

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08917

研究課題名(和文)糖代謝関連臓器における生体内オートファジーフラックスの病態生理学的意義の検討

研究課題名(英文)Significance of pathophysiological roles of autophagy in the organs regulating glucose metabolism

研究代表者

西田 友哉(Nishida, Yuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10581449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは、膵臓 細胞の細胞恒常性の維持に不可欠な役割を担っている。本研究では、pHluorin-LC3-mCherryレポーターを発現するトランスジェニックマウスを作製し糖代謝関連臓器でのオートファジーフラックスを検討した。膵島のオートファジーフラックスは飢餓後に増加し、短期間の再給餌でフラックスが抑制されるには、他のインスリン標的臓器よりも長期間の再飢餓を必要とした。さらに、インスリン抵抗性下では、膵臓 細胞におけるオートファジーフラックスの不均一性が顕在化し、グルコース応答性細胞内Ca流入や遺伝子発現がフラックスに高低により異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、全身のオートファジーフラックスを評価できる新しいレポーターマウスを開発した。飢餓やインスリン抵抗性増大下といった糖尿病に関係する病態生理学的な状況において、このマウスを用いた解析により、生体のオートファジーフラックスがどのように変化し、それと関連して機能や遺伝子発現にどのような違いが見出されるかを明らかにした点で重要な意義を持つ研究である。特に、インスリン抵抗性下での膵 細胞オートファジーフラックスの不均一性の詳細な解析結果の報告は新しい知見であり、そのメカニズムを明らかにすることによって、糖尿病の発症や進展の予防に結びつく新しい治療法が開拓につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Autophagy plays an essential role in preserving cellular homeostasis in pancreatic beta cells. However, the extent of autophagic flux in pancreatic islets induced in various physiological settings remains unclear. In this study, we generate transgenic mice expressing pHluorin-LC3-mCherry reporter for monitoring systemic autophagic flux by measuring the pHluorin/mCherry ratio. Our findings reveal that autophagic flux in pancreatic islets enhances after starvation, and suppression of the flux after short-term refeeding needs more prolonged re-starvation in islets than in the other insulin-targeted organs. Furthermore, heterogeneity of autophagic flux in pancreatic beta cells manifests under insulin resistance, and intracellular calcium influx by glucose stimulation increases more in high- than low-autophagic flux beta cells, with differential gene expression, including lipoprotein lipase.

研究分野：糖尿病学

キーワード：オートファジー 膵 細胞 糖尿病 インスリン抵抗性 レポーターマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内恒常性の維持に重要なバルクタンパク分解系である。その研究は長く形態学的な観察が中心であったが、出芽酵母の遺伝学的スクリーニングの手法を用いた分子メカニズムの解明を発端として、最近では哺乳類などの高等生物においてもその生理学的意義に関する新たな知見が数多く報告されている。

その結果、オートファジーはパーキンソン病やアルツハイマー病といった神経変性疾患、悪性腫瘍、そして糖尿病をはじめとする代謝性疾患など、多様な疾患の病態に深く関与していることが明らかとなっている。

2 型糖尿病はインスリン抵抗性の増大とそれに伴う膵細胞不全の進展が主たるメカニズムと考えられ、われわれの研究室においては膵細胞におけるオートファジーが膵細胞不全にどのように関与するかについて先駆的な研究を行ってきた。主要なオートファジー制御因子である **Atg7** を膵細胞特異的に欠損させたマウスにおいて、膵細胞不全による耐糖能異常が認められることを明らかにし、また 2 型糖尿病の膵細胞障害に関与している **human IAPP** をノックインしたマウスではオートファジー欠損により膵細胞不全が進行することを報告し、オートファジーが膵細胞の恒常性維持に重要な役割を担うことを明らかにした。

このように、オートファジーの研究領域は糖尿病をはじめとする様々な疾患分野へと広がりを見せているが、その生体内における意義は依然として不明な点が残されている。特に、オートファジーを介したタンパク分解の評価、すなわちオートファジーフラックスを生体内で正確に定量し、その病態生理学的意義を明らかにすることは従来の検討では不十分であった。

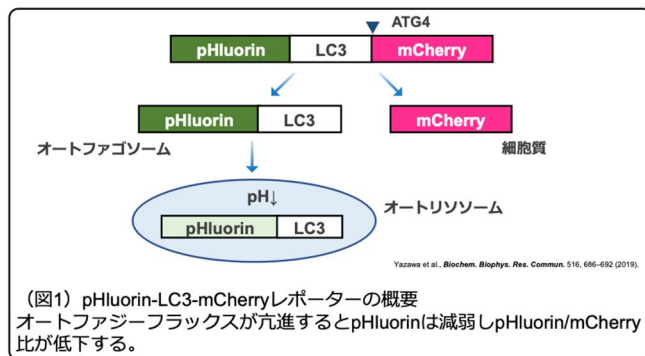
2. 研究の目的

本研究においては、オートファジーフラックスに関して糖代謝異常下でその関連臓器においてどのような変化が認められるかを評価する系を確立し、その病態生理学的な関連を解明することにより、新たな糖尿病治療の開発に結びつく知見を得ることを目的とした。

哺乳類でのオートファジー活動性の評価は、**Atg8** のホモログである **LC3** のリン脂質修飾、すなわち **LC3-PE** の増加や、**GFP** 融合タンパクである **GFP-LC3** のドットパターン形成の評価によって行われてきた。しかし、これらの指標はオートファジーの本来の生理的な役割であるタンパク分解を正確に反映したものとは言えず、最近ではオートファジーを介したタンパク分解量、すなわちオートファジーフラックス (**autophagic flux**) の評価が重視されている。

生体内でのオートファジーフラックスの定量については困難であったが、近年蛍光レポーターによるオートファジーフラックスの定量方法が報告されている。水島らにより報告された **GFP-LC3-RFP-LC3** を発現するプロベは、リソソームによる分解を受けない **RFP-LC3** を内在性コントロールとして用いることにより、オートファジーフラックスの評価が可能としたものである。一方でこのプロベにおいては、**(1)LC3** 分子が近接して連結してあることから、相同組み換えによる変異体が形成されやすいこと、**(2)GFP-RFP** 間での蛍光の吸収や **FRET** の可能性が考えられること、**(3)トランスジェニックマウス** の解析では、観察可能な発現臓器が限られており、ごく一部の解析にとどまっていること、などが課題となっていた。

研究代表者らはこれらの欠点を改良すべく蛍光プロベとして **pHluorin-LC3-mCherry** プロベを作製した。**GFP** に比較しより **pH** 感受性が高い蛍光タンパクである **pHluorin** は酸性条件下のオートリソソーム内では速やかに蛍光シグナルが減弱する。また、**RFP** よりも **pH** の変化に安定である **mCherry** を内在性コントロールとして用い、その結果オートファジーフラックスの定量指標として評価される **GFP/RFP** の蛍光強度比が、**pHluorin/mCherry** の比としてより鋭敏に評価可能となった (図 1)。



3. 研究の方法

本研究では、前述の pHluorin-LC3-mCherry レポーターコンストラクトを CAG プロモーター下に ROSA26 ローカスにノックインすることで、全身に発現するトランスジェニックマウスを作製した。まず、このマウスに対して飢餓刺激や膵β細胞アブレーションを行なってオートファジーフラックスを亢進させ、モニターマウスとしての有用性を検証した。

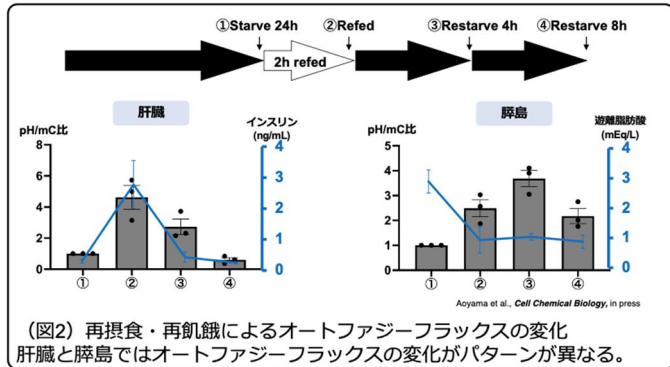
その後、飢餓・摂食モデルやインスリン抵抗性モデルを使用し、さまざまな生理的条件下において膵島やインスリン標的臓器である肝臓・筋肉などのオートファジーフラックスがどのように変化するかを評価し、その病態生理学的意義に関する検討を行った。

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

4. 研究成果

pHluorin-LC3-mCherry マウスに対し、ストレプトゾトシン投与により膵β細胞の破壊を行い、インスリン標的臓器である骨格筋のインスリン作用不足によるオートファジーフラックス亢進を誘導した。その結果、pHluorin/mCherry 比の著明な低下が認められたことから、このモニターマウスでオートファジーフラックスが評価可能であると考えられた。

次に、膵島において飢餓時にオートファジーフラックスがどのように変化するかを観察したところ、長時間飢餓後には pHluorin/mCherry 比が低下しており、オートファジーフラックスの亢進が示された。さらに、長時間飢餓後に短時間の再摂食を行い、さらに飢餓を繰り返して糖代謝関連臓器のオートファジー活性の変化を観察した。その結果、肝臓では長時間飢餓後に亢進したオートファジーフラックスが、短時間の再摂食により抑制され、さらにその後の再飢餓によって再度亢進した(図2)。このオートファジーフラックスの変化は血中のインスリン濃度の変化とよく相関していた。一方で、膵島のオートファジーフラックスに関しては、再摂食によって抑制を受けるものの、その後の再飢餓では直ちに亢進せず、やや遅れて亢進が認められた。膵島のオートファジーフラックスの変化は血中インスリン濃度とは相関せず、むしろ血中の遊離脂肪酸濃度との相関が考えられた。



(図2) 再摂食・再飢餓によるオートファジーフラックスの変化
肝臓と膵島ではオートファジーフラックスの変化がパターンが異なる。

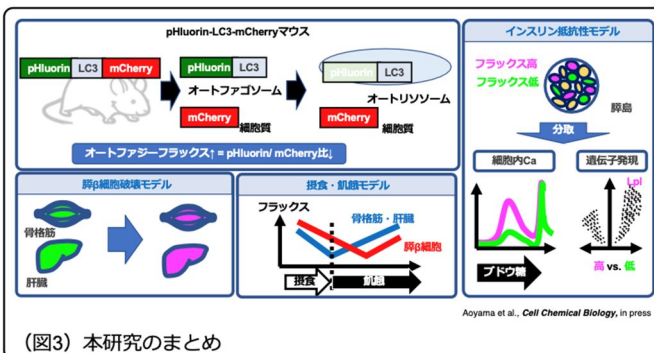
さらにわれわれは、2型糖尿病の発症に關する重要なメカニズムであるインスリン抵抗性下において、膵島のオートファジーフラックスがどのように変化するかを観察した。pHluorin-LC3-mCherry マウスに対してインスリン受容体拮抗薬である S961 を用いてインスリン抵抗性を増大させ観察したところ、S961 投与後のマウスでは膵島のオートファジー活性は亢進する細胞と低下する細胞がはっきりと認められるようになり、オートファジーフラックスのいわゆる heterogeneity が顕在化することが明らかとなった。

このインスリン抵抗性下におけるオートファジーフラックスの heterogeneity の意義を解明するため、まずこれらの単離膵島を dissociation した後、フローサイトメーターを用いてオートファジーフラックスが亢進した細胞と低下した細胞とを分取した。はじめにこれらの細胞群の機能的な差異を明らかにするため、カルシウム指示薬である Fura-2 を用いて、グルコース刺激下に細胞内カルシウムの流入がどのように変化するかを観察した。その結果、オートファジーフラックスの活性が高い細胞群においては、低い細胞群に比べグルコース刺激に伴う細胞内カルシウム流入が明らかに増加していた。したがって、膵β細胞におけるオートファジーの活性の相違は、その機能的な違いを反映したものであることが示された。

最後に、オートファジーフラックスの違いによる膵β細胞の遺伝子発現の違いを検討するため、トランスクリプトーム解析を実施した。前述の S961 投与マウスに加え、薬剤性でないインスリン抵抗性のモデルマウスとしてレプチンを欠損した ob/ob マウスを使用し、これらの heterogenous な膵β細胞を解析し、オートファジーフラックスが高い細胞群で共通して発現上昇が認められる 15 遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中で、われわれは特に LPL(lipoprotein lipase)に注目した。LPL は以前、膵β細胞にも発現し膵β細胞機能の変化を通じた耐糖能変化に關与していることが報告されている。実際に免疫組織学的検討により、われわれはオートファジーフラックスが亢進した細胞で LPL 発現が上昇していることを明らかにした。さらに、これまでの検討から、膵島ではインスリンではなく脂肪酸がオートファジーフラックスの活性制御に關与している可能性が考えられたことから、単離膵島に対してパルミチン酸負荷を行い、脂肪酸が膵島のオートファジー活性を上昇させることを示した。

本研究を通じて、われわれは膵島のオートファジーフラックスの評価を通じて、特にインスリン抵抗性下での膵β細胞のオートファジーフラックスの heterogeneity の存在とその機能的意義を明らかにし、またその制御機構の一端を示した(図3, Cell Chemical Biology 2023, in press)。

今後は、pHluorin-LC3-mCherry マウスを使用し、妊娠や1型糖尿病モデルにおいても同様の検討を行い、膵細胞のオートファジーフラックスの変化とその意義について知見をさらに深めることを計画している。



(図3) 本研究のまとめ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mochida Akihiro, Mita Tomoya, Azuma Kosuke, Osonoi Yusuke, Masuyama Atsushi, Nakajima Kenichi, Goto Hiromasa, Nishida Yuya, Miyatsuka Takeshi, Mitsumata Masako, Watada Hirotaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances the healing of abdominal aortic aneurysm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e15000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.15000	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 -

1. 著者名 Aoyama Shuhei, Nishida Yuya, Fujitani Yoshio, Fukunaka Ayako, Miyatsuka Takeshi, Suzuki Luka, Himuro Miwa, Yoshimori Tamotsu, Watada Hirotaka	4. 巻 67
2. 論文標題 Rubicon in pancreatic beta cells plays a limited role in maintaining glucose homeostasis following increased insulin resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1119～1126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.ej20-0326	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 -

1. 著者名 Aoyama Shuhei, Nishida Yuya, Uzawa Hirotsugu, Himuro Miwa, Kanai Akiko, Ueki Kyosei, Ito Minami, Iida Hitoshi, Tanida Isei, Miyatsuka Takeshi, Fujitani Yoshio, Matsumoto Masaki, Watada Hirotaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Monitoring autophagic flux in vivo revealed its physiological response and significance of heterogeneity in pancreatic beta cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chembiol.2023.03.001	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6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青山周平、西田友哉
2. 発表標題 耐糖能異常における膵島オートファジー活性の変化とその意義の検討
3. 学会等名 第14回オートファジー研究会 若手の会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青山周平、西田友哉
2. 発表標題 耐糖能異常における膵島オートファジー活性の変化とその意義の検討
3. 学会等名 第32回分子糖尿病シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西田友哉
2. 発表標題 膵 細胞におけるオートファジーの役割について
3. 学会等名 第72回日本体質医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田友哉
2. 発表標題 膵 細胞におけるオートファジーの多様性とその理解
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西田友哉
2. 発表標題 膵 細胞におけるオートファジー
3. 学会等名 群馬大学 生体調節研究所 内分泌・代謝学共同利用・共同研究拠点セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------