

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09008

研究課題名(和文)慢性低酸素による膵細胞代償機構の破綻メカニズムの解明

研究課題名(英文)Beta-cell decompensation by chronic hypoxia

研究代表者

佐藤 叔史 (SATO, YOSHIFUMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90622598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において、慢性低酸素が膵細胞の代償機構を調節する分子メカニズムについて

検討した。低酸素誘導性の転写抑制因子BHLHE40は膵細胞からのインスリン分泌低下に作用し、膵細胞代償機構の破綻に寄与していた。低酸素誘導性のプロリン水酸化酵素PHD3は低酸素下での膵細胞増殖調節に働いており、膵細胞代償機構に対しては保護的に働いている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン抵抗性が増大すると糖恒常性を維持するために膵細胞量が増加しインスリン分泌を亢進させるような代償機構が働くが、この代償機構が破綻すると糖尿病が発症する。この膵細胞代償機構の破綻の分子機序は未だ不明な点が多い。

研究実施者はBHLHE40とPHD3という分子が膵細胞代償機構において重要な鍵因子であることを見出し、これら分子の作用機序は全く不明である。BHLHE40やPHD3が膵細胞代償機構を調節する分子機序を明らかにできれば、これら因子の活性や発現を調節するような薬剤開発が可能となり膵細胞代償機構を持続させる糖尿病治療法の確立に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we investigated the molecular mechanisms by which chronic hypoxia modulates the compensatory mechanisms of pancreatic β -cells. (1) BHLHE40, a hypoxia-inducible transcriptional repressor, acts to decrease insulin secretion from pancreatic β -cells and contributes to the disruption of the pancreatic β -cell compensatory mechanism. (2) PHD3, a hypoxia-inducible prolyl hydroxylase, regulates pancreatic β -cell proliferation under hypoxia and may be protective against the pancreatic β -cell compensatory mechanism.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 細胞

1. 研究開始当初の背景

肥満や過食によりインスリン抵抗性が増大すると、糖恒常性を維持するために膵細胞量が増加し、インスリン分泌を亢進させるような代償機構が働くが、この代償機構が破綻すると糖尿病が発症する。この膵細胞代償機構の破綻の分子機序は未だ不明な点が多い。

研究実施者は、肥満により肥大化した膵島において「低酸素ストレス」の存在を世界に先駆けて発表し (Sato Y. JBC 2011)、低酸素は膵細胞のインスリン分泌低下、細胞増殖遅延やアポトーシスを引き起こすことを明らかにした (Sato Y. PLOS ONE 2014、Sato Y. JBC 2017)。このことから低酸素ストレスは膵細胞量増加やインスリン分泌亢進といった代償機構を破綻させる要因になっている可能性がある。その後の解析から、研究実施者は肥大化膵島が慢性的な低酸素に曝されていることを見出したが、慢性低酸素がどのような分子メカニズムで膵細胞代償機構の破綻を引き起こしているかは全く不明である。また遺伝子発現解析から慢性的低酸素環境下の膵細胞では BHLHE40 と PHD3 が高発現していることを見出した。BHLHE40 は bHLH ファミリーに属する転写抑制因子であり、PHD3 は酸素感知性プロリン水酸化酵素であり標的蛋白分解を促進する因子である。いずれの遺伝子も様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を担っているが膵細胞における機能は不明である (Sato F. J Cancer 2016、Fong GH. Cell Death Differ. 2008)。

本研究課題により BHLHE40 や PHD3 が膵細胞代償機構を破綻させる詳細な分子機序を明らかにできれば、これら因子の活性や発現を調節するような薬剤開発が可能となり膵細胞代償機構を持続させる糖尿病治療法の確立が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、慢性低酸素が膵細胞の代償機構を破綻させる分子メカニズムを明らかにするため、低酸素における BHLHE40 の発現制御および機能解析、低酸素における PHD3 の発現制御と機能解析、膵細胞代償機構における BHLHE40 および PHD3 の役割について検討を行った。

3. 研究の方法

低酸素における BHLHE40 の発現制御および機能解析

低酸素暴露 MIN6 細胞を用いて BHLHE40 発現の経時的変化を検討した。HIF1 ノックダウン細胞を作製し、低酸素による *Bhlhe40* 遺伝子の発現誘導における HIF1 経路の意義を検討した。*Bhlhe40* を過剰発現あるいはノックダウンした膵細胞株 MIN6 細胞を樹立し、細胞増殖、細胞死、インスリン分泌に対する影響を検討した。*Bhlhe40* 過剰発現細胞で RNA シーケンス解析を行い膵細胞機能に關与しうる複数の BHLHE40 標的遺伝子を同定した。その標的遺伝子に関してプロモーター解析を行い、標的遺伝子の発現制御メカニズムに関して詳細な検討を行った。

低酸素における PHD3 の発現制御と機能解析

低酸素暴露 MIN6 細胞を用いて PHD3 発現の経時的変化を検討した。*Phd3* を過剰発現あるいはノックダウンした膵細胞株 MIN6 細胞を樹立した。低酸素下におけるこれら細胞の増殖能について検討した。PHD3 のプロリン水酸化酵素の活性中心であるヒスチジンをアラニンにした変異体 (H196A) を作製し増殖能への影響を検討した。また膵細胞において低酸素下で PHD3 と相互作用する因子を探索し、その相互作用因子の役割について検討した。

膵細胞代償機構における BHLHE40 および PHD3 の役割

肥満モデルマウス (*ob/ob* マウス) の肥大化膵島において BHLHE40 および PHD3 の有意な発現上昇を認めている。*Bhlhe40* と *Phd3* の膵細胞特異的ノックアウトマウスを作製後、*ob/ob* マウスと交配させ膵細胞代償機構における BHLHE40 および PHD3 の機能解析を行った。体重、糖負荷試験、インスリン負荷試験、インスリン分泌試験など糖代謝に関する解析を実施した。さらに RNA-seq 解析から得られた BHLHE40 の標的因子について検討し、総合的に判断して BHLHE40 および PHD3 の役割を結論付けた。

4. 研究成果

低酸素における BHLHE40 の発現制御および機能解析

Bhlhe40 mRNA および BHLHE40 タンパク質の経時的変化を検討したところ、低酸素暴露後 3~6 時間後から mRNA の発現が上昇し、一方でタンパクレベルは遅れて 12~24 時間に著明に発現増強した。HIF1 ノックダウン細胞において、低酸素による *Bhlhe40* 発現増強がどうなるかを検討したところ HIF1 経路の遮断によって部分的に抑制された。このことから HIF1 の発現制御下にあることが分かった。*Bhlhe40* 過剰発現およびノックダウンした膵細胞株 MIN6 細胞を樹立した。低酸素下ではインスリン分泌、増殖能は低下し細胞死は増加する。この時、

Bhlhe40 ノックダウン細胞ではインスリン分泌低下の回復が見られたが、増殖および細胞死には変化は認めなかった。このことから BHLHE40 はインスリン分泌の抑制因子であることが判明した。*Bhlhe40* の過剰発現細胞を用いて RNA シークエンス解析を行いインスリン分泌低下を説明する BHLHE40 標的遺伝子の網羅的探索を行った。発現低下群には、膵細胞機能に重要な因子である *Mafa*, *Nkx2.2*, *Ppargc1a*, *Vdr*, *Nkx6-1*, *Neurod1* が含まれていた (図 1A)。さらに低酸素環境下で発現低下を認めるが *Bhlhe40* ノックダウンにより回復した遺伝子として *Mafa* および *Ppargc1a* を得た (図 1B)。研究実施者は最も発現変動の大きかった *Mafa* 遺伝子に着目し、BHLHE40 による発現制御についてさらに検討した。

既報より BHLHE40 は E-box サイトに特異的に結合し転写抑制に働く (St-Pierre B. JBC 2002)。*Mafa* プロモーター上 10kb 上流まで探索したところ有力な E-box 結合モチーフを 4 力所見出した。この 4 力所に変異を入れ DNA に結合できない変異体を作製しルシフェラーゼアッセイで検討したところ、A 領域 (-9.9kb 付近) および C 領域 (-7.9kb 付近) に存在する E-box 結合モチーフの両方が BHLHE40 による *Mafa* 転写抑制に必要であることを見出した (図 2A)。さらに BHLHE40 がこの 2 つの領域に直接結合しているかをクロマチン免疫沈降法を用いて確認したところ両部位ともに結合していることが分かった (図 2B)。この 2 つの結合部位の間には *Mafa* 転写を正に制御する因子 (PDX-1 など) の結合部位 (*Mafa* 転写のエンハンサー領域) が存在している。BHLHE40 の有無で PDX-1 のプロモーターへの結合能が変化するかを検討したところ興味深いことに BHLHE40 の存在下では PDX-1 の *Mafa* プロモーターへのリクルートが有意に減弱した (図 2C)。以上のことから BHLHE40 は *Mafa* プロモーター上の 2 力所の E-Box サイトを介して、PDX-1 の結合能を低下させ *Mafa* の転写活性を負に制御していることが明らかとなった。

低酸素における PHD3 の発現制御と機能解析

Phd3 mRNA および PHD3 タンパク質の経時的変化を検討したところ、低酸素暴露後 12 時間後から発現上昇し、7 日まで発現誘導が続いた。この時 HIF1 α タンパク質は約 1 日で消失するため PHD3 の恒常的発現誘導には HIF1 以外の経路の関与が考えられた。*Phd3* を過剰発現あるいはノックダウンした膵細胞株 MIN6 細胞を樹立した。低酸素下において MIN6 細胞の増殖速度は低下するが、この時 *Phd3* のノックダウンでさらに増殖能が低下し、逆に *Phd3* の過剰発現で増殖スピードが回復した。このとき H196A *Phd3* の過剰発現ではその回復効果が消失することからプロ

リンの水酸化活性がこの表現型に必須であることを突き止めた。一方で、*Phd3* 過剰発現 MIN6 細胞においてインスリン分泌能を検討したが、糖応答性インスリン分泌には影響しないことが分かった。以上のことから PHD3 は細胞の増殖に関与していることが判明した。さらに増殖に関与する因子 X との相互作用を見出し、PHD3 と相互作用因子 X の関係性を明らかにするこ

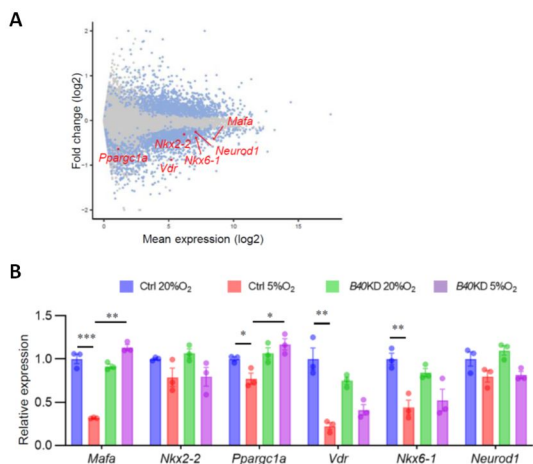


図1 BHLHE40の標的遺伝子の探索
A) *Bhlhe40*過剰発現細胞において発現変化した遺伝子をボルケーノ・プロットで示した。注目した発現低下遺伝子は赤字で示している。
B) *Bhlhe40*ノックダウン細胞における各種遺伝子の発現変化を定量PCRで検討した(n=3)。*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001

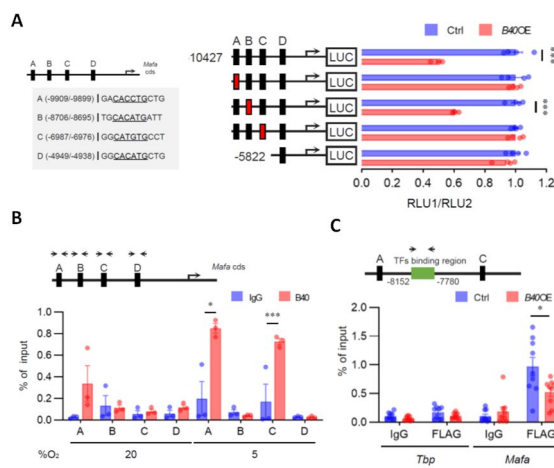


図2 BHLHE40による*Mafa*転写抑制
A) *Mafa*プロモーター上のBHLHE40結合モチーフに各々変異をいれたコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイで検討した(n=4)。B) 各領域に対するBHLHE40の結合能をクロマチン免疫沈降法で検討した(n=4)。C) BHLHE40の有無でプロモーターへのPDX-1のリクルートメントの違いをクロマチン免疫沈降法で解析した(n=4)。*, p<0.05, ***, p<0.001

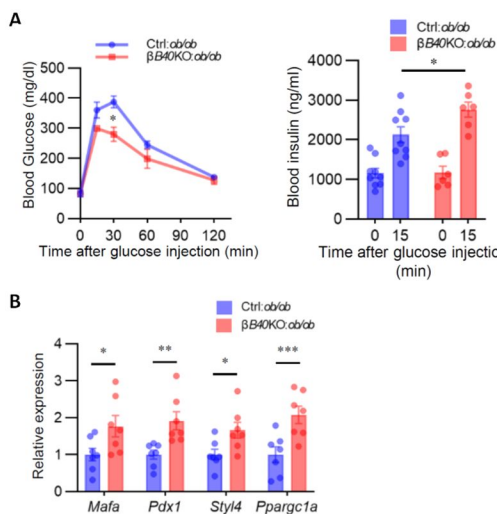


図3 *ob/ob*マウスにおけるBHLHE40ノックアウトの効果の検討
A) *ob/ob* および *ob/ob* : β BHLHE40 KOマウスにおける耐糖能とインスリン分泌能の評価 (n=6-9)。B) *ob/ob* および *ob/ob* : β BHLHE40 KOマウス膵島における各種 β 細胞関連遺伝子群の発現変化を定量PCRで検討した(n=6)。*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001

とが今後の課題である。

膵 細胞代償機構における BHLHE40 および PHD3 の役割

Bhlhe40 flox マウスと膵 細胞特異的 Cre 発現 (Pdx1-Cre) マウスとの交配により膵 細胞特異的 *Bhlhe40* 欠損 (*Bhlhe40* KO) マウスの作製した。*Bhlhe40* KO 膵島では約 75%の *Bhlhe40* mRNA の発現低下を認めた。このマウスは随時血糖及び耐糖能に影響は認めなかったため、膵島低酸素が惹起される肥満・糖尿病病態での機能解析に移行した。肥満マウスである *ob/ob* マウスをバックグラウンドに持つ *Bhlhe40* KO を作製し、対照マウス (*ob/ob* マウス) との差を検討した。*ob/ob* マウスは著明な肥満、耐糖能異常およびインスリン分泌低下を認めるが、膵 細胞特異的 *Bhlhe40* ノックアウトマウスは肥満の度合いは変わらないものの有意な耐糖能異常の改善およびインスリン分泌の回復を認めた (図 3A)。この時インスリン感受性は対照マウスと変化を認めなかった。また野生型マウス膵島と比して *ob/ob* マウス膵島では *Mafa* の発現低下を認めるが *Bhlhe40* ノックアウトにより *Mafa* およびその標的遺伝子である *Pdx-1* や *Styl4* の発現回復を認めた (図 3B)。このようにマウス個体においても膵 細胞における BHLHE40 は *Mafa* の転写抑制およびインスリン分泌の不全形成に関与し膵 細胞代償機構の破綻に寄与していることが示された。

また同様に *ob/ob* マウスにおいて *Phd3* を膵 細胞特異的にノックアウトしたところ BHLHE40 とは異なり耐糖能の増悪を認めた。PHD3 は膵 細胞代償機構に対して保護的に働いている可能性があるが、その詳しいメカニズムに関して未だ不明である。今後、その分子メカニズムや PHD3 相互作用因子 X との関連を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kariba Yuichi, Yoshizawa Tatsuya, Sato Yoshifumi, Tsuyama Tomonori, Araki Eiichi, Yamagata Kazuya	4. 巻 530
2. 論文標題 Brown adipocyte-derived exosomal miR-132-3p suppress hepatic Srebf1 expression and thereby attenuate expression of lipogenic genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 500 ~ 507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Yoshifumi, Rahman Md Mostafizur, Haneda Masaki, Tsuyama Tomonori, Mizumoto Tomoya, Yoshizawa Tatsuya, Kitamura Tadahiro, Gonzalez Frank J., Yamamura Ken-ichi, Yamagata Kazuya	4. 巻 1866
2. 論文標題 HNF1 controls glucagon secretion in pancreatic β -cells through modulation of SGLT1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 165898 ~ 165898
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2020.165898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sobuz Shihab U., Sato Yoshifumi, Yoshizawa Tatsuya, Karim Fazlul, Ono Katsuhiko, Sawa Tomohiro, Miyamoto Yoichi, Oka Masahiro, Yamagata Kazuya	4. 巻 1866
2. 論文標題 SIRT7 regulates the nuclear export of NF- κ B p65 by deacetylating Ran	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 1355 ~ 1367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2019.05.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Arima Yuichiro, Tsujita Kenichi et.al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Murine neonatal ketogenesis preserves mitochondrial energetics by preventing protein hyperacetylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 196 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42255-021-00342-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Daikuzono Hina, Yamazaki Masaya, Sato Yoshifumi, Takahashi Takashi, Yamagata Kazuya	4. 巻 578
2. 論文標題 Development of a DELFIA method to detect oncofetal antigen ROR1-positive exosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 170 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.08.054	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 叔史、モスタフィズルラーマン、羽根田昌樹、水本智也、津山友徳、吉澤達也、北村忠弘、Frank J Gonzalez、山村研一、山縣和也
2. 発表標題 HNF-1 による膵 細胞機能制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会(滋賀)web開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 叔史
2. 発表標題 脱アセチル化酵素SIRT7によるNF- B p65の核外輸送制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 叔史
2. 発表標題 低酸素誘導性BHLHE40による 細胞機能低下機序の解明
3. 学会等名 第62回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 叔史
2. 発表標題 低酸素誘導性の転写抑制因子BHLHE40による膵 細胞障害機構
3. 学会等名 第64 回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 叔史
2. 発表標題 転写因子HNF1 による膵 細胞制御機構の解明
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会九州地方会(九州支部賞受賞講演)（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清野裕	4. 発行年 2020年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 2
3. 書名 Diabetes Strategy	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ https://www.kumamoto-medbiochem.com/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山縣 和也 (YAMAGATA KAZUYA)		
研究協力者	松岡 孝昭 (MATSUOKA TAKA-AKI)		
研究協力者	井上 正宏 (INOUE MASAHIRO)		
研究協力者	南嶋 洋司 (MINAMISHIMA YOUJI)		
研究協力者	小林 大樹 (KOBAYASHI DAIKI)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関