

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11658

研究課題名(和文)細胞間で同調する周期性インスリン分泌の定量的生物発光イメージング解析

研究課題名(英文)Quantitative analysis of synchronized insulin secretion in a cluster of cells by bioluminescence imaging

研究代表者

鈴木 崇弘 (Suzuki, Takahiro)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：70298545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：分泌型の発光酵素(ガウシアルシフェラーゼ)を用いた独自開発の細胞イメージング技術により、血糖値抑制ホルモンであるインスリンの周期性分泌について研究を行った。新規に発光膵細胞株(iGL細胞)を樹立し、2Dおよび3D培養した細胞間で同調する周期性インスリン分泌を生物発光法で可視化し、ルミノメーター(発光測定器)を用いた簡便なインスリン分泌の相対定量解析法を改良した。本研究により、インスリン分泌機構と糖尿病の研究に有用なツールと手法を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規に樹立した“発光”ラット膵細胞株iGL細胞は、グルコース応答性インスリン分泌を簡便かつ高感度に測定することが可能である。3D培養のiGL細胞(スフェロイド)は、単離ラット膵島と同様に、細胞塊で同調した周期性インスリン分泌動態の可視化解析も可能である。本研究成果は、糖尿病関連の研究や創薬において有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We developed a method of bioluminescence imaging to visualize protein secretion by using *Gussia luciferase* (GLase), and oscillatory insulin secretion was studied by our imaging method. A new pancreatic beta cell line stably expressing a fusion protein of insulin to GLase (Insulin-GLase), name iGL, was established. Synchronous insulin secretion from 2D- and 3D-cultured iGL cells was visualized by our bioluminescence imaging method. We also improved a method to determine the relative amount of insulin secretion from iGL cells with a luminometer. Thus, we provided useful tools and methods to investigate the mechanism of insulin secretion and diabetes.

研究分野：生化学

キーワード：生物発光イメージング インスリン分泌 ガウシアルシフェラーゼ 開口分泌 エキソサイトーシス  
糖尿病 タンパク質分泌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) インスリン抵抗性とインスリン分泌障害が2型糖尿病の原因となるが、特にインスリン分泌障害の発症機序は未だ不明な点が多い。インスリンは、膵島細胞から拍動性に分泌され、食後1-2時間の血中濃度は数分程度の間隔で振動する(オシレーション)。正常なオシレーションは、インスリン受容体シグナル伝達を持続させ、インスリン抵抗性を抑制すると考えられる。糖尿病の発症過程でオシレーションが破綻することから、細胞塊の同調性インスリン分泌機構を解明することは、糖尿病の治療薬を開発する上で極めて重要と考えられる。

(2) インスリン分泌の可視化には、全反射蛍光や2光子励起蛍光による蛍光イメージング法が応用されている。全反射蛍光は、細胞のガラス接着面における開口分泌に至るまでの小胞動態を可視化できる利点があり、2光子励起蛍光は、細胞間接着面における開口分泌中の小胞形態変化を観察できる利点がある。一方、膵島のような細胞塊全体の周期性インスリン分泌を可視化する方法は報告が無く、膵島と同様に、細胞塊全体で周期性インスリン分泌動態を示す細胞株についても報告がなかった。

(3) 我々はこれまでに、独自に開発した「分泌タンパク質のビデオレート生物発光イメージング法」を駆使して細胞間で同調するインスリン分泌の可視化に成功していた。本手法は、分泌型ルシフェラーゼ(酵素)がルシフェリン(発光基質)を含む培養液に分泌された瞬間に起こる酵素反応の微弱発光を、外部光を遮断した高感度カメラ顕微鏡システムで可視化する。この原理により本手法は、生細胞の全細胞表面を解析可能であり、細胞外の分泌タンパク質を特異的に検出して、画像上の発光強度変化を分泌量の変動として解析できる利点がある。分子量最小(16.8kDa)かつ高い発光活性を示す分泌型発光酵素であるガウシアルルシフェラーゼ(*Gaussia Luciferase*, GLase)は、本手法に用いるルシフェラーゼとして最適であり、一連の研究から多種タンパク質の分泌動態研究に適用できる手法として確立し、創薬研究に応用できる可能性を示してきた。

### 2. 研究の目的

(1) 独自開発の「分泌タンパク質のビデオレート生物発光イメージング法」を三次元(3D)培養細胞のタンパク質分泌動態解析に適用し、単離膵島および細胞株の細胞塊(スフェロイド)を用いて、グルコース刺激による同調性インスリン分泌動態を可視化する。

(2) ルミノメーターを用いた発光測定による簡便なインスリン分泌解析法を、基礎研究および創薬研究に応用可能とするため、発光測定によるインスリン分泌の定量解析系を最適化する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒトインスリンとガウシアルルシフェラーゼの融合タンパク質(Insulin-GLase)をレポーターとして、水冷EM-CCDカメラを備えた顕微鏡システムで生物発光イメージングを行い、グルコース応答性インスリン分泌を300-500 ms/frameで可視化解析した(図1A)。

(2) 単離ラット膵島については、アデノウイルスベクターを用いてInsulin-GLaseを一過性発現させた。またラット膵細胞株(INS-1E細胞)に対してInsulin-GLase発現プラスミドベクターを導入して薬剤耐性による選別を行い、Insulin-GLaseを定常発現し、グルコース刺激時に完全な同調性インスリン分泌を示す細胞株(iGL細胞)を得た。

(3) iGL細胞を用いた解析では、生物発光イメージングによるインスリン分泌の可視化に加えて、iGL細胞培養上清についてルミノメーターを用いた発光測定によりインスリン分泌の相対定量解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 単離したラット膵島をマトリゲルでコーティングしたガラスボトムディッシュに接着させた後、Insulin-GLase発現用のアデノウイルスで感染させて生物発光イメージング解析を行った(図1B-E)。その結果、Insulin-GLaseを一過性発現させた単離ラット膵島では、高グルコー

ス刺激により膵島表層全体が一斉に同調して周期変動する分泌の発光シグナルが可視化された (図 1D, E)。

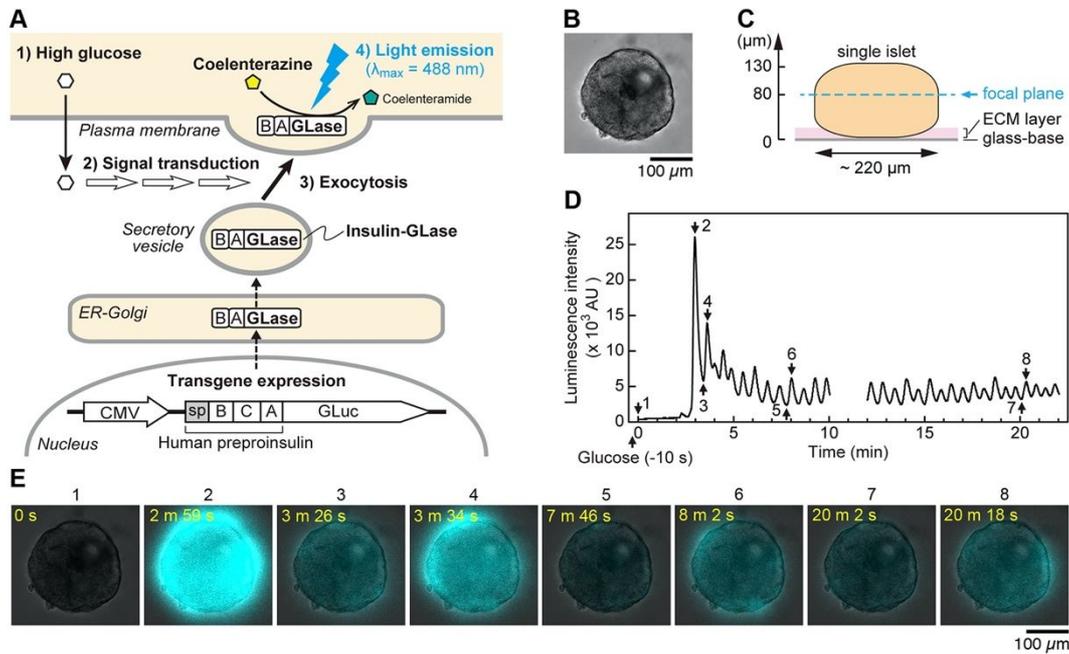


図 1 Insulin-GLase を一過性発現させた単離ラット膵島の生物発光イメージング解析 (文献 1 から引用)

(2) Insulin-GLase 発現用プラスミドベクターを遺伝子導入した INS-1E 細胞から、薬剤耐性、ルミノメーターを用いたグルコース応答性インスリン分泌、および生物発光イメージング法による周期性インスリン分泌を指標として選別を行い、Insulin-GLase を定常発現する細胞株として、iGL 細胞を樹立した。iGL 細胞をガラスボトムディッシュ上で培養し、インスリン分泌動態の生物発光イメージング解析を行った。

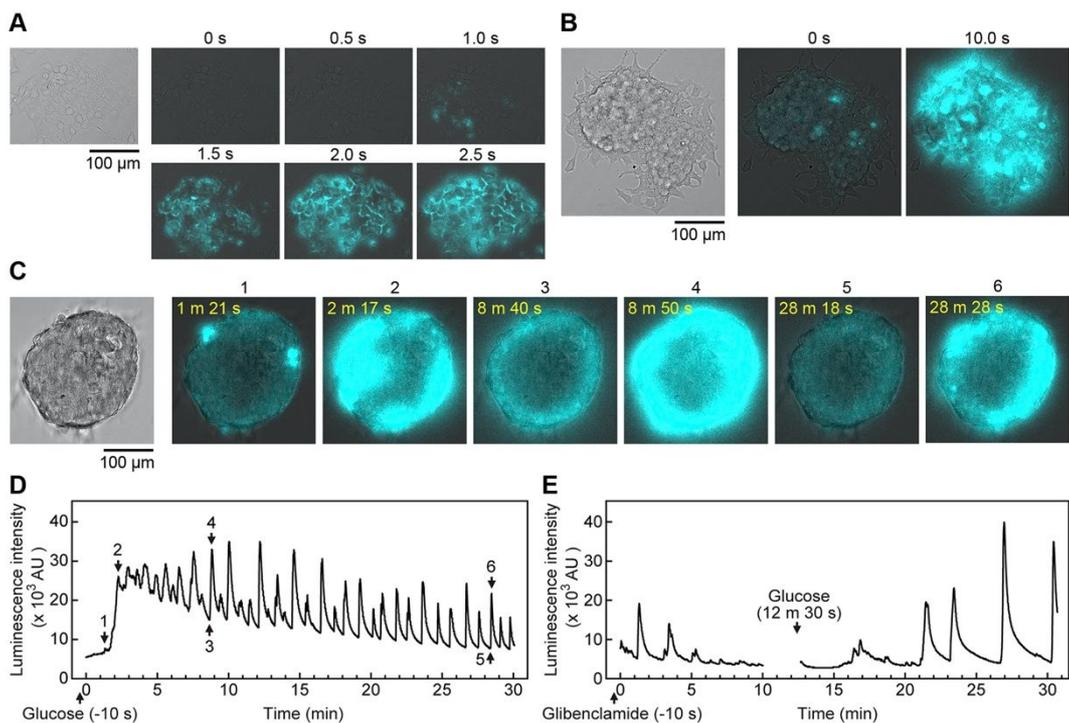


図 2 Insulin-GLase 定常発現株 iGL 細胞の生物発光イメージング解析 (文献 1 から引用)

iGL 細胞では、平面 (二次元, 2D) 培養 (図 2A) と三次元 (3D) 培養した細胞塊 (図 2B) のそれぞれの培養条件において、細胞間で同調したインスリン分泌が観察された。またマトリゲル上

に培養した膵島様 iGL 細胞スフェロイドにおいては、単離ラット膵島と同様に、グルコース刺激で細胞集団全体が同調する周期性インスリン分泌が 30 分以上観察された (図 2C,D)。一方、膵島様 iGL 細胞スフェロイドに対するグリベンクラミド刺激では、刺激直後から 3 回程度と同調性インスリン分泌が観察されて徐々に同調性が失われたが、その後グルコース刺激することにより振幅の大きな同調性インスリン分泌が観察された (図 2E)。

さらに、マルチウェルプレート上で培養した iGL 細胞の培養上清を用いて、グルコース応答性インスリン分泌をルミノメーターで発光測定解析したところ、iGL 細胞間におけるインスリン分泌の同調性と周期性が高まる細胞密度の高さと細胞培養時間の長さに比例して、インスリン分泌量が増大することが示された。

(3) 次に、一般的なアッセイ系として利用されているルミノメーターを用いた発光測定法において、iGL 細胞を用いたインスリン分泌の定量解析系を改良した。培養液に添加する還元剤としてモノチオグリセロールを使用し、マルチウェルプレートを 8 倍希釈したマトリゲルでコーティングした。さらに高密度で iGL 細胞を播種することで、細胞播種から 2~3 日後に高い細胞接着性を維持しながら、高いグルコース応答性インスリン分泌を解析できた。このとき、グルコース刺激による誘導率について、ルミノメーターを用いた発光測定法と、抗インスリン抗体を用いた ELISA 測定法との間で、高い相関性があることを示した。

このように改良された培養条件において生物発光イメージングを行い、細胞間で同調した分泌動態に基づいたグルコース応答性インスリン分泌を確認した。一方、Insulin-GLase を部分精製した結果、Insulin-GLase は各種 ELISA キットの抗体では認識されず、ELISA では iGL 細胞に内因性に発現するラットインスリンのみが検出されると考えられた。

(4) Insulin-GLase 定常発現株である iGL 細胞は、グルコース刺激時に同調性インスリン分泌を示した。このように細胞集団で完全に同調した周期性インスリン分泌を簡便に解析可能な細胞株は他に例がなく、iGL 細胞は、細胞間で同調した周期性インスリン分泌機構を研究する上で、極めて有用な細胞株であると考えられる。また、ELISA による測定法に対してルミノメーターを用いた発光測定法は、感度と簡便性に優れ、低コストである利点があり、改良された培養条件での iGL 細胞を用いたルミノメーター測定によるインスリン分泌解析法は、糖尿病治療薬の評価と開発において有益と考えられる。

(5) 本研究成果は、3D 培養した細胞塊全体のタンパク質分泌動態を簡便に可視化解析する初めての手法を提供している。本研究で用いた生物発光イメージングと発光測定による分泌タンパク質の解析手法は、細胞塊 (スフェロイド) を扱う再生医療研究など、生理的培養条件として注目されている 3D 培養細胞を用いた研究に広く応用できると考えられる。

#### <文献>

1. Suzuki T, Kanamori T, Inouye S: Quantitative visualization of synchronized insulin secretion from 3D-cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **486**: 886-892, 2017. (Open Access CC BY 4.0)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Takahiro, Kanamori Takao, Inouye Satoshi	4. 巻 486
2. 論文標題 Quantitative visualization of synchronized insulin secretion from 3D-cultured cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 886 ~ 892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.03.105	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 -

1. 著者名 Suzuki Takahiro, Kanamori Takao, Inouye Satoshi	4. 巻 140
2. 論文標題 Novel Technology for Studying Insulin Secretion: Imaging and Quantitative Analysis by a Bioluminescence Method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 969 ~ 977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.20-00012-2	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木崇弘
2. 発表標題 ガウシアルシフェラーゼを用いた分泌タンパク質と膜タンパク質の可視化と定量
3. 学会等名 第18回生命科学研究会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木崇弘, 金森孝雄, 井上敏
2. 発表標題 発光細胞株 iGL 細胞を用いた生物発光イメージングによる同調性インスリン分泌の定量的可視化
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会（東京）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木崇弘, 金森孝雄, 井上敏
2. 発表標題 インスリン分泌解析の新技术: 生物発光によるイメージングと定量解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会(千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木崇弘, 金森孝雄, 井上敏
2. 発表標題 発光 細胞株 iGL細胞を用いた同調性インスリン分泌の可視化
3. 学会等名 第16回生命科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木崇弘, 金森孝雄, 井上敏
2. 発表標題 三次元培養細胞におけるタンパク質分泌動態の定量的可視化: 同調性インスリン分泌の生物発光イメージング
3. 学会等名 第26回日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木崇弘, 金森孝雄, 井上敏
2. 発表標題 3D培養細胞における分泌タンパク質の生物発光イメージング: 周期性インスリン分泌の可視化
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木崇弘, 金森孝雄, 井上敏
2. 発表標題 ビデオレート生物発光イメージング法による3D培養細胞における同調性インスリン分泌の可視化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木崇弘
2. 発表標題 生物発光イメージングによるタンパク質分泌動態の定量的可視化
3. 学会等名 金沢大学薬学シンポジウム2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木 崇弘, 横川 慧, 松下 佐知, 古野 忠秀, 井上 敏
2. 発表標題 発光 細胞株 “ iGL細胞 ” を用いたグルコース応答性インスリン分泌の解析
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横川 慧, 松下 佐知, 福田信治, 伊納 義和, 古野 忠秀, 井上 敏, 鈴木 崇弘
2. 発表標題 発光 細胞株 “ iGL細胞 ” を用いた糖尿病治療薬の創薬スクリーニング系の構築
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会年次学術集会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	古野 忠秀 (Furuno Tadahide) (80254308)	愛知学院大学・薬学部・教授  (33902)	
研究協力者	井上 敏 (Inouye Satoshi) (40426622)	チッソ株式会社横浜研究所・研究開発本部・主席企画員  (92708)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------