

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870532

研究課題名(和文) 膵細胞インクレチンホルモン依存性Trpm2チャネル制御機構解明に関する研究

研究課題名(英文) Potentiation of Glucose-Stimulated Insulin Secretion by GPR40-PLC-TRPC Pathway and cAMP-EPAC2-TRPM2 Pathway in Pancreatic Beta Cells

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまで膵細胞ブドウ糖刺激インスリン分泌は、ATP依存性K<sup>+</sup>チャネル(KATP)閉口による脱分極により惹起されると考えられてきた。しかし、実際にはKATP閉口のみではインスリン分泌は惹起されない。膜電位の脱分極には背景電流の存在が不可欠だからである。これまで我々は、背景電流を介した新規インスリン分泌機構を提唱してきた。インスリン分泌に影響を及ぼすが、機序不明とされてきた物質の多くが背景電流に関与すると考えられる。本研究において我々は、グレリン、及びGPR40受容体刺激が背景電流を介してインスリン分泌を制御することを見出し、証明した。

研究成果の概要(英文)：It has been proposed that glucose-stimulated insulin secretion is initiated by closure of KATP channels, followed by membrane depolarization. In theory, however, closure of KATP channels is insufficient to shift the membrane potential toward a threshold level, since membrane potential is determined by the overall balance between outward and inward currents. Modest constitutional opening of background inward current through nonselective cation channels (NSCCs) is crucial to facilitate depolarization. Recently, we demonstrated that a class of NSCC is activated by both glucose metabolism and incretin hormones, via Trpm2 pathway. In this study, we demonstrate that gastric hormone ghrelin attenuates glucose-induced insulin secretion via TRPM2 pathway. We also demonstrate that GPR40 agonist stimulate insulin secretion via the TRPC3 channel pathway. We believe that TRPM2 pathway and TRPC3 pathway provide a potential therapeutic target for the treatment of type 2 diabetes.

研究分野：インスリン分泌

キーワード：膵細胞 インクレチン GPR40 GLP-1 Trpm2 Trpc3

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) インスリン分泌研究の現状

膵細胞グルコース刺激インスリン分泌研究は、1980年代のATP依存性K<sup>+</sup>チャネル(K<sub>ATP</sub>)チャネルの発見以降、その機構解明が中心に実施され、現在までインスリン分泌の主軸としてしられるK<sub>ATP</sub>経路として確立された。その後糖尿病研究の中心はインスリン分泌研究から、抹消のインスリン抵抗性の研究へとシフトし、現在ではインスリン分泌研究を実施する研究者は国内外に殆ど存在しない。インスリン分泌研究には電気生理的手法が必要不可欠であるが、実施する施設は国内には殆ど存在しない。

### (2) インスリン分泌経路は未解明

インクレチンホルモン、アドレナリン、グレリン、ソマトスタチンなどは、古くからインスリン分泌に強く影響を及ぼすことが知られていたが、その機序はK<sub>ATP</sub>経路のみでは説明不可能であり、未解明なままとなっていた。しかしながら近年、インクレチン関連薬が広く臨床応用されるようになり、その機序解明に注目が集まっている。

### (3) K<sub>ATP</sub>経路は不完全

K<sub>ATP</sub>経路には不完全な点が存在する。インスリン分泌は、K<sub>ATP</sub>閉口に伴う脱分極により惹起されると長年考えられてきたが、理論的にはK<sub>ATP</sub>閉口のみでは細胞膜の脱分極は生じない。細胞膜にはK<sub>ATP</sub>を中心とした「細胞の中 外」に陽イオンを通す「外向き電流」と、その逆に「細胞の外 中」に陽イオンを通す「内向き電流」が存在する。膜電位はその両者のバランスで制御され、内向き電流が優位となって始めて脱分極が生じる。つまり、細胞膜の脱分極およびインスリン分泌惹起には「内向き電流」の存在が必要不可欠なのであるが、これまで一切検討されることなくK<sub>ATP</sub>経路は不完全なままとされてきた。

(4) 糖尿病薬による低血糖が社会問題化  
現在臨床応用されているインスリン分泌促進薬は、全てK<sub>ATP</sub>をターゲットとしており、その副作用による低血糖が交通事故などの原因となり、社会問題となっている。低血糖リスクの少ない新薬の開発が、新たな創薬ターゲットの発見が期待されている。

### (5) 研究代表者のこれまでの発見1

これまで背景電流の一種である Transient receptor potential melastatin 2 (Trpm2) チャネルが cAMP-EPAC2 を介してグルコース代謝依存性に開口し、インスリン分泌を惹起することを明らかにし、KATP 経路の不完全であった点を補った。グルコース代謝依存性に開口する背景電流は Trpm2 以外に存在しないことも明らかにしている。

### (6) 研究代表者のこれまでの発見2

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、広く臨床応用されているが、その機序は明らかではなかった。候補者は生理的濃度の GLP-1 は、cAMP-EPAC2 を介して Trpm2 チャネルを開口させることでインスリン分泌を増強することを明らかとした。

### (7) インスリン分泌研究の今後

cAMP-EPAC- Trpm2 経路の発見は、約 30 年間不完全なままであった K<sub>ATP</sub> 経路を完成させるだけでなく、今後のインスリン分泌研究の方針を転換させると同時に、新たな糖尿病薬創薬ターゲットを見出し、新たな創薬、糖尿病病態解明研究の発展へと繋がる重要なものである。これまで作用機序不明だが、インスリン分泌に影響を及ぼすとされてきた物質の多くが本経路を介している可能性が高い。また、膵細胞には、Trpm2 チャネル以外にも多数の背景電流が存在するが、それらの生理的意義は明らかではない。今後、KATP 非依存性インスリン分泌機構の更なる解明、糖尿病病態との関連の検討、新規創薬への発展が期待される。

## 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は cAMP 抑制を介してインスリン分泌を抑制することが知られているが、機序は不明である。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。膵細胞には、Trpm2 以外の非選択性陽イオンチャ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。インスリン分泌と密接に関係のある Trpm2 経路の更なる解明、新たな制御因子の発見・シグナル解明・その他の背景電流のインスリン分泌への影響の検討により、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

電気生理学的手法(パッチクランプ法)、インスリン分泌測定、膵島還流実験、膵細胞内Ca<sup>2+</sup>測定を実施する。マウス、ラットから得られた膵島、または膵細胞を用いて実験する。適宜 Trpm2 KOマウス、グレリン受容体 KOマウスを用いる。

#### 4. 研究成果

(1) グレリンのインスリン分泌抑制作用  
野生型マウスから得られた膵細胞において、8.3 mM グルコースの Trpm2 電流増加作用を 10 mM グレリンが抑制するかどうかを検討した。グレリン非存在下では 8.3 mM グルコース刺激にて Trpm2 電流の有意な増加が観察されたが、10 nM グレリン存在下ではその効果は消失した。次に、10 nM グレリンの Trpm2 電流抑制効果がグレリン受容体を介したものであるかどうかを検討する目的で、グレリン受容体 KO マウスから得られた膵細胞を用いて同様の検討を行った。その結果、10 nM グレリン存在下、非存在下ともに有意な Trpm2 電流の増加が観察され、その変化は野生型マウスの 10 nM グレリン非存在下での変化と同等であった。グレリンは cAMP-EPAC2-Trpm2 経路を介してインスリン分泌を制御していることが明らかとなった。

#### (2) 膵細胞 GPR40 受容体刺激の効果

膵細胞に高発現する脂肪酸受容体 GPR40 は長鎖脂肪酸をリガンドとしてグルコース依存性インスリン分泌(GSIS)を増強し、GPR40 受容体作動薬は新規のインスリン分泌促進薬として期待されているが、そのインスリン分泌機序は不明であった。GPR40 受容体刺激が、背景電流を介してインスリン分泌を促進するかどうかを検討した。単一膵細胞を 5.6mM グルコース下で -70mV に電位クランプし、100  $\mu$ M の Tolbutamide で前処置後、選択的 GPR40 作動薬 (Fasiglifam; 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  $\mu$ M;  $-1.8 \pm 0.3$  pA/pF vs.  $-3.8 \pm 1.2$  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 TrpC3 チャンネル阻害薬 (Pyr3) により打ち消された。2.8mM グルコース下で Fas を灌流すると静止膜電位の有意な脱分極が観察された ( $-66.5 \pm 2.9$  mV vs.  $-50.5 \pm 3.7$  mV)。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、protein kinase C 阻害薬 (G66983、G66976) で打ち消された。インスリン分泌実験において、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、8.3mM、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。Fura-2 蛍光画像解析では 8.3mM グルコース下で Fas は細胞内カルシウムを増加させたが、Pyr3 前投与でこのカルシウム増加作用は抑制された。Fas のインスリン分泌促進効果は 2-APB 及び Pyr3 で拮抗された。また PLC 阻害薬によっても打ち消された。GPR40 受容体作動薬は、PLC-PKC-TrpC3 経路を介して内向き電流を増

加させ、膵細胞静止膜電位を脱分極させることで KATP チャンネルの脱分極・インスリン分泌を増強することを見出した。

#### 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 2件)

1. 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  $\beta$ -Cells. Sci Rep 2016;6:25912
2. Kurashina T, Dezaki K, Yoshida M, Sukma Rita R, Ito K, Taguchi M, Miura R, Tominaga M, Ishibashi S, Kakei M, Yada T, The  $\beta$ -cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glyceic effects of ghrelin. Sci Rep 2015;5:14041

[学会発表](計 11件)

1. 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 京都 2016年5月
2. 今泉美佳, 青柳共太, 吉田昌史, 飛田耶馬人, 岸本拓磨, 中道洋子, 西脇知世乃, 崎村健司, 大塚稔久, 加計正文, 永松信哉: インスリン開口分泌におけるアクティブゾーン構成タンパク質 ELKS の役割 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 京都 2016年5月
3. 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 全身の GHS-R の役割 第59回日本糖尿病学会年次学術集会 京都 2016年5月
4. 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, 森下義幸, 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 京都 2016年5月

5. 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 京都 2016年5月
6. **吉田昌史**, 出崎克也, 中田正範, 内田邦敏, 伊藤聖学, 山田穂高, 富永真琴, 川上正舒, 矢田俊彦, 加計正文: 新規ブドウ糖刺激インスリン分泌惹起経路としての Trpm2 チャンネル 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 下関 2015年5月
7. 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: GPR40 シグナルは背景電流を増加させ膵細胞グルコース応答性を上昇させる 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 下関 2015年5月
8. 伊藤聖学, **吉田昌史**, 山田穂高, 出崎克也, 大河原晋, 川上正舒, 田部井薫, 矢田俊彦, 加計正文: 膵細胞におけるインスリン分泌抑制機序としての cAMP-EPAC 経路 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 下関 2015年5月
9. Yamada H, **Yoshida M**, Ito K, Dezaki K, Kawakami M, Ishikawa S-E, Yada T, Kakei M, Potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by GPR40-PLC-TRPC pathway in pancreatic beta cells. 51th EASD Annual Meeting, 2015 Stockholm, Sweden
10. Yamada H, **Yoshida M**, Ito K, Dezaki K, Kawakami M, Ishikawa S-E, Yada T, Kakei M, Potentiation of glucose-stimulated insulin secretion by GPR40-PLC-TRPC pathway in pancreatic Beta Cells. 7th AASD Scientific Meeting and Annual Scientific Meeting of the Hong Kong Society of Endocrinology, Metabolism and Reproduction. 2015 香港
11. Ito K, **Yoshida M**, Yamada H, Dezaki K, Ookawara S, Tabei K, Kawakami M, Morishita Y, Yada T, Kakei M, Inhibition of Insulin Secretion by Adrenaline is Mediated by Change in Activity of Nonselective Cation

Channel TRPM2. 7th AASD Scientific Meeting and Annual Scientific Meeting of the Hong Kong Society of Endocrinology, Metabolism and Reproduction. 2015 香港

〔図書〕(計 1件)

1. **Yoshida M**, Dezaki K, Uchida K, Kadera S, Lam NV, Ito K, Rita RS, Yamada H, Shimomura K, Ishikawa SE, Sugawara H, Kawakami M, Tominaga M, Yada T, Kakei M, グルコースおよびインクレチン誘発インスリン分泌における cAMP/EPAC/TRPM2 活性化の関与 diabetes 日本語版 (Selected Articles from Diabetes Vol.63, No.10-12) Wiley Publishing Japan K.K., 東京都, 2015;8(3):2-11

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

自治医科大学・医学部・助教  
吉田昌史 (Masashi Yoshida)

研究者番号: 50528411

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし