

光プローブを活用したインスリン分泌機構の解明

北里大学医学部生理学

高橋 倫子

①生体における膵島カルシウムシグナルの観察

【目的】

膵臓で合成・分泌されるインスリンは生体の代謝や成長に重要なホルモンで、その分泌異常は2型糖尿病の成因に深くかかわる。日本人を初めとする東アジア系民族では、遺伝的にインスリン分泌能の低い事実が報告されている。これまで細胞生物学の分野で開発されてきた光プローブを生体に発現させ、2光子励起でイメージングする技術を用いて、インスリン分泌調節機構を *in vivo* で定量観測する実験系を立ちあげることを目指した。従来、インスリン分泌機構は摘出膵島で主として調べられてきたが、*in vivo* 標本を対象にすることにより、個体レベルでインスリン分泌を最適化するメカニズムにつき研究する道を拓くことを目的とした。今回は初めての試みとなるため、分泌調節に深く関わるカルシウムシグナルに着目し、その変動を検出する実験系の構築を図った。

【方法】

2光子顕微鏡は近赤外のフェムト秒レーザーを光源とする。長波長光を励起に用いるため、光の散乱や吸収が抑えられ、生体組織の深部観察に適する。また、光子密度の高いレンズ焦点面で選択的励起が起きるため、断層画像が獲得され、微細構造の観察に適する。顕微鏡はオリンパス社のレーザー走査型倒立顕微鏡 (FV1000 and IX81) を使用した。

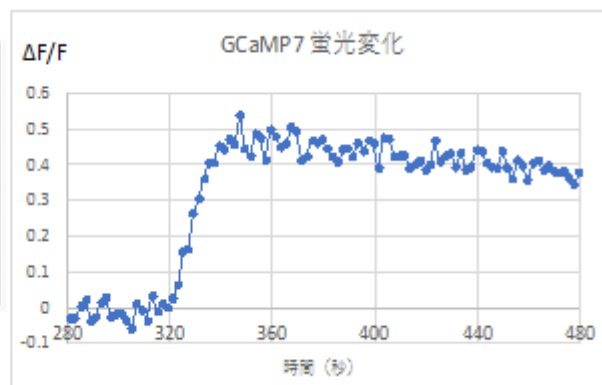
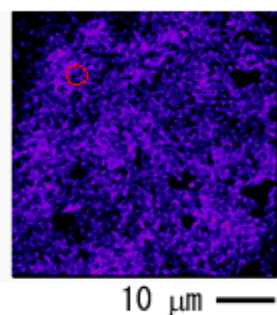
研究期間の初期はアデノ随伴ウイルス (6型) を用いてカルシウム感受性プローブ (YC-Nano) を膵島に発現させる実験系を試みていたが、収穫されたウイルスのタイター不足により、生体内臓器の蛍光標識には適さないと判断した。北海道大学根本知己教授より、膵島にカルシウム感受性蛍光色素GCaMP7を発現する遺伝子改変マウスの情報をいただき、開発者である理化学研究所 脳科学総合研究センター 平瀬肇チームリーダーよりマウスを供与いただいた。

【結果】

1. 遺伝子改変マウスの摘出膵島におけるカルシウムシグナル

この遺伝子改変マウスの膵からコラゲナーゼ処理にて膵島を単離し、グルコース刺激を与えると、大多数の膵島細胞においてGCaMP7蛍光強度がほぼ同期して増強した (下図参照)。この事実より、カルシウム感受性蛍光色素は膵島β細胞に発現していることが示され、グルコースに反応したカルシウム濃度上昇反応を検出できる可能性が高いと判断した。

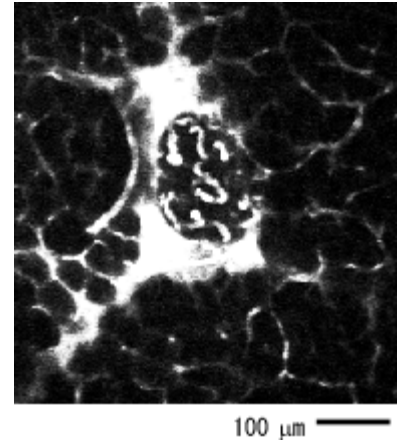
実際、この遺伝子改変マウスでGCaMP7発現にかかわるプロモーターに関する文献検索を行うと、膵島内ではインスリンを分泌するβ細胞のみで発現を増強し、グルカゴンを分泌するα細胞やソマトスタチンを分泌するδ細胞では発現誘導しないことが免疫染色法で示されている。したがって、膵島細胞の中でもβ細胞特異的にプロモーター活性を発揮すると考えられた。文献によると、膵島内のβ細胞間で、プロモーターに依存する蛋白発現量に大きな差異は無く、我々の検討でも、カルシウム濃度上昇幅に極端な細胞間



異質性は認められなかった。

2. in vivo 観察における膵島の同定

使用する倒立型2光子顕微鏡セット（東京大学大学院医学系研究科構造生理学部門）で生体内の膵島を観察できるのか、野生型マウスB6で確認する作業を行った。麻酔下のマウスに、水溶性蛍光色素であるSulforhodamine B や Dextran rhodamine、蛍光性グルコースアナログ2-NBDGなどを静注し、膵臓表面より対物レンズUPlanSAPO（20×, NA 0.75, WD 0.6 あるいは 60×, NA 1.2, WD 0.28）を用いて励起波長 830 nm–970 nmで観察した。



水溶性蛍光色素で染め出される脈管構造は、右図に示すように、膵内分泌領域では外分泌領域とは異なるパターンを示した。蛍光領域の密度も相対的に高く、同定することが可能であった。また、このように同定された膵内分泌構造では蛍光グルコースアナログ 2-NBDGの強度が周辺組織より高いことを確認した。

3. 遺伝子改変マウス膵島における カルシウム変化

カルシウム感受性色素GCaMP7発現するマウス（前述）において膵島シグナルの検出を試みた。安静時（絶食時）には膵島の蛍光強度が検出に十分ではなく、カルシウム感受性色素のみで膵島を見つけ出すのは困難であった。そのためDextran Rhodamine 静注を併用して膵島部位を同定した。その結果無刺激の条件ではあったが、観察期間中にカルシウムの一過性増大反応が検出され、カルシウムのオシレーションを反映している可能性があると考えられた。

4. 膵島内脈管イメージング

膵島内部の脈管構造を水溶性蛍光色素液で描出することができ、断層画像を経時的に高速取得すると、内部を血球成分が移動の様子を観察でき、個々の血管における血流方向が判明した。また、3で取得されたカルシウム濃度上昇画像と脈管画像の重ねあわせから、両者の位置関係につき相関解析する道が開かれた。

【今後の方向性】

今回の膵島観察は異動前の東京大学で行ったが、今後移動先の北里大学で継続できるか検討する。脈管染色を手がかりに生体内膵島構造を同定できるか検討し、観察可能であれば各種シグナル解析を施行する予定である。

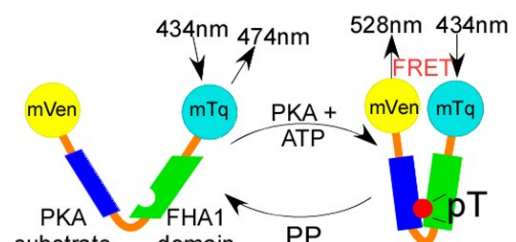
②摘出膵島における細胞内cAMP 濃度の可視化と分泌との相関解析

【目的】

カルシウムと並びインスリン分泌調節に重要な役割を担うcAMPシグナルの可視化と分泌との相関解析

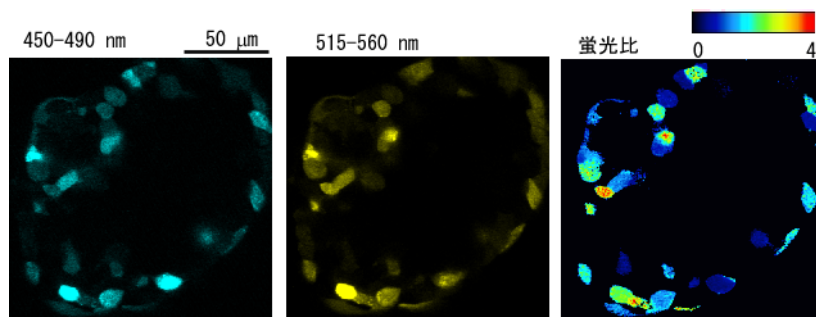
【方法と結果】

細胞内cAMP 濃度を反映するratiometric なFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）プローブ：AKAR2-Clover-Ruby (AKAR2-CR) の色素領域を、FRET を起こすペア色素である mturquoise と mVenus に組換えて、蛍光の異なる変異体(AKAR2-TV)を作成した。マウス摘出膵島にAKAR2-TV のcDNAをレンチウイルスで遺伝子導入し、GLP-1で刺激を与え、蛍光強度比が増強することからこのFRETプローブの機能確認を行った。



蛍光プローブ発現膵島を水溶性蛍光色素Alexa594で還流し、細胞外を標識し、グルコース刺激を与えて、インスリン分泌の時空間分布を2光子顕微鏡（励起波長830 nm）で計測した（蛍光取得波長：570–650 nm）。同時にFRET プローブの蛍光比（515–560nm/450–490nm）をモニターし、分泌反応との相関を調べることを目的とした。

示された蛍光比は膵島内の細胞間でばらつき、細胞内cAMP濃度には細胞による違いがあると推察された(右図参照)。しかし、AKARを発現した細胞ではグルコース依存的なインスリン分泌が極度に抑制され、分泌頻度と蛍光比との間を相関解析することは難しいと判断した。



③インスリン顆粒の動態観測系の構築

【目的】

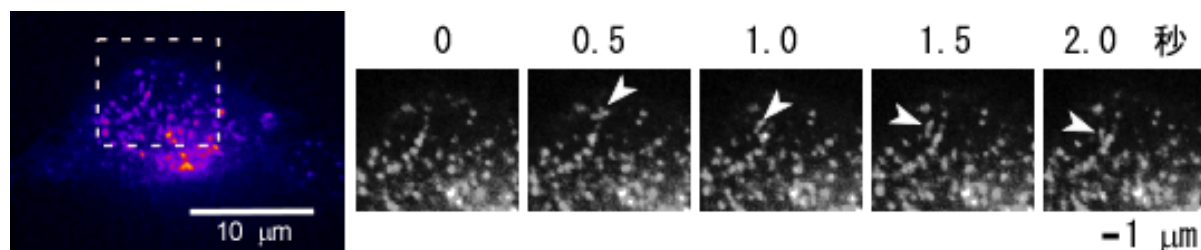
インスリン顆粒動態調節機構の定量的解析系の構築

【方法と結果】

インスリン顆粒を標識するために、CMV-preproinsulin-TagあるいはCMV-phogrin-Tag-EGFPなどの遺伝子発現ベクターを作成した。インスリン産生細胞株への遺伝子導入はlipofection法を用い、観察は高速共焦点顕微鏡を活用した。

まず、CMV-preproinsulin-Tagを導入した系では、Tag-Ligand-Qdot(量子ドット標識Tagリガンド)を電気穿孔法にて導入した。Tagリガンド陽性細胞においては量子ドットが導入され活発に動いていること、Tagリガンド陰性細胞では量子ドットは細胞内にとどまらないこと、量子ドットは細胞内で顆粒状に見えることを確認した。抗インスリン抗体染色を行い、抗体染色とTagリガンド染色における共局在係数は平均0.97-0.99を示したこと、及び、Tagリガンド染色陽性構造の平均直径は0.4 μmを示した事実より、インスリン顆粒の標識に成功していると判断した。量子ドットは先行研究によるとEGFPなどの蛍光色素に比べ励起の反復にも関わらず褪色が抑制されると報告されていて、長期高速の経時的な励起観察に資すると期待される。

さらに最近phogrin-Tag-EGFPの系も動き出し、単一顆粒の動態を精密に追える実験系が立ち上がりつつある(下図参照)。これらの実験系を組み合わせ、インスリン顆粒の動態を含めた分泌調節機構につき定量解析する実験系を確立する計画である。



謝 辞

本研究課題を助成いただきましたことに、アステラス病態代謝研究会に厚く御礼申し上げます。課題の遂行にあたり、生体内膵島のイメージングに挑戦した東京大学医学部の守本祐一氏、河西春郎教授、清水紘子氏を初めとする構造生理学部門のスタッフ、顆粒動態解析系の確立に尽力された北里大学医学部生理学の畠山裕康講師、大嶋友美氏に深謝します。蛍光膵島の情報と実験技術を教示いただいた北海道大学の根本知己教授と、遺伝子改変動物を供与いただいた理化学研究所の平瀬肇チームリーダーに深く感謝いたします。