

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19209006

研究課題名(和文) 温度感受性 TRPM2 チャンネルの生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological significance of thermosensitive TRPM2 channel

研究代表者

富永 真琴 (TOMINAGA MAKOTO)

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号：90260041

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：温度・TRPM2 チャンネル・免疫機能・インスリン分泌・膵臓

#### 1. 研究計画の概要

既知の TRP チャンネルの温度感受性をスクリーニングし、TRPM2 が体温近傍の温度で活性化する  $Ca^{2+}$ 透過性の高い非選択性陽イオンであることを明らかにし、膵臓ラ氏島β細胞でのインスリン放出に関与することを見いだしてきた。膵臓での TRPM2 機能制御によるインスリン分泌調節を目指し、TRPM2 のインスリン放出における役割を分子レベルで明らかにするとともに個体レベルでの関与も解明することを第一の目的とする。また、TRPM2 は免疫細胞での発現が確認されている。そこで、体温変動、とりわけ発熱時の免疫機能活性化に TRPM2 の機能増強が関わっているかどうかを明らかにすることを第二の目的とする。

##### (1) インスリン放出への TRPM2 の関与の検討

① 膵臓組織切片での多重染色による、より詳細な TRPM2 発現解析を行う。② TRPM2 作用物質の網羅的スクリーニング。③ 野生型マウスおよび TRPM2 欠損マウスの膵臓ラ氏島を用いて、糖依存性・温度依存性のインスリン放出量を検討する。④ ブドウ糖のみならず、脂質やアルギニンなど多くのインスリン放出刺激が知られており、それらの刺激によるインスリン放出の温度依存性を検討する。⑤ 個体レベルにおける血糖調節能の検討を行う。

##### (2) 免疫細胞の温度による活性化機構の解明

① 免疫系培養細胞での温度刺激による細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度増加、膜電流応答を観察する。② 野生型マウスの脾臓またはリンパ節から免疫細胞を調整し、磁気ビーズ法によって B 細胞および T 細胞を単離し、その精度をフロー

サイトメータを使用して確認する。そして、温度刺激によって応答が得られるかどうかを  $Ca^{2+}$ イメージング法、パッチクランプ法を用いて検討する。③ 種々のサイトカイン産生(ELISA 法)、NFAT 測定と免疫細胞の運動能の変化を検討する。熱刺激の効果と既知のリンパ球刺激物質の効果と比較検討する。さらに、TRPM2 欠損マウスから得たリンパ球での効果を野生型マウスのリンパ球での効果と比較検討する。

#### 2. 研究の進捗状況

##### インスリン放出への TRPM2 の関与の検討

TRPM2 欠損マウスでは、常時血糖が少し高く、経口もしくは腹腔内グルコース負荷試験においても TRPM2 欠損マウスの方が血糖値の上昇が大きく、下がりにくいという結果が得られ、TRPM2 が個体レベルで血糖調節に関与することが明らかとなった。経口グルコース負荷試験では、負荷早期に野生型マウスでみられるインスリン分泌の増加が TRPM2 欠損マウスでみられないことから、経口グルコース負荷時の TRPM2 の関わるインスリン分泌不全が耐糖能異常の一部を説明するものと解釈された。また、TRPM2 欠損マウスでは、インスリン抵抗性を発症していることが、インスリン負荷試験で明らかになり、これも TRPM2 欠損マウスでの耐糖能異常を説明する。膵島を用いた解析では、グルコース依存性のインスリン分泌増加が TRPM2 を欠損した膵島ではみられないことから、膵島レベルでのグルコース依存性インスリン分泌に TRPM2 が関わっていることが確かめられた。副交感神経刺激やいくつかのペプチドを含む他の膵島からインスリン分泌刺激に対する応答は、野生型

マウスと TRPM2 欠損マウスでは差がなかった。加えて、TRPM2 を欠損した単離膵β細胞において温度依存性の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度増加がみられないことを確認した。こうした実験結果は、TRPM2 の膵臓からのインスリン分泌への関与を支持するものである(論文準備中)。また、この結果は TRPM2 作用薬が糖尿病治療に利用しうる可能性を示しており、そうした化合物をスクリーニングして、2-APB が非常に強力な TRPM2 阻害薬として機能することを見いだした。(Br. J. Pharmacol. 153: 1324-1330, 2008)

#### 免疫細胞の温度による活性化機構の解明

ヒト TRPM2 発現 HEK293 細胞を用いた検討により、細胞質成分が存在せず ADP リボースが産生されない細胞膜だけの単一チャネル電流測定でも、室温条件下で過酸化水素による TRPM2 電流が観察された。つまり、過酸化水素は ADP リボースの産生を介さず直接 TRPM2 に作用し得ることを確認した。さらに興味深いことに、過酸化水素処置によって TRPM2 の熱応答が劇的に増大するという結果を得た。この現象は、全細胞記録法のみならず、単一チャネル電流記録法においても認められた。一方で、ADP リボースの電流は過酸化水素処置によって増大しなかった。この現象の生理学的意義を検討する目的で、マウス腹腔内マクロファージでの TRPM2 発現を検討したところ、野生型マクロファージでは強い TRPM2 の発現を確認し、TRPM2 欠損マクロファージには TRPM2 蛋白質の発現が観察できなかった。野生型マクロファージの熱による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇、膜電流は過酸化水素刺激で著しく増大したが、TRPM2 欠損マクロファージではそのような過酸化水素の効果は認められなかった。

#### 3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

「インスリン放出への TRPM2 の関与の検討」については、論文投稿中である。

「免疫細胞の温度による活性化機構の解明」については、細胞レベル・分子レベルでの解析が終わり、組織レベル・個体レベルでの解析に移行しつつある。

#### 4. 今後の研究の推進方策

「インスリン放出への TRPM2 の関与の検討」消化管ペプチド(Gs共役型受容体刺激)刺激及び他のインスリン分泌刺激(高K<sup>+</sup>溶液(膜脱分極)、tolbutamide(K<sub>ATP</sub>チャネル阻害剤)、アセチルコリン(Gq共役型受容体刺激)など)に対するインスリン分泌能について野生型及び TRPM2 ノックアウトマウスより単離した膵島を用いて検討する。Ca<sup>2+</sup>イメージング法によりそれぞれのマウスから単離した膵臓β細胞の細胞

内Ca<sup>2+</sup>濃度変化も測定する。さらに、高K<sup>+</sup>溶液及びdiazoxide(K<sub>ATP</sub>チャネル刺激剤)存在下でグルコース刺激によるインスリン分泌量を測定することで、K<sub>ATP</sub>チャネル非依存性の経路への関与を検討する。

「免疫細胞の温度による活性化機構の解明」野生型マクロファージと TRPM2 欠損マクロファージで食食能・抗原提示能・サイトカイン酸性分泌能・遊走能等を比較検討する。これらの能力への温度の影響を解析する。野生型マウスと TRPM2 欠損マウスに LPS や細菌を投与して細菌繁殖能・生存率等を比較検討する。

#### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Uchida K, Shiuchi T, Inada H, Minokoshi Y, Tominaga M. Metabolic adaptation of mice in a cool environment. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 459: 765-774, 2010, 査読有
- ② Shigematsu H, Sokabe T, Danev R, Tominaga M, Nagayama K. A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by zernike phase-contrast cryo-EM. J. Biol. Chem. 285: 4601-4612, 2010, 査読有
- ③ Fukumi-Tominaga T, Mori Y, Matsuura A, Kaneko K, Matsui M, Ogata M and Tominaga M. DIP/WISH-Deficient Mice Reveal Dia- and N-WASP-interacting Protein (DIP/WISH) as a regulator of cytoskeletal dynamics in embryonic fibroblasts. Genes to Cells. 14: 4601-4612, 2009, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 内田邦敏、志内哲也、稲田仁、箕越靖彦、富永真琴、寒冷暴露に備えた冷涼環境下での代謝調節、第 56 回中部日本生理学会、2009 年 12 月 4 日(石川)
- ② Uchida K, Inada H, Shiuchi T, Minokoshi Y, Tominaga M. Cool environment induced modulation of glucose homeostasis in mice. 第 36 回国際生理学会世界大会、2009 年 7 月 30 日(京都)

[その他]

ホームページ

<http://www.nips.ac.jp/cs/>