

平成21年6月30日現在

研究種目：萌芽研究
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19659236
 研究課題名（和文） 膵β細胞におけるオートファジー機構の重要性と糖尿病発症への関与の検討
 研究課題名（英文） The role of basal level autophagy on pancreatic beta cell function
 研究代表者
 河盛 隆造（KAWAMORI RYUZO）
 順天堂大学・医学研究科・特任教授
 研究者番号：00116021

研究成果の概要：オートファジーは、現在まで、様々な細胞における飢餓応答や細胞内クリアランスに極めて重要な役割を果たすと考えられてきたが、膵β細胞における役割は明らかにされていない。

我々は、糖尿病発症を規定する細胞である膵β細胞における規定レベルのオートファジーの意義を明らかにする目的で、膵β細胞特異的オートファジー不全マウスを用いて、通常食下で、どのような phenotype の変化をきたすかを観察した。その結果、早期2型糖尿病に特徴的な異常であるブドウ糖応答性インスリン分泌の低下が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,700,000	0	1,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病学

1. 研究開始当初の背景

生命を維持するために、生体は自己成分の合成のみならず、環境変化に応じて細胞成分を分解処理する必要がある。真核生物の中で、の蛋白質分解機構は2つ存在する。それは、選択的蛋白質分解系のユビキチンプロテアソ

ーム系と非選択的蛋白質分解系のオートファジー系である。オートファジーには、単膜構造体が伸長し細胞質成分を取り囲み、脂質二重膜よりなるオートファゴソームが形成され、つぎにオートファゴソームがリソソームと融合することにより細胞質成分を分解するシステムであり、Atg結合体はその中核を担う蛋白

として同定されており、この機構は、広く真核生物において保存されている(Klionsky et al. J. Cell Sci. 2005)。

酵母においては、これまでオートファジーは飢餓応答などの際のオルガネラを含む非特異的蛋白質分解機構として認識されてきた。しかしながら、ヒトを含む哺乳類においては、オートファジーは飢餓時の栄養確保として働くのみならず、恒常性維持の機構として重要であり、その破綻は、神経変性疾患、腫瘍化、易細菌感染性に関与している可能性が示唆されつつある。

こうしたなかで、マウスの系を用いて、ATGシステムの生体での役割を明らかにする先駆的試みが最近発表されつつある。まず、オートファジーに必須の遺伝子であるAtg5をノックアウトしたマウスはほぼ正常に出生するが、生後まもなく著しい栄養不全状態に陥り、飢餓条件下での生存期間は著しく短くなる。このことから、生仔マウスはオートファジーにより産生されるアミノ酸をエネルギー維持のために利用していることが明らかになった(Kuma et al. Nature 2004)。さらに組織特異的ノックアウト法をもちいて、臓器特異的なオートファジー機構の役割も解析可能となりつつあり、その先陣を切って、中枢神経特異的にオートファジー機構に必須な蛋白であるAtg7あるいはAtg5をノックアウトすると大脳皮質や海馬などで神経細胞死が誘導され、反射異常・協調運動障害などの神経変性疾患が引き起こされることが、報告された(Hara et al. Nature 2006; Komatsu et al. Nature 2006)。神経細胞は、エネルギー供給の面で他の組織に比し優遇されていると想定されている。事実、絶食や飢餓時においても比較的オートファジーの誘導が少ない細胞であることが知られていたが、この**神経細胞特異的ノックアウトの結果は、低レベルではあるが恒常的なオートファジーが、神経細胞においては細胞機能の維持に必須であることを意味する。**

われわれの研究グループはこれまで、転写調節制御、発生学、生理学、分子生物学的視点などさまざまな手法と知見を駆使することにより、主にβ細胞機能の転写制御機構とその破綻による糖尿病発症機転に関して解析をすすめてきた(Fujitani Y. et al. Gene Dev 2006; Watada H. et al. J. Biol. Chem. 2003; Watada H. et al. PNAS 2000; Watada

a H. et al. J. Biol. Chem. 2000; Fujitani Y. et al. Mol. Cell. Biol. 1999)。近年の糖尿病患者数の増加は、少なくとも一部には、運動不足、西洋風ライフスタイルの導入などによる過栄養が、インスリン抵抗性を惹起し、膵β細胞に過剰な負荷がかかることに起因する。膵β細胞の代償機構が健常であれば、膵β細胞の機能亢進と容積増加の機構により、インスリン抵抗性を代償し、糖尿病は発症しない。しかし膵β細胞において、些細であれ先天的になんらかの異常(本研究の場合、ストレス除去系の異常)が存在する場合、さまざまなストレスがβ細胞に蓄積し、最終的に相対的なインスリン分泌不全あるいはβ細胞死が起こり、糖尿病が招来されることとなる。神経細胞特異的ノックアウトの結果は、恒常的なオートファジーが、神経細胞における細胞機能の維持に必須であることを意味したが、膵β細胞も神経細胞と極めて近い性質を有する細胞であり、オートファジー機能の低下が膵β細胞機能低下を介して糖尿病発症に寄与するという作業仮説に至った。

2. 研究の目的

コンディショナルノックアウト法を用いて、膵β細胞特異的にATGシステムの機能を失活させることにより、β細胞におけるオートファジー機構の役割を解明する。そしてオートファジー機構の破綻がβ細胞機能を著しく低下させ、あるいは細胞死を誘導し、ひいては糖尿病発症を誘導するという仮説の検証をおこなう。

3. 研究の方法

オートファジーの誘導に必須の遺伝子Atg7を組織特異的にノックアウトするために、順天堂大学の小松雅明博士らAtg7のFlox alleleを開発しこの遺伝子を有するマウスを作成済みである(Komatsu et al. JCB 2005)。これを有するマウスと、膵β細胞特異的にCre recombinaseを発現するRIP(Rat insulin promoter)-Creマウスを順次交配することにより、RIP-Cre;Atg7 Flox/Flox (F/F)のgenotypeを有するマウスを得る。RIP-Creマウスはすでに、我々の管理化にあり、このマウスを用いてさまざまな検討を行っている(Gorogawa et al BBRC 2004, Iwashita et al Diabetologia 2006)。さて、交配されて得られたRIP-Cre;Atg7 F/Fマウスは理論上、膵β細胞特異的にAtg7遺伝子のexon14を欠失することにより、その機能はβ細胞特異的に欠損

しているはずである。このマウスを用いて、糖尿病、膵β細胞におけるフェノタイプを観察することで、膵β細胞における基底レベルでのオートファジーの意義を検討する。

4. 研究成果

研究方法に示したとおり、膵β細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウスを作成した。このマウスの単離膵島を用いてオートファジー進展のマーカーである LC3 蛋白の発現を調べたところ、LC3-II の発現量の著明な低下を認め、膵島においてオートファジー活性が著明に低下していることが確認された。

オートファジー活性を反映する別のマーカーとして、P62 というアダプター蛋白が知られている。この蛋白はオートファジーにより選択的に分解される分子であり、C 末端ユビキチン会合ドメインを介してユビキチン鎖と結合する。この蛋白質はアルコール性肝炎やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 ALS などの神経変性疾患の細胞内において検出される封入体の主要構成分子であるが、オートファジー不能神経細胞やオートファジー不能肝細胞において、p62 は異常蓄積し p62-ユビキチン陽性の封入体を形成することが知られている。一方で、ATG7/p62 ダブルノックアウトマウスの肝においては、封入体形成はほぼ完全に抑制され、肝においては、オートファジーによる p62 を介したユビキチン化蛋白質の選択的分解が封入体形成を抑制することが強く示唆された。一方、神経細胞においては、そのような現象は認められなかったことが報告されている。すなわち、p62 は臓器によっては、オートファジー破綻によって生じる封入体形成に必須な分子であることが判明したわけである。

膵β細胞特異的 ATG7 ノックアウト膵β細胞においても p62 やポリユビキチン蛋白の蓄積が認められた。さらに、膵ラ氏島内に著明な変性を示した多数の囊胞様構造が認められ、これらは、電子顕微鏡の解析から変性した膵β細胞であることが確認できた

これらの結果から、恒常的オートファジー不全状態は、膵β細胞に異常蛋白の蓄積を引き起こし、明らかな膵β細胞の変性を誘導することが明らかになった。膵β細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウスは完全なオートファジー不全状態であるが、膵β細胞株を用いた検討においては、酸化ストレスがユビキチン化蛋白の凝集を誘導するが、それはオートファジーの抑制により増強されることが示唆されている。また、ユビキチン化蛋白の凝集はハンチントン舞踏病のモデルマウスの膵β細胞でよく観察されている。これらの事実は、膵β細胞内では、ユビキチン化蛋白という不要蛋白の産生とオートファジーが上

手くバランスをとって、その蓄積を防いでおり、そのバランスが崩れると、ユビキチン化蛋白の凝集体が認められる可能性を示唆している。

それでは、この恒常的オートファジーの破綻は膵β細胞機能にどのような影響をあたえるのであろうか？ 私共はこのマウスの随時血糖値を調べた。その結果、膵β細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウスでは随時血糖値の増加を認めた。また、20 週齢で耐糖能負荷検査を行うと、インスリン分泌不全による耐糖能の悪化を認めた。従って、このマウスにおいては、ブドウ糖応答性インスリン分泌反応の低下があると考えられた。

次に、その現象を詳細に調べる目的で、単離膵ラ氏島を用いてインスリン分泌反応を調べた。すると、膵β細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウスから単離した膵ラ氏島では KCL 負荷による強制脱分極によるインスリン分泌の低下はないが、ブドウ糖応答性のインスリン分泌反応が低下していることが明らかになった。ブドウ糖応答性インスリン分泌機構を鑑みると、血糖上昇から ATP 感受性 K チャンネルの閉鎖までの機構に障害があることが示唆された。電子顕微鏡を用いた形態学的アプローチにより、このマウスの膵ラ氏島のミトコンドリアの明らかな形態異常が認められたため、我々は、ブドウ糖応答性の ATP 産生能を測定した。すると、膵β細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウスではブドウ糖応答性の ATP 産生能の低下が認められた。以上より、膵ラ氏島における恒常的オートファジー不全はミトコンドリアでの ATP 産生能の低下を介してブドウ糖応答性インスリン分泌低下をもたらすことが示唆された。

尚、単離膵ラ氏島あたりのインスリン含量や膵ラ氏島容積の低下などは認められなかった。これらのデータは他のグループのデータでも支持されている。

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 2 件)

1: Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. The role of autophagy in pancreatic beta-cell and diabetes. *Autophagy*. 2009;5(2):280-2.

2: Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to

high-fat diet. Cell Metab.
2008;8(4):325-32.

〔学会発表〕（計1件）

江波戸千恵，内田豊義，荒川将之，小松雅明，東浩介，熊代尚記，上野隆，木南英紀，弘世貴久，河盛隆造，藤谷与士夫，綿田裕孝：糖尿病とオートファジー その2～恒常的オートファジーの膵β細胞における役割～．第51回日本糖尿病学会年次学術集会．東京都，2008．5.22-24.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河盛 隆造 (KAWAMORI RYUZO)
順天堂大学・医学研究科・特任教授
研究者番号：00116021

(2) 研究分担者

藤谷与士夫 (FUJITANI YOSHIO)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：30433783

(3) 連携研究者