

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03423

研究課題名（和文）生体内インスリン動態制御機構の新規in vivo肝・膵イメージング法による解明

研究課題名（英文）In vivo liver and pancreas imaging for elucidation of regulating mechanisms of insulin dynamics

研究代表者

金丸 和典（KANEMARU, Kazunori）

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：10456105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：細胞からのインスリン分泌はカルシウムシグナルに制御される。従来の研究では、培養細胞など生体外の実験による知見が主であり、血流・神経・ホルモンなど制御を除外した実験系であるため、生体内環境での検証が必要である。そこで本研究では、膵細胞のマウス生体内カルシウムイメージング法を新たに開発して解析した。麻酔・開腹下だけでなく、覚醒下のマウス個体での細胞カルシウムシグナルのイメージング手法の確立に成功し、自律神経系や摂食・絶食がインスリン分泌および細胞カルシウムシグナルに与える影響を解析することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で独自に開発したイメージング技法および発見した生体内細胞活動機構の特徴は、これまで謎とされてきた血中インスリン動態の形成原理の解明に直結する先駆的な研究であるとともに、病態解明に応用可能である。すなわち、インスリン分泌機構のさらなる理解をもたらしたうえ、糖尿病治療戦略の新規創生にも貢献し得る成果である。

研究成果の概要（英文）：Insulin secretion from pancreatic cells is regulated by calcium signaling. Since previous studies were based on findings from ex vivo experiments which exclude regulation by blood flow, nerves, and hormones, verification in an in vivo environment is needed. In this study, we developed and analyzed a new in vivo calcium imaging method for pancreatic beta cells using mice. We succeeded in establishing an imaging method for cell calcium signaling not only in awake mice but also in anesthetized mice, and analyzed the effects of the autonomic nervous system and feeding and fasting on insulin secretion and cell calcium signaling.

研究分野：生理学、薬理学、神経科学

キーワード：in vivoイメージング カルシウムシグナル 膵臓 細胞 インスリン ランゲルハンス島

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。

1. 研究開始当初の背景

膵細胞は生体内で唯一のインスリン供給源であり、血糖調節ひいては生体恒常性維持に不可欠である。細胞からのインスリン放出は、血糖値、神経伝達物質、細胞間電気信号などに惹起される細胞内 Ca^{2+} シグナルに制御される。この知見は主に、培養細胞あるいは細胞を含む島状の細胞集合体である膵島の単離標本を用いた生体外 (ex vivo) の実験から得られており、血流や神経支配・三次元構造に由来する様々な刺激や制御因子、調節因子に晒される生体内環境 (in vivo) での検証が必須である。しかし、技術的な障壁により in vivo 細胞における Ca^{2+} 動態は未だ明らかでなく、例えば培養細胞の高濃度グルコース刺激時に見られる細胞内 Ca^{2+} シグナルの周期振動現象、いわゆる Ca^{2+} オシレーションが覚醒下生体内の細胞で見られるかどうかは現在でも不明であるなど、解明の余地が多く残されていた。

2. 研究の目的

このように基本的でありながら不透明なままである課題を解決すべく、本研究では細胞 in vivo Ca^{2+} イメージング法を開発し、血中インスリン濃度の実態と ex vivo 実験で蓄積された細胞 Ca^{2+} 活動様式のギャップを埋め、インスリン分泌にかかる細胞活動原理の理解を深めることが本研究の目的である。

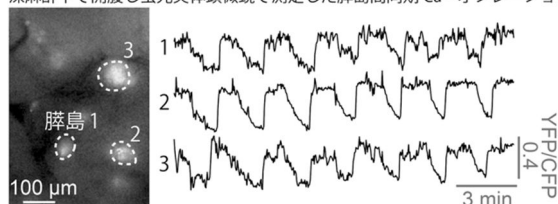
3. 研究の方法

研究代表者が以前の脳研究で確立した手法を応用し、細胞 in vivo Ca^{2+} イメージング法の開発を行った。これを活用した膵島 Ca^{2+} シグナルの生理的パターン解析と薬理的・遺伝学的擾乱による膵島間同期メカニズム解明、さらに新規の生体内可視化法開発を含むインスリン動態解析を行った。

4. 研究成果

初年度には、イメージング用の恒常的ウィンドウ作製のためのプロトコルに改良を重ね、安定性の向上を成功させた。これにより、麻酔下だけでなく、覚醒下でも同一個体における繰り返しイメージングも可能となった (右図)。

深麻酔下で開腹し蛍光実体顕微鏡で測定した膵島間同期 Ca^{2+} オシレーション



さらに、空腹状態のマウスでイメージ

ングしながら給餌を行った場合のカルシウムシグナルの変動も記録が可能となった。また、イメージング解析終了後のマウスで膵臓にダメージがないかなどを検証するための免疫組織学的解析も行った。スループット性向上のためマイクロスライサーを新規購入した。時間のかかる凍結切片作製に代わり、組織スライスでの組織学的観察が可能のように改良した。2年目には、これまでに開発してきた膵 in vivo イメージング手法に、さらなる改良を加えることに成功し、麻酔下および行動下でのデータ取得が概ね安定して可能となった。その結果、ノイズの少ないデータを多く得ることが出来、そのデータを用いた解析によりカルシウムシグナルのパターン抽出を大幅に進めることができた。その解析の結果から、予想に反して、膵イメージングではさらなる遺伝子改変マウスが必要となったため、その開発に着手した。また、膵臓神経系の活動可視化ツールの開発にも着手した。さらに、最終年度に予定している肝イメージングについても、ウイルスベクターによる予備知見取得を済ませた。その知見をもとに、新規肝イメージングを達成可能な専用の新規遺伝子改変マウス作製にも着手した。組織透明化手法を取り入れた膵臓・肝臓の

組織学的解析も最適化を進め、予備的知見を取得できる段階まで進展させた。in vivo カルシウムイメージングと組織学の解析結果を照合し、インスリン動態制御機構の解明を行った。最終年度には、これまでに開発してきたマウス生体内膵イメージングを用いて、マウス絶食および摂食が細胞カルシウム活動パターンに及ぼす影響を解析した。その結果、自律神経系が細胞カルシウム活動に意外な作用を及ぼすこと、さらに、カルシウムシグナル抑制因子を同時に発現させる遺伝子改変マウス系統も併用した解析により、その作用機序を解明するなど、重要な新規知見を得ることに成功した。また、昨年度の解析結果により急遽必要が生じ作製した新規遺伝子改変マウスが完成し、より高精度な細胞カルシウムイメージングが可能となった。さらに、マウス生体内肝細胞のカルシウムイメージング手法も、さらなる洗練が必要な状況ではあるが概ね完成し、ホルモンや神経伝達物質により肝細胞内カルシウムシグナルが顕著に変動することを見出した。肝細胞カルシウムシグナルがインスリン体内動態を一部反映することを示す結果も併せて得ている。これらの結果は学会会議や研究会において発表済みであり、論文発表の準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kitano Hisataka, Kanemaru Kazunori, Miki Toshio, Hidai Chiaki	4. 巻 75
2. 論文標題 EGF domain peptide of Developmentally regulated endothelial locus1 facilitates gene expression of extracellularly applied plasmid DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biologicals	6. 最初と最後の頁 12～15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biologicals.2022.01.002	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 Chiho Takai, Naoko Iwata, Kazunori Kanemaru, Kenji F. Tanaka, Yao Yu, Satoshi Iino, Shinsuke Nakayama	4. 巻 364
2. 論文標題 Ratio-metric measurement of intracellular calcium in visceral muscles via selective expression of a yellowameleon calcium sensor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 131756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.snb.2022.131756	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 Kurebayashi Nagomi, Murayama Takashi, Ota Ryosaku, Suzuki Junji, Kanemaru Kazunori, Kobayashi Takuya, Ohno Seiko, Horie Minoru, Iino Masamitsu, Yamashita Fumiyo, Sakurai Takashi	4. 巻 154
2. 論文標題 Cytosolic Ca ²⁺ -dependent Ca ²⁺ release activity primarily determines the ER Ca ²⁺ level in cells expressing the CPVT-linked mutant RYR2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Physiology	6. 最初と最後の頁 e202112869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1085/jgp.202112869	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 Abe Shigehiro, Kaida Atsushi, Kanemaru Kazunori, Nakazato Keiichiro, Yokomizo Naoko, Kobayashi Yutaka, Miura Masahiko, Miki Toshio, Hidai Chiaki, Kitano Hisataka, Yoda Tetsuya	4. 巻 55
2. 論文標題 Differences in the stemness characteristics and molecular markers of distinct human oral tissue neural crest derived multilineage cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Proliferation	6. 最初と最後の頁 e13286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cpr.13286	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 Takano Chika, Horie Masafumi, Taiko Isamu, Trinh Quang Duy, Kanemaru Kazunori, Komine-Aizawa Shihoko, Hayakawa Satoshi, Miki Toshio	4. 巻 18
2. 論文標題 Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition Maintains Stemness in Human Amniotic Epithelial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 3083 ~ 3091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-022-10420-1	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 Tatsuoka Juri, Sano Emiko, Hanashima Yuya, Yagi Chihiro, Yamamuro Shun, Sumi Koichiro, Hara Hiroyuki, Takada Kazuhide, Kanemaru Kazunori, Komine-Aizawa Shihoko, Katayama Yoichi, Yoshino Atsuo	4. 巻 24
2. 論文標題 Anti-tumor effects of perampanel in malignant glioma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2022.13541	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 Taiko Isamu, Takano Chika, Nomoto Masayuki, Hayashida Shingo, Kanemaru Kazunori, Miki Toshio	4. 巻 12
2. 論文標題 Selection of red fluorescent protein for genetic labeling of mitochondria and intercellular transfer of viable mitochondria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24297-0	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 Moriyama Mitsuhiro, Kanda Tatsuo, Midorikawa Yutaka, Matsumura Hiroshi, Masuzaki Ryota, Nakamura Hitomi, Ogawa Masahiro, Matsuoka Shunichi, Shibata Toshikatu, Yamazaki Motomi, Kuroda Kazumichi, Nakayama Hisashi, Higaki Tokio, Kanemaru Kazunori, Miki Toshio, Sugitani Masahiko, Takayama Tadatoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 The proliferation of atypical hepatocytes and CDT1 expression in noncancerous tissue are associated with the postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-25201-6	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 Watanabe Hirofumi, Kanemaru Kazunori, Hagikura Kazuhiro, Matsumoto Taro, Ayusawa Mamoru, Morioka Ichiro	4. 巻 45
2. 論文標題 Soluble factors released by dedifferentiated fat cells reduce the functional activity of iPS cell derived cardiomyocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 295 ~ 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.11487	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 金丸 和典、太向 勇、飯野 正光
2. 発表標題 レシオ型Ca ²⁺ センサー発現マウスによる生体内 細胞Ca ²⁺ 動態のイメージング解析
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金丸 和典、太向 勇、飯野 正光
2. 発表標題 レシオ型Ca ²⁺ センサー発現マウスを用いた生体内 細胞におけるCa ²⁺ 活動解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太向 勇、金丸 和典、飯野 正光
2. 発表標題 膵 細胞におけるMICU1によるミトコンドリアカルシウムシグナルの制御
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金丸 和典
2. 発表標題 カルシウムセンサータンパク質発現マウスを用いた肝細胞カルシウム動態のin vivoイメージング解析
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金丸 和典、太向 勇、陳 開、茂木 優貴、平岡 優一、飯野 正光
2. 発表標題 In vivo カルシウムイメージングによるマウス生体内 細胞の活動様式解明
3. 学会等名 2022年度生理研研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金丸 和典
2. 発表標題 遺伝子改変マウス膵臓および肝臓細胞のin vivoカルシウムイメージング解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太向 勇、金丸 和典、飯野 正光
2. 発表標題 膵 細胞におけるコリン作動性カルシウム抑制
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茂木 優貴、飯野 正光、金丸 和典
2. 発表標題 神経変性疾患モデルマウスにおけるin vivoアストロサイトCa ²⁺ 活動の解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金丸 和典
2. 発表標題 膵 細胞カルシウム活動のin vivo可視化により見えてきた自律神経制御と体内インスリン動態
3. 学会等名 Systematic Integration of Molecular Brain Science
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金丸 和典
2. 発表標題 オルガネラカルシウムセンサーの開発と生体内カルシウムイメージング
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太向 勇、金丸 和典、飯野 正光
2. 発表標題 膵 細胞におけるアセチルコリン作動性のカルシウム抑制
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野本 正幸、太向 勇、高野 智佳、金丸 和典、三木 敏生
2. 発表標題 ヒト羊膜上皮細胞を用いた 型肺胞上皮細胞への分化誘導
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷田部 一輝、平岡 優一、茂木 優貴、三木 敏生、飯野 正光、金丸 和典
2. 発表標題 マウス生体内における肝細胞カルシウム動態の可視化解析
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金丸 和典、太向 勇、陳 開、茂木 優貴、平岡 優一、飯野 正光
2. 発表標題 In vivo脾臓カルシウムイメージングによるマウス生体内 細胞の活動様式解明
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野 良、田中 真、矢部 健介、野村 泰之、大島 猛史、平岡 優一、飯野 正光、金丸 和典
2. 発表標題 型味細胞における味覚受容カルシウム応答のin vivoイメージング解析
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 茂木 優貴、飯野 正光、金丸 和典
2. 発表標題 神経変性疾患モデルマウスにおける脳表アストロサイトCa ²⁺ 活動の巨視的解析
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太向 勇、金丸 和典、飯野 正光
2. 発表標題 Cholinergic suppression of Ca ²⁺ signaling in pancreatic β -cells
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金丸 和典、鈴木 純二、太向 勇、飯野 正光
2. 発表標題 赤色蛍光CEPIAを用いたミトコンドリアCa ²⁺ 動態の可視化解析
3. 学会等名 第63回日本神経化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茂木 優貴、飯野 正光、金丸 和典
2. 発表標題 神経変性疾患におけるグリア細胞Ca ²⁺ 活動解析を目指したマウス脳表in vivoイメージング実験法
3. 学会等名 第42回神経組織培養研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金丸 和典
2. 発表標題 アストロサイトCa2+シグナルに制御される神経保護因子の探索
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学医学部生理学分野webページ http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/nuphy/index.html

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

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
---------	---------