

令和元年6月13日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09758

研究課題名(和文) 細胞低酸素の病態解明とその制御法に関する研究

研究課題名(英文) Pathophysiological role of pancreatic beta-cell 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では糖尿病の発症や増悪における膵 細胞低酸素の病態解明と成因解明を行い以下のことを明らかにした。HIF非依存的(AMPK/HNF4a)経路を介した膵 細胞障害機構を明らかにした(Sato Y. JBC 2017)。細胞の低酸素応答時に非常に重要な因子(Bhlhe40およびPhd3)を見出した。両遺伝子は低酸素性 細胞障害(インスリン分泌低下や細胞死の増加)に関与していることが示唆された。糖尿病の発症進展過程での膵島血管をイメージングできるモデルマウスを作製した。GLP-1によるcAMPの上昇が低酸素回避に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病における 細胞低酸素の病態および成因は明らかではない。本研究は、低酸素による 細胞障害分子メカニズムの解明、糖尿病時に膵島が低酸素化される機序の解明、および 細胞低酸素化に対するGLP-1の防御機構の解明についての検討を行うものである。本研究の成果により、糖尿病における 細胞低酸素の病態的意義が明らかになれば、細胞低酸素を標的とした新たな糖尿病治療法開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated the pathophysiological role of beta cell hypoxia as follows. 1) Hypoxic stress caused beta-cell dysfunction via a HIF-independent (AMPK/HNF4a) pathway (Sato Y. JBC 2017). 2) Bhlhe40 and Phd3 were identified as novel regulators of beta cell hypoxia response. 3) These 2 protein can regulate insulin secretion and beta cell death in diabetes. 4) An imaging model mouse for visualizing islet vessels became available. 5) GLP-1 can escape beta cells from hypoxia by modulating intra-cellular cAMP levels.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

低酸素は、癌や代謝疾患など様々な病気の発症に関与している (Semenza GL. N Engl J Med 2011)。例えば肥満モデルマウスの脂肪組織は低酸素に陥っており、低酸素によりアディポネクチンの分泌が低下することが報告されている (Hosogai N. Diabetes 2006)。研究代表者は、酸素消費亢進により細胞が低酸素化されること、また糖尿病モデルマウス膵島が低酸素化されていることを初めて明らかにした (Sato Y. JBC 2011)。この報告に引き続き、国外の他のグループからも同様の報告がなされ (Bensellam M. PLOS ONE 2012, Cheng X. Cell Death Dis 2012)、糖尿病における細胞低酸素が注目を浴びている。さらに低酸素が細胞機能遺伝子 (Pdx1, Neurod1, Slc2a2 (GLUT2), Wfs1 など) の発現低下を伴いインスリン分泌障害を引き起こすことを見出した (Sato Y. PLOS ONE 2014)。低酸素状態では、低酸素誘導因子 (HIF) が発現し、低酸素応答における主要な転写因子として働く。しかし HIF をノックダウンした細胞でも同様の遺伝子の発現変化が認められたことから、低酸素は HIF 非依存的に細胞障害を引き起こすことが強く示唆された (Sato Y. PLOS ONE 2014)。持続的な高血糖は酸化ストレスなどを介し、インスリン分泌不全を悪化させ、高血糖の遷延化・重篤化を招く (糖毒性)。これまでの研究成果から、細胞低酸素も糖毒性のメカニズムに関与しているものと考えられた。

(1) HIF (HIF-1 と HIF-1 のヘテロダイマー) は、低酸素応答時の主要な転写因子として働く (Semenza GL. Physiology 2009)。HIF 以外の低酸素時に誘導される経路についての理解はあまり進んでいないが、AMPK の活性化やある種の miRNA の発現亢進が起きることが報告されている (Wouters BG. Nat Rev Cancer 2008)。研究代表者は低酸素により HIF 非依存的に細胞機能遺伝子の発現が低下することを見出していたが、その機序は不明である。

(2) また細胞内酸素濃度は、酸素の「供給」と「消費」のバランスによって規定される。研究代表者は *in vitro* の検討結果から、高血糖によりミトコンドリアで持続的に酸素消費が亢進し、細胞が低酸素化されていることを明らかにした (Sato Y. JBC 2011)。しかしながら、糖尿病マウス膵島では血流量の低下や血管拡張が確認されており (Dai C. Diabetes 2013)、酸素消費だけでなく、細胞への酸素供給量の変化も細胞低酸素に寄与している可能性がある。実際に糖尿病マウス膵島の酸素需給バランスが、どのように変化しているかについては未だ検討されていない。

(3) Glucagon like peptide-1 (GLP-1) は糖応答性インスリン分泌増強作用や細胞保護作用を有する。単離膵島を用いた予備的検討の結果、GLP-1 は、高グルコース負荷により引き起こされる細胞低酸素を改善する作用を有していることが判明した。しかし、GLP-1 シグナルがどのように細胞低酸素を改善しているのか、その分子メカニズムは全く不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では以上の3点の項目に焦点を置き検討を行った。

### (1) 細胞障害分子メカニズムの解明

既知の HIF 非依存的経路 (AMPK, miRNA) の関与について検討する。また質量分析や DNA マイクロアレイを用いて、その他 (HIF 依存的、非依存的) 経路に關与する新規低酸素応答因子の同定を行い、細胞障害における役割を検討する。

### (2) 細胞低酸素の成因解明

糖尿病モデル動物を用いて、膵島のミトコンドリア機能および膵島内血管量、血流量などについて検討する。酸素の供給・消費の受給バランスについて経時的に評価を行い、細胞低酸素を引き起こす原因を明らかにする。

### (3) GLP-1 による低酸素防御機構

GLP-1 が膵細胞低酸素を改善するメカニズムについて検討を行う。また糖尿病マウスに GLP-1 を投与し、膵島低酸素改善効果について検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) HIF 非依存的経路 (AMPK など) の検討

1) キナーゼ活性欠失型 AMPK 2 を過剰発現させた細胞株 (MIN6) を作製し低酸素条件下で低下した細胞機能遺伝子 (Pdx1, Neurod1, Slc2a2, Wfs1 など) の発現が回復するかを定量的 PCR で検討した。また低酸素による AMPK 活性化が細胞機能に及ぼす影響を検討した。

2) 質量分析 (LC-MS/MS) による新規低酸素応答因子の同定

HIF 非依存的な経路の探索のために、レトロウイルスを用いて HIF-1 ノックダウンした MIN6 細胞を作製し、この対照細胞およびノックダウン細胞を低酸素に暴露し、各々の核分画蛋白を使用して、SDS-PAGE にて蛋白を展開、銀染色した。変動した蛋白を選定し、そのバンドを切り出し、回収蛋白に対してトリプシン処理後、ペプチド溶液を質量分析機器にかけて候補分子を同定を試みた。

### (2) 新規低酸素応答因子の同定

対照および HIF-1 ノックダウン細胞を低酸素に暴露し、HIF 依存的あるいは非依存的に発現が変動する下流の遺伝子群を DNA マイクロアレイ法により網羅的に抽出した。変動した各々の遺伝子の性格付けを行ったうえで、細胞機能に重要な新規低酸素応答因子の同定を行った。

### (3) 細胞における新規低酸素応答因子の機能解析

同定した低酸素応答遺伝子を過剰発現あるいはノックダウンした MIN6 細胞を作製し、i) 通常酸素下や低酸素下でのインスリン分泌能、細胞増殖や細胞死への影響、ii) 標的遺伝子や標的蛋白の同定、iii) 細胞機能、増殖や生存を調節する分子メカニズムの解明を行った。

#### (4) 細胞低酸素の成因解明

微小血管のイメージングマウス (Flk1-GFP/Flt1-tdsRed) と肥満糖尿病 (ob/ob) マウスを交配させ、糖尿病の発症・進行における膵島内の血管量や形態のイメージングが可能なモデルマウスの作製を行った。

#### (5) GLP-1 による 細胞防御機構

GLP-1 のどのようなシグナル経路が低酸素改善に関与しているかを、培養細胞および単離膵島を用いて以下の項目について検討した。1) GLP-1 は、cAMP 上昇や PKA 活性化作用を有している。細胞内 cAMP を増加させる薬剤 (フォルスコリンなど) や PKA 阻害剤 (H-89 など) が、低酸素あるいは低酸素改善効果に与える影響を検討した。2) GLP-1 が 細胞のミトコンドリア機能 (酸素消費) に与える影響について細胞外フラックスアナライザーを用いて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) HIF 非依存的経路 (AMPK など) の検討

低酸素は複数の膵 細胞機能遺伝子の発現を低下させるが、キナーゼ活性欠失型 AMPK 2 (Kinase dead form of AMPKa2) を過剰発現させ AMPK シグナルを阻害した MIN6 細胞を作製し、低酸素により発現が低下した 細胞遺伝子 (Pdx1, Neurod1, Slc2a2, Wfs1) の発現量を定量的 PCR で検討した。その結果、低酸素によるこれら遺伝子の発現低下は抑制されなかった。このことから AMPK シグナルの関与は否定的であった。また研究代表者は異なるスクリーニングより低酸素による AMPK の活性化が膵 細胞機能に関与する転写因子 HNF4 蛋白の安定性の制御に関与していることを見出し報告した (Sato Y. JBC 2017)。これも HIF 非依存的経路 (AMPK/HNF4a 経路) を介した低酸素による膵 細胞障害機構の一つであると考えられた。さらに質量分析を用いた解析より新規低酸素応答因子の同定を試みた。MIN6 細胞を低酸素に暴露した後に、核抽出蛋白を SDS-PAGE にて展開し、銀染色を行った。しかしながら、低酸素暴露によって著しく発現変化した蛋白のバンドを検出することができなかった。低酸素で誘導される既知の蛋白 HIF-1 でさえ銀染色では検出できなかったことから、この方法では検出感度が極めて低く蛋白の同定は困難であると考えられた。

#### (2) 新規低酸素応答因子の同定

質量分析を用いた解析からストラテジーを変更し、DNA マイクロアレイを用いた解析から新規低酸素応答因子を同定することにした。その結果、膵 細胞において低酸素によって誘導され極めて高発現した遺伝子として転写抑制因子 Bhlhe40 とプロリン水酸化酵素 Phd3 の 2 種類を同定した。

#### (3) 細胞における新規低酸素応答因子の機能解析

Bhlhe40 と Phd3 遺伝子に関して 細胞における発現様式を決定し、MIN6 細胞を用いたノックダウン細胞や過剰発現細胞の作製を行った。さらにこれら細胞を用いた低酸素環境における機能解析を行った。その結果、両遺伝子は低酸素誘導因子 HIF-1 により発現誘導されており、低酸素により著明に発現が上昇した。Bhlhe40 過剰発現 MIN6 細胞は細胞増殖、インスリン含量等には影響せず、糖応答性インスリン分泌を低下させた (図 1)。このことから低酸素により発現上昇した Bhlhe40 はインスリン分泌抑制に働いていることが推測された。一方、Phd3 過剰発現 MIN6 細胞はインスリン分泌には影響せず、低酸素下での細胞死や細胞増殖を調節している可能性が考えられた (図 2)。

#### (4) 細胞低酸素の成因解明

微小血管のイメージングマウス (Flk1-GFP/Flt1-tdsRed) と肥満糖尿病 (ob/ob) マウスを交配させ、糖尿病の発症・進行における膵島内の血管量や形態のイメージングが可能なモデルマウスを作製した。しかしながら研究期間内に解析には至らなかった。今後このモデルマウスを用いて膵島の微小環境に関して検討していく予定である。

#### (5) GLP-1 による 細胞防御機構

次に GLP-1 による低酸素に対する 細胞防御機構について検討した。その結果、高血糖は膵島の低酸素化に寄与するが GLP-1 だけでなくフォルスコリンによっても高血糖による低酸素を回避した。このことから低酸素回避に cAMP の関与が強く示唆された。今後、阻害剤を用いた詳細な検討が必要である。また糖尿病マウスにおけるミトコンドリア機能の評価を行うため、膵島を用いた細胞外フラックスアナライザーによる代謝経路プロファイリングの実験の基礎的検討を進めていく予定である。

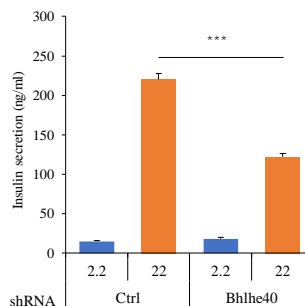


図1 Bhlhe40 ノックダウン細胞における糖応答性インスリン分泌の低下

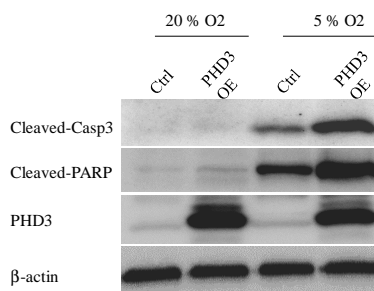


図2 Phd3過剰発現細胞における低酸素性アポトーシスの増加

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Sobuz SU, Sato Y (Equal 1st author), Yoshizawa T, Karim F, Ono K, Sawa T, Miyamoto Y, Oka M, Yamagata K. SIRT7 regulates the nuclear export of NF- $\kappa$ B p65 by deacetylating Ran. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* May 7;1866(9):1355-1367 2019 (査読有り)
2. Fukuda M, Yoshizawa T, Karim MF, Sobuz SU, Korogi W, Kobayashi D, Okanishi H, Tasaki M, Ono K, Sawa T, Sato Y, Chirifu M, Masuda T, Nakamura T, Tanoue H, Nakashima K, Kobashigawa Y, Morioka H, Bober E, Ohtsuki S, Yamagata Y, Ando Y, Oike Y, Araki N, Takeda S, Mizuta H, Yamagata K. SIRT7 has a critical role in bone formation by regulating lysine acylation of SP7/Osterix. *Nat Commun.* 9: 2833, 2018 (査読有り)
3. Miyasato Y, Yoshizawa T, Sato Y (Equal 2nd author), Nakagawa T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Kuwabara T, Adachi M, Ianni A, Braun T, Komohara Y, Mukoyama M, Yamagata K. Sirtuin 7 Deficiency Ameliorates Cisplatin-induced Acute Kidney Injury Through Regulation of the Inflammatory Response. *Sci Rep.* 8(1):5927, 2018 (査読有り)
4. Korogi W, Yoshizawa T, Karim MF, Tanoue H, Yugami M, Sobuz SU, Hinoi E, Sato Y, Oike Y, Mizuta H, Yamagata K. SIRT7 is an important regulator of cartilage homeostasis and osteoarthritis development. *Biochemical and biophysical research communications* 496(3) 891-897, 2018 (査読有り)
5. Karim MF, Yoshizawa T, Sobuz SU, Sato Y, Yamagata K. Sirtuin 7-dependent deacetylation of DDB1 regulates the expression of nuclear receptor TR4. *Biochemical and biophysical research communications* 490(2) 423-428, 2017 (査読有り)
6. Sato Y, Tsuyama T, Sato C, Karim MF, Yoshizawa T, Inoue M, Yamagata K. Hypoxia reduces HNF4 $\alpha$ /MODY1 protein expression in pancreatic  $\beta$ -cells by activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 292:8716-8728, 2017 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 発表者: 佐藤叔史 他  
題名: 膵 細胞低酸素による HNF4 $\alpha$  タンパク低下メカニズムの解明 (ポスターP40)  
学会名: 日本生化学会九州支部例会 2017
2. 発表者: 佐藤叔史 他  
題名: 膵 細胞における低酸素誘導因子 BHLHE40 の機能解析 (ポスター2P-1034)  
学会名: 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年
3. 発表者: 佐藤叔史、山縣和也  
題名: 低酸素応答因子 HIF-1 $\alpha$ /AMPK による膵 細胞障害の分子機構 (シンポジウム)  
学会名: 第 91 回日本生化学会大会 2018 シンポジウム 低酸素生物 : ミトコンドリア呼吸、代謝、遺伝子発現、細胞分化・組織再生から臨床応用へ

〔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〕

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/biochem2/biochem2.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 井上正宏 博士

(京都大学大学院医学研究科クリニカルバイオリソース研究開発講座)

ローマ字氏名: Inoue Masahiro

研究協力者氏名: 田崎雅義 博士

(熊本大学大学院 生命科学研究部 (保健学系) 構造機能解析学分野)

ローマ字氏名: Tasaki Masayoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。