

令和元年6月5日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09396

研究課題名(和文) 膵細胞TRPM2を介した新規インスリン分泌惹起経路における蛋白・蛋白機能連関

研究課題名(英文) Functional coupling between proteins related to a novel triggered pathway for insulin secretion via TRPM2 in pancreatic beta-cells.

研究代表者

加計 正文 (KAKEI, Masafumi)

自治医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：90214270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵細胞からのインスリン分泌にはブドウ糖濃度の上昇が重要で、ブドウ糖代謝がKATPチャネルを閉鎖することでインスリン分泌が惹起されると考えられていたが、本研究ではそれ以外の機序として、TRPM2蛋白(チャネル)が関与していることを見出している。TRPM2チャネル開口にはブドウ糖代謝も重要であるが、GLP-1という腸管ホルモンによっても開口し、インスリン分泌をさらに増強する。これらの機序は新しく、特に健常者でのインスリン分泌機構にはTRPM2の方がより重要であることを示唆している。KATPチャネルによる従来の分泌機序に対して、修正が必要であることを提案するインパクトのある研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来考えられていたインスリン分泌機構はKATPチャネル遺族性の機序で、このチャネルの発見(1984年)以来信じられていた。本研究はこの機序に修正を求めるものであり、特に健常者においての修正が重要である。また、今後KATPチャネルの生理的意義はむしろ、肥満誘発の機序として注目されることと思われる。このように生理的意義におけるTRPM2チャネルの重要性と病態的意義としてのKATPチャネルの重要性が区別して議論されることになると、新たな治療薬の開発にも結び付くこととなり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：It has long been believed that the KATP channel plays an important role in insulin secretion evoked by glucose elevation at interstitial space. In the present study we found TRPM2 channel is related more importantly to insulin secretion triggered by glucose as a mechanism other than the above channel. TRPM2 channel opens upon glucose metabolism but also upon GLP-1, intestinal hormone secreted after meal. These mechanisms are novel and postulated for playing major mechanism in healthy man because in these subjects blood glucose level is not increased after meal. We propose this impactful correctional hypothesis as another pathway in addition to KATP channel-dependent pathway in glucose-stimulated insulin secretion.

研究分野：糖尿病学

キーワード：インスリン分泌 TRPM2チャネル KATPチャネル 膵細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ATP-感受性 K⁺チャンネル(KATP チャンネル)はその発見以来、心臓、膵β細胞において、心筋虚血・心筋保護、並びにインスリン分泌機構で中心的役割を果たしていることが多くの論文で報告されてきた。その理由として、心筋においては静止膜電位形成や活動電位持続時間調節で膜安定化と心筋収縮力、エネルギー代謝の調節や心筋保護に重要な役割を果たしていることから、また、膵β細胞においては、グルコース応答インスリン分泌機構の惹起経路として全身のグルコース代謝恒常性という重要な生理的・臨床的意義によるものであった。膵β細胞の KATP チャンネルは血中グルコース濃度上昇によるβ細胞内糖代謝の結果として細胞内 ATP/ADP 比の上昇によるチャンネル抑制と引き続いての膜脱分極と電位依存性 Ca²⁺チャンネル活性化、細胞内への Ca²⁺流入と Ca²⁺濃度上昇の結果、細胞活性化とインスリン開口放出刺激の一連の代謝・興奮・分泌連関というメジャーな情報伝達経路を中心とした理論に基づいていた(惹起経路あるいは KATP チャンネル依存性経路とも呼ぶ)。しかし、正常者における食前血糖値は 100mg/dl 前後の狭い範囲に精密に調節されており、テストミール食後の血糖値上昇の程度はわずか 0.77 mM と報告されている(前値 89.2 ± 1.6 mg/dl vs. 食後 20 分 103.0 ± 2.0 mg/dl)(1)。このわずかなグルコース濃度の変化の時血中インスリンは 6.0 ± 0.7 μU/ml から 30.8 ± 3.3 μU/ml へ上昇していた(1)。この程度の小さなグルコース濃度上昇でもインスリン分泌は刺激されていたが、この現象を KATP チャンネル活性がグルコース濃度上昇の(0.77 mM の上昇)結果により更に抑制されて細胞のインスリン分泌刺激を亢進させたことによるとは考えにくい。従って、それ以外の機序の想定が必要と思われる。

一方膜電位調節におけるイオンチャンネルの位置づけとしては、K イオン透過性の高い KATP チャンネルが抑制されて膜の脱分極がもたらされるためには、静止膜電位が K イオンの平衡電位より正電位側にある生理的状态では、内向き電流を担う別のタイプのイオンチャンネルが必要であり、β細胞静止膜電位である -70 mV ~ -60 mV 付近で開口できるイオンチャンネルとしては非選択的陽イオンチャンネル(背景電流)の存在が必要と理論上は考えられる。本研究では背景電流の一種で TRP(transient receptor potential)チャンネルである TRPM2(transient receptor potential melastatin 2)に注目してβ細胞特に正常におけるインスリン分泌調節のこのチャンネルの重要性について実験的に示した。

次に臨床的な膵細胞機能異常としては、早期の 2 型糖尿病患者においては、グルコース刺激インスリン分泌の第一相低下と GLP-1 感受性異常が報告されている(2)。第一相分泌は前述の惹起経路に相当するグルコース刺激後早期に見られるインスリン分泌応答である。また、GLP-1 は小腸上皮に存在する L 細胞から分泌されるインクレチンホルモンで食事摂取後に分泌され、膵細胞を刺激することが知られている。2 型糖尿病の早期にはインスリン第一相分泌の低下と細胞の GLP-1 応答の低下が報告されており第一相分泌低下は肝臓での糖の取り込みの低下と食後高血糖をもたらす。末梢の高血糖による KATP チャンネル抑制の結果インスリン過剰分泌と高インスリン血症による末梢組織での糖取り込み増加による肥満促進が考えられる。

以上より第一相分泌機構における GLP-1 作用を明らかにすることはこれらの病態の理解に重要であり、以下の実験結果を示し、インスリン分泌機構の新たな概念を提唱する。

2. 研究の目的

以上より第一相分泌機構における GLP-1 作用を明らかにすることはこれらの病態の理解に重要であり、以下の研究を計画した。その結果として、インスリン分泌機構の新たな概念を提唱することを目的とする。

3. 研究の方法

膵β細胞は、ラットあるいはマウスの膵臓から単離されたランゲル半島を更に単一細胞へ単離することで収集し、パッチクランプ法により perforated whole-cell mode で背景電流を測定(保持電位 -70 mV で記録された内向き電流として測定)。KATP チャンネルは 100 μM tolbutamide 存在下で抑制された条件下で記録した。温度は摂氏 30 度で実施した。

4. 研究成果

GLP-1 は生理的濃度で(10 pM ~)背景電流を刺激した(3)。-70 mV の保持電位で GLP-1 を 100 pM で作用させると内向き電流を生じた。静止膜電位に対しては 2.8 mM グルコース下で脱分極した(-64.2 ± 1.3 mV vs. 58.4 ± 2.1 mV, P<0.01)。この電流は -19.2 mV の逆転電位を示し、Ca²⁺イオンを外液から除くと -4.4 mV であったことから Na⁺、Ca²⁺イオンに透過性であることが分かった。背景電流はグルコース刺激(16.6 mM)でも増加した。したがって、グルコースと GLP-1 は背景電流を刺激して、膜脱分極をもたらすが、正常範囲のグルコース(5.5 mM 前後)で KATP チャンネルが中等度抑制されている時には背景電流刺激を介して、インスリン分泌を促進する作用があることが示唆される。

次に情報伝達経路の探索を行った。GLP-1はcAMP産生を促すことが知られているが、膜透過性のcAMP, dibutyryl cAMPはGLP-1と同様に背景電流を刺激した。同様の作用はexendin-4 (ex-4, 加水分解されないGLP-1アナログ)やliraglutide (臨床的にGLP-1アナログとして2型糖尿病患者に使用されている)でもみられ、GIP(小腸上部のK細胞から分泌されるインクレチンホルモンでGLP-1に似た作用をもつ)も同様にこの背景電流を刺激した。Ex-4の作用はex9-39(GLP-1受容体拮抗薬)存在下で防止され、H89(PKAブロッカー)存在下でも防止されず、EPAC activatorの8-pCPT-29-O-Me-cAMP (8-pCPT)は背景電流を活性化した。これら活性化された背景電流は2-APB(2-aminoethyl diphenylborinate:TRPチャンネル阻害薬)で抑制された(3)。

次に、背景電流の同定のために TRPM2 欠損マウスを用いた。ex-4,グルコース GIP, 8-pCPT による背景電流刺激作用は TRPM2 ノックアウト(KO)マウスから単離した細胞ではみられなかったことより、GLP-1, グルコースは TRPM2 チャンネルを刺激することで、インスリン分泌を刺激することが明らかになった。

以上の結果をサマライズすると、グルコース刺激インスリン分泌の惹起経路は KATP チャンネルの活性が代謝により調節されていることには変わらないが、正常者ではグルコース濃度の変動は大きく変わらないことから、ベースとなる KATP チャンネル活性レベルはある程度のところで維持されていると思われる。食事摂取により、GLP-1 分泌が刺激されると GLP-1 受容体を介して cAMP 産生/EPAC2 の刺激により TRPM2 が開口し Ca^{2+} イオンあるいは Na^{+} イオンの流入に伴う内向き電流の活性化により膜は更に脱分極して、インスリン分泌を活性化すると考えられる。これらの作用に対応する GLP-1 濃度は 100 pM 程度の濃度が最も作用しやすい(3)。しかし、より高濃度の GLP-1 も直接あるいは間接的にインスリン開口放出に作用して分泌を刺激している経路も報告されていることから、GLP-1 の作用は多様である(4; 5)。

考察

本研究では、正常者におけるインスリン分泌調節における KATP チャンネルの生理的意義を検討したが、正常者では食後の血糖値も食前血糖値も狭い範囲に調節されていることから KATP チャンネルの活性がこのグルコース濃度変化によってもっぱら変化するとは考えにくい。このように正常者では、KATP チャンネルよりもむしろ TRPM2 チャンネルを介した調節の方が重要であろう。TRPM2 はグルコースによっても活性化され、更に GLP-1 による活性化等が加わることで主なインスリン分泌調節シグナルとして関与していると思われる。GLP-1 作用が不十分な状態である 2 型糖尿病の初期の段階で、第一相分泌が低下していると、肝での糖の取り込み低下による食後高血糖が引き起こされ、結果として、末梢での高グルコース濃度となり、細胞の KATP チャンネルのグルコースによるチャンネル抑制を来し、インスリン分泌が刺激され、高インスリン血症となる。過剰なインスリン分泌状態は 2 型糖尿病の初期状態ではしばしばみられる病態であり、高インスリン血症による末梢へのグルコース取り込みを促進することから、肥満をもたらすこととなる。従って、KATP チャンネルは生理的なグルコース代謝維持機構というより、むしろ肥満で示される、高インスリン血症の病態との変わりが深いチャンネルと考えた方が分かりやすい。

従来、受容体刺激によるインスリン分泌刺激の機序としてのイオンチャンネルの役割については明らかではなかった。この目的で多くの実験がされたが、KATP チャンネルや電位依存性 Ca^{2+} チャンネルへの受容体リガンドの作用連関の明確な証明はなく、報告されても再現性に乏しいものであったが、ここに TRP チャンネルの受容体刺激情報伝達メカニズムとして注目すると理解しやすいことが分かる。事実、我々はグレリンによるインスリン分泌抑制のメカニズムやアドレナリンによるインスリン分泌抑制には cAMP の調節を介しての TRPM2 経路が重要であることを報告した(6; 7)。また、脂肪酸によるインスリン分泌にも TRPC3 の関与を報告した(8)。そのようなことから考えると、KATP チャンネルによるインスリン分泌機構の従来の考え方は一つの基本概念ではあるが、これが生理的にメジャーなインスリン分泌調節経路ではなく、むしろ糖尿病の各種病態における高インスリン血症をもたらす病態的位置づけとして考える必要がある。

TRPM2 チャンネルの細胞における重要性についての研究はまだ糸口としての部位に立っていると思われる。TRPM2 チャンネルのグルコースによる活性化の機序もまだ十分明らかではない(9)。今後の研究が待たれる。

KATP チャンネルによるインスリン分泌機構はチャンネル発見以来 35 年間中心的機能蛋白として位置づけられてきたが、正常者におけるグルコース代謝恒常性維持機構における KATP チャンネルの生理的意義については見直しが必要な段階にあると思われる、今後生理的な分泌機構と病態的な分泌機構を分けて考えることが重要である。

上記説明の参考論文として以下を記す。

(1) Hashimoto S, Mizutani E, Suzuki M, Yoshida A, Naito M: Effects of Aerobic Exercise on Postprandial Carbohydrate and Lipoprotein Metabolism Following Cookie

- Ingestion in Healthy Young Women. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2015;61:299-305
- (2) Woerle HJ, Carneiro L, Derani A, Goke B, Schirra J: The role of endogenous incretin secretion as amplifier of glucose-stimulated insulin secretion in healthy subjects and patients with type 2 diabetes. Diabetes 2012;61:2349-2358
- (3) Yosida M, Dezaki K, Uchida K, Kodera S, Lam NV, Ito K, Rita RS, Yamada H, Shimomura K, Ishikawa SE, Sugawara H, Kawakami M, Tominaga M, Yada T, Kakei M: Involvement of cAMP/EPAC/TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. Diabetes 2014;63:3394-3403
- (4) Seino S, Takahashi H, Fujimoto W, Shibasaki T: Roles of cAMP signalling in insulin granule exocytosis. Diabetes Obes Metab 2009;11 Suppl 4:180-188
- (5) Gromada J, Holst JJ, Rorsman P: Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. Pflugers Arch 1998;435:583-594
- (6) Kurashina T, Dezaki K, Yoshida M, Sukma Rita R, Ito K, Taguchi M, Miura R, Tominaga M, Ishibashi S, Kakei M, Yada T: The beta-cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glycemic effects of ghrelin. Sci Rep 2015;5:14041
- (7) Ito K, Dezaki K, Yoshida M, Yamada H, Miura R, Rita RS, Ookawara S, Tabei K, Kawakami M, Hara K, Morishita Y, Yada T, Kakei M: Endogenous alpha2A-Adrenoceptor-Operated Sympathoadrenergic Tones Attenuate Insulin Secretion via cAMP/TRPM2 Signaling. Diabetes 2017;66:699-709
- (8) Yamada H, Yoshida M, Ito K, Dezaki K, Yada T, Ishikawa SE, Kakei M: Potentiation of Glucose-stimulated Insulin Secretion by the GPR40-PLC-TRPC Pathway in Pancreatic beta-Cells. Sci Rep 2016;6:25912
- (9) Kakei M, Yoshida M, Dezaki K, Ito K, Yamada H, Funazaki S, Kawakami M, Sugawara H, Yada T: Glucose and GTP-binding protein-coupled receptor cooperatively regulate transient receptor potential-channels to stimulate insulin secretion [Review]. Endocr J 2016;63:867-876

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

加計正文 KATP/TRP チャネルの協調的インスリン分泌調節、破綻と病態. 心電図(査読無) 2018; 3 8 : 142-147 . <https://doi.org/10.5105/jse.38.142>

Ito K, Dezaki K, Yoshida M, Yamada H, Miura R, Rita RS, Ookawara S, Tabei K, Kawakami M, Hara K, Morishita Y, Yada T, Kakei M: Endogenous alpha2A-Adrenoceptor-Operated Sympathoadrenergic Tones Attenuate Insulin Secretion via cAMP/TRPM2 Signaling. Diabetes (査読有) 2017;66:699-709 10.2337/db16-1166

Yamada H, Yoshida M, Ito K, Dezaki K, Yada T, Ishikawa SE, Kakei M: Potentiation of Glucose-stimulated Insulin Secretion by the GPR40-PLC-TRPC Pathway in Pancreatic beta-Cells. Sci Rep (査読有) 2016;6:25912 10.1038/srep25912

Kakei M, Yoshida M, Dezaki K, Ito K, Yamada H, Funazaki S, Kawakami M, Sugawara H, Yada T: Glucose and GTP-binding protein-coupled receptor cooperatively regulate transient receptor potential-channels to stimulate insulin secretion [Review]. Endocr J (査読有) 2016;63:867-876, 10.1507/endocrj. E116-0262

Kurashina T, Dezaki K, Yoshida M, Sukma Rita R, Ito K, Taguchi M, Miura R, Tominaga M, Ishibashi S, Kakei M, Yada T: The beta-cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glycemic effects of ghrelin. Sci Rep (査読有) 2015;5:14041 10.1038/srep14041

Yosida M, Dezaki K, Uchida K, Kodera S, Lam NV, Ito K, Rita RS, Yamada H, Shimomura K, Ishikawa SE, Sugawara H, Kawakami M, Tominaga M, Yada T, Kakei M: Involvement of cAMP/EPAC/TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. Diabetes (査読有) 2014;63:3394-3403 10.2337/db13-1868

〔学会発表〕(計 12 件)

今泉 美佳, 青柳 共太, 吉田 昌史, 飛田 耶馬人, 大倉 正道, 山内 肇, 崎村 建司, 中井 淳一, 加計正文, 永松 信哉, 大塚 稔久

アクティブゾーンタンパク質 ELKS のインスリン分泌における役割

第 61 回日本糖尿病学会 年次学術集会 2018 年 5 月

山田 穂高, 船崎 俊介, 吉田 昌史, 伊藤 聖学, 出崎 克也, 川上 正舒, 矢田 俊彦, 石川 三衛, 加計正文, 原 一雄

膵β細胞 GPR40 シグナルは PLC-PKC-TrpC 経路を介してインスリン分泌を増強する
第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会 2018 年 5 月

Joint Meeting of The 10th Asia Pacific Heart Rhythm Society Scientific Session
(APHR2017) & the 64th Annual Meeting of the Japanese Heart Rhythm Society
(JHR2017). September 14-17, 2017 PACIFICO Yokohama

Electrocardiology Frontiers 2017 Basic and Clinical in the KATP Channel

Takei M.

KATP/TRP-channel cooperativity in insulin secretion, dysregulation and metabolic
disorder

藤原 寛太郎, 安東 弘泰, 池口 徹, 吉田 昌史, 加計 正文

TRPM2 チャネルの膜電位特性の数値モデル解析

第 60 回日本糖尿病学会 年次学術集会 2017 年 5 月

伊藤 聖学, 出崎 克也, 吉田 昌史, 山田 穂高, 三浦 李菜, 大河原 晋, 田部井 薫,
川上 正舒, 原 一雄, 森下 義幸, 矢田 俊彦, 加計 正文

生理学的低濃度のアドレナリンは cAMP/TRPM2 経路を介してインスリン分泌を抑制する

第 60 回日本糖尿病学会 年次学術集会 2017 年 5 月

Masafumi Kakei. New regulation mechanism of insulin secretion by incretin
hormones. The symposium on Nutrition and Metabolism. University Medical
Center Ho Chi Minh City Viet Nam. 2016 年 10 月 11 日

犬飼 敏彦, 竹林 晃三, 粟田 卓也, 他 5 名 番目 埼玉県下における 2 型糖尿病患者
に対するシタグリプチンの長期投与の血糖コントロールに対する影響
—SUCCEED Trial—

第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月

山田 穂高, 吉田 昌史, 伊藤 聖学, 他 5 名 番目 膵β細胞における脂肪酸受容
体 GPR40 を介する新規インスリン分泌メカニズム

第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月

今泉 美佳, 青柳 共太, 吉田 昌史, 他 8 名 番目 インスリン開口分泌におけるア
クティブゾーン構成タンパク質 ELKS の役割

第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月

伊藤 聖学, 吉田 昌史, 山田 穂高, 他 7 名 番目 アドレナリンによるβ細胞背景
電流抑制によるインスリン分泌抑制作用

第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月

出崎 克也, 倉科 智行, 吉田 昌史, 他 2 名 番目 グレリンのインスリン分泌・糖
代謝作用における膵β細胞 vs 全身 GHS-R の役割

第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月

吉田 昌史, 出崎 克也, 伊藤 聖学, 他 6 名 番目 グレリンの cAMP-EPAC-Trpm2 経
路に及ぼす影響の検討

第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。