

受賞者

藤谷 与士夫

順天堂大学大学院医学研究科 内科・代謝内分泌学、先進糖尿病治療学

## 研究テーマ

膵β細胞機能維持におけるオートファジー機構の意義と糖尿病発症への関与

### 1. はじめに

**緒言:** 生命を維持するためには、生体は自己成分の合成のみならず、環境変化に応じて細胞成分を分解処理する必要がある。真核生物の中での蛋白質分解機構は大きく分けると2つ存在し、選択的蛋白質分解系のユビキチンプロテアソーム系と非選択的蛋白質分解系のオートファジー系である。酵母においては、これまでオートファジーは飢餓応答などの際の自己蛋白成分分解機構として認識されてきた。しかしながら、ヒトを含む哺乳類においては、異常蛋白質の分解など恒常性維持の機構として重要であり、その破綻は、神経変性疾患、腫瘍化、易細菌感染性に関与している可能性が示唆されつつある<sup>a)</sup>。

**目的:** 膵β細胞はインスリン分泌のために特殊化された細胞であり、肥満やインスリン抵抗性の存在する場合などインスリン分泌の需要が増大した際には、折りたたみの悪い異常インスリンの蓄積などによる、各種ストレス(小胞体ストレス、酸化ストレスなど)が過剰に負荷されることが予想される。そのような際のストレス除去の機構としてオートファジーが機能している可能性がある。このような仮説に基づき、本研究はオートファジーの誘導に必須の遺伝子Atg7をマウスの系において膵β細胞特異的にノックアウトすることにより、膵β細胞恒常性維持におけるオートファジー機構の重要性と、糖尿病発症への関与の可能性を検討するものである。

**背景:** 過栄養による内臓脂肪の蓄積、運動不足などがあいまって、インスリン抵抗性がもたらされるが、この時点よりβ細胞は、負荷にさらされることになる。β細胞が健常ならばそれに打ち勝ってβ細胞が代償的に普段以上にはたらくことにより、糖尿病にいたることはない。しかしβ細胞において、些細であれ先天的になんらかの異常が存在する場合(本研究の場合、ストレス除去系の異常が存在する場合)、このような負荷が継続すると、さまざまなストレス(小胞体ストレス、酸化ストレスなど)がβ細胞に蓄積し、最終的に相対的なインスリン分泌不全あるいはβ細胞死がおり、糖尿病が招来されることとなる。オートファジー機能の低下が膵β細胞機能低下を介して糖尿病発症に寄与するという作業仮説を本研究においては mouse genetics を用いて検証したい。

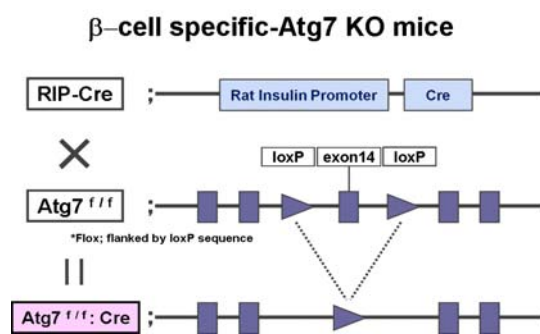
**序論:** これまでオートファジーの研究はおもに出芽酵母を用いた生化学的手法により進められてきたが、生体での役割に関しては、(すでに述べたように)ごく最近オートファジー関連遺伝子(Atg)の変異マウスが作製されたことにより、ようやく生体レベルでの解析はその緒についたばかりである。まず、オートファジーに必須の遺伝子である Atg5 をノックアウトしたマウスはほぼ正常に出生するが、生後まもなく著しい栄養不全状態に陥り、飢餓条件下での生存期間は著しく短くなる。このことから、新生仔マウスはオートファジーにより産生されるアミノ酸をエネルギー維持のために利用していることがあきらかとなった<sup>b)</sup>。さらに組織特異的ノックアウト法を

もちいて、中枢神経特異的にオートファジーに必須のAtg7あるいはAtg5をノックアウトすると大脳皮質や海馬などで神経細胞死が誘導され、反射異常・協調運動障害などの神経変性疾患がひきおこされることが示された<sup>c),d)</sup>。

## 2. 方法

我々は、糖尿病とオートファジーの関係を探索する第一歩として、 $\beta$ 細胞におけるオートファジーの誘導について解析した。まず、2型糖尿病モデルである、*db/db*マウスの $\beta$ 細胞においては、オートファゴソームがコントロールの*db/misty*マウスに比し、高頻度に観察された。C57BL/6マウスの $\beta$ 細胞では、オートファゴソームの出現はごく低頻度であったが、これに高脂肪食を負荷することにより、その頻度は劇的に（約10倍に）増加した。

つぎにオートファジーの膵 $\beta$ 細胞における生理的役割を明らかにするために、オートファゴソームの隔離膜伸長に必須の遺伝子Atg7を膵 $\beta$ 細胞特異的に欠失する変異マウスを作製した。その方法を以下に示す（図1）。

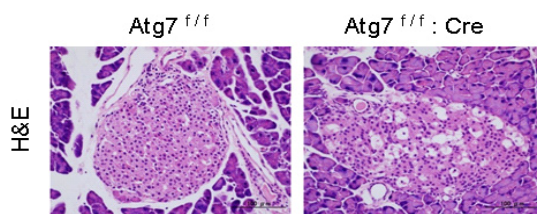


**図1. 膵 $\beta$ 細胞特異的 Atg7KO マウスの作製**

Atg7 遺伝子の exon14 を flox した Atg7 flox マウスと、insulin promoter 制御下に Cre を発現する RIP-Cre マウスを交配することで、 $\beta$ 細胞特異的にオートファジーを欠損するマウスを作製した。

## 2. 結果 研究成果

Atg7を $\beta$ 細胞特異的に欠損するAtg7<sup>f/f</sup>;RIP-Creマウス(Atg7欠損マウス)の $\beta$ 細胞においては、オートファジーの誘導がほぼ完全に抑制されていた。まず、H&E染色を用いた解析において、Atg7欠損マウスの $\beta$ 細胞は、特徴的な空泡様変性を認め、週齢を追うごとに変性を示す $\beta$ 細胞数が多くなった(図2)。この空泡様変性は細胞そのものが高度に膨化したものが明らかとなった。この $\beta$ 細胞の変性はユビキチン陽性の凝集体形成や、オートファジーで特異的に分解されるとされるp62蛋白質の蓄積を伴っていた。



**図2. Atg7KO マウスに認められた $\beta$ 細胞の空泡様変性**

オートファジー欠損 $\beta$ 細胞では空泡様構造が認められ、週齢依存的に増加した。

また、電顕レベルでは、膨化し、枝分かれした異常ミトコンドリアや凝集体を有する変性 $\beta$ 細胞が観察された。

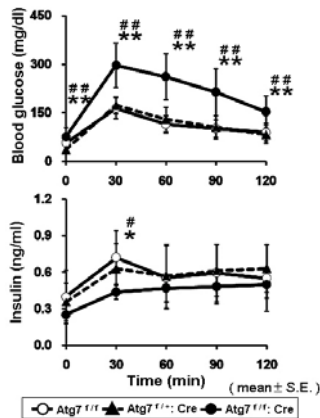


図3.  $\beta$ 細胞特異的 Atg7KO にみられた耐糖能異常

$\beta$ 細胞特異的 Atg7KO マウスは、コントロールに比し、糖負荷試験において有意な耐糖能の低下を示し、同時に計測したインスリン分泌は高血糖にかかわらず低下を認めた。

随時血糖値は8週齢よりAtg7欠損マウスにおいてコントロールより有意な高値を示した。腹腔内ブドウ糖負荷試験(IPGTT)を施行したところ、 $\beta$ 細胞Atg7欠損マウスは耐糖能障害を認め、同時に測定した血中insulin値の低下を認め、耐糖能障害は加齢に伴い顕著になった。インスリン感受性に有意差は認めなかったことから、この変異マウスで認められた耐糖能障害はインスリン分泌不全によるものと考えられた(図3)。

単離膵島を用いた解析では、 $\beta$ 細胞を強制的に脱分極するKCl刺激によってはinsulin分泌に差を認めなかった一方で、グルコース刺激によるインスリン分泌はAtg7欠損 $\beta$ 細胞において有意に低下が認められた。この現象を裏付けるように、グルコース刺激による単離膵島でのATP産生は変異マウスで低下しており、 $\beta$ 細胞でオートファジーが機能しないとミトコンドリア機能不全によるATP産生低下をきたすことが示唆された。

つぎに、高脂肪食負荷による $\beta$ 細胞でのオートファジー誘導の意義を明らかにする目的で、Atg7欠損マウスに8週齢から12週間にわたり、高脂肪食を負荷した。

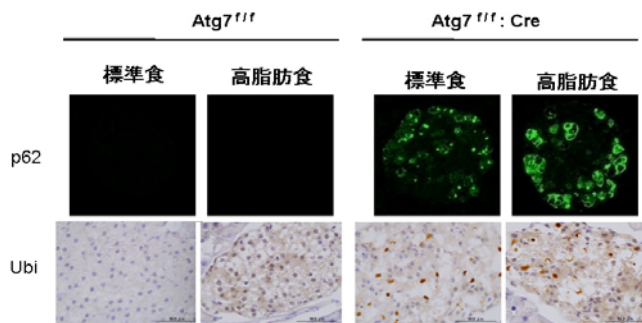


図4. 高脂肪食負荷時の Atg7 欠損  $\beta$ 細胞の形態学的異常

Atg7 欠損マウスに高脂肪食を負荷すると、 $\beta$ 細胞に p62 およびユビキチン化蛋白質が急速に蓄積し、細胞死も増加する。

Atg7KOマウスは標準食においても膵 $\beta$ 細胞内にユビキチン化蛋白質とp62の蓄積をみとめたが、高脂肪食を負荷するとこれらのゴミ蛋白質の蓄積がさらに急速にすすむことが明らかになった(図4)。

また、コントロールマウスにおいては $\beta$ 細胞が代償的に量を増加させることにより、高脂肪食下においても血糖値を維持することが可能であったが、Atg7欠損マウスでは $\beta$ 細胞増殖の低下とアポトーシス死の亢進により、 $\beta$ 細胞容積を増加させることができず、結果として糖尿病状態に陥ることが明らかになった。

最後に、高脂肪食下において、 $\beta$ 細胞にオートファジーを起動させる刺激を検索したところ、oleic acidや palmitateなどの遊離脂肪酸 (FFA)がその有力候補であることが明らかになった(図5)。

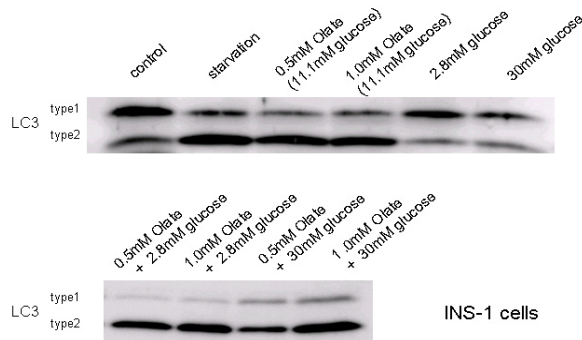


図5.  $\beta$ 細胞での FFA によるオートファジーの誘導

INS-1 細胞においてオートファジーを誘導するシグナルを解析した。オレイン酸やパルミチン酸がオートファジーを活性化することが明らかとなった。

#### 4. 考察 まとめ

以上の結果より、定常状態においてオートファジーはユビキチン化蛋白質や老化したミトコンドリアなどを恒常的に分解処理することで、 $\beta$ 細胞が健全に機能するための細胞内浄化に寄与すること、また、高カロリー食、高脂肪食負荷時などインスリン分泌の需要が高まった際には、FFA などによりオートファジーは $\beta$ 細胞において強力に誘導されて、 $\beta$ 細胞の量的増加および機能維持を支援する必須の代償機構として機能していることが明らかとなった（図6）。

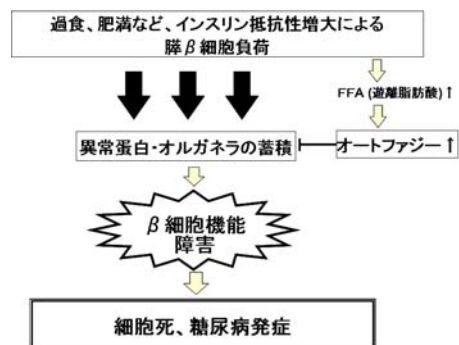


図6. 膵 $\beta$ 細胞オートファジーの役割

過食、肥満などインスリン抵抗性増大時における膵 $\beta$ 細胞オートファジーの役割。インスリン抵抗性存在時には FFA 濃度の増加がオートファジー誘導のシグナルになっている可能性がある。

異常蛋白質の蓄積や、機能の低下したミトコンドリアの蓄積などは、老化した細胞でひろく観察される現象である。糖尿病末期の機能低下を呈するヒト膵 $\beta$ 細胞に於いても IAPP(膵島アミロイド)の蓄積や膨化したミトコンドリアなどが観察され、糖尿病では $\beta$ 細胞の形態的・機能的老化が早期に進行していると考えられる。われわれは、糖尿病モデルである db/db マウスにおいて、オートファジーの機能不全が早期より起こっていることを観察しており、適度なオートファジー活性は、過食の時代に、膵 $\beta$ 細胞の老化（機能低下）による糖尿病発症・進行を阻止する上で有力な治療戦略となりえると考えている。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、御援助を賜りました財団法人病態代謝研究会に厚く御礼申し上げます。

## 5. 発表論文および参考論文

### 発表論文

1. Fujitani Y, Kawamori R, Watada H. The role of autophagy in pancreatic beta-cell and diabetes. **Autophagy**. 2009 Feb 19;5(2). [Epub ahead of print]
2. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high fat diet. **Cell Metab**. 2008, 8:325-332.

### 参考論文

- a) Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev Cell** 2004, 6:463-77.
- b) Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiisa T, Mizushima N The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature** 2004, 432:1032-1036.
- c) Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. **Nature** 2006, 441:885-89.
- d) Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature** 2006, 441:880-84.