

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03735

研究課題名(和文) オートファジー不全による膵細胞不全の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of beta cell failure due to autophagic failure

研究代表者

綿田 裕孝 (Hiroataka, Watada)

順天堂大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60343480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、オートファジー不全が膵島機能不全の重要な規定因子であることを報告するとともに、2型糖尿病におけるオートファジー不全の病態解明を行ってきた。その過程でオートファジー不全による膵細胞不全に対する代償機構に關与する可能性のあるAutophagy failure induced gene (AFIG)1の同定と、細胞内オートファジーフラックス調節候補因子Autophagy flux regulator (AFR)1の同定に至った。本申請においては膵細胞恒常性維持におけるAFIG1とオートファジーにおけるAFR1の機能解明を行ったが、これらの因子の重要性は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究グループは、膵細胞におけるオートファジー機能不全が膵細胞機能不全に關与することを世界に先駆けて解明したものの、その詳細な分子機構の解明に関してはなかなか進んでいなかった。そこでトランスクリプトーム解析やCRISPR/Cas9システムを用いたスクリーニング系により、その鍵因子候補を同定し、今回、機能解析を行った。残念ながら、これらの因子の重要性を示せなかったが、膵細胞機能不全の分子メカニズムの同定は糖尿病の膵細胞不全の病態解明とともに、オートファジー調節機構の新たな知見の解明を通じて細胞生物学分野の進歩にも大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have reported that autophagy failure is an important determinant of islet dysfunction and have elucidated the pathogenesis of autophagy failure in type 2 diabetes. In the process, we have identified an autophagy failure induced gene (AFIG)1 that may be involved in the compensatory mechanism for pancreatic  $\beta$ -cell failure due to autophagy failure and a candidate factor for intracellular autophagy flux regulator (AFR)1 (AFR)1, a candidate regulator of intracellular autophagy flux. In this application, we have elucidated the functions of AFIG1 in pancreatic  $\beta$ -cell homeostasis and AFR1 in autophagy, but could not confirm the importance of these factors.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：膵細胞 オートファジー 2型糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、膵細胞を含む様々な細胞種において、細胞質タンパク質やオルガネラを分解する細胞内プロセスであることが知られている。オートファジー活性の低下は、2型糖尿病患者や2型糖尿病の齧歯類モデルの膵細胞で報告されている。また、我々は以前、膵細胞特異的にオートファジー不全を引き起こす膵細胞的 Atg7 ノックアウトマウスで2型糖尿病の膵細胞に特徴的な phenotype が観察されたことから、オートファジー不全が2型糖尿病の原因になりうることを報告した。しかしながら、どのようなメカニズムでそれが起こるのかに関しては、明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、誘導性に膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトされるマウスである i Atg7KO を作製し、オートファジー阻害後の膵島機能不全を観察し、膵島機能不全の誘導と同時にあるいは、その早期に遺伝子発現の変化する遺伝子がオートファジー不全による膵細胞障害に関与する可能性が高いとの仮説の基に、そのような遺伝子を同定し、その機能解明を進めた。

## 3. 研究の方法

### 動物

MIP-CreER マウスおよび Atg7 フロックスマウス( Atg7 flox/flox )を交配することで MIP-CreER Atg7 flox/flox マウス ( i Atg7KO ) を作成した。本マウスの Cre 媒介組換えの誘導のために、マウスは6週齢または10週齢で4mgのタモキシフェンを1週間かけて3回皮下注射された。マウスは、12時間の明暗サイクルで飼育された。研究プロトコルは、順天堂大学の動物飼育・使用委員会の審査と承認を受けた。

### 代謝パラメータの測定

血糖値は、携帯型グルコースメーターを用いて測定した。ブドウ糖負荷試験は、12週齢で8時間絶食後、ブドウ糖(2g/kg 体重)を腹腔内注射して行った。血漿インスリン濃度は、酵素結合免疫吸着法(ELISA; 森永生物科学研究所、横浜、日本)により分析した。

### 免疫染色

組織は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中の4%パラホルムアルデヒドで4、8時間以上固定し、PBSで洗浄し、パラフィン包埋した。この研究で使用した一次抗体はモルモット抗インスリン(1:5; Dako, Carpinteria, CA)、モルモット抗 p62 (1:200; PROGEN, Heidelberg, ドイツ)、ウサギ抗 Sprr1a (1:200; Abcam, Cambridge, MA) および抗 Ki67 (1:100; BD Pharmingen, サンディエゴ、カリフォルニア、米国)である。この研究で使用した二次抗体は、Alexa Fluor 488 コンジュゲート抗マウス IgG、Alexa Fluor 555 コンジュゲート抗モルモット IgG であった。スライドは、Leica TCS SP5 共焦点レーザー顕微鏡(Wetzlar, Germany)を用いて画像化した。

膵細胞量を測定するために、少なくとも100µm離れた5つの異なる切片を選択し、抗

インスリン抗体で染色した。膵 細胞面積 / 膵臓全体の面積の比 ( 相対膵 細胞面積 ) は、BZ Analyzer ( キーエンス、大阪、日本 ) を用いてデジタル的に定量化した。 細胞量は、相対 細胞面積に膵臓重量を乗じることで算出した。

#### 単離した膵島からのインスリン分泌のアッセイ

膵島は、12 週齢のマウスから既述の方法で単離した。サイズマッチした 5 個の膵島を、グルコースを含む 400 $\mu$ L のクレブス-リンゲル液中でインキュベートした。単離膵島の上清のインスリン濃度をインスリン ELISA キットで分析し、単離膵島全体の総 DNA 濃度で正常化した。

#### RNA 配列決定

12 週齢の Atg7 欠損マウスおよびコントロールマウスから膵島を単離した ( 1 群あたり n = 4 マウス )。RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を用いて全 RNA を抽出した。RNA の品質は Agilent 2100 BioAnalyzer ( Agilent Technologies, Palo Alto, CA ) を用いてテストし、cDNA は SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing ( Clontech, Mountain View, CA ) を用いて作成した。シーケンスライブラリーは、Nextera XT DNA Library Prep Kit ( Illumina, San Diego, CA ) を用いて調製した。すべてのサンプルは約 500 塩基対のピークサイズを持ち、HiSeq 2500 プラットフォーム ( Illumina ) で配列決定された。

シーケンスリードは、Mus musculus ゲノムアセンブリ ( Genome Reference Consortium GRCm38, UCSC version mm10 ) に対してマッピングされた。Gene Ontology およびパスウェイの濃縮解析は、DAVID ( バージョン 6.8 ) および Enrichr ツールを用いて実施した。

#### S961 の処理

S961 は Lauge Schäffer 博士 ( Novo Nordisk ) から供与された。PBS または S961 を浸透圧ポンプ ( ALZET 1007D; DURECT Corporation, Cupertino, CA, USA ) に装填し、7 週齢の C57BL/6J 雄マウスの背中に皮下埋め込みした。1 週間の S961 投与後、マウスを犠牲にして単離した膵島で mRNA の発現量を測定した。

## 4 . 研究成果

#### 膵 細胞特異的 Atg7 欠損マウスにおける耐糖能異常とオートファジー機能不全の進行

オートファジー不全が 細胞の恒常性に及ぼす累積的な影響をモニターするため、Atg7 を欠損させた ( Atg7flox/flox ) マウスを、マウス Ins1 プロモーター制御下でタモキシフェン誘導性 Cre リコンビナーゼを発現する MIP-CreER マウスと交配し、誘導性膵 細胞特異的 Atg7 欠損マウス ( i Atg7KO ) を作成した。i Atg7KO マウスに 6 週齢でタモキシフェンを注射したところ、10 週齢まで体重およびランダム血糖値は i Atg7KO と Atg7 ヘテロ欠損マウス ( i Atg7Het ) の間で同等だった。i Atg7KO マウスの血糖値は 12 週齢から上昇し始め、14 週齢以降では i Atg7Het マウスと比較して有意に高くなったことから、オートファジーの累積欠損により耐糖能異常が生じることが示唆された。

次に、オートファジー欠損の 2 つの異なる時期にオートファジー阻害を誘導する 2 種類のマウスモデルを作製した。一つは 10 週齢から 12 週齢の短期 Atg7 欠損マウス ( i Atg7KO-2w ) であり、もう一つは 6 週齢から 12 週齢の長期 Atg7 欠損マウス ( i Atg7KO-

6w)である。年齢差は膵細胞の生理的・分子的特性に影響を与える可能性があるため、両モデルマウスとも同じ12週齢で実験に供した。i Atg7KO-2w マウスの膵島を用いた定量的 RT-PCR 解析では、Atg7 mRNA の発現レベルの著しい低下が認められ、免疫プロット解析では、Atg7 タンパク質レベルの低下、Atg7 依存性の LC3-I から LC3-II への転換の抑制、p62 の集積が見られた。さらに、p62 とインスリンに対する免疫染色により、i Atg7KO-2w および i Atg7KO-6w マウスの両方の膵細胞で p62 が蓄積していることが示された。これらの結果は、Atg7 の2週間の欠失が、本モデルマウスのオートファジー不全を誘導するのに十分であることを示唆している。

#### オートファジー不全の長期化による 細胞不全の進行

短期および長期のオートファジー不全が耐糖能や細胞機能障害に影響を及ぼすかどうかをさらに評価するため、i Atg7KO-2w および i Atg7KO-6w マウスで腹腔内糖負荷試験 (IPGTT) を実施した。i Atg7KO-2w マウスは i Atg7Het-2w と比較して、血糖値および血漿インスリン値に有意差がなかったのに対し、i Atg7KO-6w マウスでは対照の i Atg7Het-6w と比較してブドウ糖投与後の各時点における血糖値が有意に高く、血漿インスリン値が著しく低下していた。これらの結果は、膵細胞における6週間にわたるオートファジー欠乏がインスリン分泌不全の進行につながることを示唆しており、Atg7 の短期欠失では明らかな生理学的表現型が見られないのと対照的である。

6週間のオートファジー欠損後の膵細胞機能不全の基礎的なメカニズムを調べるために、i Atg7KO-6w マウスおよび i Atg7Het-6w マウスのインスリンに対する免疫染色によって細胞面積を評価したところ、2群間でβ細胞面積に統計的な差はなかった。次に、グルコース刺激によるインスリン分泌を評価するために、2群から分離した膵島を用いて静置培養を行ったところ、i Atg7KO-6w では i Atg7Het-6w 同腹子と比較して高グルコース濃度でのインスリン分泌が強固に抑制されていた。また、i Atg7KO-6w 由来の膵島のインスリン含量は、i Atg7Het-6w の同腹子のそれと比較して有意に低かった。これらのことから、オートファジーの欠損が長期化すると、インスリン含量の低下とともに、グルコース刺激によるインスリン分泌の障害を伴う耐糖能異常が生じることが示唆された。

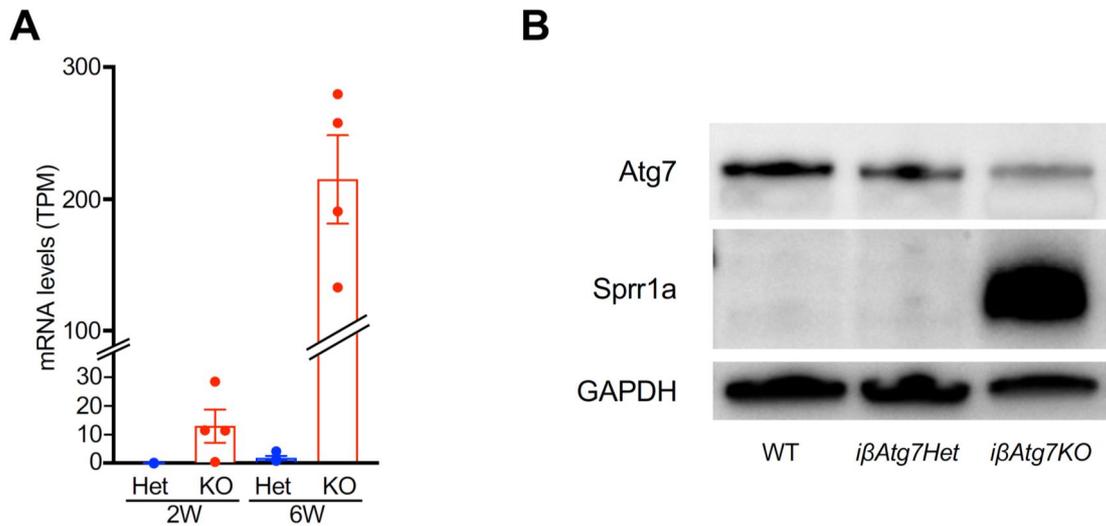
#### オートファジー欠乏症の長期化に伴う 細胞特異的遺伝子のダウンレギュレーション

オートファジー阻害とその後の細胞不全の因果関係の根底にある分子メカニズムを調べるため、i Atg7KO-2w マウスと i Atg7KO-6w マウス、およびそのコントロールマウスから分離した膵島について、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施しました。階層的クラスタリングとヒートマップ解析により、i Atg7KO-6w マウスの膵島における遺伝子発現プロファイルが他の3グループと比較してダイナミックに変化することが示された。

#### 代謝ストレス条件下での Sprr1a のアップレギュレーション

i Atg7KO-2w マウスまたは i Atg7Het-2w マウスの少なくとも1つのサンプルで TPM>1 を示した12,499遺伝子のうち、i Atg7KO-2w マウスで i Atg7Het-2w マウスに比べて4倍以上の増加を示したのは、Spr1a 遺伝子のみであった。Spr1a の mRNA の発現量は、i Atg7KO-2w マウスでは i Atg7Het-2w マウスの82.3倍、同様に i Atg7KO-6w マウスでは i Atg7Het-6w マウスの100倍以上であった(図1)。

図1 膵 細胞特異的誘導性オートファジー不全マウスで認められた Sprr1a の発現亢進



次に、代謝ストレス条件下における他のモデルマウスの膵島における Sprr1a の遺伝子発現レベルを調べた。まず、様々な週齢の肥満糖尿病 db/db マウスから単離した膵島における Sprr1a の発現を調べた。興味深いことに、糖尿病発症直後の 4 週齢では、Srr1a の発現はコントロールマウスと同程度であったが、糖尿病発症からしばらく経過した 8 週齢と 12 週齢では、Srr1a の発現はコントロールと比較して優位にアップレギュレートされていた。また、インスリン受容体拮抗薬である S961 投与マウスにおける Sprr1a の発現を調べたところ、PBS 対照群と比較して、S961 を 5nmol/week 投与した群では Sprr1a が上昇する傾向があり、10nmol/week 投与群では統計的に有意な上昇が観察された。

他の細胞では Sprr1a が細胞死に抑制的に作用していることが指摘されているため、Atg7 欠損 MIN6 細胞で Sprr1a をノックダウンしたり、膵 細胞特定型 Atg7 欠損マウスと Sprr1a ノックアウトマウスを掛け合わせしたが、膵 細胞死が増えるという結果は得られず、膵 細胞不全時の Sprr1a の増加の意味は解明できなかった。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Luka Suzuki, Takeshi Miyatsuka, Miwa Himuro, Yuka Wakabayashi, Sho Osonoi, Masaki Miura, Takehiro Katahira, Yoshio Fujitani, Hitoshi Iida, Hiroki Mizukami, Yuya Nishida, Hiroataka Watada	4. 巻 611
2. 論文標題 Cumulative autophagy insufficiency in mice leads to progression of -cell failure	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 38-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	西田 友哉  (Nishida Yuya)  (10581449)	順天堂大学・医学部・准教授   (32620)	
研究分担者	宮塚 健  (Miyatsuka Takeshi)  (60622363)	順天堂大学・大学院医学研究科・客員教授   (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
---------	---------