

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790922

研究課題名(和文)三次元画像解析技術を用いた新生膵島の解析

研究課題名(英文)Analysis of nascent islets using a three dimensional imaging method

研究代表者

藤本 裕之(Fujimoto, Hiroyuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50437274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：Optical projection tomographyを用いて、マウスの膵臓内の膵島および新生膵島、膵管、血管を三次元的に画像解析するため技術の確立を目指した。膵島・血管についてOPTで三次元画像構築ができた。また、新生膵島を簡便に観察するために膵島特異的にルシフェラーゼを発現するマウスより単離した膵島をマウス虹彩上に移植した。その結果、移植膵島数依存的にルシフェラーゼからのシグナルを得た。次に移植膵島の新生・増殖の評価系確立のためにGLP-1受容体作動薬を2週間投与し膵島由来のルシフェラーゼ発光の増加傾向を認めた。よって、新生膵島を観察するために新たな方法の一つを確立できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is an establishment of technique to analyze the new islets, pancreatic duct, and blood vessel in pancreas of mouse three-dimensionally using an Optical Projection Tomography (OPT). Islets and blood vessel in pancreas could be constructed three-dimensionally by OPT. And the islets transplantation onto iris of mouse which expressed luciferase protein in islets was occurred to easily observe the nascent islets. The transplanted islets were observed and analyzed by stereomicroscope or IVIS system. As a result, the transplanted islets could be observed and the luciferase activity from islets was evaluated dose dependent manner. Next, agonist for GLP-1 receptor was used for evaluating the nascent islets from transplanted islets. Two weeks injections induce the tendency of increase of luciferase activity derived from transplanted islets which include the nascent islets. Therefore, this method has a possibility to observe and evaluate the nascent islets.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常 膵臓イメージング

1. 研究開始当初の背景

1型糖尿病は、膵細胞が選択的に障害され、膵島が枯渇する糖尿病である。強化インスリン療法によっても良好なコントロールが困難であり、合併症の進行により医療経済上も大きな問題となっている。また、2型糖尿病においても、現在、日本における患者数は、推定890万人を超え、近年その増加は世界的にも深刻な状況にある（厚生労働省）。この2型糖尿病においても、耐糖能障害出現段階ですでに膵島は減少していること、そして、膵島量の減少により治療抵抗性となる可能性が指摘されている。

膵島量を回復させる治療として、iPS細胞を分化誘導することによる再生療法は糖尿病の根治治療として期待されているが、技術的な問題、安全性や倫理的問題など実用化に際して多くのハードルがある。

そのほか期待される治療法として、もともと膵臓内に備わる膵島の新生を促進させる治療が考えられる。以前より、糖尿病モデルマウスにおいて膵管にインスリン陽性細胞が出現することが報告されている（Diabetologia 46:830-838, 2003）。

2. 研究の目的

膵臓内において膵島新生が起こる部位を特定すると同時に膵島新生を誘導する因子を効果的に探索することである。そのためには、膵臓を三次元的に高解像度で解析できる画像解析技術が必要である。そこで、今回は、Optical Projection Tomographyを用いてマウス膵臓内の膵管および新生膵島を三次元的に解析する。OPTはJ.Sharpeらによって確立された光投射型断層撮影技術を用いて二次元の断層画像から生体標本の三次元画像を再構築する技術である。OPTでは、共焦点顕微鏡で観察可能なサンプルよりも大きな組織を5-50 μ mの分解能で解析でき、生体内に発現するRNAやタンパク質を切片を作製することなく観察可能であるため、従来の切片からの解析では不可能であった臓器単位での正確な三次元的解析が可能となる。これまでにマウス胚における神経や、マウス膵臓内の膵島（Nature Methods 4: 31-33, 2007）の観察などが報告された。また、我々も移植膵島の観察（Transplant international, 24, 839-844 2011）し、移植膵島の観察および膵島数・量の解析に成功している。以上の背景を基に本研究では、OPTを用いて、新生膵島、血管などの関係を三次元的画像から検討する。また、新生膵島を簡便に観察するためにマウスの眼に膵島を移植し、実体顕微鏡やIVISシステムによる評価系の確立を目指す。

3. 研究の方法

Optical Projection Tomographyを用いて、膵臓内の膵島、膵管および血管の観察を可能にする条件の検討を行った。血管の染色は、Alexa647-NHS 溶液を還流することで血管内皮細胞の膜タンパク質を染色することで行った。膵島についてはインスリンを染色した。膵管染色についてはCD133抗体を用いた。

膵島移植について

ドナーにはRIP-Lucマウス（ラットインスリンプロモーター下にルシフェラーゼが組み込まれた遺伝子を導入されたマウス）もしくは、MIP-GFPマウス（マウスインスリンプロモーター下に緑色蛍光タンパク質が組み込まれた遺伝子を導入されたマウス）をもちいた。レシピエントとして、CB57/1cr-Prkdcscid/Cr1Cr1jマウスを用いた。マウスの眼、虹彩上に膵島を移植し、顕微鏡、IVIS観察の際に組織による発光・蛍光の減少などの影響を抑えることが可能な部位に行った。

IVISでの移植膵島中ルシフェラーゼタンパク質の発現の解析について、まず、ルシフェラーゼの発現をin vivoで解析するために基質であるルシフェリンを尾静脈注射後の最適観察時間の検討を行った。つぎに移植膵島数と発光シグナルの相関を検討した。

移植膵島の新生・増殖について検討するため、実際に齧歯類において膵島増殖作用があるとGLP-1受容体作動薬のLiraglutideを膵島移植を施したマウスに200ug/kgを1日2回2週間投与した。

4. 研究成果

OPTを用いた三次元画像の構築検討

図1に示すように膵島および、血管を染色することにより三次元画像を得ることに成功した。

しかしながら、膵管染色についてはCD133抗体を用いた検討において染色条件を見出すことはできなかった。

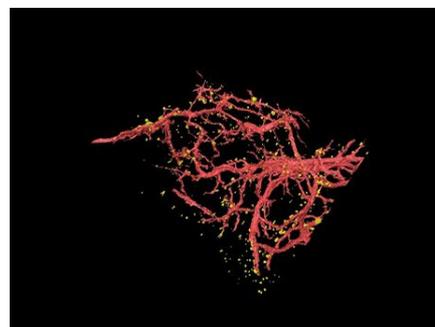


図1；マウス膵臓のOPT解析画像

マウスの目の虹彩上に移植した膵島を実体顕微鏡で観察した結果を図2に示す。目の虹彩上に移植膵島が確認でき、移植操作が確立できたことが分かった。

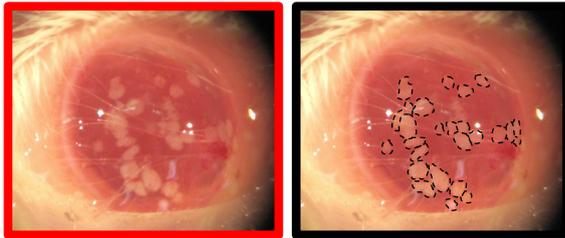


図2：移植膵島の実体顕微鏡像

つぎに、移植膵島のルシフェリン投与後のIVISでの最適観察時間の検討を行った。図3に示すように時間の経過とともにルシフェラーゼ由来の発光強度は上昇し、12分30秒経過後はほぼ一定の値を示した。そのため、以後の実験は、投与後12分30秒で観察を行った。

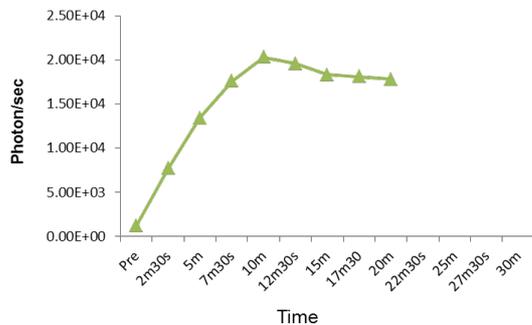


図3 移植膵島の基質投与後の最適観察時間の検討

移植膵島の新生と増殖について Liraglutide を2週間投与した結果を図4に示す。2週間投与後の移植膵島からの発光を比較すると Liraglutide 投与群で非投与群に比べて膵島量の増加傾向が見られた。

以上のことから、マウス虹彩内に移植した膵島を観察することが、新生膵島を観察するための一つの手段である可能性を示すことができた。

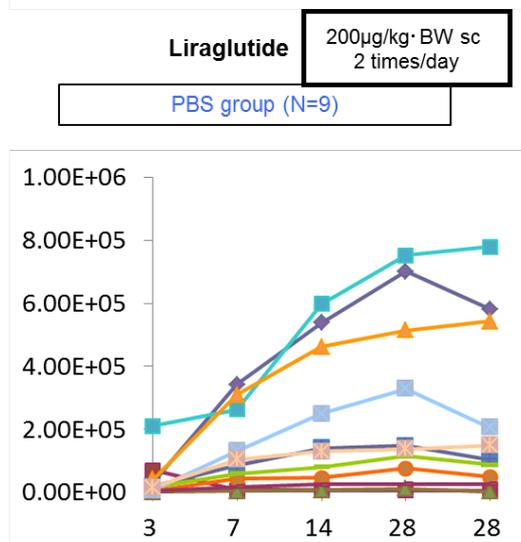
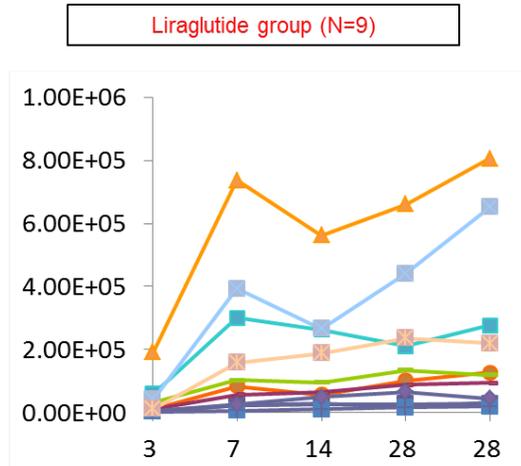


図4: Liraglutide 投与の有無による膵島由来の発光強度の比較

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 1 件)

Hiroyuki Fujimoto, Hiroo Iwata, Substrate-Mediated, High-Efficiency siRNA Electroporation. Springer Protocols 2014, 1121, 139-146, DOI;10.1007/978-1-4614-9632-8_12

〔学会発表〕(計 7 件)

神戸香織、木村寛之、松田洋和、小川祐、豊田健太郎、藤本裕之、小野正博、稲垣暢也、佐治英郎 膵 細胞のイメージングを目的とした GLP-1 4 受容体標的 68Ga 標識 Exendin(9-39)誘導体の開発 第 53 回日本核医学会学術集会 2013.11.8-10 福岡

神戸香織、木村寛之、松田洋和、小川祐、豊田健太郎、藤本裕之、小野正博、稲垣暢也、佐治英郎 膵 細胞のイメージングを目的とした GLP-1 4 受容体標的 111In 標識 Exendin-4 誘導体の開発 第 23 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 2013.6.21 武蔵野大学

藤本裕之、豊田健太郎、木村寛之、小川祐、庄暁桐、平井光春、松田洋和、佐治英郎、稲垣暢也 非侵襲的画像診断法を用いた糖尿病モデル動物の膵 細胞量の解析 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013.5.16-18 熊本

庄暁桐、豊田健太郎、藤本裕之、木村寛之、小川祐、松田洋和、近藤恭士、向英里、天満敬、平井光春、岩永康裕、上本伸二、佐治英郎、稲垣暢也 移植後の膵 細胞量モニタリングのための非侵襲的画像診断法の開発 第 40 回膵・膵島移植研究会 2013.3.1-2 高松

Zhuang, X., Toyoda K., Fujimoto H., Kimura H., Ogawa Y., Mukai E., Ueda M., Tenma T., Hirai M., Takagi M., Kon A., Matsuda H., Ono M., Saji H., Innagaki N., Development of 123I-labeled exendin derivative targeting GLP-1 receptors for insulinoma SPECT imaging. 9th International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes 2012.11.24-27 京都

Fujimoto H., Toyoda K., Kimura H., Ogawa Y., Mukai E., Zhuang, X., Ueda M., Tenma T., Hirai M., Takagi M., Kon A., Matsuda H., Ono M., Saji H., Innagaki N., Development of 1Non-Invasive PET Probe for Quantifying Pancreatic -cell Mass Using Fluorine-18-labeled Exendin-4. 9th International Diabetes

Federation Western Pacific Region Congress / 4th Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes 2012.11.24-27 京都

Fujimoto H., Toyoda K., Kimura H., Ogawa Y., Matsuda H., Takagi M., Kon A., Ono M., Saji H., Innagaki N., Development of 123I-labeled exendin probe targeting GLP-1 receptors for detecting insulinoma cells. 48th EASD Annual Meeting 2012.10.1-5 ベルリン、ドイツ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 裕之 (FUJIMOTO HIROYUKI)
京都大学 医学研究科 助教
研究者番号：50437274