

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 13日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500677

研究課題名（和文）

新規生活習慣病改善転写因子 TFE3 が骨格筋の代謝および運動能に与える影響の検討

研究課題名（英文）

The role of TFE3, a metabolism-related transcription factor, in skeletal muscles.

研究代表者

飯田 薫子 (IIDA KAORUKO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授

研究者番号：50375458

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨格筋組織特異的に TFE3 を高発現する遺伝子改変マウス (Tg マウス) を用いて、骨格筋における TFE3 の機能を明らかにした。Tg マウスは、野生型と比較して、HK2, GYS1, GLUT4 など糖代謝関連遺伝子の発現が上昇しており、それらに伴い、骨格筋における有意なグリコーゲンの蓄積や運動耐容能の増強などを認めた。また、Tg マウスはインスリン感受性の亢進を認め、トレッドミルの運動トレーニングにより、増強されることが明らかとなった。以上の結果より、骨格筋における転写因子 TFE3 は、糖代謝を制御し、副次的に運動耐容能を増強する働きを持っており、これらの効果が生活習慣病への治療に有効的な効果をもたらす可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the roles of TFE3 in skeletal muscle, the main organ for energy metabolism, using transgenic mice overexpressing TFE3 in muscles. In TFE3 transgenic muscle, glycogen stores were more than 2-fold than wild-type, and this was associated with an upregulation of genes involved in glucose metabolism, specifically GLUT4, HK2 and GYS. Consequently, exercise endurance capacity was enhanced in this transgenic model. Furthermore, insulin sensitivity was enhanced in transgenic mice, and exhibited better improvement after 4 weeks of exercise training.

These potential roles of TFE3 in regulating metabolic genes and glucose metabolism within skeletal muscle suggests that it may be used for treating metabolic diseases, as well as increasing endurance in sport.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：応用健康科学

キーワード：生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

日本を含む先進各国では、近年、脂肪分摂取の増大などによる摂取カロリー過剰と運動不足などによる消費カロリーの低下から、脂質の蓄積過剰状態である肥満と、それに基

づく糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化症などの生活習慣病の増加は深刻な社会問題となっている。これら疾患の原因には過剰なエネルギー貯蓄に伴う、エネルギー代謝調節機構の破綻が挙げられる。転写因子 TFE3

(transcription factor binding to IGHM enhancer 3) はこれまで免疫などに関与する転写因子として知られていたが、申請者の所属した研究室において、この転写因子 TFE3 が糖・脂質代謝やインスリンシグナルに関与する遺伝子のプロモーター領域に頻出する E-box にも反応することが明らかとなり、新規エネルギー代謝関連因子として報告された (Nakagawa Y et al: *Nat Med*, 2006). ウイルスにより肝臓に強発現させた TFE3 は、インスリンシグナルの介在タンパク質である IRS-2 (insulin receptor substrate 2) を始め、HK2 (hexokinase 2), GSK (glycogen synthase kinase) といった糖代謝に関わる分子の発現を顕著に上昇させると共に、IRS-2 以降のインスリンシグナル分子活性化によるインスリン感受性の増強、p70S6K (ribosomal protein S6 kinase) の活性化による蛋白合成促進作用、GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 beta) の活性化によるグリコーゲンの合成促進作用などを有していた。さらに、肝臓での TFE3 は PGC-1 α (peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha) の誘導を介して、脂肪酸分解 (β 酸化) 関連遺伝子群の発現を上昇させ、脂肪酸分解を促進し、高脂血症を改善する機能を有していた。

このような作用から、TFE3 はメタボリックシンドローム改善の標的分子として非常に注目されている。しかしながら他臓器における作用を含め、TFE3 の代謝に関する作用は未知の部分が多く、その解明は必須である。そこで本研究では、TFE3 の骨格筋における作用を明らかにしていくこととした。肝臓同様に、インスリンのエネルギー代謝調節の重要な標的臓器である骨格筋においても、TFE3 が同様の分子メカニズムを有する可能性は高い。肝臓で強発現した TFE3 はインスリンシグナルの増強作用、グリコーゲンの合成促進作用、さらにはタンパク質合成の増進作用などを有しているが、もしこの TFE3 の機能が筋肉でも保持されるのであれば、「エネルギー代謝の効率的な利用」と「筋タンパク量やグリコーゲン量の増加による筋量や運動能の増加」の2方向からの効果が期待され、これら効果は生活習慣病治療への応用や、運動能力の向上にも応用できるような興味深いものとなることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、糖の主要な代謝臓器である骨格筋に着目し、骨格筋組織特異的 TFE3 強発現トランスジェニックマウスを用いて、骨格筋での糖代謝関連遺伝子の発現変化、及び個体の糖代謝や運動耐容能等の変化について検討を行い、骨格筋における TFE3 の作用を明らかにしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

本研究では α -actin 遺伝子プロモーターを介して骨格筋組織特異的に TFE3 を多量に発現するトランスジェニックマウス (以下 TFE3 Tg マウスと表記する) を作製し、検討に用いた。実験には、10~16 週齢のマウスを使用し、対照群には同胞のトランスジーンを持たない野生型マウス (以下 WT マウスと表記する) を用いて、以下の検討を行った。

①筋組織での各種遺伝子の発現検討

骨格筋組織における、mRNA およびタンパク質レベルにおいて、糖・脂質代謝関連因子やインスリンシグナル関連因子などの発現量を検討した。

②代謝機能への影響の検討

- ・ 体重および (マウス CT, DEXA による) 筋肉量、脂肪量などの基本データ測定
- ・ 血糖値、血中インスリン値、血中脂質、遊離脂肪酸など各種代謝パラメーター測定
- ・ 経口糖負荷試験 (OGTT)、インスリン抵抗性試験 (ITT)
- ・ 動物用呼気ガス分析装置を用いた基礎代謝量の測定

上記をマウス各個体解析し、エネルギー代謝機能について WT マウスと比較検討した。

③筋分化・肥大への影響の検討

- ・ 単離筋組織の重量測定
 - ・ 筋組織のグリコーゲン定量
 - ・ 筋組織標本の切片作成と組織学的評価
- 組織学的な評価としては、HE 染色 (形態変化の観察)、PAS 染色 (グリコーゲンの検出)、各種免疫染色などを行った。

さらに、薬物による筋損傷モデル (Benoit PW. *J Anat.* 1970) を用い、筋再生の過程を比較検討した。以上の方法より、TFE3 が筋の肥大や再生に与える影響を検討した。

④運動機能への影響の検討

動物用トレッドミルを用いて短期または長期の運動を行い、運動強度や持続時間、運動後の筋グリコーゲン量などを野生型群と比較検討し、運動耐容能を評価した。

なお上記の検討はすべて、定常時だけでなく、4-8 週間の運動トレーニング後にも行い、TFE3 が与える効果が、運動負荷により修飾されるかについても併せて検討を行った。

(2) 培養細胞レベルでの検討

筋芽細胞株 C2C12 を用いて TFE3 のインスリン作用への影響、エネルギー代謝への影響、分化・肥大への影響などを解析するために以

下の検討を行った。

- ① C2C12 を一定の条件下において筋線維に分化させた後、アデノウイルスを用いて TFE3 を強発現させ、インスリンシグナルやエネルギー代謝に関与する遺伝子/蛋白発現を定量的 PCR / Western Blotting 法などにて評価した。またこの細胞にインスリン刺激を行い、シグナル介在分子の活性化状態を評価した。
- ② C2C12 にアデノウイルスを用いて TFE3 を強発現させた後、筋芽細胞から筋線維への分化誘導を行い、各種の分化マーカー (Myf 5, MyoD, Myogenin, MRF4 など) や筋萎縮関連因子 (Atrogin-1) の発現評価を行い、TFE3 が筋の分化や肥大に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 骨格筋での転写因子 TFE3 による糖代謝関連遺伝子の制御

骨格筋の代謝関連遺伝子の発現をノーザンブロット法により検討した結果、TFE3 Tg マウス群では、WT マウス群に比し、糖利用の最初の段階を制御する HK2, グリコーゲン合成経路に関与する GYS (glycogen synthase), 及び糖の輸送担体 GLUT4 (glucose transporter 4) など糖代謝関連遺伝子の発現が顕著に増加していた (図 1)。また、HK2, GYS1 のタンパク発現も TFE3 Tg マウスで増加していた。一方で解糖系の主要な酵素である PFK (phosphofructokinase), PK (pyruvate kinase) などの遺伝子発現には、変化が認められなかった (図 1)。

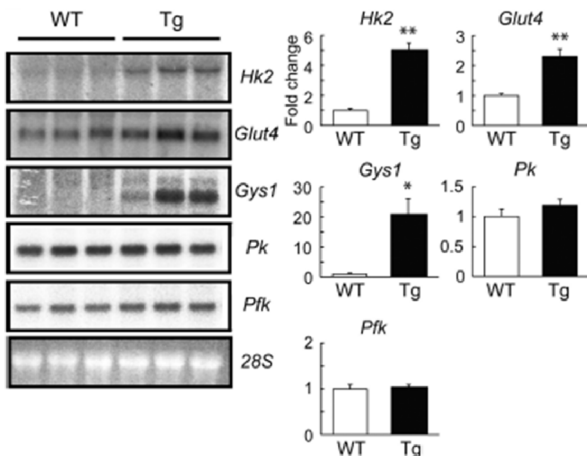


図1 糖代謝関連遺伝子の発現検討 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

(2) 転写因子 TFE3 による骨格筋のグリコーゲン蓄積の誘導

HE 染色による筋の組織評価においては WT マウスとの間に有意な差は認められなかつ

た。しかしながら PAS 染色の検討において、TFE3 Tg マウス群の染色性の亢進 (=グリコーゲンの蓄積) が認められた。そこで、骨格筋組織中のグリコーゲン含有量の定量を行ったところ、大腿四頭筋、腓腹筋ともに TFE3 Tg マウス群におけるグリコーゲン含有量が有意に増加していることが確認された (図 2)。

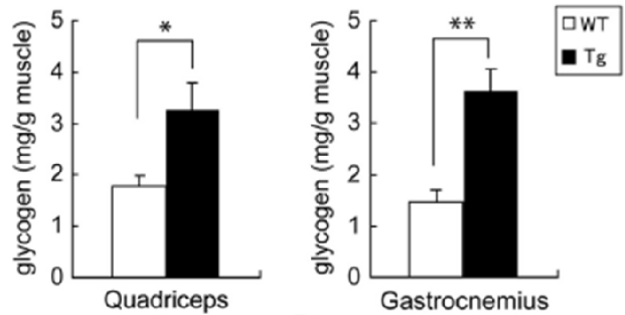


図2 グリコーゲン定量実験 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

(3) Tg マウスにおけるインスリン感受性の亢進

定常時における血清パラメーターの検討では、TFE3 Tg マウスと WT マウスの間で、血糖、インスリン、HbA1c, トリグリセリド、遊離脂肪酸などの値に有意な差は認められなかった。

また耐糖能試験 (OGTT) を行った結果では、有意な変化は認められなかったが、一方で、インスリン負荷試験 (ITT) においては、TFE3 Tg マウスにおいてインスリン感受性の増強が認められた (図 3)。さらに、トレッドミルを用いた長期 (1 ヶ月間) の運動トレーニングを行うことにより、このインスリン感受性の亢進は更に増強されることが明らかとなった (図 3)。

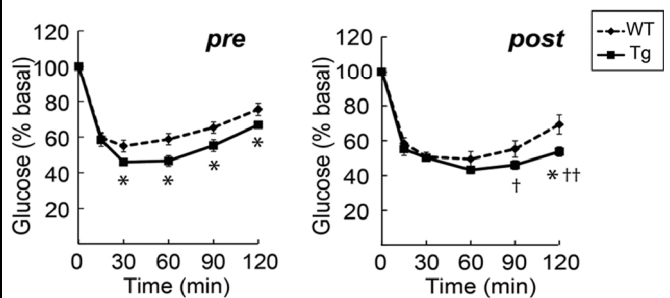


図3 トレッドミルによる運動トレーニング前後のインスリン感受性試験
* $P < 0.05$ vs. WT
† $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs. pre

OGTT と ITT の結果が乖離したことについては、理由はまだ明らかになっていない。しかしながら、GLUT4 や HK2 といった糖代謝を制御する因子の発現がインスリンシグナルの亢進を引き起こしたことが考えられる。また、長期トレーニングを行った群の遺伝子発現の検討では HK2, GYS, GLUT4 の遺伝子発現

増強に加え、IRS2 の遺伝子発現上昇が認められ (データ提示せず)、このことがトレーニング後のインスリン感受性の亢進の一因と考えられた。

なお、細胞実験において、TFE3 を高発現させた C2C12 細胞由来の筋線維細胞にインスリン刺激を行ったが、Akt, GSK などインスリンシグナル介在分子の活性化状態に有意な差は認められなかった。

(4) TFE3 Tg マウスにおける持久力増強効果

両群マウスにおいて、運動耐容能試験を行った所、TFE3 Tg マウスの走行距離が、野生型に比し、有意に増加しており持久力が高いことが示唆された (図 4)。これは、運動時に分解されエネルギーとして利用されるグリコーゲンの合成促進や HK2 や GLUT4 の発現増加による糖利用、糖の取り込みが促進していたことが要因として考えられた。

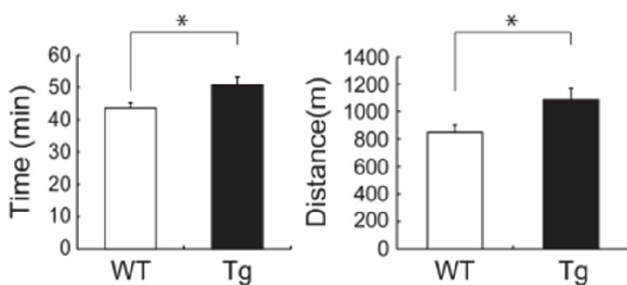


図4 運動耐容能試験(* $P<0.05$)

以上 (1) ~ (4) の結果より、骨格筋における転写因子 TFE3 は、肝臓同様 HK2 の遺伝子発現を増強するだけでなく、GYS, GLUT4 も制御する機能を有しており、インスリン感受性の亢進など、特に糖代謝に有効的な効果をもたらす因子である可能性が示唆された。さらに、運動能の向上が認められたことから、TFE3 により「エネルギー代謝の効率的な利用」に加え、「運動能向上」の付加的効果が得られることも明らかとなった。

(5) TFE3 が筋の分化に与える効果の検討

先行研究では、TFE3 は肝臓において蛋白合成促進作用を有し、肝細胞を肥大させる作用があることを報告している (Nakagawa Y et al: Nat Med, 2006)。さらに TFE3 は E-box 配列に結合することが明らかとなっているが、Myf5, MyoD, Myogenin, MRF4 といった筋分化関連遺伝子のプロモータ領域には E-box 存在することが判っている。そこで、TFE3 が骨格筋の肥大や分化に何らかの影響を与える可能性を考え、以下の検討を行った。

筋の組織評価においては WT マウスと TFE3

Tg マウスの中に、筋重量や組織学的形態に明らかな差は認められていなかった。そこで、薬物 (カルジオトキシン) 投与により人為的に筋組織を挫滅させ、その再生過程を評価した。その結果、Tg マウスでは筋組織の再生が早期に起こる傾向が示された。

さらに、その詳細な機序を検討するために、筋芽細胞株 C2C12 にアデノウイルスを用いて、TFE3 を高発現またはノックダウンした上で分化誘導を行い、その過程を検討した。その結果、TFE3 を高発現させた細胞では、筋分化関連因子の MyoD や Myogenin の発現が抑制され、筋萎縮関連因子 Atrogin-1 の発現が増加することが明らかとなった。また、顕鏡による形態学的な検討においても、分化の抑制が認められた。一方ノックダウンでは、MyoD, Myogenin の発現の有意な上昇、Atrogin-1 の減少などを認め、形態学的な検討では分化が亢進する傾向を認めた。

以上のことから、転写因子 TFE3 は筋分化関連因子や筋萎縮関連因子に直接あるいは間接的に影響をおよぼし、筋の分化や肥大に影響する可能性が示唆される。In vivo と In vitro の結果が相反していることについては、理由はまだ明らかではない。今後はこの点も含め、TFE3 が筋の分化や肥大に与える影響を引き続き検討していく予定である。

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 1 件)

① Iwasaki H, Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. TFE3 Regulates Muscle Metabolic Gene Expression, Increases Glycogen Stores, and Enhances Insulin Sensitivity in Mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 302(7): E896-902, 2012、査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 飯田薫子, 中彩乃, 中川嘉, 島野仁 「骨格筋における転写因子 TFE3 の糖・蛋白代謝に対する効果」, 第 65 回 日本栄養・食糧学会大会, 東京都 (2011 年 5 月)

② Naka A, Iida K, Iwasaki H, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H. 「Functional analysis of TFE3, the energy metabolism related transcription factor, in skeletal muscles.」, 15th Annual Congress of the European College of Sport Science (ECSS), Antalya, Turkey (June 2010)

③ 中彩乃, 飯田薫子, 岩崎仁, 中川嘉, 山

田信博，島野仁 「エネルギー代謝関連転写因子 TFE3 の骨格筋における機能解析」，第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会，岡山県 （2010 年 5 月）

④ 中彩乃，飯田薫子 「エネルギー代謝関連転写因子 TFE3 の骨格筋における機能解析」，日本体力医学会 第 64 回大会，新潟県 （2009 年 9 月）

⑤ 岩崎仁，島野仁，中川嘉，飯田薫子、松坂賢，石井清朗，小林和人，矢藤繁，高橋昭光，鈴木浩明，山田信博 「新規生活習慣病関連転写因子 TFE3 の骨格筋における機能解析」 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会，大阪（2009 年 5 月）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 薫子 (IIDA KAORUKO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・准教授

研究者番号：50375458

(2) 研究分担者

中川 嘉 (NAKAGAWA YOSHIMI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：80361351