

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K09746

研究課題名(和文) 蛍光ATPプローブ遺伝子ノックインマウスを用いた膵島細胞糖代謝異常の解析

研究課題名(英文) Metabolic and functional analysis of pancreatic islet cells using the fluorescent ATP probe gene knock-in mouse

研究代表者

長嶋 一昭 (NAGASHIMA, KAZUAKI)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40324628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光ATPプローブ遺伝子ノックインマウス膵島を用いて細胞内ATP濃度を、Fura2使用にて細胞内ATPおよびCa²⁺濃度変化を同時測定。同一膵島細胞でも刺激反応性細胞内ATP、Ca²⁺濃度変化が不均一で、膵島内細胞は代謝・機能的に不均一であることが示唆された。膵島細胞を用いた単細胞トランスクリプトーム解析から、細胞間にも遺伝子発現の不均質性があり、インスリン遺伝子、ミトコンドリア代謝関連遺伝子、小胞体ストレス遺伝子、増殖関連遺伝子などの発現にばらつきが観察された。膵部分切除状態下の膵島細胞シングルセルRNAシーケンスにより、経時的に変化する細胞の多様な遺伝子発現が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ATPは細胞内代謝に深く関わる。血糖低下させる唯一のホルモンであるインスリンは膵細胞から分泌され、その機序は代謝説で説明されているが未だ詳細不詳な点が多い。本研究では、細胞内ATP濃度を測定可能な蛍光ATPプローブノックインマウス膵島とCa²⁺インジケータFura2を用いて細胞内代謝変化を代謝・機能的に検討、個々の細胞遺伝子発現も検討し、同じ細胞間でも代謝・機能的にも遺伝子発現的にも不均一であること、膵島内では様々な状態の膵細胞が共存して存在(代謝・機能的にも遺伝子発現的にも不均一な細胞が共存)している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using pancreatic islet cells from fluorescent ATP probe gene knock-in mouse and the fluorescent Ca²⁺ probe Fura-2AM, we have carried out dual measurement of intracellular ATP ([ATP]c) and Ca²⁺ ([Ca]c) concentrations and found that even beta cells in the same islet have different response to the stimuli. Using single-cell transcriptome analysis, we also found heterogeneity among beta cells in gene expressions. These data suggest beta cells in an islet are heterogeneous both functionally and genetically.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵細胞 ATP 不均一性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究開始(2016年)当初の背景:糖尿病発症にはインスリン分泌障害およびインスリン抵抗性の両者が関与する。血糖値恒常性維持のためには、膵細胞インスリン分泌が、分泌量およびタイミングともに適切に調節されることが必須である。グルコース刺激によるインスリン分泌調節機序として代謝説が支持されており、主要な経路としてATP感受性K⁺(K_{ATP})チャネルを介した経路の重要性が認知されている。K_{ATP}チャネルに関する解析については、これまで*in vitro*、*in vivo*ともに多くの解析がなされてきた。当教室の稲垣らが世界に先駆けその分子的基盤を解明し(*Science* 1995)、本申請者らが同チャネル変異遺伝子導入マウスおよび遺伝子欠損マウスを用いてインスリン分泌における重要性を直接証明し(*PNAS*.1997、*PNAS*.1998)、電気生理学的解析で同チャネルの様々な活性調節因子を検証し(*EMBO J.*1999)、経口血糖降下薬の作用機序・薬剤特性の違いに関して検討を行い(*Diabetes Res Clin Pract.*2004)、本邦初のK_{ATP}チャネル構成サブユニットKir6.2(*J Clin Endocrinol Metab.*2005)ならびにSUR1遺伝子異常(*J Diabetes Invest.* 2013)による新生児糖尿病症例の機能解析を行うなど、申請者らは基礎的解析と臨床的展開を意識した研究推進を継続してきた。一方、糖代謝状態を反映する細胞内ATP濃度変化の解析に関しては、従来の測定法では細胞をつぶしたある一時点での定点測定であり、生細胞のままの経時的測定ができず、温度、培養条件、細胞内環境等のわずかな違いで繊細に変化する細胞内代謝変化を解析する上で全く不十分であったため、ATP濃度変化とそれにより活性調節され機能発現するK_{ATP}チャネルの生理的条件下での役割の詳細は未だ検証不十分であることを、これまでの研究経験から強く実感してきた。同時に、同じ膵島細胞(主に細胞)でも各種刺激反応性が均一ではなく、ヘテロな集団であることを実感してきた。これらの研究経過・研究基盤を踏まえ、本申請研究は、膵島細胞内糖代謝の実際と、膵島細胞間での刺激反応性の実際を、評価・検証・解釈することを目的に立案した。

2. 研究の目的

アデノシン三リン酸(ATP)は細胞内代謝および細胞機能調節に深く関わる。膵細胞グルコース刺激によるインスリン分泌調節では、糖代謝・細胞内ATP濃度変化を介した膵細胞K_{ATP}チャネル活性調節がその調節基盤とされている。生理的条件下における膵細胞代謝調節メカニズムの理解には、生細胞における刺激前後の細胞内シグナルの動態観察が必要であるが、従来、細胞内ATP動態を生細胞のまま簡便に、経時的かつリアルタイムで測定できる手法はなかった。本研究は、膵島細胞で使用可能な高K_d値を有する蛍光ATPプローブを基に作成された蛍光ATPプローブ遺伝子ノックインマウス等を用いて生細胞のまま、生理的条件下で、直接的、経時的かつリアルタイムに解析し、様々な摂餌条件および耐糖能状態における細胞内糖代謝と糖代謝異常の病態形成機序との関わりの実際と、細胞間での刺激に対する反応性の実際を解析・検証することを目的とする。

3. 研究の方法

ATP合成酵素サブユニットタンパク質両端にcyan fluorescent protein(CFP)変異体のmseCFPとyellow fluorescent protein(YFP)変異体monomeric(A206K)Venus(改変mVenus)を遺伝子工学的に連結させた蛍光ATPプローブ(ATeam3.10および1.03;解離定数(K_d)7.4μMおよび1.2mM)(*Proc Nat Acad Sci USA*, 2009)を基に膵島細胞解析用に改良した、より高い

Kd 値を有する ATP プローブ (GO-ATeam ; Kd 値 3.6mM) 遺伝子を用いて作成された蛍光 ATP プローブ遺伝子ノックインマウスを用いて、体重、耐糖能、グルコース刺激によるインスリン分泌能 (in vivo)、単離膵島インスリン分泌能、膵島細胞および分散膵島細胞における [ATP]c 動態、[Ca²⁺]c 動態を経時的並列測定する。各蛍光イオンプローブ (Fura2-AM、SBFI-AM、MQAE-AM、BCECF-AM 等) を用い、各々対応する励起および蛍光波長フィルターにて並列測定する (細胞内 Ca²⁺濃度測定では Fura2-AM を用いた励起波長 340nm/380nm、蛍光波長 510nm の二波長励起一波長測光、Na⁺濃度測定では SBFI-AM 使用、励起波長 340/380nm、蛍光波長 510nm、Cl⁻濃度測定では MQAE-AM 使用、励起波長 355nm、蛍光波長 460nm、H⁺濃度測定では BCECF-AM 使用、励起波長 450/500nm、蛍光 535nm)。また、膵細胞のインスリン分泌調節で細胞内 ATP 濃度変化と同様に重要な観察対象である、K_{ATP} チャネル活性・特性、細胞膜電位等の測定を行う。[Ca²⁺]c は、VDCC 経由の細胞外からの Ca²⁺流入に加えて小胞体など細胞内 Ca²⁺貯蔵器官からの Ca²⁺放出の総計であり、[Ca²⁺]c と VDCC 両者を検討することでより詳細な細胞内 Ca²⁺濃度動態変化の機序が明らかとなる。単位膜面積あたりのイオン電流密度の評価の際は、単一細胞膜容量測定 (Capacitance measurement) 併用により評価する (PNAS.1998)。K_{ATP} チャネル活性・特性はパッチクランプ single channel mode および whole-cell mode、細胞膜電位は同 whole-cell mode、VDCC 活性・特性は whole-cell mode (AXOPATCH 200B; Axon Instruments, EPC-9; HEKA Elektronik) にて行なう。

4 . 研究成果

細胞内 ATP 濃度変化を、生理的状態のまま、リアルタイムに測定することは、細胞の代謝動態を評価する上で非常に重要であるが、これまで細胞内 ATP 濃度変化を生理学的条件化下で測定する際の適したツールがなかった。我々は、ATP 濃度によって OFP/GFP 比が変化する FRET である GO-ATeam1 を導入したノックインマウスを用いて、野生型マウスとの比較で耐糖能および細胞機能に差がないことを確認した上で、単離細胞に Ca²⁺インジケータである fura-2AM を導入し、細胞内 Ca²⁺と ATP 濃度動態の同時測定を行い、先行する OFP/GFP 比、すなわち細胞内 ATP 濃度の上昇とそれより遅れて細胞内 Ca 濃度上昇することを確認した。さらに生体内の膵島における膵島細胞 (細胞) の不均一性に着目し、細胞内 ATP 動態および細胞内 Ca²⁺動態の反応性のばらつきについて検討した。検討過程で得られた結果 ; Ateam 発現マウス由来の単離膵島を用いて細胞内代謝に関する細胞の不均一性に関して学会発表を行った (AASD : Usui R et al. 2017)。また、膵島細胞を用いた単細胞トランスクリプトーム解析から、同じ膵細胞であっても細胞間で遺伝子発現の不均質性があり、インスリン遺伝子、ミトコンドリア代謝関連遺伝子、小胞体ストレス遺伝子および増殖関連遺伝子などの発現にばらつきが観察され、これらは刺激によって動的に変化しえるとの結果を得た。また、膵島にとって激しい刺激となる膵部分切除状態において、膵島内細胞に対して 1 細胞レベルで遺伝子発現を解析できるシングルセル RNA シークエンスにより、上記刺激下での遺伝子発現の経時的に変化する多様な不均一性について検討した。以上から、膵島内の細胞は、代謝・機能的にも遺伝子発現的にも不均一であること、様々な状態の細胞が膵島内に共存している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Usui R, Yabe D, Fauzi M, Goto H, Botagarova A, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Kobayashi S, Manabe T, Baba Y, Kurosaki T, Herrera PL, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N	4. 巻 9
2. 論文標題 GPR40 activation initiates store-operated Ca ²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β -cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52048-1	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 該当する

1. 著者名 Tatsuoka H, Sakamoto S, Yabe D, Kabai R, Kato U, Okumura T, Botagarova A, Tokumoto S, Usui R, Ogura M, Nagashima K, Mukai E, Fujitani Y, Watanabe A, Inagaki N	4. 巻 23
2. 論文標題 Single-Cell Transcriptome Analysis Dissects the Replicating Process of Pancreatic Beta Cells in Partial Pancreatectomy Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101774	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 該当する

1. 著者名 Nagashima K, Tanaka D, Inagaki N	4. 巻 59
2. 論文標題 Epidemiology, clinical characteristics, and genetic etiology of neonatal diabetes in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 129-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.13199	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Usui R, Yabe D, Fauzi M, Goto H, Botagarova A, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Kobayashi S, Manabe T, Baba Y, Kurosaki T, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N
2. 発表標題 Store-operated Ca ²⁺ entry activated by STIM1 plays an essential role in GPR40-mediated GLIS potentiation
3. 学会等名 American Diabetes Association the 79th Scientific Sessions（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Usui R, Yabe D, Goto H, Fauzi M, Botagarova A, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N
2. 発表標題	ER Ca ²⁺ sensor, stromal interaction molecule 1 (STIM1) plays an important role in GPR40-mediated potentiation of glucose-induced insulin secretion.
3. 学会等名	Asian Islet Biology and Incretin 2018 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Usui R, Yabe D, Goto H, Fauzi M, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N
2. 発表標題	The role of ER Ca ²⁺ -sensor, stromal interaction molecule 1 (STIM1) in GPR40-mediated potentiation of glucose-induced insulin secretion.
3. 学会等名	54th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Usui R, Yabe D, Fauzi M, Tokumoto S, Tatsuoka H, Tahara Y, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N.
2. 発表標題	ATP and Ca ²⁺ dynamics in pancreatic β -cells: Ex vivo analysis using ATP biosensor GO-ATeam1
3. 学会等名	The 9th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (AASD) (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Tatsuoka H, Nakamura M, Yabe D, Usui R, Muhammad F, Tokumoto S, Tahara Y, Ogura M, Nagashima K, Watanabe A, Inagaki N
2. 発表標題	Genetic and epigenetic programs for regenerating pancreatic beta-cells following partial pancreatectomy in mice
3. 学会等名	Kyoto Diabetes Mini-Symposium: Beta Cell Replacement Strategies. (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名 杉崎 和, 山本正道, 龍岡久登, 白井亮太, 今村博臣, 田原裕美子, 小倉かさね, 佐藤広規, 佐藤雄一, 小倉雅仁, 長嶋一昭, 稲垣暢也.
2. 発表標題 蛍光ATPプローブ遺伝子ノックインマウスを用いた膵 細胞内代謝解析
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 佐藤広規、長嶋一昭、小倉雅仁、佐藤雄一、田原裕美子、小倉かさね、山野 言、杉崎 和、藤田直尚、龍岡久登、白井亮太、向 英里、藤本新平、稲垣暢也
2. 発表標題 Srcは膵 細胞グルコキナーゼ細胞内局在変化を介してグルコース代謝およびインスリン分泌調節に関与する
3. 学会等名 第59回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 白井亮太、矢部大介、Fauzi Muhammad、Botagarova Ainur、後藤久典、徳本信介、龍岡久登、田原裕美子、小林静香、真鍋俊也、黒崎知博、Pedro Luis Herrera、小倉雅仁、長嶋一昭、稲垣暢也
2. 発表標題 膵 細胞におけるGPR40シグナルに注目したストア依存性カルシウム流入の意義の解明
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Usui R, Yabe D, Goto H, Fauzi M, Otani D, Botagarova A, Tokumoto S, Tatsuoka H, Ogura M, Nagashima K, Inagaki N
2. 発表標題 IP3R/STIM1/Orai1 pathway plays an important role in GPR40-mediated potentiation of glucose-induced insulin secretion
3. 学会等名 International Diabetes Federation 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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