

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

令和 6 年 4 月 5 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 国立国際医療研究センター
職 名 研究員
研究代表者 志村 まり

下記のとおり令和3年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:21013)

1. 共同研究課題名	糖尿病マウスを用いたシンクロトロンX線顕微鏡による細胞内小分子解析			
2. 共同研究目的	糖尿病マウス検体を対象に、シンクロトロンX線顕微鏡を用いた細胞内小分子(元素、脂質、糖質など)の高分解イメージング技術を応用し、糖尿病の機序解明に貢献する。近年の技術開発より、X線多種のエネルギーを解析することで、従来のタンパク質中心の解析以外に、元素(ミネラル+金属)、脂肪酸、糖や薬剤などの生体小分子(代謝産物)イメージングは技術的には可能となっているが、医学生物応用は未だ乏しい。本年は、蛍光X線によるアルミニウムなどの軽元素動態の解析、回折や吸収X線を用いた細胞内構造や脂質や糖質などの画像解析に向けた研究を展開する。また、昨年度本研究で展開した硬X線による金属との重ね合わせ画像より、糖尿病病態を解析する。			
3. 共同研究期間	令和5年 4月 1日 ~ 令和6年 3月31日			
4. 共同研究組織				
氏名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 志村 まり	国立国際医療研究センター難治性ウイルス感染症研究部 (理化学研究所放射光科学研究センター兼任)	研究員	X線顕微鏡測定解析、及び成果考察	
(分担研究者) 該当無し				
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	分子糖代謝制御分野	氏名	藤谷 与士夫

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同研究計画

- 1) 2022~2023年：硬X線顕微鏡(SXFM)による高分解イメージングと軟X線顕微鏡イメージング準備
 - (ア) 既に開始している糖尿病マウス膵島細胞の蛍光X線顕微鏡(SXFM, SPring-8, BL29)の元素イメージングの継続(藤谷、志村、協力研究者:名大松山)
 - (イ) 学会や論文発表により、国内外に成果発表(志村、藤谷)
- 2) 申請以降 2023~：硬および軟X線顕微鏡イメージング情報の重ね合わせ解析の確立
 - (ア) 軟X線顕微鏡システムによる代謝産物イメージングの確立(東大木村、理研江川)
 - (イ) 学会や論文発表により、国内外に成果発表(志村、藤谷)

7. 共同研究の成果

放射光による膵島細胞の蛍光X線イメージング(本学分子糖代謝制御分野の藤谷教授らとの共同研究)：

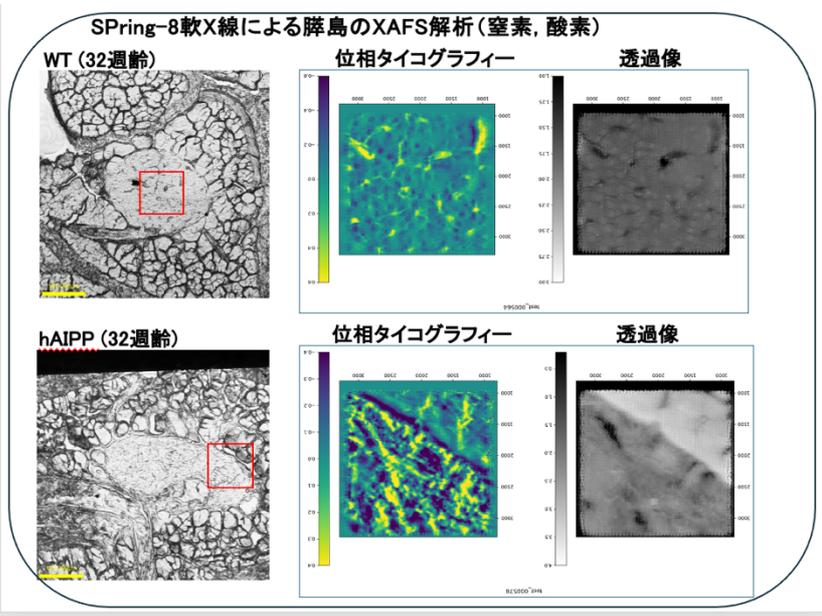
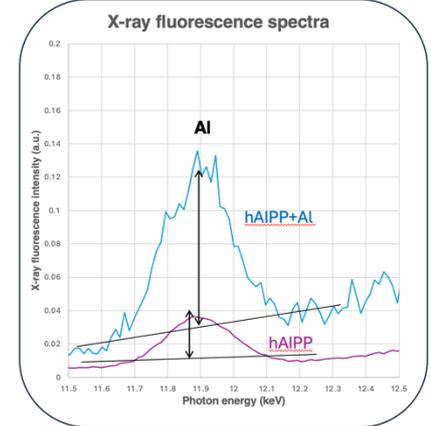
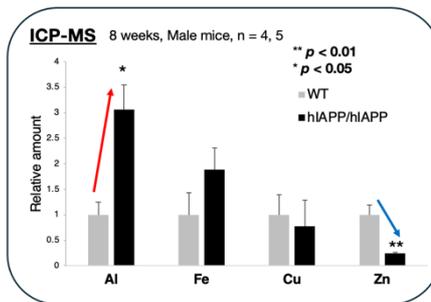
2020年より膵島細胞(膵島、膵臓組織)の高分解元素イメージングを、SPring-8内の走査型蛍光X線顕微鏡システム(SXFM)を用いて展開し、ヒト型糖尿病マウス(hIAPP)膵島において、糖尿病発症前の5週齢で亜鉛の減少が著しく、その後も減少は維持され、糖尿病症状を伴う8週齢以降で鉄の減少が週齢に従って加わることが明らかになった。これらの元素減少は、ミトコンドリア機能障害(膵島機能)との関連が示唆された(Fukunaka A., et al, *Scientific Report*, 2023)。さらに本年度は、膵島組織について、別の視点から解析を進めている。

これまでに、hIAPP 8週齢摘出膵島において、WT 8週齢摘出膵島と比較して、24元素測定中アルミニウム(AI)が有意に増大することを明らかにしている(右図上参照)。5週齢でも同様の傾向が見られたことから、糖尿病症状が出る以前より、AIが膵島に増大することが示唆される。また、hIAPP膵島組織はAI吸着が良いことをLumogallion染色、そして放射光蛍光X線解析(右図中参照)でも明らかにしている。Lumogallion染色は、非特異的な面もあるが、AIを検出する簡便な手法である。機序は未だ不明であるが、hIAPP膵島組織にAIを吸着する何らかの環境変化の可能性が考えられた。

硬X線顕微鏡システム(SPring-8)：硬X線によるAI局在を試みた。AI蛍光X線ピークは臭素(Br)L線ピークと極めて近く重なることや、食餌中Brの除去は難しいことから、AIの微量検出は難しい。hIAPP膵臓組織領域全体のイメージングより、AIが存在することは示唆されたが、ノイズも高かった。

新鮮凍結切片の作成の確立：化学固定より蛋白質はクロスリンクされるが、他の脂質、糖質、またフリーに存在する生体分子の大部分が喪失することを、申請者は報告している(Mastuyama S, et al., JAAS, 2020)。そこで、AIが化学固定処置より喪失した可能性は否定できない。福中らは、新鮮凍結切片の作成を確立し、これまで化学固定後のhIAPP膵島試料では検出できなかったLumogallion染色陽性所見を得ている。これらから、新鮮凍結切片を用いることで、AIが温存できた可能性が考えられ、今後の蛍光X線解析が期待できる。

軟X線顕微鏡システム(SPring-8)：次に、軟X線による膵島組織の解析を試みた。上述のように、ヒト型糖尿病マウス膵島組織はAIが吸着するなど、何らか



かの環境変化が示唆され、hIAPP 膵島においては、hIAPP アミロイド蛋白質発現による変化は否定できない。申請者は東大との共同研究より、回折、吸収及び蛍光 X 線による細胞内小分子（細胞内構造, DNA, 脂質, 糖質, 元素）の同時解析可能な顕微システム (CARROT) の確立に成功している (Kimura T, *et.al.*, *Optics Express*, 2022; Takeo Y, *et al.*, *J Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2023)。前項右下図は、CARROT による膵頭組織の窒素 (N), 酸素 (O) 吸収 X 線像 (raw data) である。多少については追加解析が必要であるが、N は概ね蛋白質と考えると、WT 膵島の特徴的な点状の生体分子 (黄色) は、hIAPP 膵島では連続的である。また、hIAPP 膵島外組織と比較しても、その分布は明らかである。今後は再現性を含めて、変動している生体分子が何であるかのスペクトル解析、hIAPP アミロイドを含めた変性蛋白質がどう変動していくかについて、時系列解析、また炭素 (C) を含めた多変量解析を検討している。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況及び本研究所担当教員との共同研究に関する情報交換 (本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文, 又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお, 論文の場合は, 別刷りを1部提出してください。)

① 本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文
該当なし

② この共同研究に基づくとの記載のある論文:

Fukunaka A*, Shimura M*, Ichinose T, Pereye OB, Nakagawa Y, Tamura Y, Mizutani W, Inoue T, Inoue T, Tanaka Y, Sato T, Saitoh T, Fukada T, Nishida Y, Miyatsuka T, Shirakawa J, Watada H, Matsuyama S, Fujitani Y*, Zinc and iron dynamics in human islet amyloid polypeptide-induced diabetes mouse model. *Sci Rep.* 13(1):3484 (2023). * (corresponding)

③ 学会発表を行った主なもの3件以内(学会名、開催日、演題)

(1) (第 66 回日本糖尿病学会年次学術集会、5 月, 2023, ヒト型糖尿病モデルマウスの膵島における金属動態変化、福中彩子、志村まり、一ノ瀬尊之、井上陽登、田中優人、白川純、松山智至、藤谷与士夫、ポスター

(2) 微量元素学会、9 月, 2023, 特別講演、Applications using synchrotron X-rays in biology and medicine: a point of view in atoms.

(3) 内分泌・代謝学共同研究拠点成果報告会・ワークショップ、12 月, 2023, 放射光を用いた生物医学応用-元素・原子の視点から-

④ 本研究所担当教員と申請代表者との共同研究に関する情報交換の状況(主なやり取りを箇条書き)
定期的な zoom 会議による研究打ち合わせ