

令和 5 年 5 月 22 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：20H03430

研究課題名(和文) 膵細胞活動を生体内で可視化する新規指標を用いた2型糖尿病治療戦略基盤の探索

研究課題名(英文) Basis of treatment strategy for type 2 diabetes using new indices obtained by visualization of pancreatic beta cell activities in vivo

研究代表者

飯野 正光 (IINO, Masamitsu)

日本大学・医学部・上席研究員

研究者番号：50133939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：インスリンは血糖値を低下させる唯一のホルモンとして膵細胞から分泌され、インスリン分泌の破綻は糖尿病の原因となる。しかし、膵細胞からのインスリン分泌が生体内でどのように制御され、病態によってどのように変化するかについてはまだ不明のことが多い。本研究により膵細胞におけるグルコース濃度に依存した細胞内Ca²⁺動態に関して新たな視点からの知見が得られ、ミトコンドリアや小胞体が細胞機能へ関与することが示唆されるとともに、膵細胞の活動を生体内で目の当たりにする新たな可視化法が確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、インスリン分泌が膵細胞内のCa²⁺濃度によって制御されていることを利用し、全く新たな視点から研究が進められた。膵細胞のCa²⁺動態には非常に複雑な機構が関与しているが、それを読み解くための細胞内小器官のCa²⁺動態を解析する新たな研究方法と、生体内における活動を目の当たりにする新たな可視化法が確立された。このような成果は、今後の研究発展を著しく促進し、糖尿病発症における膵細胞の機能変化に新たな光を投げかけるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Insulin is secreted from pancreatic cells as the only hormone that lowers blood glucose levels, and disruption of insulin secretion is a cause of diabetes. However, it is still unclear how insulin secretion from pancreatic cells is regulated in vivo and how it is altered by pathological conditions. This study provides new insights into glucose concentration-dependent intracellular Ca²⁺ dynamics in pancreatic cells, suggests that mitochondria and endoplasmic reticulum are involved in cell function, and establishes a new visualization method to witness pancreatic cell activity in vivo.

研究分野：薬理学

キーワード：カルシウム 膵細胞 インスリン イメージング

1. 研究開始当初の背景

膵内分泌腺細胞の多数を占める膵細胞は、血中グルコース濃度に依存して Ca^{2+} シグナルを発生し、インスリンを開口放出する。細胞レベルの膵細胞研究により、細胞内 Ca^{2+} 濃度は周期的に増減し、その基盤として細胞膜が脱分極と再分極を周期的に繰り返すことが定説とされている。インスリンは、血糖値を低下させる唯一のホルモンであり、膵から周期的に分泌されることが報告されているがその機序は明らかになっていない。また、インスリン分泌機構の破綻は2型糖尿病の発症に至るがその機構も明らかでない。

膵細胞は、細胞、細胞などととも直径 100 μm ほどの膵島と呼ばれる集合体を作る。膵外分泌腺組織中には多数の膵島が離散的に分布している(マウスで 1,100 個程度、ヒトでは約 100 万個)(**図 1**)。各膵島内で細胞同士はギャップジャンクションを作って電気的に結合していると考えられているので、膵島ごとに細胞が同期して周期的 Ca^{2+} シグナルを形成し、インスリンを周期的に分泌すると予想される。血中インスリン濃度が周期的に増減するためには、膵島の大部分が同期してインスリンを分泌しなければならない。しかしながら、各膵島間には数百ミクロンの距離があり、直接の接触がないことから、何らかの同調機構の存在を想定しなければならないが、謎として残されている。そもそも、膵島同士が同期して Ca^{2+} シグナルを発生するかについては明確な検証が行われていない。このように、生体内における膵細胞からのインスリン分泌制御機構の全貌は明らかになっていない。

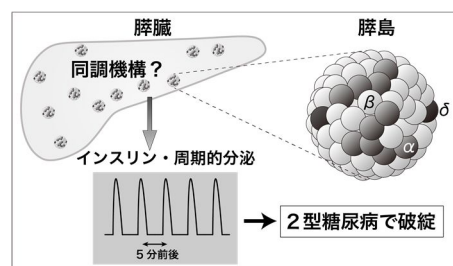


図 1 膵臓と膵島の関係

2. 研究の目的

膵細胞の生体内における活動を明らかにすることは、薬物標的としての膵細胞の機能を明らかにすることに加えて、2型糖尿病の病態を明らかにする上で重要である。本研究では、研究代表者らがこれまでの Ca^{2+} シグナル研究で開発してきたツール群を応用することにより、膵細胞の Ca^{2+} シグナルを生体内で観測する新たな研究法を確立する。また、膵島間の同期性に関与する候補分子を、細胞レベルの研究により抽出する。この二つのアプローチを組み合わせることでインスリン分泌の周期性およびその破綻の謎に挑戦するとともに、糖尿病発症機転との関連を追究した。

3. 研究の方法

(1) 同期機構の細胞・分子レベルの解析 膵島間の同期性を制御する因子を検索するため、培養細胞 MIN6 及びマウス膵島標本を用いて細胞レベルの解析を行った。細胞質、小胞体内腔、及びミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 濃度を、それぞれ R-GECO1、GCEPIA1er、及び CEPIA2mt を、レンチウイルスベクターを用いて発現させ測定した。蛍光膜電位センサー ArcLightA242 も同様に発現させて膜電位測定を行った。また、同期性に関与すると考えられる候補分子について shRNA を用いたノックダウンを行い解析した。

(2) 生体内膵島 Ca^{2+} イメージング法の確立 全組織・全細胞に組み込んだ 2 波長型高感度 Ca^{2+} インドikator タンパク質 (YC-Nano50) 遺伝子を、細胞のみで発現誘導する遺伝子改変マウスを用いた。マウスを全身麻酔下に開腹し、膵を腹腔内から引き出した状態で蛍光実体顕微鏡観察を行った。これとは別に、腹壁にガラス窓を設置することにより、無麻酔・覚醒条件下に膵島観

察を可能とするイメージング法も開発した。いずれの場合も、436 nm の励起光を膵組織に照射し、2 波長 (480 nm 及び 535 nm) の蛍光画像を、CCD カメラを用いて経時的に取得した。膵は、呼吸運動、蠕動運動などにより刻々位置が変化するが、YC-Nano50 の 2 波長の蛍光強度比をとることにより、ムーブメントによる影響はキャンセルした。

(3) 顕微鏡視野内にある複数の生体内膵島の Ca^{2+} 濃度変化を同時測定し、各膵島における周期的変化に関する解析を実施した。

(4) 細胞特異的に YC-Nano50 あるいは G-CEPIA1er を発現するトランスジェニックマウスの膵臓から単離膵島標本を作製し、ガラスボトムディッシュに付着させて蛍光 Ca^{2+} イメージングを行った。

4. 研究成果

膵細胞が高グルコース中で周期的 Ca^{2+} 濃度上昇を発生している時に、ムスカリン受容体のパルス状刺激を与えると、一過性の Ca^{2+} 濃度低下が見られることを見出している。これが膵島間の同期性シグナルの基盤となる可能性が考えられたのでメカニズムを追究した。この一過性 Ca^{2+} 濃度低下にともなって、ムスカリン受容体刺激に伴う小胞体からの Ca^{2+} 放出が生じていることが MIN6 細胞を用いた小胞体内腔 Ca^{2+} イメージングにより確認され、 Ca^{2+} 放出量を上回る細胞外への Ca^{2+} の汲み出しが起きていることが示唆された。この現象が、膵島標本でも起きているのかを確認するために、細胞特異的に YC-Nano50 あるいは G-CEPIA1er を発現するトランスジェニックマウスから単離膵島標本を作製して細胞レベルの解析を行った。MIN6 細胞で観察された結果と同様に、膵島標本においてもムスカリン受容体刺激に伴い細胞内 Ca^{2+} 動員が起きているのに関わらず、細胞質の Ca^{2+} 濃度が一過性に低下することが明らかになった。この興味深い現象のメカニズムを探るために、細胞特異的な発現が知られる陽イオンチャネル 1 種を候補分子とし、これを shRNA によりノックダウンした MIN6 細胞を作製した。この MIN6 では、ムスカリン受容体のパルス状刺激に応答した細胞質 Ca^{2+} 濃度の一過性低下がみられなくなり、むしろ Ca^{2+} の濃度の増加が見られるようになった。一方、この状態でも小胞体からの Ca^{2+} 放出に大きな変化はなかった。また、ノックダウン MIN6 細胞における膜電位イメージングでは、ムスカリン受容体パルス状刺激によって惹起される膜電位の過分極が見られず、むしろ強く脱分極した。これらの結果は、ムスカリン受容体刺激に伴う一過性 Ca^{2+} 濃度低下の分子基盤解明に迫る重要な知見である。

細胞の周期的脱分極にミトコンドリアにおける ATP 産生が関与しており、かつ ATP 産生能がミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 濃度の影響を受けることが知られているので、ミトコンドリア内の Ca^{2+} 濃度変化についてマウス膵島標本および MIN6 細胞を用いて解析を進めた。その結果、周期的な細胞質の Ca^{2+} 濃度変化に対して、ミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 濃度変化は限定的であり、ミトコンドリア関連分子のノックダウンによりミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 濃度変化幅が大きく増大した (図 2) ことからミト

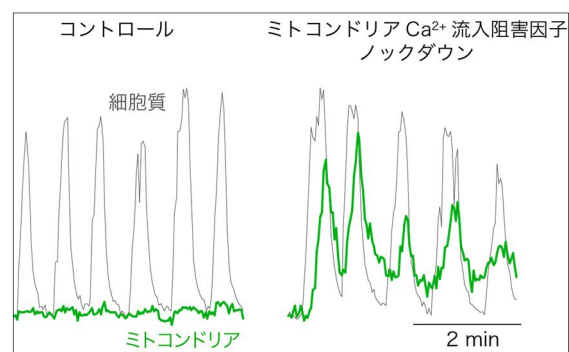


図 2 CEPIAmt を用いた細胞内ミトコンドリア内腔の Ca^{2+} 動態解析により、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入の阻害分子を見出した (マウス単離膵島内細胞)。

コンドリアへの Ca^{2+} 流入がこの分子により強く抑制されていることが示唆された。さらにこの分子のノックダウンにより細胞死が起りやすい傾向が観察されたので、生理的意義についてこの分子の細胞特異的ノックアウトマウスを用いた追究を進めている。

2波長型高感度Ca²⁺インジケータタンパク質(YC-Nano50)遺伝子を、細胞のみで発現する遺伝子改変マウスを用い、麻酔後開腹した生体内Ca²⁺イメージングにより、膵島内の細胞のCa²⁺シグナルの実測に成功した。これにより、単一膵島中では細胞同士が同期したCa²⁺シグナルを示すことを確認した。

さらに、複数の膵島の同時生体内Ca²⁺イメージングに挑戦して成功した。その結果、Ca²⁺濃度の周期的変化は麻酔薬の種類によって大きく影響を受けることが判明した。そこで、無麻酔・覚醒下条件での測定を実施できるようにするため、手術法と光路系の改良に取り組み、腹壁に設置したガラス窓を介して複数の膵島のCa²⁺濃度変化を同時測定することに成功した。これにより、各膵島における周期的変化を、全身麻酔を行わない状態で解析できるようになった。このような解析の結果、条件によっては同期性を示唆する結果が得られた(図3、論文準備中)。

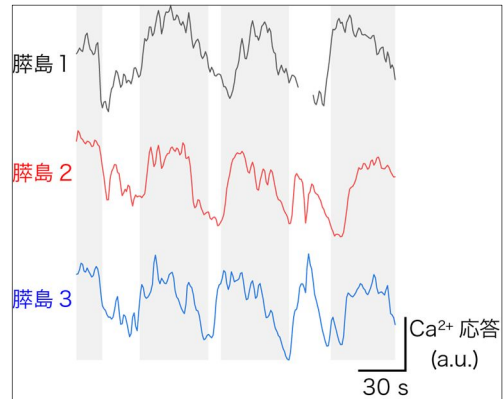


図3 生体内Ca²⁺イメージングにより測定された膵島のCa²⁺応答(覚醒時)条件により、ほぼ同期したCa²⁺濃度上昇がみられる。

研究成果の国内外の位置付け・インパクト、予期しなかった展開、今後の展望など膵組織は腹腔内に存在し、拍動のほか呼吸運動や蠕動運動などの影響により観察中の細胞の動き(ムーブメント)が生じるため、生体内Ca²⁺イメージングは困難であった。本研究では、研究代表者らが開発してきた細胞特異的2波長Ca²⁺インジケータを発現する遺伝子改変マウスを用いることにより、ムーブメントの影響を排除して細胞の生体内Ca²⁺イメージングに挑戦して成功した。その結果、全身麻酔により細胞のCa²⁺シグナルが非常に強く影響を受けるという予想外のことが判明した。この問題を回避するため、腹壁に設置したガラス窓を介して無麻酔・覚醒下の条件で膵細胞の生体内Ca²⁺イメージングに世界で初めて成功した。これは当初の計画を超える画期的な成果であると考えており、今後の細胞研究に大きなインパクトを与えるものと考えている。また、膵島の周期的活動制御に細胞内小器官の関与を示唆する結果を得たとともに、その分子機構解明の手がかりが得られたことも、今後の発展につながる大きな成果であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Zampese Enrico, Wokosin David L., Gonzalez-Rodriguez Patricia, Guzman Jaime N., Tkatch Tatiana, Kondapalli Jyothisri, Surmeier William C., D' Alessandro Karis B., De Stefani Diego, Rizzuto Rosario, Iino Masamitsu, Molkenin Jeffery D., Chandel Navdeep S., Schumacker Paul T., Surmeier D. James	4. 巻 8
2. 論文標題 Ca ²⁺ channels couple spiking to mitochondrial metabolism in substantia nigra dopaminergic neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abp8701	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 Kurebayashi Nagomi, Murayama Takashi, Ota Ryosaku, Suzuki Junji, Kanemaru Kazunori, Kobayashi Takuya, Ohno Seiko, Horie Minoru, Iino Masamitsu, Yamashita Fumiyoshi, 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 Kitajima N, Takikawa K, Sekiya H, Asanuma D, Sakamoto H, Namiki S, Iino M, Hirose K.	4. 巻 11
2. 論文標題 In vivo Fluorescence Imaging of Extracellular ATP in the Mouse Cerebral Cortex with a Hybrid-type Optical Sensor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio Protoc.	6. 最初と最後の頁 e4046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.4046.	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 Kitajima Nami, Takikawa Kenji, Sekiya Hiroshi, Satoh Kaname, Asanuma Daisuke, Sakamoto Hirokazu, Takahashi Shodai, Hanaoka Kenjiro, Urano Yasuteru, Namiki Shigeyuki, Iino Masamitsu, Hirose Kenzo	4. 巻 9
2. 論文標題 Real-time in vivo imaging of extracellular ATP in the brain with a hybrid-type fluorescent sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e57544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.57544	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 Okubo Yohei, Iino Masamitsu, Hirose Kenzo	4. 巻 522
2. 論文標題 Store-operated Ca ²⁺ entry-dependent Ca ²⁺ refilling in the endoplasmic reticulum in astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1003 ~ 1008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.006	査読の有無 有
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18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
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 飯野 正光
2. 発表標題 可視化で探るカルシウムシグナル
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 (招待講演)
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 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 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 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膵島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 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、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 Kanemaru K, Taiko I, Iino M
2. 発表標題 In vivo imaging analysis of Ca ²⁺ signaling in pancreatic β -cells with transgenic mice expressing ratiometric Ca ²⁺ indicator
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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	金丸 和典 (KANEMARU Kazunori) (10456105)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	

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