

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860697

研究課題名(和文) 膵細胞低酸素の糖尿病発症進展における意義の解明

研究課題名(英文) The pathophysiological role of pancreatic beta-cell hypoxia in the progression of diabetes

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病時にマウス膵島(膵細胞)は低酸素に曝されているがどのような機序で細胞の酸素濃度が低下するのか、また低酸素は細胞機能を低下させるがどのような分子メカニズムが関与しているかは不明である。本研究において、膵島低酸素を追跡可能な低酸素イメージング型糖尿病モデルマウスを作製した。また低酸素暴露によりミトコンドリア機能の低下や細胞機能遺伝子の発現異常が引き起こされ、インスリン分泌が低下していると考えられた。また低酸素による遺伝子発現異常やインスリン分泌低下に低酸素応答の主要調節因子HIF1の関与は否定的であった。細胞におけるHIF1非依存的な低酸素応答経路の解明は今後の重要な課題である。

研究成果の概要(英文)：The islets (pancreatic beta-cells) of a diabetic mouse become hypoxic. However, how the beta cells become hypoxic under diabetic conditions and what kinds of molecules are related to the beta-cell dysfunction by hypoxia, which still remain unclear. In this study, we generated hypoxia-imaging mice to monitor islet hypoxia in diabetes by crossbreeding an oxygen dependent domain (ODD)-Luciferase transgenic (Tg) mouse with diabetes model mice (ob/ob or db/db mouse). Furthermore, we found that beta-cell hypoxia causes less ATP production by reduced mitochondrial complex activity and abnormal beta-cell gene expression patterns, which results in reduced insulin secretion. And Hypoxia-inducible factor(HIF)-1, a master regulator in hypoxia response didn't contribute to the dysregulated gene expression and impaired insulin secretion by hypoxia. From this aspect, further studies are needed to clarify a HIF-1-independent hypoxia response pathway in beta-cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病 低酸素 膵細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病臓器低酸素のモニタリング

糖尿病マウスの代謝関連臓器(脂肪、腎臓など)において低酸素の存在が報告されており、臓器低酸素は重要な病態の1つとして考えられている(Hosogai N. Diabetes 2007, Rosenberger S. Kidney int 2008)。これらの臓器に加えて、代表者は糖尿病の膵細胞も何らかの機序で低酸素になっていること、さらに興味深いことに高グルコース負荷により低酸素が悪化することを報告した

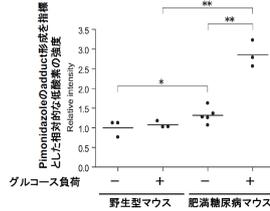


図1 糖尿病マウス膵島は低酸素に曝されている。

(図1)(Sato Y. JBC 2011)。しかし、糖尿病の発症進展のいかなる段階で細胞低酸素が出現するのかは不明であり、これまでに糖尿病発症と細胞低酸素との関係を経時的に追跡した報告はない。

低酸素イメージングの主流は、低酸素プローブ(ピモニダゾール)を用いた方法であるが、マウスへの薬剤投与と抗体ベースの検出が必要であり、評価に時間を要すること、また定点観察であり高度低酸素の検出に限られることが欠点である。近年、低酸素誘導因子(HIF)の特性をイメージングシステムに利用したマウスが開発された(Harada H. BBRC 2007)。このシステムは、低酸素のときにのみ発光し、非侵襲的に、リアルタイムで、臓器低酸素のイメージングが可能であることから、経時的に変化する低酸素の検出に有用であると考えられる。

(2) 細胞低酸素の成因解析

糖尿病発症前後の何らかの要因によって、「酸素供給」、「酸素消費」の2つのバランスが崩れ、細胞の低酸素化が引き起こされたと考えられる。膵島への酸素供給は、膵島内の血管量と血流量によって決定されるが、糖尿病マウスの膵島内血管量を対照マウスと比較検討したところ、血管量の著しい低下は認めなかった(Sato Y. JBC 2011)。しかし、糖尿病マウス膵島には拡張した血管が多数存在していることを確認しており、膵島内血流量が変化している可能性が十分考えられる。血流量に加え、膵島自身の酸素消費の変化に着目して低酸素化の成因を検討する必要がある。

(3) 低酸素による細胞障害機構の解明

代表者は、低酸素ストレスが細胞障害を引き起こし、糖尿病の悪化につながると考えた。まず、低酸素が細胞遺伝子にどんな影響を与えるかを、細胞株 MING6 を用いて検討した。その結果、慢性的低酸素に

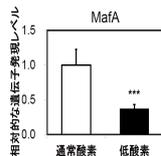


図2 低酸素に長時間曝露されたβ細胞では転写因子 MafA の発現が有意に低下する。*** p<0.001

より、細胞成熟および、インスリン合成に不可欠な転写因子である MafA の発現が有意に低下した(図2)。なぜこのような発現異常が引き起こされるのかは不明である。また細胞障害メカニズムとして、慢性高血糖は酸化ストレスや小胞体ストレスを引き起こすことが知られている(Jonas. Diabetes Obes Metab 2009)。低酸素ストレスも高グルコースが引き金となって増悪するが(図1)低酸素ストレスが既存の両ストレスと、どのような関係にあるかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は以下の2つの目的において実施する。

(1) 糖尿病の発症進展における細胞低酸素の成因解明:

低酸素モニター型肥満糖尿病モデルマウスを作製し、糖尿病の発症前後で経時的に低酸素を追跡する。さらに

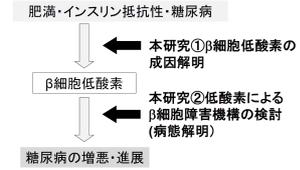


図3 本研究の概念図

細胞低酸素が糖尿病発症の原因であるか、結果であるかを結論付ける。また膵島血管(質、量)、膵島への酸素供給量、および膵島の酸素消費量の評価を行うことで、細胞低酸素を引き起こす原因を明らかにする。

(2) 低酸素による細胞障害機構の検討(病態解明):

低酸素に曝露した膵細胞株 MING6 細胞、マウス単離膵島、およびマウス個体を用いて、糖応答性インスリン分泌能、細胞遺伝子発現の変化、細胞増殖能、細胞死の評価を行い、低酸素が細胞に与える影響を *in vitro*、*in vivo* で明確にする。また細胞障害機構として、酸化ストレスや小胞体ストレスが挙げられるが、両者と低酸素ストレスとの関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病の発症進展における細胞低酸素の成因解明

低酸素モニター型糖尿病モデルマウスの作成

ODD-Tg マウスは、HIF1 依存的なレポーター遺伝子(5 × HRE ODD-Luc: 図4)を全身性に発現

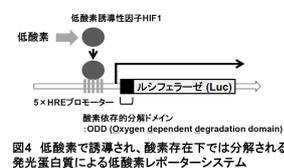


図4 低酸素で誘導され、酸素存在下では分解される発光蛋白質による低酸素レポーターシステム

させたトランスジェニックマウスである(Harada H. BBRC 2007)。ODD-Tg マウスと肥満糖尿病モデルマウス(*ob/ob*、*db/db* マウス)を交配し作成する。

糖尿病の発症前後における細胞低酸素の出現時期の検討および成因解析

糖尿病モデルマウスは生後6週齢頃から高血糖を呈するので、生後4~12週齢まで糖尿病の進行と以下の項目(i-vi)に関して経時

的に検討する。i) ODD-Tg/*ob* や ODD-Tg/*db* に対してルシフェリンを投与し、IVIS Imaging System で低酸素部位をイメージングする。ii) IVIS の解像度で確認できないときは、マウスを開腹し、摘出した臓器を使って検討する。iii) 従来の低酸素プローブ(ピモニダゾール)を投与し、結果を比較検討する。iv) ローダミンデキストランを注射後、2光子レーザー顕微鏡で膵島内血流を可視化し、血流を評価する。v) マイクロスフィアを注射し、膵島内の血流量を評価する。vi) マウス単離膵島を培養し、細胞外フラックスアナライザーを用いて代謝経路のプロファイリングを行う。

(2)低酸素による 細胞障害機構の検討(病態解明)

低酸素化 細胞におけるインスリン分泌能、細胞死、増殖能の解析

MIN6 細胞あるいはマウス単離膵島を慢性的に低酸素暴露後、糖応答性インスリン分泌能、細胞内インスリン含量をELISA法で検討する。またDNAマイクロアレイを行うことで遺伝子発現異常を網羅的に解析し、細胞からのインスリン分泌を障害する遺伝子の探索を行う。さらにその中で見出した遺伝子、およびMafA以外の細胞機能に重要な遺伝子(転写因子、トランスポーターなど)の発現を定量的PCRにて検討する。また低酸素暴露後のアネキシンV/PI染色、TUNEL染色および切断型カスパーゼ3の検出により、細胞アポトーシスを、WST-1試薬、BrdU染色を用いて、細胞の増殖能についても検討する。

低酸素による 細胞障害メカニズムにおけるHIF1制御の有無の検討

HIF1ノックダウンMIN6、HIF1恒常的活性化MIN6を作成し、低酸素暴露によって引き起こされた転写因子MafAの発現低下とその他の遺伝子発現異常、機能異常に関して、HIF1の関与があるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1)糖尿病の発症進展における 細胞低酸素の成因解明

FVBバックグラウンド(白色)のODD-Tgマウスに5世代C57BL6Jマウスを交配し、B6バックグラウンド(黒色)のODD-Tgを作製した。更に*ob/ob*マウス、あるいは*db/db*マウスと交配し、低酸素モニター型糖尿病モデルマウス(ODD-Tg/*ob*およびODD-Tg/*db*マウス)



図5 低酸素モニター型糖尿病マウス
HIF応答性Luc過剰発現(ODD-Tg)マウスと肥満2型糖尿病モデルマウス(*db/db*マウス)を交配することで低酸素モニター型糖尿病モデルマウス(ODD-Tg/*db*)を作製した(左図)。各マウスのジェノタイプング結果。野生型(WT)、ヘテロ接合体(Het)とホモ接合体(*db/db*)を示す(右図)。

を作製した(図5)。

これらのマウスは、元々の*ob/ob*マウスや*db/db*マウスと同様に、ホモ接合体で低週齢から著明な肥満と高血糖を呈した。しかし、繁殖能力が低いこととホモ接合体が生まれてくる割合が極めて低いことから、同週齢の同腹仔の個体を確保することが難しいことが判明した。このことから、これらのマウスを用いた解析を安定的に行うことができなかったため期限内に結論を出すことができなかった。

これらのマウスは糖尿病の低酸素病態を明らかにするための有力なツールとなることが期待される。今後、マウスの個体数を十分に確保した上で、膵島低酸素のタイムコースおよび酸素代謝の詳細に関して検討を進めていく必要がある。

(2)低酸素による 細胞障害機構の検討(病態解明)

低酸素暴露したMIN6細胞において、細胞内インスリン含量は変化しないが、基礎分泌量の有意な上昇と糖応答性インスリン分泌の有意な低下を認めた。既報通りこれらの細胞では低酸素暴露によって種々の解糖系遺伝子(Slc2a1、Hk1 etc)の発現が上昇すること、また培養上清中の乳酸量が上昇することを確認した。さらにミトコンドリア内の電子伝達系複合体の構成成分であるNdufa5の遺伝子発現が低下しており、複合体の活性の低下およびATP産生の低下があることを見出した。糖応答性のインスリン分泌には、ミトコンドリアで産生されるATP量の増加が不可欠であるため、低酸素下で認められたインスリン分泌量の低下の一要因は、このミトコンドリア障害によるATP産生の不足が関与していると考えられた。

また細胞機能に關与する遺伝子を網羅的に解析したところ、MafA以外に転写因子(Pdx-1、Foxa2、Neurod1など)、糖輸送体(Slc2a2)、チャネル(Kcnj11)や膜蛋白(Wfs1)などが有意に低下していた。これらの現象は単離膵島を低酸素暴露した時にも確認された。これら細胞機能遺伝子の発現低下は、低酸素による細胞機能低下に關与している可能性がある。

さらに低酸素条件下の細胞死、細胞増殖に關しても検討したところ、軽度な低酸素(5-10% O₂)で切断型カスパーゼ3および切断型PARPが著明な増加とアネキシンV陽性細胞(アポトーシス細胞)の増加を伴い細胞死が引き起こされた。また低酸素下において細胞の増殖は著しく抑制された。このように低酸素は、細胞の様々な面で細胞障害を引き起こすことが明らかとなった(Sato Y. PLOS ONE 2014)。

HIF1は、低酸素応答において中心的な役割を持つ転写因子である。次に、低酸素による細胞障害におけるHIF1の役割を検討した。低酸素によるインスリン分泌低下はHIF1を

ノックダウンした細胞においても認められたことから、HIF1 非依存的な分泌障害機構があると考えられた。上記に示した細胞機能遺伝子の発現低下に HIF1 依存性があるかどうかを検討したところ、Wfs1 以外の全ての遺伝子において、HIF1 の有無に関係なく遺伝子の発現が低下した(図 6)。このことから HIF1 非依存的に細胞機能遺伝子の発現低下が引き起こされ、インスリン分泌の低下に至ったと考えられた。

また興味深いことに HIF1 蛋白は低酸素下

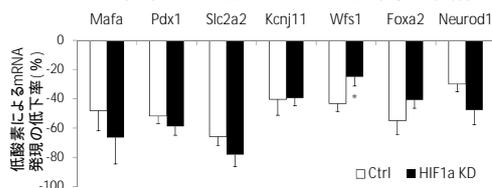


図6 低酸素による細胞機能遺伝子の発現低下におけるHIF1の役割
*p<0.05

において著しく誘導されることから低酸素下で主に機能すると考えられたが、通常酸素下においても HIF1 ノックダウン細胞は著明なインスリン分泌の低下を示した。この分泌障害には、低酸素条件下とは異なる制御機構が存在すると考えられる。

さらに低酸素は細胞死も引き起こすことから、細胞死が先行して起こったために二次的に遺伝子の発現が低下したと考えられた。この可能性を検討するために低酸素による細胞死で重要な役割を担っている CHOP をノックダウンし上記の遺伝子の発現低下が変化するかを検討した。その結果、細胞死が起こる前段階や細胞死が抑制されている時点においても Pdx-1 や Wfs1 の発現は既に低下していることが判明し、細胞死が起こるよりも早い段階で細胞機能遺伝子の発現低下が起こっていると結論付けられた。本研究により低酸素による細胞障害機構に関する新しい知見を得ることができた。

これまでの報告からも HIF1 が低酸素応答において重要であることは既知の事実であるが、本研究による知見から低酸素による細胞機能に関わる遺伝子の発現低下は HIF1 の有無で影響を受けなかった。このことから HIF1 非依存的な低酸素応答機構が細胞障害において極めて重要であることが示唆された。しかし HIF1 非依存的経路は十分に研究されておらず明確に定義されていない。細胞における新規低酸素応答機構の分子メカニズムを明らかにすることが次の課題であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Ohki T, Utsu Y, Morita S, Karim MF, Sato Y, Yoshizawa T, Yamamura K, Yamada K, Kasayama S, Yamagata K. Low serum level of high-sensitivity C-reactive protein in a Japanese subject with MODY3. J

Diabetes Investig. 5(5):513-6, 2014 査読有 DOI: 10.1111/jdi.12237.

Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K. SIRT7 Controls Hepatic Lipid Metabolism by Regulating the Ubiquitin-Proteasome Pathway. Cell Metab. 19(4):712-21, 2014 査読有 DOI: 10.1016/j.cmet.2014.03.006.

Yoshikawa A, Imagawa A, Nakata S, Fukui K, Kuroda Y, Miyata Y, Sato Y, Hanafusa T, Matsuoka TA, Kaneto H, Iwahashi H, Shimomura I. Interferon stimulated gene 15 has an anti-apoptotic effect on MIN6 cells. Endocr J. 61(9):883-90, 2014 査読有

https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/advpub/0/advpub_EJ14-0219/article

Sato Y, Inoue M, Yoshizawa T, Yamagata K. Moderate Hypoxia Induces β -Cell Dysfunction with HIF-1-Independent Gene Expression Changes. PLOS ONE 9(12):e114868, 2014 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0114868.

Hayashi H*, Sato Y*(共同筆頭著者), Li Z, Yamamura KI, Yoshizawa T, Yamagata K. Roles of hepatic glucokinase in intertissue metabolic communication: Examination of novel liver-specific glucokinase knockout mice. Biochem Biophys Res Commun. 460(3):727-32, 2015 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.097. Kurokawa H, Ito H, Inoue M, Tabata K, Sato Y, Kondoh S, Kadonosono T, Yano S, Inoue M, Kamachi T. High resolution imaging of intracellular oxygen concentration by phosphorescence lifetime. Sci. Rep. 5:10657, 2015 査読有 DOI:10.1038/srep10657.

Yamagata K, Karim MF, Sato Y, Yoshizawa T. Role of SIRT7 in hepatic lipid metabolism. Diabetol Int. 6:193-196. 2015 査読有

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13340-015-0226-y>

Suzuki K, Sato Y, Kai S, Nishi K, Adachi T, Matsuo Y, Hirota K.

Volatile anesthetics suppress glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells by inhibiting glucose-induced activation of hypoxia-inducible factor 1. Peer J. 3:e1498. 2015 査読有 DOI:10.7717/peerj.1498.

[学会発表](計7件)

佐藤叔史、井上正宏、山縣和也 細胞低酸

素による転写因子発現低下メカニズムの検討 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会
場所：大阪 2014 年 5 月 22～25 日 査読あり
(ポスター I-P-285)

作永真由美、佐藤叔史、吉澤達也、山縣和也 膵細胞における HNF4 標的遺伝子 Anks4b の機能解析 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会場所：大阪 2014 年 5 月 22～25 日 査読あり (ポスター -P-277)

佐藤叔史、井上正宏、吉澤達也、山縣和也 HIF-1 非依存的発現調節を介した軽度低酸素による細胞障害メカニズムの検討 第 12 回 がんハイポキシア研究会 場所：佐賀 (ホテルマリターレ創世佐賀) 2014 年 11 月 21～22 日 ポスター 29

佐藤叔史、井上正宏、吉澤達也、山縣和也 HIF-1 非依存的発現調節を介した軽度低酸素による細胞障害メカニズムの検討 第 37 回日本分子生物学会年会 場所：横浜 (パシフィコ横浜) 2014 年 11 月 25～27 日 査読あり (ポスター 3P-0838)

佐藤叔史、佐藤ちなみ、吉澤達也、井上正宏、山縣和也 細胞低酸素による転写因子 HNF4 蛋白発現低下機序の検討 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 場所：下関 2015 年 5 月 21～24 日 査読あり (ポスター III - P - 264)

Kazuya Yamagata, Yoshifumi Sato
Hypoxia reduces HNF4alpha/MODY1 protein expression of pancreatic beta-cells 2016 Keystone Symposia Conference 場所：Westin Miyako Kyoto, Kyoto, Japan Oct.25-Oct 29, 2015 査読あり (Poster session3)

佐藤叔史、井上正宏、吉澤達也、山縣和也 細胞低酸素による転写因子 HNF-4 蛋白低下メカニズムの検討 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015 場所：神戸 (神戸ポートアイランド) 2015 年 12 月 1～4 日 査読あり (ポスター 2P-1214)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

出願状況

なし

取得状況

なし

〔その他〕ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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・助教

研究者番号：90622598

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山縣 和也 (YAMAGATA, Kazuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：70324770

井上 正宏 (INOUE, Masahiro)

大阪府立病院機構大阪府立成人病センター・生化学部門 部長

研究者番号：10342990

近藤 科江 (KONDOH, Shinae)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：40314182