

## 妊娠期膵β細胞におけるインスリン分泌亢進機構の解明

今泉美佳<sup>1</sup> 藤原智徳<sup>2</sup> 大塚弘毅<sup>3</sup>

<sup>1</sup>杏林大学医学部生化学教室

<sup>2</sup>杏林大学医学部細胞生理学教室

<sup>3</sup>杏林大学医学部臨床検査医学

妊娠期の母体では、胎児へのエネルギー源となるグルコースを供給するために、血糖降下ホルモンであるインスリンが効きにくくなる、いわゆるインスリン抵抗性が引き起こされる。しかし母体では血糖値を正常に保つために多量のインスリンを膵β細胞から分泌することでインスリン抵抗性を代償している。インスリンが十分に分泌されないと妊娠糖尿病の原因となり<sup>1)</sup>、妊娠糖尿病患者が急増している現代において、この妊娠期の代償性インスリン分泌亢進機構の解明は重要な研究課題である。

代償性インスリン分泌亢進には膵β細胞量増加と共に個々のβ細胞からのインスリン分泌能増加が重要な役割を果たすと考えられている<sup>2)</sup>。β細胞量増加機構については研究が先行している一方、β細胞からのインスリン分泌能増加のメカニズムは未だ解明されていない。最近、妊娠期β細胞量増加の調節機構として、妊娠期に限ってβ細胞で急激に合成、分泌されるセロトニンが、セロトニン受容体であるHtr2bを介してβ細胞量を増加させるメカニズムが報告された<sup>3)</sup>。私達はこのセロトニンの合成、分泌増加が妊娠期インスリン分泌能増加をも調節しているのではないかと考え、妊娠期β細胞でのインスリン開口放出に及ぼすセロトニンの調節機構をセロトニン受容体欠損マウスを用いて検討した<sup>4)</sup>。

まず、セロトニン受容体の膵島での発現についてRT-PCRおよびイムノブロットで調べたところ、妊娠マウス膵島ではHtr3aが高発現していることがわかり、妊娠期に合成、分泌されるセロトニンがHtr3aサブユニットから構成されるHtr3受容体を介してインスリン分泌を調節している可能性が推察された。そこで、Htr3受容体の妊娠期における役割を明らかにするためにHtr3受容体の欠損マウス(Htr3a KOマウス)を用いて実験を進めた。

マウス膵灌流実験では、野生型(WT)妊娠マウスか

らのグルコース応答性インスリン分泌量は非妊娠マウスに比べて、著明に増大していた。しかし、KO妊娠マウスではWTのような分泌増加は観察できなかった。膵島からのグルコース応答性インスリン分泌(% release)のdose-response curveを調べた所(図1)、WT妊娠膵島では非妊娠に比べインスリン分泌が大きく増加し、曲線が左にシフトしていた。つまり妊娠期では、β細胞からのインスリン分泌のグルコース感受性が増大していることがわかった。しかし、KO妊娠膵島ではWTのような妊娠による分泌増加が見られなかった。これらの結果から、妊娠期のセロトニン-Htr3受容体シグナルはβ細胞でのグルコース感受性を増大させ、細胞からのグルコース応答性インスリン分泌能を増加させていることがわかった。一方、妊娠によるβ細胞量増加はKOマウスの膵島

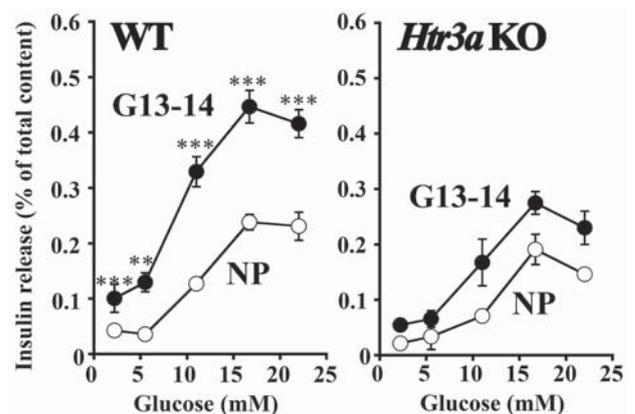


図1. 膵島からのグルコース応答性インスリン分泌のdose-response curve

非妊娠(NP)および妊娠期(妊娠13日-14日)(G13-14)のWTとHtr3a KOマウスより膵島を調製し、各グルコース濃度で30分間刺激した時のインスリン分泌(% of total insulin content)を示した。

でも同様に増加しており、また、妊娠によるKO  $\beta$  細胞のセロトニン発現量はWT  $\beta$  細胞と同程度であった。このように、妊娠期においてHtr3受容体シグナルは $\beta$ 細胞量増加、セロトニン合成に影響を及ぼすことなく、 $\beta$ 細胞のグルコース応答性インスリン分泌能を増加させることがわかった。

Htr3受容体はリガンド依存性非選択性陽イオンチャネルであり、他の細胞での電気生理学実験ではチャネルの活性化により、内向き電流が生じることが知られている<sup>5)</sup>。 $\beta$ 細胞の電気生理学実験を行った所、WT妊娠 $\beta$ 細胞にグルコース2.8mM存在下でsingle cell patch current-clampを行い、Htr3受容体のアゴニストを添加したところ、静止膜電位が脱分極方向にシフトした。対して、KO妊娠 $\beta$ 細胞ではアゴニストによる膜電位の脱分極シフトは見られなかった。このHtr3受容体シグナルによる膜電位シフトは電位依存性 $Ca^{2+}$ チャネルの活性化に影響を及ぼすと考え、膵島内 $\beta$ 細胞のグルコース刺激による細胞内 $Ca^{2+}$ 上昇をFluo3とconfocal顕微鏡を用いて調べた。非妊娠WT膵島にグルコース刺激を行った所、膵島内 $\beta$ 細胞では $Ca^{2+}$ 上昇のグルコース感受性の低い細胞と高い細胞が混在していた(図2A)。ところが、セ

ロトニンが豊富に存在するWT妊娠膵島内 $\beta$ 細胞ではグルコース感受性の高い細胞の割合が多くなった。一方、KO妊娠膵島では $Ca^{2+}$ 上昇のグルコース感受性の高い細胞の増加が見られず、非妊娠と変わらなかった。この $Ca^{2+}$  imaging結果を定量化するために、各膵島内の全ての $\beta$ 細胞の $Ca^{2+}$ 蛍光強度を測定し、刺激前のbasalレベルより2倍以上蛍光強度が増加した細胞をhigh responsive cellとし、それより蛍光強度低い細胞をlow responsive cellとし、各膵島あたりのlow responsiveとhigh responsive cellsの割合を求めたところ、WT妊娠膵島においてのみ、グルコース刺激に対するhigh responsive cellsの割合が増加していた(図2B)。

次いで、インスリン-GFPを発現させてそれぞれの膵島内 $\beta$ 細胞でのグルコース応答性インスリン開口放出を全反射蛍光(TIRF)顕微鏡を用いてTIRF-imaging解析した。WT妊娠膵島では非妊娠膵島に比べて開口放出頻度の高い $\beta$ 細胞の割合が増加しており、膵島当たりの開口放出頻度が非妊娠膵島に比べて大きく増加していた。一方、KO妊娠膵島ではWT妊娠膵島のように開口放出頻度の高い細胞の増加は見られず、膵島当たりの開口放出頻度の増加も観察されなかった。

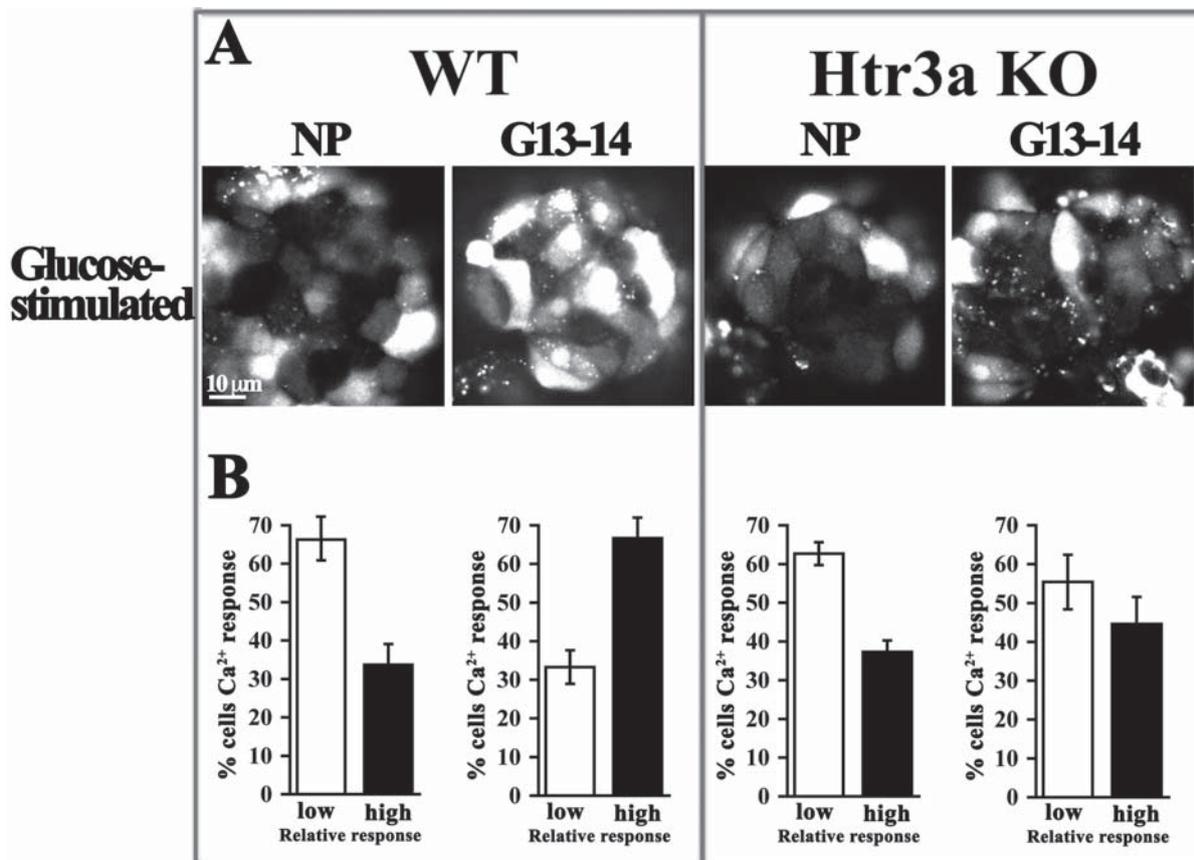


図2. Htr3受容体シグナルは $\beta$ 細胞のグルコース感受性の閾値を低下させる。膵島における $\beta$ 細胞内 $Ca^{2+}$ 上昇をFluo-3法により測定した。

(A) 22mMグルコース刺激下の $\beta$ 細胞の代表的なFluo-3イメージング

(B) 各膵島内グルコース応答性の高い細胞 (high, black column) と低い細胞 (low, white column) の割合。

以上の結果より、妊娠マウス $\beta$ 細胞では自己分泌/傍分泌されたセロトニンによるHtr3受容体シグナルが静置膜電位を脱分極方向にシフトさせ、細胞内 $Ca^{2+}$ 上昇およびインスリン分泌のグルコース感受性の閾値の低下を引き起こす。これにより、グルコース刺激下ではインスリン開口放出頻度の高い $\beta$ 細胞の割合を増加させ、結果として妊娠期では膵島からのインスリン分泌が著しく増大していることがわかった。このように、セロトニンHtr3受容体シグナルは妊娠期におけるグルコース応答性インスリン分泌能増加に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。なお、インスリン抵抗性は妊娠だけでなく、肥満によっても生じ、代償性インスリン分泌亢進が起こることが知られている。この肥満におけるインスリン分泌亢進に及ぼすHtr3受容体の影響についても現在検討を進めている。

#### 参考文献

- 1) Buchanan TA & Xiang AH (2005) J Clin Invest 115, 485-491.
- 2) Sorenson RL & Brelje TC (1997) Hormone and metabolic research. 29, 301-307.
- 3) Kim H, et al. (2010) Nature Medicine 16, 804-808.
- 4) Ohara-Imaizumi M, et al. (2013) Proc Natl Acad Sci U S A. 110, 19420-19425
- 5) Maricq AV, et al. (1991) Science 254, 432-437.

#### 講演記録

- 1) 今泉美佳, 青柳共太, 岡村匡史, 中道洋子, 西脇知世乃, 永松信哉 CDKAL1欠損マウスでは妊娠期の代償性インスリン分泌亢進機能が低下している第57回日本糖尿病学会年次学術集会. 大阪. (2014.5.22-24)  
Kim K, Oh C-M, Ohara-Imaizumi, M, Nagamatsu S, German MS, Kim H. Functional Role of Serotonin in Insulin Secretion Under Diet-induced Insulin-Resistant State 74<sup>th</sup> Scientific Session of American Diabetes Association, San Francisco, CA, USA, June 13-17, 2014
- 2) 今泉美佳, 青柳共太, 岸本拓磨, 永松信哉 有芯顆粒を介したインスリン分泌動態の可視化 (シンポジウム: 神経ペプチドや神経栄養因子の小胞輸送と精神神経疾患) 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学会大会合同年会 奈良 (2014.9.29-10.1)
- 3) 今泉美佳, 藤原智徳, 大塚弘毅 妊娠期 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌亢進機構の解明. 第43回杏林医学会総会 東京 (2014.11.15)
- 4) 今泉美佳, 青柳共太, 岸本拓磨, 永松信哉 ノックアウトマウスを用いたインスリン開口分泌のイメージング解析「シンポジウム: モデル動物を用いたインスリン分泌研究」第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会. 京都 (2015.2.13-14)

#### 論文

- 1) Kim, K., Oh, C. M., Ohara-Imaizumi, M., Park, S., Namkung, J., Yadav, V. K., Tamarina, N. A., Roe, M. W., Philipson, L. H., Karsenty, G., Nagamatsu, S., German, M. S., Kim, H. (2014) Functional role of serotonin in insulin secretion in a diet-induced insulin-resistant state. Endocrinology. 156, 444-52