

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：84305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19549

研究課題名(和文) ストレプトゾトシン糖尿病における骨格筋AMPKの代謝調節作用と病態生理的意義

研究課題名(英文) The metabolic effect and pathophysiological role of skeletal muscle AMPK in streptozotocin-induced diabetic mice

研究代表者

横田 繁史 (Yokota, Shigefumi)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・内分泌代謝高血圧研究部・研究員

研究者番号：50725281

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：AMPキナーゼ(AMPK)は、細胞内エネルギー枯渇を感知して活性化するリン酸化酵素であり、近年では、肥満・糖尿病などの代謝分野において注目されている。応募者は、STZを投与したマウスの骨格筋でAMPKが活性化することを見出した。骨格筋選択的AMPK不活性型マウス(DN-AMPK Tg)マウスにSTZを投与するとインスリン依存性糖尿病による代謝異常が改善することを見出した。これには、IL-6、myonectin、leptinなどが骨格筋AMPK活性化に依存して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. It was observed that found that streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice activated AMPK in skeletal muscle. Skeletal muscle-specific dominant negative AMPK-expressing transgenic mice (DN-AMPK Tg mice) suppressed metabolic abnormalities in STZ-induced insulin-deficient diabetes. The study revealed that IL-6, myonectin, leptin and etc affect metabolic abnormalities of STZ-induced diabetes.

研究分野：代謝・内分泌学

キーワード：AMPK streptozotocin 臓器連関 myokine IL-6 myonectin leptin

1. 研究開始当初の背景

AMPK (AMP-activated protein kinase) は、細胞内アデノシンモノリン酸 (AMP) 濃度上昇によって活性化するセリン/スレオニンリン酸化酵素である。細胞内エネルギー飢餓によって AMPK が活性化すると、脂肪酸酸化、ミトコンドリア合成および糖の取込みなどの異化作用を促進し、タンパク質合成や糖新生などの同化作用を抑制して、細胞内のエネルギー状態を保持するように働く。このことから、AMPK は細胞内エネルギー代謝の“マスター酵素”の一つとして考えられるようになった。

最近、糖尿病治療薬であるメトフォルミン、アディポサイトカインであるレプチンやアディポネクチンが AMPK を活性化することで肥満・糖尿病の改善に関わることが明らかになった。さらに、視床下部の AMPK が摂食行動や食物嗜好性などに関わることも明らかになった。このように、AMPK は、細胞内に留まらず、全身のエネルギー代謝調節を営む調節酵素として知られるようになった。

インスリン抵抗性を伴った肥満・2型糖尿病において、AMPK は、末梢組織において活性が低下、または不活性化が起こる。これは、肥満に伴う脂肪組織の炎症が末梢組織の AMPK を不活性化していることがわかっている。上述したように、メトフォルミンやレプチン、アディポネクチンといった AMPK 活性化剤および活性化生体分子により末梢組織の AMPK を活性化することが、2型糖尿病の治療に役立つと考えられている。しかし、インスリン欠乏による糖尿病である1型糖尿病において、AMPK の代謝調節作用や病態生理学的な役割については明らかではなかった。

インスリン欠乏型糖尿病(1型糖尿病)は、骨格筋、脂肪組織、肝臓などの末梢組織で糖の利用が抑制される。また、脂肪組織では脂肪合成を抑制し、脂肪分解が促進する。脂肪分解によってできた脂肪酸は血中を通じて肝臓へ供給される。また、骨格筋ではタンパク質分解が促進し、分解によりできたアミノ酸は血中を通じて肝臓へ供給される(グルコースアラニン回路)。肝臓へ供給されたアミノ酸や脂肪酸は糖新生やケトン体合成の基質となり、結果的に高血糖、高ケトン体血症となる。

そこで、申請者は末梢組織において、糖の利用が抑制されエネルギー飢餓状態になったインスリン欠乏型糖尿病の骨格筋で AMPK が活性化するのではないかと予想した。実際、膵β細胞を選択的に破壊する試薬であるストレプトゾトシン(STZ)を投与したインスリン欠乏型糖尿病マウス(STZ糖尿病マウス)の骨格筋で AMPK が活性化することを見出した。AMPK の下流シグナルである脂肪酸酸化シグナルを活性化する一方で、タンパク質合成を抑制、タンパク質分

解メカニズムの一つであるオートファージシグナルは亢進していた。これは、上述したように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が促進することにより、インスリン欠乏型糖尿病での代謝適応に寄与するものと考えられる。

そこで、骨格筋 AMPK が、インスリン欠乏型糖尿病にどのような代謝調節作用を営んでいるかを明らかにするために、骨格筋選択的に dominant negative AMPK を発現した AMPK 不活性型マウス(DN-AMPK Tg マウス)に、STZ を投与したところ、骨格筋での脂肪酸酸化シグナル、オートファージシグナルが抑制され、タンパク質合成シグナルの抑制が解消された。驚いたことに、血中インスリン濃度が低値なものにも関わらず、STZ 糖尿病による高脂肪酸血症、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カ月以内に生存していた(STZ 投与野生型マウスは2週間以内に全て死亡した)。また、脂肪組織重量の増加に伴って、レプチンやアディポネクチンが増加していた。さらに、STZ 糖尿病マウスだけではなく自然発症1型糖尿病(NOD)マウスに、AMPK 阻害剤の Compound C を浸透圧ポンプを用いて慢性的に投与すると、STZ DN-AMPK Tg マウスと同様、STZ 糖尿病による代謝異常が改善した。

STZ DN-AMPK Tg マウスの脂肪組織重量が改善する原因を調べるために、骨格筋から分泌され脂肪組織に作用し、脂肪分解や脂肪の利用を促進する IL-6 や irisin について調べた。その結果、STZ 糖尿病マウスの骨格筋において IL-6 および irisin の前駆体である FNDC5(fibronectin type III domain containing 5) の発現が上昇し、血中濃度も増加した。そこで、STZ 糖尿病マウスに IL-6 の中和抗体を浸透圧ポンプで慢性的に投与すると、STZ DN-AMPK Tg マウス同様、インスリン濃度は低値のままだが、糖尿病による高血糖や高ケトン体血症が改善し、各組織重量も部分的に回復、死亡率も顕著に改善した。今まで、インスリン欠乏型糖尿病は、低インスリン血症で全て説明されてきたが、本研究は予想に反し、骨格筋 AMPK が活性化することが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

本研究では、STZ 糖尿病の代謝異常の一部が、インスリン欠乏だけでなく、骨格筋を始めとする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、骨格筋選択的に AMPK 活性を抑制したマウスにおいて STZ 糖尿病の代謝異常が改善するメカニズムを個体レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) STZ 野生型マウスの骨格筋で IL-6 のタンパク質発現が上昇し、STZ DN-AMPK Tg マウスで低下していた。IL-6 は、骨格筋以外の様々な組織で発現している。そこで、骨格筋以外の各組織で IL-6 のタンパク質発現を測定した。STZ 糖尿病マウスに IL-6 中和抗体を投与すると代謝が改善していたことから、反対に、STZ DN-AMPK Tg マウスに IL-6 リコンビナントタンパクを投与して代謝が再び増悪するかを調べた。

(2) STZ DN-AMPK Tg マウスで血中レプチン濃度が増加していたことから、STZ DN-AMPK マウスにレプチン抗体を投与して代謝が再び増悪するかを調べた。

(3) 新たな骨格筋から分泌される因子(マイオネクチン)であるマイオネクチン(myonectin)について、STZ 糖尿病マウス、STZ DN-AMPK Tg マウスにおいて、どのような代謝調節作用を営むかを調べた。さらに、それぞれのマウスにマイオネクチンのリコンビナントタンパク、抗体を慢性的に投与して代謝がどのように変化するかを調べた。

(4) STZ 野生型マウスおよび STZ DN-AMPK Tg マウスにおいて、関連する生体分子の血中濃度について検討した。

4. 研究成果

(1) IL-6 のタンパク質発現を測定したところ、褐色脂肪組織において、野生型マウスと同程度発現していたが、STZ の投与で変化はなかった。その他、白色脂肪組織である鼠径部脂肪組織および精巢上体脂肪組織、肝臓、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 の発現および分泌が増加し、血中濃度が増加したと考えられる。STZ DN-AMPK Tg マウスに IL-6 リコンビナントタンパクを慢性的に投与する実験では、正常化していた血中脂肪酸、血中ケトン体が上昇し、血糖値も STZ 糖尿病マウスと同程度に上昇していた。組織重量、体重も低下していた。IL-6 抗体実験の結果とともに考察すると、STZ 糖尿病による代謝増悪には骨格筋から分泌する IL-6 が STZ 糖尿病の代謝増悪を引き起こすことを示唆する。

(2) STZ 糖尿病では、脂肪組織の萎縮に伴って、レプチンの分泌は低下する。そこで、STZ DN-AMPK Tg マウスにおいて血中レプチン濃度が変化するかを調べた。その結果、STZ DN-AMPK Tg マウスでは、血中レプチン濃度が有意に上昇していた。STZ 糖尿病マウスにレプチンを補充すると代謝が改善することが報告されており、申請者も確認している。その反対に、STZ DN-AMPK Tg マウスにレプチン抗体を慢性投与すると、正常化していた血中脂肪酸、血中ケトン体ともに上昇し、血糖値も STZ 糖尿病マウスと同程度に上昇していた。このことから、血中レプチン濃度の上昇が、STZ DN-AMPK Tg マウスにおいて

代謝異常が改善する原因の一つと考えられる。同じアディポカインであるアディポネクチンは、STZ 糖尿病マウスでは変化なかったが、STZ DN-AMPK Tg マウスでは上昇していた。

(3) マイオネクチンは、IL-6 と同様に骨格筋から分泌されるマイオカインである。マイオネクチンの発現は骨格筋に選択的である。最近、マイオネクチンは血中脂肪酸を脂肪組織や肝臓において取り込みを促進することが報告された(JBC 2012, Adipocyte 2012)。実際に、血中マイオネクチン濃度を測定したところ、IL-6 とは反対に、STZ 糖尿病マウスで低下し、STZ DN-AMPK Tg マウスでは回復していた。STZ DN-AMPK Tg マウスにマイオネクチンの抗体を慢性投与したところ、正常化していた血中脂肪酸、血中ケトン体ともに上昇し、血糖値も STZ 糖尿病マウスと同程度まで上昇していた。その反対に、STZ 糖尿病マウスに、リコンビナントタンパクを慢性投与すると、増悪していた血中脂肪酸、血中ケトン体は正常化した。このことから、血中マイオネクチン濃度の上昇が、STZ DN-AMPK Tg マウスにおいて血中脂肪酸が改善し、レプチン同様に代謝が改善した原因の一つではないかと考えられる。

(4) 申請者は上記に上げた生体分子以外にも、関連する分子について検討した。代謝調節や骨格筋肥大化に関わる因子である IGF-1 (insulin-like growth factor 1) は、レプチンやマイオネクチン同様に STZ 糖尿病で低下し、STZ DN-AMPK Tg マウスで正常化していた。マイオスタチン(myostatin)は、この遺伝子をノックアウトすると骨格筋量が顕著に増加することが知られている。そこで、血中濃度を測定したが、STZ 糖尿病マウスでは変化していなかった。がんによるカヘキシアのマーカーである IL-1 β も、STZ 野生型マウスで上昇し、DN-AMPK マウスで低下していた。

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 2 件)

1. Okamoto S, Yokota S, Minokoshi Y et al (他22名、16番目)
Activation of AMPK-Regulated CRH Neurons in the PVH is Sufficient and Necessary to Induce Dietary Preference for Carbohydrate over Fat.
Cell Rep 2018, 22:706-721. 査読有り
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.102
2. Coutinho EA, Yokota S, Minokoshi Y et al (他12名、4番目)
Activation of SF1 Neurons in the Ventromedial Hypothalamus by DREADD Technology Increases Insulin Sensitivity in Peripheral Tissues.

Diabetes 66: 2372-2386, 2017. 査読有り
DOI: 10.2337/db16-1344

〔学会発表〕(計 4 件)

1. **横田繁史**, 増田慎也, 田中将志, 山陰一, 村中和哉, 井上隆之, 北野隆司, 真田樹義, 石井好二郎, 日下部徹, 島津章, 浅原哲子 肥満症患者の糖代謝機能・骨格筋量制御における筋肉由来液性因子・myostatinの病態意義 第38回日本肥満学会, 大阪, 2017年10月
2. **横田繁史**, 箕越靖彦 Role of myokines in metabolic abnormalities of streptozotocin-induced diabetes. 第91回日本生理学会, 静岡, 2017年3月
3. **横田繁史**, 箕越靖彦 Role of myokines in metabolic abnormalities of streptozotocin-induced diabetes 第37回日本肥満学会, 東京, 2016年10月
4. **横田繁史**, 箕越靖彦 ストレプトゾト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, 愛知・岡崎 2016年9月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 繁史 (YOKOTA, Shigefumi)
国立病院機構 京都医療センター
臨床研究センター
内分泌代謝高血圧研究部研究員
研究者番号: 50725281

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし