

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 31 年 3 月 19 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30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	膵 β細胞特異的・誘導性オートファジー不全マウスの作製及び表現型解析を順天堂大学で行い、上記マウスの血清を用いたバイオマーカー探索を群馬大学で行いながら相互に情報を交換しながら議論を重ねることにより、インスリン分泌および糖代謝の恒常性におけるオートファジーの役割を解明する。			
3. 共同研究期間	平成30年 4月 1日 ～ 平成31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学	准教授	研究の統括	
(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学	助教	遺伝子改変マウスの表現型解析 (全般), in vitro 実験	
氷室美和	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学	非常勤助手	遺伝子改変マウスの表現型解析 (transcriptome 解析)	
片平雄大	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学	助手	遺伝子改変マウスの表現型解析 (組織学的評価ほか)	
三浦正樹	順天堂大学大学院医学研究科代謝内分泌内科学	助教	遺伝子改変マウスの表現型解析 (組織学的評価ほか)	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御分野	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

糖尿病は  $\beta$  細胞からのインスリン分泌が低下あるいは枯渇すること起因す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  $\beta$  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不明であった。本研究では膵  $\beta$  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、 $\beta$  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。これまでの解析結果により、2週間のオートファジー不全ではインスリン分泌能に明らかな変化が認められないのに対して、RNA sequencing において発現プロファイルが大きく変化する遺伝子群を見出している。一方、6 週間のオートファジー不全ではインスリン分泌の低下を認め、 $\beta$  細胞機能維持に不可欠な遺伝子群の発現が低下していた。今後短期(2週間)および長期(6週間)オートファジー不全マウスの血清を用いてプロテオーム解析およびメタボローム解析を行うことにより、オートファジー不全に伴い血中に分泌されるバイオマーカーを探索する。

## 7. 共同研究の成果

短期(2週間)オートファジー不全マウス ( $i\beta Atg7KO^{2W}$ )、長期(6週間)オートファジー不全マウス ( $i\beta Atg7KO^{6W}$ )、および対照マウスの膵島を単離、RNA を抽出し、RNA sequencing を行なった。 $i\beta Atg7KO^{2W}$ 、 $i\beta Atg7KO^{6W}$  マウスともに *Atg7* mRNA の有意な低下を認めた。 $i\beta Atg7KO^{6W}$  マウスにおいて有意に発現が低下している遺伝子群に関して KEGG pathway 解析を行ったところ、インスリン分泌や2型糖尿病に関連する pathway が抽出され、この結果は、 $i\beta Atg7KO^{6W}$  マウスにおける遺伝子発現プロファイルの変化は、 $\beta$  細胞不全の結果を反映している可能性が高いと考えられた。次にオートファジー不全は誘導されているが、耐糖能は正常である  $i\beta Atg7KO^{2W}$  マウスにおける遺伝子発現プロファイルを解析し、 $i\beta Atg7KO^{2W}$ - $i\beta Atg7Het^{2W}$  間で最も発現変化の大きい *Sprr1a* に注目し解析を行なった。*Sprr1a* は障害時の神経組織の再生や、虚血による心筋障害の修復に重要であることが報告されているものの、膵  $\beta$  細胞における機能については未解明である。*db/db* マウス膵島で *Sprr1a* mRNA 発現量を定量化した結果、耐糖能正常である4週齢ではほとんど発現していないのに対し、 $\beta$  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週齢の *db/db* マウス膵島では *Sprr1a* の発現亢進が確認された。さらに、 $\beta HC9$ 、 $\beta TC3$ 、INS-1 といった  $\beta$  細胞株において *Atg7* の発現を knockdown したところ、いずれの細胞株においても *Sprr1a* の発現が亢進していた。さらに INS-1 細胞において、*Atg7* の knockdown と同時に *Sprr1a* を knockdown すると、対照群 (*Atg7* 単独を knockdown) に比較して *Atg7*、*Sprr1a* の両方を knockdown した細胞では、細胞数が有意に減少することが確認された。

以上の *in vivo* および *in vitro* 実験の結果は、新規遺伝子 *Sprr1a* がオートファジー不全感受性遺伝子として機能し、 $\beta$  細胞数の恒常性維持に何らかの役割を担っていることを示唆している。今後 *Sprr1a* 発現量の変化と  $\beta$  細胞機能の恒常性とを繋ぐ分子メカニズムの解明を目指したい。

## 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 本研究の担当教員の氏名の記載のある論文

1. Miura M, Miyatsuka T, Katahira T, Sasaki S, Suzuki L, Himuro M, Nishida Y, Fujitani Y, Matsuoka TA, Watada H. Suppression of STAT3 signaling promotes cellular reprogramming into insulin-producing cells induced by defined transcription factors. *EBioMedicine*. 36: 358-366, 2018.
2. Osonoi Y, Mita T, Azuma K, Nakajima K, Masuyama A, Goto H, Nishida Y, Miyatsuka T, Fujitani Y, Koike M, Mitsumata M, Watada H. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis. *Autophagy*. 14(11): 1991-2006, 2018

### ② この共同研究に基づくとの記載のある論文