

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390244

研究課題名(和文) 膵細胞オートファジーの生理的基質の解明

研究課題名(英文) Physiological substrate of beta cell autophagy

研究代表者

綿田 裕孝 (Watada, Hirotaka)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：60343480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：今回、我々は2型糖尿病の病態、特に膵細胞不全の病態解明を目的として、膵細胞におけるオートファジー機構に着目して検討を行った。2型糖尿病の膵細胞では、しばしばアミロイドの沈着が認められるが、この原因蛋白であるヒトIAPPがどのように毒性を発揮するかは明らかにされていなかった。本研究の結果、ヒトIAPPはオートファジー機能が正常であれば明らかな膵細胞傷害性は示さないが、高脂肪食などのストレス下にオートファジー不全という状態が存在すると膵細胞毒性が亢進し、膵細胞のアポトーシスの増加を介して膵細胞容積を低下させ、その結果糖代謝障害を引き起こすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Type2 diabetes mellitus is a serious health problem in the world. In this study, to uncover the pathophysiology of beta cells observed in type 2 diabetes mellitus, we investigated the role of autophagy failure on the human islet amyloid polypeptide (hIAPP) toxicity. Detailed analyses using knock-out mice revealed that autophagy failure deteriorates beta cell toxicity of hIAPP under insulin resistance condition. These data suggest that autophagy failure may be involved in the pathogenesis of beta cell failure in type 2 diabetes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：膵細胞 オートファジー インスリン アポトーシス アミリン

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病患者の特筆すべき特徴は、膵細胞の脆弱性である。この特徴を糖尿病の病期に従って列記する。

糖尿病発症前：耐糖能は比較的保たれているが、ブドウ糖応答性インスリン分泌低下を示す。

糖尿病初期～中期：過栄養状態などによりインスリン抵抗性が出現するが、本来認められるべき膵細胞容積増加が認められず、逆に膵細胞容積が低下し、耐糖能の悪化を招く。

糖尿病中期～後期：膵細胞から分泌されるIslet Amyloid Polypeptide (IAPP)がアミロイドとよばれる繊維状の凝集体を形成し、膵ラ氏島に蓄積する。このIAPPは特にoligomerの状態に細胞毒性を有するため、2型糖尿病における膵細胞機能不全に拍車をかけることが予測される。

以上のような膵細胞異常を一義的に説明できる機構は未だ明らかになっていない。我々は、これまで、膵細胞におけるオートファジー機構に着目し、膵細胞特異的にオートファジー機構に必須なタンパクAtg7を欠損させた膵細胞特異的Atg7ノックアウトマウスを作製し、オートファジー機構がこの病態に関与する可能性に関して検討を行ってきた。その結果、以下の結果が明らかになった。

インスリン抵抗性状態では膵細胞のオートファジーが活性化している。

膵細胞におけるオートファジー不全はミトコンドリアにおけるATP産生低下を伴ったブドウ糖応答性インスリン分泌不全を引き起こす。

膵細胞におけるオートファジー不全は、本来認められるインスリン抵抗性に伴う膵細胞増殖亢進による膵細胞量の増加の障害を引き起こす。この際、膵細胞のApoptosisが亢進することがその一因として考えられる (Ebato et al. Cell Metabolism 8:325-332,2008)。

この結果は、膵細胞オートファジー不全が、糖尿病発症前、糖尿病初期～中期の特徴的異常を引き起こすことを示唆する。一方で、糖尿病中期～後期の異常に関しては、IAPPに代表される不要なタンパクの蓄積が細胞障害を招くという事実を鑑みると、タンパク分解の中核を担

うオートファジー不全の結果引き起こされる特異的基質の蓄積が糖尿病中期～後期の異常に密接に関与する可能性があると考えた。事実、ヒトIAPPを膵細胞に強制発現させると、耐糖能が悪化するとともに、膵細胞におけるユビキチン化蛋白の蓄積が認められることが報告されている (Huang CJ. et al. Am J Physiol Endocrinol Metab 293:E1656-62, 2007)。

以上の情報から、通常状態ではオートファジーがヒトIAPPの分解消去に関与し、オートファジー不全状態ではヒトIAPPの細胞毒性が表面化することにより、膵細胞機能傷害が誘導されるという仮説を立てた。この仮説が立証されれば、膵細胞におけるオートファジーは、ヒトの膵細胞においてより生理的役割を有するということになり、きわめて興味深い。

また、Komatsuらは、神経特異的ATG7ノックアウトマウスと肝特異的ATG7ノックアウトマウスをそれぞれオートファジー不全で蓄積するタンパクであるp62のノックアウトマウスと交配し、ダブルノックアウトマウスを作製後、両者のphenotypeを比較した (Komatsu M. et al. Cell 131:1149-63, 2007)。その結果、肝特異的ATG7ノックアウトマウスの肝障害は、P62欠損により、著明に改善したが、神経特異的ATG7ノックアウトマウスの神経変性には何ら影響を与えなかった。このことは、p62の蓄積が臓器特異的に細胞障害性を有していることを示しているが、膵細胞におけるP62蓄積の意義に関しては、現在不明である。

2. 研究の目的

以上の背景を鑑み、本申請では膵細胞障害に関与するオートファジーの基質の候補として重要性がとりわけ高いと予想されるp62とヒトIAPPに関して、その病態生理学的意義を解析する。さらに、それ以外の基質を網羅的に同定、機能解析を進めてゆく。

すなわち本申請の具体的な目標は、

1) ヒト IAPP による膵細胞障害とオートファジーによる制御

2) 膵細胞における p62 蛋白蓄積の病態生理学的意義の解明

3) 膵 細胞におけるオートファジーの 新規基質蛋白質の網羅的解析である。

3. 研究の方法

1) ヒト IAPP による膵 細胞障害とオ ートファジーによるその制御

マウスの IAPP はアミノ酸配列の違いから、ヒト IAPP のような toxic oligomer や fibril のような高次構造をとらないことが知られている。したがって、マウスモデルを用いてヒトの IAPP の病態生理を解析することは通常不可能である。

そこで、ヒト IAPP の病態生理学的意義を解析するためにしばしば用いられているモデルは、ヒト IAPP トランスジェニックマウスである。しかしながら、このモデルは、大量の IAPP を膵 細胞に発現する非生理的な系であるために、それ自体で小胞体ストレスを惹起する(Matveyenko AV et al Diabetes. 58:906-916, 2009)。したがって、発症前のヒトの糖尿病を反映するモデルにはならないと我々は考えた。このような中で、Mayo Clinic の Eberhardt 博士らは、マウス IAPP 遺伝子座にヒト IAPP を組み込んだ、ヒト IAPP ノックインマウスを作製している。このモデルのすぐれた点は、ヒト IAPP がマウスの内因性プロモータの制御下にコントロールされていることであり、ヒト IAPP を過剰発現させるトランスジェニックマウスとは異なり、より生理的な条件下でヒト IAPP の糖尿病における役割を in vivo で解析できることである。

そこで、本研究では、ヒト IAPP ノックインマウスにおいて、膵 細胞特異的に ATG7 を欠損させることにより、潜在的に細胞毒性を有するヒト IAPP に対する、オートファジーの膵 細胞保護効果について解析する。

2) 膵 細胞における p62 蛋白質蓄積の病 態生理学的意義の解明

申請者らの検討の結果、膵 細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウスにおいては、神経や肝特異的 ATG7 ノックアウトマウスと同様に p62 (sqstm1) の蓄積が認められた。肝においては、ATG7 ノックアウトマウスと p62 ノックアウトマウスを交配することで、肝逸脱酵素の著明な減少や組織学的異常の改善などが観察された(Komatsu M. et al. Cell 131:1149-1163, 2007)。このことより、肝臓においてオートファジー不全によりもたらされる細胞障害の多くは p62 に依存したものであることがわかる。一方、神経特異的 ATG7 ノックアウトマウスにおいて、p62 を欠損させても神経変性の表現型になんら改善は認められなかった。以上のことから、オートファジー不全による細胞機能障害における p62 の関与は臓器により大きく異なるといえる。そこで、膵 細胞のオートファジー機能不全による膵 細胞機能障害において p62 の蓄積がその phenotype にどのように関与しているのか、そのメカニズムは何かに関して、詳細に検討を行う。

ただし、p62 の全身のノックアウトマウスはインスリン抵抗性を主因とする糖尿病を発症することが知られているため、このマウスは膵 細胞の詳細な phenotype の解析には適さない。そこで、筑波大学の石井哲郎博士らが作製した p62^{flox} マウス(Okada K et al. Hepatol Res. 39:490-500, 2009)と膵 細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウスを交配し、膵 細胞特異的 ATG7 & p62 ダブルノックアウトマウスを作製すべく、交配を進める。

3) プロテオミクスを用いた膵 細胞にお けるオートファジーの基質蛋白質の網羅的 解析

膵細胞でオートファジーの基質となっている蛋白質を網羅的に同定することを目的とする。具体的には膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウス (Rip-Cre;Atg7f/f) 及びコントロールマウス (Atg7f/f マウス) の単離膵島からのタンパク抽出物を用いてプロテオミックスの手法で両群間で発現の異なるタンパクを同定。そのタンパクの膵細胞における役割を細胞株に強制発現することにより検討する。

4. 研究成果

1) ヒト IAPP による膵細胞障害とオートファジーによるその制御

ヒト IAPP が膵細胞のオートファジーに与える影響を観察する目的で INS1 細胞にヒト IAPP を添加した。その結果、ラット IAPP 添加時に比し INS-1 細胞におけるオートファゴソーム数の数が増加した。また、タンパク分解酵素阻害剤を投与したさいの LC3type2 の発現量が増加していた。さらには、膵細胞特異的ヒト IAPP ノックインマウスにおいてはコントロールマウスに比しオートファゴソーム数の増加が観察された。以上より、ヒト IAPP は齧歯類のそれよりもオートファジーを活性化させることが示された。

つぎにヒト IAPP がオートファジーを活性化させる意義を検討する目的で、テトラサイクリン応答性 Atg7 ノックダウン細胞を樹立した(Abe H. et al. Endocrinology, 154: 4512-4524, 2013)。この細胞株にさらにヒト IAPP を添加し、細胞数を計測したところ、細胞死が増加することが明らかになった。すなわちヒト IAPP の毒性の除去に膵細胞のオートファジー機構が必要である可能性が示唆された。

次に、in vivo において、ヒト IAPP と膵細胞オートファジー不全が糖代謝に与える影響を観察する目的でヒト IAPP ノック

インマウスと膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスを交配させて、耐糖能負荷試験をおこなった。その結果、高脂肪食負荷の状況下で、ヒト IAPP ノックイン膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスはヒト IAPP ノックインマウスや膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスに比べて耐糖能が悪化することが観察された。

次に、in vivo において、ヒト IAPP と膵細胞オートファジー不全が膵細胞容積に与える影響を観察する目的で、膵切片を用いて膵細胞容積、cleaved caspase3 陽性細胞数、Ki67 陽性細胞数を計測した。その結果、ヒト IAPP ノックイン膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスはヒト IAPP ノックインマウスや膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスに比べて膵細胞容積が減少しており、かつ cleaved caspase3 陽性細胞数が増加していることが明らかになった。

これに関して、膵細胞における p62 の免疫染色を行ってみると、興味深いことに膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスでは p62 陽性の凝集体形成が認められるが、ヒト IAPP ノックイン膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスでは、p62 陽性凝集体が認められずに、代わりに p62 が細胞質に均一に存在していた。

これらのデータよりヒト IAPP はオートファジー機能が正常であれば明らかな膵細胞傷害性は認めないが、高脂肪食などのストレス下にオートファジー不全という状態が存在するとなんらかの機序で膵細胞毒性が亢進し、膵細胞のアポトーシスの増加を介して膵細胞容積を低下させ、その結果糖代謝障害を引き起こすと考えられる。その機序のひとつに p62 の凝集障害が考えられた (Shigihara N. et al. J. Clin. Invest. 2014 in press)。

このようにオートファジー機能不全は膵

細胞機能において重要であるが、現在臨床で広く用いられている GLP-1 受容体作動薬がオートファジー機能不全による膵細胞傷害にどのように作用するかについては明らかではなかった。そこで追加検討を行った。具体的には、膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスに GLP-1 受容体作動薬を投与し耐糖能が改善するか否かを検討した。その結果、GLP-1 受容体作動薬の慢性投与はブドウ糖応答性のインスリン分泌能を改善させることが明らかになった (Abe H. et al. *Endocrinology*, 154: 4512-4524, 2013)。

2) 膵細胞における p62 蛋白質蓄積の病態生理学的意義の解明

筑波大学の石井哲郎博士らが作製した p62flox マウス (Okada K et al. *Hepatology Res.* 39:490-500, 2009) と膵細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウスを交配し、膵細胞特異的 ATG7 & p62 ダブルノックアウトマウスの作製をすすめ、現在そのラインの作製が終わった。現在、膵細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスと膵細胞特異的 ATG7 & p62 ダブルノックアウトマウスを作製できたので、両者の phenotype の比較を行っている。

3) プロテオミクスを用いた膵細胞におけるオートファジーの基質蛋白質の網羅的解析

膵細胞特異的 ATG7 ノックアウトマウス (Rip-Cre;Atg7f/f) 及びコントロールマウス (Atg7f/f マウス) の単離膵島からのタンパク抽出物を用いて 1D gel-electrophoresis を行った。その結果、発現量が異なると推測されるバンドが認められた。そのバンドからタンパクを抽出し、

ERp57 が同定された。このタンパクの発現がオートファジー不全の結果増加するかをさらに確認する目的でテトラサイクリン誘導性 Atg7 ノックダウン膵細胞株を用いて ERp57 の発現を検討すると、Atg7 ノックダウンにより ERp57 の発現が増加することが明らかになった。

次に膵細胞のオートファジー不全時における ERp57 の意義に関して検討した。具体的には、Atg7 ノックダウン膵細胞株において ERp57 の発現を抑制することで細胞死にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、ERp57 抑制により cleaved caspase3 の発現が増加し、細胞数が減少した。以上のことから、膵細胞オートファジー不全により増加する ERp57 は細胞死に抑制的に作用することが明らかになった (Yamamoto et al. in submission 2014)。

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)

[雑誌論文](計2件)

1) Abe H, Uchida T, Hara A, Mizukami H, Komiya K, Koike M, Shigihara N, Toyofuku Y, Ogihara T, Uchiyama Y, Yagihashi S, Fujitani Y, Watada H: Exendin-4 improves beta-cell function in autophagy-deficient beta-cells. **Endocrinology** 154: 4512-4524, 2013

2) Shigihara N., Fukunaka A., Hara A., Komiya K., Honda A., Uchida T., Abe H., Toyofuku Y., Tamaki M., Ogihara T., Miyatsuka T., Hiddinga HJ, Sakagashira S, Koike M., Uchiyama Y., Yoshimori T., Eberhardt NL, Fujitani Y., Watada H. Human IAPP-induced pancreatic beta-cell toxicity and its regulation by autophagy. **J. Clin. Invest.** 2014 in press.

[学会発表](計12件)

1) Yamamoto E, Uchida T, Abe H, Komiya K, Hara A, Ogihara T, Takeda S, Fujitani Y, Watada H: ERp57 protects autophagy deficient beta-cells from cellular damage. American Diabetes Association 73rd Scientific Sessions, Chicago (America), **ポスター**, 2013.06.21-25, 2013

2) 山本恵理子, 内田豊義, 阿部浩子, 小宮幸次, 原朱美, 荻原健, 武田省, 藤谷与士夫, 綿田裕孝: ERp57 はオートファジー不全に伴う膵 細胞障害に保護的に作用する. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本県(日本), ポスター, 2013.05.16-18, 2013

3) 阿部浩子, 内田豊義, 原朱美, 水上浩哉, 小宮幸次, 小池正人, 内山安男, 八木橋操六, 藤谷与士夫, 綿田裕孝: 膵 細胞特異的オートファジー欠損マウスにおいて、エキセナチドは耐糖能と膵 細胞機能を改善する. 第86回日本内分泌学会学術総会, 宮城県(日本), 若手研究奨励賞(YIA)審査講演, 2013.04.25-27, 2013

4) Abe H, Uchida T, Komiya K, Shigihara N, Toyofuku Y, Hara A, Hirose T, Fujitani Y, Watada H: Exendin-4 treatment improves glucose and beta-cell function of beta-cell-specific autophagy deficient mice. American Diabetes Association 72nd Scientific Sessions, Philadelphia (America), ポスター, 2012.06.08-12, 2012

5) 阿部浩子, 内田豊義, 小宮幸次, 嶋原奈弓, 豊福優希子, 原朱美, 弘世貴久, 藤谷与士夫, 綿田裕孝: 膵 細胞特異的オートファジー欠損マウスにおいて、エキセナチドは耐糖能と膵 細胞機能を改善する. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会, 神奈川県(日本), 口演, 2012.05.17-19, 2012

6) 藤谷与士夫: 糖尿病とオートファジー. 第 17 回東京肝臓シンポジウム, 東京都(日本), 口演, 2012.06, 2012

7) 綿田裕孝: 膵 細胞におけるオートファジーの意義. 第 85 回日本内分泌学会学術総会, 愛知県(日本), シンポジウム, 2012.04.19-21, 2012

8) Watada H: Autophagy in the beta cells. The 16th Japan-Korea Symposium on Diabetes Mellitus, Tokyo (Japan), シンポジウム, 2011.10.21, 2011

9) Watada H: Autophagy and Quality Control in the Beta Cell. Nutrient Control over Autophagy in the Beta Cell. American Diabetes Association 71st scientific sessions, San Diego (America), シンポジウム, 2011.06.24-28, 2011

10) 阿部浩子, 内田豊義, 嶋原奈弓, 小宮幸次, 豊福優希子, 弘世貴久, 藤谷与士夫, 綿田裕孝: 膵 細胞特異的 Atg7 欠損マウスに対する Exenatide 作用の検討. 第 54 回日本

糖尿病学会年次学術集会, 北海道(日本), ポスター, 2011.05.19-21, 2011

11) 小宮幸次, 内田豊義, 阿部浩子, 田蔭基行, 河盛隆造, 弘世貴久, 藤谷与士夫, 綿田裕孝: 膵 細胞において、遊離脂肪酸投与による急性期のオートファジー活性化は小胞体ストレスを介さずに誘導される. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 北海道(日本), 口演, 2011.05.19-21, 2011

12) 小宮幸次, 内田豊義, 阿部浩子, 河盛隆造, 藤谷与士夫, 綿田裕孝: 膵 細胞における遊離脂肪酸誘導性オートファジーのメカニズム解析. 第 84 回日本内分泌学会学術総会, 兵庫県(日本), 口演, 2011.04.21-23, 2011

〔その他〕
ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綿田裕孝 (WATADA, Hirotaka)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 60343480

(2) 研究分担者

藤谷与士夫 (FUJITANI, Yoshio)
順天堂大学・医学部・前任准教授
研究者番号: 30433783