

論文の要旨

氏名 重藤 元

論文題目 Development of evaluating methods for the live cell response related to insulin

(インスリンが関わる生細胞応答の評価法開発)

本論文では、糖尿病治療薬開発への応用を念頭に置いた、インスリンが関わる生細胞応答の評価手法開発について論じた。全5章で構成されており、各章の内容を以下にまとめた。

第1章は序論として、生体の血糖値維持システムや、糖尿病およびその改善方法について概略を述べ、本研究の目的と意義を明らかにした。全世界の糖尿病の患者数は日々増加しており、その治療法開発が緊急の課題である。健常者の場合、血中のグルコース濃度（血糖値）が上昇すると、それを感知したインスリン分泌細胞がインスリンを分泌し、次にインスリンを受容した肝臓細胞や筋肉細胞が血中グルコースを取り込むことにより、血糖値をコントロールする。糖尿病はこの血糖値維持システムが破綻することで発症し、その発症メカニズムによって大きく2つに大別される。1型糖尿病は血糖値が上昇してもインスリンが十分量分泌されず、血中グルコースが取り込まれない状態である。2型糖尿病は、一定量のインスリンが血中に存在するにも関わらず、細胞のインスリン感受性が低下して、血中グルコースを十分取り込めなくなった状態である。どちらの場合も細胞機能の低下が疾病の要因であり、それを改善することが必要である。すでに様々な糖尿病治療薬が開発されているが、患者への負担は未だ大きく、常に慎重な投与が求められる。これは薬剤の効能が、インスリンを強制的に分泌させる、または血中グルコースを強制的に取り込ませるといった、単純な機能で評価されていることが原因であると考えられる。本来の血糖値維持システムは長時間にわたり複雑に制御されていることから、そのような単純な効能ではなく、血糖値維持システムを構成する生細胞機能を反映する効能に基づいた薬剤の開発が必要であると考えられる。すなわち、1型糖尿病治療用の薬剤開発では生細胞のインスリン分泌応答を、2型糖尿病治療用の薬剤開発ではインスリン受容後の生細胞応答を、経時的に長時間評価することが重要であると考えられる。そこで本研究では「インスリン分泌を伴う生細胞応答」と「インスリン受容後の生細胞応答」の評価法開発を目的とした。

第2章では「インスリン分泌を伴う生細胞応答」の評価法開発を行った。生体外の実験では、グルコース濃度に応答したインスリン分泌細胞は、素早い分泌応答とそれに続く2段階目の分泌応答を示す、二相性分泌応答を示すことが報告されている。一方で現在治療に用いられているインスリン分泌促進薬は、単純な一層のみのインスリン分泌を引き起こすことが知られている。さらに、生体内における血糖値は数時間にわたって変動するため、インスリン分泌挙動も数時間にわたって変動すると考えられる。したがって、1型糖尿病の薬剤開発には細胞から分泌されるインスリンを経時的に評価することが重要である。しかし現在用い

られている評価法は、培養細胞の培地を連続的に分取し、それらのインスリン濃度を測定するという大変煩雑な手法である。そこで第2章では、そのような分取操作の必要がない、インスリン分泌応答評価法開発を行った。インスリンはインスリン受容体の α CT セグメントと L1 ドメインに挟み込まれる形で結合する。そこで、 α CT セグメントと発光タンパク質 (Nluc)、L1 ドメインと蛍光タンパク質 (YPet) の融合タンパク質をプローブとして遺伝子工学的に作製した。このプローブはインスリン存在下でのみ、「(Nluc- α CT) – (インスリン) – (L1-YPet) の複合体を形成し、Nluc と YPet が近接した結果に由来する」と考えられる **Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)** シグナルを生じた。そこで、このプローブをインスリン分泌細胞株である MIN6 細胞の培養液に単純に混合し、様々な濃度のグルコースあるいはインスリン分泌促進剤で細胞を刺激した後の **BRET** シグナル経時変化を評価した。その結果、生体内血糖値応答や薬剤効果を反映した **BRET** シグナル経時変化を示したことから、分取操作の必要ない、インスリン分泌応答評価法開発に成功したと結論した。

第3章では「インスリン受容後の生細胞応答」の評価法開発を行った。生体内におけるインスリン濃度は数時間かけて変動することが知られており、インスリン受容後の生細胞応答も同一の細胞を経時的に評価することが重要である。そこで第3章では、単一細胞レベルでインスリン受容後の遺伝子発現応答を長時間モニタリングする手法の開発を目指した。血中のグルコースは **Glucose Transporter (GLUT)** を通して細胞に取り込まれる。そこで本章では、インスリン受容後に発現が増加する *GLUT1* mRNA と発現が減少する *GLUT4* mRNA の発現応答モニタリングに挑戦した。本研究では、各 *GLUT* mRNA を検出すると **Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)** シグナルを発する DNA ナノピンセット構造体 (DNA-NT) を新たにデザインした。この DNA-NT は、標的 mRNA と結合すると、構造が開いた状態から閉じた状態へと変化し、あらかじめ修飾した蛍光色素 Cy3 と Cy5 間で **FRET** シグナルを生じる。肝臓の細胞株である Hepa1-6 細胞にインスリン刺激を与えた後に固定し、各 DNA-NT を用いて蛍光イメージング解析を行った。その結果、*GLUT1* の場合、インスリン受容細胞の小胞体あるいは核と思われる部位に **FRET** シグナルが強く検出された。*GLUT4* の場合はインスリン受容前と比べ、小胞体あるいは核と思われる部位の **FRET** シグナルが減少していた。このことから、肝臓細胞内の各 *GLUT* mRNA を検出するための DNA-NT 作製に成功したと結論した。そこで生細胞に DNA-NT を導入し、インスリン受容後の各 *GLUT* mRNA 発現応答を単一細胞レベルで評価した結果、個々の細胞によって大きく異なる応答挙動が観察された。一方、評価系全体の積算値は従来法で測定した細胞群応答挙動に対応したことから、単一細胞レベルでインスリン受容後の *GLUT* mRNA 発現応答評価に成功していることが示唆された。これらの細胞応答の不均一性を誘発する原因解明や、薬剤評価系へ応用する際の意義を見出すまでには至らなかったが、これらの知見が新たな糖尿病治療薬の開発や未知の細胞機能の解明に役立つものと期待している。

第3章では同一の刺激を与えても個々の細胞が異なる応答を示すという細胞応答の不均一性が観察されたことから、インスリン分泌を伴う生細胞応答に関しても、個々の細胞応答を評価する必要があると考えた。そこで第4章では、第2章で開発したインスリン検出プローブを発現させたセンサー細胞を作製し、単一生細胞レベルでのインスリン分泌応答評価法開発を行った。第2章で作製したプローブをリンカーで接続し、1分子とした融合タンパク質

[Nluc- α CT-(SAGG)₇-L1-YPet]を作製した。このタンパク質のインスリン検出プローブとしての機能評価を行ったところ、インスリンの特異的な検出が可能であり、第2章におけるプローブと比較して検出感度が16倍向上した。次にこのタンパク質に膜貫通ドメインを付加しHepa1-6細胞へ発現させることで、細胞膜表面にインスリン検出プローブを発現したインスリンセンサー細胞を作製した。センサー細胞は蛍光顕微鏡観察下、インスリン濃度依存的なBRETシグナルを示したことから、インスリンの局所的な濃度観察が可能であると結論した。そこでMIN6細胞とセンサー細胞の共培養系を用いたインスリン分泌のモニタリングに挑戦した。2種類の濃度のグルコースで細胞を刺激した結果、グルコース濃度に依存したBRETシグナルの変動が観察された。この結果から、グルコース刺激を受けたMIN6細胞から分泌されたインスリンのモニタリングに成功したことが示唆された。今後の単一生細胞のインスリン分泌応答評価法への応用が期待される。

第5章では、研究の総括および将来展望について述べた。本研究では、血糖値維持システムに準じた生細胞機能を指標に糖尿病治療薬を開発する必要があると考え、生細胞のインスリン分泌応答、およびインスリン受容後の生細胞応答の評価法の開発を行った。第2章では新規インスリン検出プローブを開発し、サンプルの分取をせずにMIN6細胞のインスリン分泌応答を評価することに成功した。第3章では、インスリン受容後のGLUT1、GLUT4 mRNA発現応答評価が、DNA-NTを用いると単一細胞レベルで可能であることが示唆された。第4章ではインスリンセンサー細胞を用いると単一細胞レベルでのインスリン分泌応答評価が可能であることが示唆された。

以上の様に本研究では、従来困難であった、「インスリン分泌応答」と「インスリン受容後の遺伝子発現応答」の連続測定を単一生細胞レベルで実現し、評価するための基盤技術創出に成功した。今後は本研究で作製した評価系を組み合わせることによって、単一細胞レベルで複数種の長期細胞応答を評価することが可能になり、より生体内の細胞応答に近い応答を指標とした薬剤開発が実現すると期待される。