

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17538

研究課題名（和文）膵細胞におけるPHD3による低酸素応答機構の解明

研究課題名（英文）The role of PHD3 in hypoxic response of pancreatic beta cells

研究代表者

津山 友徳 (TSUYAMA, TOMONORI)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任助教

研究者番号：10845960

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）：本研究課題では 細胞の低酸素誘導因子として新たに見出したProlyl-hydroxylase 3 (PHD3)について以下の点を明らかにした。(1) 2型糖尿病モデル(ob/ob)マウスの 細胞では低酸素に陥っていることに対応してPhd3の遺伝子発現が亢進していることが判明した。(2) ob/obマウスにおいて 細胞特異的にPhd3遺伝子を欠損したモデルマウスを樹立した。(3) (2)のマウスでは通常のob/obマウスと比較して耐糖能が改善していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病の病態に膵細胞における低酸素ストレスが関与している可能性が示唆されているが、その具体的なメカニズムは知られていない。本研究では 細胞における低酸素応答因子であるPHD3が糖尿病病態において血糖値に影響を及ぼす重要な因子であることを明らかにした。今後PHD3の機能の詳細を明らかにしていくことで、2型糖尿病の病態解明や新たな治療戦略の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have recently identified prolyl-hydroxylase 3 (PHD3) as highly up-regulated genes in hypoxic  $\beta$ -cells. This study revealed the role and expression of PHD3 in hypoxic and diabetic  $\beta$ -cells as follows. (1) In consistent with the occurrence of hypoxia in the  $\beta$ -cells of type 2 diabetes (T2D) mice, these cells show highly upregulation of Phd3 expression. (2)  $\beta$ -cell-specific Phd3 knockout mice in T2D mice background were established. (3) PHD3 deletion in  $\beta$ -cells improved glucose tolerance in T2D mice.

研究分野：低酸素

キーワード：低酸素 糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身の糖代謝は膵細胞とインスリン感受性臓器細胞との連携した働きによって制御されている。肥満等によりインスリン抵抗性を発症した場合、細胞がインスリン分泌を増大することで血糖を維持する代償メカニズムが存在するが、この代償メカニズムが十分に機能なくなると血糖が上昇しはじめる。慢性的な高血糖状態は細胞において酸化ストレスや小胞体ストレス、炎症などの有害な影響を及ぼし、糖尿病の発症や増悪につながる。研究代表者らの研究グループは、糖応答性のインスリン分泌は酸化的リン酸化に対する依存性が高いため、2型糖尿病マウスの細胞では大量のインスリンを分泌するために酸素消費が著しく亢進し、細胞内が低酸素状態に陥っていることを近年明らかにした。細胞株や単離膵島を低酸素培養することで細胞死やインスリン分泌不全が誘導されることから低酸素ストレスによる細胞機能不全が2型糖尿病の病態に関与している可能性が示唆されている。

低酸素ストレスに対する適応応答では hypoxia-inducible factor (HIF) と呼ばれる低酸素誘導性の転写因子が中心的な役割を果たしていることが様々な臓器や組織の細胞において報告されている。しかしながら興味深いことに、研究代表者は2型糖尿病マウスの細胞では低酸素状態に陥っているにも関わらず、HIF 自身や HIF 標的遺伝子の多くは発現上昇していないことを見いだした(未発表データ)。さらに低酸素ストレスによるインスリン分泌不全には、HIF 経路に依存しない AMPK-HNF4 経路 (Tsuyama 2017 JBC) や Bhlhe40-MafA 経路 (Tsuyama 投稿準備中) が関与していることを解明してきた。さらに研究代表者は HIF 経路の活性化が低酸素暴露直後の短期的なものであることに着目し、HIF 経路の活性が消失している長期低酸素状態において高発現している因子を探索した結果、prolyl hydroxylase domain-containing protein 3 (PHD3) を新たに見出した。PHD3 は HIF を標的とするプロリン残基の水酸化酵素であることが報告されているが、低酸素下の細胞における役割は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では低酸素・糖尿病下の細胞における PHD3 の働きを明らかにすることで、新たな低酸素応答機構・糖尿病病態の解明や糖尿病治療の開発に貢献することが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 2型糖尿病マウスの膵島における PHD3 発現の検討

2型糖尿病モデル(*ob/ob*)マウスと野生型 BL6 マウスとの膵島における *Phd3* 遺伝子の発現量を RT-qPCR 法により評価・比較した。同様に免疫組織化学染色により両者の PHD3 タンパク量を評価・比較した。

#### (2) 細胞特異的に *Phd3* をノックアウトした2型糖尿病モデルマウスの樹立

*Phd3* 遺伝子のエキソン2を loxP 配列で挟んだ遺伝子座を有するマウス(*Phd3<sup>fl/+</sup>*)および細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス(*Pdx1-Cre*)を入手・購入した。次に *Pdx1-Cre:Phd3<sup>fl/fl</sup>:ob/+* および *Pdx1-Cre:Phd3<sup>fl/fl</sup>:ob/+* の遺伝型を有するマウスを交配させることで、細胞特異的に PHD3 をノックアウトした糖尿病モデルマウス (*Pdx1-Cre:Phd3<sup>fl/fl</sup>:ob/ob*; *PHD3KO:ob/ob*) およびコントロールマウス(*Phd3<sup>fl/fl</sup>:ob/ob*; *Ctrl:ob/ob*) を作出した。

### (3) PHD3 が糖代謝に及ぼす影響の検討

*Ctrl:ob/ob* および *PHD3KO:ob/ob* マウスにおける体重、随時血糖を評価した。また両者における糖負荷後の血糖値の推移(耐糖能)を評価・比較した。

### (4) PHD3 の機能解析

(3)の結果の理由を解明するため、*Ctrl:ob/ob* および *PHD3KO:ob/ob* マウスの単離膵島組織切片を作製し、HE 染色法、BrdU 法、TUNEL 法によりそれぞれ膵島量、細胞増殖、細胞死を評価・比較した。

## 4. 研究成果

### (1) 2型糖尿病マウスの膵島における PHD3 発現の検討

研究代表者の研究グループでは2型糖尿病モデルマウスである *ob/ob* マウスの膵島では低酸素が検出されることを報告している(JBC 2011)。この事実に対応して、*ob/ob* マウスの膵島では野生型マウスの膵島と比較して顕著に *Phd3* の遺伝子発現が亢進していることを見出した(図1)。さらに PHD3 の増加は免疫組織化学染色によりタンパクレベルにおいても確認することができた。

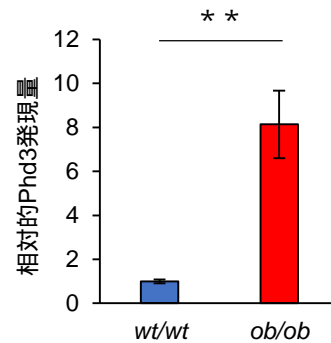


図1 2型糖尿病マウス膵島におけるPhd3発現

### (2) 細胞特異的に *Phd3* をノックアウトした2型糖尿病モデルマウスの樹立

糖尿病病態における PHD3 の役割を解明するために、*PHD3KO:ob/ob* マウスおよび *Ctrl:ob/ob* マウスを作成し、両者の膵島を単離後に RT-qPCR 法を用いて評価した結果、*Ctrl:ob/ob* と比較して *PHD3KO:ob/ob* マウス膵島において *Phd3* の発現が減少していることを確認した。

### (3) PHD3 が糖代謝に及ぼす影響の検討

*Ctrl:ob/ob* マウスおよび *PHD3KO:ob/ob* マウスの経時的な体重変化や随時血糖を比較したが、両群差は確認できなかった。次に両者の耐糖能を比較した結果、*PHD3KO:ob/ob* マウスでは *Ctrl:ob/ob* マウスと比較して耐糖能が悪化していることが判明した(図2)。このことから 細胞の PHD3 は糖尿病病態に関与していることが示唆された。

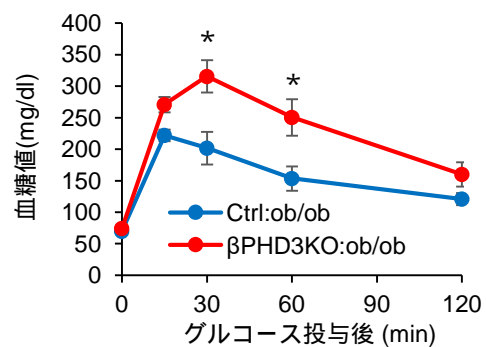


図2 2型糖尿病マウスにおけるPHD3ノックアウトによる耐糖能悪化

### (4) PHD3 の機能解析

PHD3 を過剰発現やノックダウンした 細胞株を用いて実施した以前の検討において、PHD3 がインスリン分泌機構自体にはほとんど影響しないことが既に判明している。そこで PHD3 は低酸素・糖尿病下における細胞増殖や細胞死を調節しているものと考えられる。マウス膵島における膵島量、細胞増殖能および細胞死を評価するためにそれぞれ HE 染色法、BrdU 法、TUNEL 法の評価系を確立した。現状ではこれらの指標に対する *PHD3KO:ob/ob* マウスと *Ctrl:ob/ob* マウスとにおける両群間比較は十分な解析数に至っておらず、今後引き続き検討していくべき課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akter Fatema, Tsuyama Tomonori, Yoshizawa Tatsuya, Sobuz Shihab U., Yamagata Kazuya	4. 巻 12
2. 論文標題 SIRT7 regulates lipogenesis in adipocytes through deacetylation of PPAR 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 1765 ~ 1774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13567	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 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 $\beta$ -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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------