

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293220

研究課題名(和文) 糖尿病状態における細胞変容とオートファジー

研究課題名(英文) Alteration of cellular status in diabetes and 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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本プロジェクトにおいては、糖尿病状態においてオートファジー機能不全がどのような病態修飾を引き起こしているかを検討した。まず、膵細胞においては、ヒト膵細胞に発現するIAPPは細胞毒性を有するが、オートファジー機構がその毒性を抑制するように作用することが明らかになった。また、動脈硬化においては、通常モデルマウスは動脈硬化巣を形成するが、その病理像はヒトのそれとは大きく異なることが知られているなかで、動脈硬化モデルマウスと平滑筋細胞特異的オートファジー不全マウスを交配することでヒトに近い動脈硬化病理像を示すことが明らかになり、ヒトの動脈硬化形成にオートファジー不全が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigate how autophagy failure modify the pathophysiology observed in diabetic state. We revealed that in pancreatic beta cells, the activation of autophagy weakens the toxicity induced by human IAPP. In addition, while model mice of atherosclerosis forms atheroma in artery, however, the morphology of the atherosclerotic lesions are quite different from those in human, we found that crossing with smooth muscle cell specific autophagy failure mode, model mice of atherosclerosis showed the similar morphology in the lesion to human atherosclerosis. These results suggest that autophagy failure plays critical role in the formation of human diseases.

研究分野：代謝学

キーワード：オートファジー 膵細胞 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病では全身の細胞の増殖、死、分化機構の変容が認められ、それが病態形成、合併症の発症に大きく関与する。病態の主座である膵細胞は細胞機能維持機構の変容を伴いながら進展していく。その結果出現する高血糖はインスリン抵抗性と相まって全身の血管に様々な代謝異常を引き起こし、平滑筋細胞を代表とする動脈硬化関連細胞の変容を誘導し、動脈硬化を促進させ、生命予後の悪化をもたらす。

オートファジーは、生体の恒常性維持に重要なはたらきを有する蛋白質分解機構である。我々の研究グループは、これまで、ヒト2型糖尿病の膵細胞及び2型糖尿病モデルマウスの膵細胞においてオートファジー不全が認められること(Abe H et al. Endocrinology 2013)、膵細胞におけるオートファジー不全が、膵細胞の増殖、細胞死の調節機構に異常をもたらし、膵細胞機能不全をもたらすことなどを報告してきた(Ebato C et al. Cell Metab 2008)。しかし、2型糖尿病の膵細胞におけるオートファジー機構の意義の全容解明には至っていない。

以前から、ヒト2型糖尿病発症および増悪の過程において、膵細胞から分泌される Islet amyloid polypeptide (IAPP)の重合によって生じる oligomer の毒性の関与が指摘されている(Haataja et al. Endocr Rev. 2008)。そこで、我々はオートファジー依存性の蛋白質分解機構が、IAPP toxic oligomer による細胞障害から細胞を保護しているのではないかという仮説を立てた。マウスの IAPP ペプチドはヒト IAPP (hIAPP)との一次構造の相違より細胞障害性を有さず、これまでのマウスの系を用いてこれを生理的に証明することは不可能である。しかし、hIAPP を有するノックインマウスを用いれば、上記仮説の検証が可能となる。

また、(前)糖尿病状態の膵細胞のオートファジーを活性化すれば糖尿病の発症・進展予防に繋がるのかという臨床医学的な命題についても明らかにされていない。オートファジーを活性化する目的で trehalose 等が、頻用されているがこれらの薬剤はオートファジー特異的な活性化剤とは言い難い。そのようななかで、オートファジー関連遺伝子 Atg5 をマウスの全身に過剰発現させるとオートファジー活性が増加することでインスリン感受性が増し、寿命が延長することが報告された(Pyo JO et al. Nature Comm 2013)が、本方法によるオートファジー活性化法に再現性があるかないかに関して今後の検討が必要であろう。

動脈硬化病変の形成には内皮細胞の障害、単球やマクロファージの接着と遊走、平滑筋細胞の増殖や遊走が関与する、すなわち、多種の細胞が変容を遂げながら複雑に関わる病変である。中でも平滑筋細胞の増殖、細胞

死は動脈硬化形成に重要である(Dzau VJ et al. Nat Med 2002)。また、急性冠症候群の発症にはプラークの破綻が大きく関わり、平滑筋細胞のアポトーシスによるプラークの脆弱化が強く関連している。そのような中で、最近、平滑筋細胞の増殖、死、分化誘導においてオートファジーが重要な役割を担っている可能性が報告されてきている(Martinet W, ATVB 2004, Kedi Xu, JLR2010)。それによるとオートファジーは糖尿病状態で増加する酸化ストレスで促進され、Advanced Glycation Endproduct で抑制されることが知られており、細胞増殖には促進的に、細胞死には抑制的に作用し、動脈硬化の各ステージで異なる作用を有する可能性がある。しかし、これまでのデータはほとんどが in vitro の解析に留まり、オートファジーが動脈硬化のどの段階で誘導されるのか、具体的にどのような役割を果たすのかなどに関しては検討されていない。一般的には糖尿病では動脈硬化の進展が早い。また、糖尿病で認められる動脈硬化病変は個人差が大きいことから、糖尿病状態が平滑筋のオートファジー機構に一樣でない修飾をもたらす、平滑筋細胞の変容を介して様々な動脈硬化の形成に関与する可能性もある。

2. 研究の目的

以上の背景を鑑み、図1に示すように、糖尿病状態におけるオートファジー機構の調節異常が、膵細胞、平滑筋細胞の機能変容を介して、病態形成に大きく関与していると仮説を立てた。これを検証する目的で以下の具体的課題を解明する。

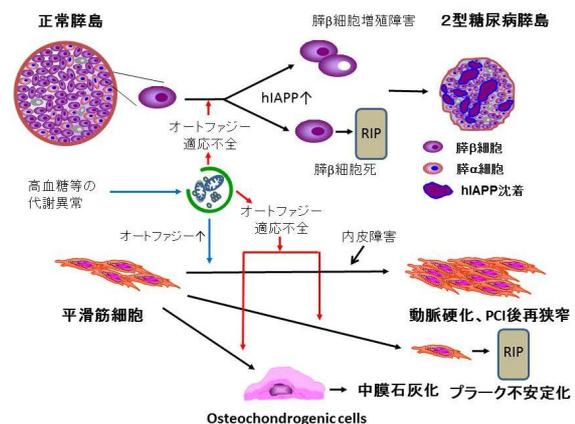


図1：本研究の Working Hypothesis. 2型糖尿病状態では、膵細胞、血管平滑筋にオートファジー活性異常が生じ、病態形成に関与すると考えた。青矢印：オートファジー機能亢進。赤矢印：オートファ

- (1) hIAPP ノックインマウスにおいて、膵細胞のオートファジー活性を低下させた際の hIAPP の細胞毒性に与える影響とそのメカニズムを検討する。

(2)平滑筋細胞特異的 Atg7 ノックアウトマウスを作成し、動脈硬化性疾患発症との関連を明らかにする。

これらの結果を総合して、糖尿病状態におけるオートファジーの挙動を解明し、オートファジー促進、機能低下が細胞の増殖、死、分化転換などに与える影響を解明する。

3. 研究の方法

(1) オートファジーによる hIAPP の細胞毒性の抑制の可能性

アミノ酸配列の相違より、マウス IAPP は hIAPP とは異なり細胞障害性を発揮しないこと、amyloid 形成能を有さないことが明らかになっている。従って、hIAPP の膵細胞障害性を生体において評価するためには、マウスの内因性の IAPP を hIAPP に置き換えた遺伝子改変マウスの作成が必要である。そこで hIAPP ノックインマウス (IAPP^{h/h}) を共同研究者の Eberhardt (Mayo Clinic) から入手し (Hiddinga HJ et al. J Diabetes Invest 2011)、Atg7 flox マウスと RIP (rat insulin promoter)-Cre マウスを順次交配させることにより、Atg7^{f/f};RIP-Cre;IAPP^{h/h} マウスを作製する (なお、Atg7 はオートファゴソームの形成に必須の遺伝子であり、この遺伝子の働きなしにはオートファジー機構は機能しない。)。このマウスにおいては、IAPP の 2 個のアレルがヒト型のそれに置き換わっており、かつ膵細胞においてオートファジー活性が低下している。われわれの仮説では、IAPP^{h/h} マウスにおいては、ヒト型 IAPP 蛋白質が常時産生されているが、たとえ IAPP oligomer が若干生じたとしても、オートファジーにより分解されるため細胞は障害から保護されている、と考えられる。一方、Atg7^{f/f};RIP-Cre;IAPP^{h/h} マウスでは膵細胞におけるオートファジー活性が低下しているため、IAPP toxic oligomer が生じやすく、その結果、細胞障害をきたすことが想定される。この仮説を検証する目的で、コントロールマウス、IAPP^{h/h} マウス、Atg7^{f/f};RIP-Cre マウス、Atg7^{f/f};RIP-Cre;IAPP^{h/h} マウスを作成し、それぞれのマウスを通常食、高脂肪食下で飼育し、体重、摂餌量、随時血糖値、耐糖能等、おもに生理学的パラメータを比較検討するとともに膵細胞機能を評価する。

また、IAPP 毒性とオートファジー機能の関連に関しては、我々がすでに作成している、テトラサイクリン誘導性 Atg7 ノックダウン膵細胞株 INS-1 細胞を用いる。そこにマウスおよび hIAPP をアデノウイルスにて感染させることにより評価する。

(2) 平滑筋細胞のオートファジー機能不全

による動脈硬化性疾患進展の可能性

Atg7^{f/f} マウスに SM22-Cre^{tg} マウスを交配し、血管平滑筋特異的 Atg7 欠損マウス (SM22-Cre;Atg7^{f/f}) を作製する。本マウスから平滑筋細胞を単離し、培養した後、動脈硬化促進因子添加のうえで、平滑筋細胞の老化、アポトーシスに与える影響を調べる。

また、in vivo における動脈硬化への影響に関しては、本マウスと ApoE 欠損マウスを交配した後、高脂肪食を摂取させ、週齢を追ったのちに、動脈硬化への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 膵細胞における hIAPP 発現とオートファジーとの関連

膵細胞株 INS-1 細胞に hIAPP を発現させた際のオートファジーフラックスを検討した。その結果、Cleaved Caspase3 の活性による評価ではアポトーシスが亢進し、その際タンパク分解酵素阻害剤投与時の LC3type2 が亢進することから、オートファジーフラックスの亢進も認められた (図 1)。この結果から、膵細胞における hIAPP の発現は膵細胞のアポトーシス亢進をもたらし、おそらくはその毒性を軽減させるためにオートファジー活性が亢進しているものと考えられた。

図 1 hIAPP はオートファジーフラックスを亢進させる。

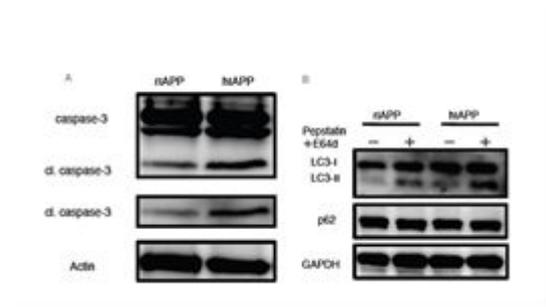
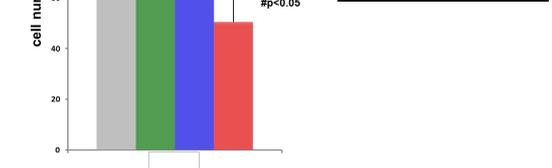


図 2 hIAPP 発現時にオートファジー活性を抑制すると、膵細胞死が促進する。



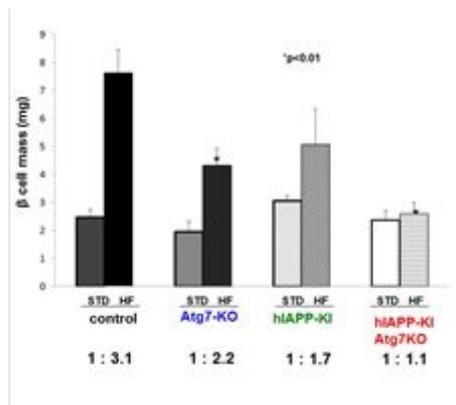
そこで、次に、hIAPP 発現時のオートファジー活性抑制が細胞死に与える影響に関して検討を行った。テトラサイクリン誘導性 Atg7 ノックダウン INS-1 細胞を用いて、hIAPP を

アデノウイルスで発現させ、その際 Atg7 の発現を抑制し、オートファジー活性を抑制したときに細胞死がどのようになるか検討を行ったが、図2に示すように、hIAPP の発現、オートファジー活性の抑制により細胞死は相乗的に増加することが明らかとなった。

(2) in vivo における膵 細胞 hIAPP 発現とオートファジー不全との関連

以上のデータから hIAPP の過剰発現は膵細胞毒性を有しアポトーシスを誘導するが、同時にオートファジー誘導性にも作用し、本機構は細胞毒性に対して防御的に作用する可能性が考えられた。そこで、生体においても同様な機構が存在するか否かに関して検討する目的で、コントロールマウス、IAPP^{h/h} マウス、Atg7^{f/f};RIP-Cre マウス、Atg7^{f/f};RIP-Cre; IAPP^{h/h} マウスを作成し、それぞれのマウスを通常食、高脂肪食下で飼育し、膵 細胞容積を測定した。

図3 hIAPP 発現オートファジー不全モデルでは高脂肪食による膵 細胞容積増加が起らない。



すると図3に示すように、コントロールマウスにおいては高脂肪食負荷時に膵 細胞容積が増加するが、この増加がオートファジー不全マウス Atg7KO マウスおよび、hIAPP 発現マウス hIAPP KI マウスで減弱していることが確認された。それに加えて、hIAPP 発現オートファジー不全マウスでは高脂肪食負荷時の膵 細胞容積増加がほとんど認められないことが明らかになった。

以上より、生体においても膵 細胞における hIAPP 発現過剰は細胞毒性を有し、オートファジー機構がそれを抑制的に作用していることが明らかになった。

(3) 平滑筋細胞におけるオートファジー機構と細胞死、老化の関係

Atg7^{f/f} マウスに SM22-Cre^{tg} マウスを交配し、血管平滑筋特異的 Atg7 欠損マウス (SM22-Cre;Atg7^{f/f}) を作製した。本マウスから平滑筋細胞を単離し、培養後、平滑筋細胞

の細胞死、老化に関する影響を検討した。

その結果、培養後の細胞数の増加が、コントロールの細胞に比して、Atg7 欠損細胞で減少しており、oligonucleosome 活性による細胞死の増加が培養 48 時間後に増加していることが明らかとなった。さらに ガラクトシダーゼ活性の増加も認められることから、平滑筋細胞におけるオートファジー不全は、細胞死の増加、老化の促進を引き起こすことが明らかとなった。

(4) 平滑筋細胞におけるオートファジー不全と動脈硬化の進展機構

次に、生体における平滑筋オートファジー不全が動脈硬化に与える影響に関して検討した。まず、SM22-Cre;Atg7^{f/f} の動脈における病変に関して検討したが、コントロールに比べて中膜の若干の菲薄化が認められたが、それ以外の明らかな病変は認められなかった。そこで、本マウスと III 型高脂血症を示す動脈硬化モデルマウスである ApoE ノックアウトマウスを実験に供した。まず本マウスの動脈硬化巣で p62 の発現亢進が認められた。したがって、本マウスの平滑筋細胞はもともとオートファジー不全状態にあると考えられた。次に、SM22-Cre;Atg7^{f/f} マウスと ApoE ノックアウトマウスを交配し、その後 14 週間 1.25% cholesterol 含有食を摂餌させたところ、コントロールの ApoE ノックアウトマウスに比して、著名な寿命の短縮が認められた。

次に、本現象の原因を検索するため各マウスから動脈を摘出し oil red-O 染色を用いて動脈硬化の程度を定量評価した。その結果、SM22-Cre;Atg7^{f/f}:ApoEKO マウスではコントロールの ApoEKO マウスに比して、動脈硬化巣の増大が認められた。さらに、動脈硬化巣の病理像を観察すると、動脈硬化巣における平滑筋細胞の減少、コレステロール沈着の増加等を認めた。もともと ApoEKO マウスは動脈硬化モデルとして頻りに用いられているが、その病理像は人間のそれとは程遠いと考えられてきた。しかし、本病理像の以上の特徴はヒトのそれにきわめて近似していた。

さらに興味深いことに、Mac2 染色を行い単球、マクロファージ系の細胞の局在に関して調べてみると、コントロールマウスでは Mac2 陽性細胞は内膜中膜複合体に言及していたものの、SM22-Cre;Atg7^{f/f}:ApoEKO マウスでは中膜や外膜にもその存在が認められた。

この外膜へのマクロファージの浸潤もヒトの動脈硬化の病理像に近いと考えられた。そこで、外膜でのマクロファージの局在から動脈瘤の発症の可能性を考え、外膜に多い弾性繊維を評価した。その結果、弾性繊維の断裂を頻りに認めた、さらに大動脈径を評価すると本マウスにおいては動脈から腎動脈への分岐部直上部の大動脈径の拡大を認め

た。さらに、本マウスの死亡率増加に関して、マウスの剖検を行ってみると、胸腔内への出血と大動脈の断裂が認められるマウスの存在が明らかになった。

一般に ApoE ノックアウトマウスは動脈硬化巣を形成するという意味では動脈硬化モデルマウスとして用いられているが、その病理像はヒトのそれとは大きく異なることが知られている。そのようななかで、本マウスと平滑筋細胞特異的オートファジー不全マウスを交配することでヒトに近い病理像を示すことが明らかになったことは、ヒトの動脈硬化におけるオートファジー不全の関与を示唆すると考えられた。

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 12 件)

1: Yamaguchi H, Arakawa S, Kanaseki T, Miyatsuka T, Fujitani Y, Watada H, sujimoto Y, Shimizu S. Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. EMBO J. 2016 Sep 15;35(18):1991-2007.

2: Klionsky DJ, Watada H. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. 2016;12(1):1-222.

3: Watada H, Fujitani Y. Minireview: Autophagy in pancreatic β -cells and its implication in diabetes. Mol Endocrinol. 2015 Mar;29(3):338-48.

4: Yamamoto E, Uchida T, Abe H, Taka H, Fujimura T, Komiya K, Hara A, Ogihara T, Fujitani Y, Ueno T, Takeda S, Watada H. Increased expression of ERp57/GRP58 is protective against pancreatic beta cell death caused by autophagic failure. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Oct 10;453(1):19-24.

5: 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 β cell toxicity and its regulation by autophagy. J Clin Invest. 2014 Aug;124(8):3634-44.

[学会発表](計 6 件)

1. Fujitani Y. 「Roles of autophagy in pancreatic β -cell function and type 2 diabetes」第 57 回日本糖尿病学会年次学術

集会, 大阪府(日本), 2014.05.22-24(2014.05.24), シンポジウム, 国内学会

2. 神谷麻衣, 宮塚健, 三浦正樹, 荻原健, 藤谷与士夫, 綿田裕孝 「糖尿病モデルマウスの膵島における autophagy status の可能性」第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 山口県(日本), 2015.5.21-24(2015.5.22), 口演, 国内学会

3. 藤谷与士夫 「膵 細胞機能障害とオートファジー」第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会, 宮崎県(日本), 2014.02.14-15(2014.02.14), シンポジウム, 国内学会

4. 福中彩子, 嶋原奈弓, 原朱美, 小宮幸次, 本田彬, 藤谷与士夫, 綿田裕孝 「ヒト IAPP が誘導する膵 細胞傷害とオートファジーによる制御」第 51 回臨床分子医学会, 東京都(日本), 2014.4.11-12(2014.4.11), ポスター, 国内学会

5. 氷室美和, 宮塚健, 鈴木路可, 小池正人, George, K. G., 藤谷与士夫, 綿田裕孝 「膵 細胞のオートファジー不全は膵島の形態異常をきたす」第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会, 神奈川県(日本), 2017.2.10-11(2017.2.10), 口演(若手研究奨励賞審査), 国内学会

6. Kamitani M., Miyatsuka T., Miura M., Ogihara T., Fujitani Y, Watada H. 「Heterogeneity Of Autophagy Status In Pancreatic Cells Under Metabolic Stress.」75th Scientific Sessions American Diabetes Association (ADA) Boston(USA), 2015.6.5-9(2015.6.8), ポスター, 国際学会

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)

群馬大学・生体調節研究所, 教授

研究者番号: 30433783

三田智也 (MITA TOMOYA)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 90532557