

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310136

研究課題名(和文)低酸素応答のメタボローム解析から新しい虚血再灌流傷害治療法の開発へ

研究課題名(英文)New concept for treatment of ischemia/reperfusion injuries brought by metabolomics

研究代表者

南嶋 洋司 (Minamishima, Yoji Andrew)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20593966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：Phd2を失活させて低酸素応答が全身で活性化したマウスでは、対照群と比較して心筋梗塞モデルにおける梗塞巣が優位に縮小しており、心機能も保持されていることが確認された。そこで、Phd2が失活した心筋組織において、虚血再灌流傷害軽減に貢献した代謝メカニズムの解明を試みた。その結果、『PHD2を失活させることにより活性化された低酸素応答によって、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化から解糖系に代謝システムがシフトすることにより、エネルギー通貨であるATPや高リン酸化化合物をより少ない酸素消費量で保持していることがその臓器保護効果の本態である』との結論に辿り着いた。

研究成果の概要(英文)：Cells turn on hypoxic response under the environment where the available oxygen molecules are limited. Hypoxic response is mainly regulated by transcriptional factor HIF (hypoxia-inducible factor), which is also negatively regulated by “oxygen sensor” prolyl-hydroxylase PHDs. Among all PHDs, inactivation of PHD2 alone is sufficient to activate HIF pathway. Given that hypoxic response is designed for tissue protection under the hypoxic environment such as ischemic diseases, activation of HIF by PHD2-blocade should have beneficial role in ischemia/reperfusion model. Here we reported that inactivation of Phd2 in mice myocardial infarction model revealed smaller infarction size and better cardiac function by maintaining higher ATP with lower oxygen consumption. Our study shed light on new treatment for ischemia reperfusion injuries by targeting oxygen sensor PHD2.

研究分野：病態医化学

キーワード：hypoxia metabolomics HIF PHD ischemia

1. 研究開始当初の背景

低酸素環境下で高発現する転写因子 HIF1 のクローニングは低酸素応答研究における最大の転機となったが (Wang et al, Proc Natl Acad Sci U S A 1993 & 1995)、その HIF の制御メカニズムは全く解っていなかった。申請者が平成 22 年まで所属していた米国の Kaelin 研究室では、家族性癌疾患 VHL 病研究を進める過程で、VHL 病原因遺伝子産物 pVHL が HIF1 をユビキチン化により分解に導くこと (Ohh et al, Nat Cell Biol 2000)、HIF1 が pVHL に認識されるには HIF1 の特定のプロリン残基が水酸化される必要があること (Ivan et al, Science 2001; Min et al, Science 2001)などを発見し、さらにその HIF1 のプロリン水酸化酵素 PHD (PHD1~PHD3)を同定した (Ivan et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2002)。本研究は、その PHD による低酸素応答の *in vivo*での制御と細胞内エネルギー代謝の制御の研究へと発展させたものである。

2. 研究の目的

我々の身体が低酸素環境に暴露されたとき、個々の細胞は転写因子 HIF の活性化を介してエネルギー代謝を“低酸素モード”に切り替え、限られた酸素を有効に利用しようとする。

薬剤処理あるいは遺伝子操作によって HIF を活性化させた細胞 (すなわち低酸素応答を模倣させた細胞)は、所謂“虚血再灌流傷害”に対して抵抗性を示すのだが、HIF によって“低酸素モード”に切り替わった細胞内エネルギー代謝の流れの中で、どの代謝産物/代謝反応が細胞保護に奏功しているのか、完全には解っていなかった。

その代謝反応の責任分子をメタボローム解析を駆使して突き止めて、その分子を標的とした、心筋梗塞・脳血管傷害などの低酸素応答が関与する疾患の新しい治療法の開発へと発展させることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

下記のような流れで研究を行った。

- (1) 酸素濃度センサー-PHD2 を失活させて低酸素応答を活性化させたマウス(タモキシフェン誘導型 PHD2 ノックアウトマウス [Phd2 cKO]) を用いて下記のような3つの心筋の虚血再灌流モデルを作製する。
  - 心筋梗塞モデル
  - 心肺停止モデル
  - Langendorff 体外摘出心全虚血モデル
- (2) 各モデルにおいて低酸素応答の活性化が虚血再灌流後の心機能に与える影響の評価を行う。
- (3) 心筋組織にて代謝解析を行い、心機能の変動と相関する代謝産物および代謝経路を同定する。

4. 研究成果

成果について、研究の主な成果、得られた成果の国内外の位置づけとインパクト、今後の展望などの点から記述すること

(1) 心筋の虚血再灌流モデルの作製

心筋梗塞モデル

Phd2 cKO および対照群マウスを用いて冠動脈前下行枝をクランプする心筋梗塞モデル(LAD ligation model)を作製した。

心肺停止モデル

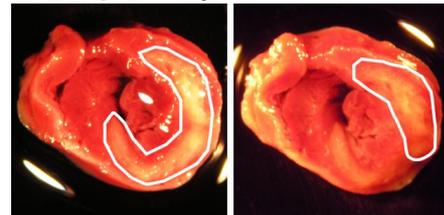
Phd2 cKO および対照群マウスを用いて、KCl 投与による心停止・気管内挿管および人工呼吸・指圧による心臓マッサージによる蘇生(CPR)を行うモデルを作製した。

Langendorff 体外摘出心全虚血モデル

Phd2 cKO および対照群マウスより摘出した心臓を Langendorff 体外心循環装置に接続して心停止・再灌流モデルを作製した。

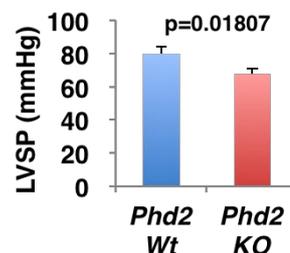
(2) 心機能評価

Phd2 cKO 群において心筋梗塞巣のサイズが優位に縮小し、左室機能低下のマーカー・LVEDP の上昇も優位に抑えられており、Phd2 の失活によって活性化された低酸素応答は、心筋梗塞巣の縮小と新機能維持に貢献していることが示された。



心肺蘇生成功率、蘇生後生存率、心機能の全てにおいて、Phd2 cKO および対照群間に統計学的有意差は今のところ認められていない。

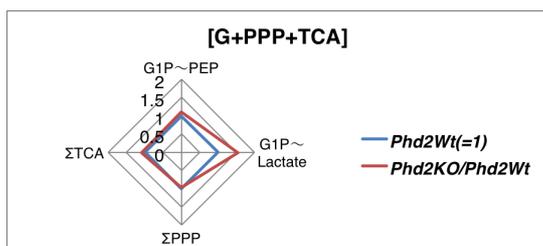
再灌流後 20 分時において、Phd2 cKO 群での左室収縮気圧 LVSP、および左室内圧上昇率 dP/dt の低下が認められ、予想に反して Phd2 を失活させた心臓では収縮力が低下していることが考えられた。



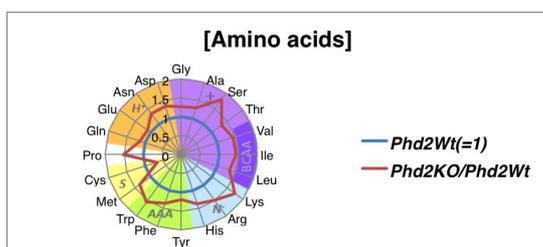
(3) 代謝産物解析

Phd2 cKO および対照群の心筋組織を用いて代謝解析を行った。

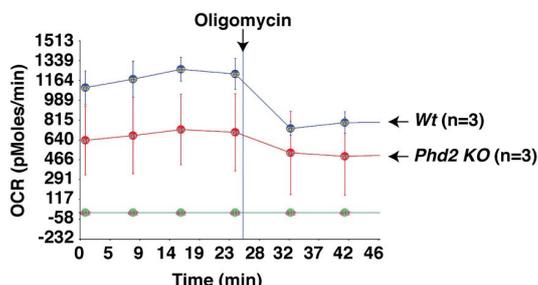
全てのデータをここに表示させることは出来ないため代表的な代謝経路のサマリーのみを提示する。Phd2の失活により代謝がミトコンドリアにおける酸化リン酸化から、極端に解糖系にシフトしていることが解る。



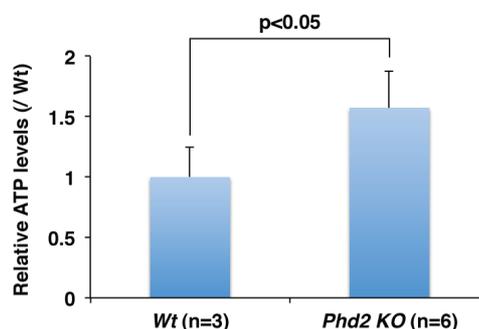
また、アミノ酸においては、セリン、アラニン、アスパラギン酸などの糖源性アミノ酸の有意な上昇を認めた。また、Phd2の基質であるプロリンも上昇していた。システイン以外全てのアミノ酸が上昇していた。



その他、初代培養心筋細胞を用いた実験から、Phd2の失活により心筋の酸素消費量が劇的に減少していることが解る。すなわち、ミトコンドリアの呼吸鎖の活性が抑えられていることが解る。



ミトコンドリアにおける呼吸の抑制は、ATP産生というエネルギー産生の観点からは不利なものであるが、大変興味深いことにPhd2の失活はATP量の有意な上昇をもたらすことが明らかになった。



さらに、重要なエネルギー貯蔵物質でもあるクレアチンリン酸も有意に上昇していることも判明した (data not shown)。これらのことから、**少ない酸素消費量でより多くのATPあるいは高リン酸化代謝産物を保持できていることが**、酸素濃度センサーであるPHD2の阻害による低酸素応答の活性化が心筋梗塞モデルにおける虚血再灌流傷害に対して保護的に働く最大の理由であると結論づけた。

現時点では生存率などに統計学的に有意な差がなく、代謝解析を行っていない。症例数を増やしていく予定である。

心臓の局所的虚血モデルではなく全虚血モデルにおいては、低酸素応答の活性化は心保護的には作用しないという、とともに予想に反する結論が得られた。しかしながら新たな治験ではあるため、引きつづき代謝産物解析は継続して行う予定である。

## 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) Kikuchi D, Minamishima YA, Nakayama K. Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1 and regulates the cellular PDH activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 451(2):288-94, 2014

(査読有り)

(2) Bao Y, Mukai K, Hishiki T, Kubo A, Ohmura M, Sugiura Y, Matsuura T, Nagahata Y, Hayakawa N, Yamamoto T, Fukuda R, Saya H, Suematsu M, Minamishima YA.

Energy management by enhanced glycolysis in G1 phase in human colon cancer cells in vivo and in vitro.

*Mol Cancer Res.* 11(9):973-985, 2013

(査読有り)

[学会発表](計15件)

(1) "Inactivating HIF-prolyl hydroxylase

PHD2 in liver improves survival after lactic acidosis by activating Cori cycle”  
Tomohiro Suhara, Takako Hishiki, Masataka Kasahara, Noriyo Hayakawa, Tomoko Oyaizu, Tsuyoshi Nakanishi, Akiko Kubo, Hiroshi Morisaki, Makoto Suematsu and Yoji Andrew Minamishima

ポスター発表 (一般)

Keystone Symposia “Hypoxia: From Basic Mechanisms to Therapeutics (E3)” . 5/14/2015, Royal Dublin Society, Dublin, Ireland

(2) “低酸素応答による乳酸代謝制御機構”  
寿原明宏、笠原正貴、菱木貴子、早川典代、南嶋洋司、末松誠

指定口頭演題およびポスター発表

第12回がんとハイポキシア研究会. 2014年11月21日、佐賀県佐賀市ホテルマリターレ創世佐賀にて

(3) 鈴木 教郎、南嶋洋司

シンポジウム「低酸素応答システムの分子機構と多様な役割」

オーガナイザー (日本語)

第87回日本生化学会大会. 2014年10月18日、京都府京都市京都国際会館にて

(4) “Energy management by enhanced glycolysis in G1 phase in human colon cancer cells in vivo and in vitro”

Yan Bao, Kuniaki Mukai, Takako Hishiki, Akiko Kubo, Mitsuyo Ohmura, Yuki Sugiura, Tomomi Matsuura, Yoshiko Nagahata, Noriyo Hayakawa, Takehiro Yamamoto, Ryo Fukuda, Hideyuki Saya, Makoto Suematsu and Yoji Andrew Minamishima

ポスター発表 (一般)

Keystone Symposia “Tumor Metabolism (X6)”. 3/18/2014, Whistler, BC, Canada

(5) “PHD2-HIF dependent hypoxic response regulates Cori cycle”

Masataka Kasahara, Tomohiro Suhara, Noriyo Hayakawa, Makoto Suematsu, Yoji Andrew Minamishima

ポスター発表 (一般)

Keystone Symposia “Sensing and Signaling of Hypoxia: Interfaces with Biology and Medicine (A1)” . 1/9/2014, Breckenridge, CO, U.S.A.

(6) “低酸素応答と in vivo 糖・乳酸代謝”  
南嶋洋司、笠原正貴、寿原明宏、早川典代、末松誠

ポスター発表 (一般)

第11回がんとハイポキシア研究会. 2013年12月14日、宮城県仙台市東北大学片平さくらホールにて

(7) “低酸素応答による in vivo エネルギー代謝の制御”

南嶋洋司、笠原正貴、早川典代、寿原明宏、末松誠

ワークショップ口頭発表 (指名)

第36回分子生物学会. 2013年12月3日、兵庫県神戸市神戸ポートアイランドにて

(8) “低酸素応答や細胞周期と細胞内エネルギー代謝制御”

南嶋洋司、末松誠

口頭発表 (指名)

第1回がんと代謝研究会. 2013年10月31日、山形県鶴岡市慶應義塾大学先端生命科学研究所 鶴岡メタボロームキャンパスにて

(9) “低酸素応答によるエネルギー代謝制御機構～臓器間のクロストーク～”

招待講演

南嶋洋司、末松誠

第1回低酸素研究会. 2013年7月6日、東京都新宿区早稲田大学先端生命医科学センター (TWIns)にて

(10) “成人肝細胞のエリスロポイエチン産生能力再活性化と、その腎性貧血治療への応用～PHD-HIF 依存的低酸素応答をターゲットとした新しい治療法の開発～”

南嶋洋司

シンポジウム口頭発表 (招待)

第58回日本透析医学会学術集会. 2013年6月23日、福岡県福岡市福岡国際会議場にて

(11) “PHD as a therapeutic target”

Yoji Andrew Minamishima

口頭発表・ポスター

第33回内藤コンファレンス. 2012年6月27日、北海道札幌市シャトレゼ ガトーキングダム サッポロにて

(12) “Regulation of cellular energy metabolism by in vivo hypoxic response”

Yoji Andrew Minamishima and Makoto Suematsu

シンポジウム口頭発表・オーガナイザー

第85回日本生化学会大会. 2012年12月14日、福岡県福岡市福岡国際会議場、マリメッセ福岡にて

(13) “Effect of acute or chronic hypoxic response in cardiomyocytes”

Yoji Andrew Minamishima, Javid Moslehi, William G. Kaelin Jr. and Makoto Suematsu

口頭発表・ポスター

第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月14日、神奈川県横浜市パシフィコ横浜にて

(14) “In vivo 低酸素応答の功罪”

南嶋洋司, Javid Moslehi, William G. Kaelin Jr., 末松誠

シンポジウム (招待)

第84回日本生化学会大会. 2011年9月22日、  
京都府京都市京都国際会館にて

(15) "Abstract 16056: Acute HIF Prolyl Hydroxylase 2 Inactivation Confers Protection Against Myocardial Ischemic Reperfusion Injury"

Steven M Bair, Yoji A Minamishima, Ronglih Liao, William G Kaelin, Javid Moslehi  
AHA Scientific Session 2011; 124: A16056  
<http://bit.ly/1d317cG>  
11/16/2011, Orlando, FL, U.S.A.

〔図書〕(計6件)

(1) 南嶋洋司

全人力・科学力・透析力・for the people 透析医学

分担執筆 "成人肝細胞での低酸素応答をターゲットとした腎性貧血治療法の可能性"

医薬ジャーナル社 東京. 359-363, 2014.  
ISBN978-4-7532-2679-5 C3047

(2) "低酸素応答 細胞内エネルギー代謝の低酸素モードとは?"

南嶋洋司、末松誠

実験医学増刊"驚愕の代謝システム" 32(15):  
2393-2403, 2014

(3) "細胞のエネルギー代謝を量る～低酸素環境下での代謝フラックスの定量～"

南嶋洋司

実験医学別冊 2013年別冊: 144-150, 2013

(4) "エネルギー代謝異常疾患としての癌"

南嶋洋司

血管医学 13(4): 385-391, 2012

(5) "成人肝細胞のエリスロポエチン産生能力再活性化と、その腎性貧血治療への応用"

南嶋洋司, William G. Kaelin Jr., 末松誠  
腎臓 35(2): 112-116, 2012

(6) "ノックアウトモデルからみた in vivo 低酸素応答～発生、心臓・腎疾患、がんにおける PHD の役割"

南嶋洋司, 末松誠

実験医学 30(8): 1270-1275, 2012

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南嶋 洋司 (Yoji Andrew Minamishima)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号: 20593966

(2) 連携研究者

久保 亜希子 (Akiko Kubo)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号: 50455573

谷内江 綾子 (Ayako Yachie)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 10453549

菱木 貴子 (Takako Hishiki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 10338022