

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890219

研究課題名(和文)膵細胞インクレチンホルモン依存性チャネルの制御機構解明に関する研究

研究課題名(英文)Regulation of glucose and incretin-stimulated insulin secretion by cAMP-EPAC2-TRPM2

研究代表者

吉田 昌史 (Yoshida, Masashi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50528411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は、cAMP産生を介して膵細胞グルコース刺激時のインスリン分泌を増強することが知られているが、その機序は明らかではない。本研究において我々は、生理的濃度のGLP-1が、膵細胞の背景電流の一種であるtransmembrane receptor potential melastatin 2 (Trpm2)チャネルを直接刺激し、インスリン分泌を増強することを発見した。GLP-1はcAMP-EPAC2を介してTrpm2チャネルを直接制御し、静止膜電位を脱分極させることでグルコース感受性を改善すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In pancreatic beta-cells, closure of ATP-sensitive-K<sup>+</sup> (K-ATP) channel is an initial process triggering glucose-stimulated insulin secretion. However theoretically, closure of K-ATP channel alone should be insufficient to shift membrane potential toward threshold level to set on insulin secretion. Opening of background nonselective-cation channels (NSCCs) facilitates excitability of the membrane. We here show that a class of NSCC is activated by both glucose and incretin hormones, GLP-1 and GIP, via cAMP/EPAC-mediated NSCC (TRPM2 channel) pathway. Our data demonstrate that glucose metabolism leads to opening of TRPM2 channel and closure of K-ATP channel simultaneously. Glucose- and incretin-activated NSCC works in concert to effectively induce membrane depolarization to initiate insulin secretions. The present study reveals a newly confirmed beta-cell mechanism through which glucose and incretin evoke insulin secretion and provides a innovative target to treat type 2 diabetes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：糖尿病 インスリン分泌 インクレチンホルモン

### 1. 研究開始当初の背景

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は cAMP 産生を介して膵β細胞のグルコース反応性を改善し、グルコース刺激時のインスリン分泌を改善することが知られているが、その機序は明らかではない。また、GLP-1 の生理的濃度は 10 ~ 100 pM であるが、GLP-1 を使用したこれまでの報告では、ほぼ全ての研究において 10 nM 以上の非生理的濃度の GLP-1 が使用されており、それらの結果の臨床的価値は低い。

### 2. 研究の目的

(1) GLP-1 が Trpm2 チャンネル電流を増加させ、インスリン分泌を増強するかどうかを検討する。

最近 Trpm(transmembrane receptor potential melastatin)チャンネルが GLP-1 作用の標的である可能性を示唆する報告がされたが(Uchida K, et al. Diabetes 60 119-26 2011)、チャンネルレベルでの報告はまだなく、Trpm チャンネルに作用するまでのシグナル伝達も未知である。我々は生理的濃度の GLP-1 が EPAC2 を介して Trpm2 チャンネル電流を有意に増加させ、静止膜電位を有意に脱分極させ、インスリン分泌を増加させることを推定している。さらなるシグナル伝達の解析により、GLP-1 がいかにしてインスリン分泌を増加させるかを完全に解明することを目的とする。

(2) グルコース刺激インスリン分泌機構に Trpm2 電流が関与するかどうかを検討する。

Trpm2 KO マウスにおいて、グルコース刺激インスリン分泌も低下していることが知られているが(Uchida K, et al. Diabetes 60 119-26 2011)、グルコース代謝が Trpm2 電流に影響し、インスリン分泌に関与するかどうかは不明である。グルコース代謝が、K-ATP 閉口だけでなく、Trpm2 電流を開くことによりインスリン分泌を惹起している可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

ラット・野生型マウス・Trpm2 KO マウスから得られた膵島および膵β細胞を用いる。

電気生理学的手法(パッチクランプ法)を用い、得られた膵β細胞の Trpm2 電流を観察し、GLP-1 とその下流にあるシグナル物質の効果を検討する。適宜インヒビターも用いる。

得られた膵島を用い、インスリン分泌測定を実施する。

適宜、細胞内  $Ca^{2+}$  測定実験を追加する。

### 4. 研究成果

(1) GLP-1 は cAMP-EPAC を介して膵β細胞 Trpm2 電流を増加させ、インスリン分泌を増強する。

Trpm2 チャンネルは背景電流の一種で、非選択的陽イオンチャンネルであり、 $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  等が通過することがわかった(コンダクタンス;  $82.3 \pm 7.3$  pS/pF,  $n=5$ )。次に我々は背景電流に対し GLP-1 作働薬である exendin-4 の作用について検討した。その結果生理的濃度である 10 ~ 100 pM exendin-4 刺激により、背景電流の有意な増加を観察した(保持電位 -70 mV,  $10^{-10}$  M exendin-4, コントロール vs exendin-4;  $-1.8 \pm 0.42$  pA/pF vs.  $-6.3 \pm 1.5$  pA/pF,  $p=0.0024$ ,  $n=5$ )。この応答は用量依存性であった。また、native GLP-1, liraglutide も同濃度でこの電流を増加させた。これらの変化は Trpm2 チャンネルインヒビターである 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) 同時投与にて消失し、Trpm2 チャンネルノックアウトマウスから採取された膵β細胞にても消失したため、exendin-4 刺激により増加する背景電流は Trpm2 チャンネル電流であると考えられた。また、この電流増加は GLP-1 レセプターアンタゴニストである exendin 9-39 存在下にて消失したため、GLP-1 レセプターを介した反応であると言える。膜透過性 cAMP である dibutyryl cAMP 投与にても同様に Trpm2 電流の有意な増加が観察されたが、protein kinase A (PKA) インヒビターである H89 存在下でも同様の結果が得られ、PKA エンハンサーである 6-phe-cAMP や 6-Bnz-cAMP 投与では電流増加は観察されなかったため、PKA の関与は否定的である。PKA と同じく cAMP の下流にある EPAC2 エンハンサーである 8-pCPT にても同様の有意な電流増加が得られたため、exendin-4 による Trpm2 電流の増加は EPAC2 系によると考えられる。Trpm2 チャンネル電流増加により静止膜電位は脱分極することが予想されたため、2.8 mM の低グルコース中で 100 pM exendin-4 刺激を与えたところ静止膜電位は有意に脱分極した。1 nM exendin-4 刺激によりインスリン分泌が有意に増加することも観察された。GLP-1 は cAMP/EPAC2 を介し、Trpm2 チャンネル電流を増加させ、膜電位を予めやや脱分極した状態に保つことで膵β細胞のグルコース反応性を改善し、インスリン分泌を増強していることが明らかとなった。

(2) グルコース代謝は K-ATP 閉口だけでなく、Trpm2 チャンネルを開口させ、その作用はグルコース刺激インスリン分泌に必須である。

背景電流に対する 16.6 mM グルコース刺激の影響を観察した。その結果、高グルコース刺激により背景電流は有意に増加した(保持電

位 -70 mV, 2.8 mM vs 16.6 mM;  $-1.4 \pm 0.08$  pA/pF vs.  $-6.6 \pm 1.0$  pA/pF,  $p=0.007$ ,  $n=5$ )。13.8 mM スクロースにて浸透圧を補正した場合には背景電流の増加は生じなかったため、浸透圧の影響は否定的であった。この電流変化は、電子伝達系プロトコル及びEPAC インヒビターにより消失したため、糖代謝がEPACを介して背景電流を制御していることが明らかとなった。これらの変化はTrpm2 インヒビター (2-APB) 同時投与にて消失し、Trpm2 ノックアウトマウスから採取された膵β細胞にて消失したため、Trpm2 電流であると考えられた。exendin-4 刺激によるTrpm2 電流変化はグルコース濃度依存性であったが、EPAC2 アクティベータ(8-pCPT-AM)投与では、Trpm2 は2.8 mM グルコース中においても最大反応を示した。これらの結果より、グルコース代謝およびGLP-1 は、両者ともEPAC2 を介して膵β細胞 Trpm2 電流を増加させ、インスリン分泌を促進することが明らかとなった。グルコース代謝は、K-ATP (外向き電流) を減少させるだけでなく、EPAC2 を介してTrpm2 電流 (内向き電流) を増加させることでインスリン分泌を促進し、GLP-1 はそのTrpm2 経路を増強することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等  
(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 1 件)

**Yoshida 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*. (査読あり) 2014 May 13. pii:

DB\_131868. [Epub ahead of print]

PMID:24824430 [PubMed - as supplied by publisher]

〔学会発表〕(計 5 件)

48<sup>th</sup> European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting 2012

第9回国際糖尿病連合西太平洋地区会議  
および第4回アジア糖尿病学会 2012  
(トラベルサポートグラント受賞)

第24回分子糖尿病シンポジウム 2012

American Diabetes Association's 73<sup>rd</sup>  
Scientific Sessions (ADA 2013)

第56回日本糖尿病学会年次学術集会  
(2013) 若手研究奨励賞 (YIA) 受賞

〔図書〕(計 3 件)

1. **吉田昌史**, 加計正文: ファーマナビゲータ インクレチン薬編、Chapter 4、インクレチン薬と糖尿病薬との併用、SU薬(速効型インスリン分泌促進薬を含む)、2012年、P180~185、メディカルレビュー社

2. **吉田昌史**, 加計正文: 糖尿病レクチャー、新しい経口糖尿病薬療法、Q11. SU薬とその併用は、2011. Vol1. No1, P101~109、総合医学社

3. 加計正文、**吉田昌史**、大和志保: Islet Equality、膵島機能研究のアップデート 第2回、2011. Vol3. No3, P26~30 メディカルレビュー社

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
無し

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 昌史 (Yoshida Masashi)

研究者番号： 50528411