

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18859

研究課題名(和文) インスリン抵抗性改善を目指したDGK による筋分化促進機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanisms of myogenesis by diacylglycerol kinase delta for improvement of insulin resistance

研究代表者

堺 弘道 (Hiromichi, Sakai)

島根大学・総合科学研究支援センター・助教

研究者番号：00375255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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) は骨格筋においてグルコースの取り込みを正に制御するが、2型糖尿病のインスリン抵抗性改善のためには、2型糖尿病患者で減少する骨格筋量を増加させ、グルコース取り込み量を増加させることが重要である。本研究により、DGK は、プロテインキナーゼCの活性を減少させ、cyclin D1の発現抑制に関わることで、筋分化を正に制御することを明らかにした。さらに、DGK の発現はミリスチン酸により増加するが、この発現増加は、グルコースの取り込みを正に制御することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Diacylglycerol kinase (DGK) regulates positively glucose uptake in skeletal muscle. To improve the insulin resistance of type II diabetes mellitus, it is important to increase the skeletal muscle mass, which is reduced by diabetes, and glucose uptake in skeletal muscle. In this study, we revealed that DGK decreases the activity of protein kinase C and involves in the reduction of cyclin D1 expression during C2C12 myogenesis. Moreover, we found that the upregulation of DGK expression by myristic acid is associated with the increase of glucose uptake in C2C12 myotubes.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ジアシルグリセロールキナーゼ 2型糖尿病 筋分化 サイクリンD1 プロテインキナーゼC 脂肪酸
グルコース

1. 研究開始当初の背景

ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)はジアシルグリセロール(DG)をリン酸化してホスファチジン酸(PA)を産生する酵素である。現在までに、DGKはI-Vの5つのサブタイプに分類される10種類のisozyme($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \eta, \kappa, \epsilon, \zeta, \iota, \theta$)が同定されている。DGKの基質DGとその産生物PAは共に細胞内シグナリングのためのセカンドメッセンジャーであることから、DGKはこれら二つのメッセンジャーを代謝・制御する“key enzyme”であり、極めて重要な生理的役割を担っていると考えられてきた。実際に、最近、これらのDGK isozymeが細胞増殖・分化や糖代謝などの多彩な生理現象に関わること、そして、癌や2型糖尿病などの難治性病態形成に決定的な役割を果たすことが明らかになっている。申請者のグループは、以前より各DGK isozymeの生理機能についての解明を試みてきた。そして、2型糖尿病患者の骨格筋でのDGK δ の発現半減が本症を増悪化(インスリン抵抗性の増加)させることから、DGK δ は筋細胞におけるグルコースの取り込みを正に制御することを示した(引用文献1,2)。一方で、DGK δ の欠損マウスは生誕時にまぶたがなく、肺や皮膚の形態にも異常が見られたことから、DGK δ は上皮系細胞の分化も正に制御することも明らかにした(引用文献3)。これらの知見から、申請者らは、DGK δ は骨格筋における糖の取り込みを制御するだけでなく、発現細胞の分化、つまり、骨格筋においては筋細胞の分化をも制御すると推測した。さらに、申請者らは、2型糖尿病患者の骨格筋で減少するDGK δ の発現を増加させる栄養因子の探索研究の中で、飽和脂肪酸の一つであるミリスチン酸(14:0)がDGK δ の発現を転写レベルで増加させることを見出した(引用文献4)。

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。2型糖尿病患者における骨格筋量の減少はインスリン抵抗性を増加させることから、2型糖尿病患者で減少する骨格筋量を増加させ、筋量の増加に伴うグルコース取り込み量を増加させることが重要である。DGK δ は筋細胞におけるグルコースの取り込みを正に制御し、筋分化をも制御すると推測される。従って、骨格筋中のDGK δ の発現量を増加させることができれば、2型糖尿病患者で減少する骨格筋量の増加とその筋量増加に伴うグルコース取り込み量の増加が期待できる。

2. 研究の目的

本研究課題では以下の二点について研究を遂行し、研究成果を得た。

目的：ミリスチン酸によるDGK δ 発現制御と筋細胞におけるグルコース取り込み能との関連性

2型糖尿病患者の骨格筋におけるDGK δ の発現半減は本症増悪化を引き起こす。従って、骨格筋におけるDGK δ の発現量を増加させ、グルコースの取り込み能を高めることが2型糖尿病の治療法の開発には重要である。従って細胞レベルで、ミリスチン酸によるDGK δ の発現量の増加がグルコースの取り込みと関連するのかを明らかにする。

目的：DGK δ による筋分化制御機構

2型糖尿病患者において減少する骨格筋量を増加させることは、筋量の増加に伴うグルコース取り込み量を増加させる上で重要である。従って、筋分化に関与すると考えられるDGK δ の筋分化制御機構を明らかにする。

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、0.1%ウシ胎児血清及び5 μ g/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)DGK δ の発現抑制 エレクトロポレーション法を用いてDGK δ 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、その後、DMに置換し分化誘導した。

(3)ミリスチン酸添加によるDGK δ の発現解析とグルコースの取り込み評価

C2C12筋管細胞にミリスチン酸を24時間添加し、DGK δ の発現量の変化を調べた。また、このときのグルコースの細胞内への取り込みは、2-NBDGを用いて評価した。

4. 研究成果

< ミリスチン酸によるDGK δ 発現制御と筋細胞におけるグルコース取り込み能との関連性 >

1. ミリスチン酸添加時のC2C12筋管細胞へのグルコース取り込み量の変化

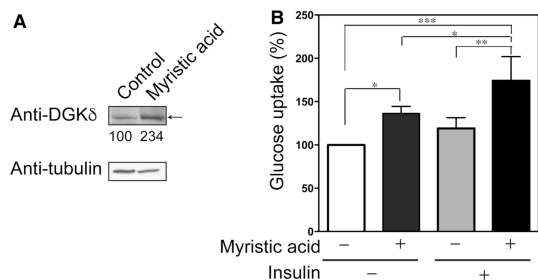


図1 ミリスチン酸添加(0.5 mM)時のDGK δ の発現変化(A)とグルコース取り込み量への影響(B)

マウスC2C12筋管細胞へのミリスチン酸添加は、DGK δ の発現を増加させる(引用文献4, 図1A)。このとき、C2C12筋管細胞へのグルコース取り込み量を調べたところ、ミリスチン酸処理によりグルコースの取り込み量が増加することがわかった(図1B)。この取り込み量の増加の割合はインスリン刺激した場合と同程度であったことから(図1B)、

ミリスチン酸はインスリン非依存的にグルコースの取り込み能を増加させることが推測された。

2. ミリスチン酸添加時の DGK δ の発現増加とグルコース取り込み量増加との関連性

グルコースの取り込み量の増加がミリスチン酸によって発現増加した DGK δ によって制御されているのか否かを確認するために、DGK δ 特異的 siRNA を用いて DGK δ の発現を抑制した。その結果、ミリスチン酸添加によって増加するグルコースの取り込みが抑制された (図 2)。

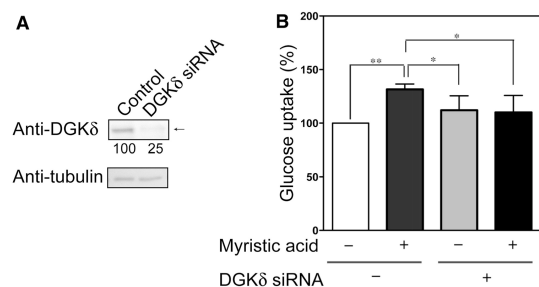


図 2 DGK δ 特異的 siRNA による DGK δ の発現抑制 (A) とミリスチン酸添加 (0.5 mM) 時のグルコース取り込み量への影響 (B)

逆に、DGK δ を安定高発現させた細胞ではグルコースの取り込みがインスリン非依存的に増加することがわかった (図 3)。

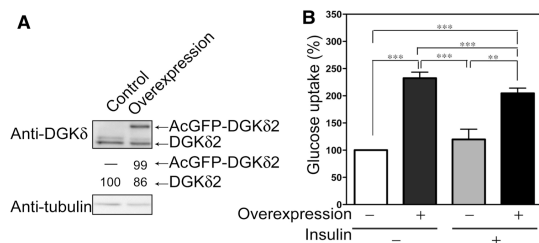


図 3 DGK δ 安定発現時 (A) のグルコースの取り込み量への影響 (B)

以上の結果より、ミリスチン酸による DGK δ の発現増加は、グルコースの取り込み能を増強させることが強く示唆された (雑誌論文 1)。今後は、ミリスチン酸がどのような転写因子を介して DGK δ の発現を制御するのかを明らかにしていくことが、2 型糖尿病患者で減少する DGK δ の発現を増加させるために重要である。

< DGK δ による筋分化促進機構の解明 >

1. C2C12 筋芽細胞の筋分化過程における DGK δ の発現解析

筋分化過程における DGK δ の発現変化はよくわかっていない。そこで、C2C12 筋芽細胞の筋分化過程 (分化誘導 0 ~ 148 時間) における DGK δ の発現パターンを調べ、筋分化マーカーの発現パターンと比較した。その結果、筋形成制御因子 myogenin と細胞周期からの分化移行に關与する cyclin D3 は分化 48 時間後に誘導され、逆に、細胞周期調節因子 cyclin D1 は分化 24 時間後に顕著に減少した。一方で、DGK δ の発現は分化 48 時間後に発現が減

少し、cyclin D1 よりも遅れて発現減少することがわかった。

2. DGK δ の C2C12 筋芽細胞の筋分化における役割

筋分化における DGK δ の役割を解明するために、DGK δ の発現を DGK δ 特異的 siRNA を用いて抑制した。その結果、分化 48 時間後の myogenin の発現が減少し、逆に、cyclin D1 の発現量は増加していた。さらに、筋形成に關わる myosin heavy chain の発現細胞数は半減していたことから、DGK δ は筋分化を正に制御することが示唆された。

3. DGK δ による筋分化誘導メカニズムの検討

DGK の基質 DG は conventional/novel protein kinase C (cnPKC) を活性化し、一方で、代謝物 PA は mammalian target of rapamycin (mTOR) を活性化する。DGK δ による筋分化制御メカニズムを解明するために、DGK δ の発現抑制による PKC 及び mTOR シグナルへの影響を評価した。その結果、分化 48 時間後の PKC α 及び PKC δ の発現量、さらには、cnPKC のリン酸化レベルが DGK δ の発現抑制により増加していた。一方で、mTOR 及び pmTOR (Ser-2448)、pAkt (Ser-473) の発現量には影響しなかった。さらに、分化 24 時間後にも DGK δ の発現抑制により cnPKC のリン酸化レベルが増加していた。このとき、DGK δ の発現抑制は myogenin の発現にほとんど影響しなかったが、cyclin D1 の発現量は増加することがわかった。これらの結果から、DGK δ は PKC 活性を抑制することで、cyclin D1 の発現抑制に關与し、筋分化を誘導することが示された。

本研究により、ミリスチン酸による DGK δ の発現増加は、グルコースの取り込み能を増強させること、そして、DGK δ は cyclin D1 の発現抑制に關与することで、筋分化を誘導することが示された。従って、今後は、骨格筋におけるミリスチン酸による DGK δ 発現増加と骨格筋量の増加 (グルコース取り込み増加) との関連性を明らかにしていくことが 2 型糖尿病患者で減少する骨格筋量の増加を目指す上で重要である。

< 引用文献 >

- Chibalin, A.V., Leng, Y., Vieira, E., et al., Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance., *Cell*, 132, 375-386, 2008.
- Miele, C., Paturzo, F., Teperino, R., et al., Glucose regulates diacylglycerol intracellular levels and protein kinase C activity by modulating diacylglycerol kinase subcellular localization., *J. Biol. Chem.*, 282, 31835-31843, 2007.
- Crotty, T., Cai, J., Sakane, F., et al., Diacylglycerol kinase delta regulates protein

kinase C and epidermal growth factor receptor signaling., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 103, 15485-15490, 2006.

4. Sakiyama, S., Usuki, T., Sakai, H., and Sakane, F., Regulation of diacylglycerol kinase δ expression in C2C12 skeletal muscle cells by free fatty acids., *Lipids*, 49, 633-640, 2014.

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 8件)

1. Wada, Y., Sakiyama, S., Sakai, H., and Sakane, F., Myristic Acid Enhances Diacylglycerol Kinase δ -Dependent Glucose Uptake in Myotubes., *Lipids*, 51, 897-903, 2016. doi: 10.1007/s11745-016-4162-9. 査読有り

[学会発表](計 9件)

1. 堺弘道, 松本健一, 坂根郁夫 第59回日本脂質生化学会, 京都大学百周年時計台記念館(京都), 2017年6月16日「ジアシルグリセロールキナーゼ δ はC2C12筋芽細胞の筋分化誘導のためにcyclin D1の発現を制御する」
2. 堺弘道, 松本健一, 坂根郁夫 第58回日本生化学会, にぎわい交流館 AU(秋田), 2016年6月10日「C2C12筋芽細胞の筋分化におけるジアシルグリセロールキナーゼ δ の機能」
3. 和田祐子, 堺弘道, 崎山静花, 坂根郁夫 第87回日本生化学会, 神戸ポートアイランド(神戸), 2015年12月1日「ミリスチン酸は筋管細胞のジアシルグリセロールキナーゼ δ の発現とグルコース取り込み能を亢進する」

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堺 弘道 (SAKAI HIROMICHI)

島根大学・総合科学研究支援センター・助教
研究者番号: 00375255

(4)研究協力者

坂根 郁夫 (SAKANE FUMIO)

千葉大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 10183815