

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19527

研究課題名(和文)オートファジーによる糖尿病発症・進展の抑制

研究課題名(英文)Interventions in Autophagy suppress the development and progression of diabetes.

研究代表者

小宮 幸次(komiya, koji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50385077

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)：糖尿病のオートファジー(AP)不全による膵細胞障害を報告した。本研究では生体内APをモニターするマーカーを同定し、AP抑制因子のRubicon(Rb)の抑制がオートファジーを促進し膵細胞機能障害を抑制するか検討する。

AP不全膵細胞株の検討よりProteasome subunit(PMS)を同定し、膵細胞特異的AP不全マウスの血中PMSの上昇を確認した。PMSは膵細胞のAP不全を反映するマーカーの候補と考えられた。今後は特異性に関する検討が必要である。

定常状態の膵細胞株、マウスにおいてRbを抑制してもAPの促進は認めなかった。今後はAP不全状態の細胞・マウスでの検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We reported that the insufficiency of Autophagy (AP) impaired beta-cell functions. The purpose of this study is to identify the marker for monitoring AP in vivo. Moreover, this study examines that the AP's function enhanced by the suppression of Rubicon (Rb), AP inhibitor, improves beta-cell function.

We detected proteasome subunit (PMS) in the culture medium of AP deficient beta-cell lines. In addition, we recognized an increase in the amount of PMS in the serum of beta-cell specific AP deficient mice. The results suggest that PMS is one of the markers for monitoring AP in vivo. From now on, the investigation of the specificity will be needed.

To suppress Rb did not enhance the function of AP in a steady-state beta-cell lines or mice. Looking ahead, we will verify it in an AP failure conditions.

研究分野：代謝内分泌

キーワード：糖尿病 オートファジー バイオマーカー Rubicon 膵細胞障害 プロテアソームアルファサブユニット6

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は本邦のみならず世界的にみても増加傾向にあり、合併症による死亡・生活の質の低下および医療経済に多大なる損害を与えており、その克服は重要な課題である。糖尿病の自然史において血糖上昇に先行して膵細胞の機能障害が惹起することが以前より知られており、膵細胞障害の進行により高血糖が顕性化してくる。いわば糖尿病は膵細胞障害の進行性の疾患と捉えることができ、膵細胞障害の進行を抑制・阻止する事が糖尿病における重要な治療戦略の一つと位置づけられる。従来は治療戦略として、膵細胞機能を血糖値や血中インスリン濃度より類推または予測式により評価し、病態に対して適当と思われる薬剤選択が行われてきた。しかし膵細胞障害を評価することは困難であり、また従来は膵細胞障害の進行を完全に抑制することは出来ない。膵細胞障害を評価する新たなマーカーと、膵細胞障害の進行を抑制する新たな治療戦略が必要と考えられる。そこで当研究室では膵細胞障害のメカニズムとしてオートファジーに着目し研究を進めてきた。オートファジーは蛋白分解機構の一つであり種々な疾患との関連性が報告されており、当研究室は世界に先駆けて膵細胞の機能維持にオートファジーが必須であること (Ebato et al. Cell Metab 8: p325, 2008)、ヒト化マウスを用いてオートファジー不全がIAPP蓄積を介して膵細胞障害を引き起こすことを見出した (Shigihara et al. J Clin Invest 124: p3634)。さらにヒト2型糖尿病の膵細胞においてオートファジー不全を示唆する所見を見出した (Abe et al. Endocrinology 154: p4512, 2013)。同様の報告は国内外の別のグループからも報告されており、従来から膵細胞障害を引き起こすと考えられている高血糖、高脂肪酸、酸化ストレス、小胞体ストレスとオートファジー不全との相互作用も報告されており、膵細胞障害の進行とオートファジー不全との関連性は確固たるものとして捉えられている。当研究室はモデル動物の検討より、肥満などに対して膵細胞機能が代償的に増大している時にはオートファジーの促進が認められ、膵細胞機能障害により代償不全に陥った時にはオートファジーが低下していると想定している (Abe et al. Endocrinology 154: p4512, 2013)。従って生体におけるオートファジーの状態は膵細胞の状態を反映し、オートファジー不全への介入は糖尿病治療における新たな治療戦略となりえると考えられる。

2. 研究の目的

オートファジーを病態のメカニズムとして検討した報告は糖尿病以外の疾患も含め多数存在するが、疾患の病態評価・治療手段としてオートファジーの有用性を解明した検討は今までになかった。

膵細胞機能障害の指標となりえるオートファジー不全のマーカーを見出し、オートファジー不全に介入することが可能となれば、新たな糖尿病治療戦略の一つとなりえる。すなわち、新たに見出されたマーカーをモデル動物においてモニタリングすることにより、オートファジー促進により膵細胞機能が代償的に増大している時期とそれに引き続いて生じると想定されるオートファジー不全による膵細胞の機能障害の時期を判別することが可能となる。見出されたオートファジー不全に対して介入することで糖尿病モデル動物における膵細胞障害を抑制し、高血糖への進行抑制が可能になると予想される。その意義は、ヒトにおいて膵細胞のオートファジーを評価することで、オートファジー不全による膵細胞障害の惹起を発見することが可能となる。先に述べたように膵細胞障害は高血糖に先立って惹起されることが知られているため、現在の糖尿病の診断に用いられている血糖やHbA1cよりも早期に糖尿病への進行を予測することが可能となる。また見出されたオートファジー不全に対して介入することにより膵細胞障害に対して従来の薬物治療より早期に糖尿病進行抑制に介入が可能となり、より長期間にわたり膵細胞機能を維持することが可能となる。膵細胞の障害抑制及び機能維持が可能となればより長期間にわたり血糖の恒常性を保つことが可能となり、高血糖により惹起される様々な合併症による生命予後の短縮や生活の質の低下、医療経済への圧迫を改善できるものと考えられる (図1)。

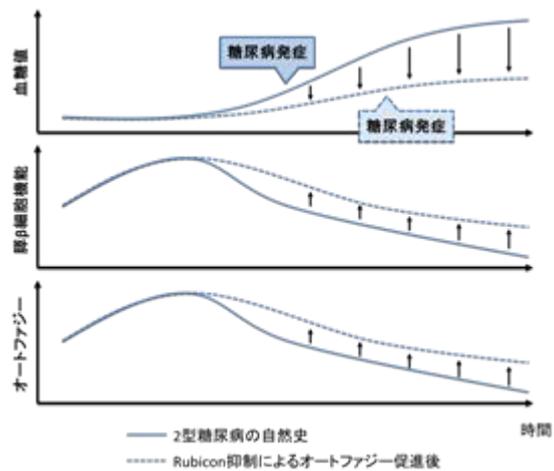


図 1

しかし、従来のオートファジー評価方法は in vitro での評価が中心であり、in vivo において評価するためには臓器を摘出し評価する必要があり、生体におけるモニタリングは困難であった。

また従来よりオートファジーの促進物質として利用されている Rapamycin は様々な細胞機能制御を司る mTOR を阻害するため特異性が低く治療薬として適切ではなかった。そ

ここで新たなオートファジー調整分子として Rubicon が報告された。オートファジーはオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜により器質を取り囲み、オートファゴソームにリソソームが融合することで器質を分解する機構である。オートファゴソームの形成およびリソソームの融合に重要な役割を果たす Beclin-1 複合体に Rubicon は結合し、オートファゴソームとリソソームの融合を抑制する。すなわち Rubicon はオートファジーを負に制御する因子であり、Rubicon を抑制することによりオートファジーが促進されることが報告されている (Matsunaga et al. Nat Cell Biol 11: p385, 2009)。

そこで本研究では以下の2点を明らかにする。(1)生体においてモニタリング可能なオートファジー不全マーカーを確立する。(2)Rubicon 抑制によるオートファジー促進が、膵細胞障害進行を抑制することを証明する。

3. 研究の方法

(1) オートファジー不全膵細胞株の作成
膵細胞株である INS-1 細胞株に対して、テトラサイクリン誘導性 SiRNA を用いてオートファジー実行分子である Atg7 の遺伝子発現の抑制を行い、オートファジー不全膵細胞株の作成を行った。テトラサイクリン添加後 5-7 日目に細胞を回収し、RT-PCR および Western blotting 法により Atg7 の遺伝子発現および蛋白発現の低下を確認した。またオートファジー不全において蓄積する蛋白である p62 の蓄積の確認も行い、細胞株におけるオートファジー不全を確認した。

(2) 培養液中の蛋白解析
前項で作成した INS-1 細胞にテトラサイクリンを添加した細胞 (INS-1 Atg7 KD) と溶媒のみを添加した細胞 (INS-1 WT) をそれぞれ 7 日間培養したのちに、その培養液を回収し、遠心分離および膜濾過を用いて、培養液中の蛋白の抽出を行った。抽出した蛋白を 1 次元電気泳動、2 次元電気泳動にて分離し、銀染色にて蛋白量の反定量評価を行った。INS-1 Atg7 KD において増加しているバンドおよびスポットより蛋白を抽出し、質量解析にて蛋白の同定を行った (Yamamoto et al. Biochem Biophys Res Commun: Epub, 2014)。

(3) Western Blotting 法による蛋白量評価
前述のように INS-1 細胞培養液中の蛋白を抽出し、抗 proteasome subunit alpha (PSMA) 6 抗体および抗 PSMA1-3,5-7 抗体を用いて Western Blotting 法によりそれぞれの蛋白量を評価した。また Rat insulin promoter (RIP) 下に Cre を発現させた Cre-LoxP システムを用いて、膵細胞特異的に Atg7 をノックアウトした膵細胞特異的オートファジー不全マウス (Atg7 KD マウス) の心腔内より血漿を採取し、同様に

PSMA6 および PSMA1-3,5-7 の蛋白量の評価を行った。

(4) Rubicon ノックダウン膵細胞株の作成
膵細胞株である MIN-6 細胞に対して SiRNA を用いて Rubicon をノックダウンし、Rubicon ノックダウン膵細胞株 (MIN6 Rb KD) を作成した。SiRNA 導入後 5 日目で細胞を回収し、RT-PCR にて Rubicon 遺伝子発現の評価を行い、約 80% 程度のノックダウン効率を確認した。

(5) 細胞株におけるオートファジー評価
SiRNA にて Rubicon をノックダウンした MIN6 細胞を 7 日間培養したのちに細胞を回収し、蛋白を抽出した。オートファジー機能評価としてオートファジー不全の際に蓄積することが知られている p62 の蛋白量を Western Blotting 法を用いて評価した。またオートファゴソームは最終的にリソソームにより分解されるが、リソソーム阻害薬添加後にオートファゴソームを構成する LC3-II の蛋白量を評価することによりオートファゴソームの形成促進 (オートファジーフラックス) を評価することができる (Komiya et al. Biochem Biophys Res Commun 401: p561, 2010)。SiRNA 導入後 7 日目にリソソーム阻害薬である E64d, pepstatin-A を 2 時間添加した後に細胞を回収し、Western Blotting 法により LC3-II の蛋白量の評価を行い、リソソーム阻害薬を添加していない細胞との比較からオートファジーフラックスの評価を行った。

(6) Rubicon ノックアウトマウスの耐糖能評価
大阪大学大学院生命機能研究科の吉森保教授より供与頂いた全身 Rubicon ノックアウトマウスの体重、随時血糖測定および腹腔内糖負荷試験、インスリン負荷試験により耐糖能評価を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞株におけるオートファジー不全マーカーの検討
INS-1 Atg7 KD の培養液中の蛋白解析において、1 次元電気泳動および 2 次元電気泳動の両者において、INS-1 WT と比較して 27kD 付近の蛋白の増加が認められた (図 2)。

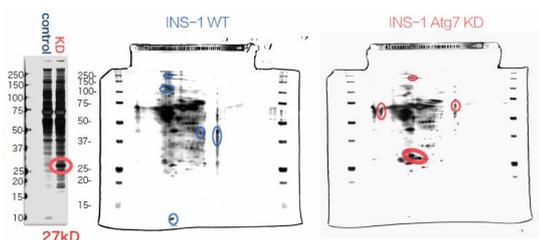


図 2

同部位から抽出した蛋白の質量解析において PSMA6 が同定された。PSMA6 抗体を用いた Western Blotting 法において INS-1 Atg7 KD の培養液中において PSMA6 蛋白量の増加が認められた (図 3)。

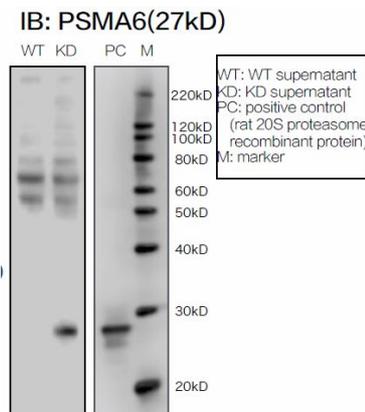


図 3

(2) 膵 細胞特異的オートファジー不全マウスの血漿における検討

In vitro の検討において PSMA6 が同定されたため、in vivo における検討を行った。Atg7 KD マウスの血漿中の PSMA6 の蛋白量を Western Blotting にて評価したところ、対照マウス (WT) と比較して PSMA6 蛋白量の増加は認められなかった。Western Blotting による PSMA6 検出がきわめて低かったため検出系の問題も考慮し、PSMA1-3,5-7 全体の蛋白量の評価を行った。WT と比較して Atg7 KD マウスの血漿において蛋白量の増加が認められた (図 4)。

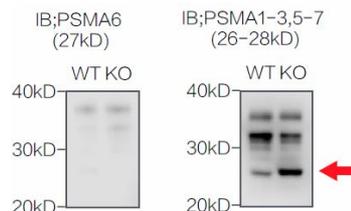


図 4

細胞株と動物実験における結果の差異は検出系の感度による可能性のほか、動物実験において認められた結果が膵 細胞特異的オートファジー不全による直接的な結果ではなく、2 次的な結果を反映している可能性も考慮する必要があると考えられた。2 次的な結果であったとしても膵 細胞特異的オートファジー不全に特異的な結果であればマーカーとしての有用性は高いものと考えられるので、今後、特異性に関する検討が必要と考えられた。

(3) 膵 細胞株における Rubicon ノックダウンがオートファジーに与える影響

膵 細胞においても Rubicon 抑制によりオートファジーが促進されるかを検討するため、膵 細胞株である MIN6 細胞の Rubicon 遺伝

子発現のノックダウンし、オートファジーの評価を行った。MIN6 Rb KD の p62 蛋白量は対照細胞株と比較して減少は認められなかった。また MIN6 Rb KD のオートファジーフラックスの評価では対照細胞株と比較してオートファジーフラックスの亢進は認められなかった。以上より本検討では膵 細胞株において Rubicon を抑制してもオートファジーの促進は認められなかった。しかし対照細胞株において p62 の蓄積が非常に弱かったことから、通常培養における MIN-6 細胞株ではオートファジー不全がないために、Rubicon ノックダウンによるオートファジー促進が認められなかった可能性が考えられた。オートファジーを抑制した状態の膵 細胞株に対して Rubicon ノックダウンを行う必要があるが、完全にオートファジーを抑制した状態では Rubicon ノックダウンによる促進が認められない可能性が高いと考えられる。Atg7 のようなオートファジー実行分子のノックダウンによるオートファジー抑制やリソソーム阻害薬や 3-MA などの薬剤によるオートファジー阻害はオートファジーが強く抑制されるため不适当と考えられた。以上より膵 細胞株において Rubicon ノックダウンによるオートファジー促進効果を検討するのは困難と考えられた。

(4) 全身 Rubicon ノックアウトマウスの耐糖能評価

我々は以前の検討において高脂肪食負荷マウスや糖尿病モデル動物である db/db マウスの膵島においてオートファジー不全が認められる事を見出しているため、これらのモデル動物の Rubicon を抑制することによりオートファジー不全の回復が認められるかを検討することとした。それに先立ち、全身 Rubicon ノックアウトマウスの耐糖能評価を行った。全身 Rubicon ノックアウトマウスの通常飼育下における体重、随時血糖、20 週齢において施行した腹腔内糖負荷試験での血糖に統計学的に有意な差は認められなかった (図 5)。20 週齢に施行したインスリン負荷試験においてインスリン感受性に有意な差は認められなかった (図 5)。高脂肪食負荷により同様の検討を行ったが有意な差は認められなかった (図 5)。

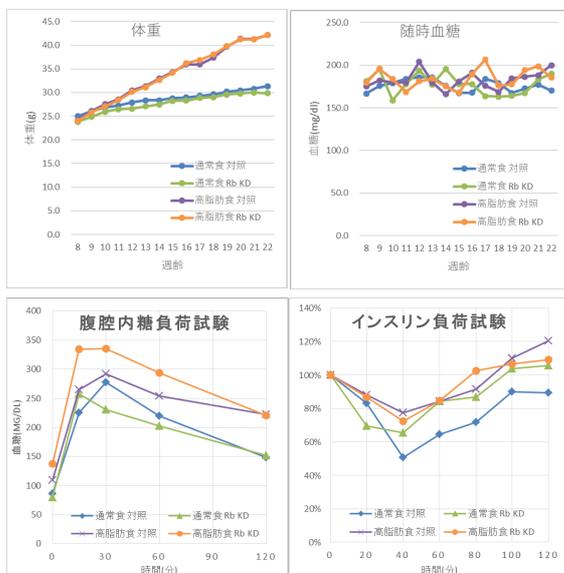


図 5

以上より通常飼育および高脂肪食負荷において全身 Rubicon ノックアウトマウスの耐糖能に対照マウスと比較して有意な差は認められなかった。今後は膵細胞特異的 Rubicon ノックアウトの耐糖能評価が必要と考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮 幸次 (KOMIYA, Koji)

順天堂大学大学院・医学研究科・代謝内分
泌内科学・准教授

研究者番号：50385077