

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06970

研究課題名(和文) 転写因子KLF15による骨格筋と肝臓の臓器相関を介した代謝制御に関する研究

研究課題名(英文) Study for the interaction between skeletal muscle and the liver on the regulation of metabolic control via the transcription factor KLF15

研究代表者

岡田 裕子 (Okada, Yuko)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90782433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子KLF15の代謝制御における役割を検討した。骨格筋ではKLF15の発現は運動によって増強し、これにはカルシウム刺激が関与する可能性が示唆された。糖尿病モデルマウスの骨格筋ではKLF15のタンパクレベルでの発現増強を認め、培養筋細胞では高濃度のグルコースで処理することによりKLF15のタンパク発現が増強した。高血糖によるKLF15のタンパク発現が増強には、KLF15タンパクのポリユビキチン化の減弱に起因すると考えられた。骨格筋特異的KLF15欠損マウスの随時血糖は対照と差は無かったが絶食時には有意に血糖が低下し、骨格筋のKLF15は糖新生の活性化に寄与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the role of the transcription factor KLF15 in the regulation of systemic metabolism. The abundance of KLF15 in skeletal muscle is upregulated in response to exercise, which is likely mediated via calcium-dependent signaling. The abundance of KLF15 in skeletal muscle is also upregulated in several diabetic model mice and treatment of cultured muscle cells with a high concentration of glucose resulted in the increase in the protein abundance of the transcription factor. Hyperglycemia-induced increase in the protein abundance of KLF15 is attributable to the decrease in the poly-ubiquitination of this protein. Whereas blood glucose levels of muscle-specific KLF15 deficient mice are similar to those of control mice, those of the mutant mice at fasting states are lower, suggesting that KLF15 in skeletal muscle contribute to the regulation of hepatic gluconeogenesis.

研究分野：糖尿病代謝学

キーワード：エネルギー代謝 骨格筋 糖尿病

### 1. 研究開始当初の背景

糖質、脂質、タンパク/アミノ酸代謝などを含む、生体のエネルギー代謝制御は、様々な臓器が相互に関わる複雑な臓器相関によって制御されている。また、糖質、脂質、タンパク/アミノ酸などの栄養素は個々の臓器で代謝を受けるだけでなく、臓器同士のエネルギー代謝に関わる情報のやり取りにも重要な役割を果たしている。

KLF15 は脂肪組織や肝臓などエネルギー代謝調節に深く関わる臓器に高発現する転写調節因子である。代表者は過去に KLF15 の脂肪細胞分化制御における機能の解析 (J Biol Chem. 280:12867-75, 2005) や脂肪細胞特異的 KLF15 過剰発現マウスの代謝変化の解析 (J Biol Chem. 286: 37458-69, 2011) など、KLF15 のエネルギー代謝調節における役割についての研究を行ってきた。

脂肪細胞は KLF15 が高発現する細胞であるが、今回の研究では代表者は骨格筋にも KLF15 が発現することに着目した。骨格筋は摂食時にはインスリンの作用によって糖質やタンパク質をエネルギー源として貯蔵し、絶食時には乳酸やアミノ酸などの糖新生基質を肝臓に供給することにより、糖代謝恒常性の維持に寄与する臓器である。また、代表者らの研究グループでは、以前に KLF15 が肝臓においてタンパク分解やアミノ酸異化を介して、糖新生の制御に関わることを明らかにしている (Diabetes. 59:1608-15, 2010)。運動や絶食時には肝臓の糖新生が増加して血糖恒常性が維持されると考えられている。また、糖尿病状態では肝臓の糖新生が亢進することはよく知られている。骨格筋のタンパク分解によって供給されるアミノ酸が糖新生の重要な基質となることを踏まえると、骨格筋の KLF15 は、糖新生基質の供給などを介して、エネルギー代謝に関わる肝臓と骨格筋の臓器相関においてなんらかの役割を担う可能性があると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究は、このような背景を踏まえて、骨格筋に発現する KLF15 の個体レベルでの代謝制御における役割を明らかにすることを目的とする。

具体的には、絶食や摂食、運動や安静、筋肉不動化、さらには糖尿病や肥満など、エネルギー代謝が様々な変化する過程で、骨格筋の KLF15 が個体レベルでの代謝に適応にどのような役割を担うかを明らかとする。また、特に骨格筋のタンパク異化における役割、また肝糖産生制御との関係などについて検討する。

### 3. 研究の方法

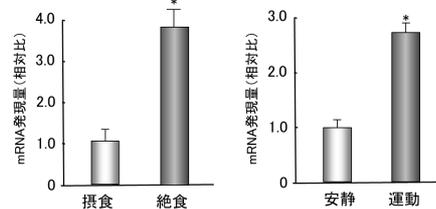
糖尿病や運動や安静、筋肉不動化、さらに

は糖尿病や肥満など、各種の代謝状態が変化する条件下で、骨格筋における KLF15 や KLF15 によって制御される遺伝子の発現量の変化を解析し、その代謝制御における役割を検討する。また、代表者らのグループが世界で初めて作成した KLF15-flox マウス (論文未発表) と骨格筋特異的に Cre リコンビナーゼを発現する MLC1f-Cre マウス (ニューヨーク大学 Burden 博士より供与) との交配により、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスを作成し、その代謝表現型の解析から骨格筋の代謝制御における KLF15 の役割の解明を目指す。

### 4. 研究成果

各種の生理的条件下で骨格筋における KLF15 の発現変動について検討したところ、絶食やトレッドミルによる単回数運動負荷で、KLF15 の mRNA レベルの発現が顕著に増強することが明らかとなった (図 1)。また、遺伝的糖尿病モデル動物である db/db マウス

図1 絶食や運動による骨格筋のKLF15の発現増加

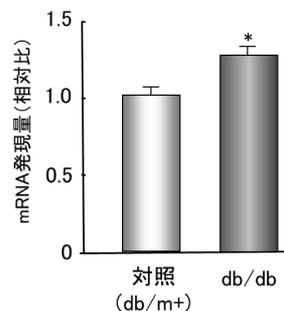


C57/B6マウス腸腰筋にて、絶食18時間後またはトレッドミル運動負荷 (15m/min)2時間後に検討

や高脂肪食飼育マウスの骨格筋でも対照に比べ、KLF15 の mRNA 発現が増加することも見出した (図 2)。さらに、マウス下肢をギプスで固定し、3 日間の不動化処理を行ったマウスでの骨格筋での mRNA 発現の mRNA 発現が増強していた。

運動による骨格筋での KLF15 の発現増加のメカニズムについて検討するため、培養筋細胞を各種の運動を模倣すると考えられる刺激で処理し KLF15 の発現を検討した。その結果、カルシウム刺激では KLF15 の mRNA レベ

図2 糖尿病モデルマウスにおける骨格筋のKLF15の発現増加



2カ月齢マウス腸腰筋にて検討

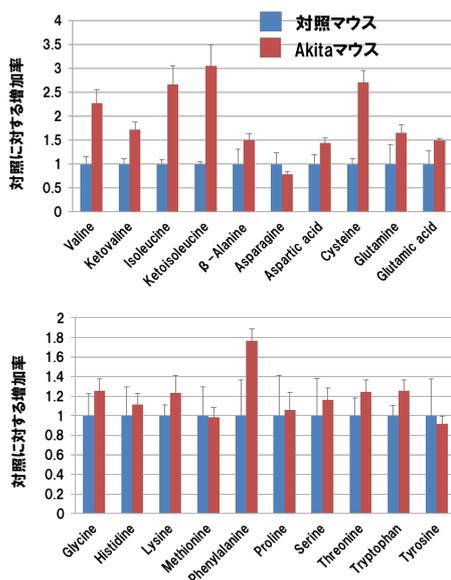
ルでの発現が増強したが、cAMP 刺激では KLF15 の発現に変化はなかった。このことから、運動時の骨格筋のカルシウムシグナルの増強が KLF15 の発現増加に寄与する可能性が示唆された。

一方、ストレプトゾトシン(STZ)の投与によってインスリン欠乏性の糖尿病を誘導したマウスでは骨格筋の KLF15 の mRNA レベルは対照マウスと比較して差は無かったが、タンパクレベルでは約 4 倍に増加していた。さらに、インスリン遺伝子の異常によってインスリン分泌低下型の糖尿病を発症する Akita マウスの骨格筋でも KLF15 のタンパクレベルでの発現が増強していた。また、STZ 誘導性糖尿病マウスでも、Akita マウスでも、骨格筋重量は対照に比べて低下していた。体重で補正した後の骨格筋重量が低下していたことから、これらのマウスでは骨格筋が特異的に減少する何らかの機構が働いていると考えられた。

そこで、Akita マウスの血清のアミノ酸濃度を質量分析法にて解析したところ、バリン、ケトバリン、ロイシン、ケトロイシン、アラニンなどを含む、多くのアミノ酸の血中濃度が増加しており、蛋白の異化が生じていると考えられた(図3)。

さらに、これらの糖尿病マウスでは KLF15

図3 Akitaマウスの血清中アミノ酸濃度の変化



によって遺伝子発現が制御されると考えられている、タンパク分解に関わる Atrogin1 や Murf1 といったユビキチンリガーゼや Prodh や Tdo2 といったアミノ酸異化系の遺伝子の発現も増強していた。タンパク/アミノ酸分解に関わる遺伝子の発現や血中アミノ酸濃度の上昇、KLF15 のタンパクレベルでの発現増強は、いずれも Akita マウスに対して高血糖を是正する薬物治療をおこなった

場合には、改善を認めた。これらの結果から、KLF15 は糖尿病における骨格筋タンパクの異化・分解に関与する可能性が示唆された。

マウスの培養筋細胞を高濃度のブドウ糖で処理すると、KLF15 の mRNA レベルには変化がないにも関わらずタンパク発現が増加した。また、高濃度のブドウ糖で処理した細胞では、KLF15 のポリユビキチン化が减弱した。細胞をプロテアソーム阻害剤である MG132 で処理した際には、低濃度のブドウ糖での培養下でも KLF15 のタンパクレベルでの発現が増強し、MG132 存在下では、高濃度のブドウ糖で処理しても、それ以上、KLF15 のタンパクの発現は増加しなかった。一方、インスリンは KLF15 の発現には影響を及ぼさなかった。

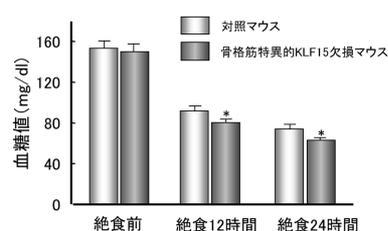
以上の実験結果から、糖尿病状態のマウス骨格筋では高血糖によって KLF15 のユビキチン化が减弱することにより、KLF15 タンパクの発現が増強すると考えられた。

次に、骨格筋での KLF15 の代謝制御における機能を明らかにするため、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスについて解析した。本マウスは随時摂食時の血糖値は対照と差は無かったが、長時間の絶食時には対照と比較して有意な血糖低下を生じることが明らかとなった(図4)。このことから、骨格筋の KLF15 は糖新生の増強に重要な役割を果たしていると考えられた。

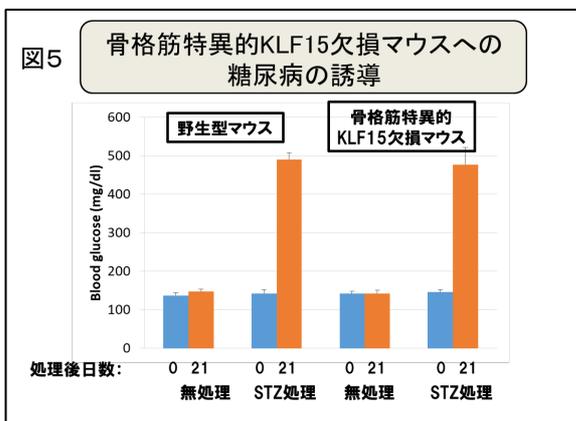
さらに、糖尿病状態での代謝変化の KLF15 の病理学的意義を明らかにするため、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスに STZ を投与してインスリン欠乏性糖尿病を誘導し、その際の血糖の変化について解析した。その結果、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスにおいても、STZ の投与によって、野生型とほぼ同様の時間経過で、同程度の高血糖を示すことが明らかとなった(図5)。このことから、骨格筋の KLF15 は絶食時とは異なり、糖尿病状態での血糖制御における役割は限定的であると考えられた。

また、代表者らの研究グループでは、肝臓においては糖尿病治療薬であるメトホルミンによって KLF15 の発現が低下すること、また、この現象がメトホルミンの血糖降下作用の発現に寄与することを明らかにしている。そこで、培養筋細胞において KLF15 の発現に

図4 骨格筋特異的KLF15欠損による絶食時低血糖



対するメトホルミンの効果を検討したところ、肝臓とは異なり、メトホルミンによってKLF15の発現は増加した。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 9件)

平田悠、野村和弘、千賀陽子、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。高血糖はWWP1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する。第54回日本臨床分子医学会学術集会。東京、2017年(一般口演)。

平田悠、野村和弘、千賀陽子、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。糖尿病による筋萎縮の分子機構の解析。第90回日本内分泌学会学術総会。京都、2017年(一般口演)。

平田悠、野村和弘、千賀陽子、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。高血糖はWWP1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する。第60回日本糖尿病学会年次学術集会。名古屋、2017年(一般口演)。

平田悠、野村和弘、千賀陽子、今村道博、武田伸一、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。高血糖はWWP1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する。第3回日本筋学会学術集会。東京、2017年(一般口演)。

平田悠、野村和弘、千賀陽子、今村道博、武田伸一、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。高血糖はWWP1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する。第29回分子糖尿病学シンポジウム。大阪、2017年(一般口演)。

平田悠、野村和弘、千賀陽子、今村道博、武田伸一、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。高血糖はWWP1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する。第32回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会。名古屋、2018年

(一般口演)。

平田悠、野村和弘、千賀陽子、今村道博、武田伸一、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。ユビキチンリガーゼWWP1はKLF15の発現調節を通じ糖尿病性筋萎縮を制御する。第55回日本臨床分子医学会学術集会。京都、2018年(一般口演)。

平田悠、野村和弘、千賀陽子、今村道博、武田伸一、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。高血糖はWWP1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する。第91回日本内分泌学会学術総会。宮崎、2018年(一般口演)。

平田悠、野村和弘、千賀陽子、今村道博、武田伸一、岡田裕子、細岡哲也、小川渉。高血糖はWWP1/KLF15経路を介して筋萎縮を促進する。第61回日本糖尿病学会年次学術集会。東京、2018年(一般口演)。

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田裕子 (OKADA, Yuko)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90782433

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

小川 渉 (OGAWA, Wataru)

神戸大学・大宇学院医学研究科・教授

研究者番号：40294219

(4)研究協力者

平田 悠 (HIRATA, Yu)

大学院博士課程学生