

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591299

研究課題名(和文) 骨格筋・心筋におけるAkt1およびAkt2の機能の解明

研究課題名(英文) Role of Akt1 and Akt2 in Cardiac and Skeletal Muscle

研究代表者

岡崎 由希子 (Okazaki, Yukiko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30422299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はインスリンシグナル伝達の中心を担うAktの骨格筋や心筋における役割を検討するため、臓器特異的Akt欠損マウスを作成・解析した。筋肉特異的Akt1/Akt2ダブル欠損マウスは5週齢にて心不全のために死亡した。心筋のミトコンドリア関連のmRNA発現の著明な低下による心筋障害が一因と考えられた。骨格筋特異的Akt1/2ダブル欠損マウスは6週齢から骨格筋の重量減少が明らかとなり、その後耐糖能障害とインスリン抵抗性を呈した。

これらの結果からAkt1・Akt2は心筋におけるグルコース・脂質代謝の維持に必須であり、また骨格筋の量や質の維持や、骨格筋を介する全身の糖代謝に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to gain insight into the role of Akt in heart and SKM, we ablated Akt1 and Akt2 by crossing Akt1 and Akt2 floxed mice with MCK-Cre or MLC1-Cre transgenic mice, respectively, resulting in both heart and SKM specific Akt1/Akt2 knockout (M-Akt1/2DKO) mice or SKM specific Akt1/Akt2 knockout (MLC1-Akt1/2DKO) mice. M-Akt1/2DKO mice died within 5 weeks after birth due to heart failure. Quantitative RT-PCR analysis revealed genes regulating oxidative phosphorylation were decreased significantly in the heart of M-Akt1/2DKO mice. In MLC1-Akt1/2DKO mice, the body weight and skeletal muscle volume were decreased at 6 weeks after birth, and showed impaired glucose tolerance and insulin resistance at 32 weeks.

These data suggest that Akt1 and Akt2 play an important role for maintaining heart and SKM growth and function by regulating mitochondrial energy metabolism and controlling quantity and quality of skeletal muscle which are involved in glucose metabolism in whole body.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：骨格筋 心筋

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいては糖代謝の80%以上が骨格筋にて行われており、骨格筋におけるインスリン作用の低下(インスリン抵抗性)が2型糖尿病の発症・病態形成に重要であると考えられている。また、主に培養細胞系を用いた研究において、骨格筋におけるインスリン依存性のグルコースの取り込み、グリコーゲン合成、蛋白合成などのインスリンの代謝作用には phosphoinositide-3 kinase(PI3K)、Aktシグナルが必須であることが示唆されている(Ueki et.al JBC 1998)。

一方、糖尿病患者では冠動脈疾患・脳血管障害を中心とする大血管症合併症を合併しやすいが、これら動脈硬化性疾患に起因する心疾患とは独立し糖尿病患者で特異的に見られる心疾患として、糖尿病性心筋症といわれる概念がある。糖尿病性心筋症は1972年に Rublerらが、糖尿病で冠動脈疾患を認めずに高度心筋障害をきたした病理解剖症例を報告し、その後30年以上にわたって研究が積み重ねられてきている。糖尿病性心筋症では主に拡張障害が生じるが、その機序として心筋内小動脈病変、心筋代謝障害、心筋線維化、自律神経障害などが挙げられている。

現在までに骨格筋・心筋特異的、もしくは心筋特異的にインスリンシグナルのパスウェイにおける重要な分子を欠損させたマウスが作成されており、心臓においてインスリンシグナルは心筋細胞の肥大化、抗アポトーシス作用等を介して心機能の保持に重要であることが分かってきている。しかしながら、骨格筋においてグルコースの取り込みやグリコーゲンの合成などのAktによる糖代謝作用が全身の糖代謝にどのような影響を与えるかについては、今のところ明確なエビデンスは得られていない。

Aktは下等生物の段階から存在し、ホ乳類にも保持されている分子量約60kDaのセリン・スレオニンキナーゼである。Aktは糖取り込み促

進、グリコーゲン合成促進などの糖代謝、細胞増殖などに関与しており、糖尿病、癌などの疾患において重要な分子であると考えられている。AktにはAkt1、Akt2、Akt3の3つのアイソフォームがあり、Akt1とAkt2は全身にユビキタスに発現しており、Akt3は神経系・精巣に限局して発現している。Akt1は主に細胞増殖に、Akt2は主に代謝に関わっているといわれている。我々は骨格筋・心筋におけるAktの役割を検討するため、これらの臓器でAkt1及びAkt2を特異的に欠損したマウスの作成・解析を行うこととした。

2. 研究の目的

骨格筋・心筋におけるAktの役割を検討するために、我々は以下の手法で骨格筋・心筋特異的(筋肉特異的)Akt1/Akt2ダブルノックアウトマウスを作成した。Akt1遺伝子のExon4と5を挟むようにその上流と下流にIox-P配列が挿入したAkt1 floxマウス、Akt2遺伝子のExon5と6を挟むようにその上流と下流にIox-P配列を挿入したAkt2 floxマウス、およびMCK(muscle creatine kinase)のプロモーター領域の下流にCreリコンビナーゼが組み込まれた配列を持つMCK-Creトランスジェニックマウスを用いて、筋肉特異的Akt1欠損(M-Akt1KO)マウス、筋肉特異的Akt2欠損(M-Akt2KO)マウス、筋肉特異的Akt1/Akt2ダブル欠損(M-Akt1/2DKO)マウスを作成した。マウス作成後、M-Akt1/2DKOマウスの骨格筋及び心筋におけるインスリン刺激によるAkt及びその下流へのシグナルが消失していることをウエスタンブロットにて確認した。M-Akt1KOマウス、M-Akt2KOマウスの成長曲線は正常であったが、M-Akt1/2DKOマウスはいずれもほぼ4週齢で心不全のために死亡した。M-Akt1/2KOマウスの心筋mRNAの解析では、ミトコンドリアの電子伝達系の酵素であるシトクロームC(CytC)、CPT₁、CPT₂や、ミトコンドリアのゲノムの複製や転写に関与するmtTFAの著明な低下が認められ、このことが心不全をも

たらずような心筋障害の一因ではないかと考えられた。

M-Akt1/2DK0マウスはほぼ4週齢で死亡してしまうため、Akt1・Akt2の長期的な骨格筋への影響は検討できなかった。そこで我々は、Akt1 floxマウス、Akt2 floxマウス、およびMLC1(myosin light chain 1)のプロモーター領域の下流にCreリコンビナーゼが組み込まれた配列を持つMLC1-Creトランスジェニックマウスを用い、骨格筋特異的にAkt1/2をKOしたマウス(MLC1-Akt1/2DK0マウス)も作成した。MLC1-Akt1/2DK0マウスの作成後、MLC1-Akt1/2DK0マウスの骨格筋におけるAktの蛋白発現が著しく低下していることをウエスタンブロットにて確認した。

3. 研究の方法

M-Akt1/2DK0マウスは生後4週で心不全で死亡したが、この原因を調べるためにマウスの心機能を時系列的に検索する。また4週齢までの糖脂質代謝異常の有無、糖脂質代謝関連分子の変動も調べる。また、MLC1-Akt1/2DK0マウスを用い、長期にわたる骨格筋におけるAkt作用の解析を行う。これらの研究を通して、インスリンシグナル伝達を担う中心的分子であるAkt1およびAkt2の心筋や骨格筋における働きを検討し、糖尿病性心筋症の病因・病態や、糖尿病患者に認められる骨格筋でのインスリン抵抗性の分子メカニズムを解明していく。

(1)M-Akt1KO マウス、M-Akt2KO マウス、M-Akt1/2DK0 マウスの全身の糖代謝、脂質代謝を観察する。また、心筋における遺伝子発現の変化を検討する。出生後4週での死因は心不全と思われるため、心機能の経時的変化を追う。また遺伝子変化を経時的に調べるために、網羅的遺伝子発現を行う。また、M-Akt1KO マウス、M-Akt2KO マウス、M-Akt1/2DK0マウスに対して、ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験を行う。

(2) 筋肉特異的Akt1/2 ダブルノックアウトマウス(M-Akt1/2 DKO)は平均4週で死亡するため、Akt1 Akt2ダブルノックアウトによる骨格筋への影響は十分に検討できなかった。そこで骨格筋特異的にAkt1およびAkt2をKOしたマウス(MLC-Akt1/2 DKO)を用い、Akt1とAkt2の骨格筋および糖代謝への影響に関する検討する。骨格筋の表現系に関しては、MLC1-Akt1/2DK0マウスとコントロールマウスの組織標本を作成して、骨格筋での筋肉ファイバタイプの変化、脂肪沈着の量・分布の相違、血管分布の差異等を中心に観察する。次に、表現系の検討に引き続き、MLC1-Akt1/2DK0 マウスの骨格筋における遺伝子発現を特に糖代謝、脂質代謝に関連する遺伝子に注目して網羅的に解析する。

またMLC1-Akt1/2DK0 マウスに対して、ブドウ糖負荷試験、インスリン負荷試験を行い、同実験を高脂肪食の負荷後にも行う。

4. 研究成果

(1)M-Akt1KO マウス、M-Akt2KO マウス、M-Akt1/2DK0 マウスの全身の糖代謝に関しては、M-Akt1KO マウス、M-Akt2KO マウスいずれにおいても、8週齢において随時血糖・インスリン値、インスリン負荷試験、ブドウ糖負荷試験でコントロール群と同等であった。高脂肪食負荷をかけて同様の検討を行ったが、やはり有意差を認めなかった。M-Akt1/2DK0マウスでも3週齢における随時血糖・インスリン値、インスリン負荷試験、ブドウ糖負荷試験においてもコントロールマウスと比べ有意差を認めなかった。これらより、心筋・骨格筋のAkt1,2は、検討を行った週齢では糖代謝に明らかな影響を与えないことが分かった。

M-Akt1/2DK0の出生後4週での死因は心不全と思われるため、経時的に心エコーを施行した。0週齢ではコントロールと同等であった心機能が、2週齢になるとやや低下傾向を

認め、4 週齢では心筋壁が有意に菲薄化し、また心内腔の拡張を認めた。この原因を調べるために心筋の TUNEL 染色を行ったところ、M-Akt1/2DKO マウスの心臓ではアポトーシスの亢進を認めた。また M-Akt1/2DKO マウスにおいて 0, 2, 4 週齢で経時的に RT-PCR を行った結果、グルコース・脂肪酸の代謝に関連する遺伝子であるインスリンミトコンドリアコピー数、電子伝達系の酵素であるシトクローム C や、脂肪酸の細胞内への取り込み・ミトコンドリアへの輸送に関連する FABP4・CD36 の発現が経時的に低下していた。

これらの結果より、心臓での Akt1, 2 の欠損によってミトコンドリアに何らかの異常が生じ、成長に見合う必要なエネルギー代謝が適切に行えないことが心不全に関与していることが考えられた。心筋において Akt1, 2 は、アポトーシス遺伝子の発現やグルコース・脂質代謝の異常を介して心不全を惹起させる可能性が示唆された。

(2) ウエスタンブロットにて、MLC-Akt1/2DKO の骨格筋におけるインスリン刺激による Akt およびその下流へのシグナルが障害されていることを確認した。

骨格筋特異的 Akt1/2 ダブル欠損マウス (MLC1-Akt1/2DKO) は 6 週齢の時点から体重減少および速筋優位な骨格筋の重量減少が明らかとなり、これに伴うと思われる筋力低下と自発運動の低下を示した。しかしながらこの時期には全身の耐糖能とインスリン抵抗性は対照マウスと変わらず、またインスリン刺激による骨格筋のグルコース取り込みにも低下を認めなかった。

MLC1-Akt1/2DKO は週齢が進むにつれ、体重増加率の低下、骨格筋重量の低下、筋力低下、持久力の低下を呈した。また、骨格筋中の酸化的リン酸化関連の遺伝子発現、ミトコンドリア生合成関連の遺伝子発現、ミトコンドリア含量も著明に低下していた。

32 週齢で MLC1-Akt1/2DKO は耐糖能障害とインスリン抵抗性を呈し、速筋におけるグルコース取り込みも低下を認めた。加えて速筋に本来多く含まれるタイプ II 線維が減少しており、筋線維面積の減少と線維化の進行を認めた。また全身の持久力も著明に低下していた。また、32 週齢での MLC1-Akt1/2DKO 骨格筋のマイクロアレイでは、複数の炎症性サイトカイン等に変化が認められた。100 週齢になると、MLC1-Akt1/2DKO の耐糖能障害とインスリン抵抗性はさらに増悪した。

これまでの研究から、心筋においては Akt1・Akt2 はグルコース・脂質代謝の維持に必須であり、ダブル欠損では代謝異常やアポトーシス遺伝子の発現を介して心不全を惹起させる可能性が示唆された。また、骨格筋においては Akt1・Akt2 は骨格筋の量の維持や質の維持に必須であり、また、骨格筋を介する全身の糖代謝に大きく関わっていることが示唆された。

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 6 件)

梅原敏弘、梅原敏弘、植木浩二郎、金子和真、鈴木美穂、岩根亜弥、栗澤元晴、笹子敬洋、小林正稔、岡崎由希子、大杉満、Birnbau Morris J、門脇孝：「Roles of Akt1 and Akt2 in cardiac and skeletal muscle」第 16 回日韓糖尿病シンポジウム 2011 年 10 月 21 日-22 日 千葉県浦安市 ヒルトン東京ベイ

梅原敏弘、植木浩二郎、金子和真、鈴木美穂、岩根亜弥、栗澤元晴、笹子敬洋、小林正稔、岡崎由希子、大杉満、Birnbau Morris、門脇孝：「0-142 心筋・骨格筋における Akt1 および Akt2 の機能の解明」第 32 回日本肥満学会年次学術集会 2011 年 9 月 23 日-24 日、兵庫県淡路市 淡路夢舞台国際会議場

Yukiko Okazaki, Kohjiro Ueki, Toshihiro Umehara, Kazuma Kaneko, Miho Suzuki, Takayoshi Sasako,

Motoharu Awazawa, Mituru Ohsugi, Morris Birnbaum, Takashi Kadowaki : Role of Akt1 and Akt2 Cardiac and Skeletal Muscle. 3rd Annual Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes 2011.7. Beijing, China

梅原敏弘、植木浩二郎、鈴木美穂、金子
和真、岩根亜弥、粟澤元晴、笹子敬洋、
小林正稔、岡崎由希子、大杉満、
Birnbaum Morris J、門脇孝：「PA-061
心筋・骨格筋における Akt1 および Akt2
の機能の解明」第 11 回東京大学生命科学
シンポジウム Todai BIO2011 2011 年
6 月 4 日、東京 東京大学安田講堂及び
工学部 2 号館

梅原敏弘、植木浩二郎、鈴木美穂、金子
和真、岩根亜弥、阪田道教、笹子敬洋、
小林正稔、粟澤元晴、岡崎由希子、大杉
満、Birnbaum Morris J、門脇孝：「血
管内皮的特異的 Akt/PKB ノックアウト
マウスの解析」第 54 回日本糖尿病学会年
次学術集会 2011 年 5 月 19 日-21 日、
札幌 さっぽろ文化の館他

金子和真、植木浩二郎、鈴木美穂、梅原
敏弘、粟澤元晴、笹子敬洋、小林正稔、
岡崎由希子、大杉満、門脇孝：「心筋・骨
格筋における Akt1/Akt2 の役割の解明」
第 84 回日本内分泌学会学術集会 2011
年 4 月 21 日-23 日、神戸 神戸国際会議
場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 由希子 (OKAZAKI, Yukiko)

東京大学医学部附属病院・糖尿病代謝内
科・助教

研究者番号：30422299