

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15352

研究課題名(和文) ストレプトゾトシン糖尿病代謝異常を是正する骨格筋AMPK依存性代謝改善因子の探索

研究課題名(英文) Study of muscle AMPK-dependent factors that improve metabolic abnormalities in streptozotocin-induced diabetes

研究代表者

箕越 靖彦 (MINOKOSHI, Yasuhiko)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・教授

研究者番号：10200099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：AMPキナーゼ(AMPK)は、細胞内のエネルギー枯渇を感知して活性化するキナーゼであり、近年、肥満・糖尿病の分野で注目されている。応募者は、骨格筋選択的dominant negative-AMPK発現マウス(DN-AMPK Tg)にストレプトゾトシン(STZ)を投与すると、血中インスリン濃度は低値であるにも関わらず、糖尿病(STZ糖尿病)による高血糖、高脂肪酸血症、高ケトン体血症などの代謝異常が改善し、致死率が劇的に改善することを見出した。その結果、IL-6、irisinとレプチンが骨格筋AMPK活性に依存してSTZ糖尿病の代謝異常に関わることを見出した。

研究成果の概要(英文)：AMP kinase (AMPK) is a metabolic sensor that plays an important role in obesity and diabetes. I found that muscle-specific dominant negative AMPK-expressing transgenic mice (DN-AMPK Tg mice) suppress metabolic abnormalities in streptozotocin-induced type 1 diabetes. The study revealed that IL-6, irisin, and leptin are involved in the effects of muscle DN-AMPK on streptozotocin-induced diabetes.

研究分野：代謝学

キーワード：AMPK streptozotocin myokine leptin

## 1. 研究開始当初の背景

AMPK (AMP-activated protein kinase) は、5'-AMP によって活性化される serine/threonine kinase である。AMPK は、当初、acetyl-CoA carboxylase 及び HMG-CoA reductase の活性を制御する調節酵素として、同定された。その後、これらの酵素が同一酵素であること、また 5'-AMP によって活性化されることが明らかとなった。現在、AMPK は、細胞内のエネルギー要求度に応じて様々な代謝酵素を制御する、“マスター酵素”の一つと考えられている。さらに、糖尿病治療薬であるメトホルミンが骨格筋や肝臓の AMPK を活性化すること、レプチンとアディポネクチンが AMPK を活性化すること (Minokoshi, et al., 2002; Yamauchi, Minokoshi, et al., 2002)、視床下部の AMPK がレプチンやインスリンなどのホルモン、グルコースなど栄養素の共通のエネルギーセンサーとして働き、摂食行動の調節に必須であること (Minokoshi, et al., 2004) が判明し、AMPK は細胞内のエネルギー代謝だけでなく、生体全体のエネルギー代謝に調節作用を営む調節酵素と捉えられるようになった。

AMPK は、AMP によるアロステリックな調節と AMPK キナーゼ (AMPKK) によるリン酸化によって活性化される。AMPK にはいくつかのリン酸化部位が存在するが、サブユニット 172 番目のスレオニンが AMPK の活性化に重要である。AMPKK として、Peutz-Jeghers syndrome (PJS) の原因遺伝子の一つである LKB1 が同定されている。しかし、培養細胞株として様々な実験に使用される HeLa 細胞は、LKB1 を発現していないにも関わらずグルコース飢餓などによって AMPK を活性化することから、LKB1 以外の活性化機構が存在することは明らかである。事実、calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) が、AMPKK の一つであることが報告された。このことは、AMPK 活性が細胞内カルシウムによっても調節されることを示唆する。

インスリン抵抗性を主徴とする 2 型糖尿病において、AMPK は、末梢組織において活性が低下、また活性化不全が起こる。従って、これを活性化することが糖尿病治療に役立つと考えられて来た。しかし、インスリン欠乏による 1 型糖尿病においては、AMPK を活性化することが治療につながるのか否かは不明であった。

1 型糖尿病は、インスリン欠乏によって末梢組織、特にインスリン感受性組織である骨格筋、心臓、脂肪組織、肝臓において糖の利用が抑制される。その結果、エネルギー飢餓が生じて AMPK が活性化すると考えられる。活性化した AMPK は、脂肪酸酸化を促進する一方、タンパク質合成を抑制、オートファジーを活性化することから、1 型糖尿病の骨格筋において AMPK が活性化することは、骨格筋の筋タンパク質を分解してアミノ酸を

増やし糖新生に供給する“グルコース-アラニン回路”を促進することによって、1 型糖尿病での代謝適応に寄与すると考えられる。

事実、申請代表者は、骨格筋 AMPK による代謝調節機構を調べる過程で、STZ 誘導性 1 型糖尿病マウスの骨格筋において AMPK が活性化することを見出した。そこで、骨格筋選択的に dominant negative AMPK を発現した DN-AMPK Tg マウスにストレプトゾトシン (STZ) を投与したところ、骨格筋での AMPK 下流シグナルである脂肪酸酸化シグナル、タンパク質合成抑制シグナル、飢餓適応反応のオートファジーシグナルが抑制された。しかし、驚いたことに、血中インスリン濃度が低値であるにも関わらず、高脂肪酸血症、高ケトン体血症が正常化し、部分的に高血糖も改善した。骨格筋および脂肪組織重量が増加し体重減少が抑制され、半数以上のマウスが数ヶ月を越えて生存した (本実験では STZ を投与したマウスは 2 週間以内に全て死亡する)。さらに、STZ 糖尿病マウスだけでなく、自然発症 1 型糖尿病 (NOD) マウスに、AMPK 阻害剤である compound C を浸透圧ポンプによって持続投与すると、DN-AMPK Tg マウスと同様、高脂肪酸血症、高ケトン体血症が正常化して、血糖値も改善した。このように、膵臓ベータ細胞が障害されインスリン分泌量が減少する 1 型糖尿病は、これまで、低インスリン血症によってすべての病態が説明されてきたが、この実験結果は、予想に反して、インスリンだけでなく、骨格筋 AMPK が活性化することが、1 型糖尿病の代謝異常を引き起こすことを示唆する。

## 2. 研究の目的

以上のように、STZ 糖尿病では骨格筋において AMPK が活性化すること、その活性化はむしろ糖尿病の増悪因子として働くことが明らかとなった。骨格筋からは様々なマイオカインが分泌される。それ故、骨格筋において AMPK が活性化することによって何らかのマイオカインが分泌され、それによって STZ 糖尿病の代謝異常が引き起こされる可能性がある。本研究は、STZ 糖尿病の代謝異常が、インスリン欠乏だけでなく、骨格筋の AMPK 活性に依存して分泌されるマイオカイン及びマイオカインを起点とする他臓器間相互ネットワークの異常に起因するとの考えに立ち、当該マイオカインを同定し、その機能を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) C2C12 骨格筋細胞株に持続活性化型 AMPK、または AMPK に対する shRNA を発現させた樹立株を作成し、cDNA アレイ解析を行い、AMPK 活性に依存して発現が変化するマイオカインを探索した。

(2) DN-AMPK Tg マウスと対照マウスに STZ を投与し、(1) で得られたマイオカイン及び関連する生体分子の骨格筋、血中における濃

度変化を調べた。

(3)(2)で得られたマイオカインについて、リコンビナントタンパクと特異抗体を用いて STZ 糖尿病における機能を調べた。

具体的には、STZ 糖尿病マウスで増加し、DN-AMPK Tg マウスで低下するマイオカインの抗体を、STZ 糖尿病を発症した対照マウスに浸透圧ポンプを用いて慢性的に投与した。また、STZ を投与した DN-AMPK Tg マウスにそのリコンビナントタンパクを投与した。これに対して、反対に STZ 糖尿病マウスで低下し、DN-AMPK で増加するマイオカインについては、STZ 糖尿病マウスにリコンビナントタンパクを慢性的に投与し、DN-AMPK Tg マウスには抗体を投与した。

(4) アディポカインについても、STZ 糖尿病と DN-AMPK Tg マウスにおいて、血中濃度が変化するものを探索し、(3)の実験を行った。

#### 4. 研究成果

(1) C2C12 骨格筋細胞株に、持続活性型 AMPK、または AMPK に対する shRNA を恒常的に発現させ、cDNA アレイ解析を行った。その結果、マイオカインとして知られる IL-6 が STZ 糖尿病で増加し、DN-AMPK Tg マウスでは低下していた。その他、いくつかのマイオカインの発現量も変化していた。

(2) IL-6 の骨格筋と血中濃度の変化を調べたところ、STZ 糖尿病マウスにおいて IL-6 の骨格筋でのタンパク量、血中濃度が共に増加した。反対に、DN-AMPK Tg マウスでは血中濃度が低下した。骨格筋の転写補因子である PGC1 $\alpha$  の活性は AMPK によって制御される。そこで PGC1 $\alpha$  によって発現・分泌が制御されるマイオカイン、irisin について調べた。その結果、血中 irisin 濃度も STZ 糖尿病マウスにおいて増加、DN-AMPK Tg マウスでは低下していた。IGF1(insulin-like growth factor 1)は、IL-6 や irisin とは反対に STZ 糖尿病マウスにおいて血中濃度が低下、DN-AMPK Tg マウスでは正常化していた。myostatin は、この遺伝子をノックアウトすると骨格筋量が著しく増加すること知られている。そこで myostatin のタンパク発現量が調べたが、STZ 糖尿病では変化していなかった。

IL-6 は、骨格筋以外にも様々な組織、細胞に発現する。そこで、各組織での発現を調べた。褐色脂肪組織では、骨格筋と同程度に IL-6 が発現していたが、STZ 投与によって変化していなかった。白色脂肪組織、脾臓ではほとんど発現していなかった。このことから、STZ 糖尿病では骨格筋において IL-6 の発現・分泌が増加し、その結果、血中濃度が増加すると考えられる。

(3) STZ 糖尿病マウスにおいて血中 IL-6 濃度が増加したことから、浸透圧ポンプを用いて IL-6 抗体を慢性的に投与した。その結果、STZ 糖尿病マウスにおける高血中脂肪酸、ケ

トン体血症が正常化し、血糖値も有意に低下した。また、骨格筋、脂肪組織重量、体重も有意に回復した。これとは反対に、DN-AMPK Tg マウスに IL-6 リコンビナントタンパクを投与すると、正常化していた血中脂肪酸、ケトン体が上昇し、血糖値も STZ 糖尿病と同程度に上昇した。組織重量、体重も低下した。

IL-6 は骨格筋 AMPK を活性化することが知られている。そこで、骨格筋 AMPK 活性を調べた。その結果、STZ 糖尿病マウスに IL-6 抗体を投与すると、骨格筋 AMPK 活性が低下することを見出した。以上の実験結果から、STZ 糖尿病マウスでは、骨格筋から IL-6 が分泌され、これが骨格筋の AMPK 活性をさらに上昇させ、骨格筋での蛋白合成を抑制する。また、irisin と共に脂肪組織に作用して白色脂肪組織の褐色化を誘導し、脂肪組織の萎縮を引き起こすと考えられる。

(4) STZ 糖尿病では脂肪組織が萎縮することから、レプチンの発現・分泌も低下する。そこで、DN-AMPK Tg マウスにおいて血中レプチン濃度が変化するかどうかを調べた。その結果、DN-AMPK Tg マウスでは血中レプチン濃度が有意に上昇することが分かった。レプチンは、STZ 糖尿病の代謝異常を改善することが知られている。それ故、レプチンの濃度上昇が、DN-AMPK Tg マウスにおいて代謝異常が回復する原因の一つと考えられる。アディポネクチンは、STZ 糖尿病マウスでは変化していなかったが、DN-AMPK Tg マウスでは有意に増加していた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Inagaki-Ohara K, Okamoto S, Takagi K, Saito K, Arita S, Tang L, Hori T, Kataoka H, Matsumoto S, Minokoshi Y. Leptin receptor signaling is required for high-fat diet-induced atrophic gastritis in mice. *Nutrition & Metabolism*. 13: 7, 2016.

DOI: 10.1186/s12986-016-0066-1. 査読有

Hirono S, Lee EY, Kuribayashi S, Fukuda T, Saeki N, Minokoshi Y, Iwanaga T, Miki T. Importance of adult Dmbx1 in long-lasting orexigenic effect of agouti-related peptide. 157: 245-257, 2016. 査読有

DOI: 10.1210/en.2015-1560

Tang L, Okamoto S, Shiuchi T, Toda C, Takagi K, Sato T, Saito K, Yokota S, Minokoshi Y. Sympathetic nerve activity maintains an anti-inflammatory state in adipose tissue in male mice by inhibiting TNF- $\alpha$  gene expression in macrophages. *Endocrinology* 156: 3680-3694, 2015.

DOI: 10.1210/EN.2015-1096. 査読有

[学会発表](計9件)

Yokota S, Minokoshi Y. Involvement of myokines in metabolic abnormalities of streptozotocin-induced diabetes. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2017年3月28日~2017年3月30日, Actocity Hamamatsu (Shizuoka・Hamamatsu)

Minokoshi Y. Involvement of myokines in metabolic abnormalities of streptozotocin-induced diabetes. Novo Nordisk Diabetes Innovation Summit. 2016年11月29日~2016年11月30日, Shiran Kaikan Kyoto University (Kyoto・Kyoto)

横田繁史, 箕越靖彦. ストレプトゾトシン誘導型糖尿病の代謝異常に及ぼすマイオカインの調節作用. 第37回日本肥満学会. 2016年10月7日~2016年10月8日, 東京ファッションタウン(東京・江東区)

横田繁史, 箕越靖彦. ストレプトゾトシン誘導型糖尿病の代謝異常に及ぼす骨格筋AMPKの調節作用. 生理学研究所研究会. 2016年9月10日~2016年9月11日, 生理学研究所(愛知・岡崎)

箕越靖彦. AMPKによるエネルギー代謝調節機構. 第6回糖尿病トランレーショナルリサーチ研究会. 2016年7月1日~2016年7月1日, 弘前プラザホテル(青森・弘前)

箕越靖彦. 視床下部によるエネルギー代謝調節機構. The 9th Diabetes Masters Conference. 2015年12月19日~2015年12月19日, 弘前プラザホテル(青森・弘前)

横田繁史, 岡本土毅, 箕越靖彦. ストレプトゾトシン(STZ)糖尿病による骨格筋および白色脂肪組織の委縮を引き起こすメカニズム. 第36回日本肥満学会. 2015年10月2日~2015年10月3日, 名古屋国際会議場(愛知・名古屋)

箕越靖彦. 視床下部におけるエネルギー代謝調節機構. 第36回日本肥満学会. 2015年9月5日~2015年9月5日, 泉ガーデンカンファレンスセンター(東京・港区)

箕越靖彦. メトホルミンの代謝調節作用: AMPKとAMPK非依存性調節機構に関する最近の知見. Diabetes Expert Meeting. 2015年7月9日~2015年7月11日, 柳川藩主立花邸御花(福岡・柳川)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞内 $\alpha$ -メチルグルコシド(AMG)の定量方法

発明者: 箕越靖彦、齊藤久美子

権利者: 自然科学研究機構

種類: 特許

番号: 特願 2017-093141

出願年月日: 2017年5月9日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

<http://www.nips.ac.jp/research/group/post-16/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

箕越 靖彦(MINOKOSHI, Yasuhiko)  
生理学研究所・生体機能調節研究領域・教授

研究者番号: 10200099

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

岡本 士毅(OKAMOTO, Shiki)  
琉球大学・医学研究科・特命講師  
研究者番号: 40342919

横田 繁史(YOKOTA, Shigefumi)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・NIPS リサーチフェロー

研究者番号: 50725281

### (4) 研究協力者

齊藤 久美子(SAITO, Kumiko)  
生理学研究所・技術課・係長