

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11563

研究課題名(和文) ミトコンドリア品質管理に着目した糖尿病における『膵細胞の疲弊』の分子機構

研究課題名(英文) Maintenance of mitochondrial quality control through mitophagy is essential for insulin secretion in pancreatic beta cells

研究代表者

青柳 共太 (Aoyagi, Kyota)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：50453527

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)：インスリンは膵細胞から分泌される血糖降下ホルモンで、血糖値の恒常性維持に不可欠である。日本において、慢性的な高血糖を主徴とする2型糖尿病の大部分はインスリン分泌不全を成因としている。膵細胞のミトコンドリアは血糖依存的にインスリンを分泌する上で重要な役割を果たしているが、糖尿病患者の膵細胞では機能不全となったミトコンドリアが蓄積していることが報告されていた。本研究では膵細胞特異的なマイトファジー(機能不全となったミトコンドリアを分解するオートファジー)を可視化するマウスを用い、ミトコンドリア品質管理の破綻が膵細胞からのインスリン分泌不全の形成に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまで技術的に困難であった膵細胞におけるマイトファジーを評価する実験系を構築した。また、本研究により、膵細胞におけるミトコンドリア品質管理機構が破綻することがインスリン分泌不全を惹起し、糖尿病発症の一因となる可能性が明らかとなった。このことは膵細胞におけるミトコンドリア品質管理を維持することにより、2型糖尿病の発症を抑制する新規治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Insulin is a blood glucose-lowering hormone secreted from pancreatic beta-cells and is essential for maintenance of normoglycemia. In Japan, a large proportion of type 2 diabetes is caused by deficiency of insulin secretion. It is well known that mitochondria in pancreatic beta cells play an indispensable role in glucose-dependent insulin secretion, but morphologically and functionally abnormal mitochondria were accumulated in pancreatic beta cells of diabetic patients. In this study, using CMR mice which enable to visualize mitophagy (selective autophagy that specifically targets damaged or dysfunctional mitochondria for degradation), we revealed that the failure of mitochondrial quality control would cause the deficiency of insulin secretion in pancreatic beta cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：糖尿病 膵細胞 インスリン分泌 ミトコンドリア マイトファジー オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インスリンは膵臓のランゲルハンス島(膵島)内の膵細胞から血中グルコース濃度(血糖値)依存的に分泌される。分泌されたインスリンは脂肪細胞や筋細胞などにおいて血中からの糖の取り込みを促進させると共に、肝臓からの糖の放出を抑制することで血糖値の上昇を抑制する。膵細胞が血糖値を抑制するのに十分な量のインスリンを分泌できなくなると、慢性高血糖となり、糖尿病を発症する。日本における糖尿病の大部分を占める2型糖尿病の初期の膵細胞は血糖値を抑制するためにインスリンを活発に分泌するが、その状態が慢性的に続くと「膵細胞の疲弊」として知られる過程により、インスリン分泌量が徐々に減弱し、最終的にはインスリン分泌不全へと至ることが知られている(1)。すなわち、2型糖尿病の発症を抑制するには「膵細胞の疲弊」の抑制が重要であるが、その分子機構は明らかではない。

膵細胞は血糖値の上昇に応じて細胞内に取り込んだグルコースをミトコンドリアで代謝することでインスリン分泌に必須であるATPを産生している。すなわち、血糖依存的なインスリン分泌において膵細胞のミトコンドリアは重要な役割を果たしている。一方、ミトコンドリアにおけるATP産生過程では副産物として活性酸素種(ROS)が発生し、このROSによって機能不全となったタンパク質や脂質がミトコンドリア内に徐々に蓄積していく。機能不全となったミトコンドリア分子は不良ミトコンドリアとして分離され、マイトファジー(ミトコンドリアを分解するオートファジー)によって分解される(2, 3)。不良ミトコンドリアは正常なミトコンドリアよりも多量のROSを産生したり、アポトーシス誘導シグナルを発することから、マイトファジーによる不良ミトコンドリアの分解によってミトコンドリア品質を維持することは膵細胞からのインスリン分泌を維持する上でも重要である。そこで本研究では膵細胞におけるミトコンドリア品質管理に着目し、「膵細胞の疲弊」との関連について解析を行った。

ミトコンドリア品質管理について解析する上で、マイトファジーの活性を測定することは必要不可欠である。しかしながら、研究開始当初は膵細胞ではマイトファジーの検出が技術的に困難であった。そこで本研究ではマイトファジーを可視化するconditional mitochondria matrix targeting mitophagy repoter (CMR)プローブを膵細胞に特異的に発現させることにより、膵

細胞におけるマイトファジーを評価する実験系を構築した(図1)。CMRプローブはミトコンドリア局在シグナルにmCherryとEGFPをタンデムにつないだ蛍光タンパク質である。CMRプローブを発現するミトコンドリアが細胞質に存在する時はmCherryとEGFPの両方から蛍光が観察されるのに対し、マイトファジーによってリソソームへと移行すると、リソソームの酸性環境によりEGFPが素早く消光するのに対し、mCherryはしばらく蛍光を発し続ける。結果的にCMRプローブを用いればマイトファジーによりリソソームへと移行したミトコンドリアを蛍光の変化を通して検出することが可能となる。作出したCMRプローブを膵細胞特異的に発現させたマウス(CMRマウス)を用い、糖尿病モデルマウスの膵細胞におけるマイトファジーおよびミトコンドリア品質管理状態について評価を行った。

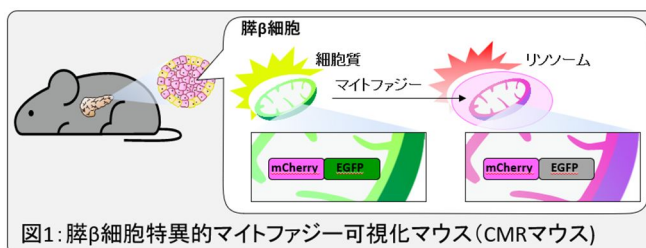


図1: 膵β細胞特異的マイトファジー可視化マウス(CMRマウス)

2. 研究の目的

糖尿病発症に際して観察される「膵細胞の疲弊」の過程におけるミトコンドリア品質管理の重要性を解明する。

3. 研究の方法

(1) CMRマウスの作出

ミトコンドリア局在シグナルにmCherryとEGFPをタンデムにつないだCMRプローブ配列の両端にfloxed配列を挿入したDNAをRosa26にノックインしたマウスと膵細胞特異的にCre recombinaseを発現するRIP-Creマウスを交配することにより膵細胞特異的にCMRプローブを発現するマウスを作出した。

(2) CMRプローブを用いたマイトファジー解析

灌流固定したCMRマウスより作製した膵臓凍結切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。得られた画像のうち、EGFPのシグナル強度からmCherryのシグナル強度を差し引くことによりマイトファジーのシグナルを検出した。また、EGFPシグナルもしくはmCherryシグナルが検出された面積から総ミトコンドリア量を推定した。これらの値から総ミトコンドリア量におけるマイトファジーシグナルの比率を算出した。

(3) 不良ミトコンドリア蓄積量の解析

不良ミトコンドリアはROSの産生が高まることが知られていることから、ROSの産生をOxyBlot法およびMitoSOXを用いた可視化解析により評価した。また、不良ミトコンドリア量を推定するために、機能的なミトコンドリアをMitoTracker Red CM-H₂Xrosで、総ミトコンドリアを抗Tom20抗体でそれぞれ染色し、総ミトコンドリアに対する機能的なミトコンドリアの比率を算出した。

(4) 高脂肪食飼育マウスの作製およびインスリン慢性投与

雄マウスに60%脂肪含有餌を6週齢から26週齢までの20週間投与した。慢性的にインスリンを投与するために、高脂肪食で14週間飼育したマウスの背部皮下に浸透圧ミニポンプを埋設し、0.36U/日の割合でインスリンを6週間投与した。血糖値および血中インスリン濃度を測定するために、一晚絶食したマウスに1.25g グルコース/kgを投与し、投与直前と投与から15、30、60、120分後に尾静脈より採血を行った。

4. 研究成果

(1) 膵 細胞特異的マイトファジー可視化マウス (CMR マウス) の確認

灌流固定したCMRマウスの膵臓切片を観察したところ、インスリンで染色される膵 細胞特異的にCMRプローブが発現していることが確認できた。また、CMRマウスの培養膵 細胞を観察したところ、CMRプローブはミトコンドリアに局在し、マイトファジーを誘導するDFP処理によってリソソームへと輸送され、EGFPが消光してmCherryのみのシグナルを発することが確認できた。さらに、CMRマウスの培養膵 細胞において、オートファゴソーム形成必須分子であるAtg7をノックダウンすると、DFP処理依存的なmCherryのみのシグナルの出現が抑制されることを見いだした。すなわち、CMRマウスを用いて膵 細胞におけるマイトファジーが評価できることが確認できた。

(2) 高脂肪食飼育マウス膵 細胞におけるマイトファジー活性の評価

糖尿病モデルとして高脂肪食で20週間飼育したマウスを用いて実験を行った。高脂肪食飼育したマウスにおいて血糖値が上昇すると共に、それを抑制するために血中インスリン濃度も上昇していることを確認した。CMRマウスを高脂肪食で飼育すると、膵 細胞におけるマイトファジーが誘導されることを見いだした。高脂肪食で飼育すると、膵島が肥大化することが広く知られている(4)。そこで次に、どのような膵島でマイトファジーが誘導されているか調べるために、高脂肪食飼育したマウスの膵島を通常サイズの膵島と巨大サイズの膵島に分類し、マイトファジー活性の評価を行った。すると、高脂肪食飼育によって肥大化した膵島においてマイトファジーがより活発に起こっていることが明らかとなった。その一方、マイトファジーが活発に起こっている巨大膵島では不良ミトコンドリアが多く蓄積していることも明らかとなった。これらの結果から、巨大膵島ではマイトファジーが活発に起こっているが、マイトファジーの処理容量を超える量の不良ミトコンドリアが産生されるため、結果的に不良ミトコンドリアが細胞内に蓄積し、ミトコンドリア品質管理状態が悪化していると結論した。

(3) 高脂肪食飼育マウス膵 細胞におけるマイトファジー誘導機構の解析

巨大膵島におけるマイトファジー誘導機構について明らかにするために、マイトファジー誘導機構として広く知られているPINK1/Parkin経路(5)が膵 細胞におけるマイトファジーに関与するか検討を行った。マイトファジーが活発に起こっている巨大膵島においてParkinの有意な発現上昇が観察された。そこで膵 細胞にParkinを強制発現したが、マイトファジーへの影響は観察されなかった。さらにPINK1の遺伝子欠失マウスを解析したところ、膵 細胞におけるマイトファジーには影響が観察されず、耐糖能異常も正常であった。これらの結果から、膵 細胞におけるマイトファジーにはPINK1/Parkin経路は関与していないと結論した。

次に、膵 細胞におけるPINK1/Parkin非依存的なマイトファジー誘導機構について検討を行った。糖尿病モデルマウスの膵 細胞では低酸素ストレスによって低酸素依存的な転写因子であるHif-1の発現量増大・活性化していることが報告されている(2, 6)。また、ヒト糖尿病患者の膵 細胞においてもHif-1の発現量が増大していることが報告されている(2)。さらに、PINK1/Parkin非依存的なマイトファジー経路として、Hif-1依存的に発現調節されるBNIP3を介した経路が知られていた(7)。そこで、膵 細胞において低酸素-Hif-1-BNIP3の経路を介してマイトファジーが惹起されている可能性について解析を行った。

巨大膵島は低酸素ストレスに曝されており、Hif-1依存的にBNIP3の発現が増強していた。そこでBNIP3を通常飼育したマウスの膵 細胞に強制発現したところマイトファジーの活性化が観察された。一方、高脂肪食飼育したマウスの膵 細胞でBNIP3をノックダウンするとマイトファジーの減弱が観察された。これらの結果から、膵 細胞におけるマイトファジーはPINK1/Parkin経路非依存的であり、低酸素ストレスによりHif-1を介して発現誘導されるBNIP3依存的であると結論した。

(4) インスリン慢性投与が膵 細胞のマイトファジーに与える影響についての解析

高脂肪食飼育により誘導した糖尿病モデルマウスにおいて、インスリンを慢性的に投与する

と血糖値が改善し、膵細胞からのグルコース刺激依存的なインスリン分泌も回復した。そこで、糖尿病モデルマウスの膵細胞機能を回復させるインスリン慢性投与が、膵細胞におけるミトコンドリア品質管理状態へ与える影響について解析を行った。高脂肪食飼育し、インスリンを慢性的に投与したマウスの膵細胞ではマイトファジーの減弱が観察された。さらに、インスリンを慢性投与した膵細胞では低酸素ストレスが緩和され、不良ミトコンドリアの蓄積量も減少していることを見いだした。すなわち、糖尿病モデルマウスに行った慢性的なインスリン投与は膵細胞のミトコンドリア品質管理状態を改善することを介して膵細胞からのインスリン分泌を回復させ、血糖値を改善させている可能性を見出した。

(5) まとめ

本研究により、糖尿病モデルマウスの膵細胞ではマイトファジーが活性化し、不良ミトコンドリアを分解していることが明らかとなった。一方、糖尿病モデルマウスの膵細胞では不良ミトコンドリアの蓄積が観察されたことから、糖尿病モデルマウスの膵細胞では活性化したマイトファジーで分解できる容量を超える不良ミトコンドリアが産生されたため、結果的に不良ミトコンドリアが蓄積し、ミトコンドリア品質管理状態が悪化していると考えられた。また、糖尿病モデルマウスに慢性的にインスリンを投与すると、膵細胞におけるミトコンドリア品質管理状態が改善し、膵細胞からのインスリン分泌が回復したことから、膵細胞におけるミトコンドリア品質管理状態を良好に保つことが膵細胞からのインスリン分泌を維持する上で重要であると考えられた。

糖尿病発症時には膵細胞が活発にインスリン分泌することに疲弊して、インスリン分泌不全へ至ると考えられている。活発なインスリン分泌には大量のATPが必要となるが、その副産物であるROSに起因して不良ミトコンドリアは産生される。すなわち、活発なインスリン分泌により膵細胞が低酸素ストレス状態となり、細胞内に不良ミトコンドリアが蓄積し、その蓄積量が膵細胞におけるマイトファジー処理容量を超えた時に膵細胞がインスリン分泌不全へと向かうことが予想される。つまり、不良ミトコンドリアの蓄積によるミトコンドリア品質管理状態の悪化が、糖尿病発症時に観察される膵細胞の疲弊の分子機構である可能性が考えられた。

<引用文献>

1. Yagihashi S, Inaba W, Mizukami H (2016) Dynamic pathology of islet endocrine cells in type 2 diabetes: β -cell growth, death, regeneration and their clinical implications. *J Diabetes Investig*, 7: 155-165
2. Gerber PA, Rutter GA (2017) The role of oxidative stress and hypoxia in pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*, 26: 501-518
3. Liesa M, Shirihai OS (2013) Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*, 17: 491-506
4. Gupta D, Jetton TL, LaRock K, Monga N, Satish B, Lausier J, Peshavaria M, Leahy JL (2017) Temporal characterization of β -cell-adaptive and β -maladaptive mechanisms during chronic high-fat feeding in C57BL/6NTac mice. *J Biol Chem*, 292: 12449-12459
5. Koyano F, Matsuda N (2015) Molecular mechanisms underlying PINK1 and Parkin catalyzed ubiquitylation of substrates on damaged mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1853: 2791-2796
6. Sato Y, Endo H, Okuyama H, Takeda T, Iwahashi H, Imagawa A, Yamagata K, Shimomura I, Inoue M (2011) Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro. *J Biol Chem*, 286: 12524-12532
7. Killackey SA, Philpott DJ, Girardin SE (2020) Mitophagy pathways in health and disease. *J Cell Biol*, 219: e202004029

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 Aoyagi Kyota, Yamashita Shun-ichi, Akimoto Yoshihiro, Nishiwaki Chiyono, Nakamichi Yoko, Udagawa Haruhide, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Kanki Tomotake, Ohara-Imaizumi Mica	4. 巻 66
2. 論文標題 A new beta cell-specific mitophagy reporter mouse shows that metabolic stress leads to accumulation of dysfunctional mitochondria despite increased mitophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 147 ~ 162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00125-022-05800-8	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青柳共太、山下俊一、神吉智丈、今泉美佳
2. 発表標題 膵 細胞特異的マイトファジーレポーターマウスによって明らかになった糖尿病におけるミトコンドリア品質管理の重要性
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青柳共太、山下俊一、神吉智丈、今泉美佳
2. 発表標題 膵 細胞特異的マイトファジーレポーターマウスによって明らかになった糖尿病におけるミトコンドリア品質管理の重要性
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青柳共太、山下俊一、神吉智丈、今泉美佳
2. 発表標題 膵 細胞特異的マイトファジーレポーターマウスによって明らかになった糖尿病におけるミトコンドリア品質管理の重要性
3. 学会等名 第2回オートファジーコンソーシアムシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青柳共太、山下俊一、西脇知世乃、中道洋子、秋元義弘、神吉智丈、今泉美佳
2. 発表標題 膵細胞におけるミトコンドリア品質管理の破綻はインスリン分泌不全を誘導する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青柳共太、山下俊一、西脇知世乃、中道洋子、神吉智丈、今泉美佳
2. 発表標題 膵細胞における代償性インスリン過剰分泌破綻の分子機構の解析
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020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