

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440083

研究課題名(和文) 神経刺激による膵島細胞のシグナル伝播とホルモン分泌連鎖のダイナミクス解析

研究課題名(英文) Dynamics of intercellular signal transduction and hormone secretion in pancreatic islet cells activated by nerve stimulation

研究代表者

古野 忠秀 (FURUNO, Tadahide)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：80254308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、神経と膵島細胞の接着には接着分子の一つであるCADM1が集積し、神経からの情報の効率的な受容に関わっていることを明らかにしていることから、CADM1が細胞の分泌顆粒動態に及ぼす影響を調べた。その結果、CADM1の発現抑制細胞では、細胞内の分泌顆粒の移動速度が減少することが分かった。次に、ルシフェラーゼとプログルカゴンの融合タンパク質を細胞に発現させ、活性化に伴うグルカゴンの開口放出を発光イメージングによってビデオレートでリアルタイムに検出することに成功した。グルカゴンの開口放出は、細胞が密集している部位で活発に起こっていた。また、同じ場所で繰り返し起こっている様子も観察された。

研究成果の概要(英文)：CADM1, identified as an adhesion molecule in pancreatic islet alpha cells, has been reported not only to communicate among alpha cells and between nerve fibers. First, we investigated the effect of CADM1 expression on the movement of intracellular secretory granules in alpha cells. A mean velocity of granules in alpha cells that expressed CADM1 endogenously was significantly decreased in CADM1-knockdown cells. Next, we have visualized glucagon secretion using a method of video-rate bioluminescence imaging. The fusion protein of proglucagon and *Gussia luciferase* was used as a reporter to detect glucagon secretion and was efficiently expressed in pancreatic alpha cells. The secretory events were observed frequently at the intercellular contact regions in response to stimulation by KCl. These results suggested that the cell-cell adhesion strongly affected the intracellular movement and the fusion with plasma membrane of intracellular granules.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞接着 膵島細胞 グルカゴン 分泌顆粒 開口放出 イメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内では、胃や腸をはじめとする消化器系組織が強い神経支配を受けている。実際に、ストレスは胃潰瘍や十二指腸潰瘍のリスクファクターの一つであり、神経が消化器系組織の機能に密接に関わっていることはよく知られている。解剖学的は、膵臓にも神経支配が及んでおり、細胞がコロニーを形成して存在しているランゲルハンス島(膵島)にも神経の伸張が見られる。膵島細胞(細胞や細胞)は、グルカゴンやインスリンなどのホルモンを分泌して血糖を調節する重要な役割を果たしており、神経は接着部位を介して膵島細胞のホルモン分泌を制御していると考えられる。しかし、神経-膵島細胞および膵島細胞同士の細胞間相互作用には未だ不明な点が多く、その詳細は十分明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに多くの研究成果を挙げてきた蛍光イメージング法と *in vitro* 共存培養系に加えて、新たにビデオレートバイオルミネッセンス顕微鏡を活用して、まず神経から膵島細胞への活性化シグナルの伝達と、それによって膵島細胞コロニーに連鎖的に伝播していくシグナルおよびホルモン分泌過程をリアルタイムで可視解析し、そのダイナミクスを明らかにすることを目的とする。さらに、このような細胞接着を介した神経と膵島細胞、および、膵島細胞同士の相互作用の分子機構(接着分子、メディエータ、シグナル分子、分泌関連分子)を解明し、患者数が増加の一途をたどっている2型糖尿病の治療薬開発に対して、新たな視点からの情報を提供することを目指す。

3. 研究の方法

(1)細胞

細胞には、マウス膵島細胞の培養細胞株である TC6 細胞または TC1.6 細胞を用いた。また、RNA 干渉によって接着分子 CADM1 の発現を抑制した TC6^{siRNA-CADM1} 細胞、および、そのコントロールとして TC6^{siRNA-Neg. Con.} 細胞を用いた。

(2)顆粒動態観察

マトリゲルコート処理したガラスボトムディッシュに TC6 細胞を播種し、48 時間培養した。quinacrine (3 μM, 15 分) で分泌顆粒を染色し、ニポウディスク方式共焦点レーザー走査ユニット(CSU-W1)を搭載した倒立型顕微鏡を用いて顆粒動態を計測した。得られた結果は、Image J Plug-in Manual Tracking を用いて解析し、次の式を用いて平均二乗変位(MSD)を算出した。

$$MSD(n\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} [(x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2]$$

(Nは全フレーム数、nはフレーム数、tはフレーム間の時間、(x_i, y_i)は時間 i にお

る顆粒座標)

得られた MSD 値と時間を対数化したグラフ化し、その際に得られる直線の傾き(値)を算出し、顆粒の運動パターンの指標とした。

(3)プラスミド作製と細胞への導入

ルシフェラーゼ発現プラスミドベクターとして、*Gaussia princeps* 由来野生型ルシフェラーゼ(GLase)遺伝子(wGLuc: wild type GLuc)、一般的に使用されているヒトコドン最適化 GLase 遺伝子(hGLuc: human codon optimized GLuc)、Preferred 法を用いてヒトコドンに最適化した GLase 遺伝子(pGLuc: preferred human codon optimized GLuc)を挿入した pcDNA3-wGLuc、pcDNA3-hGLuc、pcDNA3-pGLuc を用いた。そして、プログルカゴン(PGCG)と GLase の融合タンパク質(PGCG-GLase)を発現させるため、以下の4種の PGCG-GLase 発現プラスミドベクターを作製した。

- ・pcDNA3-wPGCG-hGLuc: ヒトプログルカゴン遺伝子と hGLuc 遺伝子から成るベクター
- ・pcDNA3-wPGCG-pGLuc: ヒトプログルカゴン遺伝子と pGLuc 遺伝子から成るベクター
- ・pcDNA3-pPGCG-hGLuc: Preferred 法で最適化したヒトプログルカゴン遺伝子(pPGCG)と hGLuc から成るベクター
- ・pcDNA3-pPGCG-pGLuc: pPGCG と pGLuc から成るベクター

遺伝子導入は、Lipofectamine LTX と Plus 試薬を用いて行った。また、TC6 細胞に pcDNA3-pPGCG-pGLuc 遺伝子を導入することにより、PGCG-GLase を安定発現する TC6^{PGCG-GLase} 細胞を樹立した。

(4)免疫染色

マトリゲルコート処理した chamber slide に TC1.6^{PGCG-GLase} 細胞を播種し48時間培養した。細胞は、4%パラホルムアルデヒド/PBS で1時間固定し、0.1% Triton X-100/PBS で30分間可溶化した後、1% BSA/PBS で30分間ブロッキングした。一次抗体(ウサギ抗 GLase 抗体およびマウス抗グルカゴン抗体)を加え4で一晩静置した後、二次抗体(Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor 546 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体)を加えて3時間室温で静置した。画像は、共焦点レーザー走査顕微鏡(LSM-710 Meta)を用いて取得した。

(5)ウェスタンブロット

ポリ-D-リジンコートをした6ウェルプレートに TC1.6^{PGCG-GLase} 細胞を播種し、48時間培養した。細胞を洗浄した後、2.8 mM グルコースを含む500 μl の KRHB で1時間培養した。分泌サンプルは、培養上清を全て回収し、遠心にて細胞を除去し、4×LDS Buffer を添加することにより得た。細胞サンプルは、細胞を100 μl の Passive Lysis buffer で処理し、4×LDS Buffer を加えることにより得た。各サンプルを SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に転写した後、5%スキムミルク/PBS で1時間ブロッキングした。その後、一次抗体(ウ

サギ抗 GLase 抗体およびマウス抗グルカゴン抗体) 中で 4 晩浸透し、HRP 標識二次抗体(HRP 標識 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体および HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体) で 3 時間浸透した後、Western chemiluminescence kit により発光シグナルを LAS-4000mini を用いて検出した。

(6) 生物発光イメージング

生物発光シグナルは、簡易暗箱中に組み立てられた顕微鏡ステージ自動温度制御システムと水冷式 EM-CCD カメラ (ImagEM 1K, C9100-14 モデル, 1024 × 1024 pixels, pixel size = 13 μm) を搭載した IX81-ZDC2 顕微鏡で検出した。IX-81-ZDC2 電動顕微鏡と EM-CCD カメラの接続部位(C-マウントアダプター)には、電動制御用内部赤外光ランプを遮断するため赤外線除去フィルターを組み込み、対物レンズは、UPLSAPO 20×ドライレンズ (NA 0.75) を用いて pixel size が 650 nm × 650 nm の条件で撮影を行った。発光活性シグナルデータは、AQUACOSMOS ソフトウェア Ver.2.6 を用いて 500 ミリ秒/frame、転送時間は 1.712 ミリ秒/image の条件下で取得した。発光強度の経時変化解析は、AQUACOSMOS ソフトウェアを用いて解析した。生物発光イメージング法による TC6^{PGCG-GLase} 細胞からの PGCG-GLase 分泌の可視化は以下の手順で行った。

TC6^{PGCG-GLase} 細胞をポリ-D-リジンコートした 35-mm ガラスボトムディッシュに播種し、20 mM グルコースを含む KRHB 液で 3 回洗浄し、3 μg/ml セレンテラジンと 20 mM グルコースを含む KRHB 液 1 ml を加え顕微鏡のステージにセットした。焦点面を細胞とガラスの接着部位から 2 μm の位置に合わせ、3 分間連続撮影を行った。続いて、終濃度 50 mM KCl になるように KRHB 液を加え KCl 脱分極刺激を行った。

4. 研究成果

(1) 膵島 細胞内分泌顆粒動態の解析

膵島 細胞内の分泌顆粒動態を測定するため、蛍光色素 quinacrine で顆粒を染色し、その顆粒動態を EM-CCD カメラ搭載ニポウディスク方式共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて 500 ミリ秒/frame で 5 分間測定した。quinacrine は酸性顆粒を染色することが知られているので、膵島 細胞にプログルカゴンと mCherry の融合タンパク質を発現させ、両者の共局在を調べたところ、両者の局在がほぼ一致した (相関係数: 0.78 ± 0.04)。そこで、顆粒を quinacrine で染色し、その動態に及ぼす接着分子 CADM1 の影響を追究することにした。その結果、野生型 TC6 細胞株、TC6^{siRNA-CADM1} 細胞、TC6^{siRNA-Neg.Con.} 細胞の顆粒の平均速度は、それぞれ 0.236 ± 0.010 μm/s、0.190 ± 0.016 μm/s、0.200 ± 0.013 μm/s であり、CADM1 発現抑制細胞で顆粒の移動速度が減少していることが分かった (図 1)。

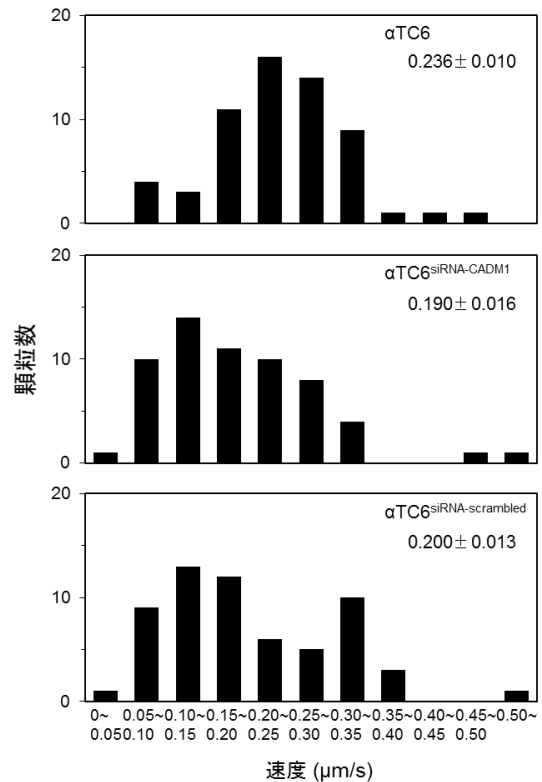


図 1 分泌顆粒の平均移動速度分布

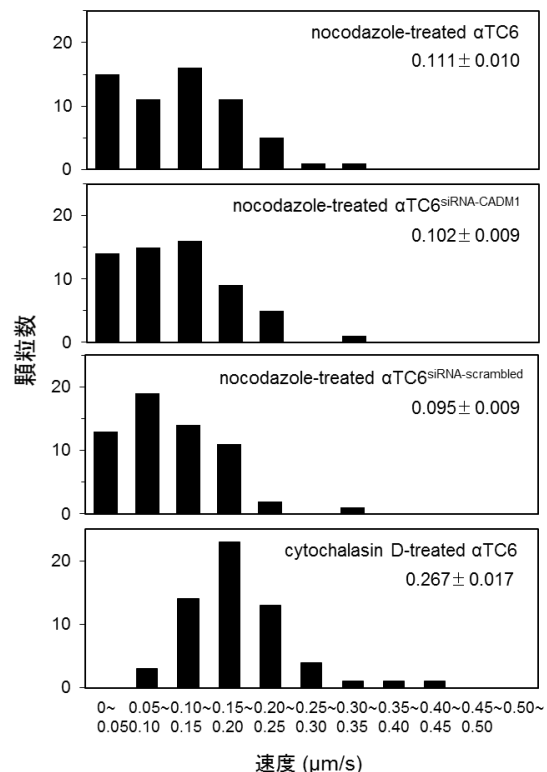


図 2 分泌顆粒の平均移動速度に及ぼすノコダゾールの影響

また、この分泌顆粒の動きは、微小管重合阻害剤のノコダゾールの前処理により、全ての細胞で顕著に抑制された。一方、アクチン重合阻害剤のサイトカラシンDの前処理では、ほとんど影響がなかった(図2)。また、値は、3種の細胞で大きな差がなかったが、ノコダゾール処理すると、値は減少し、拡散運動や直線運動から静止運動に近づくことが分かった(図3)。

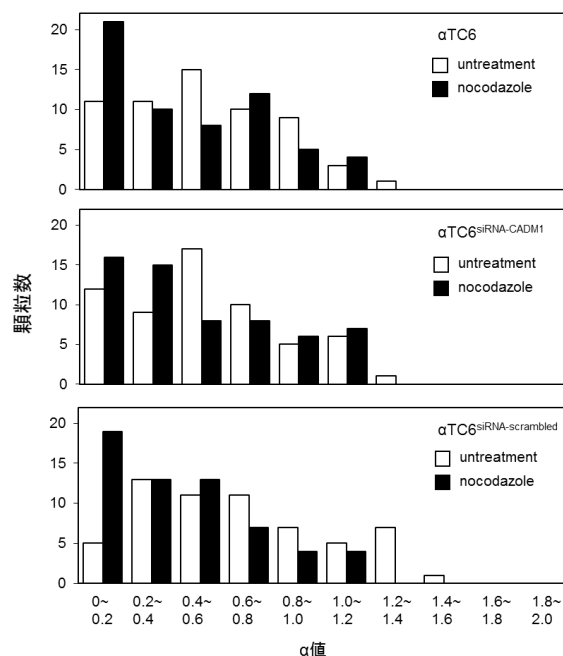


図3 分泌顆粒動態の値

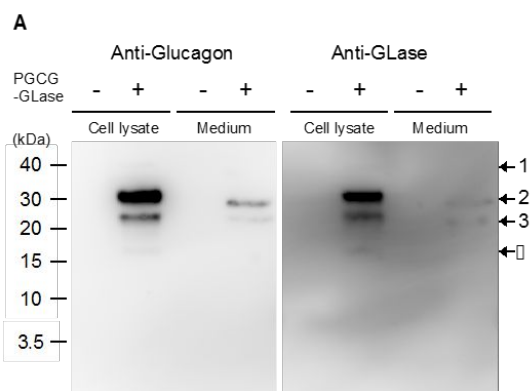
(2) 藤島 細胞からのグルカゴン分泌のイメージング

まず、PGCG-GLase 融合タンパク質の発現における Preferred 法によるコドン最適化遺伝子の有効性の検討を行った。作製した4種類の遺伝子 (wPGCG-hGLuc、wPGCG-pGLuc、pPGCG-hGLuc、pPGCG-pGLuc) を TC1.6 細胞に一過性に導入して発光量を比較したところ、それぞれ 4.16×10^7 rlu、 6.28×10^7 rlu、 6.27×10^7 rlu、 9.16×10^7 rlu となり、PGCG と GLase の両者を Preferred 法で作製した pPGCG-pGLuc 遺伝子による発光活性が最も強く、発現量が高いことが分かった。

そこで、TC1.6 細胞に pPGCG-pGLuc 遺伝子を導入し、グルカゴン分泌抑制条件である 20 mM グルコース刺激、および、グルカゴン分泌刺激条件である 2.8 mM グルコースまたは 50 mM KCl 脱分極刺激を 37 °C で 1 時間行い、培養上清に分泌された PGCG-GLase 量を発光にて測定した。その結果、20 mM グルコース (58.56×10^6 rlu) と比較して、2.8 mM グルコース (125.05×10^6 rlu) と 50 mM KCl (127.16×10^6 rlu) 刺激では、約 2 倍増加した。このことから、TC1.6 細胞の刺激により、グル

カゴンと同様に、PGCG-GLase が細胞外に分泌されることが分かった。

そこで、TC1.6 細胞に pPGCG-pGLuc 遺伝子を導入し、PGCG-GLase を発現する細胞株 (TC1.6^{PGCG-GLase}) を樹立した。まず、ウェスタンブロットと免疫染色により、細胞に発現する PGCG-GLase の分子量と細胞内分布を調べた。その結果、TC6^{PGCG-GLase} 細胞の細胞内と培養上清に含まれる PGCG-GLase 融合タンパク質は、そのプロセシング産物である MPGF-GLase の状態で存在していると考えられた(図4A)。また、細胞でわずかに存在する GLP-1 のプロセシング産物である MPGF-GLase をマイナーバンドとして検出した。これらの結果から、PGCG-GLase は正しくプロセシングを受けて、主に MPGF-GLase として分泌されていることが示された。また、この融合タンパク質は、細胞内でグルカゴンと共局在している様子が観察され、翻訳後グルカゴン顆粒内に封入されることが示唆された(図4B)。



1: PGCG-GLase、2: MPGF-GLase、
3: MPGF-GLase、4: プロセシング産物

B

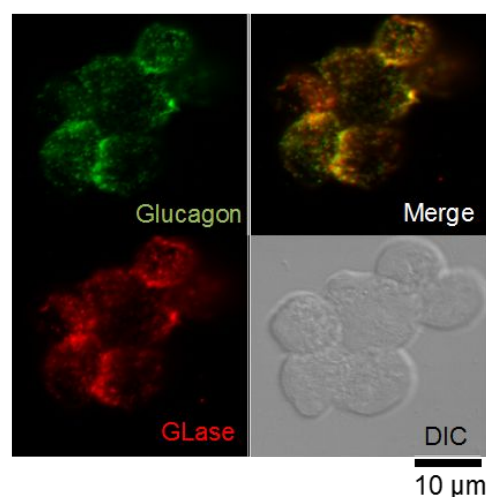


図4 PGCG-GLase 融合タンパク質の発現

次に、2日間培養して細胞集団を形成した TC1.6^{PGCG-GLase} 細胞の発光イメージングを行った。3 µg/ml 発光基質セレンテラジンと 20 mM グルコースを含む KRHB 溶液中で 3 分間撮影を行った後、50 mM KCl により脱分極刺激を行った。その結果、KCl 刺激に伴い細胞間隙に活発な発光を検出した。この発光は、細胞から放出された GLase とセレンテラジンの反応によるものであり、グルカゴン分泌を可視化したものと考えられた (図 5 : 緑色)。KCl 刺激後の発光ビデオ画像から発光最大値の合成画像を作成し、明視野画像に重ねた結果、細胞が密集した細胞間接着領域にグルカゴン分泌部位が局在していることが示された。

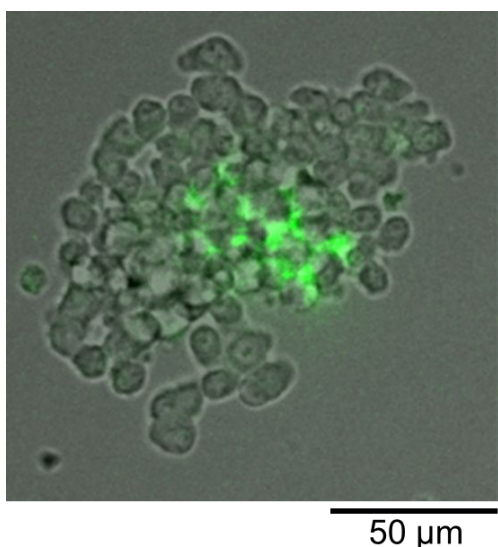


図 5 発光イメージング画像

細胞集団全体の発光強度の経時変化から、グルカゴンの分泌は、繰り返し起こっていることが分かった (図 6)。また、細胞集団の微小領域に注目して解析したところ、グルカゴンの分泌は同一部位で繰り返し行われている様子が観察された。

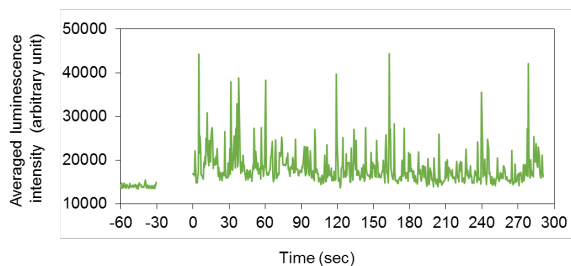


図 6 グルカゴン分泌の経時変化

(3)まとめ

本研究では、細胞のグルカゴン含有顆粒の細胞内動態と開口放出過程を蛍光および発光イメージングにより追究した。

グルカゴン含有顆粒は、細胞内で微小管に沿って輸送されており、刺激応答によって細胞が密集した領域で分泌されていることが明らかになった。また、グルカゴン分泌が細胞膜で均等に起こっているわけではなく、同じ場所で繰り返し分泌されていると考えられる結果も得られた。これらの結果から、細胞の細胞膜上にグルカゴン分泌に適した微小領域が存在していることが示唆された。しかし、そのような領域に集積する接着分子や受容体などの膜タンパク質や細胞質側の裏打ち蛋白質を明らかにするには至っていない。

今後、微小領域へ集積するタンパク質の同定、細胞間の相互作用の解析、細胞と細胞の相互作用の追究、神経と細胞の相互作用の検討などを進め、新たな視点からの糖尿病治療薬の標的分子の探索につなげていきたい。

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 2 件)

Yokawa, S., Suzuki, T., Inouye, S., Inoh, Y., Suzuki, R., Kanamori, T., Furuno, T., Hirashima, N.: Visualization of glucagon secretion from pancreatic cells by bioluminescence video microscopy: identification of secretion sites in the intercellular contact regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 485, 725-730. (2017) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.114. 査読有

Yokawa, S., Furuno, T., Suzuki, T., Inoh, Y., Suzuki, R., Hirashima, N.: Effect of cell adhesion molecule 1 expression on intracellular granule movement in pancreatic cells. *Cell Biochem. Biophys.*, 74, 391-398. (2016) doi: 10.1007/s12013-016-0737-6. 査読有

[学会発表](計 10 件)

Tadahide Furuno : Effect of cell adhesion molecule 1 expression on intracellular granule movement in pancreatic cells. 日本生物物理学会第 54 回年会. 2016 年 11 月 25 日. つくば国際会議場(茨城県つくば市)

横川 慧: 細胞接着を介した膵島細胞のグルカゴン分泌調節機構の解明. 第 38 回

生体膜と薬物の相互作用シンポジウム・
2016年11月18日・名古屋市立大学(愛
知県名古屋市)

横川 慧:生物発光イメージング法を用い
た膵島細胞からのグルカゴン分泌の解
析・第25回日本バイオイメーjing学
会学術集会・2016年9月5日・名古屋市立
大学(愛知県名古屋市)

Satoru Yokawa: Cell adhesion molecule 1
(CADM1) influences granule movement and
glucagon secretion in pancreatic
cells. 2015 Cell Biology ASCB Annual
Meeting. 2015年12月13日・San Diego
(USA)

小栗良介:接着分子CADM1を介した細胞間
接着による膵島細胞の分泌顆粒動態の
制御・第24回日本バイオイメーjing学
会学術集会・2015年9月27日・東京理科
大学(東京都葛飾区)

Satoru Yokawa: Cell adhesion molecule 1
(CADM1) regulates glucagon secretion in
pancreatic cells. 日本生物物理学
会第53回年会・2015年9月15日・金沢大
学(石川県金沢市)

古野忠秀:細胞間接着を介した神経による
膵島細胞の機能調節機構の研究・日本薬
学会第135年会・2015年3月27日・神戸
学院大学(兵庫県神戸市)

横川 慧:アルギニン刺激に伴う膵島細胞
内顆粒動態の追究・日本薬学会第135
年会・2015年3月27日・神戸学院大学(兵
庫県神戸市)

Tadahide Furuno: Analysis of granule
movement in pancreatic islet cells
attached with neurites. 日本生物物理学
会第52回年会・2014年9月26日・札幌
コンベンションセンター(北海道札幌市)

篠原惇宏:膵島細胞の細胞内顆粒動態の
解析・第23回日本バイオイメーjing学
会学術集会・2014年9月5日・大阪大学
(大阪府大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古野 忠秀 (FURUNO, Tadahide)
愛知学院大学・薬学部・教授
研究者番号: 80254308

(2) 研究分担者

鈴木 崇弘 (SUZUKI, Takahiro)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70298545

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし