

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659154

研究課題名(和文) 低酸素センサーPHD2によるCori回路の新規活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of activating Cori cycle caused by inhibition of PHD2 in liver

研究代表者

笠原 正貴 (KASAHARA, Masataka)

慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)

研究者番号：30328265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸素濃度が低下した環境下では、生体のエネルギー代謝は『低酸素モード』に切り替わる。本研究では、肝細胞特異的に低酸素応答が活性化したマウス(PHD2-LKOマウス)を用いて、低酸素応答による乳酸代謝の制御メカニズムの解明を試みた。PHD2-LKOマウスは運動能力、乳酸処理能力が向上し、乳酸の細胞内取り込みと代謝が活性化されたことが確認できた。以上から、肝細胞特異的な低酸素応答を介して乳酸代謝が亢進し、乳酸クリアランスが高まることがわかった。また、その機序として糖新生経路の活性化が示唆された。

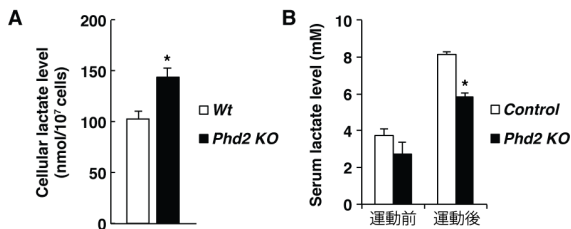
研究成果の概要(英文)：Prolyl hydroxylase 2 (PHD2) is an oxygen sensor that regulate the activity of the hypoxia inducible factors in an oxygen dependent manner. The purpose of this study was to examine whether inactivation of PHD2 in the liver played an important role for activating Cori cycle and decreasing lactate levels in circulation. Blood lactate levels after treadmill test or lactate tolerance test were significantly lower in PHD2-liver-specific knockout (PHD2-LKO) mice. The stable isotope labeled lactate incorporation assay revealed that livers of PHD2-LKO mice produced significantly greater amounts of glucose derived from the labeled lactate than controls, suggesting that the blockade of PHD2 in the liver helps improve lactic acidosis by activating gluconeogenesis from lactate.

研究分野：医化学

キーワード：低酸素 PHD2 エネルギー代謝 Cori回路

1. 研究開始当初の背景

低酸素状態に対する生体反応（低酸素応答）は、主に転写因子 HIF によって制御されているが、その HIF もまた“低酸素センサー”であるプロリン水酸化酵素 PHD2 によって負に制御されているため（Minamishima et al, Blood 2008）PHD2 が失活した細胞では 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（Minamishima and Kaelin, Science 2010）。PHD2 が欠損した細胞内では低酸素応答が ON になり、活性化した解糖系によって多くの乳酸が産生されるため、細胞外に放出される乳酸の濃度も対照群と比較して有意に高い (A)。このことから、PHD2 を全身で欠損したマウスでは全身の細胞で対照群より多くの乳酸が放出されて高乳酸血症になることが予想されたのだが、驚いたことに PHD2 欠損マウスの血中乳酸値は対照群よりも逆に低値であった。さらに、トレッドミル試験によって骨格筋からの乳酸産生を亢進させた運動負荷モデルにおいても、PHD2 欠損マウスの方が、対照群と比較して有意に血中乳酸値が低下した (B)。骨格筋から放出された乳酸は主に肝細胞に取り込まれて代謝されるので、この結果は PHD2 を介した低酸素応答が活性化した肝細胞では、乳酸の取り込みと代謝が活性化することを示唆している。



2. 研究の目的

酸素濃度が低下した環境に対する生体反応（低酸素応答）は、骨格筋・肝臓などの臓器のエネルギー代謝を『低酸素モード』に切り替える。運動負荷時には骨格筋において解糖が亢進した結果、肝臓での乳酸処理能力を上回る多量の乳酸が血中に放出されるのだが、低酸素応答を恒常的に活性化させたマウス（PHD2 欠損マウス）においては、予想に反して血中乳酸値が対照群と比較して有意に低いことが解った。これは、乳酸を産生する骨格筋などと、その乳酸を取り込んで糖新生などの原料として利用する肝臓との間のクレストーク (Cori 回路) が低酸素応答によって活性化されていることを示唆している。

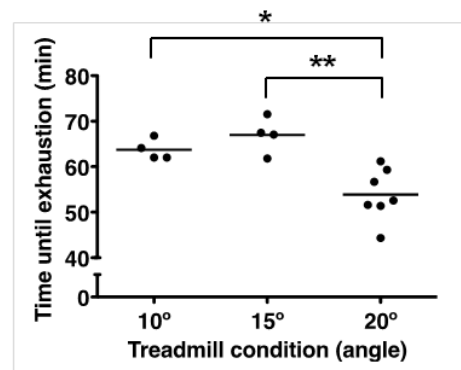
本研究の目的は、マウスの乳酸負荷モデルを用いて、低酸素応答によるエネルギー代謝（特に糖・乳酸代謝）の制御メカニズムの解明を目指すことである。

3. 研究の方法

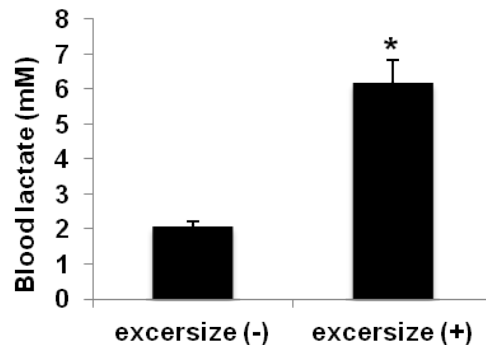
(1) “生理的乳酸負荷モデル”の作製

7週齢の雄の C57BL/6 マウスを用いて、トレッドミル試験の適切な条件を決定した。走路の速度は 6m/min から開始し、5分おきに 2m/min ずつ加速、休憩しようとした際には 100V の電気ショックを刺激として与え、刺激にもかかわらず 5秒間以上走行出来なくなった際に試験を終了とした。この条件では走路の傾斜角は +20 度が適切と思われた (C) ため、以後の遺伝子改変マウス (C57BL/6 系統) を用いた実験も、この条件で行うこととした。また、この実験条件では、安静時と比較して血中乳酸値は有意に上昇していることも確認出来た (D) ため、これを“生理的乳酸負荷モデル”として、以後の実験に用いた。

(C)



(D)



(2) 肝細胞特異的に低酸素応答を活性化させたマウスにおける生理的乳酸負荷に対する影響の検討

肝細胞特異的 PHD2 ノックアウトマウス (PHD2 flox/flox; albumin-Cre) および対照

群 (PHD2 +/+;albumin-Cre) を対象とし、両群のマウスを用いてトレッドミル試験を行い、下記項目に関して群間の比較を行った。

走行不能になるまでの時間を両群間で比較した。

野生型マウスが走行不能になる平均的な時間(運動開始後 50 分)のサンプルを用いて、血糖値、血中乳酸値を両群間で比較した。

(3) 肝細胞特異的に低酸素応答を活性化させたマウスにおける乳酸腹腔内投与に対する影響の検討

乳酸負荷 (0.5mg/g, i.p.) 後の血中乳酸値の経時変化の観察を行った。

乳酸負荷 (0.5mg/g, i.p.) 後の生存期間を観察した。

(4) 乳酸代謝に関わる酵素群、担体の発現量を real-time RT-PCR 法で評価した。

(5) 安定同位体標識乳酸 ($^{13}\text{C}_3$ -lactate) を腹腔内投与した後の肝細胞内中間代謝物 ($^{13}\text{C}_3$ で標識された分子) ならびに $^{13}\text{C}_3$ で標識されたグルコースを定量した (CE-MS、LC-MS)。

(6) 肝細胞以外の細胞による解析結果への影響を最小限にするため、肝細胞の初代培養を行い、安定同位体標識乳酸 ($^{13}\text{C}_3$ -lactate) を投与した後の肝細胞内中間代謝物 ($^{13}\text{C}_3$ で標識された分子) ならびに $^{13}\text{C}_3$ で標識されたグルコースを定量した (CE-MS、LC-MS)。

4. 研究成果

(1) 肝細胞特異的に PHD2 をノックアウトしたマウス (PHD2 LKO) は、“生理的乳酸負荷モデル”において、対照群よりも長く走ることができた。

(2) PHD2 LKO 群は、“生理的乳酸負荷モデル”50 分の時点において、血中乳酸濃度が対照群よりも有意に低かった。

生理的乳酸負荷に対して乳酸の取り込み、代謝が促進されることが示唆されたため、乳酸を投与 (0.5mg/g, i.p.) しても、その処理能力に差が認められることが考えられた。

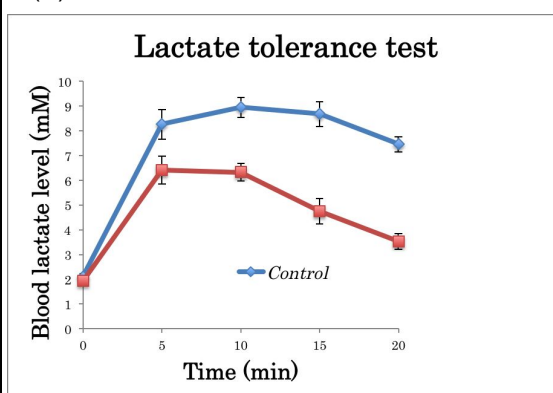
(3) 乳酸を腹腔内投与した後の血中乳酸濃度は、PHD2 LKO 群の方が低かった(A)。

(4) 致死量の乳酸を腹腔内投与した後の生存期間は、PHD2 LKO 群の方が有意に長かった。

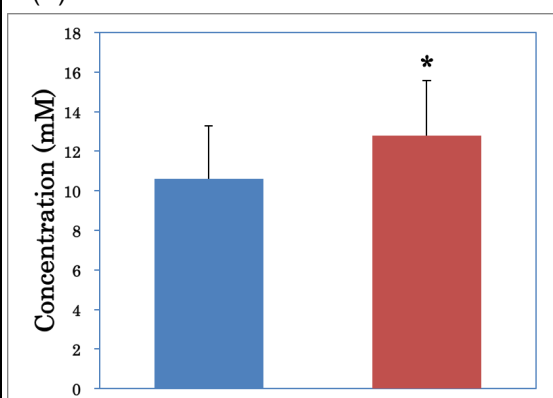
(5) MCT2、LDHA、PEPCK、GLUT2 などの糖新生に関わる担体・酵素は、PHD2 LKO 群の肝臓で多く発現していた。

(6) $^{13}\text{C}_3$ -lactate 腹腔内投与後の血漿中 $^{13}\text{C}_3$ 標識グルコース濃度は、PHD2 LKO 群の方が有意に高かった(B)。

(A)



(B)



(7) 初代培養した肝細胞において、PHD2 LKO 群では乳酸の細胞内取り込みと代謝が活性化されていた。

以上から、*in vivo*、*in vitro* とともに、肝細胞特異的な低酸素応答を介して乳酸代謝が亢進し、乳酸クリアランスが高まることがわかった。また、その機序として糖新生経路の活性化が示唆された。

尚、本研究成果を論文にまとめ、現在、英文誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

(1) “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(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計2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) “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）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

笠原 正貴 (Masataka Kasahara)

慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）

研究者番号：30328265

(2)研究分担者

南嶋 洋司 (Yoji Andrew Minamishima)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20593966

(3)連携研究者

久保 亜紀子 (Akiko Kubo)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：50455573

菱木 貴子 (Takako Hishiki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10338022