

マイトファジー可視化による糖尿病の病態解明

青 柳 共 太¹⁾ 森 井 健 司²⁾ 秋 元 義 弘³⁾大 塚 弘 毅⁴⁾ 今 泉 美 佳¹⁾

1) 杏林大学医学部細胞生化学教室

2) 杏林大学医学部整形外科学教室

3) 杏林大学医学部顕微解剖学教室

4) 杏林大学医学部臨床検査医学教室

インスリンは血糖降下作用を持つホルモンで、膵臓のランゲルハンス氏島（膵島）内の膵β細胞から分泌される。慢性的な高血糖を主徴とする2型糖尿病は膵β細胞からのインスリン分泌不全や、肝臓や筋肉、脂肪などにおけるインスリン感受性の低下が主因と考えられている。このうち、特に日本人においては、インスリン分泌不全が2型糖尿病発症において重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

膵β細胞は血糖上昇に伴って細胞内に糖（グルコース）を取り込み、ミトコンドリアなどで代謝することによりATPを産生し、細胞内ATP量の増加に応じてインスリンを分泌する。そのため、血糖依存的な膵β細胞からのインスリン分泌においてミトコンドリアは必要不可欠な役割を果たしている。ところが、グルコース刺激依存的なATP産生において重要な役割を果たすミトコンドリアの呼吸反応では、活性酸素種（ROS）が副産物として生じ、ミトコンドリア自身を構成するタンパク質や脂質などを酸化して、それらの機能を妨げることが知られている。また、ROSによって損傷され、機能不全となった不良ミトコンドリアはさらに大量のROSを産生することでインスリン分泌を阻害し、アポトーシスを誘導することが知られている。神経や筋肉を用いたこれまでの研究から、細胞はミトコンドリアを標的としたオートファジー（マイトファジー）によって不良ミトコンドリアを分解することでミトコンドリア品質を維持していることが明らかになっている。しかしながら、膵β細胞ではマイトファジーを解析することが技術的に困難であったため、膵β細胞におけるミトコンドリア品質管理と糖尿病の関連については不明であった。そこで本研究では、マイトファジーによって分解されているミトコンドリアを検出するための蛍光プローブを用い、肥

満マウスの膵β細胞におけるミトコンドリア品質管理について解析を行った。

膵β細胞におけるマイトファジーを検出するために、ミトコンドリアにEGFPとmCherryをタンデムに発現させる蛍光プローブ（CMMR）を膵β細胞に発現させた。CMMRを発現したミトコンドリアは細胞質中ではEGFPとmCherryの両方から蛍光が観察される。一方、マイトファジーによってミトコンドリアがリソソームへと移行すると、リソソームの酸性環境によりEGFPは素早く消失するのに対し、mCherryはしばらく蛍光を発し続けるため、結果的にmCherryのみのシグナルが観察できるようになる。このCMMRを膵β細胞特異的に発現させたCMMRマウスを作出し、高脂肪食（HFD）飼育によりCMMRマウスに肥満を誘導したところ、膵β細胞においてマイトファジーが亢進していることを見いだした。

次に、HFD飼育により膵β細胞でマイトファジーが亢進する機構について検討を行った。マイトファジーは本来、不良ミトコンドリアを分解するために活性化されることから、HFD飼育したマウスの膵β細胞には不良ミトコンドリアが蓄積していることが予想された。そこで、HFD飼育したマウスの膵β細胞を培養し、不良ミトコンドリアの蓄積量について解析を行った。まず、不良ミトコンドリア蓄積の指標となるROS産生について検討したところ、HFD飼育したマウスの膵島では通常食飼育したマウスの膵島に比べ、ROS産生が高まっていることが明らかとなった。また、逆に機能的なミトコンドリアを選択的に染色したところ、HFD飼育したマウスの膵β細胞では機能的なミトコンドリアの割合が低下していることを見いだした。さらに電子顕微鏡解析を行ったところ、膨潤して形態的に異常なミトコンドリアの割合がHFD飼育したマウスの膵

β 細胞で増加していることが明らかとなった。これらのことから、HFD飼育したマウスの膵 β 細胞では不良ミトコンドリアが蓄積し、それを分解するためにマイトファジーが活発に起こっていることが明らかとなった。

次に、HFD飼育したマウスの膵 β 細胞においてマイトファジーが活性化される分子機構について検討を行った。まず、神経組織や筋肉などでマイトファジーに関わるものが報告されているPINK1やParkinについて遺伝子欠失マウスを用いた実験や過剰発現実験などにより検討を行った。その結果、PINK1やParkinは膵 β 細胞におけるマイトファジーには関与しないことが明らかとなった。そこでPINK1やParkinに非依存的なマイトファジー機構について検討を行った。HFD飼育したマウスでは肥満による高血糖に対応するため、膵 β 細胞が代償的にインスリンを過剰分泌する。その結果、膵 β 細胞ではミトコンドリアが大量の酸素を消費するため、膵 β 細胞が低酸素状態に陥ることが示唆されていた。実際に、低酸素状態の組織に沈着するPimonidazoleをHFD飼育したマウスに投与すると、膵島において低酸素状態を示す強いシグナルが観察された。そこで、低酸素依存的転写因子であるHif-1 α によって発現制御されるマイトファジー関連分子に着目し、解析を行った。その結果、Hif-1 α 依存的に発現調節されるBNIP3を膵 β 細胞に強制発現するとマイトファジーが誘導されたのに対し、BNIP3をノックダウンするとマイトファジーが抑制されることを見いだした。これらの結果から、HFD飼育したマウスの膵 β 細胞では代償的なインスリン過剰分泌に伴って誘導される低酸素状態によりHif-1 α が増加し、Hif-1 α により誘導されたBNIP3によってマイトファジーが亢進している可能性が明らかとなった。

最後に、HFD飼育したマウスおよび糖尿病モデル db/db マウスに2型糖尿病患者において膵 β 細胞を保護する作用が報告されているインスリンを投与し、膵 β 細胞におけるミトコンドリア品質管理と膵 β 細胞の機能について検討を行った。すると、インスリン投与によりHFD飼育マウスや db/db マウスの膵 β 細胞において不良ミトコンドリアの蓄積量が減少し、それに伴ってマイトファジーも減弱することを見いだした。また、インスリン投与によって

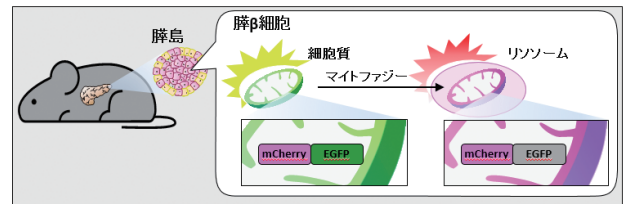


図1 膵 β 細胞特異的なマイトファジー可視化マウスの作製
膵 β 細胞のミトコンドリアにマイトファジーを検出するための蛍光センサーとして、pH感受性の異なる蛍光タンパクであるmCherryとEGFPを発現させた。ミトコンドリアが細胞質にいる時はmCherryからの赤い蛍光とEGFPからの緑の蛍光の両方が観察されるが、ミトコンドリアがマイトファジーによって酸性のリソソームへと輸送されると、EGFPは蛍光を発しなくなるため、mCherryからの赤い蛍光のみが観察されるようになる。すなわち赤い蛍光を観察することにより、マイトファジー活性が検出できる。

HFD飼育マウスや db/db マウスの膵島からのインスリン分泌が増強されること、さらに db/db マウスの膵 β 細胞においてはアポトーシスも抑制されることを見いだした。これらの結果から、糖尿病状態の膵 β 細胞ではミトコンドリア管理状態が悪化することによりインスリン分泌不全および膵 β 細胞死が誘導される可能性が明らかとなった。

以上の結果から、肥満によって惹起される代償的なインスリン過剰分泌に伴う低酸素状態と、それに続くHif-1 α の増加によりBNIP3発現量が増加し、膵 β 細胞におけるマイトファジーが惹起される可能性が明らかとなった。また、BNIP3を介したマイトファジーによって不良ミトコンドリアの蓄積量を抑制し、膵 β 細胞のミトコンドリア品質を維持することで、膵 β 細胞からのインスリン分泌量や膵 β 細胞の数を維持していることが明らかとなった。現在はミトコンドリアに作用することが示唆されている抗糖尿病薬が膵 β 細胞のミトコンドリア品質管理に与える影響などについて検討を進めている。

参考文献

- 1) Aoyagi K, Yamashita SI, Akimoto Y, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Udagawa H, Abe M, Sakimura K, Kanki T, Ohara-Imaizumi M. A new beta cell-specific mitophagy reporter mouse shows that metabolic stress leads to accumulation of dysfunctional mitochondria despite increased mitophagy. *Diabetologia*, 66: 147-162