

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：82648

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790267

研究課題名（和文）TRPM2 を介したインスリン分泌機構と糖尿病発症への関与

研究課題名（英文）Involvement of TRPM2 in insulin secretion and diabetes pathogenesis

研究代表者

内田 邦敏（UCHIDA KUNITOSHI）

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・助教

研究者番号：20581135

研究成果の概要（和文）：インスリン分泌は血糖値を降下させる唯一の有効な手段であり、その破綻は糖尿病を発症させる。インスリン分泌機能の破綻による糖尿病発症のメカニズムの解明と新たな治療薬の開発が求められている。本研究は、TRPM2 の糖尿病発症への関与を明らかにし、糖尿病治療のターゲットとなる可能性を検証することを目的として実施した。その結果、TRPM2 はインスリン分泌およびインスリン感受性のいずれの調節にも関与しており、糖尿病発症に強く関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Insulin secretion from pancreatic β -cells is the only efficient means to decrease blood glucose concentrations. Many electrophysiological studies have shown that not only ATP-sensitive K^+ and voltage-gated Ca^{2+} channels, but also many other ion channels are involved in insulin secretion. We previously revealed that TRPM2 is expressed in pancreatic β -cells and could be involved in insulin secretion. To clarify whether TRPM2 could be a target for the diabetes therapy, we analyzed the wild-type (WT) and TRPM2-KO mice fed a high fat diet. WT mice fed a high fat diet exhibited high blood glucose levels, despite high plasma insulin levels. That is because insulin resistance developed in WT mice. On the other hand, TRPM2-KO mice fed a high fat diet did not exhibit drastic changes in blood glucose levels and plasma insulin levels compared with TRPM2-KO mice fed a normal diet. In addition, insulin resistance did not develop in TRPM2-KO mice. In WT mice fed a high fat diet, TRPM2 mRNA expression levels in islets, liver and white adipose tissue were higher than those in WT mice fed a normal diet. These results suggest that TRPM2 could be involved in diabetes pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：分子・細胞生理学

1. 研究開始当初の背景

インスリン分泌機構は古くよりグルコースの細胞内代謝によってインスリン分泌量が調節されるという説(燃料説)が提唱されていた。1984年グルコースの代謝の過程で生じるATPが膵臓細胞の K^+ チャネル(K_{ATP} チャネル)を閉じることが報告され、その後のさらなる研究により、 K_{ATP} チャネル閉口による膜の脱分極が電位作動性 Ca^{2+} チャネル開口に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、インスリン分泌が起こるという「 K_{ATP} チャネル依存性経路」が明らかにされ、燃料説が立証された。この経路が血中グルコース濃度に依存したインスリン分泌の最も主要な経路であると現在でも考えられているが、その一方で K_{ATP} チャネル非依存的な経路の存在も知られている。その中には脂肪酸代謝、グルタミン酸などを介した機構が含まれるが、これらの関与については未だ結論が得られていない。その理由には最終的なターゲット分子が明らかにされていないことが挙げられる。また、インスリン分泌はGLP-1などの消化管ペプチド、アセチルコリンなどの神経伝達物質などによっても調節を受けており、さらにそれらの刺激に対していくつもの分泌機構が報告されている。このようにインスリン分泌機構は極めて複雑であり、未だ不明な点も多い。

このインスリン分泌は血糖値を降下させる唯一の有効な手段であり、その破綻は糖尿病を発症させる。糖尿病患者は年々増加しており、境界型糖尿病(予備群)を含めるとその数は2,200万人にものぼり、社会的負担も含めて大きな問題となっている。糖尿病は1型(インスリン依存性)と2型(インスリン非依存性)に分類されるが、特に2型糖尿病はメタボリックシンドロームにおいてみられる内臓脂肪型肥満に伴うインスリン抵抗性が原因の1つである。この肥満に伴うインスリン抵抗性は通常、インスリン分泌の亢進によって代償されるが、ある時期になるとインスリン分泌機能が破綻して糖尿病を発症する。糖尿病の薬物治療には K_{ATP} チャネル阻害剤などインスリン分泌促進剤が用いられるが、インスリン分泌促進効果が得られない場合にはインスリンの自己注射が必要となる。インスリン自己注射は毎食前に自ら注射しなければならないために患者に大きな負担を与え、QOLを低下させる一因となっている。インスリン分泌機能の破綻による糖尿病発症のメカニズムの解明と新たな治療薬の開発が求められているが、それにはこの複雑なインスリン分泌機構の解明と糖尿病発症との関連を明らかにすることが必要不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、TRPM2活性化からインスリン分泌が引き起こされる分子メカニズムを明らかにすること、さらにTRPM2と糖尿病との関係を糖尿病モデルマウス解析によって明らかにすることで、糖尿病治療への応用の可能性を検証することを目的として行った。

3. 研究の方法

(1) TRPM2を介したインスリン分泌メカニズムの検討

TRPM2で報告されているN1326D(ADPRの作用消失)及びIQmotif-mutant(Ca^{2+} の作用消失)などの同定されている活性部位のアミノ酸の変異体をSite-directed mutagenesis法を用いて作製した。また、TRPM2のPKAリン酸化部位を同定するため、リン酸化部位として知られている配列RRXS/TのS/TをAに置換したミュータントを同様の手法を用いて作製した。そしてこれらをHEK293細胞に強制発現させ、その活性を検討した。

(2) 糖尿病発症への関与の検討

TRPM2と糖尿病との関係を明らかにするため高脂肪食給餌による糖尿病もしくはインスリン抵抗性モデル作製法を野生型及びTRPM2ノックアウトマウスに適用し、病態発症の違いを検証した。具体的には、体重、血糖値および血漿中インスリン値を測定し、インスリン感受性を検討するためにインスリン負荷試験を行った。また、2型(*db/db*マウスなど)糖尿病モデルマウスのTRPM2 mRNA発現量をリアルタイムRT-PCRを用いて検討した。

4. 研究成果

(1) TRPM2を介したインスリン分泌メカニズムの検討

インスリン分泌を刺激するホルモンの受容体の下流シグナルであるPKAのリン酸化部位として知られる配列RRXS/TのS/TをAに置換したミュータントを作製した(T9A, S11A, T25A, S38A, S187A, S225A, S1169A, S1176A)。また、TRPM2活性化物質であるADPRおよびcADPRの作用が消失すると報告されているミュータント(N1326D)を作製した。これらのチャネル活性をホールセルパッチクランプ法を用いて検討した結果、いくつかのmutantは熱刺激および過酸化水素刺激に応答しなかった。また活性がみられたものはいずれもPKAの作用の消失が認められなかった。また、N1326D mutantも既報通りのADPRの作用消失を確認できなかった。

(2) 糖尿病発症への関与の検討

野生型マウスとTRPM2ノックアウトマウスに高脂肪食を摂餌させ、インスリン抵抗性モデ

ルを作製し、その病態発症について比較検討した。その結果、TRPM2 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して肥満を呈しにくいことが解った(図1)。糖代謝能について検討した結果、TRPM2 ノックアウトマウスはインスリン抵抗性を発症していなかった。以上の結果から TRPM2 がインスリン分泌のみならず、インスリン感受性の調節にも関与している可能性が示唆された(図2)。そこで、グルコース取り込みおよび貯蔵に強く関与する臓器(筋肉、膵臓、脂肪組織)における TRPM2 の発現を RT-PCR 法を用いて検討することにした。その結果、TRPM2 は肝臓、脂肪組織にも発現していることが明らかとなった。また、高脂肪食モデルおよび糖尿病モデルマウスの膵島において TRPM2 発現量の増加が認められた。さらに、興味深いことにエネルギー代謝に重要である白色脂肪組織においても発現量の増加が認められた。これは、免疫細胞が脂肪組織へ浸潤していることを示唆しており、インスリン感受性の低下に TRPM2 が関与していると考えられた。実際、TRPM2 ノックアウトマウスはインスリン抵抗性を発症していなかったことから、TRPM2 はインスリン感受性の調節にも関与していることが明らかとなった。

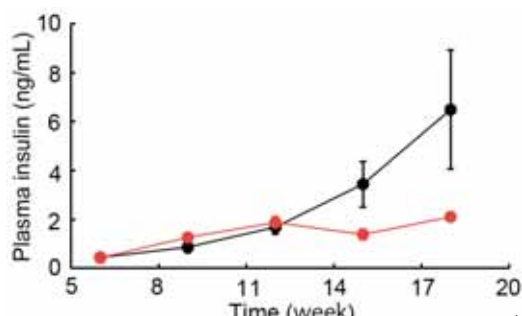


図1 高脂肪食を摂餌した野生型および TRPM2 ノックアウトマウス(写真) 12 週間高脂肪食を摂餌した TRPM2 ノックアウトマウス(上)と野生型マウス(下) 図)野生型マウス(黒)および TRPM2 ノックアウトマウス(赤)の高脂肪食摂餌期間中の血漿中インスリン濃度の変化。6 週より摂餌を開始。

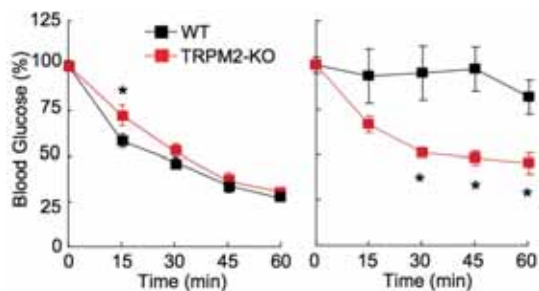


図2 インスリン負荷試験

左) 通常食を摂餌した野生型(黒)および TRPM2 ノックアウトマウス(赤)のインスリン投与後の血糖値変化。

右) 12 週間高脂肪食を摂餌した野生型(黒)および TRPM2 ノックアウトマウス(赤)のインスリン投与後の血糖値変化。

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)

査読あり

(1) Uchida K and Tominaga M. The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocrine J.* 58. 1021-1028 (2011)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/endoctrj/58/12/58_EJ11-0130/_article

[学会発表](計2件)

Uchida K and Tominaga M. The role of TRPM2 channels in pancreatic b-cells functions. 2012 International ion channel conference. 2012年8月24日. 韓国.

Uchida K and Tominaga M. The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in pancreatic b-cells functions. 第89回日本生理学会 シンポジウム 1. TRP チャンネルの産業応用 2012年3月27日. 長野.

[その他]

ホームページにて研究成果等を公表

http://www.nips.ac.jp/cs/photo_member/uchida/uchida.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

内田 邦敏 (UCHIDA KUNITOSHI)

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・助教

研究者番号：20581135

(2)研究分担者

(3)連携研究者