

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08489

研究課題名(和文) 膵細胞特異的Atg7・p62二重欠損マウスの作製とその機能解析

研究課題名(英文) Loss of p62 in pancreatic beta cells under autophagy deficiency had little effect on glucose tolerance and insulin secretion.

研究代表者

池田 富貴 (Ikeda, Fuki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80445494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー不全下にある細胞におけるp62の機能を解明するため、細胞特異的にAtg7およびp62を同時に欠失させたダブルノックアウトマウス(Atg7K0;p62K0)を作製し、耐糖能を評価した。Atg7単独欠損マウスでは細胞内にp62の集積が確認されるのに対して、Atg7K0;p62K0ではp62の異常蓄積が著しく減少していた。Atg7K0;p62K0はAtg7単独欠損マウスと同程度のインスリン分泌不全を呈しており、統計学的有意差は認められなかった。以上の知見は、オートファジー不全下におけるp62の蓄積と細胞不全との間に明らかな因果関係は認められないことを示唆している。

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、膵細胞の恒常性維持に重要な役割を担うことが報告されてきた。細胞特異的オートファジー不全マウスではp62の異常蓄積が認められることが報告されているが、蓄積したp62が細胞機能にどのような影響を与えているのかについては長らく不明であった。今回の研究で細胞特異的にAtg7とp62を同時に欠失させることにより、オートファジー不全下のp62の機能を解析するマウスモデルを構築することに成功した。結果はp62の有無により細胞機能が大きく変わることはないことが示されたが、より詳細な解析が細胞におけるp62の機能の全容を明らかにすることに期待したい。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is known to play an essential role in intracellular quality control through the degradation of damaged organelles and components. It has been demonstrated that β -cell-specific autophagy deficient mice, which lack Atg7, exhibited impaired glucose tolerance, accompanied by accumulation of p62 (also known as Sqtm1). In this project we investigated the role of p62 in β cells under autophagy-deficient conditions, by inactivating both Atg7 and p62 simultaneously in a β -cell specific manner. Whereas p62 accumulation was dramatically reduced in the islets of Atg7 and p62 double-deficient mice, glucose tolerance and insulin secretion were comparable to Atg7 single-deficient mice. Taken together, these findings suggest that the p62 accumulation appears to have little effect on β -cell function under autophagy inhibition caused by Atg7 deficiency.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 オートファジー p62 細胞 インスリン分泌

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内タンパク質分解機構の一つであり、発生・分化、老化、免疫などで重要な機能を担っている。オートファジー誘導に不可欠なタンパク質 Atg7 を膵β細胞特異的に欠失させたマウス (β Atg7KO) ではβ細胞内に p62 タンパク質が蓄積し、インスリン分泌不全を伴う耐糖能異常を呈する。p62 は肝細胞や脂肪細胞の恒常性維持に不可欠な役割を担うことが知られているが、膵β細胞において Atg7 存在下で p62 を欠失させても耐糖能に明らかな異常は認められない。しかし、これまでは p62 の異常蓄積が存在しない Atg7 存在下での研究であったため、Atg7 を欠失したオートファジー不全下における p62 の異常蓄積がβ細胞機能に如何なる影響を及ぼすのかについては未解明であった。

2. 研究の目的

オートファジー不全下にあるβ細胞における p62 の機能を明らかにするため、β細胞特異的に Atg7 および p62 を同時に欠失させた二重欠損マウス (β Atg7KO; p62KO マウス) を作製し、p62 の異常蓄積がβ細胞機能に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 膵β細胞特異的 Atg7・p62 二重欠損マウス (β Atg7KO; p62KO マウス) の作製

β細胞特異的かつタモキシフェン誘導性に Atg7 および p62 を欠失させるため、MIP-Cre^{ER}; Atg7^{fllox/fllox}; p62^{fllox/fllox} マウス (β Atg7KO; p62KO) および MIP-Cre^{ER}; Atg7^{fllox/fllox}; p62^{fllox/+} マウス (β Atg7KO; p62Hetero) を作製した(図1)。

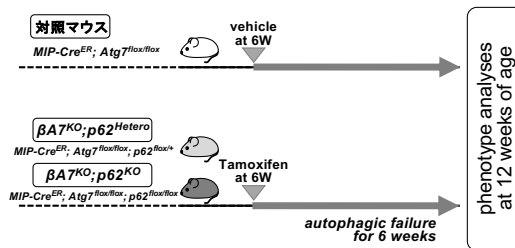


図1 β細胞特異的Atg7・p62二重欠損マウスの作製

(2) β Atg7KO; p62KO マウスの耐糖能およびβ細胞機能評価

上述の β Atg7KO; p62KO, β Atg7KO; p62Hetero および対照マウスに対して6週齢でタモキシフェンを投与し、オートファジー不全を誘導した。12週齢で腹腔内ブドウ糖負荷試験を行い、耐糖能、インスリン分泌能を評価した後、膵組織切片を作製した。

4. 研究成果

Atg7 単独欠損マウスではオートファジー不全誘導後6週間で p62 の集積が確認されるのに対して、 β Atg7KO; p62KO マウスでは p62 の異常蓄積がほぼ消失していた(図2)。これらの結果は当初の目的通りにオートファジー不全下で p62 を欠失したβ細胞を作製できたことを示している。

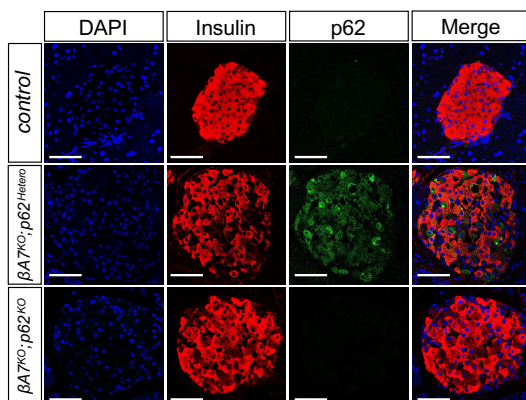


図2 β細胞特異的Atg7・p62二重欠損マウスにおけるp62染色

12週齢の MIP-Cre^{ER}; Atg7^{fllox/fllox}; p62^{fllox/fllox} マウス (β Atg7KO; p62KO) および対照マウスの膵組織切片を作製し、インスリン、p62 に対する免疫組織染色を行った。Atg7 単独欠損マウス (p62ヘテロ欠損) では、β細胞内に p62 の異常蓄積が認められるのに対して、 β Atg7KO; p62KO マウスでは p62 発現が消失していた。

これらのマウスを用いてブドウ糖負荷試験を行った結果、 $\beta Atg7KO; p62KO$ マウスの耐糖能およびインスリン分泌能は $Atg7$ 単独欠損マウス ($p62$ ヘテロ欠損) と同程度であり、統計学的な有意差はなかった (図3)。

上記3群のマウスより膵臓を摘出し、膵切片作製、インスリン染色を行った後、 β 細胞容量を定量化した。 $\beta Atg7KO; p62KO$, $\beta Atg7KO; p62^{Hetero}$ および対照マウスの間に統計学的有意差は認められなかった。

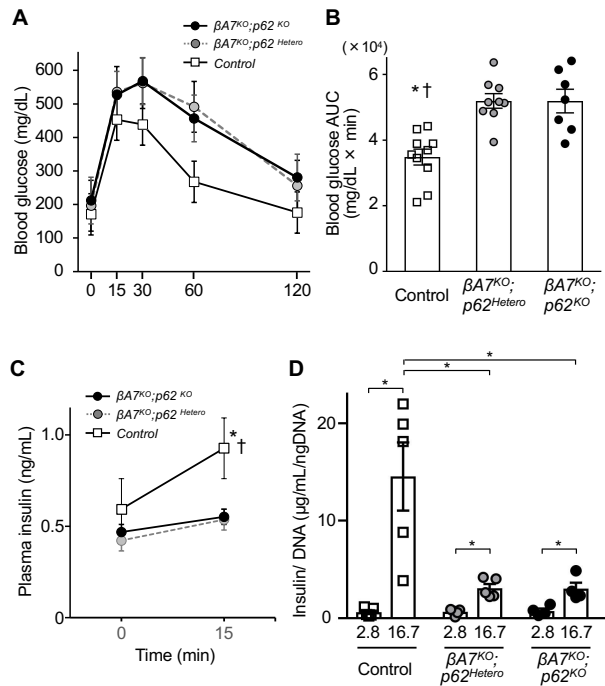


図3 β 細胞特異的Atg7・p62二重欠損マウスの耐糖能およびインスリン分泌能

12週齢の $MIP-Cre^{ER}; Atg7^{flox/flox}; p62^{flox/flox}$ マウス ($\beta Atg7KO; p62KO$) および対照マウスを用いてブドウ糖負荷試験を行った。オートファジー不全マウス ($\beta Atg7KO; p62KO$ および $\beta Atg7KO; p62^{Hetero}$) では対照マウスに比較してブドウ糖負荷後の血糖値が上昇しており(A)、AUC (Area Under the Curve) は有意に上昇していた(B)。一方、ブドウ糖負荷試験後の血糖値はオートファジー不全群で有意に低下していた(C)。*, $p < 0.05$ versus $\beta Atg7KO; p62KO$, and †, $p < 0.05$ versus $\beta Atg7KO; p62^{Hetero}$. (D) 単離膵島を用いたブドウ糖応答性インスリン分泌能の評価。 $\beta Atg7KO; p62KO$ および $\beta Atg7KO; p62^{Hetero}$ では対照マウスに比較してブドウ糖負荷後のインスリン分泌が有意に低下していた。*, $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. All data are as the mean \pm SE.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関