

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07345

研究課題名(和文) 糖尿病発症における小胞体ストレス誘導性カルシウムシグナリングの関与の解明

研究課題名(英文) The involvement of ER stress-induced Ca<sup>2+</sup> signaling with the development of diabetes mellitus

研究代表者

山本 伸一郎 (Shinichiro, Yamamoto)

帝京平成大学・薬学部・准教授

研究者番号：10542102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵島細胞において酸化ストレスによる TRPM2 依存性細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が認められた。一方、高グルコース刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇は TRPM2 非依存性であった。糖尿病モデルマウスである Akita マウスを用いて糖尿病の増悪における TRPM2 の関与を検討した。Akita マウスで認められた経時的な血糖値上昇、耐糖能異常、インスリン分泌低下、および膵島細胞におけるインスリン含量は、Trpm2 遺伝子欠損により改善した。これらの結果は、膵臓 細胞障害に TRPM2 が関与していることを示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在二型糖尿病における 細胞を標的にした薬としてインスリン分泌を促進させる薬が主に使用されている。しかしインスリン分泌を促進させ続けることは小胞体ストレスならび 細胞障害を促進することにつながる。本申請研究では二型糖尿病の発症および増悪への TRPM2 の関与を明らかにし、 細胞における二型糖尿病の発症および増悪を防ぐ創薬のターゲットとしてTRPM2 を提示できた。従って本申請研究により二型糖尿病発症に新たな側面からのアプローチを可能にし、新規創薬ターゲット分子を提示できたと言える。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress induced TRPM2-dependent intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration increases in islets, although high glucose-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration increases were TRPM2-independent. Next, we investigated the involvement of TRPM2 with the aggravation of diabetes mellitus by using diabetes model mice, Akita mice. Akita mouse has a mutation (Cys96Tyr) in the insulin 2 gene. The mutant insulin induce beta cell damage accompanied with ER stress, leading to the development of diabetes mellitus. Blood glucose elevation, glucose tolerance disorder, and the decrease of insulin secretion, and insulin content in islets observed in Akita mice were improved by Trpm2 deficiency.

These data suggested that TRPM2 is involved in the development of diabetes mellitus accompanied with ER stress-induced beta cell damage.

研究分野：カルシウムシグナリング

キーワード：Ca チャネル 小胞体ストレス 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

### ・小胞体ストレスと膵臓 $\beta$ 細胞障害

小胞体は分泌タンパク質および脂質合成を行う細胞内小器官であり、細胞内における  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵庫としても知られている。また小胞体は様々な細胞応答を引き起こすためのプラットフォームとしても機能している。小胞体は生体内において極めて重要な役割を担っており、小胞体の恒常性の異常は多くの疾患に関与することが知られている。特に分泌細胞である膵臓  $\beta$  細胞における小胞体の恒常性の破綻については 2 型糖尿病との関連が指摘されている。

分泌タンパク質はメッセンジャー RNA から翻訳されると小胞体内に移行する。小胞体内で分泌タンパク質は高次構造を獲得するために、そのタンパク質を構成するアミノ酸鎖の折りたたみ (folding) などの翻訳後修飾をうける。そして正しく高次構造を獲得したタンパク質が細胞外に分泌される。しかし正しく折りたたまれない不良タンパク質 (unfolded protein) も産生され、不良タンパク質が小胞体内に蓄積すると小胞体ストレスを惹起し、細胞障害を引き起こす。

膵臓  $\beta$  細胞はインスリンを分泌することで血糖を低下させることができる唯一の分泌細胞である。特に、高血糖下ではインスリンを大量に合成・分泌し、血糖をコントロールしなければならない。高血糖状況が持続すると、 $\beta$  細胞において小胞体ストレスが引き起こされる。この小胞体ストレスは高まったインスリン合成需要に対して小胞体の folding 能が追いつかず、unfolded protein の蓄積により引き起こされると考えられている。このような小胞体ストレスによる小胞体の恒常性の破綻が 2 型糖尿病の発症に関与する。小胞体ストレスは  $\beta$  細胞において活性酸素種や炎症性サイトカインの産生を引き起こす。そして血球細胞の浸潤を伴って、 $\beta$  細胞障害をもたらされることが指摘されている。従って 2 型糖尿病は炎症性疾患の側面を有していると言え、2 型糖尿病と小胞体発の炎症応答の重要性が近年認識されつつある。2 型糖尿病における小胞体ストレスと活性酸素種・炎症性サイトカイン産生の重要性は認識されているが、詳細な機構については明らかにされていない。

### ・活性酸素種によって活性化される $\text{Ca}^{2+}$ チャネル ~TRPM2~

形質膜上に発現する TRPM2 は  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルであり活性酸素種などの酸化ストレスによって活性化される。TRPM2 は免疫細胞や膵臓の  $\beta$  細胞に高い発現が認められている。申請者はこれまで単球/マクロファージにおいて活性酸素種による TRPM2 の活性化を介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入が炎症性サイトカイン産生誘導に関与することを明らかにした。また申請者らは  $\beta$  細胞において、TRPM2 は酸化ストレスにより細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こす  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルとして機能していることを明らかにしている。

## 2. 研究の目的

2 型糖尿病は小胞体ストレスと密接な関連があり、小胞体ストレスの亢進に伴う活性酸素種や炎症性サイトカインの産生が細胞障害を引き起こすことが知られている。申請者らはこれまで TRPM2 が  $\beta$  細胞において酸化ストレス状況下  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングを引き起こし、単球/マクロファージにおいては TRPM2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングが炎症性サイトカイン産生を引き起こすことを明らかにしている。そこで申請者は、 $\beta$  細胞において小胞体ストレスによる活性酸素種産生と炎症性サイトカイン産生をつなぐ分子実態として TRPM2 に着目し、2 型糖尿病の発症および増悪への TRPM2 の関与を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### ・膵島を用いた *in vitro* 検討

マウスの膵臓から調製した膵島を用いてまず酸化的ストレスによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇について  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Fura-2 を用いて検討した。さらに TRPM2 欠損マウスから調製した膵島を用いてその  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇への TRPM2 の関与を検討した。

### ・Akita マウスおよび *Trpm2* 欠損マウスを用いた *in vivo* 検討

2 型糖尿病モデルマウスの一つとして使用される Akita マウスはヒトのインスリンに相当するインスリン 2 の遺伝子に変異をきたしており、96 番目のアミノ酸残基であるシステインがチロシンに置換されるインスリン 2 が産生される。変異インスリン 2 は正しく折りたたまれないことが出来ず、不良タンパク質として小胞体内に蓄積する。その結果、小胞体ストレスを惹起し、細胞障害を伴うインスリン分泌低下を引き起こす。

膵臓  $\beta$  細胞と小胞体ストレスに特化するためにも Akita マウスを用いて、*Trpm2* 欠損マウスと Akita マウスを用いて *Trpm2* 欠損 Akita マウスを作製し、検討を行った。そして経時的に体重、および血糖値を観察した。糖負荷による耐糖能、およびインスリン分泌能、インスリン感受性、および膵臓  $\beta$  細胞におけるインスリン含量について検討を行った。

## 4. 研究成果

・膵島における過酸化水素、および高グルコース刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化

野生型マウスから調製した膵島細胞における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を検討したところ、30、および 100 M 過酸化水素 (100 M) により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が認められた。一方、*Trpm2* 欠損マウスから調製した膵島細胞においては、その細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は認められなかった。また野生型および *Trpm2* 欠損マウスから調製した膵島細胞における高グルコース (11.5 mM) 刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化についても検討したところ、両膵島細胞共に高グルコース刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇が認められ、野生型および *Trpm2* 欠損膵島細胞間で違いは認められなかった。従って、膵島細胞における過酸化水素による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に TRPM2 が関与しており、高グルコース刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇には TRPM2 が関与しないことが示された。また興味深いことに、調整した膵島細胞を高グルコースで培養し、過酸化水素刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を観察したところ、低グルコースで培養した膵島細胞と比較して、過酸化水素による TRPM2 依存的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇の増加が認められた。

・糖尿病モデルマウス Akita マウスにおける糖尿病の増悪への TRPM2 の関与の検討

*Trpm2* 欠損マウスと Akita マウスを用いて、*Trpm2* 野生型 Akita マウス、および *Trpm2* 欠損 Akita マウスを作製し、4 週齢以降の各週齢における体重、および血糖値について比較を行った。通常の Akita マウスに相当する *Trpm2* 野生型 Akita マウスは、週齢を増すごとに血糖値の上昇が認められた。一方、*Trpm2* 欠損 Akita マウスは、週齢を増すごとに血糖値の上昇は認められるが、*Trpm2* 野生型 Akita マウスと比較してその上昇が抑制されていた。また *Trpm2* 野生型、および *Trpm2* 欠損 Akita マウスの各週齢における体重は、同じであった。そこで、6 週齢マウスを用いて絶食 16 時間後のグルコース負荷による耐糖能、およびインスリンインスリン分泌について検討を行った。*Trpm2* 野生型 Akita マウスは、グルコース負荷により非常に高い血糖上昇を引き起こされた。一方、*Trpm2* 欠損 Akita マウスは、その上昇が抑制されていた。またグルコース負荷 30 分後の血中のインスリン濃度は、*Trpm2* 野生型 Akita マウスより *Trpm2* 欠損 Akita マウスの方が高かった。続いて 6 週齢マウスの絶食 16 時間後の膵島におけるインスリン含量を測定したところ、膵島におけるインスリン含量は、*Trpm2* 野生型 Akita マウスより *Trpm2* 欠損 Akita マウスの方が高かった。一方、インスリン感受性については、*Trpm2* 野生型、および *Trpm2* 欠損 Akita マウス間で違いは認められなかった。これらの結果は、小胞体ストレスによる膵臓  $\beta$  細胞障害に TRPM2 が関与していることを示すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本伸一郎
2. 発表標題 タンパク質品質管理機構と Transient receptor potential melastatin 2
3. 学会等名 分子から個体へ：俯瞰と接近の生命科学
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----