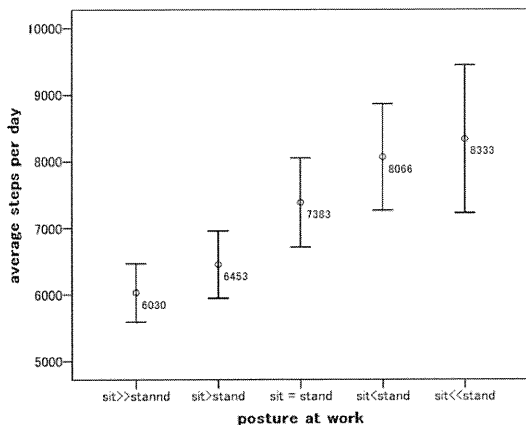


図5. 工作中的の姿勢区別にみた1日  
歩数の平均値の比較

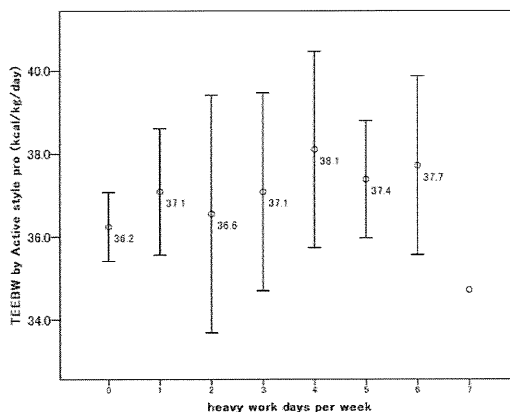


図6. 重労働の日数別にみた活動量計によ  
る消費エネルギー量の平均値の比較

## 別紙 4

## 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suwa, M., Nakano, H., Radak, Z., and Kumagai, S.	Short-term adenosine monophosphate-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside treatment increases the sirtuin 1 protein expression in skeletal muscle.	Metab. Clin. Exper.	60	394-403	2011
Zsolt Radak, et al.	Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle.	Free Radical Biology & Medicine	51	417-423	2011
齊藤貴文, 崎田正博, 松尾恵理, 野藤 悠, 森山善彦, 長野真弓, 古賀崇正, 熊谷秋三	高齢者における膝痛の強度と罹患側の違いがメンタルヘルスに及ぼす影響.	ヘルスプロモーション理学療法研究	1	21-28	2011
崎田正博, 石井禎基, 上阪雄介, 土手愛美, 中村泰章, 齊藤貴文, 熊谷秋三	児童の性差と年齢における静的立位足圧中心動揺変数の発達的变化.	ヘルスプロモーション理学療法研究	1	39-50	2011
林 直亨, 熊谷秋三	疫学的アプローチによる学生のメンタルヘルス支援に向けたシステム構築: 研究の概要 九州大学P&P研究 EQUITE Study1.	健康科学	33	69-73	2011
野津亜季, 林 直亨, 熊谷秋三	疫学的アプローチによる学生のメンタルヘルス支援に向けたシステム構築: 研究デザインと研究方法 九州大学 P&P 研究 EQUITE Study2.	健康科学	33	75-77	2011

野藤 悠, 山下幸子, 林 直亨, 熊谷秋三	疫学的アプローチによる学生のメンタルヘルス支援に向けたシステム構築：身体活動量, 食物摂取量 九州大学 P&P 研究 EQU SITE Study3.	健康科学	33	79-81	2011
高柳茂美, 福盛英明, 一宮 厚, 熊谷秋三	疫学的アプローチによる学生のメンタルヘルス支援に向けたシステム構築：うつ症状 九州大学P&P研究 EQU SITE Study4.	健康科学	33	83-86	2011
高柳茂美, 福盛英明, 一宮 厚, 熊谷秋三	疫学的アプローチによる学生のメンタルヘルス支援に向けたシステム構築：首尾一貫感覚 九州大学P&P研究 EQU SITE Study5.	健康科学	33	87-90	2011
福盛英明, 一宮 厚, 高柳茂美, 熊谷秋三	疫学的アプローチによる学生のメンタルヘルス支援に向けたシステム構築：QOL 九州大学P&P研究 EQU SITE Study6.	健康科学	33	91-95	2011
熊谷秋三, 一宮 厚	疫学的アプローチによる学生のメンタルヘルス支援に向けたシステム構築：課題と展望 九州大学P&P研究 EQU SITE Study7.	健康科学	33	97-102	2011
松園美貴, 上園慶子, 眞崎義憲, 大柿哲朗, 熊谷秋三, 斎藤篤司, 成水貴代	大学職員に対する運動教室の効果 -第二報-	CAMPUS HEALTH	49	掲載予定	2012
Ryo Miyazaki, Yoshikazu Yonei, Yoriko Azuma, Hitoshi Chiba, Koichiro Hayashi, Koji Yamatsu, Kojiro Ishii	Relationship Between the Change in Daily Step Count and Brachial-Ankle Wave Velocity During a Pedometer-Based Physical Activity Program for Older Adults	Anti-Aging Medicine	8(4)	35-40	2011
Kazuko Ishikawa-Takata, Yoshihiko Naito, Shigeo Tanaka, et al.	Use of Doubly Labeled Water to Validate a Physical Activity Questionnaire Developed for the Japanese Population.	Journal of Epidemiology	21	114-121	2011

井上 茂, 岡 浩一朗 , 内藤義彦, 他.	身体活動のトロント憲章日本語版 : 世界規模での行動の呼びかけ.	運動疫学研究	13	12-29	2011
Doi Y, Ninomiya T, Hata J, Hirakawa Y, Mukai N, Iwase M, Kiyohara Y.	Two risk score models for predicting incident Type 2 diabetes in Japan.	Diabet Med	29	107-114	2012
Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y.	Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: The Hisayama Study.	Neurology	77	1126-113 4	2011
Doi Y, Ninomiya T, Hata J, Hirakawa Y, Mukai N, Ikeda F, Fukuhara M, Iwase M, Kiyohara Y.	N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide and Risk of Cardiovascular Events in a Japanese Community: The Hisayama Study.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	31	2997-300 3	2011
Matsuzaki T, Sasaki K, Hata J, Hirakawa Y, Fujimi K, Ninomiya T, Suzuki SO, Kanba S, Kiyohara Y, Iwaki T.	Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: The Hisayama Study.	Neurology	77	1068-107 5	2011
Ohara T, Ninomiya T, Kubo M, Hirakawa Y, Doi Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y.	Apolipoprotein Genotype for Prediction of Alzheimer's Disease in Older Japanese: The Hisayama Study.	J Am Geriatr Soc	59	1074-107 9	2011
Ninomiya T, Ohara T, Hirakawa Y, Yoshida D, Doi Y, Hata J, Kanba S, Iwaki T, Kiyohara Y.	Midlife and late-life blood pressure and dementia in Japanese elderly: the Hisayama Study.	Hypertension	58	22-28	2011
Usui T, Ninomiya T, Nagata M, Doi Y, Hata J, Fukuhara M, Kiyohara Y.	Albuminuria as a Risk Factor for Peripheral Arterial Disease in a General Population.	J Atheroscler Thromb	18	705-712	2011

Hata J, Doi Y, Ninomiya T, Fukuhara M, Ikeda F, Mukai N, Hirakawa Y, Kitazono T, Kiyohara Y.	Combined Effects of Smoking and Hypercholesterolemia on the Risk of Stroke and Coronary Heart Disease in Japanese: The Hisayama Study.	Cerebrovasc Dis	31	477-484	2011
Yoh J, Nishi Y, Hosoda H, Tajiri Y, Yamada K, Yanase T, Doi R, Yonemoto K, Kangawa K, Kojima M, Tanaka E, Kusukawa J	Plasma levels of n-decanoyl ghrelin, another acyl- and active-form of ghrelin in human subjects and the effect of glucose- or meal-ingestion on its dynamics.	Regulatory Peptides	167	140-148	2011
Yonemoto K, Doi Y, Hata J, Ninomiya T, Fukuhara M, Ikeda F, Mukai N, Iida M, Kiyohara Y	Body mass index and stroke incidence in a Japanese community: the Hisayama study.	Hypertension Research	34	274-279	2011
Doi N, Sakamoto T, Sonoda Y, Yasuda M, Yonemoto K, Arimura N, Ishibashi T	Comparative study of vitrectomy versus intravitreal triamcinolone for diabetic macular edema on randomized paired-eyes.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol (online first)	250	71-78	2012
Yasuda M, Kiyohara Y, Wang JJ, Arakawa S, Yonemoto K, Doi Y, Ninomiya T, Ishibashi T	High serum bilirubin levels and diabetic retinopathy the Hisayama Study.	Ophthalmology	118	1423-1428	2011
Koike K, Fukami K, Yonemoto K, Iwatani R, Obata R, Ueda K, Toyonaga M, Ueda S, Ohara A, Takeda K, Yamagishi S, Okuda S	A new vasculitis activity score for predicting death in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis patients.	American Journal of Nephrology	35	1-6	2012
Kaji R, Takedatsu H, Okabe Y, Ishida Y, Sugiyama G, Yonemoto K, Mitsuyama K, Tsuruta O, Sata M	Serum IgG4 was Associated with the number and the distribution of the extrapancreatic lesions in type 1 Autoimmune Pancreatitis Patients.	Journal of gastroenterology and hepatology	27	268-272	2012
米本孝二, 清原 裕	肥満と脳梗塞.	血圧	18	4-5	2011

# Short-term adenosine monophosphate-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside treatment increases the sirtuin 1 protein expression in skeletal muscle

Masataka Suwa<sup>a,\*</sup>, Hiroshi Nakano<sup>b</sup>, Zsolt Radak<sup>c</sup>, Shuzo Kumagai<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Life Design, Tohoku Institute of Technology, 6 Futatsusawa, Taihaku-ku, Sendai, Miyagi, 982-8588, Japan

<sup>b</sup>Department of Human Development, Nakamura Gakuen University, Jonan-ku, Fukuoka 814-0198, Japan

<sup>c</sup>Institute of Sport Science, Faculty of Physical Education and Sport Science, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>d</sup>Institute of Health Science, Kyushu University, Kasuga, Fukuoka 816-8580, Japan

Received 3 April 2009; accepted 2 March 2010

## Abstract

Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) has been proposed to stimulate mitochondrial biogenesis and fat and glucose metabolism in skeletal muscle. Nicotinamide adenine dinucleotide-dependent histone deacetylase sirtuin 1 (SIRT1) is also thought to play a pivotal role for such metabolic adaptations. The purpose of the present study was to examine the effect of AMPK activation with the administration of AMPK activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) to rats on skeletal muscle SIRT1 protein expression as well as peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and glucose transporter 4 (GLUT4) protein expression and hexokinase activity. The AICAR promoted the phosphorylation of AMPK  $\alpha$ -subunit (Thr<sup>172</sup>) and acetyl-coenzyme A carboxylase (Ser<sup>79</sup>) without any change of total AMPK  $\alpha$ -subunit or acetyl-coenzyme A carboxylase protein levels in both the slow-twitch soleus and fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) muscles. The SIRT1 protein expression increased at 24 hours after administration of AICAR in the EDL muscle but not in the soleus muscle. The PGC-1 $\alpha$  protein expression increased in both the soleus and EDL muscles and GLUT4 did in the EDL muscle at 24 hours after an administration of AICAR. The hexokinase activity increased at 18 and 24 hours in the soleus and at 12, 18, and 24 hours in the EDL after an AICAR treatment. These results suggest that short-term AICAR treatment to rats promotes skeletal muscle AMPK phosphorylation and then coincidentally increases the SIRT1 protein expression. In addition, such treatment also enhances the PGC-1 $\alpha$  and GLUT4 protein contents and hexokinase activity in skeletal muscle.

Crown Copyright © 2011 Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Silence information regulator 2 (Sir2) proteins are the nicotinamide adenine dinucleotide-dependent acetylases that regulate longevity in *Caenorhabditis elegans* [1] and *Saccharomyces cerevisiae* [2] in response to caloric restriction. In mammals, the Sir2 ortholog, sirtuin 1 (SIRT1)/Sir2 $\alpha$  plays an important role in various biological processes via functionally interacting and deacetylating several proteins [3]. SIRT1 controls both energy homeostasis and metabolic adaptations [4]. The activation of SIRT1 with its activator resveratrol improved the glucose

tolerance and survival in mice fed high-fat diet [5,6]. SIRT1 can promote mitochondrial biogenesis and fatty acid oxidation in skeletal muscle cells via deacetylation and functionally activating the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) [7-9]. This metabolic role of SIRT1 is associated with 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), which is also a key regulator of energy metabolism [4].

5'-Adenosine monophosphate-activated protein kinase is a heterotrimer consisting of 3 subunits:  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  [10]. Two isoforms exist for both the  $\alpha$ -subunit ( $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2) and  $\beta$ -subunit ( $\beta$ 1 and  $\beta$ 2) and 3 for the  $\gamma$ -subunit ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2, and  $\gamma$ 3). The  $\alpha$ -subunit contains the catalytic domain. The  $\beta$ -subunit mediates the assembly of the heterotrimeric AMPK complex [11] and glycogen binding [12]. The  $\gamma$ -subunit binds the AMP and following phosphorylation of threonine

\* Corresponding author. Tel.: +81 22 304 5599; fax: +81 22 304 5591.  
E-mail address: [suwa-m@tohotech.ac.jp](mailto:suwa-m@tohotech.ac.jp) (M. Suwa).



172 in the  $\alpha$ -subunit and kinase activation [13]. The AMPK functions as an energy sensor and is activated when the cellular AMP to adenosine triphosphate ratio is increased [10]. The phosphorylation of threonine 172 in  $\alpha$ -subunit strongly correlates with the AMPK activity [14]. The AMPK phosphorylation is mainly regulated by an upstream kinase LKB1 in skeletal muscle [15]. Skeletal muscle AMPK is activated by exercise [16], adipocytokines including leptin [17] and adiponectin [18], and antidiabetic drug metformin [19,20]. The activation of AMPK by its activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates both glucose uptake and fatty acid oxidation in skeletal muscle cells [21] and increases insulin-stimulated glucose uptake, insulin signaling such as phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activities, glucose transporter 4 (GLUT4) protein expression, hexokinase activity, and mitochondrial oxidative enzyme activities in skeletal muscle [22–24]. The activation of AMPK by AICAR also increases the PGC-1 $\alpha$  expression in skeletal muscle [25], which controls mitochondrial biogenesis and glucose metabolism [25,26]. The AMPK is indirectly phosphorylated by SIRT1 through LKB1 deacetylation [27]. In addition, AMPK promotes SIRT1 activation by enhancing the transcription and activity of nicotinamide phosphoribosyltransferase [28].

The skeletal muscle SIRT1 protein expression [29] and activity [30] have been observed to increase with endurance exercise in rat skeletal muscle. Endurance exercise has a great impact on the skeletal muscle metabolic characteristics, including mitochondrial biogenesis and GLUT4 expression [31], while also activating AMPK [16]. The activation of AMPK with AICAR also induces such metabolic adaptations in skeletal muscle [23,24], thus suggesting that the activation of AMPK mediates the effect of endurance exercise training on metabolic characteristics. It is hypothesized that AMPK regulates SIRT1 expression. The purpose of the present study was to investigate whether the activation of AMPK with short-term AICAR treatment to rats induced the expression of SIRT1 protein as well as the expression of PGC-1 $\alpha$  and GLUT4 protein and also the hexokinase activity in slow- and fast-twitch skeletal muscles.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats that were 4 weeks of age and with a body weight of 70 to 90 g (Kyudo, Tosu, Saga, Japan) were used for the current study. All rats were handled daily for at least 5 days before beginning their experiment regimen. All rats were housed in a temperature- ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and humidity- ( $60\% \pm 5\%$ ) controlled room with a 12-hour light (7:00 AM–7:00 PM) and 12-hour dark (7:00 PM–7:00 AM) cycle. Food and water were provided ad libitum. All experimental procedures were strictly conducted in accordance with the Nakamura Gakuen University Guidelines for the Care and

Use of Laboratory Animals and were approved by the University Animal Experiment Committee.

### 2.2. AMPK and acetyl-coenzyme A carboxylase phosphorylation study

The rats were randomly assigned to pre ( $n = 12$ ) and AICAR treatment ( $n = 36$ ) groups. The rats of AICAR treatment group were then given a subcutaneous ingestion of AICAR (Toronto Research Chemicals, North York, Ontario, Canada; 1 mg/g body weight). The rats were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg body weight IP), and the slow-twitch soleus and fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) muscles were rapidly dissected out at 1 ( $n = 12$ ), 2 ( $n = 12$ ), and 4 ( $n = 12$ ) hours after the AICAR treatment. The rats of the pre group were also anesthetized, and the soleus and EDL muscles were dissected out. The muscles were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until determinations of phosphorylated and total AMPK $\alpha$  and acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) protein expression were performed.

A lysis buffer was used to inhibit phosphatases and determine the phosphorylated AMPK and ACC protein levels as well as total AMPK $\alpha$  and ACC (50 mmol/L HEPES, 0.1% Triton X-100, 4 mmol/L EGTA, 10 mmol/L EDTA, 15 mmol/L  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 100 mmol/L  $\beta$ -glycerophosphate, 25 mmol/L NaF, 5 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , and 1 tablet per 50 mL Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets [Roche Diagnostics, Tokyo, Japan], pH 7.4). The muscle specimens were homogenized in ice-cold lysis buffer (1:10 wt/vol) with a Polytron-type homogenizer operating at maximum speed for 30 seconds. The homogenate was centrifuged at 15 000g ( $4^{\circ}\text{C}$ ) for 25 minutes. The protein concentration of the supernatant was then determined by use of a protein determination kit (Bio-Rad, Richmond, CA). The muscle protein homogenate was solubilized in sample loading buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.005% bromophenol blue).

### 2.3. SIRT1, PGC-1 $\alpha$ , and GLUT4 proteins and hexokinase activity study

The rats were randomly assigned to pre ( $n = 12$ ), AICAR treatment ( $n = 48$ ), and saline treatment ( $n = 12$ ) groups. The rats of AICAR treatment group were then given a subcutaneous ingestion of AICAR (1 mg/g body weight). The rats were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg body weight IP); and then the soleus and EDL muscles were rapidly dissected out at 6 ( $n = 12$ ), 12 ( $n = 12$ ), 18 ( $n = 12$ ), and 24 ( $n = 12$ ) hours after the AICAR treatment. The rats of pre group were also anesthetized, and the muscles were dissected out. In the rats of saline treatment group, a comparable volume of saline was administered subcutaneously. The rats were anesthetized, and the muscles were dissected out at 24 hours after the saline injection. The

muscles were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyses were performed.

The frozen samples were homogenized with homogenizer in ice-cold homogenizing buffer (1:10 wt/vol) (25 mmol/L HEPES, 250 mmol/L sucrose, 2 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, and 1 tablet per 50 mL Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets [Roche Diagnostics], pH 7.4). The homogenate was centrifuged at  $15000g$  ( $4^{\circ}\text{C}$ ) for 25 minutes. The protein concentration of the supernatant was determined by the use of a protein determination kit (Bio-Rad). The muscle homogenate was used for Western blotting to determine the SIRT1, PGC-1 $\alpha$ , and GLUT4 protein contents and hexokinase activity. For Western blotting, the muscle protein homogenate was solubilized in sample loading buffer as described above.

#### 2.4. Gel electrophoresis and Western blotting

The proteins (20  $\mu\text{g}$ ) of these homogenates were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis

using 5% (phospho- and total ACC), 7.5% (SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ ), and 10% (GLUT4 and phospho- and total AMPK $\alpha$ ) resolving gels. The proteins separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis were then electrophoretically transferred onto the polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was incubated with a blocking buffer of casein solution (SP-5020; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 hour at room temperature. The membrane was reacted with affinity-purified rabbit polyclonal antibody to phospho-AMPK $\alpha$  (Thr<sup>172</sup>; 1:500 dilution, #2532, Cell Signaling, Beverly, MA), total AMPK $\alpha$  (1:1000 dilution, #2531S, Cell Signaling), phospho-ACC (Ser<sup>79</sup>; 1:500 dilution, #3661, Cell Signaling), total ACC (1:500 dilution, #3662, Cell Signaling), Sir2 (1:1000 dilution, #07-131, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), PGC-1 $\alpha$  (1:500 dilution, AB3242, Chemicon International, Temecula, CA), or GLUT4 (1:8000 dilution, AB1346, Chemicon International) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  and then was incubated with biotinylated anti-rabbit/mouse immunoglobulin G (1:1000 dilution, BA-1400, Vector

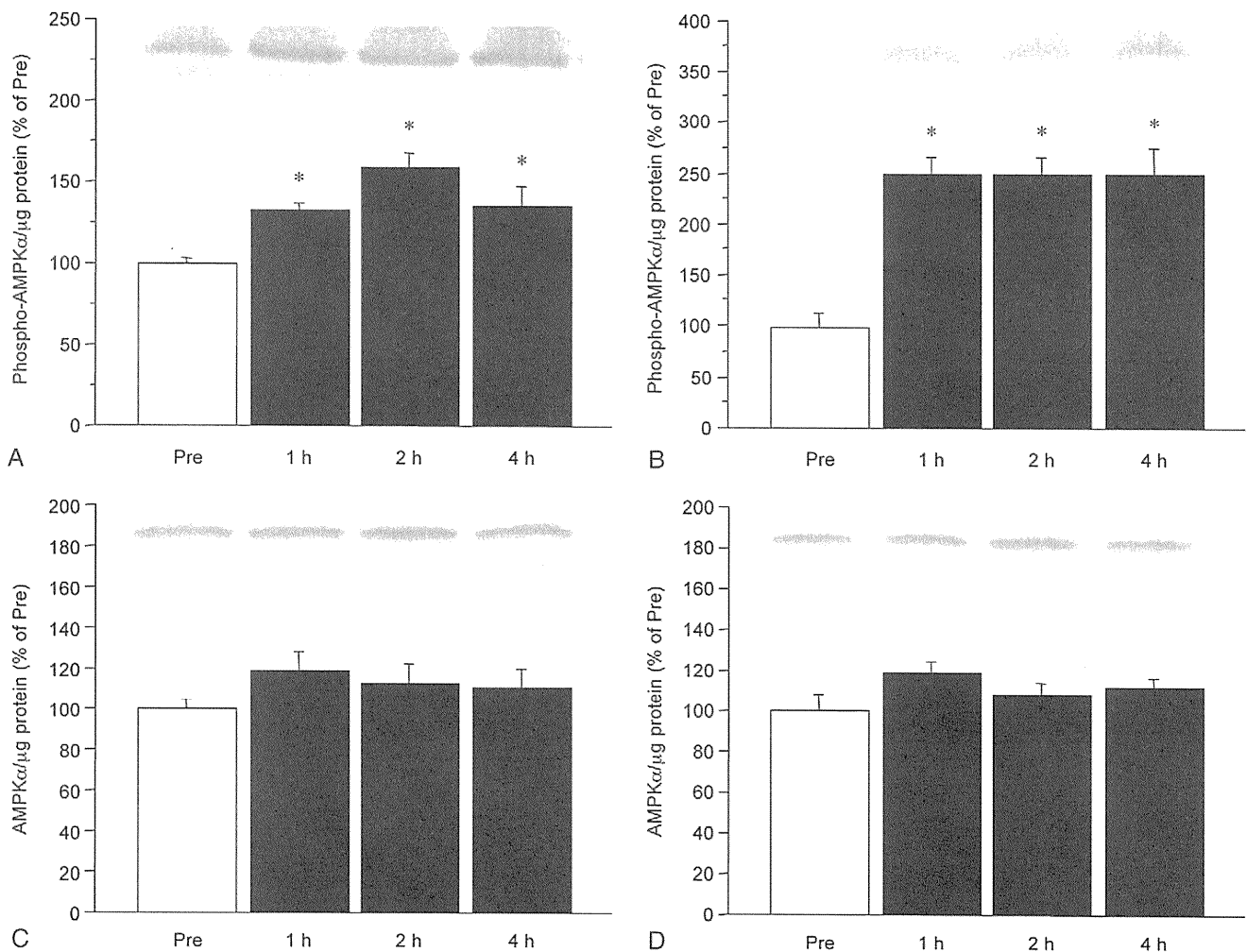


Fig. 1. Phospho- and total AMPK $\alpha$  protein expression in the soleus and EDL muscles before and 1, 2, and 4 hours after AICAR treatment. A and B, Phospho-AMPK $\alpha$  in soleus and EDL muscles, respectively. C and D, Total AMPK $\alpha$  in soleus and EDL muscles, respectively. Values are the means  $\pm$  SE;  $n = 12$  muscles per group.  $*P < .05$  vs pre.

Laboratories) for 30 minutes. The band on the membrane was visualized by avidin and biotinylated horseradish peroxidase macromolecular complex technique (PK-6100, Vector Laboratories). The band densities were determined using the Image 1.62 software package (National Institute of Health, Bethesda, MD).

### 2.5. Hexokinase activity

The hexokinase activity was measured spectrophotometrically. The enzymatic assay was carried out at 30°C using saturating concentrations of substrates and cofactors as determined in preliminary analyses. The hexokinase activity was measured at 340 nm by following the production of reduced form of beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) for 3 minutes. The extinction coefficient for NADPH, which is a reference of the hexokinase activity, was 6.22. For the hexokinase assay, 100 mmol/L Tris-HCl, 0.4 mmol/L beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 700 U/mL

glucose-6-phosphate dehydrogenase, 1 mmol/L glucose (omitted for the measurement of nonspecific activity), and 5 mmol/L adenosine triphosphate (omitted for the measurement of nonspecific activity), pH 7.0, were used.

### 2.6. Statistical analysis

All data are expressed as the means  $\pm$  SE. To estimate the time course of the protein expressions and hexokinase activity with AICAR treatment, we used the 1-way analysis of variance. Dunnett post hoc test was conducted if the analysis of variance indicated a significant difference. The unpaired *t* test was used to compare the saline and AICAR groups. A value of  $P < .05$  was considered to be significant.

## 3. Results

### 3.1. AMPK and ACC protein phosphorylation

Fig. 1 shows the change in the phosphorylated and total AMPK $\alpha$  protein expression after an AICAR treatment. In the

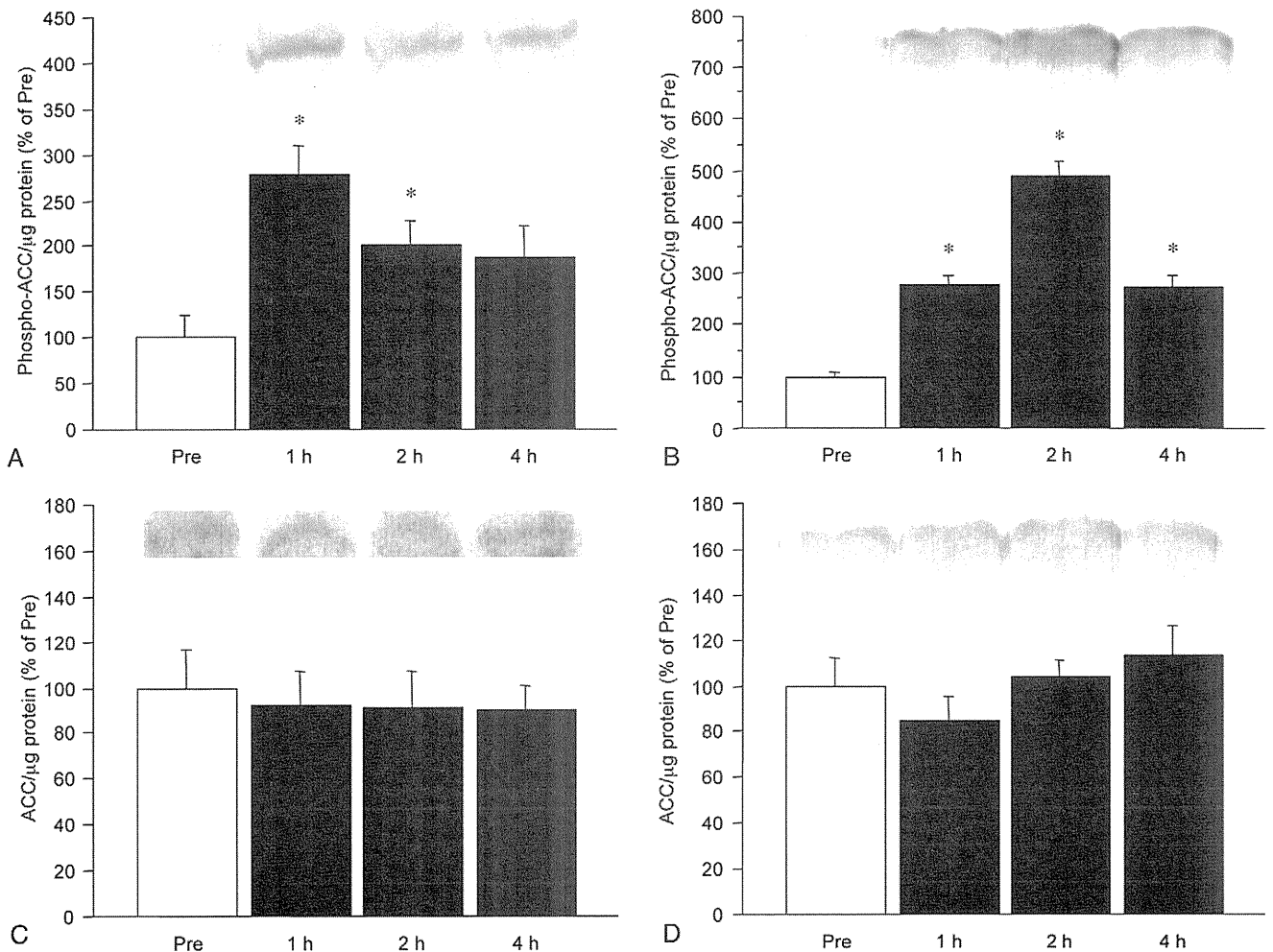


Fig. 2. Phospho- and total ACC protein expression in soleus and EDL muscles before and 1, 2, and 4 hours after AICAR treatment. A and B, Phospho-ACC in soleus and EDL muscles, respectively. C and D, Total ACC in soleus and EDL muscles, respectively. Values are the means  $\pm$  SE;  $n = 12$  muscles per group. \* $P < .05$  vs pre.

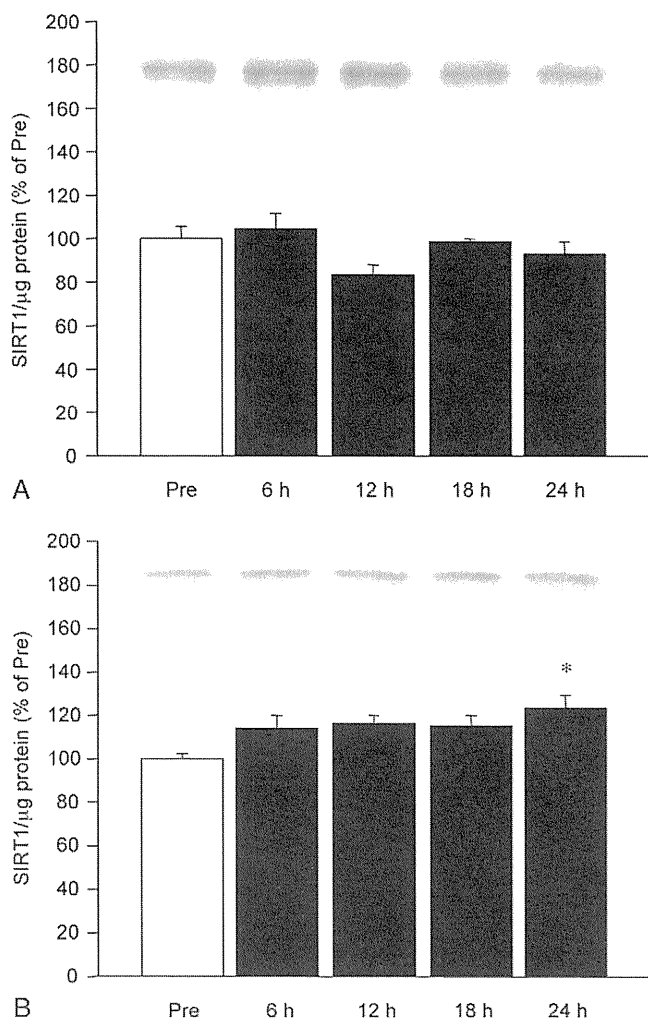


Fig. 3. SIRT1 protein expression in the soleus (A) and EDL (B) muscles before and 6, 12, 18, and 24 hours after AICAR treatment. Values are the means  $\pm$  SE;  $n = 12$  muscles per group. \* $P < .05$  vs pre.

soleus muscle, the phosphorylated AMPK $\alpha$  protein increased at 1, 2, and 4 hours after the AICAR injection from the preinjection period (Fig. 1A; +32%, +59%, and +36%, respectively, from pre;  $P < .05$ ). In the EDL muscle, the phosphorylated AMPK $\alpha$  protein also increased at 1, 2, and 4 hours after the AICAR injection from the preinjection period (Fig. 1B; +150%, +151%, and +150%, respectively, from

pre;  $P < .05$ ). Total AMPK $\alpha$  protein expression did not change in the soleus or EDL muscles (Fig. 1C, D).

The effect of AICAR was further examined on the phosphorylation of ACC, a downstream target of AMPK controlling the entry of fatty acids into mitochondrial matrix in skeletal muscle [21]. Fig. 2 shows the change in the phosphorylated and total ACC protein expression after an AICAR treatment. In the soleus muscle, the phosphorylated ACC protein increased at 1 and 2 hours after the AICAR injection from the preinjection period (Fig. 2A; +178% and +101%, respectively, from pre;  $P < .05$ ). In the EDL muscle, the phosphorylated ACC protein also increased at 1, 2, and 4 hours after the AICAR injection from the preinjection period (Fig. 2B; +178%, +392%, and +173%, respectively, from pre;  $P < .05$ ). Total ACC protein expression did not change in the soleus or EDL muscles (Fig. 2C, D).

### 3.2. SIRT1 protein expression

Fig. 3 shows the change in the SIRT1 protein expression after an AICAR administration. In the soleus muscle, no changes were observed after the treatment (Fig. 3A). In the EDL muscle, the SIRT1 protein increased (+24%) at 24 hours after the treatment from the pretreatment period (Fig. 3B,  $P < .05$ ). In addition, the SIRT1 protein expression in the EDL muscle at 24 hours after the AICAR treatment was significantly higher than that in the saline treatment (Table 1,  $P < .05$ ).

### 3.3. PGC-1 $\alpha$ protein expression

Fig. 4 shows the change of the PGC-1 $\alpha$  protein expression after an AICAR administration. The PGC-1 $\alpha$  protein increased at 24 hours after an AICAR administration from the pretrial period in both the soleus (Fig. 4A) and EDL (Fig. 4B) muscles (+21% and +26%, respectively, from pre;  $P < .05$ ). In addition, the PGC-1 $\alpha$  protein expression in both the soleus and EDL muscles at 24 hours after the AICAR treatment was significantly higher than that in the saline treatment (Table 1,  $P < .05$ ).

### 3.4. GLUT4 protein expression

Fig. 5 shows the change in the GLUT4 protein expression after an AICAR administration. In the soleus muscle, no changes were observed after the treatment (Fig. 5A). In the

Table 1  
Skeletal muscle protein expression and hexokinase activity 24 hours after either saline or AICAR administration

	Soleus muscle		EDL muscle	
	Saline	AICAR	Saline	AICAR
SIRT1 (% of saline)	100.0 $\pm$ 1.8	104.1 $\pm$ 2.5	100.0 $\pm$ 6.2	117.6 $\pm$ 2.1*
PGC-1 $\alpha$ (% of saline)	100.0 $\pm$ 6.0	116.3 $\pm$ 3.4*	100.0 $\pm$ 6.7	122.0 $\pm$ 8.1*
GLUT4 (% of saline)	100.0 $\pm$ 4.1	102.5 $\pm$ 5.9	100.0 $\pm$ 6.9	137.0 $\pm$ 5.8*
Hexokinase activity ( $\mu$ mol L <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	2.02 $\pm$ 0.07	2.33 $\pm$ 0.07*	2.49 $\pm$ 0.07	3.45 $\pm$ 0.11*

Data are expressed as the mean  $\pm$  SE;  $n = 12$  muscles per group.

\*  $P < .05$  vs saline-treated group.