

論文内容の要旨

**PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signalling and optimising gluconeogenesis and insulin signalling in hepatocytes**

プロリン水酸化酵素 (PHD3) は肝細胞において炎症応答反応を制御し、糖新生やインスリンシグナルの調節因子として機能する

日本医科大学大学院医学研究科 生体機能制御学  
大学院生 矢野宏行

**SCIENTIFIC REPORTS** (2018)8:14290 DOI:10.1038/s41598-018-32575-z 掲載

## 【背景】

2型糖尿病では肝臓におけるインスリン抵抗性により肝糖新生が過剰に亢進し、慢性高血糖を引き起こす原因となる。そのため肝糖新生の抑制は病態に基づく2型糖尿病の治療戦略であり、その分子メカニズムの解明は重要な課題である。

我々は絶食時に発現が誘導される **CITED2** が、ヒストンアセチル化酵素 **GCN5**、**PKA** とともにモジュールを形成し、糖新生を促進することを報告してきた。そこで **cDNA** マイクロアレイを用いて、絶食時に発現が誘導され、**CITED2** と協調的に発現が制御される遺伝子を網羅的に解析したところ、低酸素誘導因子 **HIF** のプロリン水酸化酵素である **PHD3** が得られた。この分子が肝細胞において糖代謝を制御し得る分子である可能性を考え、検討を重ねた。

## 【方法】

12週齢相当の雄マウスより初代培養肝細胞を単離し、アデノウイルスベクターを用いた **shRNA** により **PHD3** をノックダウンした。この細胞を用いて、糖新生やインスリンシグナル、炎症応答反応に関連する遺伝子群を **qPCR** 法で検討するとともに、タンパクレベルでの変化を **Westernblot** 法で検討した。またこれらで観察された現象が **PHD3** の酵素活性に依存するかを検討するため **PHD3** を強発現するウイルスベクターを作製し(野生型と酵素活性欠失型)、ノックダウンした細胞に入れ戻し検討した。また **PHD3** を急性ノックダウンしたときにみられる現象と慢性にノックアウトされた細胞での現象を比較検討するため、肝臓特異的 **PHD3** ノックアウトマウスを作製し、12週齢相当の雄マウスから初代培養肝細胞を単離し同様の検討を行った。

## 【結果】

絶食シグナルである **cAMP** 刺激により糖新生系酵素(**G6pc**, **Pck1**)の発現に与える影響を検討したところ、**PHD3** をノックダウンした細胞では糖新生系酵素の発現はいずれも70%程度抑制された。また強発現ウイルスでの入れ戻し実験により、この現象には **PHD3** の酵素活性が必要であることが分かった。肝細胞からの糖産生自体を検討したところ、糖新生系酵素の発現と同様にノックダウンで減少し、**PHD3** の酵素活性に依存していた。

インスリンシグナルについても検討を行った。**PHD3** ノックダウンではインスリン刺激によるインスリン受容体基質(**IRS1/IRS2**)のチロシンリン酸化が障害され、その下流の **AKT**, **GSK** のリン酸化も障害されていた。この現象が **PHD3** の酵素活性に依存するか否か検討を行ったところ、野生型 **PHD3** を入れ戻しても、活性欠失型 **PHD3** を入れ戻しても同様にインスリンシグナルは回復した。つまり **PHD3** のインスリンシグナルへの影響は酵素活性に依存しなかった。

インスリンシグナルが障害される原因として炎症応答反応の関与が知られることから、これらについて検討をおこなった。**PHD3** ノックダウンでは **LPS** の刺激の有無に関わらず、

TNF $\alpha$ , IL-6, iNOS などの炎症関連遺伝子の発現が亢進していた。これらの発現に関与する経路を Westernblot 法により検討したところ NF $\kappa$ B, JNK, STAT を含むシグナルの亢進がみられた。また強発現ウイルスによる入れ戻しの検討では PHD3 の酵素活性には依存しないという結果であった。

#### 【考察】

今回我々の行った検討では PHD3 は Glucagon-cAMP シグナルで誘導され、GCN5-CITED2-PKA モジュールにより発現調節を受けていた。PHD3 は絶食シグナルである cAMP により低酸素刺激と同程度に誘導された。PHD3 の機能抑制では、糖新生系酵素の発現は減弱し、インスリンシグナルは障害された。前者には PHD3 の持つ酵素活性が必要であり、後者には必要無かった。また PHD3 の機能抑制では NF $\kappa$ B シグナルの亢進がみられ、炎症関連遺伝子の発現は顕著に亢進した。

既報では PHD3 ノックアウトマウスにおいてインスリンシグナルは亢進し、糖新生を抑制することで糖代謝を改善すると報告されている。しかし我々の検討では糖新生を抑制するという結果は同様であったが、インスリンシグナルに対する作用は逆であった。これは既報では主にマウス個体を用いた *in vivo* での検討であるのに対して、我々は主に肝細胞を用いた *in vitro* での検討であったこと、および既報でみられた PHD3 ノックアウトによる HIF2 の発現亢進が、我々の急性ノックアウトモデルでは再現されなかったことが影響していると思われる。

#### 【結論】

今回の我々の検討から、肝細胞において絶食シグナルで誘導される PHD3 は糖新生の促進、インスリンシグナルの維持、炎症応答の抑制など多岐に関与する重要な分子であることが明らかとなった。今後は *in vivo* において更なる PHD3 の機能解析が必要であると考えている。