

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22637

研究課題名（和文）KLF15を介した筋萎縮の分子機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanism of muscle atrophy mediated by KLF15

研究代表者

小川 渉（Wataru, Ogawa）

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40294219

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では転写調節因子KLF15が糖尿病及び不動化による筋萎縮の×要な制御因子であることを明らかとした。糖尿病ではユビキチンオガーゼWWP1の発現低下がKLF15のタンパクレベルでの発現を増加させ、不動化では細胞膜カルシウムチャネルの発現低下を介したCa<sup>2+</sup>シグナル減弱がKLF15の遺伝子発現を増加させ、これによって筋のタンパク異化が活性化し、筋の萎縮が生じることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは加齢による骨格筋量の減少とそれに伴う活動能力の低下であり、様々な疾患の発症率を増加させ、健康寿命短縮の重要な原因となる。サルコペニアの主要な原因は加齢に伴う生理的变化であるが、糖尿病はサルコペニアの促進要因であり、不動化や身体活動の低下もサルコペニアを悪化させることが知られている。今回、糖尿病や不動化による筋萎縮のメカニズムが明らかとなったことで、サルコペニアのより良い治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have shown that the transcriptional regulator KLF15 is an essential regulator of muscular atrophy triggered by diabetes and immobilization. In diabetes, the downregulation of the ubiquitin ligase WWP1 contributes to the upregulation of KLF15 at the protein level, and in immobilization induces the inhibition of Ca<sup>2+</sup> signaling through the downregulation of a membrane Ca<sup>2+</sup> channel, which in turn results in the stimulation of protein catabolism and skeletal muscle atrophy.

研究分野：代謝学

キーワード：骨格筋 筋萎縮 糖尿病 不動化 KLF15 WWP1

### 1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは加齢による骨格筋量の減少とそれに伴う活動能力の低下であり、様々な疾患の発症率を増加させ、健康寿命短縮の重要な原因となる。糖尿病はサルコペニアの重要な促進要因であることが知られているが、糖尿病がどのようなメカニズムで筋量を減少させるかには十分に明らかではない。また、加齢に伴う身体活動低下は骨格筋量の減少を促し、筋量減少による運動能力の低下はさらなる筋量減少に繋がるという悪循環を生むが、身体活動低下や筋不動化による筋量減少のメカニズムにも不明な点が多い。

代表者はユビキチンリガーゼ WWP1 が転写調節因子 KLF15 のタンパクレベルでの発現制御因子であることに加え、WWP1/KLF15 経路が「高血糖」と「不動化」という2つの異なる病態において、骨格筋の萎縮に重要な役割を担う可能性を見出した。

### 2. 研究の目的

本研究計画は、このような代表者が独自に見出した、高血糖や不動化が WWP1/KLF15 経路を介して筋萎縮シグナルを活性化するという、従来、想定されていなかった現象の分子機構の詳細を明らかとし、サルコペニアの発症予防薬/治療薬の開発に資する科学的知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

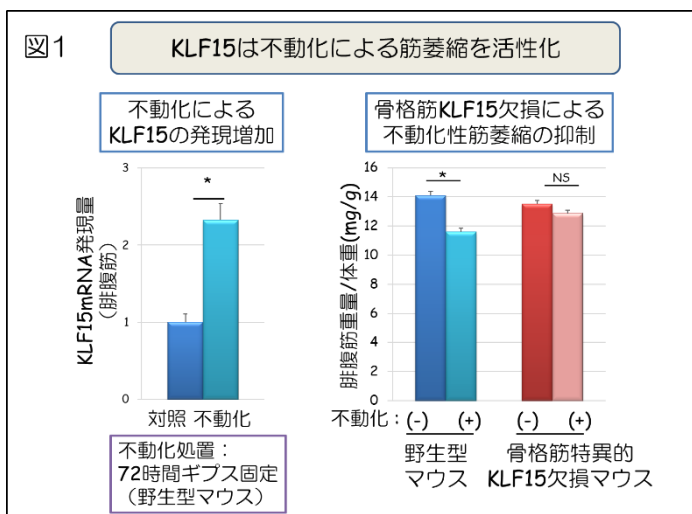
高血糖により WWP1 の発現が抑制されるメカニズムについて培養 C2C12 筋筒細胞を用いた系で検討した。骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスを用いて不動化性筋萎縮における KLF15 経路の関わりについて検討し、KLF15 の上流の制御因子についても探索した。またギプス固定により筋萎縮をきたした患者と対照患者から得た骨格筋試料を用いた検討も行った。

### 4. 研究成果

C2C12 筋筒細胞を高濃度のグルコースで処理すると、p38MAPK や JUNK の活性化が確認された。これらのキナーゼの阻害剤で処理した細胞や siRNA によりノックダウンした細胞では高濃度のグルコース処理による WWP1 の発現増加が抑制され、これらのキナーゼが WWP1 の発現抑制に関わると考えられた。

骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスはギプス固定3日間行くと、骨格筋での KLF15 の発現が遺伝子レベルで増加した、また同じ処理により骨格筋量は約 15%減少したが、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスではギプス固定を行っても有意な筋の萎縮は生じなかった(図1)。このことより、KLF15 は不動化性筋萎縮も重要な制御因子であることが明らかとなった。また不動化性筋萎縮における KLF15 の役割の普遍性について検討するため、運動神経切除モデルを用いた検討も行った。下肢運動神経切除モデルでは切除2日後に骨格筋における kLF15 の発現が遺伝子レベルで増強し、骨格筋量は約 10%減少した。骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスでは、この条件下での筋萎縮も抑制した。以上により、KLF15 はギプス固定だけでなく、神経切除による不動化においても筋萎縮に関わる分子であることが明らかとなった。

次に、不動化による筋萎縮において、KLF15 の上流で作用する因子について解析した。まず、不動化による KLF15 の遺伝子発現のメカニズムを検討した結果、KLF15 のプロモーター領域には転写因子 C/EBP ファミリーの結合部位があることを見出した。また、筋不動化の際には、C/EBP ファミリーの中で C/EBPβ と C/EBPδ の発現が増強することが明らかとなった。C2C12 培養筋筒細胞に C/EBPβ または C/EBPδ を強制発現すると、KLF15 のプロモーター活性が増強した。また、siRNA を用いて C/EBPβ または C/EBPδ の発現を抑制すると、KLF15



の発現を増強した。また、siRNA を用いて C/EBPβ または C/EBPδ の発現を抑制すると、KLF15

の遺伝子発現は低下した。以上から、不動化時には C/EBP $\beta$  及び C/EBP $\delta$  の発現が増強し、これらの転写因子の作用により KLF15 の遺伝子発現 が活性化し、筋萎縮が促されると考えられた。

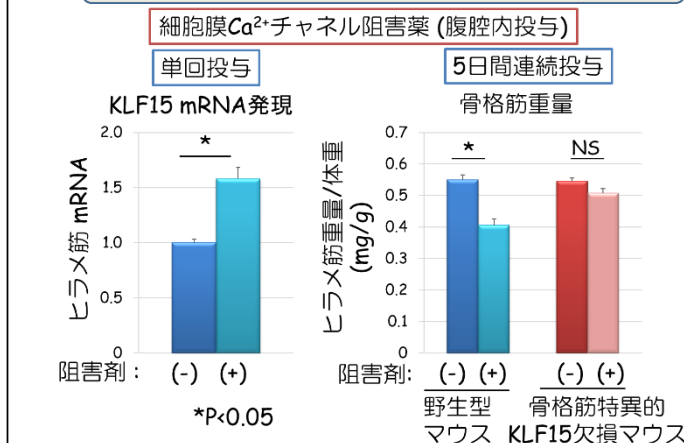
さらに、これらの現象をヒト試料を用いて検証することを試みた。骨折によってギプス固定を行った後に、骨折整復のために手術を受ける患者から術中に骨格筋の生検試料を得て、これを不動化による筋萎縮群とした。また、骨折整復手術後に、抜釘術を受ける患者からも、術中に骨格筋の生検試料を得て、これを萎縮のない対照群とした。それぞれの群の患者の骨格筋生検試料を用いて遺伝子発現解析を行った結果、KLF15 や WWP1、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  の発現変化など、不動化モデルマウスの骨格筋で見られたのと同様な遺伝子発現の変化が人でも認められることが明らかとなった。

また C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  のさらに上流の制御因子について検討した。C2C12 培養筋細胞に CaMKK の阻害剤を加えると KLF15 と C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  の発現が増強したことから Ca<sup>2+</sup>シグナルの低下が不動化による遺伝子発現変化に関与する可能性 が示唆された。また細胞内の Ca<sup>2+</sup>をキレートする BAPTA-AM には KLF15 や C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  の発現増強効果はなかったが、細胞外 Ca<sup>2+</sup>のキレート剤である EGTA が これらの遺伝子発現を増強したことから、細胞外から細胞内への Ca<sup>2+</sup>流入の阻害、すなわち細胞膜の Ca<sup>2+</sup>チャンネルが関与すると考

えられた。そこで広範囲に Ca<sup>2+</sup>チャンネルを阻害する阻害剤をマウスに単回投与したところ、骨格筋で KLF15 の発現が増加した。また、同じ Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤をマウスに 5 日間連続投与すると、野生型マウスでは骨格筋量の減少を認めたが、骨格筋特異的 KLF15 欠損マウスでは Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤による骨格筋量の減少が抑制されることが明らかとなった (図 2)。

さらに、この現象に関与する Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤を特定するため各種の薬理的阻害剤を用いた検討を行った。VDCC 阻害剤であるニフェジピンや TRPV2 阻害剤であるトラニラストは C2C12 筋筒細胞で KLF15 の発現に影響を及ぼさなかったが、Piezo1 の阻害剤である GsMTX4 は KLF15 及び萎縮関連遺伝子の発現を増加させた。さらに Piezo1 の活性化薬である Yoda1 は C2C12 培養筋細胞において KLF15 及び萎縮関連遺伝子の発現を抑制させた。以上より Piezo1 は不動化性筋萎縮における KLF15 の上流の制御因子であると考えられ、本分子経路は筋萎縮の抑制剤の標的となり得る可能性が示唆された。

図 2 Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害はKLF15を介して筋萎縮を促す



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、千賀洋子、岡田裕子、小林憲太、岡本子毅、蓑越靖彦、今村道博、武田伸一、小田崇弘、福井友章、大江啓介、新倉隆宏、黒田良佑、細岡哲也、小川 渉
2. 発表標題 骨格筋量制御におけるKLF15の機能の解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田悠、野村和弘、千賀洋子、岡田裕子、小林憲太、岡本子毅、蓑越靖彦、今村道博、武田伸一、小田崇弘、福井友章、大江啓介、新倉隆宏、黒田良佑、細岡哲也、小川 渉
2. 発表標題 骨格筋量制御におけるKLF15の機能の解析
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------