

機関番号：82648

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

研究成果の概要（和文）：

TRPM2 作用薬をスクリーニングして、2-APB が素早くしかも可逆的・濃度依存的に TRPM2 電流や膵島からのインスリン分泌を阻害することが明らかになった。TRPM2 欠損マウスを解析し、TRPM2 が個体レベルでグルコースやインクレチンホルモンの刺激で膵臓からのインスリン分泌に関わることが明らかになった。野生型マウス飼育温度を 25 度と 20 度で飼育して解析を行い、5 度の飼育温度低下が糖代謝に加えて脂質代謝にも大きな影響を及ぼしていることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) is a non-selective Ca^{2+} -permeable cation channel, and is known to be activated by adenosine 5'-diphosphoribose (ADP-ribose) and hydrogen peroxide. 1) Upon screening of the compounds, it was clarified that 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) exhibited the rapid and reversible inhibition of TRPM2 channels and that 2-APB inhibited heat-evoked insulin release from the pancreatic islets. 2) To clarify the involvement of TRPM2 in insulin secretion, we analyzed TRPM2 knock-out (TRPM2-KO) mice, and found that TRPM2 is involved in insulin secretion stimulated by glucose and that further potentiated by incretins, suggesting that TRPM2 may be a new target for diabetes therapy. 3) To determine the effects of a small reduction in ambient temperature on energy metabolism, we compared two groups of mice; one exposed to a cool environment (20°C) and the other maintained in a near-thermoneutral environment (25°C) for 10 days. We found that a small reduction in ambient temperature can affect glucose homeostasis through regulation of insulin secretion and preferentially enhances fat storage in IWAT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
2008 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2009 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2010 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
年度			
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

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：TRPM2 チャンネル・免疫機能・インスリン分泌・膵臓

1. 研究開始当初の背景

TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは、ショウジョウバエの光受容シグナル伝達系の構成成分として最初に同定された陽イオンチャネルである。TRP チャネルは、6つの膜貫通領域と1つのポア形成領域を持つサブユニットから構成され、4量体で機能的なチャネルを形成すると考えられている。現在までにショウジョウバエから線虫、ホ乳類に至るまで30をこえるTRPチャネル遺伝子が同定されている。ホ乳類ではTRPチャネルは6つのサブファミリー (TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP および TRPA) に分類され、大きな遺伝子ファミリーを形成している。

TRPチャネルは実に様々な身体の生理機能に関与しており、その多くが複数の刺激を受容する多刺激受容体として機能する。例えば、TRPV1は唐辛子の辛み成分であるカプサイシンの受容体として同定されたが、酸刺激や43°C以上の熱刺激によっても活性化される。また、ミントの主成分メントールの受容体として同定されたTRPM8は25°C以下の冷刺激によっても活性化される。生体内におけるTRPチャネルの機能は主に、(1)細胞センサーとして細胞内外の刺激受容、(2)非興奮性細胞の活性化、(3)体内イオン環境の恒常性維持に分類される。例えばTRPV1およびワサビの主成分アリルイソチオシアネートの受容体TRPA1は侵害刺激の受容に広く関与していることが、遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究によって明らかにされており、TRPM5は甘味・旨味・苦味の受容に関与していることが報告されている。また、TRPP3 (PKD2L1)はPKD1L3とともに酸受容複合体を形成している。TRPV3とTRPV4は皮膚において温度受容に関与すると考えられている。これら細胞センサー分子としてのTRPチャネルの特徴は、それらの多くが顕著な温度感受性を示すことである。現在までに9つの温度感受性TRPチャネルが報告されており、これは全体のほぼ1/3を占める。温度感受性TRPチャネルは、感覚神経のみならず様々な臓器で発現が観察され、このことは体温による生理機能制御の重要性を反映しているのかもしれない。また、TRPC1やTRPM4は免疫細胞の活性化に関与していることが報告されており、TRPV5と

TRPV6はCa²⁺の恒常性に、TRPM6とTRPM7はMg²⁺の恒常性にそれぞれ関与していることが明らかにされている。

2006年に申請者らは、9番目の温度感受性TRPチャネルとしてTRPM2が体温近傍の温度によって活性化し、少量のリガンド (ADPR, cADPR) 存在下で体温下で活性化しうることを見いだした (EMBO J, 2006)。そして、TRPM2が膵臓β細胞に特異的に発現してインスリン分泌に関わることを明らかにした。

2. 研究の目的

上記の温度感受性TRPM2チャネルの機能が正しければ、TRPM2活性化剤は糖尿病治療薬として機能することになる。そうしたTRPM2作用薬をスクリーニングすることを第一の目的とする。次に個体レベルでTRPM2が糖代謝に関わることを、TRPM2欠損マウスを用いて検討することを第二の目的とする。さらに、微少な環境温度変化が糖代謝に与える影響を明らかにすることを第三の目的とする。

3. 研究の方法

第一の目的のために、複数の化合物のADPR活性化TRPM2電流に対する効果をパッチクランプ法を用いて解析する。効果の明らかになった化合物について、温度活性化TRPM2チャネル電流に対する効果、温度刺激による膵島からのインスリン放出に対する効果を検討する。

第二の目的のために、TRPM2欠損マウスに対して経口および腹腔内グルコース投与を行い、血糖および血中インスリン量を測定する(糖負荷試験)。膵臓β細胞を単離して、糖負荷やインクレチンホルモン投与に対する細胞内Ca²⁺濃度変化を観察する。さらに膵島に対する糖負荷やインクレチンホルモン投与の効果を検討する。

第三の目的のために、マウスをある一定の温度で飼育する装置を改札した。そこで、マウスを1週間25度と20度で飼育して糖代謝に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

残念ながらTRPM2活性化薬は見いだせなかったが、2-APB(2-aminoethoxydiphenyl borate)が強いTRPM2抑制効果を持つことを発見し

た。2-APB は ADPR 活性化 TRPM2 電流を濃度依存的可逆的に抑制した。2-APB は ADPR 存在化での熱活性化電流を濃度依存的可逆的に抑制した。その IC₅₀ は約 1 μM であり、これまで報告のあるどの TRPM2 阻害薬より強力であった。また、この 2-APB による TRPM2 の阻害効果は細胞内 Ca²⁺濃度非依存的であった。さらに、グルコース刺激、熱刺激やインクレチン受容体活性化薬 excendin-4 による膵島からのインスリン分泌を有意に抑制した。このように、2-APB は強い TRPM2 抑制効果があることが明らかとなった。この結果は 2008 年 Br. J. Pharm.誌に報告した。

単離した膵臓 β 細胞に温度刺激を加えて細胞内 Ca²⁺濃度変化を観察したところ、野生型膵臓単離 β 細胞で見られた温度依存性細胞内細胞内 Ca²⁺濃度上昇は TRPM2 欠損膵臓 β 細胞では完全に消失していた。野生型マウスと TRPM2 欠損マウスを比較して、体重・摂食量・体温・行動量等に差はなかったが、血中グルコース濃度は TRPM2 欠損マウスで有意に高かった。また、血漿インスリン濃度は低い傾向にあった。経口および腹腔内グルコース負荷試験では、両試験とも TRPM2 欠損マウスで野生型マウスより有意に血糖の上昇が大きく、正常化が遅かった。また、インスリン分泌が TRPM2 欠損マウスで有意に低下していた。よって、インスリン分泌が高血糖の原因と考えられた。単離した膵臓 β 細胞へのグルコース投与による細胞内 Ca²⁺濃度上昇は 1 相、2 相とも野生型 β 細胞に比して TRPM2 欠損 β 細胞で有意に減弱していた。GLP-1 投与による Ca²⁺濃度上昇も TRPM2 欠損マウスで有意に減少していた。中等度以上の濃度のグルコースによる膵島からのインスリン放出は、1 相、2 相とも TRPM2 欠損膵島で有意に少なかった。野生型膵島で見られた GLP-1 によるグルコース依存性インスリン分泌の増加が TRPM2 欠損膵島では消失していた。以上の結果から、TRPM2 は個体レベルで糖代謝に関わっていることが明らかとなった。膵臓 β 細胞で体温下でグルコースおよびインクレチンホルモンを感知して、インスリン分泌をもたらしているものと考えられた。この結果は、2011 年 Diabetes 誌に報告した。

20 度と 25 度でマウスを 10 日間飼育して種々のパラメータを比較したところ、20 度で飼育したマウスで摂食量・飲水量が有意に多

かった。経口および腹腔内グルコース負荷試験では、両試験とも 20 度飼育マウスで有意に血糖の上昇が大きく、インスリン分泌が低下していた。行動量・体温に差はなかったが、20 度飼育マウスで皮膚温が有意に低く、血漿ノルエピネフリンが有意に多かった。UCP mRNA 量に差はなかったが、鼠径部白色脂肪でのみ血糖の取り込みを司る GLUT4 mRNA 発現が 20 度飼育マウスで有意に増加していた。脂肪代謝似関わる転写因子の発現が有意に増大していた。これらのことから、5 度という小さな環境温度の低下でも交感神経の活性化が増大して脂質代謝に変化が現れていることが明らかとなった。5-10 度という環境で飼育すると筋肉等への糖の取り込みが促進され、インスリン分泌が低下しても血糖の上昇はないことが知られているが、5 度の温度低下では先ず白色脂肪での脂肪代謝（脂肪酸合成）が促進して脂肪蓄積がおこり、さらなる温度低下に備える機構がかたらくものと考えられた。この成果は、2010 年 Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol.誌に報告した。

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 3 件)

- ① Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Inada H, Shiuchi T, Mori Y, Yada T, Minokoshi Y, Tominaga M. Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. Diabetes, 60:119-126, 2011, 査読有
- ② Uchida K, Shiuchi T, Inada H, Minokoshi Y, Tominaga M. Metabolic adaptation of mice in a cool environment. Pflugers Archiv. Eur. J. Physiol. 459: 765-774, 2010, 査読有
- ③ Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of TRPM2 channels by 2-APB. Br. J. Pharm. 153(6):1324-1330, 2008, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 内田 邦敏、出崎 克也、Boldbaatar Damdindorj、稲田 仁、志内 哲也、森 泰生、矢田 俊彦、箕越 靖彦、富永 真琴、TRPM2 は細胞内 Ca²⁺濃度変化依存的及び非依存的にインスリン分泌を促進する、第 88 回日本生理学大会、平成 23 年 3 月 29 日 (神奈川)
- ② Uchida K, Dezaki K, Damdindorj B, Mori Y,

Minokoshi Y, Yada T, Tominaga M. TRPM2 is a key player for insulin secretion. 2nd Leuven TRP meeting, 平成22年9月23日 (ベルギー)

- ③ 内田 邦敏、出崎 克也、Boldbaatar Damdindorj、森泰生、箕越靖彦、矢田俊彦、富永真琴、TRPM2とインスリン分泌、第87回日本生理学大会、平成22年5月21日 (岩手)
- ④ 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)
- ⑤ 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)

[図書] (計1件)

- ① Makoto Tominaga, Transient Receptor Potential (TRP) Channels. In "Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 179" Springer, 2007

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

稲田 仁 (INADA HITOSHI)
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・特任助教
研究者番号：60419893

(3) 連携研究者

なし