

令和元年6月12日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19545

研究課題名(和文) Trpチャンネルを介したGLP-1・GPR40依存性インスリン分泌機構に関する研究

研究課題名(英文) Glucose and GTP-binding protein-coupled receptor regulate transient receptor potential-channels to stimulate insulin secretion.

研究代表者

吉田 昌史 (YOSHIDA, Masashi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50528411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、膵細胞新規インスリン分泌機構の解明を行い、次の～を明らかにした。生理的濃度のアドレナリン(Adr)がインスリン分泌を抑制する機序は不明であった。本研究において我々は、AdrがcAMP/TRPM2経路に対し、内因性に抑制的に作用し、ブドウ糖刺激およびインクレチン刺激によるインスリン分泌を抑制的に制御することを明らかにした。GPR40受容体刺激は、インスリン分泌を促進する事が知られ、2型糖尿病治療薬として開発が期待されるが、作用機序は不明であった。本研究において我々は、その作用機序・シグナルを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満やストレスなどの交感神経作用を介した糖尿病病態悪化の機序解明への発展が期待される。更に、肥満などの血中アドレナリン濃度高値患者においてはインクレチン関連薬の効果が小さい事が想定されることから、本研究成果は早期の臨床応用が期待される。本研究において我々は、GPR40受容体刺激はTRPC3チャンネルを介してインスリン分泌を増加させることを発見、証明した。この発見は、今後のインスリン分泌研究の方向性を大きく転換させると同時に、糖尿病創薬研究における新たなターゲットを見出し、臨床応用へ繋げることが可能である点で、新規的かつ重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：It was known that adrenaline suppresses glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) via Gi-coupled receptor with suppression of cyclic AMP (cAMP) production. The present study showed that a physiological concentration of adrenaline attenuates insulin release via cAMP/TRPM2 signaling, thereby providing a potential therapeutic tool to treat patients with type 2 diabetes. G protein-coupled receptor 40 (GPR40) contributes to medium- or long-chain fatty acid-induced amplification of GSIS, and GPR40 agonists are therapeutic targets in type 2 diabetes. The present study showed a novel mechanism for the regulation of insulin secretion by GPR40 agonist in pancreatic beta-cells.

研究分野：インスリン分泌、糖尿病、電気生理学

キーワード：インスリン分泌 Trpチャンネル 膵細胞 インクレチン GLP-1 GPR40 GIP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)インスリン分泌研究の現状

KATP 経路 (図 1) 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」の研究へと移行していった。肥満 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。近年、2 型糖尿病治療薬として インクレチン関連薬や、G protein-coupled receptor 40 受容体作動薬が注目を集め、臨床応用や治験が実施されているが、その作用機序は明らかではない。我々は transient receptor potential channel (Trp) を介する新規インスリン分泌経路を発見し、
、
は本経路を刺激し、インスリン分泌を増強する事を報告してきた。これまで機序不明とされてきたインスリン分泌促進物質・抑制物質の多くが本経路に関与することが示唆され、本経路の更なる解明は糖尿病治療薬の開発に新たな一歩を踏み出させる可能性が強く示唆される。更に、本経路と糖尿病病態との関連は不明であり、その解明は糖尿病病態解明に関しても重要な研究課題である。

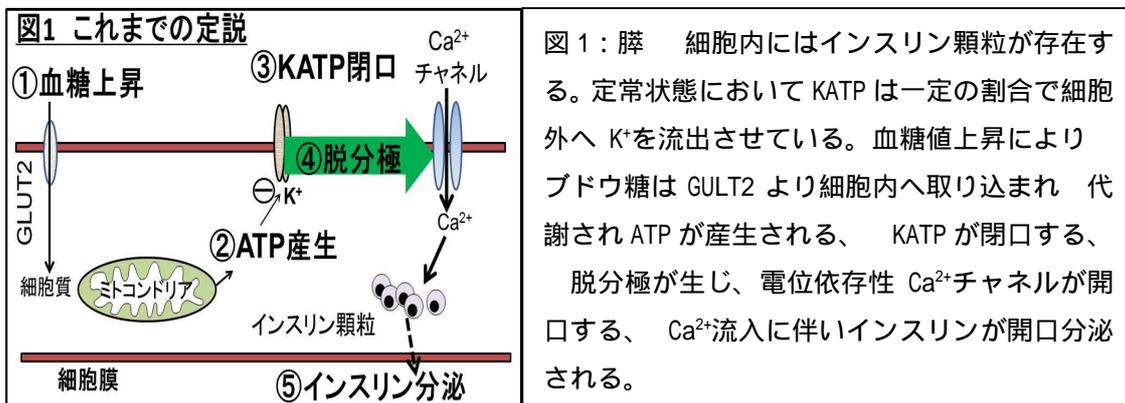


図 1: 膵 細胞内にはインスリン顆粒が存在する。定常状態において KATP は一定の割合で細胞外へ K⁺を流出させている。血糖値上昇によりブドウ糖は GLUT2 より細胞内へ取り込まれ代謝され ATP が産生される、KATP が閉口する、脱分極が生じ、電位依存性 Ca²⁺チャンネルが開く、Ca²⁺流入に伴いインスリンが開口分泌される。

(2) アドレナリンのインスリン分泌抑制機序

交感神経過緊張は肥満やメタボリックシンドロームと関連することが知られている。またアドレナリン (Adr) レセプターの過剰発現が 2 型糖尿病の病態に関与することが報告されている。Adr は G 蛋白共役型受容体および cAMP 抑制を介してインスリン分泌を抑制することが示唆されているがその詳細な機序は明らかではない。過去の Adr のインスリン分泌抑制機構に関する報告の多くが、薬理学的高濃度 Adr を用いた検討で、臨床的応用の意義は低い。

2. 研究の目的

インスリン分泌に影響を与えるとされる物質の多くが、我々の提唱した cAMP-EPAC2-Trpm2 経路に関与すると考えられる。例えば、食欲促進物質のグレリンがインスリン分泌を抑制する機序は不明であったが、我々はグレリンが cAMP-EPAC2-Trpm2 経路を抑制することで、インスリン分泌を抑制することを明らかにした (*Scientific Reports*. 2015 Sep 15;5:14041.). その他にも、cAMP を介してインスリン分泌に影響を及ぼすが、作用機序不明とされてきた物質が多数存在する。本研究において我々は、それらの物質が cAMP-EPAC2-Trpm2 経路に関与するかどうかを検討する。予備的研究において我々は、アドレナリン、グレリン、PACAP が Trpm2 電流に影響を及ぼすことを突き止めている。本研究では、生理的濃度のアドレナリンが膵 細胞インスリン分泌を抑制する機序を中心に検討を実施する。膵 細胞には、Trpm2 以外の非選択性陽イオンチャンネルが多数存在する。本研究において我々は、それらの生理的存在意義も検討し、その制御物質、シグナルを明らかにする。GPR40 受容体作動薬は、新規糖尿病治療薬として期待されているが (*Diabetes Care*. 2013 Aug;36 Suppl 2:S175-9.), その作用機序は不明な点が多く、特

定のチャネルに作用するという報告は無い。我々は予備的研究において、GPR40 受容体刺激が Trpc3 チャネルを開口させ、インスリン分泌を増強することを明らかにしている(51st EASD 2015, Oral Presentation #171)。糖尿病病態とチャネルの異常・変性についての報告は多数あるが、Trpm2 や Trpc3 についての検討はまだ無く、本研究はその解明も目的としている。インスリン分泌と密接に関係のある Trpm2 経路、Trpc3 経路の更なる解明、新たな制御因子の発見・シグナル解明・糖尿病病態との関連の検討により、新たな創薬・糖尿病病態解明・臨床応用へと繋げることを目的とし、本研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) cAMP-EPAC2-Trpm2 経路、Trpc3 経路の新たな制御物質・調節因子・シグナルを解明する。電気生理学的手法、インスリン分泌測定、膵細胞内 Ca²⁺測定を実施する。cAMP を介し、インスリン分泌に影響を与えるとされる物質の Trpm2 電流に対する作用を検討する。GPR40 の下流に存在する物質及びそのアンタゴニストの Trpc3 電流に対する効果を検証する。

(2) インスリン分泌促進物質、抑制物質の Trp に対する相互作用を検討する

Trp に関与し、インスリン分泌に影響を及ぼす事が確認された物質の相互作用を確認する

4. 研究成果

(1) 生理的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 WT マウスで、低濃度 Adr (1nM) は高濃度 Adr (5 μ M) と同様にブドウ糖(G)刺激(16.6 G)およびインクレチン刺激(5.6 G 下 Exendin-4(Ex-4))による背景電流増加およびインスリン分泌刺激作用を著明に抑制した。一方 TRPM2KO マウスにおいて、高濃度 Adr はインスリン分泌を抑制したが、生理的濃度 Adr は抑制しなかった。これらの結果から、低濃度 Adr のインスリン分泌抑制作用は TRPM2 を介していることが明らかとなった。また低濃度 Adr は高濃度 Adr と同様、cAMP 産生を抑制した。Adr による cAMP 産生の抑制は TRPM2KO マウスでも見られたことから、Adr によるインスリン分泌抑制には cAMP 産生以降の機序の関与が考えられた。また、高濃度 Adr が cAMP アナログによる背景電流増加を抑制する一方で、低濃度 Adr は cAMP アナログによる背景電流増加を抑制しなかった。背景電流に対する低濃度 Adr の抑制についてその受容体を特定するため、各種受容体拮抗薬を用いて検討した。1, 2C, 受容体拮抗薬投与下では低濃度 Adr は Ex-4 刺激背景電流増加を抑制したが、ヨヒンビンおよび 2A 受容体拮抗薬投与下では低濃度 Adr は Ex-4 刺激背景電流増加を抑制しなかった。これらから、低濃度 Adr によるインスリン分泌抑制作用は、2A 受容体-cAMP 産生抑制を介した背景電流抑制作用によることが明らかとなった。膜電位については、高濃度 Adr は既報通りブドウ糖および Ex-4 刺激による脱分極を再分極させたのに加え、トルブタミドによる脱分極も再分極した。低濃度 Adr においては Ex-4 による脱分極のみが完全に抑制された。WT および TRPM2KO マウスにおける内因性 2 受容体作用、すなわち生理学的低濃度 Adr が耐糖能に与える影響を検討するため、ヨヒンビン投与下、非投与下で IPGTT を行った。WT では、ヨヒンビン投与で 30 分、60 分、120 分における血糖値が低下したが、TRPM2KO マウスではヨヒンビン投与による血糖値の低下は無かった。

【総括】生理的低濃度の Adr は、cAMP/TRPM2 チャネル経路に対し、内因性に抑制的に作用し、ブドウ糖およびインクレチン刺激インスリン分泌を抑制する事が明らかとなった。本研究成果は、肥満やストレスなどの交感神経作用を介した糖尿病病態悪化の機序解明への発展が期待される。更に、肥満などの血中アドレナリン濃度高値患者においてはインクレチン関連薬の効果が小さい事が想定されることから、本研究成果は早期の臨床応用が期待される。

(2) GPR40 受容体刺激は TRPC3 チャンネルを介してインスリン分泌を増加させる

単一膵細胞を 5.6mM グルコース下で -70mV に電位クランプし、Tolbutamide 100 μ M で前処置後、GPR40 作動薬 (Fasigliam; Fas) を灌流すると有意な内向き電流の増加が見られた (コントロール vs. Fas 10 μ M; -1.8 ± 0.3 pA/pF vs. -3.8 ± 1.2 pA/pF, $p=0.016$, $n=6$)。Tolbutamide free で -80mV に膵細胞を電位クランプした条件でも同様であった。この作用は Trp チャンネル阻害薬 (2-APB) 及び TrpC チャンネル阻害薬 (BTP2) により打ち消された。この結果より、GPR40 受容体刺激により、TrpC チャンネル電流が増加することでインスリン分泌が増強される可能性が示唆された。さらにシグナルの伝達経路の検討を行った。Fas の電気生理学的作用は PLC 阻害薬 (U73122) 及び、小胞体イノシトール 3 リン酸受容体阻害薬 (XestosponginC) で打ち消された。インスリン分泌実験において、1-10 μ M の Fas は、2.8 mM グルコース中においてはインスリン分泌に影響を及ぼさなかったが、16.7mM グルコース中ではインスリン分泌を有意に増加させた。Fas のインスリン分泌促進効果は 2-APB 及び BTP2 で拮抗された。また PLC 阻害薬、小胞体イノシトール 3 リン酸受容体阻害薬によっても打ち消された。次に、GPR40 を介するインスリン分泌増強作用と cAMP-PKA 経路の関与の検討を行った。膵島への Fas 添加で cAMP は増加しなかったが、Exendin4 では増加した。Fas のインスリン分泌促進作用は PKA 阻害薬 (H89) で打ち消されなかった。【総括】GPR40 受容体作動薬は、PLC-TrpC 経路を介して内向き電流である TrpC チャンネルを開口させ、K-ATP の関与なく、グルコース濃度依存性に膵細胞静止膜電位を脱分極させることでインスリン分泌を増強することを見出した。Fasigliam は肝障害の出現により販売中止となったが、今回我々はその更に下流のシグナルを解明し、新たな創薬ターゲットを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

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.

ELKS/Voltage-Dependent Ca_{2+} Channel-Subunit Module Regulates Polarized Ca_{2+} Influx in Pancreatic Cells.

Cell Rep. 2019 Jan 29;26(5):1213-1226.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.106. 査読あり

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 2A-Adrenoceptor-Operated Sympathoadrenergic Tones Attenuate Insulin Secretion via cAMP/TRPM2 Signaling.

Diabetes. 2017 Mar;66(3):699-709. 査読あり

Kakei M, **Yoshida M**, Dezaki K, Ito K, Yamada H, Kawakami M, Sugawara H, Yada T, Glucose and GPCR-stimulated insulin secretion: cooperative contribution via TRP-channel mediation. **Endocr J.** 2016 Oct 29;63(10):867-876. Epub 2016 Jul 17. Review. 査読あり

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 -Cells. **Sci Rep** 2016;6:25912 査読あり

〔学会発表〕(計 8件)

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

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、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

藤原寛太郎、安東弘泰、池口徹、**吉田昌史**、加計正文、TRPM2 チャンネルの膜電位特性の数理モデル解析、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会 2017

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

吉田昌史、出崎克也、伊藤聖学、山田穂高、内田邦敏、川上正舒、富永真琴、矢田俊彦、加計正文、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

出崎克也、倉科智行、**吉田昌史**、加計正文、矢田俊彦、グレリンのインスリン分泌・糖代謝作用における膵細胞 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

伊藤聖学、**吉田昌史**、山田穂高、出崎克也、大河原晋、田部井薫、川上正舒、森下善幸、矢田俊彦、加計正文、アドレナリンによる膵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

山田穂高、**吉田昌史**、伊藤聖学、出崎克也、川上正舒、石川三衛、矢田俊彦、加計正文、膵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

〔図書〕(計 2件)

吉田昌史、メディカルレビュー社、Islet Equality 2017 Vol.6 No2、総ページ数；4

吉田昌史、北隆館、BIO Clinica 2017、総ページ数；4

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者 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。