

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08525

研究課題名(和文) 膵 細胞内GLP-1/グルコレセプター/KATPクロストークの分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of GLP-1/glucoreceptor/KATP crosstalk in pancreatic b cells

研究代表者

吉田 昌史 (Yoshida, Masashi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50528411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：健康人におけるインスリン分泌第1相分泌の機序解明は2型糖尿病発症予防に直結するが、注目されていない。我々は、新規インスリン分泌経路(Trpm2経路)を発見し、その存在が第1相分泌に不可欠であることを報告した。本研究はTrpm2経路の障害が糖尿病発症に関与すると仮説を立て立案した。本研究で我々は、新規糖尿病薬イメグリミンの作用機序を見出し、GKラットはグルコース/CD38/cADPRを介する経路の障害により2型糖尿病を発症する事を明らかにした。新たな糖尿病発症機序を解明した点で、本研究から得られた成果の意義は大きい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病患者は増加の一途であり、その合併症による患者の生活の質低下のみならず、医療経済的にも大きな問題となりつつある。しかしながら、多くの研究者が治療薬や治療法の開発・研究に注力しているものの、発症予防に主眼を置いた研究は殆ど無い。本研究は2型糖尿病発症初期段階で低下する第1相インスリン分泌の機序解明と、障害部位の同定、治療介入による2型糖尿病発症抑制を目的として立案した。本研究で我々は新たな2型糖尿病発症機序を見出し、新規糖尿病薬イメグリミンはその経路を介してインスリン分泌を増強することを証明し、報告した。糖尿病発症抑制研究の道筋を示した点で、本研究成果の意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Although elucidating the mechanism of first phase insulin secretion in healthy individuals is directly linked to the prevention of type 2 diabetes, this has not received much attention. We have discovered a new insulin secretion pathway (Trpm2 pathway) and reported that its existence is essential for the first phase insulin secretion. This study hypothesized that impairment of the Trpm2 pathway is involved in the onset of diabetes. In this study, we discovered the mechanism of the new antidiabetic drug Imeglimin, and demonstrated that GK rats develop type 2 diabetes due to impairment of the glucose/CD38/cADPR-mediated pathway. The results of this study are significant in that they have revealed a new mechanism of diabetes onset.

研究分野：膵 細胞インスリン分泌

キーワード：膵 細胞 インスリン分泌 TRPM2 cADPR ランゲルハンス等

## 1. 研究開始当初の背景

インスリンは膵細胞から分泌され、血糖値を低下させる唯一のホルモンである。インスリン分泌には「食直後に素早く血中インスリン濃度が上昇」する第1相と、その後続く第2相があり、2型糖尿病の発症に先行して第1相が低下する。初期の2型糖尿病患者は、空腹時血糖は正常にも関わらず食後血糖が上昇するが (PLoS One. 2013;8(7):e71102)、その原因は第1相分泌の低下である。日本糖尿病学会が定める「空腹時血糖値の判定区分」によると、空腹時血糖値 100 mg/dl までが正常型と判定されるが、実際にはその時点でインスリン分泌の第1相が 50%程度にまで低下している (J Clin Endocrinol Metab. 1976 Feb;42(2):222-9)。インスリン分泌第1相の低下が2型糖尿病発症の要因であるならば、インスリン分泌機序の未解明な部分を解明し、第1相低下の予防法を示すことは重要な研究課題である。1970年代、インスリン分泌機序には2つの説が存在した。グルコースが膵細胞表面に存在するグルコース受容体を直接刺激し、インスリンが分泌されるとする「グルコレセプター説 (Science. 1974 Oct 11;186(4159):150-1)」と、グルコースが膵細胞内で代謝され、インスリン分泌が惹起されるとする「代謝説」である。論争の末、ATP 依存性 K<sup>+</sup>チャネルの発見により、細胞内代謝による KATP 経路が確立され、グルコレセプター説は忘れ去られてしまった。以来、膵細胞インスリン分泌は「血糖上昇に伴う」KATP 閉口により惹起されると考えられてきた (KATP 経路)。しかし、本経路には「臨床的」にも「基礎的」にも矛盾がある。まず臨床的な矛盾としては、本経路では健常人のインスリン分泌を説明できない点が挙げられる。近年持続血糖モニタリングシステムが臨床応用されるようになり報告も多数あるが、健常人では食後においても血糖値の上昇が無い。つまり、健常人では KATP は常に一定の割合で閉じており、KATP 経路で食直後の第1相分泌を惹起することは理論的に不可能である。次に、基礎的な矛盾点を述べる。KATP の閉口だけでは細胞膜の脱分極は理論的に生じず、インスリン分泌は惹起されない。なぜなら細胞の膜電位は、KATP を主とする外向き電流 (細胞内 細胞外) と、内向き電流である背景電流のバランスで決まるからである。KATP が閉口し、相対的に内向きの背景電流が大きくなり初めて細胞膜は脱分極する。つまり、ブドウ糖刺激インスリン分泌機構において背景電流の存在は必要不可欠であり、その事実は我々も証明してきた。つまり、定説とされてきた KATP 経路も不完全だったのである。そこで近年再び「グルコレセプター説」が注目を集めている。膵細胞に存在する甘味受容体 T1R3 のホモダイマーがグルコース感知受容体として作用し、活性化により自身の代謝を促進することが報告されたのだ (Endocr J 61:119-131, 2014)。我々はグルコースが何らかのシグナルを介して膵細胞内の cAMP 濃度を増加させ、背景電流の一種である transient receptor potential melastatin 2 (Trpm2) を開口することでインスリン分泌を増強することを報告したが、素早い cAMP 産生の機序は不明であった。グルコース感知受容体刺激は膵細胞内 cAMP 濃度を高めることから (PLoS One. 2015 Dec 2;10(12):e0144053。) Trpm2 経路を増強している可能性が強く示唆される。つまり、「グルコレセプター説」が、Trpm2 経路を介して「代謝説」の矛盾点を補っている可能性がある。これまで未解明であった2型糖尿病患者におけるインスリン分泌第1相の低下は、グルコース感知受容体シグナル、Trpm2 経路シグナルの異常が原因となっている可能性がある。本研究にて検討する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵細胞 KATP 非依存性インスリン分泌機構を解明し、2型糖尿病発症初期段階でのインスリン分泌低下機序を示し、その防止法を確立する事で2型糖尿病の発症自体を抑制する事である。KATP 経路発見以降、インスリン分泌研究はその機構解明を中心に展開し、その後糖尿病研究の中心は「インスリン分泌」から「インスリン抵抗性」の研究へと移行した。現在、2型糖尿病病態解明研究に関しても、インスリン抵抗性を中心に議論されることが殆どであり、インスリン分泌機構との関連を検討した研究は無い。また、インスリン分泌機構に関する過去の検討は、その殆どが KATP 経路を中心に実施され、その矛盾点を電気生理学的に指摘した研究は無い。本研究は1970年代以降、存在すら否定されていたが、近年注目を集めている「グルコレセプター説」にも焦点を当てる。研究代表者は過去に、新規インスリン分泌経路 (Trpm2 経路) を解明し、報告したが、本研究ではグルコース感知受容体シグナルが Trpm2 経路を介し、KATP 経路の矛盾点を補っていると考え、検討する。1970年代以降、論争のあった「グルコレセプター説」と「代謝説」が、実はお互いに支え合っていた可能性があり、それを解明し、2型糖尿病発症機序解明に結び付けようとする本研究は学術的独自性を有し、新規的である。本研究により得られる成果の意義は大きい。

### 3. 研究の方法

- A 糖尿病モデル動物におけるインスリン分泌第 1 相低下と Trpm2 経路の関連を明らかにする  
B Trpm2 経路を介し、インスリン分泌に影響を及ぼす物質の発見とシグナルの検討  
C グルコース感知受容体刺激経路と 2 型糖尿病発症との関連についての検討  
上記 A, B, C の実験を下記の手法にて実施する。
- A 糖尿病モデル動物におけるインスリン分泌第 1 相低下と Trpm2 経路の関連を明らかにする
- A- 糖尿病発症初期段階の患者と同様に、先ず第 1 相インスリン分泌低下および第 2 相分泌の増加が生じ、その後糖尿病が顕在化する 2 型糖尿病を発症するモデル動物を見極める。具体的には、各種糖尿病モデル動物を若年から飼育し、週齢おきに経口ブドウ糖負荷試験を実施する。
  - A- 本研究で用いる 2 型糖尿病モデル動物確定後は、そのモデルを用いてインスリン分泌第 1 相低下時の障害部位同定を開始する。膵島を用いたインスリン分泌測定実験、電気生理学的手法（パッチクランプ法）を用いる。適宜、膵島還流・細胞内  $Ca^{2+}$  測定実験を実施する。
  - A- A- にて、糖尿病モデル動物におけるインスリン分泌第 1 相低下時の障害部位が同定された場合、同部位に作用する物質を投薬する事で 2 型糖尿病発症抑制が可能かどうかを検討する。
- B Trpm2 経路を介し、インスリン分泌に影響を及ぼす物質の発見とシグナルの検討
- Trpm2 チャンネルは膵 細胞内 cAMP 上昇を介して開口する。グルカゴンなど、細胞内 cAMP 上昇を介してインスリン分泌を促進するとされる物質は多数報告があるが、そのシグナルは不明である。我々はその多くが Trpm2 を介すると考え、A と同様の手法を用い検討する。これまで我々はグレリン、アドレナリン、インクレチンホルモンが Trpm2 に関与することを報告している。各物質間の相互作用も検討する。cAMP を介さない Trpm2 増強経路の存在が示唆された場合、そのシグナル解析を実施する。
- C グルコース感知受容体刺激経路と 2 型糖尿病発症との関連についての検討
- C- A- にて選定した 2 型糖尿病モデル動物から単離した膵島、膵 細胞を用いる。グルコース感知受容体刺激は cAMP を介してインスリン分泌を増加させる事が知られている。我々はこれまでグルコース及びインクレチン刺激が、細胞内 cAMP の増加を介して Trpm2 チャンネルを開口させ、インスリン分泌を増強させることを報告してきた。A の検討の結果、糖尿病モデル動物にて cAMP を介するインスリン分泌経路の障害が明らかとなった場合、以下の C- 、C- 、C- を実施する。
  - C- 電気生理学的手法（パッチクランプ法）を用い、Trpm2 電流の計測を実施し、人工甘味料である Sucralose の Trpm2 電流に対する作用を検討する。Sucralose は膵 細胞に存在するグルコース感知受容体を刺激する事が報告されている（Endocr J. 2016 Aug 31;63(8):715-25.）。本実験にて Trpm2 電流の増加が観察された場合、Trpm2 シグナルの上流にグルコース感知受容体が存在することを明らかにすることができる。
  - C- C- と同様の手法を用い、Lactisole がグルコースによる Trpm2 電流の増加を打ち消すかどうかを検討する。Lactisole はグルコース感知受容体を抑制する（J Endocrinol. 2015 Jul;226(1):57-66.）。我々は過去にグルコースが膵 細胞内 cAMP の増加を介して Trpm2 を開口させることを報告した。本実験結果により、Trpm2 シグナルの上流にグルコース感知受容体があるかどうかが明らかになる。
  - C- C- 、C- 、C- の結果、グルコース/cAMP を介する経路の障害が 2 型糖尿病発症要因である可能性が示唆され、その経路の上流にグルコース感知受容体の存在が確認された場合、シグナルの解析を実施し、障害部位の同定に着手する。

## 4. 研究成果

### (1) アクティブゾーンタンパク ELKS が膵 細胞インスリン分泌に与える影響の検討

神経シナプスからの神経伝達物質放出は、プレシナプス膜直下のアクティブゾーンによって生じる。このアクティブゾーンでは神経伝達物質の極性分泌とタイミングを制御されているが、その重要な役割を担っているのがアクティブゾーン蛋白質である。アクティブゾーン蛋白質の一種である ELKS が膵 細胞にも発現しており、これまで我々が研究継続してきたインクレチンホルモン GLP-1 同様、インスリン分泌第 1 相に影響を及ぼし、糖尿病モデル動物ではその発現が低下している事が明らかとなった。我々は、GLP-1 は Trpm2 を介してインスリン分泌の第 1 相を増強する事を報告していた事から、インスリン分泌に同様の影響を及ぼす ELKS も同様に Trpm2 に関与する可能性が示唆され、糖尿病発症要因となっている可能性が考えられた。そこで、ELKS が Trpm2 に関与するかどうかを検討した。その結果 ELKS は L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルと複合体を形成している事が明らかとなり、Trpm2 経路とは無関係であることが分かった。ELKS は膵 細胞の毛細血管側の細胞膜近傍に偏って局在している事も明らかとなり、本研究結果により、これまで未解明であったインスリンの極性分泌機構が明らかとなった。

### (2) 糖尿病モデル動物

2 型糖尿病患者患者と同様の経過で 2 型糖尿病を発症するモデル動物の選定を行った。同一個体で週齢に応じて経口ブドウ糖負荷試験を実施した結果、GK ラットでは週齢と共に徐々にインスリン分泌第 1 相が低下し、それに続いて 2 型糖尿病を発症する事が明らかとなった。膵島を用いたインスリン分泌実験においても同様の結果が得られた。これらの結果から、本研究では GK ラットを病態モデルとして使用する事とした。

### (3) グルコース感知受容体/cAMP/Trpm2 経路と 2 型糖尿病

これまで我々はグルコース/cAMP/Trpm2 を介するインスリン分泌経路を報告してきた。本経路の障害が 2 型糖尿病発症要因ではないかと仮説を立て、本研究を立案したが、GK ラットにおいては 2 型糖尿病発症後も本経路は残存し、インクレチン関連薬は作用した。GK ラットではグルコース感知受容体刺激による cAMP 増加反応も保たれている可能性が高いことが示唆され、2 型糖尿病発症の機序としてグルコース感知受容体が関与している事の証明は本研究では実現できなかった。病態モデルの再選定等を実施した上での再検討が必要と考える。

### (4) 新規糖尿病薬イメグリミンの作用機序解明

新規糖尿病治療薬イメグリミンは、インスリン分泌第 1 相を増強し、血糖コントロールを改善させる。機序としては膵 細胞内のサルベージ経路を活性化し、 $NAD^{+}$  を増加させる事で CD38 を介して cADPR を産生し、cADPR が小胞体からの  $Ca^{2+}$  流出を増加させる事で細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が高まり、その結果インスリン分泌が増強されると推定されていたが、明らかではなかった。我々は前述の通り、インスリン分泌第 1 相惹起には Trpm2 チャンネルの存在が必要不可欠である事を明らかにしてきたが、近年 cADPR が直接 Trpm2 を開口させるとの報告が出てきた。そこで我々は、イメグリミンのインスリン分泌増強機序として CD38/cADPR/Trpm2 を介する経路も存在すると仮説を立て、cAMP 非依存性 Trpm2 経路探索目的に研究を開始した。我々の検討でもイメグリミンは膵 細胞内  $NAD^{+}$  濃度を増加させる事が明らかとなった。更にイメグリミンは細胞外グルコース濃度が低値の場合はインスリン分泌を増加させないが、細胞内グルコース濃度を上昇させるとインスリン分泌を増強した。この結果から、イメグリミンは確かにインクレチンホルモン同様にグルコース濃度依存性インスリン分泌増強作用があることが証明された。イメグリミンのインスリン分泌増強作用が cADPR 依存性かどうかを確認する目的で、cADPR インヒビター存在下にてインスリン分泌測定を実施したところ、イメグリミンによるインスリン分泌増強作用は打ち消された。イメグリミンのインスリン分泌増強作用が Trp チャンネルを介するかどうかを確認するために、Trp チャンネルブロッカー存在下でインスリン分泌測定を実施したところ、イメグリミンによるインスリン分泌増強作用は打ち消された。イメグリミンのインスリン分泌増強作用が Trpm2 チャンネルを介するかどうかを確認する目的で、Trpm2 KO マウスを用いて実験を実施したところ、Trpm2 KO マウスではイメグリミンによるインスリン分泌増強作用が確認されなかった。電気生理学的手法(パッチクランプ法)を用いて電流密度を測定した結果、野生型マウスではイメグリミン投与により内向き電流の増加が観察されたが、Trpm2 KO マウスでは観察されなかった。以上の結果から、新規糖尿病治療薬イメグリミンは、CD38/cADPR/Trpm2 を介してインスリン分泌を増強している事が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada H, Yoshida M, Suzuki D, Funazaki S, Nagashima S, Masahiko K, Kiyoshi O, Hara K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Effectiveness and Safety of Once-Weekly Semaglutide in Japanese Patients with Type 2 Diabetes in Treatment Intensification: A Retrospective Observational Single-Center Study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diabetes Ther.	6. 最初と最後の頁 1779-1788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13300-022-01313-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Funazaki S, Yoshida M, Yamada H, Kakei M, Kawakami M, Nagashima S, Hara K, Dezaki K.	4. 巻 Jan;13(1)
2. 論文標題 A novel mechanism of Imeglimin-mediated insulin secretion via the cADPR - TRP channel pathway.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 34-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13669	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Yamauchi H, Yoshida M, Mori MX, Hida Y, Tran HN, Ohkura M, Abe M, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H, Hara K, Sakimura K, Nagamatsu S, Mori Y, Nakai J, Kakei M, Ohtsuka T.	4. 巻 Jan 29;26(5)
2. 論文標題 ELKS/Voltage-Dependent Ca <sup>2+</sup> Channel- Subunit Module Regulates Polarized Ca <sup>2+</sup> Influx in Pancreatic Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 1213-1226.e7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.12.106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田昌史
2. 発表標題 イメグリミンの血糖依存性インスリン分泌促進作用について ~最適患者像を考える~
3. 学会等名 第57回糖尿病学の進歩（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 船崎俊介、吉田昌史、他
2. 発表標題 グルコース/cADPR/Trpm2クロストーク異常と2型糖尿病発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船崎俊介、吉田昌史、山田穂高、鈴木大輔、犀川理加、加計正文、出崎克也、原一雄
2. 発表標題 グルコース/cADPR/TRPM2クロストークの異常と2型糖尿病発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船崎俊介 吉田昌史 山田穂高 犀川理加 鈴木大輔 天本美里 松本裕子 原一雄
2. 発表標題 膵 細胞内グルコース/cAMP/Trpm2クロストークの異常と2型糖尿病発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田穂高、吉田昌史、伊藤聖学、出崎克也、川上正舒、石川三衛、加計正文、原一雄
2. 発表標題 膵 細胞GPR40刺激のK-ATPチャネル非依存的インスリン分泌メカニズム
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 膵 細胞GPR40シグナルはPLC-PKC-Tr pC経路を介してインスリン分泌を増強する
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今泉美佳、青柳共太、吉田昌史、飛田邪馬人、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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------