

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860758

研究課題名(和文)オートファジーとヒト膵島アミロイド蛋白を中心とした糖尿病発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the diabetes onset mechanism mainly on autophagy and human islet amyloid polypeptide

研究代表者

小宮 幸次(Komiya, Koji)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：50385077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病発症にオートファジーとヒト膵島アミロイド蛋白(hIAPP)の関与が示唆されているため、その関連を検討した。コントロールマウスと比較して膵細胞特異的オートファジー不全マウスでは耐糖能障害が認められ、hIAPPノックインによりさらなる増悪が認められた。膵細胞株およびhIAPPノックインマウスにおいて膵細胞の増殖抑制が認められ、インスリン受容体のリン酸化が減弱していた。膵細胞におけるhIAPPによるインスリンシグナルの抑制が耐糖能障害の機序の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the synergistic role of human IAPP (hIAPP) and autophagy dysfunction in the pathogenesis of diabetes. In the previous study we reported that reduced autophagic activity in beta cells caused impaired glucose tolerance. Physiological expression of human IAPP using hIAPP knockin strategy further exacerbated glucose intolerance of mice with beta-cell specific autophagy deficiency. Induction of hIAPP in insulinoma cells and in hIAPP knockin mice resulted in inhibition of beta cell proliferation associated with decreased phosphorylation of insulin receptor. These results suggested that inhibition of insulin signaling by hIAPP may be involved in the loss of compensatory proliferation of beta cells and impaired glucose tolerance.

研究分野：代謝内分泌内科学

キーワード：糖尿病 オートファジー 膵島アミロイド蛋白 膵細胞

1. 研究開始当初の背景

現代日本において過剰栄養摂取により糖尿病の罹患率は増加傾向にあり、その発症予防は重要な命題となっている。糖尿病の自然史において血糖上昇に先行して膵細胞の機能障害が惹起されることが以前より知られており、我々は過剰栄養による膵細胞障害の誘導メカニズムについてオートファジーに着目し研究を進めてきた。飢餓状態ではオートファジーが誘導され蛋白分解により栄養供給に働き、また我々や別のグループからの報告では遊離脂肪酸の短期的な負荷により誘導され、長期的な負荷では抑制されるなど、栄養状態によりオートファジー誘導が調整される事が報告されている。さらにオートファジーは細胞の恒常性維持を担い、異常蛋白や障害された細胞内小器官のクリアランスを行う。従って過栄養状態における膵細胞の機能調整に関与していると考え、我々は膵細胞特異的オートファジーノックアウトマウスの検討を行い、過栄養状態における膵細胞の機能維持にオートファジーが不可欠であることを見出した(引用)。また我々や別のグループからの報告では2型糖尿病モデル動物およびヒト2型糖尿病においてオートファジー不全を示す所見が認められており(引用)、2型糖尿病発症とオートファジー不全の関連性はますます強まってきたが、オートファジーによる膵細胞機能調整のメカニズムはいまだ詳細不明である。

2. 研究の目的

オートファジー不全と疾患の関連性は様々な臓器において報告されており、特に神経細胞ではオートファジー不全により異常蛋白のクリアランスが低下し、細胞障害に働くことが示されている。以前より2型糖尿病において膵細胞より分泌される islet amyloid polypeptide (IAPP)が膵島に蓄積されることが知られており、IAPPの蓄積や重合により形成された毒性オリゴマー(toxic oligomer)が膵細胞障害を惹起することが報告されている。そこで本研究ではオートファジー不全によるIAPPのクリアランス低下およびIAPP蓄積とオートファジー不全の相互作用を検討してオートファジー不全による膵細胞機能維持破綻のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) マウスの検討

膵細胞特異的オートファジー不全マウス($Atg7^{fl/fl};RIP-Cre$)(引用)とヒトIAPPノックインマウス(引用)を交配し膵細胞特異的オートファジー不全ヒトIAPPノックインマウスを作成した。8週齢より高脂肪食負荷を開始し20-21週齢の時点で腹腔内ブドウ糖負荷試験を施行し、後日に膵臓摘出を行い、インスリン抗体、cleaved caspase3抗体、Ki-67抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(2) IL-1 の検討

テトラサイクリン誘導性オートファジー不全膵細胞株($Atg7-KD\ INS-1\ cells$)(引用)の培地中にリコンビナントIL-1、IL-1受容体中和抗体、ヒトIAPPまたはラットIAPPペプチドを加え培養したのちに回収し、flow cytometryを用いた細胞周期測定およびSubG1測定、Western Blotting、quantitative RT-PCRによる評価を行った。

(3)膵細胞のインスリンシグナルの検討

$Atg7-KD\ INS-1\ cells$ の培地をヒューマリンR添加培地に交換し、その5分後に細胞を回収し、Western Blottingによりインスリン受容体(IR)、Akt、ERKのリン酸化を評価した。上記の実験系にヒトIAPPペプチドまたはラットIAPPペプチドを添加し、リン酸化状態の変化を評価した。また先の $hiAPP:Atg7^{fl/fl};Cre$ マウスより膵島を単離し、同様にヒューマリンRの添加を行い、Western Blottingによる評価を行った。

4. 研究成果

(1)膵細胞特異的オートファジー不全ヒトIAPPノックインマウスの検討

高脂肪食負荷下においてコントロールマウス($Atg7^{fl/fl}$)と比較して膵細胞特異的オートファジー不全マウス($Atg7^{fl/fl};Cre$)では耐糖能障害が認められ、膵細胞特異的オートファジー不全ヒトIAPPノックインマウス($hiAPP:Atg7^{fl/fl};Cre$)では耐糖能障害の更なる増悪が認められた(図1)。

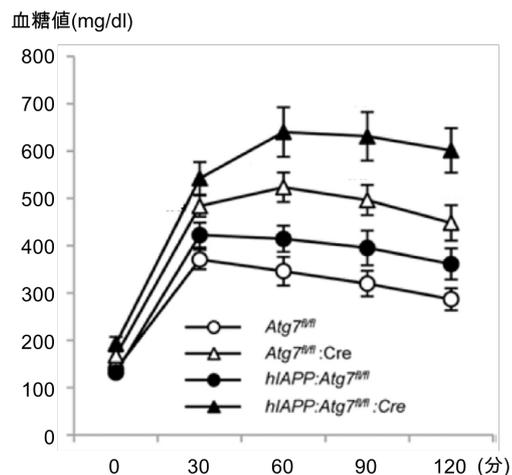


図1. 腹腔内糖負荷試験

摘出膵臓の免疫染色において $hiAPP:Atg7^{fl/fl};Cre$ マウスでは膵細胞容積の減少、cleaved caspase3陽性細胞の増加、Ki-67陽性細胞の減少が認められた。アポトーシスの増加、増殖の抑制による膵細胞容積の減少が耐糖能障害を引き起こしたと考えられた。

(2) IL-1 を介した膵細胞障害の検討

2型糖尿病では膵細胞自体が活性型IL-1

を分泌する事が報告されている。またインスリン抵抗性存在下では膵ラ氏島にマクロファージなどの炎症細胞の浸潤が認められ、既報においてヒト IAPP はマクロファージからの活性化型 IL-1 分泌を促進する事が報告されている。IL-1 の活性化にオートファジーが関与することが報告されている。そこでオートファジー不全におけるヒト IAPP による膵細胞障害のメカニズムとして IL-1 に着目し検討を行った。既報において培地中にヒト IAPP ペプチドを添加すると細胞内に取り込まれることが報告されているため、Atg7-KD INS-1 cells にヒト IAPP ペプチド添加を行った。SubG1 測定ではオートファジー不全およびヒト IAPP によるアポトーシスの有意な増加は認められなかった。細胞周期測定ではオートファジー不全により G1 期への移行が認められ、ヒト IAPP 添加により更なる移行が認められ、細胞増殖の抑制が示唆された(図 2)。

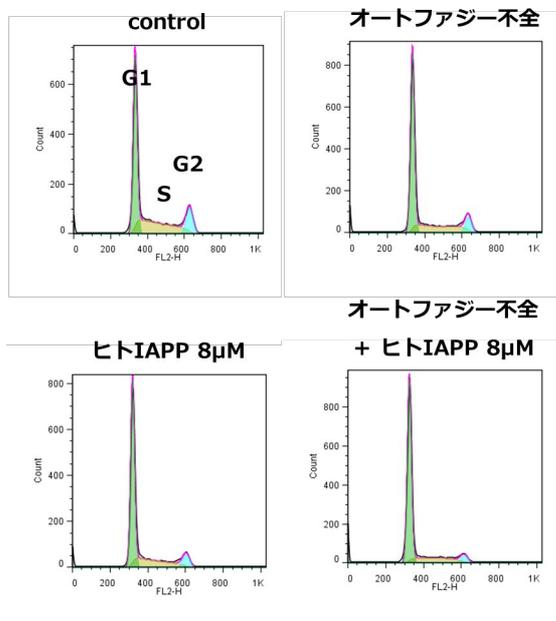


図 2 . 細胞周期測定

ヒト IAPP による細胞増殖の抑制に膵細胞からの IL-1 産生の関与を検討するため、quantitative RT-PCR にて IL-1 の発現を調べたが、オートファジー不全下においてヒト IAPP 単独負荷では IL-1 の発現量に差は認められなかった。また IL-1 受容体の中和抗体の添加を行い IL-1 シグナルの抑制を行ったが、ヒト IAPP による細胞増殖抑制に変化は認められなかった。次にヒト IAPP により活性化されたマクロファージから分泌された IL-1 により膵細胞が障害されることを想定し、Atg7-KD INS-1 cells の培地中にリコンビナント IL-1 の添加を行った。SubG1 測定では差は認められず、細胞周期測定においてヒト IAPP 添加において認められたような細胞増殖の抑制は IL-1 添加では認められなかった。以上よりオートファジー不全下におけるヒト IAPP による膵細胞障

害に IL-1 関与の可能性は低いものと考えられた。

(3)膵細胞のインスリンシグナルの検討
前述の細胞周期測定では予備実験の結果(未掲載)に基づいて高グルコース、インスリン添加の条件にて検討を行った。そこでヒト IAPP による細胞増殖抑制にインスリンシグナルの関与を想定し検討を行った。INS-1 cells においてインスリン添加による IR, Akt, ERK のリン酸化はヒト IAPP ペプチド添加により有意な抑制が認められた(図 3)。同様の検討を hIAPP:Atg7^{fl/fl} マウスから単離した膵島でも施行し、インスリンによる IR および Akt のリン酸化が hIAPP:Atg7^{fl/fl} マウスでは減弱している事が確認できた(図 3)。

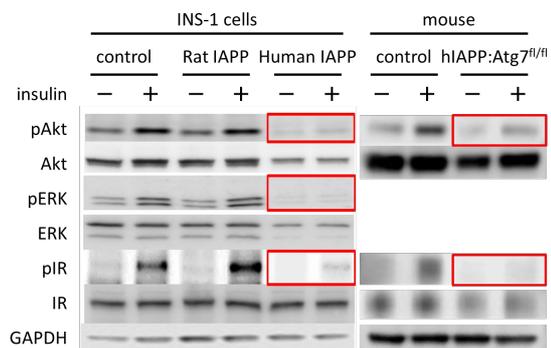


図 3 . WB によるインスリンシグナルの検討

以上よりヒト IAPP によるインスリン受容体のリン酸化阻害は、ヒト IAPP による膵細胞障害の一端を担っている可能性が示された。

今後、ヒト IAPP によるインスリン受容体リン酸化阻害のメカニズムの解明およびオートファジーとの関連性の検討を行い、2 型糖尿病発症・進行とオートファジー不全、ヒト IAPP 蓄積との関連性を明らかとし、2 型糖尿病の病態の一端を明らかとしたい。

<引用文献>

C. Ebato, H. Watada and et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 8, 2008: 325-32
K. Komiya, H. Watada and et al. Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic beta-cells via JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 401, 2010: 561-7
H. J. Hiddinga, N. L. Eberhardt and et al. Expression of wild-type and mutant S20G hIAPP in physiologic knock-in mouse models fails to induce islet amyloid formation, but induces mild glucose intolerance. *Journal of Diabetes Investigation* 3, 2012: 138-147

H. Abe, H. Watada, and et al. Exendin-4 improves beta-cell function in autophagy-deficient beta-cells. *Endocrinology* 154, 2013: 4512-24

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

E. Yamamoto, T. Uchida, K. Komiya, Y. Fujitani, T. Ueno, H. Watada, and et al. (掲載員数12人, 掲載順番6番目), Increased expression of ERp57/GRP58 is protective against pancreatic beta cell death caused by autophagic failure. *Biochem Biophys Res Commun* (査読有) 453, 2014: 19-24

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.09.040

N. Shigihara, K. Komiya, M. Koike, Y. Uchiyama, T. Yoshimori, Y. Fujitani, H. Watada, and et al. (掲載員数19人, 掲載順番4番目), Human IAPP-induced pancreatic beta cell toxicity and its regulation by autophagy. *J Clin Invest* (査読有) 124, 2014: 3634-44
DOI: 10.1172/JCI69866

〔学会発表〕(計1件)

小宮幸次, 糖尿病発症におけるヒト膵島アミロイド蛋白とオートファジーの相互作用の解明. *Front Runner of Future Diabetes Research* 第2回研究発表会, 東京, 2013

〔図書〕(計1件)

小宮幸次, 綿田裕孝, 【経口糖尿病薬治療アルゴリズムを考える-欧米でファーストラインのビッグアナイド薬を中心に】 欧米のアルゴリズムにおけるビッグアナイドの位置づけ. *糖尿病の最新治療*, 5, 2014: 66-71

<http://search.jamas.or.jp/link/ui/2014126249>.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/taisya_naibunpitsu/k4.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小宮 幸次 (KOMIYA, Koji)
順天堂大学大学院 医学研究科 代謝内分泌学講座・助教
研究者番号: 50385077

(2)研究分担者

(3)連携研究者