

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16344

研究課題名(和文) 間欠的低酸素が筋細胞においてインスリン抵抗性関連遺伝子発現に与える影響

研究課題名(英文) The effect of intermittent hypoxia on the expression of insulin resistance-related genes in muscle cells

研究代表者

正畠 良悟 (Shobatake, Ryogo)

奈良県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：40771027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス、ヒト筋細胞を間欠的低酸素(IH)[5分間のO₂ 1%状態と10分間のO₂ 21%状態(Normoxia)の繰り返し]とNormoxiaにそれぞれ24時間曝露した。IHによりIL-8、ON、MNのmRNA量と培養上清中の発現蛋白量が有意に増加した。IL-8、ON、MN遺伝子のプロモーターアッセイでは、IHによる活性上昇が認められ、それぞれ-152～-151、-105～-99、-3741～-3738のプロモーター領域が必要であった。IL-8、MNはOCT1、ONはNRF2のコンセンサス領域を有しており、それぞれのsiRNA導入によりIHによる転写活性亢進は消失した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠時無呼吸症候群の主病態である間欠的低酸素(IH)が、インスリン抵抗性に関連するミオカイン遺伝子の発現に与える影響を検討した。IHにより筋細胞においてIL-8、osteonectin(ON)、myonectin(MN)遺伝子発現が転写レベルで亢進し、IL-8、MNはOCT1、ONはNRF2を転写因子として必要とすることを示した。SAS患者では、IL-8、ON、MNの遺伝子発現増加が、筋肉組織において炎症性表現型を誘導し、インスリン抵抗性に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Sleep apnea syndrome is characterized by recurrent episodes of oxygen desaturation and reoxygenation (intermittent hypoxia [IH]) and is a risk factor for insulin resistance/Type 2 diabetes. We exposed human RD and mouse C2C12 muscle cells to normoxia or IH and measured their mRNA levels by real-time RT-PCR. We found that IH significantly increased the mRNA and protein levels of muscle-derived insulin resistance-factors (myokines) such as IL-8, osteonectin (ON), and myonectin (MN) in muscle cells. Deletion analyses revealed that the regions -152 to -151 in IL-8, -105 to -99 in ON, and -3741 to -3738 in MN promoters were responsible for the activation by IH in RD cells. The promoters contain consensus transcription factor binding sequences for OCT1 in IL-8 and MN promoters, and for NRF2 in ON promoter, respectively. The introduction of siRNA for OCT1 abolished the IH-induced expression(s) of IL-8 and MN and siRNA for NRF2 abolished the IH-induced expression of ON.

研究分野：脳神経内科

キーワード：間欠的低酸素 インスリン抵抗性 ミオカイン 睡眠時無呼吸症候群 2型糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群 (Sleep apnea syndrome; SAS) 患者は睡眠中に繰り返す無呼吸により、全身の組織、細胞は間歇的低酸素 (Intermittent hypoxia; IH)に曝露される。SAS の重症化により、無症候性、未治療、もしくは早期の2型糖尿病患者における血糖コントロールが増悪するなど、SAS はインスリン抵抗性との関連が指摘されている。骨格筋はグルコースの取り込みにとって重要な代謝組織である。しかしながら、グルコース恒常性に IH がどのような影響を与えるかは解明されていない。

2. 研究の目的

IH が骨格筋細胞における糖恒常性機構に与える影響を検討するため、マウス C2C12 骨格筋細胞とヒト RD 骨格筋細胞を用いて、IH が糖代謝・インスリン抵抗性に関連する遺伝子 NADPH oxidase 2 (NOX2)、glucose transporter type 4 (GLUT4)、mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14)、phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit β (PI3KR2)、sirtuin 2 (SIRT2)、tumor necrosis factor- α (TNF α)、interleukin (IL)-6、IL-8、IL-15、myostatin、brain derived neurotrophic factor (BDNF)、irisin、decorin、osteonectin、myonectin の発現に与える影響とその分子機序について検討する。

3. 研究の方法

申請者がこれまでの研究で確立してきた in vitro IH system を用いて、2%ウマ血清により骨格筋細胞に分化したマウス C2C12 細胞とヒト RD 細胞を IH [5 分間の低酸素状態 (1% O₂) と 10 分間の正常酸素圧状態 (normoxia) (21% O₂) の周期] normoxia にそれぞれ 24 時間曝露させる。IH は、外部からの O₂、CO₂、N₂ ガスをコンピューター制御で調節する特注のインキュベーター(O₂ programmable control, 9200EX, Wakenyaku Co., Ltd., Kyoto, Japan)と 24 ウェルプレートを用いて SAS 類似環境となるように調整する。曝露後、RNeasy Protect Cell Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて Total RNA を単離し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて cDNA を合成し、リアルタイム RT-PCR 法を行い、骨格筋細胞でグルコース取り込み・利用に関わる NADPH oxidase 2 (NOX2)、glucose transporter type 4 (GLUT4)、mitogenactivated protein kinase 14 (MAPK14)、phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit β (PI3KR2)、sirtuin 2 (SIRT2)、骨格筋細胞で発現・分泌されインスリン抵抗性惹起に関わるミオカインである tumor necrosis factor- α (TNF α)、interleukin (IL)-6、IL-8、IL-15、myostatin、brain derived neurotrophic factor (BDNF)、irisin、decorin、osteonectin、myonectin の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定する。リアルタイム PCR は KAPA SYBR® Fast qPCR Master Mix (Kapa Biosystems, Boston, MA)と Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara, Kusatsu, Japan)を使用する。IH による有意な mRNA 発現変化が認められた遺伝子についてはその遺伝子産物(蛋白質)の発現が IH によって起きているのかを細胞内蛋白質については cell lysate を Western blot で、細胞外に分泌される蛋白質については培地を ELISA 法で調べ、蛋白質としての発現変化を確認する。発現変化のメカニズムを明らかにするために、IH による有意な変化が認められた遺伝子についてはそのプロモーター領域の断片を分離し、pGL4.17[luc2/Neo]ベクター(Promega, Madison, WI)内のホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入してリポータープラスミドを作製し、トランスフェクション効率モニターのため pCMV-SPORT- β gal プラスミド(Life Technologies)とともに、RD 細胞に Lipofectamine®3000 (Life Technologies)を用いてコトランスフェクションする。ルシフェラーゼ活性は Pica Gene Luciferase assay system (Toyo-ink, Tokyo, Japan) を用いて測定し、 β -galactosidase で標準化することにより、IH により、遺伝子の転写活性が上昇したかどうかを明らかにする。IH により転写活性・mRNA 量がともに変化していた遺伝子については、プロモーター領域の欠失変異体を作製し、IH 感受性の転写変化をもたらすプロモーター領域を同定する。さらに、その領域に結合する可能性のある転写因子を TFBIND program (<http://tfbind.hgc.jp>)を用いて検索し、その候補となる転写因子に対する siRNA を用いてノックダウンの実験を行い、その転写因子が IH による mRNA 発現量の変化に必要なかどうか検討する。また、転写レベルで発現変化の説明が困難な場合は、mRNA 分解機構の観点から、microRNA の関与を検討する。

4. 研究成果

IH により糖尿病関連ミオカイン IL-8、ON、MN の mRNA 量が有意に増加し、ELISA 法では培

養上清中の発現蛋白量も有意に増加した。これら 3 遺伝子のプロモーターアッセイでは、IH による活性上昇が認められ、IL-8、ON、MN 遺伝子のそれぞれ -152 ~ -151、-105 ~ -99、-3741 ~ -3738 のプロモーター領域が必要であることがわかった。それらの領域は IL-8、MN に関しては OCT1、ON は NRF2 のコンセンサス領域を有しており、それぞれの siRNA 導入により IL-8、ON、MN 遺伝子の IH による転写活性亢進は消失した。SAS 患者では、IL-8、ON、MN の遺伝子発現増加が、筋肉組織において炎症性表現型を誘導し、インスリン抵抗性に寄与していると考えられた(J. Cell. Mol. Med. 2022;24:6019-6031. doi: 10.1111/jcmm.17618; Int. J. Mol. Sci. 2022;23:364. DOI: 10.3390/ijms23010364; Int. J. Mol. Sci. 2022;23:12957. DOI: 10.3390/ijms232112957)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takasawa Shin, Shobatake Ryogo, Takeda Yoshinori, Uchiyama Tomoko, Yamauchi Akiyo, Makino Mai, Sakuramoto-Tsuchida Sumiyo, Asai Keito, Ota Hiroyo, Itaya-Hironaka Asako	4. 巻 23
2. 論文標題 Intermittent Hypoxia Increased the Expression of DBH and PNMT in Neuroblastoma Cells via MicroRNA-375-Mediated Mechanism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5868 ~ 5868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23115868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takasawa Shin, Makino Mai, Uchiyama Tomoko, Yamauchi Akiyo, Sakuramoto-Tsuchida Sumiyo, Itaya-Hironaka Asako, Takeda Yoshinori, Asai Keito, Shobatake Ryogo, Ota Hiroyo	4. 巻 23
2. 論文標題 Downregulation of the Cd38-Cyclic ADP-Ribose Signaling in Cardiomyocytes by Intermittent Hypoxia via Pten Upregulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8782 ~ 8782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takasawa Shin, Itaya-Hironaka Asako, Makino Mai, Yamauchi Akiyo, Sakuramoto-Tsuchida Sumiyo, Uchiyama Tomoko, Shobatake Ryogo, Takeda Yoshinori, Ota Hiroyo	4. 巻 23
2. 論文標題 Upregulation of Reg IV and Hgf mRNAs by Intermittent Hypoxia via Downregulation of microRNA-499 in Cardiomyocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12414 ~ 12414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232012414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shobatake Ryogo, Ota Hiroyo, Takahashi Nobuyuki, Ueno Satoshi, Sugie Kazuma, Takasawa Shin	4. 巻 23
2. 論文標題 The Impact of Intermittent Hypoxia on Metabolism and Cognition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12957 ~ 12957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232112957	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takasawa Shin, Shobatake Ryogo, Itaya Hironaka Asako, Makino Mai, Uchiyama Tomoko, Sakuramoto Tsuchida Sumiyo, Takeda Yoshinori, Ota Hiroyo, Yamauchi Akiyo	4. 巻 26
2. 論文標題 Upregulation of IL 8, osteonectin, and myonectin mRNAs by intermittent hypoxia via OCT1 and NRF2 mediated mechanisms in skeletal muscle cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 6019 ~ 6031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.17618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shobatake Ryogo, Ota Hiroyo, Takahashi Nobuyuki, Ueno Satoshi, Sugie Kazuma, Takasawa Shin	4. 巻 23
2. 論文標題 Anorexigenic Effects of Intermittent Hypoxia on the Gut-Brain Axis in Sleep Apnea Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 高沢 伸, 正島 良悟, 竹田 善紀, 内山智子, 山内 晶世, 牧野 舞, 土田 澄代, 朝井啓斗, 太田 浩世, 広中 安佐子
2. 発表標題 間歇的低酸素は神経細胞においてカテコールアミン合成酵素mRNAを増加させる
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 : 一般演題 口演 (a90868)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryogo Shobatake
2. 発表標題 Intermittent hypoxia up-regulates gene expressions of anorexigenic peptides in neuronal and enteroendocrine cells by different mechanisms
3. 学会等名 ESMED Congress 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takasawa, S., Shobatake, R., Takeda, Y., Uchiyama, T., Yamauchi, A., Makino, M., Asai, K. and Ota, H.
2. 発表標題 Intermittent hypoxia increased the expression of DBH and PNMT in neuronal cells via microRNA-mediated mechanism.
3. 学会等名 82nd American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takasawa, S., Makino, M., Yamauchi, A., Sakuramoto-Tsuchida, S., Hirota, R., Fujii, R., Asai, K., Takeda, Y., Uchiyama, T., Shobatake, R., Ota, H
2. 発表標題 Up-regulation of ICAM-1 and ESM 1 by intermittent hypoxia via down-regulation of microRNA-181a1 in vascular endothelial cells.
3. 学会等名 59th EASD Annual Meeting, Hamburg, Germany, Oct. 2-6, 2023 (A-23-453-EASD) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryogo Shobatake, Nobuyuki Takahashi, Satoshi Ueno, Kazuma Sugie, Shin Takasawa
2. 発表標題 Intermittent Hypoxia and Appetite Regulation in the Gut-Brain Axis
3. 学会等名 13th Annual World Congress of NeuroTalk-2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------