

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09848

研究課題名(和文) 膵 細胞特異的オートファジー不全マウスの作製とその機能解析

研究課題名(英文) Cellular autophagy in alpha cells plays a role in the maintenance of islet architecture.

研究代表者

後藤 広昌 (Goto, Hiromasa)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90622746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質分解経路の1つであるオートファジーは様々な組織の恒常性維持に不可欠であることが報告されている。最近、膵 細胞からのグルカゴン分泌異常が糖尿病の病態を修飾することが明らかとなってきたが、膵 細胞においてオートファジー機構がどのような役割を果たしているのか未解明である。

そこで膵 細胞特異的にオートファジー不全を誘導する遺伝子改変マウス(Atg7KOマウス)を作製したところ、Atg7KOマウスの膵島の一部では細胞の多層化を伴う過形成を認め、膵島の形態異常が起きることが明らかとなった。このことはオートファジー機構が細胞の形態維持に不可欠であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質分解経路の1つであるオートファジーは免疫応答、発癌抑制といった病態において重要な役割を果たすことが知られている。最近、膵 細胞からのグルカゴン分泌異常が糖尿病の病態を修飾することが明らかとなってきたが、膵 細胞においてオートファジー機構がどのような役割を果たしているのか未解明である。

そこで膵 細胞特異的にオートファジー不全を誘導する遺伝子改変マウスを作製した結果、同マウスの膵島の一部では細胞の過形成を認め、膵島の形態異常が起きることが明らかとなった。このことはオートファジー機構が細胞の恒常性維持に不可欠であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is known to play a pivotal role in intracellular protein quality control. Whereas autophagy is essential for maintaining α -cell function in pancreatic islets, it remains unclear as to how the cellular autophagy affects the homeostasis and function of glucagon-secreting α cells.

To investigate the role of autophagy in α cells, we generated a mutant mouse model lacking Atg7, a key molecule for autophagosome formation, specifically in α cells. Histological analysis demonstrated more glucagon-positive cells, with a multilayered structure, in the islets under Atg7 deficiency, although metabolic profiles, such as body weight, blood glucose, and plasma glucagon levels were comparable between Atg7-deficient mice and control littermates. These findings suggest that α -cell autophagy plays a role in maintaining α -cell area and normal islet architecture but appears to be dispensable for metabolic homeostasis.

研究分野：内分泌学

キーワード：細胞 オートファジー グルカゴン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーはタンパク質分解経路の1つであり、飢餓時に起こるアミノ酸分解産物等の産生や、細胞質内機能維持のための細胞内浄化・品質管理の役割を持ち、生体の恒常性維持に重要な働きを担っている。本研究室では糖尿病の病態解明・予後改善を目標とし、病態の根幹である膵β細胞不全に焦点を当てて研究してきた。そうした中でβ細胞におけるオートファジーの重要性に着目し、膵β細胞特異的に *Atg7* (オートファジー関連遺伝子の1つ) を欠失させたオートファジー不全マウスでは、β細胞の空胞変性・p62の蓄積・ミトコンドリア形態異常が生じ、膵β細胞の増殖、細胞死調節機構が障害され、インスリン分泌不全が認められること(Ebato C et al. *Cell Metab* 8: 325-332, 2008) (Shigihara et al. *J Clin Invest*. 124: 3634-3644, 2014)や、2型糖尿病患者の膵β細胞においてオートファジー不全が認められることを報告し(Abe H et al. *Endocrinology* 154: 4512-4524, 2013)、β細胞の恒常性維持や糖尿病病態にオートファジーが関与していることを明らかにしてきた。

糖尿病はβ細胞におけるインスリン分泌不全および肝や骨格筋でのインスリン抵抗性が重要な病因と考えられ、膵内分泌細胞の中ではβ細胞を中心に解析されてきた。しかし近年この病態を修飾する因子として、β細胞に隣接して存在する膵α細胞からのグルカゴン分泌の重要性が報告されている。グルカゴンは低血糖時に分泌が刺激され、肝臓におけるグリコーゲン分解、糖新生促進により血糖値を上昇させる作用を有し、インスリンと対をなすような役割を担っている。糖尿病患者では高グルカゴン血症が認められること、β細胞をストレプトゾトシン(STZ)で破壊した糖尿病モデルマウスにおいてグルカゴンシグナルを阻害すると血糖値が著しく改善したこと(Lee Y et al. *Diabetes* 60:391-397, 2011)から、グルカゴン分泌異常もまた糖尿病の病態に深く関与することが徐々に明らかとなっている。このような背景の下、グルカゴン受容体拮抗薬が治験段階にあり、グルカゴン分泌の制御が糖尿病の新たな治療戦略の一つとして注目されている。しかし生理的条件下においてグルカゴン分泌がどのようにして制御されているのか、また糖尿病状態においてグルカゴン分泌異常がどのようにして起きるのか、その分子機構の全容は未だ明らかではない。

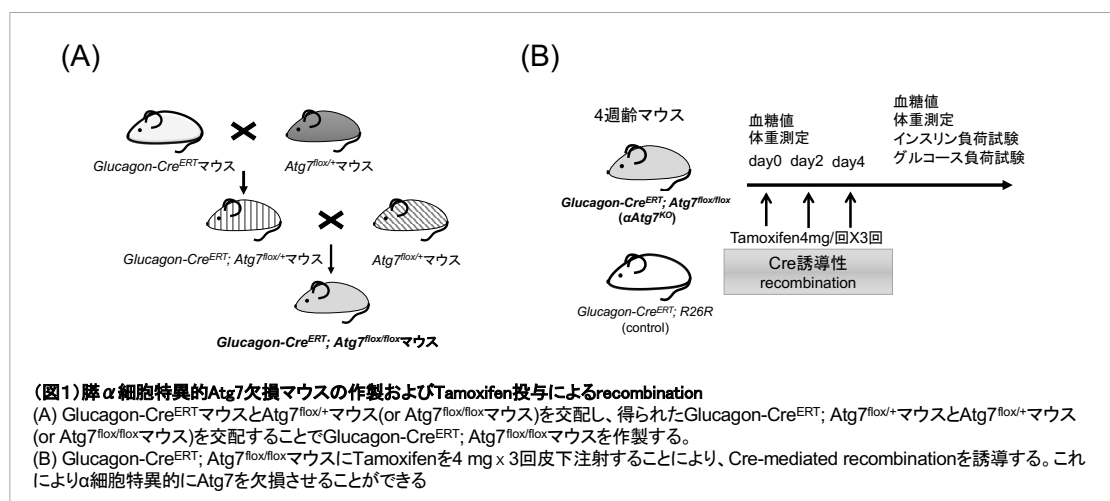
2. 研究の目的

生理的条件下および代謝ストレス下におけるα細胞の autophagy status を解析し、さらにα細胞特異的オートファジー不全モデルマウスを作製することにより、上記問題を明らかにする。

3. 研究の方法

(3A) autophagy status を可視化するためのレポーターマウス“GFP-LC3 マウス”の膵島を顕微鏡下で観察することによりα細胞の autophagy status を明らかにする。

(3B) オートファジー機能維持に不可欠な遺伝子 *Atg7* を膵α細胞特異的に欠失させた遺伝子改変マウス(α*Atg7*KO)マウスを作製し(図1)、その表現系を解析する。



4. 研究成果

成体 GFP-LC3 マウスの膵臓を摘出、凍結切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、絶食により α 細胞内に GFP puncta が集積することを見出した。

α Atg7KO マウス膵臓を摘出、パラフィン切片を作成し、抗 p62 抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、 α 細胞特異的に p62 陽性の凝集塊を認め、 α 細胞特異的にオートファジー不全が誘導されていることが確認された。 α Atg7KO マウスの膵島の一部では α 細胞の多層化を伴う過形成を認め、膵島の形態異常を認めた。Ki67 陽性細胞数は α Atg7KO マウスにおいて有意に低下しており、また α 細胞死の抑制を認めないことから、膵島の過形成は α 細胞の自己複製の亢進や細胞死の抑制によるものではなく、 α 細胞新生亢進が関与している可能性が示唆された。一方、随時血糖、グルカゴン分泌、体重の推移は α Atg7KO マウスと対象マウスとの間に有意な変化を認めなかった。以上の結果は α 細胞におけるオートファジーの恒常性維持が α 細胞容量の恒常性および膵島の形態形成に何らかの役割を果たしていることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Himuro Miwa, Miyatsuka Takeshi, Suzuki Luka, Miura Masaki, Katahira Takehiro, Goto Hiromasa, Nishida Yuya, Sasaki Shugo, Koike Masato, Shiota Chiyo, Gittes George K, Fujitani Yoshio, Watada Hirotaka	4. 巻 3
2. 論文標題 Cellular autophagy in cells plays a role in the maintenance of islet architecture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 1979-1992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/js.2019-00075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 3.Himuro M., Miyatsuka T., Suzuki L., Miura M., Katahira T., Goto H., Nishida Y., Sasaki S., Fujitani Y., Watada H.
2. 発表標題 Exploring the Role of Autophagy in Pancreatic Alpha Cells
3. 学会等名 79th American Diabetes Association（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	綿田 裕孝 (Watada Hirotaka) (60343480)	順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・教授 (32620)	
研究分担者	宮塚 健 (Miyatsuka Takeshi) (60622363)	順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授 (32620)	