

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16399

研究課題名（和文）BHLHE40およびPHD3による膵 細胞低酸素応答メカニズムの解明

研究課題名（英文）Hypoxic response by BHLHE40 and PHD3 in 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）・助教

研究者番号：10845960

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、細胞の低酸素誘導因子として新たに見出したBHLHE40およびPHD3について以下の点を明らかにした。(1) BHLHE40がインスリン分泌維持に必須なMAFA遺伝子の発現を抑制する分子メカニズムを明らかにした。(2) BHLHE40はPGC-1 遺伝子の発現を抑制することでミトコンドリア量やミトコンドリアにおけるATP産生を低下させる働きがあることを明らかにした。(3) PHD3は低酸素下の膵 細胞においてAKTを水酸化し活性化することで細胞増殖を維持する働きがあ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

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、そのメカニズムの詳細は不明のままである。本研究では膵 細胞における低酸素応答因子であるBHLHE40やPHD3が糖尿病病態における血糖値の制御に重要な影響を及ぼしている因子であることを明らかにした。今後BHLHE40やPHD3の発現制御や機能についてさらに詳しく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）：This study revealed the role of BHLHE40 and PHD3 in hypoxic response of pancreatic cells as follows. (1) BHLHE40 transcriptionally suppresses MAFA gene expression by inhibiting PDX-1 binding to an enhancer region of Mafa gene. (2) BHLHE40 reduces mitochondrial mass and mitochondrial ATP production by suppressing the expression of PGC-1 . (3) It is suggested that PHD3 maintains cell proliferation under hypoxic condition by hydroxylating and activating AKT in pancreatic cells.

研究分野：糖代謝

キーワード：低酸素 膵 細胞 インスリン分泌

1. 研究開始当初の背景

膵細胞は降血糖作用をもつホルモンであるインスリンを分泌する細胞であり、血糖調節において重要な役割を果たしている。膵細胞は高血糖により細胞内が低酸素状態に陥りやすく、2型糖尿病モデルマウスの膵島では慢性低酸素状態が検出されている。膵細胞株や単離膵島に対し低酸素刺激を与えると、インスリン分泌不全やアポトーシスが発生することから、膵細胞における低酸素ストレスは糖尿病病態に関与している可能性があるが、その分子メカニズムの詳細は不明な点が多い。

私は低酸素暴露後の膵細胞株、マウス膵島、糖尿病マウス膵島における網羅的な遺伝子発現解析を実施し、basic helix-loop-helix family, member e40(BHLHE40)や prolyl-hydroxylase 3(PHD3)が低酸素下の膵細胞において顕著に発現誘導されていることを見出した。BHLHE40はE-box配列に結合する転写抑制因子であるが、膵細胞における機能は不明である。予備検討からBHLHE40はインスリン分泌に必須な転写因子であるMAFAのエンハンサー領域に結合し転写抑制することで、インスリン分泌を低下させることが示された。一方、PHD3は酸素を基質とし標的タンパクを水酸化する酵素であるが低酸素下の膵細胞における標的因子や機能は不明である。

2. 研究の目的

本研究は低酸素・糖尿病下の膵細胞においてBHLHE40やPHD3が果たしている役割とその分子メカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

予備検討から膵細胞特異的に*Bhlhe40*をノックアウトしたob/ob(B40:ob/ob)マウスでは糖応答性インスリン分泌が亢進し耐糖能が改善していることが判明している。さらにインスリン分泌に必須な転写因子であるMAFAがBHLHE40の標的因子の一つであることをすでに見出している。そこで本研究計画では、(1)BHLHE40がインスリン分泌不全を誘導する分子メカニズムを検討した。特にBHLHE40がMAFAの発現を抑制する分子メカニズムを検討した。予備検討から膵細胞特異的に*Phd3*をノックアウトしたob/obマウスでは耐糖能が悪化することが判明している。さらに低酸素下の細胞に対しPHD3を過剰発現することで細胞増殖が維持されることが判明している。そこで本研究計画では、(2)PHD3による水酸化の標的因子や水酸化反応の役割について検討した。

(1) BHLHE40がインスリン分泌不全を誘導する分子メカニズムの検討

既報から転写因子PDX-1はMAFAのエンハンサー領域に結合することでMAFAの転写を活性化していることが知られている。そこで低酸素刺激を与えたり、BHLHE40を過剰発現した場合の膵細胞におけるMAFAエンハンサー領域に対するPDX-1の結合量をクロマチン免疫沈降(ChIP)-PCR法により評価した。次にMAFAの発現低下がインスリン分泌に及ぼす影響を遺伝子発現解析や生化学的アッセイによって評価した。さらに低酸素刺激した膵細胞におけるRNA-seq解析の予備検討結果からMAFA以外のBHLHE40の転写抑制の標的因子を選出し、その因子が関与するインスリン分泌関連機能について評価した。

(2) PHD3による水酸化の標的因子や水酸化反応の役割の検討

予備検討からPHD3はインスリンシグナル経路中のセリンスレオニンキナーゼで細胞増殖・生存に重要なAKTに結合することが判明している。そこでAKTがPHD3の水酸化反応の標的因子であることを明らかにするために、HEK293T細胞にPHD3発現ベクターとHAタグ付AKT発現ベクターをトランスフェクション後のタンパク試料に対して、HAに対する抗体で免疫沈降後、水酸化プロリンに対する抗体を用いてウエスタンブロットング法を実施した。さらにプロリン水酸化活性を欠損させたPHD3変異(H196A)を導入したMIN6細胞株を作成し、低酸素下における細胞増殖を検討した。

4. 研究成果

(1) BHLHE40がインスリン分泌不全を誘導する分子メカニズムについての研究成果

FLAGタグ付きのPDX-1を過剰発現した膵細胞株(MIN6)に対してBHLHE40の過剰発現後のタンパク試料を回収し、FLAGタグで免疫沈降後、MAFAのエンハンサー領域(転写開始点から-8152 bp -7780 bp)をPCR法で定量した結果、BHLHE40を過剰発現することでPDX-1がMAFAエンハンサー領域に結合する量が有意に低下することが判明した(図1)。BHLHE40を過剰発現する代わりに低酸素刺激を与えた場合においても同様の結果が確認された。以上のことから低酸素下における膵細胞ではBHLHE40がPDX-1によるMAFAの転写活性化を阻害することでMAFAの発現を抑制していることが判明した。

既報からMAFAはインスリンの開口放出に関与する遺伝子群(*Stxbp1*, *Napa*, *Syt7*, *Stx1a*)の発現を制御していることが知られている。低酸素刺激したMIN6細胞ではこれら開口分泌遺伝子

群の発現が低下するが、BHLHE40 を欠損したり、MAFA を過剰発現することでこれらの発現低下が有意に回復することが判明した(図 2)。また *in vivo* においても同様に、膵 細胞特異的に *Bhlhe40* をノックアウトすることで ob/ob マウスにおけるこれら開口分泌遺伝子群の発現が有意に増加することが判明した (図 3)。次に開口分泌機能を評価するためにヒト成長ホルモン (hGH) 分泌アッセイを実施した。その結果、低酸素刺激した MIN6 細胞では KCl 誘導性の hGH 分泌が低下するが、BHLHE40 を欠損することでこの分泌低下が有意に回復することが判明した (図 4)。以上のことから、低酸素下の膵 細胞では BHLHE40 が MAFA の発現を抑制し、その結果開口分泌機能に障害が生じていることが判明した。

低酸素膵 細胞における RNA-seq 解析の結果から、ミトコンドリアの生合成や酸化的リン酸化に重要な *Ppargc1a* (PGC-1 をコードしている) の発現が低酸素によって低下していることが判明した。他細胞種において PGC-1 は BHLHE40 の転写抑制の標的因子であることが報告されている。これらのことと対応し、BHLHE40 を過剰発現した MIN6 細胞では *Ppargc1a* の発現が有意に低下し、低酸素刺激した MIN6 細胞では *Ppargc1a* の発現が有意に低下するがこの発現低下は BHLHE40 を欠損することで回復することが判明した。また *in vivo* においても同様に、膵 細胞特異的に *Bhlhe40* をノックアウトすることで ob/ob マウスにおける *Ppargc1a* の発現が有意に増加することが判明した (図 3)。さらに低酸素下の MIN6 細胞ではミトコンドリア量、ミトコンドリア膜電位、ミトコンドリアタンパク量、細胞内 ATP 量が有意に低下するが、BHLHE40 を欠損することでこれらの低下が回復することが判明した。ミトコンドリアにおける ATP 産生は糖誘導性のインスリン分泌過程において重要な役割を果たしていることがよく知られている。以上のことから、低酸素下の膵 細胞では BHLHE40 が PGC-1 を減少することで、ミトコンドリア量や ATP 産生の減少に関与しているものと考えられる。

(2) PHD3 による水酸化の標的因子や水酸化反応の役割についての研究成果

AKT は PHD3 の結合因子の一つであることから、AKT が PHD3 によって水酸化されるかどうかを検討した。その結果、PHD3 を過剰発現することで AKT の水酸化が増加することが判明した。次にプロリン水酸化活性を欠損させた PHD3 変異(H196A)を導入した MIN6 細胞株を作成し、低酸素下における細胞増殖を検討した結果、PHD3 による細胞増殖効果が見られなくなることが判明した。以上の結果から、PHD3 は低酸素下の膵 細胞において AKT を水酸化することで細胞増殖を維持する働きがあることが示唆された。

(3) 研究成果(1), (2)の位置づけとインパクトおよび今後展望

従前の研究では低酸素状態に陥った膵 細胞においてインスリン分泌不全が起きる分子メカニズムは解明されていなかった。本研究成果として低酸素下の膵 細胞では BHLHE40 が増加し、MAFA や PGC-1 の発現抑制を介してインスリン分泌を抑制していることが明らかになった。ob/ob マウス膵島では慢性低酸素に陥っているが、膵島量は増加する。慢性低酸素下において細胞増殖性を維持するメカニズムについては不明であったが、本研究成果としてその分子メカニズムが解明されつつある。本研究成果は糖尿病病態における低酸素応答メカニズムの解明の新たな地平を拓くものであり、今後新たな糖尿病治療薬の開発につながることを期待できる。

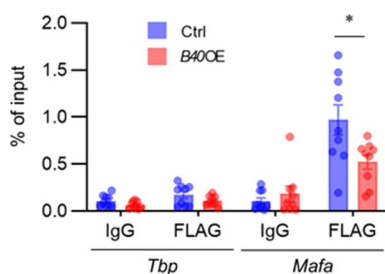


図1. PDX-1のMAFAエンハンサー領域への結合量

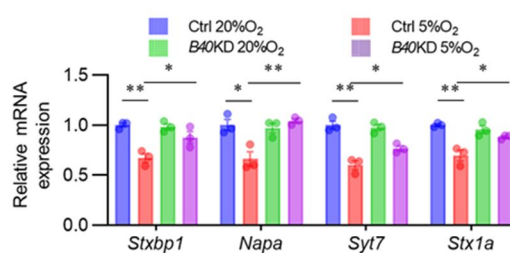


図2. 開口分泌遺伝子発現

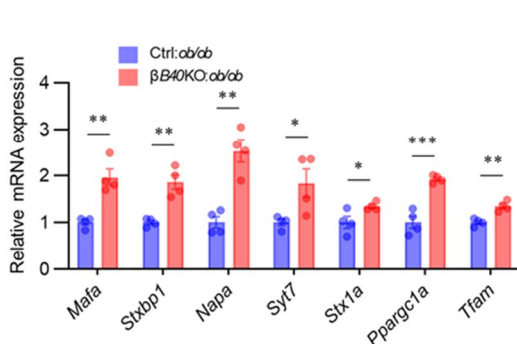


図3. *in vivo*における各種遺伝子発現の評価

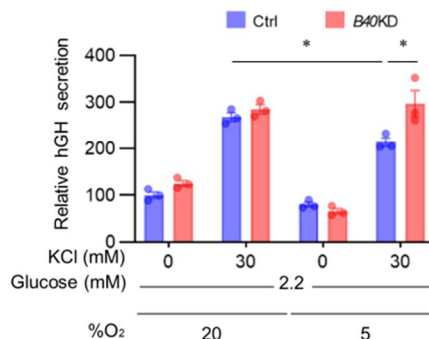


図4. 開口分泌機能評価 (hGH分泌アッセイ)

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuyama Tomonori, Sato Yoshifumi, Yoshizawa Tatsuya, Matsuoka Takaaki, Yamagata Kazuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Hypoxia causes pancreatic cell dysfunction and impairs insulin secretion by activating the transcriptional repressor BHLHE40	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e56227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202256227	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 Yoshizawa Tatsuya, Sato Yoshifumi, Sobuz Shihab U., Mizumoto Tomoya, Tsuyama Tomonori, Karim Md. Fazlul, Miyata Keishi, Tasaki Masayoshi, Yamazaki Masaya, Kariba Yuichi, Araki Norie, Araki Eiichi, Kajimura Shingo, Oike Yuichi, Braun Thomas, Bober Eva, Auwerx Johan, Yamagata Kazuya	4. 巻 13
2. 論文標題 SIRT7 suppresses energy expenditure and thermogenesis by regulating brown adipose tissue functions in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-35219-z	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 Mizumoto Tomoya, Yoshizawa Tatsuya, Sato Yoshifumi, Ito Takaaki, Tsuyama Tomonori, Satoh Akiko, Araki Satoshi, Tsujita Kenichi, Tamura Masaru, Oike Yuichi, Yamagata Kazuya	4. 巻 11
2. 論文標題 SIRT7 Deficiency Protects against Aging-Associated Glucose Intolerance and Extends Lifespan in Male Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3609 ~ 3609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11223609	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 津山友徳
2. 発表標題 低酸素誘導性インスリン分泌不全の分子機構の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会九州地方会
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
---------	---------