

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09886

研究課題名（和文）ガウシアルシフェラーゼを用いたインスリン分泌解析の新展開

研究課題名（英文）Novel development of insulin secretion analysis using Gaussia luciferase

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：血糖値抑制ホルモンであるインスリンとガウシアルシフェラーゼ（発光酵素GLase）の融合タンパク質を定常発現する膵細胞株（iGL細胞）を用いて新たなインスリン分泌解析法の研究を行った。生物発光イメージング解析により、細胞外基質マトリゲルへのiGL細胞の接着が周期性インスリン分泌の可視化解析に有用であることを示した。また、希釈マトリゲルでコーティングしたプレートを用いることで、ルミノメーターによる発光測定系でグルコース応答性インスリン分泌を解析する最適な実験条件を確立した。また、GLaseを用いてインスリン分泌を促進するオステオカルシンの分泌動態を可視化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マトリゲルコートしたマルチウェルプレートに播種したiGL細胞を用いることで、生物発光イメージング法により細胞間で同調する周期性インスリン分泌動態を安定して解析することが可能となり、糖尿病の発症機構を研究する有用な解析系を提供することができた。また、ルミノメーターによる高感度な発光測定法では、インスリン分泌量を簡便かつ安定して解析することが可能となった。本研究成果は、糖尿病関連の創薬研究において特に有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We developed a new method for analyzing insulin secretion using a pancreatic -cell line (iGL cells) that stably expresses a fused protein of insulin to Gaussia luciferase (GLase), a bioluminescent enzyme. Bioluminescence imaging analysis demonstrated that the adhesion of iGL cells to the extracellular matrix (Matrigel) is suitable for visualizing synchronized insulin secretion among clustered cells. Additionally, by using a plate coated with diluted Matrigel, we established optimal experimental conditions for analyzing glucose-stimulated insulin secretion using a luminometer. Furthermore, we visualized the secretory dynamics of osteocalcin, which promotes insulin secretion, using GLase.

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
膵細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病と増悪関係にある2型糖尿病の予防と治療は、歯科医療に深く関わる。2型糖尿病ではインスリン抵抗性とインスリン分泌障害が問題となるが、特にインスリン分泌障害の発症機序は、ほとんど不明である。インスリンは、膵島細胞から拍動性に分泌され、食後1-2時間でインスリン血中濃度が高まり血糖値が抑制される。このとき、インスリンの血中濃度は、十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、血中インスリン濃度の周期変動機構の解明は、糖尿病治療薬の開発で極めて重要と考えられる。

インスリンは膵島細胞から拍動性に分泌され、細胞間と個々の膵島間の同調により周期性インスリン分泌が起こり、血中インスリン濃度が周期変動すると考えられる。インスリン分泌量は主にELISAで解析されるが、プレートの繰り返し洗浄操作が煩雑で実験時間が長く、試薬キットが高価であり、周期性分泌の変動を解析する上では多くの手間とコストを要する。また、蛍光プローブを用いた細胞内Ca²⁺濃度の周期変動は多くの報告がある一方で、インスリン分泌量自体を簡便に計測および可視化する手法がこれまでに無く、周期性インスリン分泌動態とその制御機構の大部分は不明であった。

(2) 我々はこれまでに、生細胞における「分泌タンパク質の生物発光イメージング法」を独自に開発してきた。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、単一生細胞の全細胞表面を解析できる上に、細胞塊全体の解析も可能であり、細胞外のタンパク質を特異的に検出して画像上の発光強度から分泌量の変動を解析できる。分泌経路で高い発光活性を示すガウシアルルシフェラーゼ(*Gaussia luciferase: GLase*)は最適なレポーターであり、各種タンパク質の分泌動態と細胞表面局在を報告してきた。これまでに、インスリンとGLaseの融合タンパク質(*Insulin-GLase*)を発現させた膵細胞株と単離ラット膵島で、グルコース刺激による周期性インスリン分泌動態を可視化した(図1)<文献>。また、膵島と同様の周期性インスリン分泌を特長とする*Insulin-GLase* 定常発現膵細胞株である*iGL*細胞を樹立し、分泌動態の可視化に加えて、ルミノメーター測定による簡便なインスリン分泌解析を実現した<文献>。*iGL*細胞を播種する細胞密度および培養日数を検討した結果、周期性インスリン分泌の細胞間同調性が高まる高密度培養および長時間培養条件で、細胞あたりのグルコース応答性インスリンの分泌量と応答率が大きく増大することから、細胞間接着によるインスリン分泌の同調が細胞集団での周期的なインスリン分泌の周期変動を生み出すことは、インスリン分泌量の増大に重要であることを示唆した<文献>。これらの結果から、糖尿病における血中インスリン濃度の周期変動の消失は、インスリン分泌量の減少に繋がる可能性が考えられた。

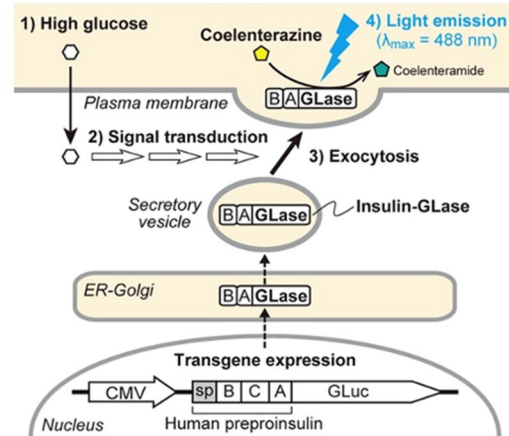


図1. 生物発光イメージングによるインスリン分泌可視化の原理(文献1から引用)

(3) *iGL*細胞を用いたルミノメーター測定による発光活性測定においては、細胞の洗浄操作が煩雑である上に、*iGL*細胞のカルチャープレートへの接着性が弱く、洗浄操作をゆっくり丁寧に行わないと細胞が剥離してしまう問題があり、創薬スクリーニングに応用する上で大きな障壁となっている。特に、長時間培養下では細胞間の接着性が高まる一方でプレートへの接着性が大きく低下する。また、インスリン分泌量の増大*iGL*細胞を用いた発光活性測定法が、ELISAによる従来の吸光度測定法と比較して、どれだけの定量性や相関性があるか不明なままである。ルミノメーターを用いたルシフェラーゼ発光測定法の感度の高さ、簡便性、および低コストの利点を活かして、糖尿病研究におけるインスリン分泌解析に応用するためには、細胞の接着性を確保し、細胞洗浄操作を容易にする必要がある。また、生物発光イメージング法による周期性インスリン分泌の可視化解析を糖尿病研究へ応用していく上でも、ルミノメーターを用いた発光測定法の改良は*Insulin-GLase*をプローブとした解析手法の両軸として発展させる上で重要である。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究より、細胞間で同調した周期性インスリン分泌は、グルコース応答性インスリン分泌における分泌量と応答率の両方の増大に重要であると考えられる。最初に、細胞の接着性を高める各種コーティング処理を施した培養ディッシュを用いて、周期性インスリン分泌動態を簡便に可視化できる*iGL*細胞を用いた生物発光イメージング解析を行うことで、周期性インスリン分泌動態への影響を明らかにする。

(2) 発光イメージング解析で得られた結果に基づき、iGL 細胞を用いたルミノメーターによる発光測定解析を行うことで、グルコース応答性インスリン分泌を解析する上で有用な細胞接着を高めるコーティング処理の解析を行う。最適なコーティング処理を決めた上で、細胞密度、培養時間、細胞洗浄回数を最適化し、従来よりも簡便な操作法でルミノメーターを用いたインスリン分泌解析系を確立し、糖尿病研究への応用性を高める。

(3) 新規インスリン分泌実験系の構築に向けた取り組みとして、細胞系としては、iGL 細胞に対してより接着性の高い Insulin-GLase 発現細胞株の樹立を試みる。また、より生理的な遺伝子発現条件でインスリン分泌を発光測定できる解析系の構築を目指す。手法としては、生物発光イメージングによるインスリン分泌動態可視化による解析法を発展させるため、蛍光イメージングとの組み合わせなど、新たな解析法の確立に取り組む。

3. 研究の方法

(1) 臍 細胞株の接着を高めるために汎用されているポリ D リジン、iGL 細胞の親株である INS-1E での報告実績のあるポリ L オルニチン、単離ラット臍島での接着に使用したマトリゲルについて、生物発光イメージング解析ではガラスボトムディッシュ、ルミノメーターを用いた発光測定解析ではマルチウェルプレートにコーティング処理を施し、iGL 細胞を比較的高密度で播種して 1~3 日間培養した後、インスリン分泌の解析を行った。マトリゲルについては、コーティング処理での操作性とイメージングでの焦点の合わせやすさ、およびコストを考慮して、他の細胞で使用実績のある 8 倍希釈した溶液を用いた。

(2) 生物発光イメージング解析は、水冷 EM-CCD カメラを備えた発光顕微鏡システムを用いた。EM-CCD カメラの感度設定を EM ゲイン最大およびフォトンイメージングモード ON (Level 1) とすることでピクセル解像度を維持しながら、グルコース刺激した iGL 細胞からの Insulin-GLase の分泌動態を可視化し、露光時間 500 ms/frame で 20 分間発光ビデオ画像を取得した。このビデオ画像の発光強度変化に基づきグルコース応答性インスリン分泌の周期性を解析した。

(3) ルミノメーターを用いた発光活性測定解析では、各種コーティング処理を行った 12 ウェルプレートに iGL 細胞を播種し、1~3 日間培養した後に、細胞の洗浄を行い、低グルコース条件の KRH バッファーで 1 時間処理した後、再び細胞を洗浄し、低グルコースおよび高グルコースで 1 時間培養し、培養上清に含まれる Insulin-GLase の発光活性をルミノメーターで測定した。このとき、発光基質セレンテラジン添加直後の 0.1 秒あたりの発光最大値を、インスリン分泌量の指標とした。

4. 研究成果

(1) 各種コーティング処理を行ったガラスボトムディッシュ用いて iGL 細胞を高密度で 3 日間培養した結果、ノンコートディッシュと比較して、8 倍希釈したマトリゲルコートディッシュでは、1 日目から細胞が敷石状に広がり、接着性が高いと考えられた。一方、ポリ D リジンは、ロット間で接着性に差があり、細胞毒性が強くなる場合があった。3 日間培養でノンコートおよびポリ D リジンは細胞が集まり始め、7 日間以上の培養では臍島様のスフェロイドが形成され始めた。一方、希釈マトリゲルコートでは 3 日間培養でノンコートディッシュと同様に敷石状に広がる接着が維持された。なお、ポリ L オルニチンコートは接着性および細胞毒性の両面で、iGL 細胞の培養には適さないと考えられる結果となった。

(2) 希釈マトリゲル、ポリ D リジン、またはノンコートのガラスボトムディッシュで iGL 細胞を 3 日間培養して生物発光イメージングを行い、細胞間で同調する周期性インスリン分泌の可視化解析を行った。その結果、希釈マトリゲルのディッシュで、細胞集団で同期するインスリン分泌が最も明確かつ持続的に観察された。このとき、細胞集団内の単一細胞は、臍島から単離したラット初代培養細胞と同様の周期性でインスリン分泌を行うことが示された (図 2)。

(3) 希釈マトリゲルコート、ポリ D リジンコート、またはノンコートのマルチウェルプレートで

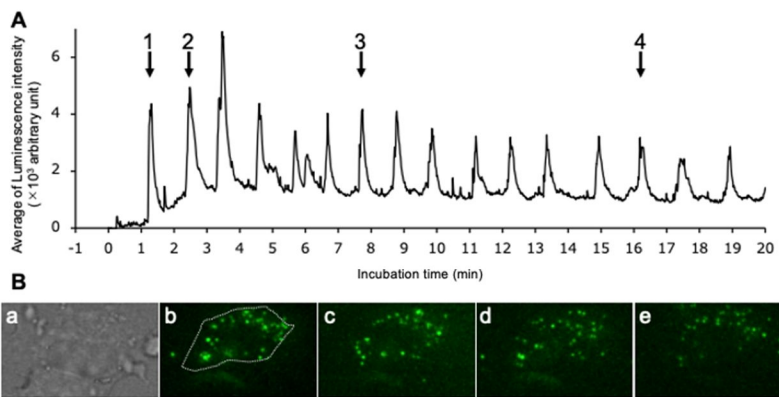


図2. マトリゲルでコーティングしたガラスボトムディッシュで培養した iGL 細胞の単一細胞レベルでの周期性インスリン分泌可視化。A, 発光ビデオ画像における単一細胞領域での発光強度変化。B, a, 明視野画像。b-e, 図Aのピーク1~4を含む10フレーム分の画像から合成した発光最大値画像 (緑に色付け, 分泌部位の分布を示す)。

iGL 細胞を培養し、グルコース応答性インスリン分泌についてルミノメーターを用いた発光活性測定により解析した。その結果、分泌量および応答率の両方について、希釈マトリゲルが最も高い値を示した。一方、ポリ D リジンは、ノンコートよりも分泌量と応答率の両方が低下した。また、希釈マトリゲルでは細胞の接着性が最も高く、細胞洗浄処理において細胞の剥離が最も少なく、洗浄操作が容易であった。

(4) iGL 細胞は、希釈マトリゲルのコーティングで最も良好なグルコース応答性インスリン分泌を示したことから、このコーティング条件で、細胞の洗浄回数、低グルコース処理の濃度、グルコース刺激の濃度依存性、播種細胞数と培養日数の最適化を行った。その結果、低グルコース処理は 0–2 mM、高グルコース処理は 11–20 mM で高い分泌量と応答率を示した。また、播種する細胞数を調整することで、2–3 日間培養で高い応答性を得ることができた。また、低グルコース処理前の細胞洗浄は 0–2 回で応答率に大きな差は無く、低グルコース処理後に高グルコース刺激前に行う細胞洗浄は 2 回で十分であった。

(5) GLase 融合タンパク質を用いた生物発光イメージング法を適用し、インスリン分泌の促進に関わるオステオカルシンについて、骨芽細胞からの分泌動態を可視化した。局所で骨形成を促進する BMP2 と比較して、血中でホルモン様に作用することが知られているオステオカルシンは開口分泌部位から速やかに拡散することを示した (図 3)。なお、BMP2 が開口分泌部位から徐々に拡散するためには、N 末端に存在するヘパラン硫酸結合部位 (塩基性アミノ酸配列) が必要であることを示した。また、発光イメージング法を適用し、神経発達に重要な巨大タンパク質 Reelin と脳由来神経栄養因子 BDNF の分泌動態を解析し、BDNF は脱分極依存性に神経突起から多くの開口分泌起こる一方で、Reelin は脱分極に依存しないで細胞体および神経突起の双方から分泌されることを明らかにした。

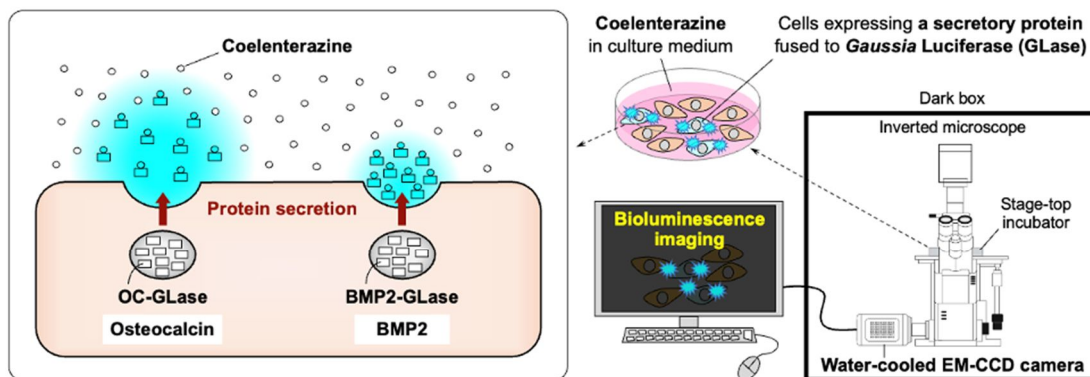


図3. 骨芽細胞から分泌されるオステオカルシン (OC) と骨形成因子BMP2の生物発光イメージング。骨から血中にホルモン様に分泌されインスリン分泌を促進することが知られるOCは分泌部位から速やかに拡散するのに対し、局所で骨形成に作用するBMP2は分泌部位からの拡散性が低いことを示唆した (文献2の Graphical Abstractより引用)。

<引用文献>

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) .

Sugimoto H, Fukuda S, Yokawa S, Hori M, Ninomiya H, Sato T, Miyazawa K, Kawai T, Furuno T, Inouye S, Goto S, Suzuki T: Visualization of osteocalcin and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) secretion from osteoblastic cells by bioluminescence imaging. *Biochem Biophys Res Commun*, 635: 203–209, 2022. (Open Access) .

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 Sugimoto Honami, Fukuda Shinji, Yokawa Satoru, Horii Miki, Ninomiya Hotsuna, Sato Takuma, Miyazawa Ken, Kawai Tatsushi, Furuno Tadahide, Inouye Satoshi, Goto Shigemi, Suzuki Takahiro	4. 巻 635
2. 論文標題 Visualization of osteocalcin and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) secretion from osteoblastic cells by bioluminescence imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 203 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.10.042	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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小早川穂波, 福田信治, 二宮秀菜, 佐藤琢麻, 鈴木崇弘, 宮澤健
2. 発表標題 MC3T3-E1細胞からの骨代謝関連タンパク質の分泌動態解析
3. 学会等名 第65回 近畿東海矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木崇弘
2. 発表標題 タンパク質分泌を可視化する生物発光イメージング法
3. 学会等名 生物発光化学発光研究会 第37回学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田信治, 杉本穂波, 横川慧, 佐藤琢麻, 宮澤健, 古野忠秀, 後藤滋巳, 鈴木崇弘
2. 発表標題 生物発光イメージング法が捉える骨関連因子オステオカルシンとBMP2の分泌動態の違い
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本穂波, 福田信治, 二宮秀菜, 佐藤琢麻, 宮澤健, 鈴木崇弘, 後藤滋巳
2. 発表標題 生物発光イメージング法を用いた骨形成関連タンパク質の分泌動態解析
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本穂波, 福田信治, 佐藤琢麻, 宮澤健, 鈴木崇弘, 後藤滋巳
2. 発表標題 骨芽細胞におけるオステオカルシンとBMP2の開口分泌動態：生物発光イメージング法による可視化
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横川 慧, 福田信治, 古野忠秀, 鈴木崇弘
2. 発表標題 生物発光イメージング法を用いた分泌型タンパク質の可視化解析
3. 学会等名 第19回生命科学研究会
4. 発表年 2022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
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
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 分担者	横川 慧 (Yokawa Satoru) (40804406)	愛知学院大学・薬学部・講師 (33902)	
研究 分担者	古野 忠秀 (Furuno Tadahide) (80254308)	愛知学院大学・薬学部・教授 (33902)	

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