

表 題 糖尿病発症における新規メカニズムとしての TRPM2 経路異常

論文の区分 博士課程

著 者 名 船崎 俊介

担当指導教員氏名 原 一雄 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
専攻 地域医療学系  
専攻分野 総合医学  
専攻科 内科系総合医学

2021年1月 8日申請の学位論文

## 目次

1. 緒言	p. 3-6
2. 材料および方法	p.9-16
2.1. 実験動物、膵島、膵 $\beta$ 細胞単離	
2.2 試液の組成	
2.3 経口グルコース負荷試験	
2.4 インスリン分泌測定	
2.5 パッチクランプ実験	
2.6 cAMP 測定	
2.7 $\text{NAD}^+$ 濃度測定	
2.8 その他に使用した試薬と溶解方法	
2.9 統計解析	
3. 結果	p.17-36
3.1 週齢の異なる GK ラットへの糖負荷による耐糖能の違い	
3.2 野生型ラット、GK ラット膵島でみられる GSIS の違い	
3.3 週齢の異なる GK ラット膵 $\beta$ 細胞にて生じる TRPM2 電流の違い	
3.4 野生型ラットおよび週齢の異なる GK ラット膵島でみられる cAMP 産生の違い	
3.5 野生型ラットおよび週齢の異なる GK ラット膵島への cADPR インヒビター投与に対するインスリン分泌の違い	

- 3.6 イメグリミンによるグルコース刺激インスリン分泌
- 3.7 NAD<sup>+</sup>および cADPR を介したイメグリミンの血糖降下作用
- 3.8 TRPM2 チャンネルを介したイメグリミンの血糖降下作用
- 3.9 イメグリミン投与によるラットにおけるインスリン分泌

4. 考察 p.37-43

5. 結論 p.44

6. 謝辞 p.45

7. 参考文献 p.46-52

## 1. 緒言

インスリンは膵  $\beta$  細胞から分泌される、血糖値を下げる唯一のホルモンである。インスリンを分泌するメカニズムは広く代謝説が支持されている (1)。以下にそのメカニズムの概要を説明する。グルコースは Glucose transporter 2 を介して膵  $\beta$  細胞内に取り込まれ、クエン酸回路が進むことでミトコンドリアによりアデノシン三リン酸 (ATP: adenosine-5'-triphosphate) が産生される。すると ATP 依存性 K チャネル (KATP チャネル) が閉口し細胞内の脱分極を生じる。KATP チャネルは、糖尿病治療薬として用いられてきたスルホニルウレア剤が特異的に制御することが知られていたチャネルである (2, 3)。KATP チャネルはスルホニル尿素受容体 (SUR: sulfonylurea urea receptor) と内向き整流性  $K^+$  チャネルファミリーのひとつである Kir6.2 とのヘテロ 8 量体で構成される複合体であることが示されている (4)。細胞膜の脱分極により Voltage-dependent であるカルシウム (Ca) チャネルが開口して細胞内の  $Ca^{2+}$  が増加することでインスリンの分泌が生じる。このメカニズムは惹起経路 (図 1-1. KATP 経路) と称される。理論的には KATP チャネルの閉口は膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌を考えるうえで非常に重要なプロセスであるが、細胞膜電位は内向き電流と外向き電流との全体的なつりあいによって決定されるため、膜電位の閾値レベルへのシフトを誘導するには十分ではない (5)。ここで重要な役割を果たしているのが非選択性陽イオンチャネル (NSCC : nonselective cation channel) である。生理的状态では、 $K^+$  イオンの平衡電位より静止膜電位が正電位側にある。KATP チャネルは  $K^+$  イオンの透過性が高いため、KATP チャネルの抑制により膜の脱分極が生じるには、内向き電流をもたらす異なるイオンチャネルが必要となる。その務めを果たすのが NSCC である。膵  $\beta$  細胞におけるインスリン分泌刺激開始の過程で、NSCC のグルコー

ス刺激による開口の結果、内向き電流が増加する。静止膜電位調節に関して、この現象が KATP チャネルの閉口による膜抵抗の増大と協同して細胞膜脱分極を促進するという、KATP チャネルと NSCC による bichannel-regulation が重要である (5-8)。

インクレチンは経口摂取した栄養素に準じて腸管から分泌される消化管ホルモンであり、インスリンをグルコース依存的に分泌する作用をもつ。小腸上部の K細胞から分泌される glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)、小腸下部の L細胞より分泌される glucagon-like peptide-1 (GLP-1)が確認されている (9)。インクレチンの一つである GLP-1 は環状アデノシン 1 リン酸 (cyclic AMP: cAMP)を介して  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させてインスリンを分泌する「増幅経路」と称される機構をもつ。しかしながら、この増幅経路によるインスリン分泌機構は生理的濃度より濃い濃度のインクレチン濃度で示された現象であった。我々のグループは生理的濃度である 100pmol/L (pM)の GLP-1 受容体作動薬のひとつ Exendin-4 が Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) 経路を介して内向きの背景電流である transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2)チャネルを開口させ、インスリン分泌を増強することを報告した (10) (図 1-2)。

TRP チャネルとは細胞膜に存在するイオンチャネルの一つで、ヒトでは 6 つのサブファミリーと 27 のチャネルからなる大規模なチャネル群である (11)。TRP の基本構造は、6 回膜貫通型のチャネルであり、ホモないしヘテロ四量体を形成してイオンチャネルを形成する。細胞質の N 末端、C 末端部分には特徴的な構造があり、チャネル活性を調節するうえで重要である。近年の解析技術の進歩により、TRP チャネルの高分解能な構造が発表されており、より詳細な機能が同定されることが期待されている (12)。TRPM2 は TRPM ファミリーに属している。TRPM2 チャネルは NSCC のひとつであり、インスリン分泌との関連につ

いて種々の報告がある。たとえば温度刺激や環状アデノシン二リン酸リボース、過酸化水素による刺激で活性化されインスリン分泌促進につながると報告されている (13-15)。他方、TRPM2 チャンネルの活性化が抑制されインスリン分泌の減弱する分子としてグレリンが挙げられる (17)。

食後に血糖値が上昇する際、追隨して生じる急峻なインスリン分泌は追加分泌と呼ばれる。追加分泌は二相性であり、グルコース刺激直後の急峻な第 1 相とその後の持続的な第 2 相が存在することは半世紀以上前から周知の事実である (17)。糖尿病前段階～2 型糖尿病患者はインスリン第 1 相分泌が落ちている (18)。また、空腹時血糖がわずかに上昇した段階で、インスリン第 1 相分泌の低下が既にみられるようになる (19)。ヒトは糖尿病を発症する約 10 年前より食後高血糖を生じる (20)。これはインスリン第 1 相分泌の低下に起因するものが大きい。

Trpm2 をノックアウトしたモデルマウス (TRPM2-KO) は第 1 相のインスリン分泌が抑制されていることが報告されている (21)。これは糖尿病初期の病態と類似する。すなわち、糖尿病発症そのものに TRPM2 チャンネルの異常が関連していることが示唆される。TRPM2 のさらなる下流のシグナルを検討すべく、我々は環状アデノシンリボース (cADPR) に着目した。cADPR は TRPM2 のアクチベーターとして機能し、TRPM2 チャンネルを介したインスリン分泌のメカニズムに重要な因子であることが報告されているためである (14)。そして、新規経口血糖降下薬であるイメグリミンが cADPR の材料である NAD<sup>+</sup>を増やすことで Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) を増強するメカニズムを有することも報告されている (22)。イメグリミンは化学物質名 (6R)-(+)-4-dimethylamino-2-imino-6-methyl-1,2,5,6-tetrahydro-1,3,5-triazine hydrochloride で示される構造物であり、「グリミン」に属する経口血糖降下薬である。ミトコンドリア機能不全は膵臓の  $\beta$  細胞に悪影響を及ぼし、循環するグルコースに反応してインスリンの産

生と放出を減少させるが、イメグリミンはミトコンドリア機能を改善する機序を持つ抗糖尿病薬として知られていた (23)。また、イメグリミンは  $\beta$  細胞機能を維持し、グルコース誘導性インスリン分泌の増加に寄与することが知られている (24,25)。しかしながら、イメグリミンの TRPM2 チャネルを介した GSIS のメカニズムは知られていない。また、TRPM2 チャネルを介したインスリン分泌のメカニズムは、すべて野生型モデル動物を用いて得られたものであり、TRPM2 チャネルの機能異常が糖尿病発症の病態に関与しているかに関しては不明であった。

本研究の目的は、2 型糖尿病自然発症モデル動物において TRPM2 チャネルの機能異常が糖尿病発症との関与があるか否か、さらに TRPM2 が他のシグナル、特に cADPR を介したインスリン分泌に関連しているかについてイメグリミンを用いて検討することである。以下の研究プロトコールを立案した。

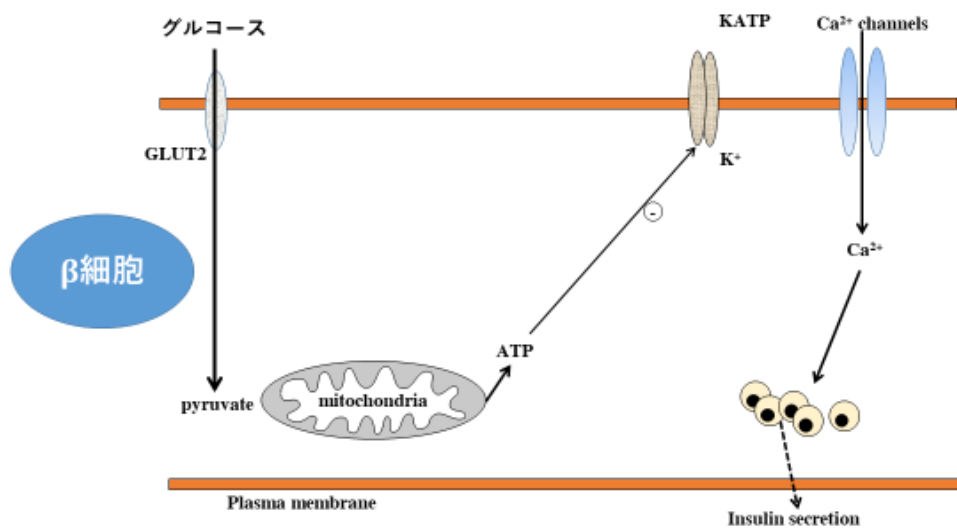


図 1-1. 膵  $\beta$  細胞における KATP 経路の模式図 (文献(1) (10)を参照、一部改変)

GLUT2: Glucose transporter 2, ATP: adenosine-5' - triphosphate, KATP: K-ATP channel



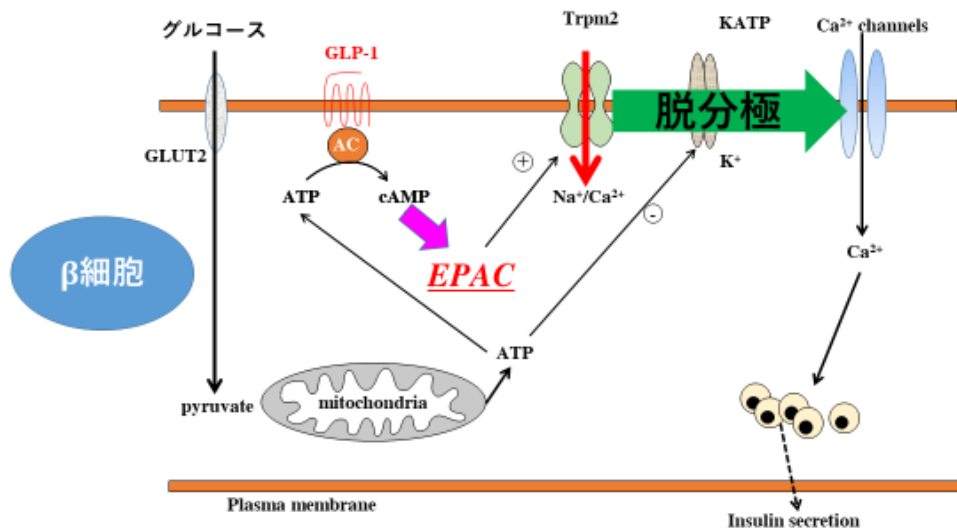


図 1-2. 膵  $\beta$  細胞における TRPM2 経路を介した新規インスリン分泌メカニズム  
(文献(10)を参照、一部改変)

GLUT2: Glucose transporter 2, KATP: K-ATP channel, ATP: adenosine-5' – triphosphate, cAMP: cyclic Adenosine monophosphate, EPAC: Exchange protein directly activated by cAMP

## 2. 材料および方法

### 2.1 実験動物、膵島、膵 $\beta$ 細胞単離

#### (1) 実験動物

8～12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス(日本 CLEA、東京)、8 週齢の雄性 Wistar ラット (日本 CLEA、東京)、5 及び 8 週齢の雄性 Goto-Kakizaki ラット (GK ラット、日本 CLEA、東京)を使用した。GK ラットを用いた先行研究のほとんどが雄性ラットを用いたものであり、性周期による実験条件のばらつきを抑えるため雄性ラットを選択した。GK ラットは非近交系の Wistar ラットから耐糖能異常を指標に選択的繁殖を行い作られたラットで、インスリン分泌能の低下による空腹時血糖高値をはじめとした耐糖能悪化を示す (26)。遺伝子改変マウスとして、8-12 週齢の TRPM2-knock out (KO) マウスを用いた。この TRPM2-KO マウスは京都大学大学院工学研究科教授森泰生先生より供与を受け、自治医科大学において C57BL/6J マウスと 9 代以上に渡って交配を繰り返してきたものである (21, 27)。動物は明暗 12 時間サイクルの環境下において、水および餌を自由に摂取できるような状態で飼育された。全ての実験は自治医科大学における各実験委員会で承認を受けており、動物実験指針に従って行われた。

#### (2) ラットおよびマウス膵島の単離方法

$\text{Ca}^{2+}$ -free HEPES-buffered Krebs-Ringer bicarbonate buffer (HKRB; 組成後述)を 5.6 mmol/L (mM) グルコースに調整し、0.03 %ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin (BSA)、WAKO、大阪)を添加して使用した。コラゲナーゼ溶液は、前述の溶液 10 mL に 100 mM  $\text{CaCl}_2$  0.5 mL およびコラゲナーゼ (Sigma-Aldrich Japan、東京)10 mg を添加したものを使用した。まず、腹腔内麻酔としてペントバルビ

タールを用いた。ペントバルビタールの濃度はマウス・ラット別に調整 (マウスは 10 mg/mL、ラットには 50 mg/mL) し、週齢や体格に合わせて 0.2-0.4 mL を用いた。その後、十二指腸の総胆管開口部を同定し、十二指腸総胆管開口部に小孔を開けカニューレを挿入し、ナイロン糸で結紮固定した。胸鎖乳突筋を切断し、気管を切除しないよう注意しながら内頸動脈を切断しマウスを脱血死させた後、左右肝管合流部をナイロン糸で結紮した。その後速やかにコラゲナーゼ溶液をカニューレから注入し、膵臓全体が溶液で満たされ膨張したことを確認し、周囲の臓器 (胃、腸管、脾臓) から剥離し摘出した。摘出した膵臓を 5.6 mM glucose (mMG)  $\text{Ca}^{2+}$ -free HKRB に入れた後、恒温槽内で 37°C 15 分間加温した。10 mL シリンジにガラス管を装着し、コラゲナーゼにより加温消化された膵臓に対してピペッティング・吸引の繰り返しを行うことで物理的に結合組織を分離した。攪拌した膵臓を 10 mL 遠沈管に移し、8 °C、1400 revolution per minute (rpm) で 20 秒間遠心し、その後上澄み液を捨て、0.1 % BSA 入り 5.6 mMG  $\text{Ca}^{2+}$ -free HKRB 液で懸濁洗浄した。この遠心過程を 3 回繰り返した後、氷上シャーレ内で実体顕微鏡下に、白色米粒様に確認できるマウス・ラット膵島を採集した。インスリン分泌・cAMP・ $\text{NAD}^{+}$  測定にはこの過程で採集されたマウス・ラット膵島を使用した。

### (3) ラットおよびマウス膵 $\beta$ 細胞単離培養方法

2.1 (2) で採取されたマウス・ラット膵島を 0.1%BSA 入り 5.6 mMG HKRB 液を 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$  に添加・調整した溶液 200  $\mu\text{L}$  を加え、800 rpm 30 秒間の遠心を行った後、上澄み液を捨てるという操作を 2 回繰り返した。その後膵島から膵  $\beta$  細胞へ単離するために、1mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) に調整された 0.1%BSA 入り 5.6 mMG  $\text{Ca}^{2+}$ -free HKRB 液 200  $\mu\text{L}$  を加え、15 分間室温で静置し

た。15 分後、200 $\mu$ L のピペットマンを用いてピペッティングし、膵  $\beta$  細胞を単離した。それらを Eagle's minimal essential medium (E-MEM) (5.6 mM MG + 10% ウシ胎児血清 (Biowest、France) + 100 U/mL ペニシリン + 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン) 10 mL に移し、1200 rpm で 5 分間遠心した。遠心後に上澄み液を吸引・除去し、膵島 30 個/1 シャーレの割合を目安として、滅菌シャーレ内に置かれたアルコール洗浄後のカバーガラス上に、単離された膵  $\beta$  細胞を撒いた。カバーガラスへ接着するように、15 分間 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で静置した後、シャーレ内に E-MEM を 3.5 mL 追加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で 12 時間以上培養し、マウス・ラット膵  $\beta$  細胞とした。この過程で作成されたマウス・ラット膵  $\beta$  細胞をパッチクランプ実験に使用した。

## 2.2 試液の組成

### (1) 細胞外液 (Ca<sup>2+</sup>-free HKRB) 組成

NaCl 129 mM、KCl 4.7 mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM、NaHCO<sub>3</sub> 5 mM、MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM HEPES 10 mM

上記の溶液は実験当日に、NaOH を用いて pH 7.4 に調整して使用した。CaCl<sub>2</sub> はパッチクランプ実験、インスリン分泌実験、cAMP 測定、NAD<sup>+</sup>測定時に 2 mM となるように添加された。グルコース濃度は実験当日に、条件に併せて必要な濃度 (2.8 mM、5.6 mM、16.6 mM) に調整して使用した。

### (2) パッチクランプ法(穿孔パッチ法ホールセルモード)のピペット内溶液組成

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40mM、KCl 5mM、MgCl 25mM、EGTA 0.5 mM、HEPES 10mM

上記の溶液は適宜 KOH を使用し pH 7.2 に調整され、実験時に dimethyl sulfoxide (DMSO; WAKO、大阪) に溶解した amphotericin B 200  $\mu$ g/mL (Sigma-Aldrich Japan、

東京)を添加して使用した。

### 2.3 経口グルコース負荷試験

グルコース負荷試験は、野生型ラット (Wistar ラット) および GK ラットを用いて行われた。野生型ラットは 8 週齢、GK ラットは 5 週齢および 8 週齢をそれぞれ用いた。

方法として、既報のように経口グルコース負荷試験の前日夕方より試験当日まで絶食とし、それぞれのラットの体重測定を行った。グルコースには 50%糖液 (大塚、東京)を用いた。試験開始時、各ラットに対するグルコースの投与量が 2 g/kg となるように調整され、投与された(28,29)。血糖値測定は、0 分 (グルコース投与前)、投与後 5 分、15 分、30 分、60 分、120 分時点で、それぞれ尾静脈からの血液の採取を行い、経口グルコース負荷試験にはグルテストネオアルファ (三和化学、名古屋) を腹腔内グルコース負荷試験にはスタットストリップ (LifeScan Japan、東京)を使用して血糖値を測定した。血糖測定と同時に尾静脈からの血液をヘパリンでコーティングしたガラス管を用いて採取した。血液はすみやかに 11000 rpm 5 分で遠心し、血球成分を分離させたのち血漿成分をマイクロチューブに分離し氷冷保存を行い、インスリン濃度測定に供した。

### 2.4 インスリン分泌測定

2.1 (2) の方法で単離された膵島を顕微鏡目視下で分別し、ピペットマンを用いて各エッペンドルフチューブにサイズが均一になるように同数ずつ分け入れた。2 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.1 %BSA 添加の 2.8 mM MG HKRB 液下、恒温槽内 37°C で 30 分間静置した。その後各エッペンドルフチューブには、実験に応じて、各濃度のグルコース、0.1 nmol/L (nM) exendin-4 (Ex-4)、イメグリミン 100 μmol/L (μM)、2-

APB 10  $\mu$ M が 2 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.1 % BSA 添加 HKRB 液に全体として 1 mL となるようにそれぞれ調整され、試験液を添加後、恒温槽内 37°C で 10 分間分間静置された。静置後、4°C 800rpm で 10 秒間遠心され、各エッペンドルフチューブの上清を採取し、インスリン濃度の測定をした。インスリン濃度の測定は ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) インスリン測定キット (森永生化学研究所、横浜) を用いて実施された。

## 2.5 パッチクランプ実験

### (1) パッチクランプ法

パッチクランプ法は細胞膜においてイオンチャネルの分子活動を、それらのチャネルを通過する電流として測定する方法である。ガラス管で作成された電極をギガ・オーム ( $\Omega$ ) 以上の高い抵抗で細胞膜に密着させ (ギガシール形成)、その電極先端部の微小膜領域 (パッチ膜) を電氣的に他の領域と隔絶した状態で、その領域内のイオンチャネルを通過する電流を測定する方法である。本研究では、穿孔パッチ法によるホールセルモードパッチクランプ法を用いて実験を行った。細胞膜電流を Dimethyl sulfoxide (0.1%) に溶解した amphotericin B を吸引したガラス電極を用いた。作成には電極プラー (PP-830、ナリシゲ、東京) を利用した。電極用マイクロフォーシ (MF-830、ナリシゲ、東京) を用いて、ガラス電極の先端に熱処理を行ったのち実験に用いた。

パッチクランプ実験の測定では既報に準じて、増幅器として Axopatch 200B (Molecular Devices、USA) を、コンピューターソフトとして pCLAMP10.2 (Molecular Devices、USA) をそれぞれ使用した (30, 31)。電流測定については、背景電流の一種で、非選択性陽イオンチャネルの一つである transient receptor potential (TRP) チャネル電流を測定した。電気生理学的実験は、恒温槽内での灌

流液の加温、および室温を一定に保つことにより、32~37℃で行われた。ガラス電極はパッチ電極抵抗 3~7 M $\Omega$  のガラス電極を用いて実験を行った。

単離した膵  $\beta$  細胞は CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置し培養した。実験には単離 12 時間後から 3 日以内のものを用いた。膵  $\beta$  細胞が接着しているカバーガラスを岩石カッターで分割し、速やかに、コントロール液である 2 mM CaCl<sub>2</sub> 添加 2.8 mM MG HKRB 液で灌流されている倒立顕微鏡のステージに設置したチャンバー内に置いて実験を開始した。ガラス電極を膵  $\beta$  細胞に接着してギガシールを形成後、試験液を灌流し、電流および膜電位の観察を行った。また、異なる組成の灌流液の入った複数のビーカーを恒温槽内 (TR-1A、アズワン、大阪) に置き、ビーカー内に入れたチューブをモーター駆動のハイトルクポンプ (MINIPULS3、ギルソン、USA) に装着し、その他端を倒立顕微鏡ステージ上のチャンバー内に連結し一定速度で流すことによって、チャンバー内の温度を保持した。各濃度に設定された溶液を入れたビーカー内に置かれたチューブを、他のビーカーに手動で移し替えていくことで灌流液の交換を行った。

## (2)背景電流 (TRP チャネル電流) 測定

背景電流の一種である TRP チャネル電流は、ホールセルモードボルテージクランプ法を用いて観察された。膵  $\beta$  細胞にグルコース刺激を行うと KATP チャネル電流が必ず観察されるため、この影響を排除する必要がある。本実験では -70 mV に電位を固定、保持したが、これは KATP チャネルの逆転電位に近似していることに起因する。スルホニル尿素薬は KATP チャネルを強制的に閉鎖させる試薬であるが、本実験ではスルホニル尿素薬の一種であるトルブタミド 100  $\mu$ M を添加した溶液を灌流することで KATP チャネルを確実に閉口し、KATP チャネルの開閉の影響を受けない状態で、電流を観察した。観察される電流は先行研

究より背景電流であると判断した (6, 32)。グルコース刺激および 0.1 nM Exendin-4 刺激で TRP チャンネルによる背景電流増加を認め、これは TRPM2-KO マウスで観察されなかったことから、本実験において観察される背景電流は、TRPM2 チャンネル電流によるものと判断した (10, 27, 33)。使用される溶液は 2 mM CaCl<sub>2</sub> 添加 HKRB 液を基本として、それぞれ、グルコース濃度、イメグリミン濃度は調整され、その他の試薬も適宜添加された。各種受容体アンタゴニスト濃度は、先行研究における報告や各薬剤の阻害定数を基準に設定した。

## 2.6 cAMP 測定

インスリン濃度測定と同様に、2. 1 (2)の方法で単離された膵島は、サイズが均一になるように各エッペンドルフチューブに同数ずつピペットマンで分けられ、2 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.1 % BSA 添加の 2.8 mM MG HKRB 液下、恒温槽内 37°C で 30 分間静置された。その後各エッペンドルフチューブには実験に応じて、グルコースは 2.8 mM、もしくは 16.6 mM が 2 mM CaCl<sub>2</sub> および 0.1 % BSA 添加 HKRB 液に全体として 1 mL となるようにそれぞれ調整され、試験液が添加された。また 500 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine も同時に添加され、恒温槽内 37°C で 60 分間静置された。60 分の恒温槽内静置後に破砕機を用いて十分に粉砕した。その後遠心してエッペンドルフチューブの上清を回収し、cAMP の測定を行った。cAMP の測定は EIA (Enzyme Immunoassay) cAMP 測定キット (GE Healthcare、UK) を用いて実施した。

## 2.7 NAD<sup>+</sup>濃度測定

インスリンおよび cAMP 濃度と同様に 2. 1 (2)の方法で膵島を単離し、サイズを合わせた 10 個の膵島の各バッチを 2.8 mM MG を添加した HKRB 中に入れ、37°C



で 30 分間静置させた後、2.8mMG、16.6mMG、イメグリミンを加えた 16.6mMG の HKRB 液でそれぞれ 60 分間インキュベートした。上清を遠心分離により除去し、臍島を PBS dodecyl-trimethylammonium bromide solution 溶液中で溶解し、-80°Cで保存した。NAD<sup>+</sup>は、NAD<sup>+</sup>/NADH Glo アッセイキット (#G9071、Promega、USA) を用いてルシフェラーゼアッセイにより定量した。

## 2.8 その他に使用した試薬と溶解方法

純水を用いて溶解した試薬は、8-Bromo-cADPR (Santa Cruz Biotechnology)。DMSO を用いて溶解した試薬は、2-aminoethoxydiphenyl borane (2-APB; Sigma-Aldrich)、イメグリミン (Adooq Bioscience LLC)であった。

## 2.9 統計解析

結果は平均値±標準誤差 (mean±SE) により示した。2 群間比較には paired ないし unpaired Student-t 検定を用いた。多群間の比較の際には一元配置分散分析を行った後、Bonferroni の多重検定を行った。データ解析のためのソフトウェアとして Graph Pad Prism version 7.0 を用いた。P<0.05 をもって、統計学的に有意とした。

### 3. 結果

#### 3.1. 週齢の異なる GK ラットへの糖負荷による耐糖能の違い

種別、および週齢の差が耐糖能に与える影響を検討するため、GK ラット (5 週齢 GK ラット; GK5、8 週齢 GK ラット; GK8)に対して 2g/kgBW グルコースの経口糖負荷試験を行った。経口グルコース負荷試験においては、空腹時血糖値に 2 者間での違いを認めなかったが、GK5 と比較し GK8 は、グルコース負荷試験開始後 15 分、30 分、1 時間で血糖値が有意に上昇していた (図 2A; 負荷後 30 分:  $p < 0.05$ , 負荷後 15 分、1 時間:  $p < 0.01$ )。同時測定した血漿インスリン値は、空腹時の時点で GK5 と比較し GK8 で有意に高かった (図 2B;  $p < 0.01$ )。

糖負荷後急峻なインスリン分泌を比較検討するため、負荷前のインスリンと任意の時間帯のインスリン値の差を新しい変数として作成した ( $\Delta$ インスリン)。GK5 と GK8 を比較すると、 $\Delta$ インスリンはグルコース負荷後 5 分、15 分で、有意に GK8 において低下していた (図 1C;  $p < 0.05$ )。GK5 と GK8 ではグルコース負荷後のインスリン分泌に差が生じ、血糖変動に差を認めることが示唆された。

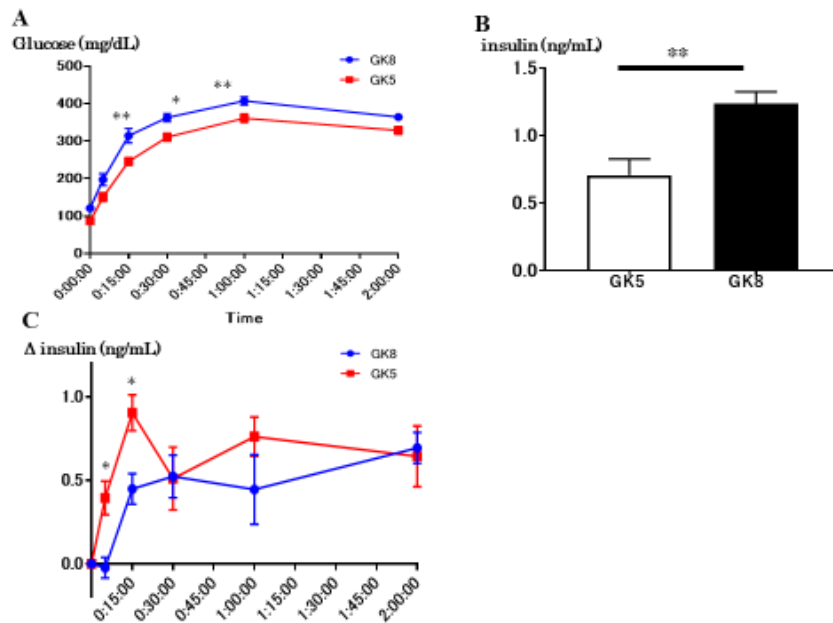


図 2. GK5 と GK8 における耐糖能の違い

A: GK ラットに対して 2g/kgBW グルコースを経口投与した際の血糖値 (n=9, \*P < 0.05 vs GK5, \*\*P < 0.01 vs GK5) B: GK ラットに対して糖負荷試験を行う前のインスリン値 (n=9, \*\*P < 0.01 vs GK5) C: GK ラットに対して 2g/BW グルコースを経口投与した際の Δ インスリン値 (Δ インスリンはグルコース負荷後から負荷前のインスリン値を減算することにより算出) (n=9, \*P < 0.05 vs GK5 \*\*P < 0.01)

### 3.2. 野生型ラット、GK ラット膵島でみられる GSIS の違い

GK ラット膵島において、2.8mMG および 16.6mMG 下で 10 分間刺激を行った際のインスリン分泌を比較した。GK5 では 2.8mMG でのインスリン分泌と比較して 16.6mMG 下では有意にインスリン分泌の増加を確認したが、GK8 では有意な増加を認めなかった (図 3A)。同等の条件下で、60 分間の刺激を行ったが、GK5 および GK8 いずれも 2.8mMG と比較して 16.6mMG で有意な増加を確認した (図 3B)。

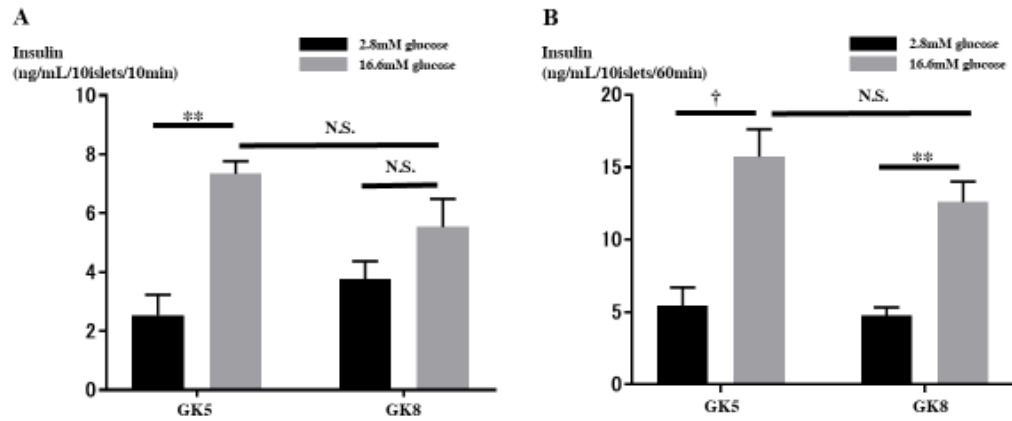


図 3. GK5 と GK8 の第 1 相・第 2 相インスリン分泌における違い

A: GK ラットの膵島に 10 分間 2.8mMG および 16.6mMG で刺激を行った際のインスリン値 (n=5~8, \*\*P < 0.01 vs GK5, N.S. not significant.) B: GK ラットの膵島に 60 分間 2.8mMG および 16.6mMG で刺激を行った際のインスリン値 (n=4~6, \*\*P < 0.01 vs GK5, †P < 0.005.)

### 3.3. 週齢の異なる GK ラット膵 $\beta$ 細胞にて生じる TRPM2 電流の違い

グルコースや Exendin-4 刺激によって増加する背景電流が、非選択性陽イオンチャンネルのひとつである TRPM2 チャンネルを介する電流であることは既報(10)のとおりである。単離膵島を用いた検討から GK8 のグルコースに対するインスリン分泌が減弱していたことより、TRPM2 チャンネルを介した背景電流におよぼす影響について検討した。GK5 および GK8 におけるグルコース刺激背景電流の観察を行った。16.6 mM 刺激による背景電流増加は GK5 においてのみ確認され、GK8 では消失した (図 4A,B)。続いて 5.6 mM 下 0.1 nM Exendin-4 刺激による背景電流の観察を行った。GK5 では有意に増加が見られ、GK8 では電流増加の程度は減弱したが、反応は保持された (図 4C,D)。これらの結果より、GK5 ではグルコース、Exendin-4 刺激により TRPM2 チャンネルを介した背景電流がいずれも保持されるのに対し、GK8 ではグルコースによる TRPM2 チャンネルを介した背景電流が抑制されることが示唆された。

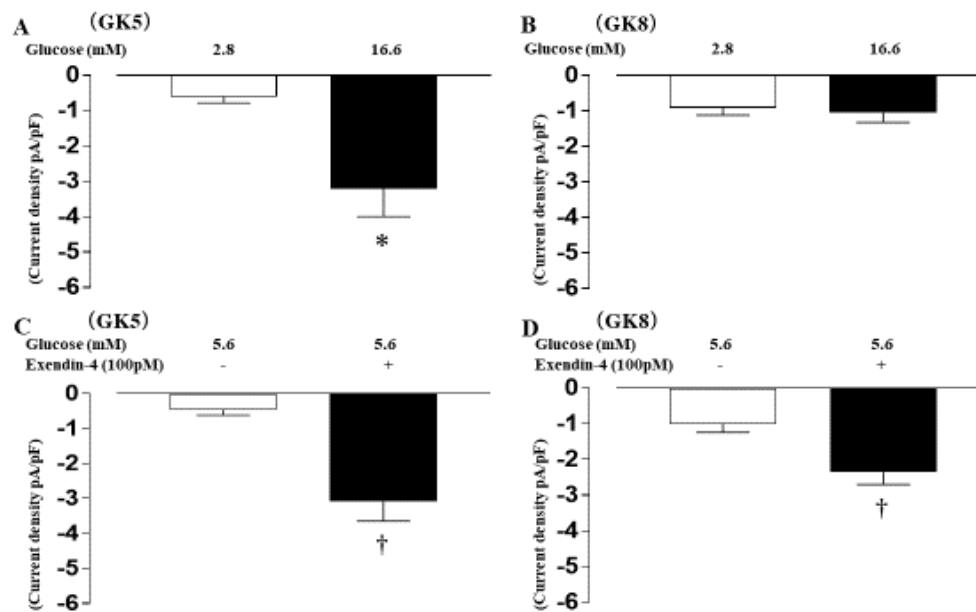


図 4. GK5 と GK8 のグルコース、Exendin-4 に対するトルブタミド添加条件の背景電流の違い

A: GK5 に 16.6mMG を用いた検討 (n=5)。

B: GK8 に 16.6mMG を用いた検討 (n=5)。

C: GK5 に 5.6mMG を背景電流として、100pM Exendin-4 を投与した検討 (n=5)。

D: GK8 に 5.6mMG を背景電流として、100pM Exendin-4 を投与した検討 (n=5)。

A,B: \*P < 0.05 vs 2.8mMG C,D: †P < 0.005 vs 5.6mMG control.

### 3.4. 野生型ラットおよび週齢の異なる GK ラット膵島でみられる cAMP 産生の違い

16.6mMG 刺激をおこなった野生型ラットおよび GK5 膵島は、2.8mMG 刺激を行った膵島と比較し有意に cAMP 産生が増加した。一方、GK8 では 16.6mMG で刺激した膵島と 2.8mMG で刺激した膵島との cAMP 産生に有意差を認めなかった。GK8 膵島の 16.6mMG 刺激における cAMP 産生量は、他種と比較して有意に低下はしていなかった (図 5)。



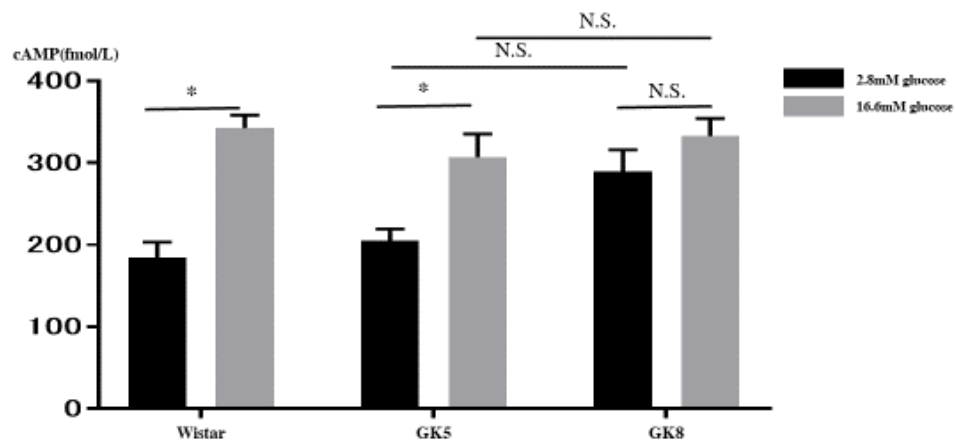


図 5. 野生型および GK5、GK8 における cAMP 産生の違い

野生型ラット、GK5、GK8 にそれぞれ 2.8mMG および 16.6mMG の刺激を行い測定された cAMP 値。 (n=5~10, \*P < 0.05 vs 2.8mMG, N.S.; not significant.)

### 3.5. 野生型ラットおよび週齢の異なる GK ラット膵島への cADPR インヒビター投与に対するインスリン分泌の違い

16.6mMG 刺激により、2.8mMG 刺激下と比較して有意に上昇した野生型ラットおよび GK5 膵島におけるインスリン分泌は、cADPR インヒビターである 100 $\mu$ M の 8-Bromo-cADPR の投与により有意に抑制された。GK8 では 2.8mMG 刺激を行った膵島と比較し 16.6mMG 刺激で有意なインスリン分泌の増加を認めず、16.6mMG 下で 8-Bromo-cADPR を投与してもさらなる抑制は認めなかった (図 6)。

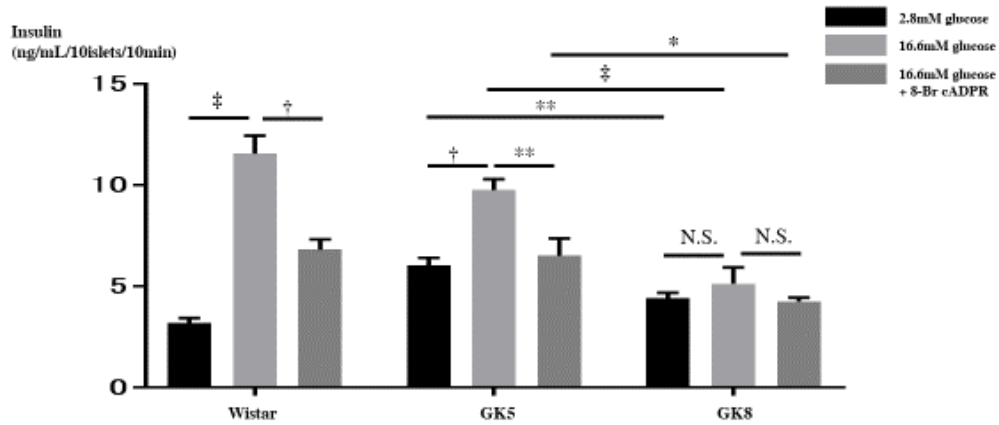


図 6. 8-Br-cADPR による GSIS 抑制効果

野生型ラット、GK5、GK8 にそれぞれ 2.8mMG, 16.6mMG および 16.6mMG 下に 8-Br-cADPR を投与して 10 分間の刺激を行い、測定されたインスリン値 (n=4~6, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, †P < 0.005, ‡P < 0.001)。

### 3.6. イメグリミンによるグルコース刺激インスリン分泌

イメグリミンが GSIS をもたらすか否かの検証を行った。イメグリミンによるマウス膵島における効果を、それぞれ 2.8mMG と 16.6mMG の条件下で測定した。バッチインキュベーション法による膵島からの GSIS は、2.8mMG よりも 16.6mMG の方が大きかった。16.6mMG 下で 100 $\mu$ M のイメグリミンを添加することでインスリン分泌は有意に増強されたが、イメグリミンを 2.8mMG 下に添加してもインスリン分泌に影響を及ぼさなかった (図 7)。

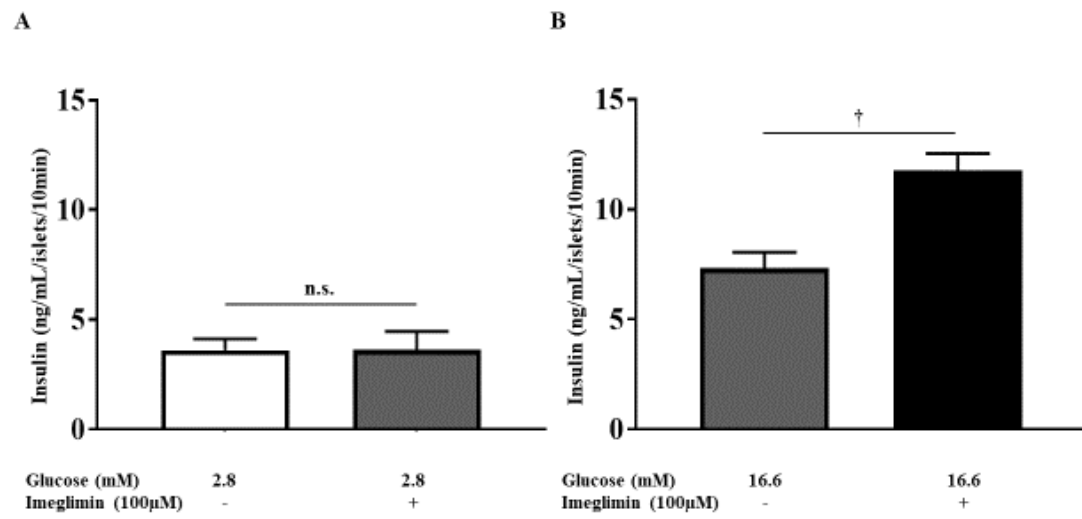


図 7. イメグリミンによる GSIS

野生型マウスに対して (A)2.8mMG, (B)16.6mMG 下で 10 分間の刺激を行った。

(n=4~7, †P < 0.005, vs. 16.6 mMG)

### 3.7. NAD<sup>+</sup>および cADPR を介したイメグリミンの血糖降下作用

先行研究(8)では、イメグリミン投与により NAD<sup>+</sup>産生が増加することが報告されていたため、本研究でも追証実験を行った。2.8mMG と 16.6mMG 下で NAD<sup>+</sup>産生を比較したとき有意差を認めなかったが、16.6mMG 下で 100  $\mu$ M のイメグリミンを投与することで 16.6 mMG 下と比較し膵島の NAD<sup>+</sup>生合成は増加した (図 8A)。イメグリミンが cADPR を介した GSIS 作用を示すか検証するために、cADPR インヒビターである 8-Bromo-cADPR を用いて、単離膵島を用いたバッチインキュベーションを行った。100 $\mu$ M のイメグリミンにより増強した第 1 相 GSIS は 100  $\mu$ M の 8-bromo-cADPR により阻害された (図 8B)。

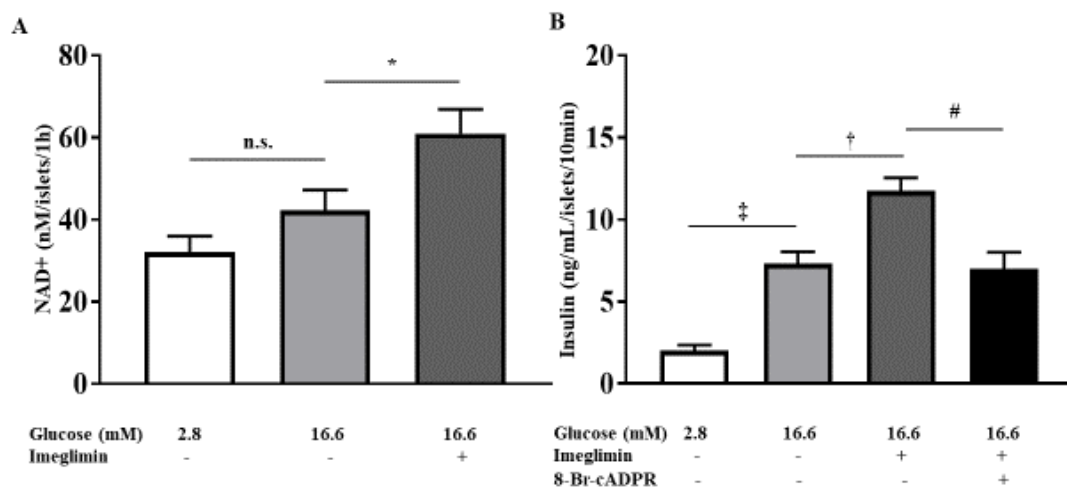


図 8. NAD<sup>+</sup>と cADPR のイメグリミンによる GSIS との関連

(A) 野生型マウス膵島を 2.8 または 16.6mMG で 60 分間刺激し、一部 100μM のイメグリミンを 16.6mMG に添加した。 (n= 5~6, \*P<0.05、vs 16,6mMG)

(B) 野生型マウス膵島を 2.8 または 16.6mMG で 10 分間刺激した。16.6mMG には適宜 100μM イメグリミンを、またはさらに 100μM8-Br-cADPR を添加した。

(n= 5~7, †P < 0.005、 ‡ P < 0.001、 vs2.8 or 16.6mMG、 #P < 0.005, vs 16.6mMG + 100μM イメグリミン)

### 3.8. TRPM2 チャンネルを介したイメグリミンの血糖降下作用

野生型マウスのイメグリミンによる GSIS は、TRPM2 チャンネルブロッカーである 2-APB (10  $\mu$ M) によって抑制された。さらに、TRPM2-KO マウスを用いて、TRPM2 チャンネルの活性化がイメグリミンによる GSIS の亢進に関与しているかどうかを調べた。TRPM2-KO マウスの膵島では、イメグリミンによる GSIS は促進されなかった (図 9A および B)。これらの結果から、イメグリミンの TRPM2 チャンネルを介した NSCC 電流を増強する作用がインスリン分泌促進作用に関与していることが示唆された。さらに電気生理学的実験を行った。5.6mM および 100 $\mu$ M トルブタミドの存在下で電位をクランプしたとき、イメグリミンは、5.6mM グルコースにおいて、 $\beta$  細胞単離野生型マウスにおいては NSCC 電流の有意な増加を引き起こしたが、TRPM-KO マウスにおいては有意な増加を認めなかった。 (図 10A および B)



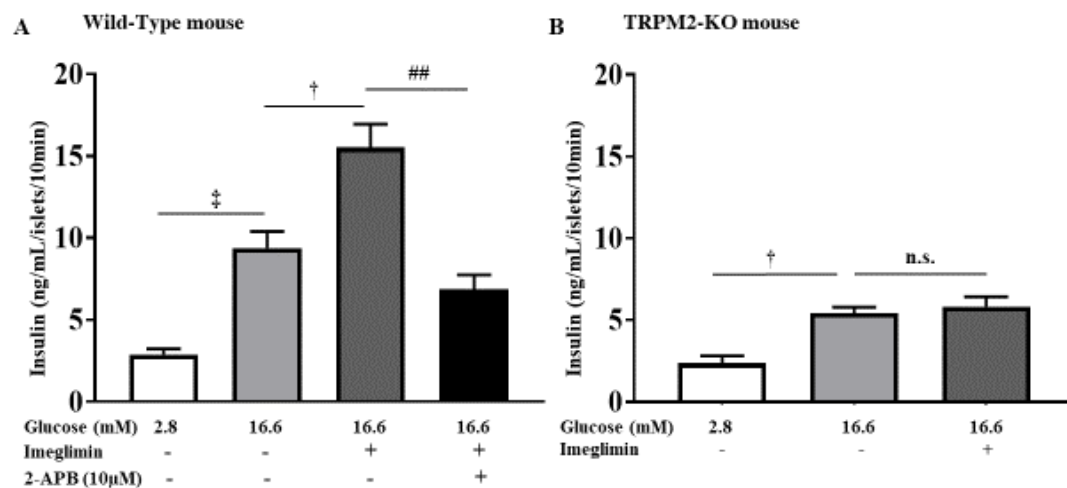


図 9. イメグリミンの GSIS における TRPM2 の関連

A: 野生型マウスの膵島を 2.8 または 16.6mMG で 10 分間インキュベートした。16.6mMG には一部 100μM イメグリミン、または 100μM イメグリミン+10μM 2-APB を添加した。B: TRPM2-KO マウスの膵島を 2.8 または 16.6mMG で 10 分間インキュベートした。一部 16.6mMG には 100μM イメグリミンを添加した。 (n = 5~11, ‡ P < 0.001, † P < 0.005 vs. 2.8 or 16.6 mMG, ## P < 0.001 vs. 16.6 mMG)

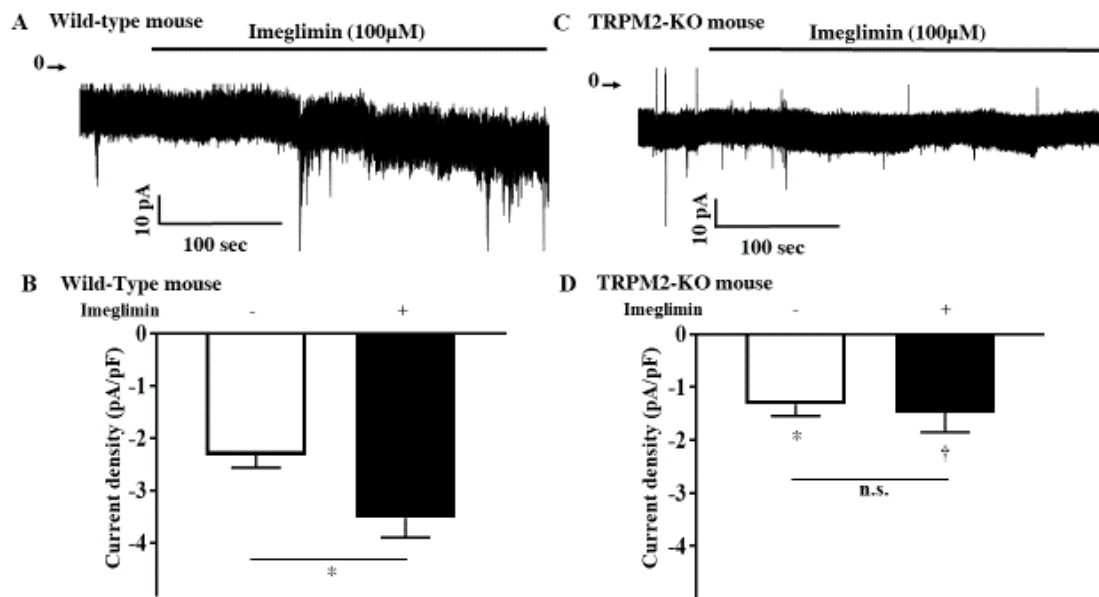


図 10. イメグリミンと膵  $\beta$  細胞における背景電流との関連

A: 野生型マウスと、C: TRPM2-KOマウスの単離した  $\beta$  細胞を、5.6mMG と 100 $\mu$ M トルブタミドの条件下で、100 $\mu$ M イメグリミンの存在下または非存在下で、-70mV で電圧クランプして背景電流の測定実験を行った ( $n = 5$ ,  $*P < 0.05$ ,  $\dagger P < 0.005$  vs 5.6mMG or Wild-Type mouse)。B と D はその細胞膜脱分極の典型例である。

### 3.9. イメグリミン投与によるラットにおけるインスリン分泌

ラット膵島に対しても、マウスと同様にイメグリミン投与によるインスリン分泌の検討を行った。野生型、GK5 膵島に対して 16.6mMG 下にイメグリミン投与を行うことでインスリン分泌は有意に増加した。GK8 でも同様の結果であった。

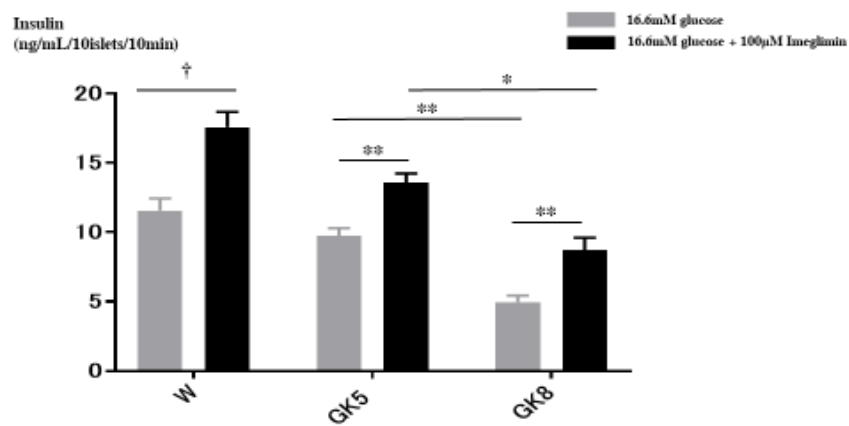


図 11. イメグリミン投与による GSIS 増強効果

野生型ラット、GK5、GK8 にそれぞれ 16.6mMG および 16.6mMG 下にイメグリミンを投与して 10 分間の刺激を行い、測定されたインスリン値 (n=4~8, \*P<0.05, \*\*P<0.01, †P<0.005, ‡P<0.001)。

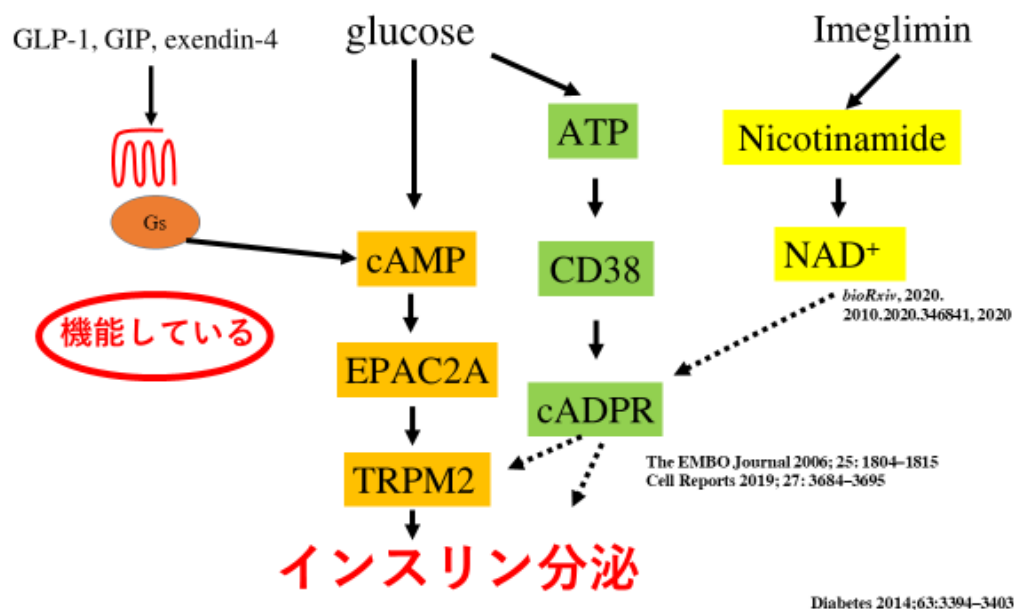


図 12. GK8 の TRPM2 チャンネルを介した第 1 相インスリン分泌と、cAMP-EPAC-TRPM2 経路とは異なる機序の検討

GIP: glucose-dependent insulintropic polypeptide, GLP-1; glucagon-like peptide-1,

ATP: adenosine-5' – triphosphate, cAMP: cyclic Adenosine monophosphate,

EPAC: Exchange protein directly activated by cAMP

#### 4. 考察－1

本研究の結果から、以下の知見を得ることができた。

- ① GK8 は GK5 と比較し第 1 相インスリン分泌が低下していると考えられた。
- ② GK8 はグルコースによる TRPM2 チャネルの開口が抑制されていた。Exendin-4 による TRPM2 チャネルの開口は減弱していたものの保持されていた。
- ③ GK8 は GK5 と比較してグルコースによる cAMP 産生の増強反応が減弱していたが、低グルコース時の結果より、cAMP 産生そのものが低下しているわけではないと考えられた。

膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌を考えるうえで、背景電流が重要な役割を果たすことは十分に確立されており、我々は膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌において K-ATP 経路のみでなく背景電流が重要であると報告してきた。すでに言及している TRPM2 に加えて、TRP ファミリーのメンバーである TRPC3 は、ホスホリパーゼ C (PLC) とプロテインキナーゼ C (PKC) を介してグルコース刺激インスリン分泌 (GSIS) を持っていることを、GPR40 アゴニストを使用した *in vitro* 実験で報告した (33)。しかしながら、糖尿病モデル動物において背景電流のシグナル伝達が糖尿病発症に関連するかを十分に検討した報告はなく、本研究では TRPM2 チャネルの機能異常について発症後 (GK8)、発症早期 (GK5) のモデル動物を用いた検討を行った。GK ラットは 1 型糖尿病モデル動物とは異なり、また、2 型糖尿病動物モデルのなかでもインスリン分泌が完全に枯渇するモデルではないため、2 型糖尿病の発症という視点で行う本研究に適していると考えた。OGTT の結果、GK8 は GK5 と比較して有意にグルコース刺激後早期の血糖値が高値であった。糖負荷前のインスリンは GK8 でむしろ有意に高く、空腹時の時点で既にインスリン抵抗性が生じている可能性が示唆された。GK8 では空腹時

のインスリンが GK5 と比較して有意に高値であったことが原因であったため絶対値の比較でなく、負荷前のインスリンとの差である  $\Delta$  インスリン値を用いて評価を行ったところ、GK8 で負荷後早期の  $\Delta$  インスリンは有意に低下していた。ヒトにおいて OGTT 負荷前後の血漿インスリン差を血漿グルコース値差で除した Insulinogenic index がインスリン初期分泌の評価に有用という報告があることから、負荷前後の差によるインスリンの評価は有用であると判断した (34)。また、パッチインキュベーション法を用いた検討では、GK5 では 10 分、60 分の 16.6mMG による刺激で有意にインスリン分泌が増加していることから第 1 相、第 2 相インスリン分泌が残存していることがわかったが、GK8 では 60 分の 16.6mMG による刺激でのみインスリン分泌の有意な増加を認めたことから第 1 相インスリン分泌が減弱していることが示唆された。さらに、パッチクランプ法を用いた検討では GK8 がグルコースによるトルブタミド添加条件における背景電流が抑制されており、Exendin-4 による反応が保持されたことから、GK8 の第 1 相インスリン分泌の減弱は TRPM2 チャネルのグルコースに対する反応の減弱に起因することが示唆された。TRP タンパク質は、Ca 流入チャネルとしてだけでなく、細胞膜の足場蛋白としても機能している (35, 36)。すなわち TRPM2 タンパク質の減少は、インスリン分泌に必要な EPAC や、KATP チャネルをコードする SUR1 などを正常な位置に維持することができず、インスリン分泌が低下することも考えられる。GK8 の第 1 相インスリン分泌の減弱が足場蛋白としての TRPM2 機能不全に関連している可能性はあるが、今回の研究では TRPM2 チャネルを介した膵  $\beta$  細胞の背景電流減少が観察されたことより、TRPM2 チャネルを介したメカニズムが重要であるといえる。

古くから、 $\beta$  細胞機能不全を最も早い段階で検出できる機能異常は第 1 相インスリン分泌の低下であると考えられている (37)。GK5 と GK8 では第 1 相インス

リン分泌に差異が生じていること、TRPM2-KO マウスにおいて第 1 相インスリン分泌が低下していることは、TRPM2 チャンネル異常が糖尿病発症早期の異常と関連しているという推測を裏付ける結果である。

インスリン分泌における TRPM2 チャンネルの役割は cAMP 依存性の伝達経路を介するものである (10)。cAMP 産生量に対する変化が糖尿病発症前後で生じている可能性を考え、GK5 および GK8 のグルコースによる cAMP 産生を評価した。その結果、GK8 は確かに高グルコースによる cAMP 産生増加反応は低下していたが、それはインスリン分泌減弱の原因でなく結果をみているものではないかと考えた。そもそも低グルコース下に cAMP が十分産生されており、産生そのものが障害されているとは考えにくいためである。産生の増加反応が減弱しているすなわちグルコース/Exendin-4 – cAMP - TRPM2 経路以外に GK8 で障害されているシグナル伝達があると考えた。

TRPM2 を介したさらに下流のシグナルを検討するにあたり、先行研究から、cADPR の関与を考えた。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  のセカンドメッセンジャーとして知られる cADPR は、TRPM2 チャンネルの強力なオープナーであり、膵  $\beta$  細胞インスリン分泌への関与が報告されている (14)。そこで cADPR の阻害薬も用いた検討を行った。



## 考察-2

2-① cADPR インヒビターである 8-Bromo-cADPR は GSIS を抑制され、cADPR のシグナルが低下している可能性がある。

2-② イメグリミンは GSIS を示し、TRPM2 チャネルを介したインスリン分泌機構が存在することが示唆された。

2-③ イメグリミンの TRPM2 チャネルを介したインスリン分泌機構に cADPR が関連することが示唆された。

2-④ イメグリミンは GK8 でも効果を示し、GK8 で低下したシグナルはイメグリミンにより救済できる可能性が示唆された。

cADPR inhibitor を用いた検討では、野生型マウスや GK5 の高グルコースにおけるインスリン分泌を抑制した。また、10 分間での GSIS が消失していた GK8 においては、高グルコース刺激時に分泌された量を下回るインスリン分泌にはならなかった。GK8 の第 1 相インスリン分泌低下には cADPR の低下が関連していることが示唆された。

cADPR Activator として汎用性のある薬剤については報告が少なく、我々は本研究において新規経口血糖降下薬であるイメグリミンに着目した。イメグリミンは、2 型糖尿病患者のインスリン分泌と感受性を改善するために、他の薬物に追加する併用療法に使われる薬剤として開発された薬剤である (23, 38, 39)。ミトコンドリア機能の改善や糖新生の抑制、グルコース依存性のインスリン分泌などのメカニズムにより抗糖尿病効果を発揮する。最近の論文で、cADPR の材料である Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) を介したインスリン分泌効果が報告された (22)。今回、我々の検討によりイメグリミンが GSIS を有すること、

NAD<sup>+</sup>合成を促進することを示した。さらに、cADPR 阻害剤はイメグリミンの GSIS を減衰させた。以上の結果より、イメグリミンの TRPM2 チャンネルを介した GSIS 作用には cADPR が介在していることが示唆された。

cADPR は Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして知られているメディエータである (40)。cADPR は、小胞体膜上のイノシトール三リン酸 (IP3) 受容体に結合して Ca<sup>2+</sup>放出を引き起こす系とは独立した Ca<sup>2+</sup>放出活性を示すことが知られている (41)。CD38 は白血球の細胞表面抗原としても知られる CD ファミリーの一員であるが、これは cADPR 産生酵素として活性を発揮する (42)。糖尿病モデル動物のひとつである Ob/Ob マウスでは、グルコースによる cADPR 濃度の上昇が認められないことが報告されている (43)。CD38 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは、GSIS の亢進を示すが、CD38 ノックアウトマウスは逆に  $\beta$  細胞機能に重度の障害を示す (44)。別の研究では、CD38 遺伝子変異は健常者よりも非インスリン依存性糖尿病患者に多く見られ、CD38 遺伝子変異を持つ患者の血清を投与するとインスリン分泌が減少することが示されている (45)。上記のように、cADPR は糖尿病、およびインスリン分泌と密接に関係している分子であることがわかる。膵  $\beta$  細胞におけるインスリン分泌に cADPR が関与していることを示す文献は他にもあり、Okamoto らは、「CD38-cyclic ADP-リボースシグナル伝達系」として、ATP が CD38 に作用して cADPR の加水分解を阻害し、細胞内カルシウムを増加させ、インスリン分泌につながることを明らかにしている (46)。cADPR は TRPM2 チャンネルの強力なオープナーとしてはたらき、膵  $\beta$  細胞の GSIS に強く関与していることが報告されている (14)。最近の研究では、ヒトの TRPM2 には cADPR が直接結合できるポケットが存在し、cADPR がヒト TRPM2 チャンネルを直接活性化することが示されている (47)。cADPR と TRPM2 チャンネルの関連性については知見が蓄

積されており、本研究結果から、イメグリミンは cADPR-TRPM2 経路を介して GSIS をあらわしていることが示唆された (図 12)。

この研究にはいくつかの限界がある。2 型糖尿病の病態にはインスリン分泌不全、インスリン抵抗性のいずれもが重要である (48)。本研究はインスリン分泌不全を主眼に置いた研究であり、糖尿病の発症を考えるうえではインスリン抵抗性も考慮する必要がある。2 型糖尿病は遺伝的要因と環境的要因または後天的要因の両方が関与している多遺伝子性疾患であるため、TRPM2 機能異常が糖尿病を発症するすべての原因を説明できるものではない (49)。cADPR の  $\text{Ca}^{2+}$  放出促進というメカニズムには議論の余地がある (50)。また、我々が今回施行した実験で脾臓における cADPR のレベルを測定することができなかったため、今後の研究では、イメグリミンを先行投与した糖尿病モデル動物との比較や、cADPR 自体の測定が重要であると考えられる。図 12 に記載したが、イメグリミンと cADPR との関連における着地点も今回の研究では明らかになっていない。本研究で糖尿病発症と TRPM2 チャネルの関連に対する知見が深まったといえるが、cADPR-TRPM2 の系が糖尿病発症、増悪に関連するかは GK5 と GK8 を比較しさらなる検討を行う必要がある。

GK5 と GK8 の *in vivo* および *in vitro* における第 1 相インスリン分泌の差異、グルコースに対する TRPM2 チャネルを介した背景電流の差異から、糖尿病の発症には TRPM2 チャネルの機能不全が関連することが考えられた。イメグリミンがグルコース依存性インスリン分泌増強効果を示すことがわかり、さらにイメグリミンによるインスリン分泌促進は cADPR インヒビターである 8-Bromo-cADPR を用いることでその効果がキャンセルされることが示された。TRP チャネルブロッカーである 2-APB を用いても同様にインスリン分泌促進効果は消失し、さらに TRPM2-KO マウスでも同様の結果を確認できたことから、イメグリ

ミンは cADPR-TRPM2 の系にて GSIS を示し、TRPM2 チャンネルのインスリン分泌機構には cADPR が関連していることが示唆された。

## 5. 結論

本研究により糖尿病自然発症モデルである GK ラットは、その週齢と共にインスリン第 1 相分泌が低下し、同時にグルコースによる TRPM2 チャネルの開口が抑制することが示された。すなわち、糖尿病発症の過程で TRPM2 チャネル開口抑制が重要である可能性が示唆された。そのシグナルには cADPR が関与し、新規経口血糖降下薬であるイメグリミンは cADPR-TRPM2 経路を介したインスリン分泌を示すことが示唆された。

2 型糖尿病の発症は多岐にわたるメカニズムが絡み合ってくるが、本研究はその機構を説明できるひとつの重要な知見である。TRPM2 経路の障害が 2 型糖尿病を発症する前に生じるインスリン分泌第 1 相低下を引き起こしその後の血糖上昇をもたらす要因の一つであれば、cADPR-TRPM2 経路を介したインスリン分泌改善を可能とするイメグリミンは糖尿病発症そのものを予防することができる製剤として活用できることも考えられる。

## 6. 謝辞

本研究は、自治医科大学大学院医学研究科若手スタートアップ研究費からの助成を受けたものであり、ご支援賜りました関係各所のみなさまに深く感謝いたします。本研究を遂行するにあたり全般にわたりましてご指導賜りました、医療創生大学薬学部教授出崎克也先生に深く感謝いたします。

さらに研究に関してご助言およびご支援を賜りました自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科教授原一雄先生、前自治医科大学附属さいたま医療センター長である川上正舒先生、前自治医科大学附属さいたま医療センター内分泌代謝科教授である加計正文先生、実験の指導をしてくださった同准教授永島秀一先生、パッチクランプ実験の技術指導をして下さいました同講師吉田昌史先生、パッチインキュベーションによるインスリン分泌実験や cAMP 測定法などの技術指導をして下さいました同講師山田穂高先生に深く感謝いたします。

また、研究に付随する動物および試薬等の購入、各種事務的作業、実験の補助と多岐にわたり多大な貢献をしていただいた研究補助員の小林千鶴さんをはじめとした循環器病臨床医学研究所の皆様、自治医大さいたま医療センター内分泌代謝科スタッフの先生方に厚く御礼を申し上げます。

## 7. 参考文献

1. F. M. Ashcroft, P. Rorsman, Diabetes mellitus and the  $\beta$  cell: the last ten years. *Cell* 148, 1160-1171, 2012.
2. B. J. Zünkler, S. Lenzen, K. Männer, U. Panten, G. Trube, Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated  $K^+$  currents in pancreatic B-cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 337, 225-230, 1988.
3. M. Hiraoka, Z. Fan, Activation of ATP-sensitive outward  $K^+$  current by nicorandil (2-nicotinamidoethyl nitrate) in isolated ventricular myocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 250, 278-285, 1989.
4. N. Inagaki, T. Gonoi, J. P. t. Clement, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, S. Seino, J. Bryan, Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science (New York, N.Y.)* 270, 1166-1170, 1995.
5. M. Kakei, M. Yoshida, K. Dezaki, K. Ito, H. Yamada, S. Funazaki, M. Kawakami, H. Sugawara, T. Yada, Glucose and GTP-binding protein-coupled receptor cooperatively regulate transient receptor potential-channels to stimulate insulin secretion [Review]. *Endocrine journal* 63, 867-876, 2016.
6. C. A. Leech, J. F. Habener, A role for  $Ca^{2+}$ -sensitive nonselective cation channels in regulating the membrane potential of pancreatic beta-cells. *Diabetes* 47, 1066-1073, 1998.
7. K. Uchida, M. Tominaga, The role of TRPM2 in pancreatic  $\beta$ -cells and the development of diabetes. *Cell calcium* 56, 332-339, 2014.

8. M. Shigeto, R. Ramratcheya, A. I. Tarasov, C. Y. Cha, M. V. Chibalina, B. Hastoy, K. Philippaert, T. Reinbothe, N. Rorsman, A. Salehi, W. R. Sones, E. Vergari, C. Weston, J. Gorelik, M. Katsura, V. O. Nikolaev, R. Vennekens, M. Zaccolo, A. Galione, P. R. Johnson, K. Kaku, G. Ladds, P. Rorsman, GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *J Clin Invest* 125, 4714-4728, 2015.
9. Y. Seino, D. Yabe, Glucose-dependent insulintropic polypeptide and glucagon-like peptide-1: Incretin actions beyond the pancreas. *Journal of diabetes investigation* 4, 108-130, 2013.
10. M. Yosida, K. Dezaki, K. Uchida, S. Kodera, N. V. Lam, K. Ito, R. S. Rita, H. Yamada, K. Shimomura, S. E. Ishikawa, H. Sugawara, M. Kawakami, M. Tominaga, T. Yada, M. Kakei, Involvement of cAMP/EPAC/TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. *Diabetes* 63, 3394-3403, 2014.
11. K. Venkatachalam, C. Montell, TRP channels. *Annual review of biochemistry* 76, 387-417, 2007.
12. M. G. Madej, C. M. Ziegler, Dawning of a new era in TRP channel structural biology by cryo-electron microscopy. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 470, 213-225, 2018.
14. K. Togashi, Y. Hara, T. Tominaga, T. Higashi, Y. Konishi, Y. Mori, M. Tominaga, TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 25, 1804-1815, 2006.
15. K. Togashi, H. Inada, M. Tominaga, Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *British journal of pharmacology* 153, 1324-1330, 2008.



16. M. Kashio, M. Tominaga, Redox Signal-mediated Enhancement of the Temperature Sensitivity of Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) Elevates Glucose-induced Insulin Secretion from Pancreatic Islets. *J Biol Chem* 290, 12435-12442, 2015.
17. T. Kurashina, K. Dezaki, M. Yoshida, Sukma Rita R, K.Ito, M.Taguchi, R. Miura, M. Tominaga, S. Ishibashi, M. Kakei, T. Yada, The  $\beta$ -cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glycemic effects of ghrelin. *SciRep* 5, 14041, 2015.
17. D. L. Curry, L. L. Bennett, G. M. Grodsky, Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83, 572-584, 1968.
18. D. M. Kendall, R. M. Cuddihy, R. M. Bergenstal, Clinical application of incretin-based therapy: therapeutic potential, patient selection and clinical use. *European journal of internal medicine* 20 Suppl 2, S329-339, 2009.
19. J. D. Brunzell, R. P. Robertson, R. L. Lerner, W. R. Hazzard, J. W. Ensink, E. L. Bierman, D. Porte, Jr., Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J Clin Endocrinol Metab* 42, 222-229, 1976.
20. B. A. Ramlo-Halsted, S. V. Edelman, The natural history of type 2 diabetes. Implications for clinical practice. *Primary care* 26, 771-789, 1999.
21. K. Uchida, K. Dezaki, B. Damdindorj, H. Inada, T. Shiuchi, Y. Mori, T. Yada, Y. Minokoshi, M. Tominaga, Lack of TRPM2 impaired insulin secretion and glucose metabolisms in mice. *Diabetes* 60, 119-126, 2011.
22. S. Hallakou-Bozec, M. Kergoat, P. Fouqueray, S. Bolze, D. E. Moller, Imeglimin Amplifies Glucose-Stimulated Insulin Release from Diabetic Islets via a Distinct

Mechanism of Action. *bioRxiv*, 2020.2010.2020.346841, 2020.

23. R. J. Perry, R. L. Cardone, M. C. Petersen, D. Zhang, P. Fouqueray, S. Hallakou-Bozec, S. Bolze, G. I. Shulman, K. F. Petersen, R. G. Kibbey, Imeglimin lowers glucose primarily by amplifying glucose-stimulated insulin secretion in high-fat-fed rodents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 311, E461-470, 2016.
24. P. Fouqueray, X. Leverve, E. Fontaine, M. Baquié, C. Wollheim, Imeglimin - A New Oral Anti-Diabetic that Targets the Three Key Defects of type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolism* 02, 2011.
25. V. Vuylsteke, L. M. Chastain, G. A. Maggu, C. Brown, Imeglimin: A Potential New Multi-Target Drug for Type 2 Diabetes. *Drugs in R&D* 15, 227-232, 2015.
26. B. Portha, P. Serradas, D. Bailbé, K. Suzuki, Y. Goto, M. H. Giroix, Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. *Diabetes* 40, 486-491, 1991.
27. T. Kurashina, K. Dezaki, M. Yoshida, R. Sukma Rita, K. Ito, M. Taguchi, R. Miura, M. Tominaga, S. Ishibashi, M. Kakei, T. Yada, The  $\beta$ -cell GHSR and downstream cAMP/TRPM2 signaling account for insulinostatic and glycemic effects of ghrelin. *Sci Rep* 5, 14041, 2015.
28. K. Dezaki, H. Sone, M. Koizumi, M. Nakata, M. Kakei, H. Nagai, H. Hosoda, K. Kangawa, T. Yada, Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes* 55, 3486-3493, 2006.
29. R. Sukma Rita, K. Dezaki, T. Kurashina, M. Kakei, T. Yada, Partial blockade of Kv2.1 channel potentiates GLP-1's insulinotropic effects in islets and reduces its dose required for improving glucose tolerance in type 2 diabetic male mice.

- Endocrinology* 156, 114-123, 2015.
30. M. Nakazaki, M. Kakei, N. Koriyama, H. Tanaka, Involvement of ATP-sensitive  $K^+$  channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* 44, 878-883, 1995.
  31. M. Yoshida, K. Dezaki, S. Yamato, A. Aoki, H. Sugawara, H. Toyoshima, S. E. Ishikawa, M. Kawakami, M. Nakata, T. Yada, M. Kakei, Regulation of voltage-gated  $K^+$  channels by glucose metabolism in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 583, 2225-2230, 2009.
  32. S. Yamamoto, S. Shimizu, S. Kiyonaka, N. Takahashi, T. Wajima, Y. Hara, T. Negoro, T. Hiroi, Y. Kiuchi, T. Okada, S. Kaneko, I. Lange, A. Fleig, R. Penner, M. Nishi, H. Takeshima, Y. Mori, TRPM2-mediated  $Ca^{2+}$  influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature medicine* 14, 738-747, 2008.
  33. H. Yamada, M. Yoshida, K. Ito, K. Dezaki, T. Yada, S. E. Ishikawa, M. Kakei, Potentiation of Glucose-stimulated Insulin Secretion by the GPR40-PLC-TRPC Pathway in Pancreatic beta-Cells. *Sci Rep* 6, 25912, 2016.
  34. Y. Sato, M. Komatsu, M. Katakura, H. Ohfusa, S. Yamada, K. Yamauchi, K. Hiramatsu, K. Ichikawa, T. Aizawa, K. Hashizume, Diminution of early insulin response to glucose in subjects with normal but minimally elevated fasting plasma glucose. Evidence for early beta-cell dysfunction. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 19, 566-571, 2002.
  35. H. S. Li, C. Montell, TRP and the PDZ protein, INAD, form the core complex required for retention of the signalplex in *Drosophila* photoreceptor cells. *The Journal of cell biology* 150, 1411-1422, 2000.

36. S. Tsunoda, Y. Sun, E. Suzuki, C. Zuker, Independent anchoring and assembly mechanisms of INAD signaling complexes in *Drosophila* photoreceptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21, 150-158, 2001.
37. E. Cerasi, R. Luft, "What is inherited--what is added" hypothesis for the pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetes* 16, 615-627, 1967.
38. V. Pirags, H. Lebovitz, P. Fouqueray, Imeglimin, a novel glimin oral antidiabetic, exhibits a good efficacy and safety profile in type 2 diabetic patients. *Diabetes Obes Metab* 14, 852-858, 2012.
39. P. Fouqueray, V. Pirags, M. Diamant, G. Schernthaner, H. E. Lebovitz, S. E. Inzucchi, C. J. Bailey, The efficacy and safety of imeglimin as add-on therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with sitagliptin monotherapy. *Diabetes Care* 37, 1924-1930, 2014.
40. A. H. Guse, Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Current molecular medicine* 4, 239-248, 2004.
41. D. L. Clapper, T. F. Walseth, P. J. Dargie, H. C. Lee, Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem* 262, 9561-9568, 1987.
42. A. H. Guse, Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Current medicinal chemistry* 11, 847-855, 2004.
43. S. Takasawa, T. Akiyama, K. Nata, M. Kuroki, A. Tohgo, N. Noguchi, S. Kobayashi, I. Kato, T. Katada, H. Okamoto, Cyclic ADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate as alternate second messengers for intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization

- in normal and diabetic beta-cells. *J Biol Chem* 273, 2497-2500, 1998.
44. A. Antonelli, E. Ferrannini, CD38 autoimmunity: recent advances and relevance to human diabetes. *J Endocrinol Invest* 27, 695-707, 2004.
  45. F. Ikehata, J. Satoh, K. Nata, A. Tohgo, T. Nakazawa, I. Kato, S. Kobayashi, T. Akiyama, S. Takasawa, T. Toyota, H. Okamoto, Autoantibodies against CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) that impair glucose-induced insulin secretion in noninsulin- dependent diabetes patients. *J Clin Invest* 102, 395-401, 1998.
  46. A. Tohgo, H. Munakata, S. Takasawa, K. Nata, T. Akiyama, N. Hayashi, H. Okamoto, Lysine 129 of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) participates in the binding of ATP to inhibit the cyclic ADP-ribose hydrolase. *J Biol Chem* 272, 3879-3882, 1997.
  47. P. Yu, Z. Liu, X. Yu, P. Ye, H. Liu, X. Xue, L. Yang, Z. Li, Y. Wu, C. Fang, Y. J. Zhao, F. Yang, J. H. Luo, L. H. Jiang, L. Zhang, L. Zhang, W. Yang, Direct Gating of the TRPM2 Channel by cADPR via Specific Interactions with the ADPR Binding Pocket. *Cell Rep* 27, 3684-3695 e3684, 2019.
  48. T. Kadowaki, Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J Clin Invest* 106, 459-465, 2000.
  49. T. J. Aitman, J. A. Todd, Molecular genetics of diabetes mellitus. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism* 9, 631-656, 1995.
  50. M. S. Islam, P. O. Berggren, Cyclic ADP-ribose and the pancreatic beta cell: where do we stand? *Diabetologia* 40, 1480-1484, 1997.