

氏 名 横田 繁史

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1615 号

学位授与の日付 平成25年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Suppression of AMP kinase activity in skeletal muscle improves  
metabolic abnormalities of streptozotocin-induced  
insulin-deficient diabetes mellitus in mice.

論文審査委員 主 査 教授 富永 真琴  
教授 箕越 靖彦  
教授 深田 正紀  
教授 片桐 秀樹 東北大学

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is caused by a consequence of pancreatic  $\beta$ -cell destruction leading to insulin deficiency, a defect that causes hyperglycemia, ketoacidosis, high plasma fatty acid level and cachexia. Cachexia includes atrophy of white adipose tissue and skeletal muscle, leading to a deadly condition. At present, insulin is only assumed to reverse this lethal catabolic syndrome. However, even with insulin therapy, patients with T1DM suffer secondary complications such as heart disease, nephropathy and hypertension. Furthermore, long-term insulin treatment underlies the increased ectopic lipid deposition in nonadipose tissues and incidence of coronary artery disease in more than 90% of the T1DM patients after the age of 55 years, probably because of the insulin's lipogenic and cholesterogenic actions. Moreover, intensive insulin therapy significantly increases risk for hypoglycemia, an event that is disabling and can even be fatal. Thus, despite the profound diabetes-improving and life-saving effects of insulin therapies, additional T1DM therapies are required.

AMPK (AMP-activated protein kinase) is a serine/threonine kinase activated in response to increasing intracellular (AMP and ADP)/ATP ratio. AMPK is a heterotrimeric complex comprising of a catalytic  $\alpha$ -subunit and regulatory  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits. Activation of AMPK promotes catabolic processes producing ATP, such as mitochondrial biogenesis, fatty acid oxidation and glucose utilization, and it inhibits anabolic pathways consuming ATP such as protein synthesis. AMPK has been shown to stimulate fatty acid oxidation via direct phosphorylation (Ser79) of acetyl-CoA carboxylase (ACC) and suppression of its activity. Suppression of ACC activity decreases production of malonyl-CoA, an allosteric inhibitor of carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) that transports free fatty acids from cytosol to mitochondrion, leading to fatty acid oxidation. AMPK also activates PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ), a transcription co-factor for mitochondrion-related gene expressions, via nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) and SIRT1 (sirtuin-1: a NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase)-dependent pathway. Moreover, AMPK inhibits protein synthesis via directly phosphorylating TSC2 (tuberous sclerosis protein 2) and thereby inhibiting mTOR (mammalian target of rapamycin) and S6K (p70 S6 kinase) signaling pathway. Furthermore, AMPK directly phosphorylates ULK1 (unc-51-like kinase 1), and increases the expression of LC3-II (microtubule-associated protein light chain 3-II), an executive factor of autophagy, and induces autophagy.

In the present study, the author explored the role of AMPK in skeletal muscle in metabolic changes in STZ-induced insulin-deficient diabetes mellitus (IDDM) in mice. The author speculated that insulin deficiency and decreased glucose utilization in skeletal muscle activates AMPK in the tissue. Activated AMPK may promote the

catabolic process in skeletal muscle in STZ-induced IDDM by stimulating suppression of protein synthesis and enhancing proteolysis in the tissue. Furthermore, activation of AMPK contributes to fatty acid oxidation in skeletal muscle in STZ-induced IDDM. The author found that STZ-induced IDDM activates AMPK and its signaling pathways in skeletal muscle. Surprisingly, inhibition of AMPK activation in skeletal muscle in STZ-induced IDDM by expressing dominant-negative AMPK (DN-AMPK) in the tissue preferentially, improved metabolic changes in STZ-induced IDDM mice; STZ-treated DN-AMPK expressing mice significantly improved hyperglycemia and decreased plasma concentrations of free fatty acids, ketone bodies, and gluconeogenic hormones such as epinephrine, norepinephrine and corticosterone, although plasma insulin level remains low. Moreover, STZ-treated DN-AMPK expressing mice increased amount of adipose tissues, skeletal muscle, and body weight, and increased survival rate. STZ-treated DN-AMPK expressing mice also recovered plasma concentration of leptin that stimulates glucose utilization in muscle and reverses the impaired whole body glucose metabolism in STZ-induced as well as spontaneously occurred IDDM. STZ-induced IDDM mice increased UCP1 (uncoupling protein 1) expression and decreased expression of lipogenic enzymes in WAT. However those returned to the control levels in STZ-treated DN-AMPK expressing mice.

To explore the mechanism by which suppression of AMPK activation in skeletal muscle improved "lipoatrophy" in STZ-induced IDDM, The author examined the expression of myokines that affect adipocyte metabolism. Interleukin-6 (IL-6) is released from skeletal muscle and stimulates lipolysis in adipose tissue. A novel myokine, irisin, induces the expression of thermogenic protein UCP1 in white adipocytes. The author found that both IL-6 and irisin increased the expression in skeletal muscle and plasma concentration in STZ-induced IDDM mice, and those are returned to the control levels in DN-AMPK expressing mice. Moreover, infusion by osmotic minipump of leptin or neutral antibody for IL-6 improved the metabolic changes in STZ-induced IDDM mice, similar to those in STZ-treated DN-AMPK expressing mice. These results thus unveil a key role for muscle AMPK in metabolic abnormalities in STZ-induced IDDM, and important role of organ networks in whole body metabolic regulation.

本論文は、インスリン欠乏型糖尿病の代謝異常には筋肉のAMP-activated protein kinase (AMPK)が重要な役割を担い、臓器間ネットワークが重要であることを明らかにしたものである。

横田繁史君は、インスリン欠乏型糖尿病における筋肉のAMPKの役割を明らかにする目的で、ストレプトゾトシン(STZ)誘導性糖尿病マウスの代謝変化に及ぼす骨格筋AMPKの役割について調べた。STZ誘導性糖尿病マウスは、骨格筋においてAMPKが活性化し、その下流のacetyl-CoA carboxylaseのリン酸化も上昇していた。また、nicotinamide phosphoribosyltransferaseやsirtuin-1の発現も上昇し、peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ も活性化していた。さらに、tuberous sclerosis protein 2におけるリン酸化の上昇およびmTOR (mammalian target of rapamycin)シグナルの抑制も起こっていた。そのうえ、セリン・スレオニンキナーゼのunc-51-like kinase 1のリン酸化および酵母Atg8の哺乳類ホモログの1つであるLC3 (microtubule-associated protein light chain 3)にオートファジーが誘導されてできたLC3-IIの発現も上昇していた。このように、横田君はSTZ誘導性糖尿病マウスの骨格筋において、AMPK活性化に伴う脂肪酸酸化、ミトコンドリア関連遺伝子の発現上昇、タンパク質合成の抑制、およびオートファジーの各シグナルが活性化していることを見いだした。

横田君はまた、骨格筋選択的dominant negative-AMPK発現マウス(DN-AMPK)にSTZを投与してインスリン欠乏型糖尿病を引き起こすと、血中インスリン値は低値であるにも関わらず、糖尿病による高血糖、高脂肪酸血症、高ケトン体血症が改善し、ノルエピネフリン、エピネフリン、コルチコステロンなどの糖新生促進ホルモンの血中濃度も低下することを発見した。さらに、STZ投与DN-AMPK発現マウスは、グルコース負荷試験、脂質負荷試験およびピルビン酸負荷試験において、インスリンが低値であるにもかかわらず、グルコース及び脂質代謝が改善していた。加えて、STZ投与DN-AMPK発現マウスは、骨格筋および脂肪組織重量が増加して、体重減少が有意に抑制され、生存率も増加した。また、脂肪組織重量の増加に伴い、筋肉での糖利用を促進する脂肪組織ホルモン・レプチンの血中濃度も回復していた。STZ誘導性糖尿病マウスは、白色脂肪組織で脂肪利用を促進する熱産生蛋白質uncoupling protein 1 (UCP1)の発現が上昇し、脂肪合成関連遺伝子の発現が減少していたが、STZ投与DN-AMPK発現マウスでは正常レベルであった。

横田君は、骨格筋AMPKの活性化を抑制することによってSTZ誘導性インスリン欠乏型糖尿病における脂肪委縮が改善するメカニズムを調べるために、脂肪細胞に作用する“myokine”の発現を調べた。STZ誘導性糖尿病マウスの骨格筋では、筋肉から分泌され脂肪組織での脂肪分解を促進する“myokine”であるinterleukin-6 (IL-6)、および白色脂肪細胞においてUCP1の発現を誘導する新規“myokine”のirisinの発現が上昇し、血中IL-6およびirisinの量も増加していた。しかし、STZ投与DN-AMPK発現マウスでは正常レベルまで回復していた。さらに、オスモティックポンプを用いてレプチンあるいはIL-6の中和抗体をSTZ誘導性1型糖尿病マウスに2週間投与したところ、血中インスリン値は低値であるにもかかわらず、血糖値および遊離脂肪酸がSTZ投与DN-AMPK発現マウスと同等レベルまで回復していた。骨格筋および脂肪組織重量も回復していた。

以上のように、横田君は、種々の生化学的、分子生物学的手法を用いて、インスリン欠乏型糖尿病の代謝異常には筋肉のAMPKが重要な役割を担っており、インスリン欠乏型糖

尿病の代謝調節には骨格筋・脂肪組織等の臓器間ネットワークが重要であることを証明した。本研究は骨格筋のAMPKのおよび骨格筋・脂肪組織間ネットワークの意義を明らかにした非常に優れた研究であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。