

機関番号：13802  
 研究種目：基盤研究C  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590208  
 研究課題名（和文）膵β細胞におけるインスリン分泌シグナル及び分泌に及ぼす温度及び形態因子の影響  
 研究課題名（英文）The effect of temperature and morphology on insulin secreting signal and insulin secretion in insulin secreting cells  
 研究代表者  
 最上秀夫（Hideo Mogami）  
 浜松医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：90311604

研究成果の概要（和文）：インスリン分泌における温度因子と形態因子がインスリン分泌に密接に関連していることが、3次元β細胞塊における TRPM2 及び Cx36 knockdown 実験において明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The effect of temperature and morphology on insulin secretion has been shown using either TRPM2 or Cx36 knockdown pseudoislets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：膵β細胞、細胞内情報伝達、インスリン、生体温度、形態

#### 1. 研究開始当初の背景

膵β細胞からのインスリン分泌を刺激する物質は、消化管ホルモン、神経伝達物質、薬剤など種々存在するが、中でも栄養素であるグルコース及びアミノ酸は単独で最大分泌刺激となりうる事が知られている。特にグルコースによるインスリン分泌刺激様式は惹起（triggering）と増強（augmentation）という二つの概念で捉えられ、これは膵灌流や遊離ラ氏島でのペリフェーション系で観察される高濃度グルコース刺激による二相性インスリン分泌の第一相（急速に増加していったん減少する-triggering）と第二相（再びゆっくり増加し刺激が続く限り持続する-augmentation）に相当すると考えられている。インスリン分泌のtriggeringは、グルコース刺激のみならず、脱分極刺激、スルホニ

ルウレア（SU）剤などの薬剤で再現でき、細胞内カルシウム濃度（ $[Ca^{2+}]_i$ ）の増加に依存した現象として説明できる。これに対し、augmentationはいったん惹起されたインスリン分泌を増強する機構で、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化とは解離しており、 $[Ca^{2+}]_i$ が増加した状態でさらに $Ca^{2+}$ の作用を増強するようなメカニズムが関与していると推察される。しかしながら、依然としてグルコースやアミノ酸刺激による二相性インスリン分泌の詳細なメカニズムは不明である。これまでインスリン分泌シグナルの研究は単層の単一細胞レベルで室温または $37^{\circ}C$ にて行われてきた。一方、インスリン分泌様式研究は三次元細胞塊を形成した膵灌流や遊離ラ氏島でのペリフェーション実験系を用いて $37^{\circ}C$ 、 $5\%CO_2$ 条件下にて行われている。互いに異なる形態や方法論

を用いて研究が進められているため、分泌シグナルと分泌を直接関連させて説明できないこともその要因の一つである。近年、分泌第二相におけるcAMP介したATP感受性K<sup>+</sup>チャネル非依存性メカニズムが提唱されており、Holzらは、以前にそのメカニズムの一つとしてチャネルの同定にまで至っていないがGLP-1によるcAMP及びCa<sup>2+</sup>調節性の陽イオンチャネルの活性化を報告している(J. Biol. Chem 270:177749-57,1995)。また、cADPriboseはカルシウム動員作用を持ち、NADからの生成酵素であるCD38も膵β細胞膜に存在する(Takasawa et. al. Science:259 370-373,1993)ことから、一旦は重要なインスリン分泌シグナルとして注目されていたが実験の再現性の点でその存在が疑問視されていた。ところが、最近、富永らはラ氏島膵β細胞に存在するTRPM2 チャネルが温度依存性(35-37°C)を持ちかつcADPriboseにより相乗的に調節されて最大開口確立となるCa<sup>2+</sup>透過性陽イオンチャネルであることを報告した(EMBO J 25:1804-15,2006)。以上の事実を考えると合わせると、温度依存性cADPribose作動性TRPM2 チャネルは分泌第二相におけるATP感受性K<sup>+</sup>チャネル非依存性メカニズムの分子実態の一つとして考えられる。また、申請者らが、インスリン産生細胞株やラット膵β細胞においてライブセルイメージングの手法を用いてインスリン分泌シグナルに関してこれまでに得た知見とラットのラ氏島インスリン分泌実験の結果から、膵β細胞における高濃度グルコース刺激によって少なくとも1) Ca<sup>2+</sup>、DAG(Diacylglycerol)、及びcAMPが惹起されることがインスリン分泌第二相の形成に必要である。2) 更にインスリン開口胞出時における細胞膜近傍でのこれら分泌シグナルの変化、特に細胞膜近傍のCa<sup>2+</sup>変化が重要であり、またisoform選択的なPKC活性化も鍵となると考えている(J. Biol. Chem. 278:9896-9904, 2003, J Physiol 561: 133-147, 2004, J. Biol. Chem. 281: 28499 - 28507,2006)。生体では膵β細胞はギャップ結合(connexin36)にて細胞同士が連絡した状態で三次元細胞塊を形成してラ氏島の中心部に存在する。このような形態形成がグルコースによるインスリン分泌シグナル及び分泌機能に重要であろうことは想像に難くない。そこで、上記観察事実からグルコースをはじめとした栄養素による二相性インスリン分泌メカニズムの詳細な解明を目指すには、複数のパラメータを考慮して少なくとも以下の3点を実現できる実験系が必要であるとの着想に至った。1) まず、温度要因を加味した37°C、5%CO<sub>2</sub>の培養環境下であること。2) 次に三次元細胞塊を形成したインスリン産生細胞株を用いる。pseudoisletを実験

に用いることは、単層単一細胞群より形態的にも機能的にも本来のラ氏島中の膵β細胞群に近く、しかもラ氏島の他の細胞の影響を除外できる利点持っている。従来からのインスリン産生β細胞株は培養条件下では単層で存在するよりも、三次元細胞塊を形成することにより細胞間交通の役目を果たすギャップ結合が形成され情報伝達同期性が増加しインスリン分泌におけるグルコース反応性も高まるという報告がある(Diabetes 48:1402-1408,1999; Endocrinology 145:667-678,2006)。

従って、単層細胞集団ではなく形態的にも機能的にも本来のラ氏島の中の膵β細胞群に近いpseudoisletにて分泌シグナルと分泌の両者を測定できること。さらに3) インスリン分泌には、複数の情報伝達系が関与しており同時に複数の情報伝達シグナルの時空間変化を検討できること。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上記実験条件を実現した上で高濃度グルコース刺激によるインスリン分泌シグナルと分泌の両者に分泌モジュレーターとしての温度因子と形態因子とがどのように関係しているかを解析することにある。

## 3. 研究の方法

グルコース反応性の高いインスリン産生細胞でCx36を発現しているMin6細胞をモデル細胞として以下を検討する(Diabetes 52:417-424, 2003)。

①室温及び培養条件下で単層細胞群と偽ラ氏島形態において高濃度グルコース刺激によりインスリン分泌シグナルのセカンドメッセンジャーであるCa<sup>2+</sup>、DAG(Diacylglycerol)、及びcAMPが惹起されるかどうか。

②これらシグナルパターン及びインスリン分泌は温度及び形態因子により違いがあるかどうかを検討する。

**蛍光プローブ:**【Ca<sup>2+</sup>センサ】細胞内カルシウム濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) モニタのために、Ca<sup>2+</sup>感受性色素fura-2 またはCa<sup>2+</sup>感受性蛍光タンパクであるyellow cameleon (YC)3.6を用いる。(理研宮脇博士より供与)【cAMPセンサ】exchange protein directly activated by cAMP(epac)のcAMP binding domainの両端にCFPとYFPを融合させたタンパクを用いる(epac-camps; Würzburg大学Lohse博士より供与)。このcAMPセンサはcAMP結合時にCFPとYFPの分子内FRET(fluorescence resonance energy transfer)が解消し両者の蛍光強度変化を惹起する(J. Biol. Chem 279:37215-37218)。

**【DAGセンサ】** PKCγのDAG binding C1 domainとmRFP(C1-mRFP) またはPKCの基質であるmyristoylatedalanine-rich C kinase substrate (MARCKS) -GFPを用いる。

**装置及び測定:** 単層細胞群: 単層細胞群において同時に3つのセカンドメッセンジャーを測定するために我々の開発した低倍の対物レン

ズを用いたプリズム式全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いる。

#### 4. 研究成果

インスリン産生細胞にはTRPM2チャンネルが機能的にも発現していることを電気生理学的に確認した。TRPM2チャンネルノックダウン細胞では、温度依存的に増大するカルシウム応答が消失した。3次元細胞塊を形成させたTRPM2チャンネルノックダウン細胞を用いた実験においてもやはりカルシウム応答は消失した。Cx36をノックダウン細胞塊ではカルシウム応答の同期性の同期性が消失した。この細胞塊を用いたインスリン分泌も有意に減少した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

**1.** Eisuke Adachi, Yutaka Kazoe, Yohei Sato, Yuko Suzuki, Tetsumei Urano, Takehiko Ueyama, Naoaki Saito, Viacheslav O. Nikolaev, Martin J. Lohse, Makoto Tominaga, Hideo Mogami

A technique for monitoring multiple signals with a combination of prism-based total internal reflection fluorescence microscopy and epifluorescence microscopy.

Pflüger Archives-European Journal of Physiology 459: 227-234, 2009 査読あり

**2.** Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, Lohse, M J, Shigemura N, Ninomiya, Y, Kojima I (2009). Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. PLoS ONE 4: e5160 査読あり

**3.** Suzuki Y, Mogami H, Ihara H and Urano T(2009)

Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells. Blood 113: 470-8 査読あり

**4.** Hayashi T, Mogami H, Murakami Y, Nakamura T, Kanayama N, Konno H and Urano T.(2008)

Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo.

Pflüger Archives-Eur J Physiol. 456: 1239-51 査読あり

[学会発表] (計3件)

Mogami H

Secretagogue-induced multiple signal interconnections in insulin secreting cells. 14<sup>th</sup> International congress of endocrinology, Kyoto, Japan 2010.3

Mogami H

Secretagogue-induced multiple signal interconnections in insulin secreting cells. 36<sup>th</sup> International congress of physiological science, Kyoto, Japan 2009.7

Mogami H

Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo Frontiers of Biological Imaging, 39<sup>th</sup> NIPS International Symposium & 7<sup>th</sup> OIB Symposium, Okazaki, Japan, 2008.9

[図書] (計2件)

1. 浦野哲盟、鈴木優子、林 忠毅、最上秀夫 技術講座「生体内リアルタイムイメージングによる血栓形成過程の解析」血栓止血誌19巻6号 2008
2. 浦野哲盟、鈴木優子、井原勇人、最上秀夫 血液及び血管内皮からみた血栓症リスク 血栓止血誌19巻4号 419-494 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計1件)

名称：Microscopic cell observation and inspection system using a plurality of observation methods  
発明者：Hideo Mogami, Yutaka Kazoe, Yohei Sato  
権利者：National University Corporation Hamamatsu University School of Medicine, Keio University  
種類：US Patent  
番号：No.US 7,706,060 B2  
登録年月日：Apr. 27, 2010  
国内外の別：USA

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

最上秀夫 (Hideo Mogami)

研究者番号 : 90311604

(2) 研究分担者

寺川 進 (Susumu Terakawa)

研究者番号 : 50014246

櫻井 孝司 (Takashi Sakurai)

研究者番号 : 50283362

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :