

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 30 年 4 月 8 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 順天堂大学医学研究科代謝内分泌内科
職 名 准教授
研究代表者 宮塚 健

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:17002)

1. 共同研究課題名	膵β細胞特異的・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 ～ オートファジー不全のバイオマーカー探索にむけて～			
2. 共同研究目的	糖尿病はインスリンの絶対的あるいは相対的分泌不全による慢性の高血糖を本態とする代謝疾患である。遺伝子改変マウスを用いた解析からオートファジー機構が膵β細胞の恒常性維持に不可欠であることを明らかとなってきたが、今までの解析ではどの発生・分化段階のオートファジー不全がどのような割合で最終的な表現型に影響しているのか解析することは困難であった。本研究ではβ細胞特異的かつ時期誘導性にオートファジー不全を誘導する遺伝子改変マウスを作製し、その表現型を時間軸・空間軸に沿って詳細に解析することにより、β細胞におけるオートファジー恒常性がそれぞれの発生段階でどのような意味を持つのか明らかにする。			
3. 共同研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
	氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者)	宮塚 健	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科	准教授	研究統括
(分担研究者)	鈴木 路可	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科	大学院生	β細胞特異的オートファジー不全マウスの作製および表現型解析
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御		氏 名 藤谷与士夫

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

- [1] β 細胞特異的・時期誘導性オートファジー不全 (inducible β Atg7KO) マウスの作製:
floxed Atg7 マウスと mouse insulin1 promoter-CreERTM マウスとを交配し、任意の時期にタモキシフェンを投与する。(宮塚、鈴木)
- [2] inducible β Atg7KO マウスの表現型解析:
随時血糖測定、ブドウ糖負荷試験を行い、さらに単離膵島を用いてブドウ糖応答性分泌能を評価する。(宮塚、鈴木)
- [3] inducible β Atg7KO マウス血清を用いたメタボローム解析およびプロテオーム解析 (藤谷)

7. 共同研究の成果

これまでに、誘導的かつ β 細胞特異的にオートファジー機能を低下させる *in vivo* 実験系を構築した。すなわち、MIP(mouse insulin promoter)-CreERTM:Atg7^{flox/flox} (β Atg7KO) マウスを作製、6 週齢の β Atg7KO マウスに tamoxifen を腹腔内投与することによりオートファジー不全を誘導した。オートファジーの選択的基質として知られる p62 の凝集塊 (puncta) が tamoxifen 投与 2 週後の β Atg7KO マウスの膵島で観察され、週を追うごとに puncta のサイズが増大し、puncta 数は増加した。一方、投与 1~2 週後時点での耐糖能は対象マウスと同等であったが、6 週後には著しい高血糖を認めた(順天堂大学および群馬大学で確認)。このように、誘導性にオートファジーを機能低下させる実験系が構築できたため、MIP-CreERTM:Atg7^{+/+} マウスと MIP-CreERTM:Atg7^{flox/flox} の間で tamoxifen 投与 2, 4, 6, 8 週後の血清を用いてメタボローム解析を行っている(群馬大学で実験中)。現在、N=4, 5 の予備データが得られており、発現量が群間で異なるメタボライトがいくつか同定されつつある。今後は N 数を増やしてさらに解析を進める予定である。また β Atg7KO マウス膵島と対象同胞マウス膵島より mRNA を抽出し、RNA sequencing 解析を行った(順天堂大学で解析)。今後得られたデータよりオートファジー不全の進行に応じて発現が変化する遺伝子群を抽出し、メタボローム解析の結果と照らし合わせることで、 β 細胞におけるオートファジー不全とインスリン分泌不全とを繋ぐ分子機構の解明に繋げたい。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

1. Kamitani M, Miyatsuka T, Miura M, Azuma K, Suzuki L, Himuro M, Katahira T, Nishida, Fujitani Y, Watada H. Heterogeneity of autophagic status in pancreatic β cells under metabolic stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 496(2): 328-334, 2018
2. Honda A, Komiya K, Hara A, Fukunaka A, Suzuki L, Miyatsuka T, Ogihara T, Fujitani Y, Watada H. Normal pancreatic β -cell function in mice with RIP-Cre-mediated inactivation of p62/SQSTM1. *Endocr J.* 65(1): 83-89, 2018