

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17H04202
研究課題名(和文) 膵島不全におけるオートファジーの役割

研究課題名(英文) Autophagic failure in islets

研究代表者

綿田 裕孝 (WATADA, HIROTAKA)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60343480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで膵細胞機能維持にオートファジーが重要な役割を果たすことを明らかにした。しかし、2型糖尿病で認められる後天性のオートファジー不全が膵細胞不全の原因となっているかは明らかでない。そこで、今回、後天的に膵細胞のオートファジー不全を誘導するマウスを作製しそのマウスの糖代謝を検討した。その結果、オートファジー不全の数週にわたる継続が膵細胞不全を引き起こすことを明らかとした。さらに、膵細胞におけるオートファジー不全は糖代謝異常に直接関与しないこと、最近同定されたミトファジーに必須な分子Atg32の哺乳類ホモログであるBCL2L13は膵細胞機能維持に関与しない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

我々の研究グループは、膵細胞におけるオートファジー機能不全が膵細胞機能不全に関与することを世界に先駆けて解明し、この分野における世界のリーダー的立場にいる。本研究はこれまでの研究を継承し、膵細胞機能不全とオートファジー機能不全の一端を解明した。本研究の結果は、2型糖尿病における膵島不全の病態解明に貢献し、新規糖尿病治療薬の分子標的の発見につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have previously demonstrated that autophagy plays an important role in maintenance of pancreatic β -cell function. However, it is not clear whether the acquired autophagy deficiency observed in type 2 diabetes causes pancreatic β -cell failure. Therefore, this time, we established the mice with inducible autophagy deficiency of pancreatic β cells, and examined the glucose metabolism of the mice. As a result, it was revealed that continuation of autophagy deficiency for several weeks causes pancreatic β -cell failure. Furthermore, we revealed that autophagy deficiency in pancreatic β cells is not directly involved in abnormal glucose metabolism, and BCL2L13, a mammalian homologue of Atg32, a recently identified molecule essential for mitophagy, is not involved in the maintenance of pancreatic β cell function.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 膵細胞 インスリン グルカゴン オートファジー ミトファジー 膵細胞

1. 研究開始当初の背景

オートファジーはタンパク質分解の主要な経路であり、飢餓時の細胞内再利用のためのアミノ酸分解機構として、また細胞質内機能維持のための細胞内浄化・品質管理機構として生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。この生理的重要性はオートファジーの分子機構の解明の研究にノーベル賞が授与されたことから明らかであるが、未解明の点も多数あり、今後のデータの積み重ねが大事である。

我々はこれまで、糖尿病の根本病態である膵細胞機能不全におけるオートファジーの重要性に焦点を当てて研究を行ってきた。その結果、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、さらにラットインスリンプロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと、オートファジー機構に必須な遺伝子である Atg7 の flox マウスを交配させた膵細胞特異的オートファジー不全マウスである RIPCreAtg7f/f マウスでは、膵細胞の増殖、細胞死の調節機構不全と、インスリン分泌不全を認めること、さらに膵毒性をもつヒト IAPP 発現マウスでは膵細胞不全が悪化すること等を報告してきた (Ebato C. et al Cell Metab 2008, Abe H. et al Endocrinology 2013, Shigihara N. et al J Clin Invest 2014)。しかし、残された課題が多数ある。

我々がモデルとして用いてきた RIPCreAtg7f/f マウスは組織形成において重要な胎生期からオートファジーが欠損しているため、2型糖尿病で推定されているような後天性のオートファジー不全が膵細胞不全の原因となっているか否かは解明できていない。また、2型糖尿病での特徴的膵島機能不全である 1)インスリン分泌不全 2)膵細胞容積低下 3)グルカゴン分泌不全のなかでグルカゴン分泌不全に対するオートファジー機構の関与に関しては一切検討できていない。

また、最近、オートファジー機構にもさまざまなタイプのものが存在することが明らかされている。その中でも、特に異常ミトコンドリアの処理に関わるマイトファジーがさまざまな疾患との関連性から注目されている。我々はこれまで RIPCreAtg7f/f マウスの膵島においてブドウ糖応答性の ATP 産生量増加不全を認めているが、この結果はオートファジー不全による障害ミトコンドリアの残存が、オートファジー不全によるブドウ糖応答性インスリン分泌機構障害の原因である可能性を示唆する。そこで、我々は、インスリン分泌障害の根本原因にマイトファジー機構障害が関与するとの仮説のもと、マイトファジーに関わるとされている Parkin および PINK1 のノックアウトマウスにおける膵細胞機能を評価したが、膵機能障害はほぼ認められず (Miyatsuka T. et al unpublished observation)、オートファジー不全によるインスリン分泌機構障害の原因として他の機構の関与が想定された。そのようななかで、酵母のマイトファジーに必須な分子である Atg32 の哺乳類ホモログである BCL2L13 が同定され (Murataka T. et al Nat Commun 2015)、BCL2L13 依存性マイトファジーが膵細胞の機能維持に関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

以上の背景を鑑み、本研究では膵島不全におけるオートファジー機構の役割のさらなる解明を目的として以下を具体的目標として検討した。

1) 膵細胞特異的かつ薬剤誘導性に Atg7 を欠損するマウスを作成し、膵細胞機能における後天的オートファジー不全の役割を解明する。

2) 正常および糖尿病モデルマウスの膵細胞を電子顕微鏡で観察し、生理的条件下および代謝ストレス下における膵細胞の autophagy status を評価するとともに、膵細胞特異的 Atg7 欠損マウスを作製し、膵細胞におけるオートファジー不全が膵細胞数、グルカゴン分泌動態に与える影響を検討する。

3) 新規マイトファジーの鍵分子 BCL2L13 の膵細胞での役割を解明するために、BCL2L13 欠損 MIN6 細胞株および、膵細胞特異的 BCL2L13 ノックアウトマウスを作製し、インスリン分泌機構における BCL2L13 依存性マイトファジー機構の意義を解明する。

3. 研究の方法

1) 後天的膵細胞特異的オートファジー不全モデルマウスの確立と解析

我々はこれまで RIPCreAtg7f/f マウスがブドウ糖応答性インスリン分泌低下に基づく耐糖能障害を示すこと、高脂肪食による膵細胞容積増加が認められないことを報告してきた。本研究では後天的オートファジー不全が膵細胞機能に与える影響に関して検討するため、MIP-CreER マウス (Tamarina et al. Islets 6: e27685, 2014) と Atg7^{fl/fl} マウスを交配することにより、MIP-CreER;Atg7^{fl/fl} マウスを作成し、十分膵発生が終了した段階でタモキシフェンを投与することにより、後天的オートファジー不全を導入するモデルを作成し、週齢を追って、我々がすでに表現型を観察している RIPCreAtg7f/f マウスの膵細胞機能との比較を行うとともに、膵細胞で、どのような遺伝子変化が起こるかにして検討を行う。

2) 膵細胞特異的 Atg7 KO マウスの確立とその表現型の評価

ピッツバーグ大学の Gittes 博士より供与された Glucagon-CreER マウスと Atg7 flox マウスを交配し Tamoxifen を投与することで、膵細胞特異的かつ後天的に Atg7 遺伝子を欠失するモデルマウス、Atg7KO マウスを作製し、本マウスの表現型を観察することで膵細胞におけるオートファジーの役割を解明する。

3) 膵細胞特異的 BCL2L13KO マウスの確立とその表現型の解明

BCL2L13 が哺乳類の Atg32 ホモログであることを見出した大津欣也博士(Kings College of London)から BCL2L13flox マウスを入手し、本マウスと MIP-CreER マウスとを交配することで膵細胞特異的 BCL2L13 ノックアウトマウスを作製し、膵細胞機能の評価を週齢を追って行う。

4. 研究成果

1) 後天的膵細胞特異的オートファジー不全モデルマウスの確立と解析

上述の方法で、MIP-CreER;Atg7^{fl/fl} マウスの作製に成功した。本マウスに 2 週間および 6 週間タモキシフェンを作用させ、それぞれのマウスの表現型を調べた。2 週間オートファジー不全を誘導したマウス(i Atg7KO-2W)の膵細胞には p62 の蓄積は認められるもののドットは認めず、耐糖能は対照同胞マウスと同等であった。一方、6 週間オートファジー不全を誘導したマウス(i Atg7KO-6W)の膵細胞には p62 陽性ドットが細胞に認められ、また、インスリン分泌不全を伴う高血糖を認めた。これらの知見はオートファジー不全そのものというよりもオートファジー不全がある程度継続することが細胞不全を引き起こすことを示している。次に、その分子メカニズムを解明するために i Atg7KO-2W, i Atg7KO-6W、および対照マウスの膵島を単離し、RNA sequencing を行なった。i Atg7KO-6W マウスでは、インスリン分泌能を制御する多くの遺伝子の発現が低下していた。i Atg7KO-2W マウス膵島で対照マウスと比較して有意に発現が亢進しているのは 8 遺伝子のみであり、これらのうち、i Atg7KO-6W マウスで共通して発現が亢進しているのは Sprr1a のみであった。db/db マウス膵島で Sprr1a mRNA を定量化すると、耐糖能正常である 4 週齢では遺伝子発現に変化はなかったが、細胞不全およびオートファジー不全の進行した 8 週齢、12 週齢において有意な発現亢進が確認された。次に i Atg7KO-6W マウスの膵切片において抗 Sprr1a 抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、p62 凝集塊を伴うオートファジー不全細胞の一部にのみ SPRR1A タンパクの発現を認めたことから、SPRR1A の発現とオートファジー不全とは相関が認められ、SPRR1A がオートファジー不全による膵細胞機能不全に何らかの役割を有することが示唆された。

2) 膵細胞特異的 Atg7 KO マウスの確立とその表現型の評価

まず、膵細胞におけるオートファジーの状態を調べる目的で、GFP-LC3 トランスジェニックマウスを用いて絶食によるオートファジーの誘導を調べた。その結果、膵細胞でも絶食によりオートファジーが誘導されることが確認された。次に上述の方法で膵細胞特異的 Atg7 KO マウスを作製し、タモキシフェン投与後 6 週後に膵細胞のオートファジー不全による糖代謝状態を調べたが、コントロールマウスと比較してあきらかな異常は認めなかった。生体におけるグルカゴンはアミノ酸代謝制御が主であるとの報告もあるため、血中アミノ酸に関しても調べたが、明らかな異常は認められなかった。

次に、膵細胞の細胞容積に注目して解析すると、平均的な膵細胞数には変化はないものの膵細胞数の増加が著しい膵島が膵細胞特異的 Atg7 KO マウスの膵で認められた。

したがって、膵細胞特異的 Atg7 KO マウスでは膵島内細胞数の不均一化が認められることが明らかになった。

3) 膵細胞特異的 BCL2L13KO マウスの確立とその表現型の解明

上述した方法で膵細胞特異的 BCL2L13KO マウスを作製した。タモキシフェン投与後 6 週間観察したが、糖代謝異常は一切認めなかったため、高脂肪食 8 週間後さらに S961 負荷を行ったが、明らかな異常は認められなかった。これらのデータから BCL2L13 が膵細胞のオートファジーに必須な役割をして、膵細胞の機能維持に関わる可能性はほとんどないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Honda A., Komiya K., Hara A., Fukunaka A., Suzuki L., Miyatsuka T., Ogihara T., Fujitani Y., Watada H	4. 巻 65
2. 論文標題 Normal pancreatic β -cell function in mice with Rip-Cre-mediated inactivation of p62/SQSTM1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 83-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ17-0333.	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 -

1. 著者名 Kamitani M, Miyatsuka T, Miura M, Azuma K, Suzuki L, Himuro M, Katahira T, Nishida Y, Fujitani Y, Watada H.	4. 巻 496(2)
2. 論文標題 Heterogeneity of autophagic status in pancreatic β cells under metabolic stress.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 328-334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.01.070.	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 -

1. 著者名 Himuro Miwa, Miyatsuka Takeshi, Suzuki Luka, Miura Masaki, Katahira Takehiro, Goto Hiromasa, Nishida Yuya, Sasaki Shugo, Koike Masato, Shiota Chiyo, Gittes George K, Fujitani Yoshio, Watada Hirotaka	4. 巻 3
2. 論文標題 Cellular autophagy in β cells plays a role in the maintenance of islet architecture	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Endocrine Society	6. 最初と最後の頁 1979-1992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/js.2019-00075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Watada H.
2. 発表標題 Role of autophagy in pancreatic beta cells and atherosclerosis
3. 学会等名 The 4th IMCR Symposium on Endocrine and Metabolim: At the Cutting Edge of Metabolic Regulation Research Gunmaken（招待講演） （国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木路可, 宮塚健, 氷室美和, 神谷麻衣, 三浦正樹, 小宮幸次, 藤谷与士夫, 西田友哉, 綿田裕孝
2. 発表標題 膵細胞における時間特異的Atg7欠損マウスの作製と機能解析
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 氷室美和, 宮塚健, 鈴木路可, 神谷麻衣, 三浦正樹, 片平雄大, 小池正人, Shiota C., Gittes G. K., 藤谷与士夫, 綿田裕孝
2. 発表標題 膵細胞特異的オートファジー不全モデルマウスの作成とその機能解析
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suzuki L., Miyatsuka T., Himuro M., Miura M., Fujitani Y., Nishida Y., Watada H.
2. 発表標題 Cumulative autophagy deficiency causes progressive β -cell failure.
3. 学会等名 The 8th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Himuro M., Miyatsuka T., Suzuki L., Koike M., Shiota C., Gittes G. K., Fujitani Y., Watada H.
2. 発表標題 Exploring the autophagy mechanism in pancreatic alpha cell
3. 学会等名 53rd Annual meeting of the European Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 1.Himuro M., Miyatsuka T., Suzuki L., Koike M., Shiota C., Gittes G. K., Fujitani Y., Watada H
2. 発表標題 Exploring the autophagy mechanism in pancreatic a cell.
3. 学会等名 Exploring the autophagy mechanism in pancreatic a cell. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 1.Watada H
2. 発表標題 Autophagy in islet homeostasis and increase of beta cell mass in response to high-fat diet
3. 学会等名 54th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 1.Himuro M., Miyatsuka T., Suzuki L., Miura M., Katahira T., Goto H., Nishida Y., Sasaki S., Fujitani Y., Watada H.
2. 発表標題 Exploring the Role of Autophagy in Pancreatic Alpha Cells
3. 学会等名 79th American Diabetes Association, San Francisco(USA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1.Suzuki L., Miyatsuka T., Himuro M., Miura M., Katahira T., Komiya K., Fujitani Y., Nishida Y., Watada H
2. 発表標題 Autophagy Deficiency Cumulatively Causes β -Cell Failure in Mice
3. 学会等名 79th American Diabetes Association, San Francisco(USA) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1. 鈴木路可, 宮塚健, 氷室美和, 三浦正樹, 片平雄大, 三田智也, 小宮幸次, 西田友哉, 藤谷与士夫, 綿田裕孝
2. 発表標題 臍 細胞における時期特異的オートファジー不全モデルマウスの作製とその機能解析
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会, 宮城県(日本)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>順天堂大学大学院代謝内分泌内科学 http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labo/taisya_naibunpitsu/</p>
--

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
研究分担者	西田 友哉 (Nishida Yuya) (10581449)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	
研究分担者	宮塚 健 (Miyatsuka Takeshi) (60622363)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (32620)	