

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07049

研究課題名（和文）2型糖尿病増悪化を防ぐジアシルグリセロールキナーゼによる骨格筋形成制御機構

研究課題名（英文）Regulation mechanisms of diacylglycerol kinase delta in differentiation and development of skeletal muscle to prevent exaggeration of type 2 diabetes

研究代表者

堺 弘道（Sakai, Hiromichi）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：00375255

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）は細胞レベルで筋分化誘導を正に制御するが、筋形成の詳細な機構や個体レベルでのDGKの骨格筋形成への寄与は分かっていない。本研究においては、筋細胞のDGKの発現を増加させ、グルコースの取り込みを増加させるミリスチン酸はDGK発現依存的に筋形成に重要な役割を担う $\alpha$ -tubulinの発現を増加させることを示した。さらに、生体レベルでの解析のために作製した骨格筋特異的DGK欠損マウスにおいて、1割程度の体重の減少と骨格筋の減少を観察した。さらに、褐色脂肪組織量の減少も観察した。今後、骨格筋及び褐色脂肪組織におけるDGKの役割を解明していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病（インスリン抵抗性）の改善のためには、食生活の乱れや運動不足により低下した骨格筋の機能（グルコース取り込み能）と量の回復が重要である。DGKは骨格筋のグルコース取り込みに重要であり、一方で、DGKが細胞レベルで筋分化誘導を正に制御する知見を得たが、筋形成における詳細な機構はわかっていなかった。今回、筋細胞のDGKの発現を増加させるミリスチン酸がDGK発現依存的に筋形成に重要な役割を担う $\alpha$ -tubulinの発現を増加させることを示した。この知見は、DGKの発現増加は2型糖尿病患者で低下するグルコースの取り込み能と筋量の両方を改善する可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：Diacylglycerol kinase (DGK) positively regulates myogenic differentiation of C2C12 myoblasts, but the molecular mechanisms of its myogenesis and development into skeletal muscle are still unknown. In this study, we found that myristic acid, which upregulates DGK expression levels and glucose uptake in myotubes, increased DGK-dependently the expression levels of  $\alpha$ -tubulin, one of important factors for muscle development, in C2C12 myotubes. Moreover, to investigate the development of skeletal muscle, we generated the skeletal muscle-specific DGK-knockout mice. The mice showed the approximately 10% reduction of body weight and skeletal muscle. In addition, brown adipocyte tissue was also decreased. In near future, we will reveal the roles of DGK on skeletal muscle and brown adipocyte tissue.

研究分野：脂質生化学

キーワード：2型糖尿病 ジアシルグリセロールキナーゼ 骨格筋 筋形成 ミリスチン酸

### 1. 研究開始当初の背景

世界における糖尿病患者は2017年にすでに4億2千万人に達し、2045年には6億9千万人に上ると試算されている【引用文献 1】。従って、糖尿病の予防・治療法の新規開発は人類の健康福祉向上の為に極めて重要な課題の一つと言える。

2型糖尿病はインスリン抵抗性の増加や膵β細胞の機能障害によって誘発される。インスリン抵抗性を増大させる主な要因は、食生活の乱れや運動不足による骨格筋（インスリン感受性・グルコース取り込み能）の機能の低下と量の減少によるグルコースの取り込み量の低下である。従って、インスリン抵抗性改善のためには、減少した骨格筋の機能の改善と量の増加の両方が重要である。

ジアシルグリセロール (DG) キナーゼ (DGK) はシグナル分子 DG をリン酸化しホスファチジン酸 (PA) を産生する酵素で、重要な生理現象を制御すると考えられてきた。そして、我々のグループは、DGKのδアイソザイムが骨格筋のインスリン感受性・グルコースの取り込み能を制御すること、さらに、2型糖尿病患者の骨格筋における DGKδ の発現半減は本症の増悪化を引き起こすことを明らかにした【引用文献 2, 3】。そこで、我々のグループは2型糖尿病の骨格筋における機能改善（グルコース取り込み能の増加）を目指し、世界に先駆けて、DGKδ の発現増加に伴いグルコース取り込み能を増大させる栄養因子ミリスチン酸を同定した【引用文献 4, 5】。そして、ミリスチン酸投与は2型糖尿病モデルマウスの血中グルコース濃度を低下させることに成功した【引用文献 6】。一方で、インスリン抵抗性の改善のためには、減少する骨格筋量を増加させることも重要である。我々はこの課題にも取り組むべく、DGKδ が細胞レベルで筋分化の誘導を制御することを示した【引用文献 7】。この知見は、DGKδ の発現増加がグルコース取り込み能を増加させるだけでなく、筋形成をも促進する可能性を示している。従って、DGKδ を分子標的とした2型糖尿病治療法の開発へと展開することは、骨格筋の機能改善と量増加の両方を同時に実現できる可能性が高い。しかし、筋形成の詳細な機構や生体（個体レベル）での DGKδ の骨格筋形成における寄与は依然不明であり、実際に DGKδ の発現増加は筋形成を促進するのか否かも明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、①細胞レベルでの DGKδ が制御する筋分化制御機構の詳細を解明し、②個体レベルでの DGKδ の発現変動による筋形成への影響を明らかにする。このように、DGKδ の骨格筋形成制御機構を解明することで、骨格筋の機能改善と量増加の両方を目指した二重に効果的な、DGKδ を分子標的とした新規2型糖尿病治療法の開発へと展開することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1)細胞培養 マウス筋芽細胞 C2C12 は10%ウシ胎児血清を含む DMEM (growth medium (GM)) を用いて培養した。培養後、必要に応じて、0.1%ウシ胎児血清及び5 µg/ml insulin を含む DMEM (differentiation medium (DM)) に置換し、筋管細胞へと分化させた。

(2)脂肪酸添加 DMSO に溶解した各脂肪酸は、10%BSA を含む PBS と等量混ぜ、超音波処理後に細胞に添加し、培養した。

(3) DGKδ の発現抑制 エレクトロポレーション法を用いて DGKδ 特異的 siRNA を C2C12 細胞に導入した。導入した細胞は GM で培養し、DM に置換し分化誘導した。

(4)動物飼育 マウスの飼育及びマウスを用いた実験は島根大学の動物実験指針に沿って行った。また、本研究に関わる動物実験は島根大学動物実験委員会にて承認されている。

### 4. 研究成果

#### ①細胞レベルでの DGKδ が制御する筋分化制御機構に関する研究

DGKδ の発現増加は筋形成を促進するのか否かわかっていない。ミリスチン酸 (14:0) は、C2C12 筋管細胞において、DGKδ の発現を増加させ、DGKδ 依存的にグルコースの取り込みを増大させることから【引用文献 4, 5】、ミリスチン酸による骨格筋形成への影響を評価した。

ミリスチン酸の骨格筋形成への影響を調べるために、分化誘導48時間後の C2C12 筋管細胞に、0.1 mM ミリスチン酸を24時間添加した。その結果、ミリスチン酸添加により、DGKδ

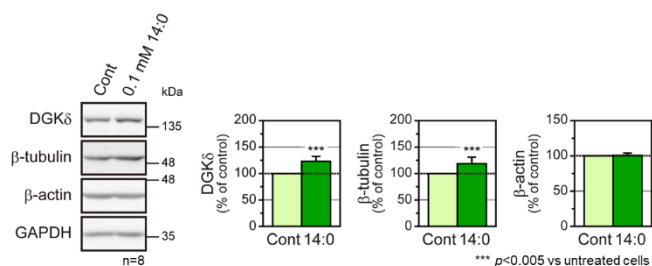


図1 ミリスチン酸のDGKδと細胞骨格タンパク質への影響

の発現が 17.2%増加し、また、微小管を形成する  $\beta$ -tubulin の発現量が 18.3%増加することがわかった (図 1). 次に、この  $\beta$ -tubulin の発現量の増加は、ミリスチン酸特異的か否かを調べるために、他の脂肪酸 (ラウリン酸 (12:0), パルミチン酸 (16:0), オレイン酸 (18:1)) を分化誘導 48 時間後の C2C12 筋管細胞に 24 時間添加した. その結果、ミリスチン酸以外の脂肪酸では  $\beta$ -tubulin の発現量の増加を確認することはできなかったことから、 $\beta$ -tubulin の発現量の増加はミリスチン酸に選択的であることがわかった (図 2). さらに、C2C12 筋芽細胞の増殖 24 時間後にミリスチン

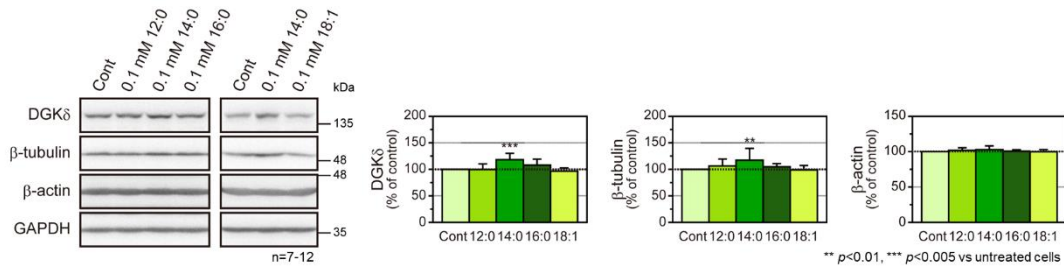
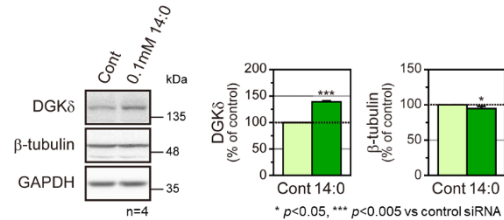


図2 各脂肪酸のDGK $\delta$ と細胞骨格タンパク質への影響

ン酸を 24 時間添加した時 (増殖段階での添加) と分化 0 時間後からミリスチン酸を 48 時間添加した時 (分化初期での添加) には、ミリスチン酸による  $\beta$ -tubulin の増加は見られなかったことから、 $\beta$ -tubulin の発現増加は筋管細胞に特異的であることがわかった (図 3). 次に、C2C12 筋管細胞における  $\beta$ -tubulin の発現増加が DGK $\delta$  依存적か否かを検討するために、DGK $\delta$  特異的 siRNA を用いて DGK $\delta$  の発現を抑制したところ、 $\beta$ -tubulin の発現量が減少すること、そして、ミリスチン酸による発現増加についても抑制されることがわかった (図 4). このことから、C2C12 筋管細胞におけるミリスチン酸による  $\beta$ -tubulin の発現増加は DGK $\delta$  依存적であることがわかった. 運動は DGK $\delta$  と  $\beta$ -tubulin の発現を増加させ【引用文献 8, 9】、一方で、 $\beta$ -tubulin の密度は筋繊維とほとんど同じであることから、 $\beta$ -tubulin の増加は筋肉量の増加に関与すること【引用文献 10】、そして、 $\beta$ -tubulin は筋形成時の細胞融合や伸長に関与するとされている【引用文献 11, 12】. 従って、ミリスチン酸は DGK $\delta$  を介して骨格筋量の増加に関与する可能性が考えられた.

(A) 増殖段階におけるミリスチン酸の影響



(B) 分化初期におけるミリスチン酸の影響

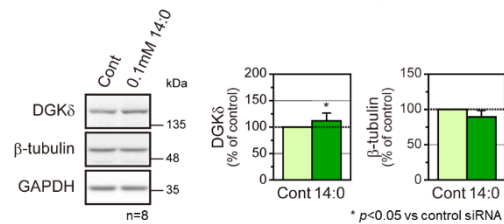


図3 ミリスチン酸の細胞増殖 (A) と筋分化初期 (B) での $\beta$ -tubulinへの影響

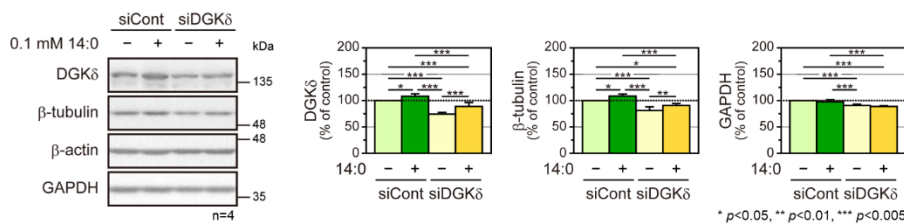


図4 DGK $\delta$ の発現抑制による $\beta$ -tubulinへの影響

## ②個体レベルでの DGK $\delta$ の発現変動による筋形成への影響評価に関する研究

DGK $\delta$  の骨格筋における役割を生体レベルで解明するために、骨格筋特異的欠損マウスの作製を行った. 具体的には、LoxP-flxed DGK $\delta$  マウスと Myf5-Cre マウスを導入し、それぞれ C57BL/6J を用いて戻し交配を行った後、それぞれのマウスを交配させ、骨格筋特異的 DGK $\delta$  欠損マウスを作製した. 作製した DGK $\delta$  欠損マウスにおいて、体重の減少と骨格筋の減少が観察されたが、コントロールマウスと比較して 1 割程度の減少であり、その差はわずかであった. さらに、Myf5 陽性細胞の褐色脂肪細胞においても本マウスは DGK $\delta$  が欠損するが、褐色脂肪組織においても組織量が減少する傾向が観察された. 現在までに、DGK $\delta$  欠損マウスにおいて骨格筋形成において際立った差異は見出していないが、今後、骨格筋や褐色脂肪組織の重量変化等において再現性を含めた検討を行い、さらに骨格筋においては筋再生、褐色脂肪組織においては脂肪形成や糖代謝などへの影響を評価していく予定である.

## <引用文献>

1. IDF Diabetes Atlas 8th edition 2017
2. Miele C, Paturzo F, Teperino R, Sakane F, Fiory F, Oriente F, Ungaro P, Valentino R, Beguinot F,

- Formisano P., Glucose regulates diacylglycerol intracellular levels and protein kinase C activity by modulating diacylglycerol kinase subcellular localization., *J Biol Chem*, 2007, 282: 31835-43.
3. Chibalin AV, Leng Y, Vieira E, Krook A, Björnholm M, Long YC, Kotova O, Zhong Z, Sakane F, Steiler T, Nylén C, Wang J, Laakso M, Topham MK, Gilbert M, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR., Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance., *Cell*, 2008, 132: 375-86.
  4. Sakiyama S, Usuki T, Sakai H, Sakane F., Regulation of diacylglycerol kinase  $\delta$ 2 expression in C2C12 skeletal muscle cells by free fatty acids., *Lipids*, 2014, 49:633-40.
  5. Wada Y, Sakiyama S, Sakai H, Sakane F., Myristic Acid Enhances Diacylglycerol Kinase  $\delta$ -Dependent Glucose Uptake in Myotubes., *Lipids*, 2016, 51:897-903.
  6. Takato T, Iwata K, Murakami C, Wada Y, Sakane F., Chronic administration of myristic acid improves hyperglycaemia in the Nagoya-Shibata-Yasuda mouse model of congenital type 2 diabetes., *Diabetologia*, 2017, 60:2076-2083
  7. Sakai H, Murakami C, Matsumoto KI, Urano T, Sakane F., Diacylglycerol kinase  $\delta$  controls down-regulation of cyclin D1 for C2C12 myogenic differentiation., *Biochimie*, 2018, 151: 45-53.
  8. Teran-Garcia M, Rankinen T, Koza RA, Rao DC, Bouchard C., Endurance training-induced changes in insulin sensitivity and gene expression., *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288:E1168-78.
  9. Fritz T, Krämer DK, Karlsson HK, Galuska D, Engfeldt P, Zierath JR, Krook A., Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients., *Diabetes Metab Res Rev*, 2006, 22:492-8.
  10. Kano Y, Fujimaki N, Ishikawa H. The distribution and arrangement of microtubules in mammalian skeletal muscle fibers., *Cell Struct Funct*, 1991, 16:251-61.
  11. Mogessie B, Roth D, Rahil Z, Straube A., A novel isoform of MAP4 organises the paraxial microtubule array required for muscle cell differentiation., *Elife*, 2015, 4:e05697.
  12. Zhang T, Zaal KJ, Sheridan J, Mehta A, Gundersen GG, Ralston E., Microtubule plus-end binding protein EB1 is necessary for muscle cell differentiation, elongation and fusion., *J Cell Sci*, 2009, 122:1401-9.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ahsanul Haque Md., Omori Naoki, Md. Sheikh Abdullah, Yano Shozo, Osago Harumi, Mitaki Shingo, Kalam Azad Abul, Sakai Hiromichi, Michikawa Makoto, Nagai Atsushi	4. 巻 1800
2. 論文標題 Analysis of the time-dependent changes of phospholipids in the brain regions of a mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148197 ~ 148197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2022.148197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Hiromichi, Matsumoto Ken ichi, Urano Takeshi, Sakane Fumio	4. 巻 12
2. 論文標題 Myristic acid selectively augments tubulin levels in myotubes via diacylglycerol kinase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1788 ~ 1796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Azad Abul Kalam, Sheikh Abdullah Md., Haque Md. Ahsanul, Osago Harumi, Sakai Hiromichi, Shibly Abu Zaffar, Yano Shozo, Michikawa Makoto, Hossain Shahdat, Tabassum Shatera, A. Garu, Zhou Xiaojing, Zhang Yuchi, Nagai Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Time-Dependent Analysis of Plasmalogens in the Hippocampus of an Alzheimer's Disease Mouse Model: A Role of Ethanolamine Plasmalogen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 1603 ~ 1603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci11121603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Azad Abul Kalam, Kobayashi Hironori, Md. Sheikh Abdullah, Osago Harumi, Sakai Hiromichi, Ahsanul Haque Md., Yano Shozo, Nagai Atsushi	4. 巻 22
2. 論文標題 Rapid identification of plasmalogen molecular species using targeted multiplexed selected reaction monitoring mass spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab	6. 最初と最後の頁 26 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmsacl.2021.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakane Fumio, Hoshino Fumi, Ebina Masayuki, Sakai Hiromichi, Takahashi Daisuke	4. 巻 13
2. 論文標題 The Roles of Diacylglycerol Kinase in Cancer Cell Proliferation and Apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5190 ~ 5190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13205190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Hiromichi, Murakami Chiaki, Usuki Takako, Lu Qiang, Matsumoto Ken-ichi, Urano Takeshi, Sakane Fumio	4. 巻 177
2. 論文標題 Diacylglycerol kinase regulates C2C12 myoblast proliferation through the mTOR signaling pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 13 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2020.07.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 堺弘道, 坂根郁夫
2. 発表標題 ミリスチン酸はC2C12筋管細胞における $\alpha$ -tubulin量を選択的かつジアシルグリセロールキナーゼ 依存的に増大させる
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外山雄大, 野津吉友, 小林弘典, 堺弘道, 國澤研大, 渡辺淳, 矢野彰三, 金崎啓造, 並河徹
2. 発表標題 保存期間がD型及びL型 アミノイソ酪酸の血漿濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 第47回医用マスペクトル学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堺弘道, 坂根郁夫
2. 発表標題 ミリスチン酸はC2C12細胞の筋分化過程における $\alpha$ -tubulinの発現量を増大させる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外山雄大, 野津吉友, 田中美砂, 小林弘典, 堺弘道, 國澤研大, 渡辺淳, 並河徹
2. 発表標題 LC-MS/MSによる アミノイソ酪酸 ( $\alpha$ -aminoisobutyric acid ) 鏡像異性体を識別する測定法の検討
3. 学会等名 第46回日本医用マススペクトル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chiaki Murakami, Fumi Hoshino, Hiromichi Sakai, Yasuhiro Hayashi, Atsushi Yamashita and Fumio Sakane
2. 発表標題 Functional relationship between sphingomyelin synthase- related protein and diacylglycerol kinase
3. 学会等名 ASBMB 2020 Annual Meeting Virtual Spotlight Series ( 招待講演 ) ( 国際学会 )
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chiaki Murakami, Fumi Hoshino, Hiromichi Sakai, Yasuhiro Hayashi, Atsushi Yamashita, Fumio Sakane
2. 発表標題 Functional relationship between sphingomyelin synthase-related protein and diacylglycerol kinase
3. 学会等名 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology at Experimental Biology 2020 ( 国際学会 )
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堺弘道, 村上千明, 坂根郁夫
2. 発表標題 ジアシルグリセロールキナーゼ はmTOR - raptor - 脂肪酸合成酵素経路を介してC2C12筋芽細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上千明, 星野史規, 堺弘道, 林康広, 山下純, 坂根郁夫
2. 発表標題 ジアシルグリセロールキナーゼ とスフィンゴミエリン合成酵素関連タンパク質は機能的に連関する
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堺弘道, 村上千明, 坂根郁夫
2. 発表標題 ジアシルグリセロールキナーゼ はmTORシグナル経路を介してC2C12筋芽細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上千明, 星野史規, 堺弘道, 林康広, 山下純, 坂根郁夫
2. 発表標題 スフィンゴミエリン合成酵素関連タンパク質とジアシルグリセロールキナーゼ はsterile motif domainを介して機能的に連関する
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島根大学 総合科学研究支援センター 生体情報・RI実験部門  
<https://www.med.shimane-u.ac.jp/CRLHP/index.html>

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
---------	---------