

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659175

研究課題名(和文)低酸素センサーを標的とした2型糖尿病治療法の探索と展開

研究課題名(英文)Oxygen sensor as a target of type-2 DM treatment

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) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：生体内における酸素濃度センサー・PHD2を全身で破壊させたマウスにおいては、対照群と比較して著明な空腹時低血糖が観察されるだけでなく、グルコースの腹腔内投与にても血糖値の上昇が殆ど認められず、全身の細胞においてインスリンへの感受性が亢進しているという結果が得られた。同様に、肝細胞あるいは骨格筋細胞においてのみPHD2を破壊したマウスでも同様の結果が得られた。すなわち、(肝臓や骨格筋において)PHD2を阻害して低酸素応答を活性化するとインスリン感受性の改善が期待出来ることから、生体内の酸素濃度感知機構を標的とした、全く新しい概念の2型糖尿病治療法の開発へのヒントを得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Hypoxic response is mainly regulated by VHL-PHD-HIF pathway. Systemically activating HIF in mice clearly shows blood sugar lowering effect and upregulated insulin sensitivity. Our result would highlight on a new concept of type-II diabetes treatment which target hypoxic response pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：低酸素 HIF PHD 糖尿病 インスリン感受性 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

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。

正常酸素濃度下では、HIF のサブユニット (HIF^α) はプロリン水酸化酵素 PHD によって特定のプロリン残基が水酸化され、それを指標に pVHL によって蛋白分解へと導かれる。反対に低酸素環境下では酸素添加酵素である PHD はその酵素活性を失うため、HIF^α はプロリン水酸化分解を免れ、恒常的に発現しているサブユニット (HIF^β) と結合して低酸素遺伝子群の転写を開始する。すなわち、HIF を介した低酸素応答の ON/OFF は PHD の酵素活性に依存することから、PHD は細胞内酸素濃度センサーであると言える。

研究代表者はその“細胞内酸素濃度センサー”の *in vivo* での役割に興味を持ち、そのノックアウトマウスを作製して、細胞がどのようにして酸素濃度をセンシングしているのか、そのセンサーが正常に機能しなくなったときに個体にはどのようなことが起きるのかといった *in vivo* の低酸素応答のメカニズムを明らかにしてきた (Minamishima et al, Blood 2008; Minamishima et al, Mol Cell Biol 2009)。

3つある PHD 遺伝子のなかでも PHD 2 が優位な HIF のプロリン水酸化酵素であり、PHD2 を阻害・欠損させた細胞では、通常酸素濃度環境下においても HIF が活性化し、低酸素応答が恒常的に観察されるようになる。

転写因子 HIF の転写ターゲット遺伝子群のなかには、グルコースの取り込みや解糖に関与するトランスポーターや酵素の遺伝子が多く含まれており、HIF の活性化によって糖代謝に大きな変動をもたらされることは容易に想像出来る。本研究では、PHD2 を欠損させて HIF を介した低酸素応答を活性化させたマウスを用いた *in vivo* の実験系で、低酸素応答によって個体の代謝、特に糖代謝がどのように変わるのか、そのメカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

低酸素環境下では細胞内で転写因子 HIF が活性化され、それによって低酸素関連遺伝子の転写が開始される。その HIF をマウスの全身の細胞で活性化させると、赤血球増多や拡張型心筋症・肝脂肪変性などが観察されるが、同時に著明な低血糖が観察される。理由としては(1)膵ラ氏島細胞によるインスリン産生の亢進、(2)全身の細胞のインスリン感受性の亢進、(3)肝細胞における糖新生の抑制、(4)グルコースの細胞への取り込みの亢進、(5)ただ単に無視出来ない数まで増加した赤血球による糖の取り込みが亢進した結果、などが考えられるが、予備研究にて上記(1)~(4)

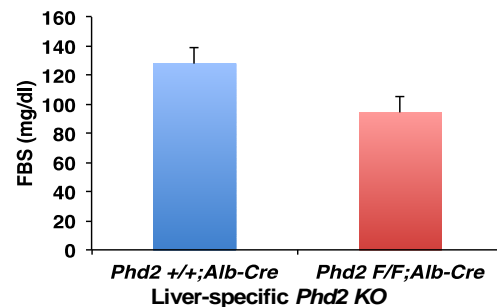
を思わせるデータが得られた。この結果をヒントに、低酸素応答をターゲットとした新しい糖尿病(特に 2 型糖尿病)治療法の開発へと展開させることは出来ないだろうか? と考えた。

3. 研究の方法

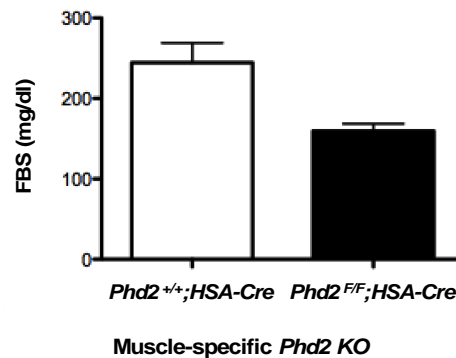
Phd2 遺伝子が肝臓あるいは筋肉で特異的に破壊されたマウスを作製し、低酸素応答による耐糖能、特にインスリン感受性の制御機構について検討した。

4. 研究成果

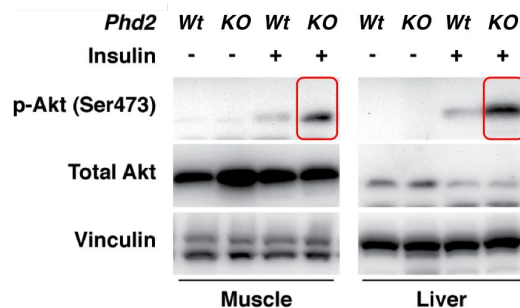
肝細胞において、PHD2 を阻害して低酸素応答を活性化させると、空腹時血糖値の低下が認められた(下図)。



また、骨格筋特異的に PHD2 遺伝子を破壊して低酸素応答を活性化させると、同様に空腹時血糖値の低下が認められた(下図)。

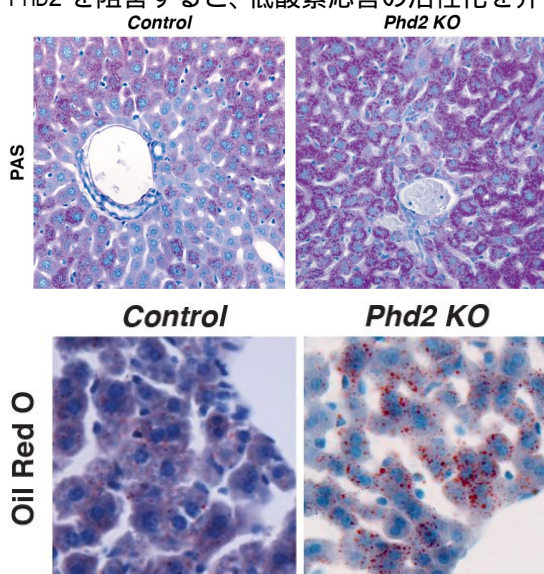


さらに、肝・骨格筋において低酸素応答を活性化させると、インスリン投与時の Akt のリン酸化(pAkt)が亢進することも確認出来た(下図)。



インスリン投与時のAktリン酸化の亢進はインスリンシグナリングが活性化していることを示すものであり、このことからPHD2を欠損させた臓器ではインスリン感受性が亢進するものと思われた。インスリン感受性が亢進しているのであれば、細胞においてグリコーゲン産生や脂肪酸合成が活性化するはずである。それを確認するために、肝臓を例にグリコーゲンや脂質の染色を行ったところ、PHD2を欠損した肝細胞内にはグリコーゲン(下図PAS染色)や脂質(下図Oil red O染色)が著明に蓄積していることが確認出来た。

すなわち、肝細胞や骨格筋細胞においてPHD2を阻害すると、低酸素応答の活性化を介



してインスリン感受性を亢進させることが出来ることが判明した。現在米国にて腎性貧血の治療薬として治験中の経口PHD阻害剤がインスリン感受性の低下(インスリン抵抗性)が病態の本態である2型糖尿病の治療薬として応用出来る可能性などについて、検討を進めていく価値があるものと思われる。

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1件)

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5件)

(1) "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

(2) "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、東北大学片平さくらホールにて

(3) "Regulation of energy metabolism by hypoxic response in vivo"

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、神戸ポートアイランドにて

(4) "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回がん代謝研究会. 2013年10月31日、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

(5) "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、早稲田大学先端生命医科学センター (TWIns)にて

[図書](計4件)

(1) "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

(2) "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

(3) "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

(4) "ロ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〕

<http://www.jst.go.jp/erato/suematsu/contents/member.html>

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・講師

研究者番号：20593966

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし