

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860172

研究課題名(和文) ミクログリア機能への温度センサーTRPM2の寄与

研究課題名(英文) Physiological roles of TRPM2 in microglial functions

## 研究代表者

加塩 麻紀子 (Kashio, Makiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20631394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓細胞は、血中グルコース濃度の上昇に応じてインスリンを分泌することで血中グルコースレベルを適正な範囲に調節する働きをする。この細胞からのインスリン分泌には、グルコース代謝により生じたATPによるKATPチャネル機能抑制と、それに伴う脱分極、電位依存性カルシウムチャネルの活性化といった典型的な経路に加え、KATPチャネルに依存しない経路が関わるということが明らかとなってきた。本研究では、このKATP非依存性の経路の一端としてのTRPM2チャネルの関わりと、レドックスシグナルおよび温度の関係性について、活性酸素によるTRPM2活性化温度閾値調節という切り口から明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic b-cells secrete hypoglycemic insulin upon blood glucose elevation to keep its concentration in the range of physiological levels. Insulin secretion from pancreatic b-cell is well known to be mediated by KATP channel-dependent canonical pathway in which KATP channel closure by intracellular ATP elevation causes membrane depolarization and activation of voltage-dependent Ca channel. However, beside the canonical pathway, KATP channel-independent pathways are recently elucidated to be involved in insulin secretion. As one of them, we have clarified the involvement of TRPM2 function in insulin secretion focusing on redox signal-mediated TRPM2-sensitization leading its activation at body temperature.

研究分野：生理学

キーワード：TRPM2 レドックスシグナル 温度 インスリン

1. 研究開始当初の背景

TRPM2は温度感受性を有する非選択性カチオンチャンネルであり、脳、心臓、肺、腎臓、膵臓、血管、免疫細胞など広範囲に発現している。これら深部体温に保たれた組織、細胞において、温度感受性TRPM2の活性がいかんにして調節されるのかについては、長らく不明であったが、我々の研究により活性酸素(レドックスシグナル)によりTRPM2の活性化温度閾値が低下することにより体温下での活性が変化することが明らかとなった。

活性酸素は古くから様々な疾患を引き起こす有害物質としてみなされてきた。しかし、NADPHオキシダーゼ(Nox)、Dualオキシダーゼ(Duox)といった活性酸素産生酵素は、サイトカインや成長因子など多くのシグナルの下流、あるいは細胞内カルシウム濃度の上昇で活性化されることから、産生と還元酵素等による除去が常に繰り返されることで濃度が生理的レベルで変化し、シグナル分子として機能すると考えられるようになってきた。特に膵臓β細胞では、活性酸素の除去に当たるカタラーゼ、グルタチオンレダクターゼのような酵素の発現が他の組織に比較して非常に低いことから、グルコースなどの刺激に応じて活性酸素レベルが大きく変化し、シグナル分子として機能することが予想される。膵臓β細胞にTRPM2が発現しており、体温下のTRPM2活性がグルコースにより惹起されるインスリン分泌を促進的に調節していることが報告されていた。しかし詳細な分子メカニズムは不明であり、その解明は糖尿病の病態生理学的理解および糖尿病治療の分子標的としてのTRPM2の可能性に迫る意味で重要な課題であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、膵臓β細胞に発現するTRPM2チャンネルが生理的環境下で活性化しインスリン分泌を亢進させる分子メカニズムの一つとして、レドックスシグナルを介したTRPM2感作(活性化温度閾値の低下)の関わりを明らかにすることが目的である。

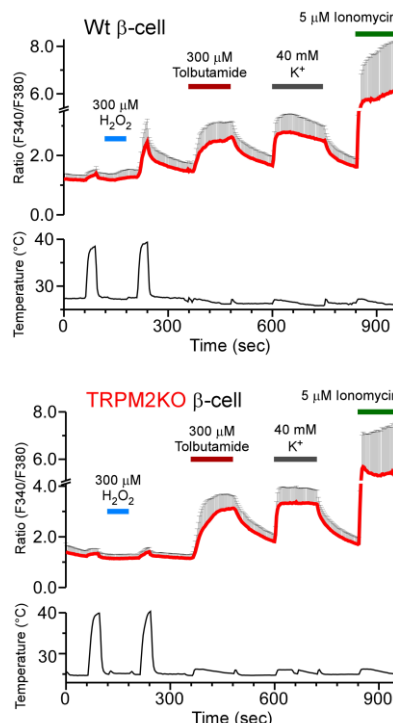
3. 研究の方法

膵臓β細胞は、野生型およびTRPM2欠損マウスの膵臓からコラゲナーゼ処理により得た。TRPM2活性化は、カルシウム指示薬Fura-2を用いた細胞内カルシウム濃度測定により評価した。レドックスシグナルのモデルとしては、レドックスシグナルにおいて重要なメディエーターとしてはたらく過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を用いた。インスリン分泌の評価には膵臓β細胞と同様の手法にて得た野生型およびTRPM2欠損膵島を用い、グルコース刺激により惹起されるインスリン分泌量に対する抗酸化剤、N-アセチルシステイン(NAC)の影響を検討することにより、グルコース誘発インスリン分泌におけるレドックスシグナルおよびTRPM2の関わり、さら

にはグルコース刺激を行う際の温度を変えることにより温度によるTRPM2活性のインスリン分泌への寄与について評価した。なお、インスリン分泌量は上清中に遊離したインスリン量をELISA法により測定することで決定した。

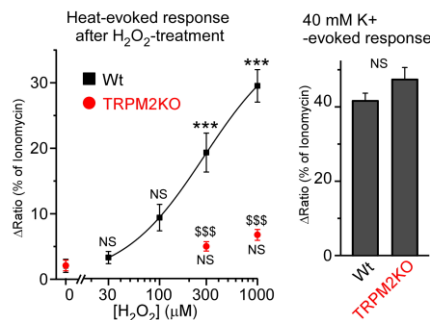
4. 研究成果

野生型膵臓β細胞の熱刺激に対する応答性は、過酸化水素処置により劇的に増大したが、TRPM2欠損細胞ではそのような現象は全く認められなかった(図1)。



(図1) 野生型(左図; Wt)およびTRPM2欠損(右図; TRPM2KO)膵臓β細胞の熱刺激応答に対する過酸化水素の影響

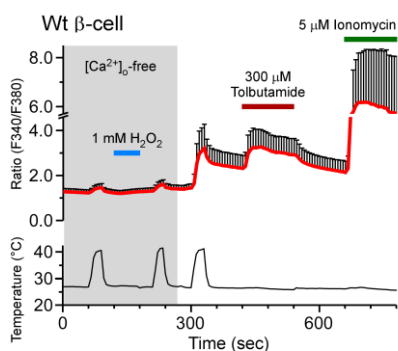
野生型膵臓β細胞における応答の増大は、処置する過酸化水素濃度に依存しており、野生型とTRPM2欠損群の間には統計学的有意な差が認められた(図2; 左)。一方で40 mM K<sup>+</sup>に対する応答性には変化がないことから電位依存性カルシウムチャンネルを介した細胞内カルシウム濃度上昇の系には、両遺伝子型間に差がないことが確認できた(図2; 右)。



(図2) 左図; 野生型およびTRPM2欠損β細胞熱刺激に対する過酸化水素の濃度反応曲線 右図; 40 mM K<sup>+</sup>に対する応答性には差がない

さらに、野生型膵臓β細胞における熱応答が細胞膜に発現する TRPM2 チャンネルを介した細胞外カルシウムイオンの流入によるものであるかを検討するために、細胞外にカルシウムイオンが存在しない条件下で同様の検討を行ったところ、細胞外カルシウム非存在下では熱応答が全く認められず、カルシウムを添加した溶液に交換後に再度熱刺激を行うと応答が確認できたことから、細胞外のカルシウムに依存した応答であることが明らかとなった(図 3)。

以上の結果より、膵臓β細胞に発現する TRPM2 チャンネルの温度による活性化は、レドックスシグナルにより調節されることが明らかとなった。膵臓β細胞は血中グルコース濃度の上昇に伴いインスリンを分泌する機能を有するが、グルコース刺激そのものが膵臓β細胞内の活性酸素レベルを上昇させることが報告されている。したがって我々は、グルコースにより惹起されるインスリン分泌における TRPM2 の寄与について、レドックスシグナルと温度に着目することにより検討を行った。16.7 mM グルコース刺激による野生型膵島からのインスリン分泌は、

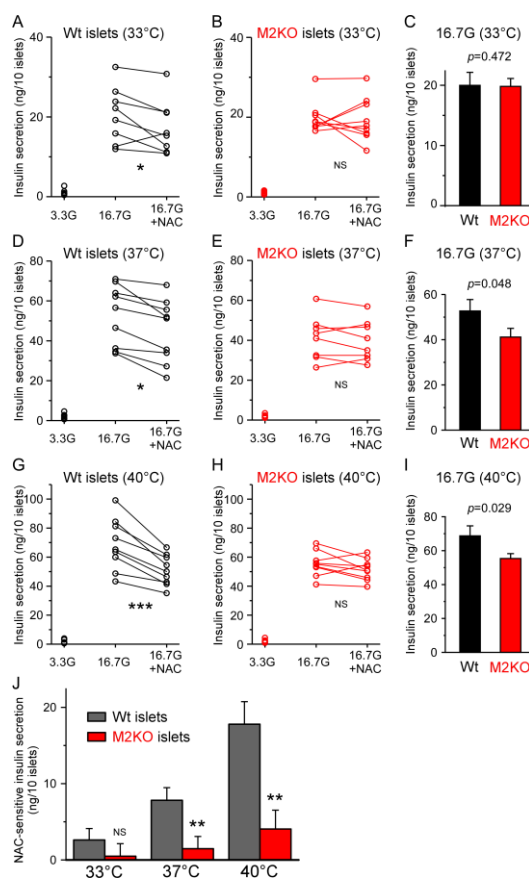


(図 3) 野生型β細胞の過酸化水素刺激により惹起される熱応答は細胞外カルシウム非存在下 ( $[Ca^{2+}]_o$ -free) では認められない

抗酸化剤である NAC 処置により減少し、その減少は 33°C、37°C、40°C と温度が高くなるにつれ著明となり、統計学的有意差が大きくなった(図 4-A, D, G)。一方で TRPM2 欠損膵島においてはそのような傾向は全く認められず、いずれの温度においても NAC 非処置群と NAC 処置群の間に有意差はなかった(図 4-B, E, H)。16.7 mM グルコース刺激によるインスリン分泌量の平均値においても、野生型と TRPM2 欠損膵島間の差は温度の上昇とともに統計学的有意差が大きくなった(図 4-C, F, I)。

レドックスシグナルによる TRPM2 感作と、そのインスリン分泌に対する影響についてより詳細に検討するために、NAC により減弱するインスリン分泌量を抽出したところ、野生型においては 33°C、37°C、40°C と温度の上昇とともに NAC 感受性インスリン分泌が増大したが、TRPM2 欠損群においてはその傾向が減弱していた(図 4-J)。以上の結果より、グルコース刺激に伴うレドックスシグナ

ルが TRPM2 の活性化温度閾値を低下させる(感作)ことで、温度による TRPM2 の活性がインスリン分泌に寄与することが明らかとなった。本研究で得られた結果は、Journal of Biological Chemistry 誌 6 月号に掲載予定である。



(図 4) グルコースにより惹起される野生型および TRPM2 欠損膵島インスリン分泌に対する抗酸化剤 NAC および温度の影響

## 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 6 件)

1. Makiko Kashio and Makoto Tominaga Redox signal-mediated enhancement of the temperature sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) elevated glucose-induced insulin secretion from pancreatic islets.

J Biol Chem. 2015 Mar 27. pii: jbc.M115.649913. (in press)

2. Rei Nishimoto, Makiko Kashio, Makoto Tominaga (2014)

Propofol-induced pain sensation involves multiple mechanisms in sensory neurons. Pflugers Arch - Eur J Physiol (in press)

3. Banzawa N, Saito S, Imagawa T, Kashio M, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T (2014)

Molecular Basis Determining Inhibition/Activation of Nociceptive Receptor TRPA1: A Single Amino Acid Dictates Species-specific Actions of the Most Potent Mammalian TRPA1 Antagonists.  
J Biol Chem. Nov 14;289(46):31927-39

4. Reona Aijima, Bing Wang, Tomoka Takao, Hiroshi Mihara, Makiko Kashio, Yasuyoshi Ohsaki, Jing-Qi Zhang, Atsuko Mizuno, Makoto Suzuki, Yoshio Yamashita, Sadahiko Masuko, Masaaki Goto, Makoto Tominaga, Mizuho A. Kido (2015)  
The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia.  
FASEB J Jan;29(1):182-92

5. Azusa Sato, Takaaki Sokabe, Makiko Kashio, Yuji Yasukochi, Makoto Tominaga and Kunihiko Shiomi (2014)  
Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, Bombyx mori.  
Proc Natl Acad Sci U S A. March 17;111(13):E1249-E1255

6. Hiroki Ota, Kimiaki Katanosaka, Shiori Murase, Makiko Kashio, Makoto Tominaga and Kazue Mizumura (2013)  
TRPV1 and TRPV4 play pivotal roles in delayed onset muscle soreness.  
PLOS ONE June 17;8(6):e65751

[学会発表] (計 2 件)

1. 加塩麻紀子、丸中良典、富永真琴「レドックスシグナルによる TRPM2 感作は膵臓β細胞からのインスリン分泌を調節する」第 92 回日本生理学会大会・ポスター発表 (2015 年 3 月 21 日、神戸)

2. 加塩麻紀子、森奏生、富永真琴「レドックスシグナルによる TRPM2 感作は膵臓β細胞からのインスリン分泌を調節する」第 91 回日本生理学会大会・ポスター発表 (2014 年 3 月 17 日、鹿児島)

[図書] (計 2 件)

1. 加塩麻紀子、富永真琴  
臨床免疫・アレルギー科 2014 年 12 月号 p649-653 (科学評論社)「レドックス・センサーTRP チャンネルと炎症」

2. 加塩麻紀子、富永真琴  
実験医学 2014 年 3 月号 p512-518 (羊土社)  
「体温センサーとしての TRP チャンネル」

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
加塩麻紀子 (KASHIO, Makiko)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20631394

(2) 研究分担者 ( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )  
研究者番号：