

令和 2 年 6 月 2 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：17K09849

研究課題名(和文) 膵細胞特異的・時期誘導性オートファジー不全モデルマウスの作製とその機能解析

研究課題名(英文) Autophagy deficiency cumulatively causes beta-cell failure.

研究代表者

小宮 幸次 (Komiya, Koji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：50385077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは蛋白分解機構の一つであり、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。以前我々はオートファジー不全がインスリン分泌不全を引き起こすことを見出したが、その背景にある分子機構は不明である。そこで本研究では細胞特異的かつ時期特異的にオートファジー不全を誘導できる*i* Atg7KOマウスを作製した。2週間のオートファジー不全では細胞機能に影響を与えず、長期(6週間)になって初めてインスリン分泌不全を発症することが明らかとなった。さらに、*i* Atg7KOマウス膵島を用いたRNA sequencingを行い、オートファジー不全に伴い発現が誘導される新規遺伝子Sprr1aを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは生体の恒常性維持に不可欠である。我々はオートファジー不全がインスリン分泌低下を伴う糖尿病を引き起こすことを明らかにしてきたが、その背景にある分子機構は不明である。今回オートファジー不全の誘導時期を制御できる遺伝子改変マウスを作製し、オートファジー不全発症後しばらくは糖尿病を発症せず、不全状態が長期化することにより著しい高血糖を発症することを見出した。さらにオートファジー不全に伴い発現が誘導される新規遺伝子Sprr1aを同定した。これらの知見はオートファジー不全と糖尿病発症とを繋ぐ分子機構を解明する一助となる可能性がある。この成果をもとに糖尿病に対する新規治療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is known to play a pivotal role in intracellular quality control through the degradation of damaged organelles and components. We previously reported that  $\beta$ -cell specific autophagy deficient mice exhibited impaired glucose tolerance, although it remains unclear as to when and how autophagy deficiency affects  $\beta$ -cell homeostasis. To address this, we generated the inducible  $\beta$ -cell-specific Atg7-knockout mice (*i* Atg7KO), by crossing mice carrying floxed Atg7 allele with Ins1-Cre/ERT mice that induce Cre-mediated recombination in a tamoxifen-inducible manner. When the autophagy deficiency was induced for 2 weeks (between 10 and 12 weeks of age), the *i* Atg7KO mice exhibited normal glucose tolerance, whereas the prolonged autophagy deficiency for 6 weeks (between 6 and 12 weeks of age) caused glucose intolerance with significantly impaired insulin secretion. These findings suggest that the autophagy failure cumulatively leads to  $\beta$ -cell failure after a certain interval.

研究分野：内分泌学

キーワード：細胞 オートファジー 糖尿病 Atg7 Sprr1a

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリンの絶対的あるいは相対的分泌不全による慢性の高血糖が様々な合併症を引き起こす代謝疾患であり、全ての糖尿病患者では唯一のインスリン産生である膵β細胞の機能不全を合併している。これまで我々はオートファジー機能維持に不可欠な遺伝子 *Atg7* をβ細胞特異的に欠失させた RIP(rat Ins2 promoter)-Cre;*Atg7<sup>fl/fl</sup>* マウス(*βAtg7KO*) を作製し、同マウスではインスリン分泌不全を伴う耐糖能異常を呈することを見出した。*βAtg7KO* の解析結果はオートファジーがβ細胞の機能維持に重要な役割を担っていることを示唆しているが、同マウスでは胎生期から恒常的に *Atg7* が欠失しているため、どの発生段階のオートファジー不全が最終的な表現型を規定しているのか不明であった。

## 2. 研究の目的

膵β細胞特異的かつ時期誘導性に *Atg7* を欠失させる遺伝子改変マウスを作製し、その表現型を解析することにより、オートファジー不全からβ細胞不全に至るまでの分子メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### [1] 新規遺伝子改変マウスの作製

MIP(mouse Ins1 promoter) -Cre<sup>ERTM</sup>; *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (*iβAtg7KO*) マウスを作製し、下記のような週齢で tamoxifen(TM)を投与した2種類のオートファジー不全マウスを作製した。

- ① 10週齢でTMを投与→12週齢で表現型解析：短期オートファジー不全マウス (*iβAtg7KO<sup>2W</sup>* マウス)
- ② 6週齢でTMを投与→12週齢で表現型解析：長期オートファジー不全マウス (*iβAtg7KO<sup>6W</sup>* マウス)

### [2] オートファジー不全マウスの表現型解析

上記[1]で作製した *iβAtg7KO<sup>2W</sup>* マウスおよび *iβAtg7KO<sup>6W</sup>* マウスにブドウ糖負荷試験を行うことにより耐糖能およびインスリン分泌能を評価する。さらに膵パラフィン切片を作製し、組織学的検討を行った。

### [3] オートファジー不全膵島のトランスクリプトーム解析

*iβAtg7KO<sup>2W</sup>* マウス、*iβAtg7KO<sup>6W</sup>* マウスおよび対照同胞マウス(*Atg7* ヘテロ欠損マウス)より膵島を単離後、RNAを抽出、bulk RNA sequencingを行うことによりオートファジー不全β細胞特異的に発現が変化する遺伝子群を抽出した。注目する数個の遺伝子に対して免疫組織染色を行った。

## 4. 研究成果

*iβAtg7KO<sup>2W</sup>* マウスの耐糖能は対照同胞マウス(*Atg7* ヘテロ欠損マウス)と同程度であったが、より長期間のオートファジー不全を誘導した *iβAtg7KO-6W* マウスではインスリン分泌不全を伴う著しい高血糖を認めた。単離膵島を用いてブドウ糖応答性インスリン分泌能(GSIS)を評価したところ(batch incubation)、*iβAtg7KO<sup>6W</sup>* においてGSISの著しい低下を認めた。これらの知見は2週間のオートファジー不全はβ細胞機能に影響を与えず、6週間という時間経過を経て、即ちオートファジー不全の蓄積がβ細胞不全を引き起こすことを示している。

次に *iβAtg7KO<sup>2W</sup>*、*iβAtg7KO<sup>6W</sup>*、および対照マウスの膵島を単離、RNAを抽出し、RNA sequencingを行なった。*iβAtg7KO<sup>6W</sup>* マウスにおいては、インスリン分泌能を制御する多くの遺伝子が低下していた。*iβAtg7KO<sup>2W</sup>* における遺伝子発現プロファイルを解析した結果、*iβAtg7KO<sup>2W</sup>* マウスで対照マウス(*iβAtg7Het<sup>2W</sup>*)に比較して有意に発現が亢進しているのは8遺伝子のみであり、これらのうち、*iβAtg7KO<sup>6W</sup>* マウスで共通して発現が亢進しているのは *Sprr1a* のみであった。

*Sprr1a* は障害時の神経組織の再生などに重要であることが報告されているが、膵β細胞における機能については未解明である。*db/db* マウス膵島で *Sprr1a* mRNA 発現量を定量化すると、

耐糖能正常である 4 週齢では遺伝子発現に変化はなかったが、 $\beta$  細胞不全およびオートファジー不全の進行した 8 週齢、12 週齢において有意な発現亢進が確認された。さらに、 $\beta$ HC9、 $\beta$ TC3、INS-1 細胞といった  $\beta$  細胞株において *Atg7* を knockdown したところ、いずれの細胞株においても *Sprr1a* の発現が亢進していた。次に *i $\beta$ Atg7KO<sup>6W</sup>* マウスの膵パラフィン切片において抗 *Sprr1a* 抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、p62 凝集塊を伴うオートファジー不全  $\beta$  細胞の一部にのみ SPRR1A タンパクの発現を認めた。言い換えればオートファジー不全  $\beta$  細胞の中には SPRR1A 発現を認めない（あるいは発現レベルの低い） $\beta$  細胞が存在し、この結果は SPRR1A の発現には spatial heterogeneity が存在することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Suzuki L., Miyatsuka T., Himuro M., Miura M., Katahira T., Komiya K., Fujitani Y., Nishida Y., Watada H.
2. 発表標題 Autophagy Deficiency Cumulatively Causes -Cell Failure in Mice.
3. 学会等名 79th American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木路可, 宮塚 健, 氷室美和, 三浦正樹, 片平雄大, 三田智也, 小宮幸次, 西田友哉, 藤谷与士夫, 綿田裕孝
2. 発表標題 膵 細胞における時期特異的オートファジー不全モデルマウスの作製とその機能解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
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)	