

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591356

研究課題名(和文)ミトコンドリアダイナミクスによる代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) Mitochondrial dynamics plays important roles in pancreas beta cell and hepatocytes to regulate glucose and lipid metabolism.

研究代表者

野村 政壽 (Nomura, Masatoshi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30315080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアは、酸素呼吸を行う細胞内小器官であり病態に応じて融合・分裂を繰り返し驚くほどダイナミックにその構造を変化させている。ミトコンドリアの分裂を制御するDrp1遺伝子改変マウスを用いて、その機能解析を行った。膵細胞特異的Drp1欠損マウスはグルコース応答性インスリン分泌の低下、耐糖能異常を認めた。肝細胞特異的Drp1欠損マウスでは高脂肪食下で小胞体ストレスが著明に亢進し、非アルコール性脂肪肝炎が生じる一方、臓器間連関を介し耐糖能の著明な改善を認めた。ミトコンドリアダイナミクスは個体レベルでのエネルギー代謝の恒常性維持に重要な役割をもつことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria have essential roles in the aerobic generation of ATP by oxidative phosphorylation, as well as in variety of cellular processes such as apoptosis and Ca<sup>2+</sup> signaling. The mitochondrial morphology changes dynamically by a balanced fusion and fission processes that occur in response to cellular energy demands, differentiation or pathogenic conditions. In order to clarify the roles of mitochondrial fission in pancreatic beta cells and hepatocytes in vivo, we used a Cre-loxP system to disrupt Drp1 in pancreatic beta cells (Drp1betaKO) and hepatocytes (Drp1LiKO), respectively. Drp1betaKO mice showed defective insulin secretion in response to glucose and overt diabetes. Upon high fat diet, Drp1LiKO mice developed non-alcoholic steatohepatitis with marked elevation of the endoplasmic reticulum stress markers. Collectively, mitochondrial dynamics plays important roles in pancreas beta cell and hepatocytes to meet energy demand.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：ミトコンドリアダイナミクス インスリン分泌 Drp1 小胞体ストレス 脂肪肝炎 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア (Mt) は、酸素呼吸を行う二重膜で囲まれた細胞内小器官であり、エネルギー (ATP) 産生にとどまらず、細胞内 Ca の制御、アポトーシスなどの生命活動に必須の役割を果たしている。また、Mt は reticular (細網状) なネットワークを細胞質全体に張り巡らし、細胞分化や病態によって融合・分裂を繰り返しながら、ダイナミックにその構造を変化させ、動的な平衡を維持していることが知られている。このような融合・分裂のバランスによる Mt ダイナミクスは、個体、臓器の発生、分化に不可欠な現象であり、さまざまな病態と関連することが明らかにされつつある。

GTPase 活性を有する dynamin-related protein 1 (Drp1) は、Mt 外膜上に局在化し Mt を分裂させる。我々は Drp1 遺伝子欠損マウスを作成し、その生理的意義を明らかにした。Drp1 を欠損させた ES 細胞では、Mt の分裂が障害され、分散していた Mt が凝集するが、ES 細胞自体は正常に増殖し、膜電位や Mt DNA に変化はみられないことから、Mt ダイナミクスを障害させても Mt のクオリティ自体は保持されている。しかし、個体レベルの Drp1KO マウスでは、初期胚で胎生致死となる。細胞が増殖しても、極性のある細胞に分化する場合、特に神経系では顕著な異常所見がみられることから、細胞質内の Mt ダイナミクスが発生・分化に重要な機能をもつことが示唆された。

2. 研究の目的

急増するメタボリック症候群、2型糖尿病の克服は 21 世紀における内科学の命題の一つである。2 型糖尿病の発症には、膵細胞のインスリン分泌不全と筋肉、肝臓に代表されるインスリン標的臓器のインスリン抵抗性の 2 つが様々な程度に関与していると考えられる。本研究では Mt ダイナミクスがこの膵細胞からのインスリン分泌、膵細胞の維持機構に如何に関与するのか、肝臓におけるエネルギー代謝、インスリン抵抗性の発症に如何に関与するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Drp1 floxed マウスに Insulin-Cre, Albumin-Cre マウスを交配させ、それぞれ膵細胞および肝細胞特異的 Drp1 欠損マウスを作成し、以下の成果に示す研究を遂行した。

4. 研究成果

**膵細胞での Mt ダイナミクス**

Drp1 KO での Mt の凝集とクオリティ

Drp1 KO は、Drp1 flox マウスと RIP-Cre マウスの交配により Drp1 を膵細胞特異的に欠損させて作製した。Drp1 KO では、細胞、細胞といった cell lineage, ラ氏島構築に異常はみられないが (図 1A), コンプレックス III 抗体を用いて Mt を染色す

ると、その分布に偏りがあることが観察された。電子顕微鏡で確認すると、野生型では Mt が全体に分散していたのに対して、Drp1 KO では核の近傍などに Mt の凝集がみられた (図 1B)。また、個々の Mt は膨張し形態異常を示していたが Mt のクリステ構造の異常はみられない。さらに、Drp1 KO の ATP 量や膜電位は WT と違いがないことから、Drp1 KO の Mt の呼吸活性は正常であることが確認された。すなわち、Drp1 KO は膵細胞における Mt ダイナミクス

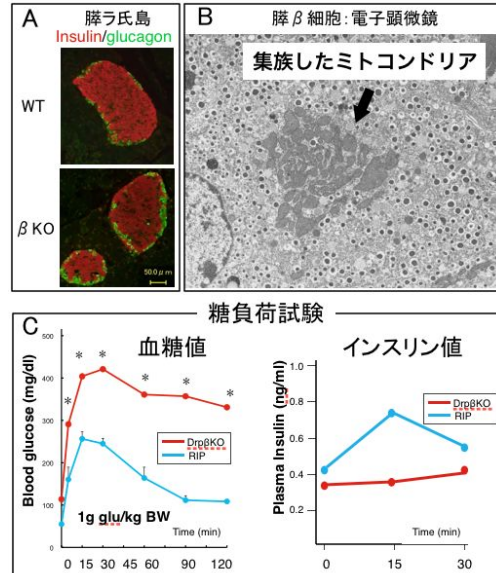


図1 膵β細胞特異的Drp1ノックアウトマウス

の機能解析に非常に有用なツールと考えられる。

耐糖能とインスリン分泌

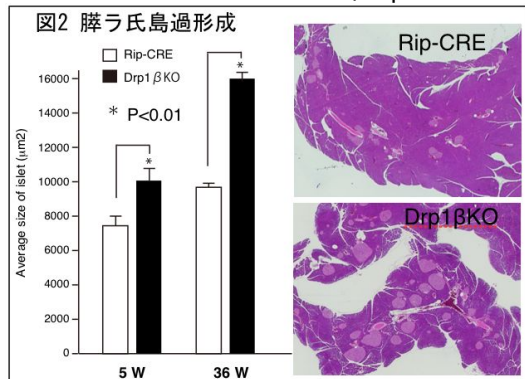
耐糖能に関しては、Drp1 KO の 4 週齢で異常がみられ、週齢とともに悪化した。また、Drp1 KO ではグルコース応答性インスリン分泌の低下が認められた (図 1C)。

細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態

グルコース応答性インスリン分泌低下の原因を検討するため、Drp1 KO からラ氏島を単離し、カルシウムプローブを用い、細胞内 Ca 濃度を測定した。グルコース刺激により、コントロール (RIP-Cre マウス) では細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度が速やかに上昇したが、Drp1 KO では上昇が緩やかであり、ピーク到達時間、回復時間も遅延した。このことから、細胞内 Ca 濃度上昇の障害がグルコース応答性インスリン分泌を低下させている原因の一つであり、Mt が凝集している細胞では、その ATP 産生能や呼吸活性は正常でも、応答性が低下していることが示唆された。一方、野生型の単離ラ氏島を用いた観察では、グルコース負荷により細胞の Mt ダイナミクスが分裂に傾き、急速に変化することも観察されている。

アポトーシス

細胞の Mt ダイナミクスがアポトーシスに及ぼす影響について、5 週齢と 36 週齢でラ氏島の面積を測定すると、Drp1 KO でラ



氏島の有意な過形成が認められた(図2)。左にラ氏島の平均面積、右に36週令の膵臓 HE 染色像を示す。さらに Drp1 KO では、グルコース応答性は欠落するが、インスリン分泌は持続し、長期的には体重が増加し肥満を呈することが示唆された。

### 膵細胞からのインスリン分泌、膵細胞の保持機構

細胞がインスリン分泌から細胞外のグルコース濃度を認識し、Mt ダイナミクスを変化させ、長期的には細胞数も規定していることから、Mt ダイナミクスは膵細胞からインスリンを分泌させ、膵細胞の保持機能を有していることを明らかにした。

### 肝細胞での Mt ダイナミクス

次に、肝臓での Mt ダイナミクスの機能を検討するため、Drp1 flox マウスとアルブミン CRE マウス(Alb-Cre)を交配し Drp1LiKO を作製した。Drp1LiKO と Alb-Cre を比較すると、普通食では両者に有意差はみられないが、高脂肪食では、両者の食餌摂取量が同じでも、Drp1LiKO の体重増加は抑えられ、Alb-Cre との間に有意差が認められた。このことから、Drp1LiKO は食餌誘導性の肥満に抵抗性を示すことが示唆された。

### 非アルコール性脂肪肝炎と小胞体ストレス

一方、肝の組織学的検討では炎症性マーカー(F4/80, MCP-1)発現亢進、肝細胞のアポトーシス(TUNEL)さらにネクローシス(核の膨化)の増加、肝繊維化(Picrosirius Red Stain)の増加を確認。電顕でミトコンドリアの形態異常(膨化)に加え、小胞体の膨化、断裂といった形態異常を明らかにした。マイクロアレイ法により遺伝子発現を解析した結果、脂質合成・分解に関与する遺伝子群の発現量に著変は認めなかったが、小胞体ストレスマーカーである P3, ATF4 が 50-100 倍と著明な増加を認めた。しかしながら、野生型および DrpLiKO マウス肝臓よりミトコンドリアを単離し、呼吸活性、ミトコンドリア膜電位を測定したが有意差は認めなかった。また細胞内 ATP 濃度にも有意差は認めなかった。Drp1 の欠損によりミ

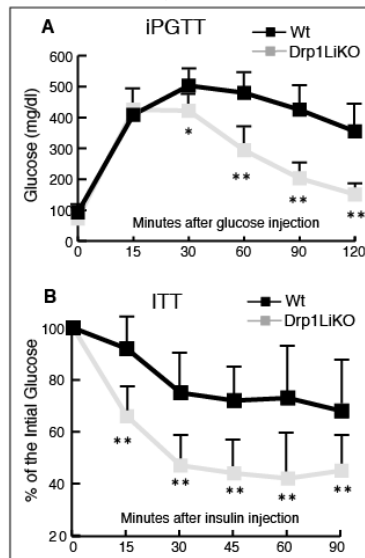
トコンドリアの呼吸活性には全く影響がみられないが、形態および動態に変化を認め、小胞体ストレスが著明に惹起されることを明らかにした。

### 臓器間連関を介したインスリン感受性

#### 制御

普通食下で腹腔内ブドウ糖負荷試験(iPGTT)を行うと、Drp1LiKO と Alb-Cre の間に有意差はみられなかったが、高脂肪食負荷では、Drp1LiKO は Alb-Cre と比較して耐糖能、インスリン感受性は良好であった(図3A: iPGTT、3B: インスリン負荷試験)。

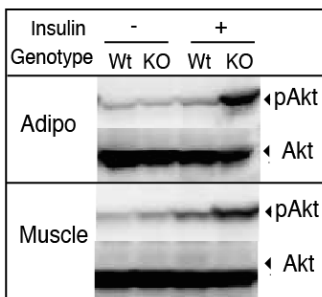
図3 糖代謝改善



さらに、血中トリグリセライド、コレステロール値も有意に低下していた。Drp1LiKO マウスはインスリン感受性の亢進から耐糖能が著明に改善することを明らかにした。

そこで脂肪・筋組織におけるインスリンシグナルの活性化を検討した(図4)。

図4 脂肪・筋組織インスリン感受性



脂肪、筋組織双方でインスリン受容体の下流に存在する Akt のリン酸化が亢進しインスリン感受性が亢進していることが明らかにした。肝臓でのミト

コンドリアダイナミクスの変化が肝臓から発せられる代謝シグナルを介して全身の糖代謝を制御していることが示唆された。

#### 結語

ミトコンドリアダイナミクスは、細胞レベルで外的環境を認識し、自らのアウトプットを変化させ、膵細胞からのインスリン分泌、膵細胞保持機構、さらに肝細胞における脂質代謝、インスリン抵抗性獲得機構で重要な役割をもつことが示唆された。今後、その詳細について検討を加えていきたいと考えている。

#### 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)

- 1) Wang L, Nomura M, Goto Y, Tanaka K, Sakamoto R, Abe I, Sakamoto S, Shibata A, Enciso PL, Adachi M, Ohnaka K, Kawate H, Takayanagi R: Smad2 disruption in the central nervous system leads to aberrant cerebellar development and early postnatal ataxia in mice. *J. Biol. Chem.* 286: 18766-74, 2011
- 2) Yagi M, Uchiumi T, Takazaki S, Okuno B, Nomura M, Yoshida S, Kanki T, Kang D: p32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation: importance of its RNA binding ability. *Nuc Acid Res* 40: 9717-37, 2012.
- 3) Sakamoto R, Matsubara E, Nomura M, Wang L, Kawahara Y, Yanase T, Nawata H, Takayanagi R: Roles for corticotropin-releasing factor receptor type 1 in energy homeostasis in mice. *Metabolism* 62: 1739-48, 2013. doi: 10.1016/j.metabol.2013.08.005.
- 4) Nomura M, Hei-lay Z, Wang L, Morinaga H, Takayanagi R, Teramoto N: Smad2 disruption in mouse pancreatic b cells leads to islet hyperplasia and impaired insulin secretion due to the attenuation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel activity. *Diabetologia* 57: 157-166, 2014. doi: 10.1007/s00125-013-3062-2.
- 5) Matsuura H, Ichiki T, Inoue E, Nomura M, Miyazaki R, Hashimoto T, Ikeda J, Takayanagi R, Fong GH, Sunagawa K: Prolyl hydroxylase domain protein 2 plays a critical role in diet-induced obesity and glucose intolerance. *Circulation* 127: 2078-87, 2013, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001742.
- 6) Kamakura S, Nomura M, Hayase J, Iwakiri Y, Nishikimi A, Fukui Y, Takayanagi R, Sumimoto H: The cell polarity protein mInsc regulates neutrophil chemotaxis via a noncanonical G protein signaling pathway. *Dev Cell* 26: 292-302, 2013, doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.008.

〔雑誌論文〕(計 19 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：Drp1 欠損非ヒト哺乳動物

発明者：三原勝芳、石原直忠、野村政壽

権利者：株式会社ジェンテック

種類：

番号：特許第 5308651 号

取得年月日：平成 25 年 7 月 5 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed3/general\\_1.html](http://www.med.kyushu-u.ac.jp/intmed3/general_1.html)

tml

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野村政壽 (NOMURA, Masatoshi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：3031580

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

石原直忠 (ISHIHARA, Naotada)

久留米大学・分子生命科学・教授

研究者番号：10325516