

学位論文の要旨

課程博士	医学博士	氏 名	坂上英充
学 位 論 文 題 目			
Role of HIF-1 α in regulation of insulin sensitivity in the skeletal muscle (骨格筋のインスリン感受性における HIF-1 α の役割)			
共 著 者 名 牧野 雄一、磯江 つばさ、滝山 由美、安孫子亜津子、 伊藤 博史、羽田 勝計			
未 公 開			
研 究 目 的			
<p>2型糖尿病は、インスリン分泌低下及び末梢組織でのインスリン抵抗性を主徴とする。インスリン抵抗性の原因の一つとして、末梢インスリン感受性組織における糖輸送担体の機能不全が知られている。骨格筋におけるインスリン刺激による糖取り込みは、インスリン感受性を規定する因子であり、糖代謝において重要な位置をしめる。骨格筋において、インスリンは細胞内のリン酸化経路の活性化を介して、糖輸送担体GLUT4を細胞表面に移行させるが、その制御機構は不明な点を残している。</p>			
<p>低酸素で活性化される低酸素誘導性転写因子Hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)は、生体の低酸素応答に関わる遺伝子群の発現を転写のレベルで制御する。近年、正常酸素環境下においても、サイトカイン、血管作動性因子、各種代謝産物などによりHIF-1αが活性化されることが明らかにされつつあり、低酸素応答のみならず、広く細胞代謝・機能制御におけるHIF-1αの役割が注目されている。最近インスリンが、HIF-1αを活性化することが示されているが、その生理学的意義は明らかでない。</p>			
<p>我々は、骨格筋のブドウ糖取り込み制御におけるHIF-1αの役割を明らかにすることを目的とした。</p>			
材 料 ・ 方 法			
<p>マウス C2C12 筋芽細胞を、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)にて 100%コンフルエントまで培養後、5%ウマ血清含有 DMEM への置換によって筋管細胞への分化を誘導した。5-7 日後、筋管細胞への分化を、管状多核細胞への形態変化の検鏡観察、ならびに分化マーカーであるミオゲニンの発現のウエスタンブロット法での検出によって確認した。HIF-1α蛋白質発現は、ウエスタンブロット法を用いて検討した。C2C12 筋管細胞及びマウス骨格筋におけるブドウ糖取り込みは、RI 標識した 2-Deoxy-D-glucose (DOG)を用いて、細胞内放射活性の測定により解析した。糖輸送担体グルコーストランスポーター4(GLUT4)の細胞膜への移動は、細胞膜分画を用いたウエスタンブロット法で検討した。</p>			
成 績			
<p>1) インスリンは、正常酸素濃度条件下の培養マウス C2C12 筋管細胞において、HIF-1α蛋白の発現を増強させた。</p>			

- 2) RNA 干渉法を用いて作成した HIF-1 α ノックダウン C2C12 筋管細胞(Δ HIF C2C12 筋管細胞)において、インスリン依存性ブドウ糖取り込み及び GLUT4 の細胞膜移行の著明な減少を認めた。
- 3) C2C12 筋管細胞において、インスリン、アディポネクチンは各々 GLUT4 の細胞膜移行及びブドウ糖取り込みを増加させ、両者の投与により相加的な増強を認めた。また正常酸素濃度下の C2C12 筋管細胞において、アディポネクチンは単独で HIF-1 α 蛋白の発現を増加させ、インスリンとの共存下でさらにその発現は増強された。 Δ HIF C2C12 筋管細胞においては、アディポネクチンによるインスリンと共同したブドウ糖取り込みの著明な減少を認めた。
- 4) Δ HIF C2C12 筋管細胞において、インスリンによる insulin receptor substrate-1(IRS-1)、Akt/protein kinase B のリン酸化は、C2C12 筋管細胞と同等に観察された。しかしながら、Akt のリン酸化標的である Akt substrate of 160kDa (AS160)のリン酸化は、 Δ HIF C2C12 筋管細胞において著明に減少していた。
- 5) Δ HIF C2C12 筋管細胞において、5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside による、AMP activated protein kinase (AMPK) を介した GLUT4 の細胞膜移行が抑制された。
- 6) HIF-1 α ヘテロノックアウトマウス由来の骨格筋におけるインスリン依存性ブドウ糖取り込みは、野生型マウス由来の骨格筋における取り込みに比し、有意に低下していた。

考 案

インスリンは、ブドウ糖代謝をはじめとする生体のエネルギー代謝の制御において中心的な役割を果たす。線維芽細胞などにおいて、インスリンが HIF-1 α 蛋白及びその標的遺伝子の発現を増加させる事が示されている。また、インスリンによって誘導される遺伝子の一部は、低酸素によっても誘導されることが示されており、インスリンによるシグナル伝達経路が、HIF-1 を介したシグナル伝達経路と一部重複する可能性が示唆されている。一方、膵 β 細胞においては、HIF-1 α 蛋白発現が、ブドウ糖刺激によるインスリン分泌に重要な働きをしていることが示されている。さらに、HIF-1 α 蛋白の分解制御にかかわる von Hippel-Lindau 癌抑制遺伝子の欠損は、ブドウ糖による膵 β 細胞のインスリン分泌に障害をもたらすとの報告もある。すなわち、生体におけるインスリン作用の調節、インスリン分泌の調節において、HIF-1 α が重要な役割を果たしている事が明らかにされつつあるが、その詳細は明らかでない。

今回我々は、骨格筋において、インスリンによる GLUT4 の細胞膜移行及びブドウ糖取り込みに HIF-1 α 蛋白が関与している事を明らかにし、HIF-1 α が骨格筋のインスリン感受性を規定する因子である可能性を示した。アディポネクチンは、脂肪細胞由来の生理活性物質であり、末梢組織のブドウ糖取り込みを増強させる作用を示す。従来、アディポネクチンの作用は、AMP-activated kinase (AMPK)の活性化を介している事が示されていた。今回の検討において、アディポネクチンがインスリンと共同して HIF-1 α 発現を誘導することが示された。さらに、 Δ HIF C2C12 筋管細胞において、アディポネクチンによるブドウ糖取り込み増強作用が観察されなかった事より、インスリン存在化でのアディポネクチンによるブドウ糖取り込みに、HIF-1 α 蛋白が関与していることが示唆された。

一方、骨格筋における HIF-1 α 蛋白によるインスリン作用制御のメカニズムとして、AS160 のリン酸化の抑制が関与する事が示された。AS160 は Rab-GTPase-activating protein (GAP)であり、GTP の加水分解により GLUT4 の膜輸送制御に関わる Rab 蛋白を非活性化する。インスリン刺激下の細胞では、Akt を介した AS160 のリン酸化によって GAP 活性が抑制され、GLUT4 が細胞膜へ移行し、ブドウ糖が取り込まれると考えられている。AS160 は、インスリン依存性の経路に加え、骨格筋収縮やエネルギー不足に応答した、AMPK 経路を介するブドウ糖取り込みの制御にも係わる事が示されている。今回、AMPK 経路による GLUT4 の細胞膜移行にも HIF-1 α が寄与することが明らかにされ、HIF-1 α が骨格筋でのエネルギー代謝の制御に広く関与している可能性が示唆された。

結 論

HIF-1 α は、骨格筋においてインスリン依存性のブドウ糖取込み制御に重要な役割を果たし、生体のインスリン感受性を規定する因子である可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B.
Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. EMBO J. 1998 Sep 1;17(17):5085-94.
2. Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T.
Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. Mol Cell Biol. 2007 May;27(9):3253-65. Epub 2007 Feb 26.
3. Chavez JA, Roach WG, Keller SR, Lane WS, Lienhard GE.
Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. J Biol Chem. 283:9187-95, 2008

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	坂上英充
審査委員 奥村利勝 (適)・否 (印)			
審査委員 高井章 (適)・否 (印)			
審査委員 羽田勝計 (適)・否 (印)			
学位論文題目			
Role of HIF-1a in regulation of insulin sensitivity in the skeletal muscle (骨格筋のインスリン感受性における HIF-1a の役割)			

低酸素で活性化される低酸素誘導性転写因子Hypoxia inducible factor-1a (HIF-1a) は、正常酸素環境下においても、サイトカインなどによりHIF-1aが活性化されることが明らかにされつつあり、低酸素応答のみならず、広く細胞代謝・機能制御におけるHIF-1aの役割が注目されている。最近インスリンが、HIF-1aを活性化することが示されているが、その生理学的意義は明らかでない。申請者は、骨格筋のブドウ糖取り込みにHIF-1aが関与する可能性を検証した。

実験にはマウス C2C12 筋芽細胞を筋管細胞へ分化させ骨格筋のモデル細胞とした。HIF-1a 蛋白質発現は、ウエスタンブロット法を用いて検討した。C2C12 筋管細胞及びマウス骨格筋におけるブドウ糖取り込みは、RI 標識した 2-Deoxy-D-glucose (DOG) を用いて、細胞内放射活性の測定により解析した。糖輸送担体グルコーストランスポーター4 (GLUT4) の細胞膜への移動は、細胞膜分画を用いたウエスタンブロット法で検討した。

得られた主な成績は下記の通り

- 1) インスリンは、C2C12 筋管細胞において、HIF-1a 蛋白質の発現を増強させた。
- 2) HIF-1a ノックダウン C2C12 筋管細胞 (Δ HIF C2C12 筋管細胞) において、インスリン依存性糖取り込み及び GLUT4 の細胞膜移行の著明な減少を認めた。
- 3) HIF-1a ヘテロノックアウトマウス由来の骨格筋におけるインスリン依存性糖取り込みは、野生型マウス由来の骨格筋における取り込みに比し、有意に低下していた。

以上より、HIF-1a は、骨格筋においてインスリン依存性のブドウ糖取り込み制御に重要な役割を果たし、生体のインスリン感受性を規定する因子である可能性を始めて示唆した。これらの知見は、糖代謝における HIF-1 の意義を明らかにしたことに加えて、骨格筋への糖の取り込みが病態に深く関わる糖尿病の病態理解にも貢献する臨床的にも極めて有意義な研究成果である。論文提出者は関連領域に関する質問にも十分な知識を背景に不足なく返答した。以上総合して、学位論文として必要十分と判断した。