

氏名	櫻井孝司
学位（専攻分野）	博士（学術）
学位記番号	総研大甲第222号
学位授与の日付	平成8年3月21日
学位授与の要件	生命科学研究科 生理科学専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Fine structure and secretory function of islet β -cells in the rat pancreas studied by video microscopy
論文審査委員	主査教授 山岸俊一 教授 岡田泰伸 助教授 老木成稔 助教授 湯浅茂樹 教授 寺川進

（浜松医科大学光量子医学研究センター）

論文内容の要旨

A spatial organization of islet β -cells, a secretion of insulin, and a relationship between them were studied without cellular dissociation by using a video-enhanced contrast differential interference contrast (VEC-DIC) microscope. In the rat pancreas, endocrine islet cells appeared with less contrast than exocrine acinar cells, and contained secretory granules (c.a. 0.5-1.2 μm in diameter) more scattered than those in acinar cells. In individual islet cells, the exocytotic response (degranulation) appeared as abrupt light intensity changes of many secretory granules, when the concentration of glucose in the superfusion solution was raised from 1.5 mM to 15 mM. Such responses were observed in most islet cells simultaneously. By counting the number of responses in a unit of time, the time course was studied for quantitative estimation of the secretory activity. The glucose-induced exocytotic response was augmented in the presence of L-arginine (0.3 mM), and was suppressed completely by removal of Ca^{2+} from the medium. The glucose-sensitive cells were sensitive also to elevation of K^+ concentration in the medium from 5 mM to 65 mM, and to addition of A23187 (a Ca^{2+} ionophore, 1 μM), tolbutamide (a sulfonylurea, 100 μM) and bethanechol (a muscarinic agonist, 100 μM) to the medium. The cells that responded to glucose were immunopositive when fixed in mid-response and processed with an HRP-coujugated anti-insulin antibody. After a glucose-induced degranulating response, release of insulin to the extracellular medium was detected by the reverse hemolytic plaque assay. These results indicate that the exocytotic responses induced by glucose stimulation reflect the secretory activity of insulin-containing β -cells.

A three dimensional configuration of β -cells in Langerhans islet was best elucidated when cells were completely degranulated by extensive glucose stimulation. Several β -cells adhered each other, and formed many elliptically shaped clusters ($40.3 \pm 0.8 \mu\text{m}$ for long axis and $35.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ for short one, $n=56$). The cluster of β -cells was clearly visualized also by confocal laser microscopy in tissues stained with lucifer yellow or 8-hydroxy-pyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (an anionic fluorescence chromophore) and by light microscopy in tissues immunostained with anti-insulin antibody. The clustered structure was also recognized in the normally circulated pancreas. The clusters were classified roughly into two classes by their morphological characteristics: a small-sized one consisting of 8.3 ± 0.1 cells ($n=43$) and a large-sized one consisting of 15.5 ± 0.5 cells ($n=13$). The former were located in the center of islet, and the latter in the periphery.

In order to develop a method for analysing secretion of insulin dynamically, the secretory activity of β -cell cluster was examined

quantitatively. Almost all β -cells in a single cluster showed patterns of exocytotic responses similar to each other upon glucose stimulation. Different clusters, sometimes even next neighbors, in an islet showed heterogeneous response patterns. This heterogeneity of β -cell clusters was further demonstrated by immunostaining of tissues fixed in the peak of degranulating response. The heterogeneity became less prominent when the clusters were stimulated with K^+ -rich solution or A23187-containing solution. The patterns of glucose-induced exocytotic response at 35°C were classified roughly into two types: one showing a rapid and transient response, and the other showing a delayed and persistent response. An ensemble average of the responses observed in 40 clusters revealed a biphasic pattern involving an early phase and a late phase, consistent with the earlier observation. These suggest that the biphasic secretion of insulin was ascribed to heterogeneous activities of different β -cell clusters. The time course of the degranulation pattern depended significantly on the size of cluster: the early phase was mostly found in the small-sized clusters, and the late phase in the large-sized ones.

In Langerhans islet, β -cells were arranged in many clusters. These clusters were subdivided into two groups by their cell population and by their degranulation pattern. They concluded that small-sized cluster of β -cells are mostly responsible for the secretion of insulin during brief stimulation, whereas the large-sized cluster of β -cells may significantly contribute to the total insulin release only after prolonged stimulation. The cluster of β -cells functions as a physiological unit for insulin secretion, and a diversity of individual clusters of β -cells may be an essential basis for a multifactorial control of glucose homeostasis.

審査結果の要旨

申請者、櫻井孝司氏は、膵臓の内分泌組織であるランゲルハンス島の構造と分泌機能に興味を持ち、その解析をおこなった。従来、ランゲルハンス島内の β 細胞が意味のある特別な配列をしているのかどうかについては、定説がなく、また、個々の β 細胞が組織の中でどのような時間空間パターンをもってインスリンの放出をしているのかについても、研究する手段が無かった。そこで彼は、生きた組織の3次元的な構造と、分泌の最小単位であるエキソサイトーシス反応とが同時に観察できるビデオ顕微鏡法を、摘出細片化した膵臓組織、または、生体内にある膵臓に応用し、正常組織内の β 細胞の配列を調べ、その構造と機能の相関を検討した。その研究の主な結果は次のようである。

ランゲルハンス島内の細胞に高濃度(15mM)グルコース刺激をすると、細胞内顆粒が一個一個消失する反応が観察できた。同じ反応が、高濃度 K^+ 溶液、トルブタマイド、カルシウムイオノフェアによっても引き起こされた。インスリン抗体を用いた免疫染色法によって、それらの顆粒内にはインスリンが含まれることが証明され、また、免疫溶血反応によって、顆粒の消失反応が見られるときに限って、組織外にインスリンが放出されることが証明された。これらのことから彼は、顆粒の消失反応が β 細胞のエキソサイトーシスであることを結論した。

β 細胞は6~20個が集まってクラスターを形成していた。クラスター間の隙間は、共焦点レーザー顕微鏡下に陰イオン性色素を浸透させて明瞭に可視化できた。同じクラスター内の細胞のインスリン分泌の時間的反応パターンは類似していたが、別のクラスター間では異なるパターンとなった。クラスターには、細胞数の少ない(約8細胞)タイプと多い(約16細胞)タイプがあった。細胞数の少ないタイプでは、グルコースの連続刺激によるエキソサイトーシス反応が、刺激開始直後から7分くらいまでの初期にほぼ集中することが多く、細胞数の多いタイプでは、7分以降から30分にかけての遅延期に集中するものが多かった。これらのことより彼は、 β 細胞のクラスターが、ランゲルハンス島内の構造的な単位となっているだけでなく、異なる分泌特性をもつ機能的な単位となっていることを明らかにした。

この研究は、ビデオ顕微鏡法という形態学的手法をとりながらも、リアルタイム高分解能観察の力を駆使して、これまで直接的に観察することのできなかつた、生きた組織の中のインスリン放出の過程を解析することに成功し、重要な内分泌組織であるランゲルハンス島の形態と機能の相関に関する全く新しい知見を提供したもので、優れたものと評価できる。多数の図を掲載した論文はよくまとまっており、問題点に関する考察も適当である。よって本論文は学位論文にふさわしいものであり、櫻井孝司氏は博士(学術)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと審査員全員一致で判定した。

また、審査委員会は櫻井孝司氏の提出論文の内容、および、関連事項について、多くの質問と試問をおこなった。それらに対する解答内容は概ね適当、明快であり、学問的にも水準の高いものであった。研究技術の応用性と特徴、および、その問題点をよく理解しており、研究内容に関する問題点も適格に把握していた。背景となる研究分野全般に関する質問にも概ね満足のいく解答が得られ、十分な学識を有すると判断された。博士論文の英語も適正であり、語学力も十分と判断された。

以上により、審査委員会は、櫻井孝司氏の論文内容、学識、語学力ともに博士（学術）を授与するに値するものと全員一致で判定した。