

表題 生理学的濃度のアドレナリンによる膵β細胞非選択性陽イオンチャネル(TRPM2チャンネル)を介したインスリン分泌制御機構

論文の区分 博士課程

著者名 伊藤 聖学

担当指導教員氏名 森下 義幸 教授

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

2017年1月10日申請の学位論文

## 目次

1. 諸言	3
2. 材料および方法	8
2. 1 実験動物、および膵島、膵 $\beta$ 細胞単離培養方法	
2. 2 溶液の組成	
2. 3 インスリン分泌測定	
2. 4 パッチクランプ実験	
2. 5 cAMP 測定	
2. 6 腹腔内グルコース負荷試験	
2. 7 その他に使用した試薬	
2. 8 統計処理	
3. 結果	17
3. 1 野生型マウスより単離した膵 $\beta$ 細胞における低濃度のアドレナリン投与に対するインスリン分泌抑制効果	
3. 2 TRPM2-KO マウスより単離した膵 $\beta$ 細胞における高濃度アドレナリンと低濃度アドレナリンの膵島インスリン分泌抑制効果の違い	
3. 3 培養膵 $\beta$ 細胞におけるグルコースおよび Ex-4 刺激による背景電流増加に対する低濃度アドレナリンの電流抑制作用	
3. 4 Ex-4 刺激背景電流増加に対する低濃度アドレナリンの抑制効果に関わるアドレナリン受容体についての検討	
3. 5 野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスより単離した膵 $\beta$ 細胞におけるアドレナリンの cAMP 産生抑制効果	

3. 6	培養膵 $\beta$ 細胞における db-cAMP 刺激による背景電流増加に対するアドレナリンの作用	
3. 7	培養膵 $\beta$ 細胞におけるアドレナリンによる細胞膜脱分極抑制効果	
3. 8	培養膵 $\beta$ 細胞におけるトルブタミドによる細胞膜脱分極およびインスリン分泌促進に対するアドレナリンの作用	
3. 9	野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスでのヨヒンビン投与有無による耐糖能の違い	
4.	考察	42
5.	おわりに	48
6.	謝辞	49
7.	参考文献	50

## 1. 諸言

アドレナリンは主に副腎髄質のクロム親和性細胞から分泌され、ノルアドレナリンは交感神経終末から放出される。これらのカテコールアミンは膵島からのインスリン分泌を阻害し、血糖値を上昇させる。カテコールアミンによるインスリン分泌抑制機序は、図 1-1 のように、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体の活性化を介したアデニル酸シクラーゼの抑制[1]、遅延整流性カリウム電流の活性化[2、3]、電位依存性カルシウム電流の阻害[4、5]、インスリンエキソサイトシスの阻害等[6-8]、複数の報告がなされている。しかしながら、これらの研究では、薬理学的高濃度が用いられ伝達経路や機序の検討が実施されてきたことから、生理学的濃度のアドレナリンの機序についてはほとんど明らかではなかった。

一般に、膵 $\beta$ 細胞におけるグルコース代謝の機序は、図 1-2 に示すように、細胞内へのグルコース取り込み後、ミトコンドリアによるアデノシン三リン酸 (ATP : adenosine-5'- triphosphate) の産生増加の結果、ATP-sensitive  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャンネルを閉口により、細胞膜の脱分極が引き起こされる。引き続いて、電位依存性カルシウムチャンネルの活性化による  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入が起こり、細胞質内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇によるエキソサイトシスの刺激とインスリン分泌の開始が惹起される。この膵  $\beta$  細胞におけるインスリン分泌刺激開始の過程で、非選択性陽イオンチャンネル (NSCC : nonselective cation channel) のグルコース刺激による開口の結果、背景電流が増加し、 $Na^+$  および  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入増大が引き起こされる。静止膜電位調節に関して、この現象が  $K_{ATP}$  チャン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、 $K_{ATP}$  チャンネルと NSCC による bichannel-regulation

model が提唱されている[9-13]。我々は過去に、グルコース刺激やグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1 : glucagon-like peptide-1) 受容体刺激が、環状アデノシンリン酸 (cAMP : cyclic adenosine monophosphate) の産生を介して非選択性陽イオンチャネルの一つである一過性受容器電位メラスタチン 2 (TRPM2 : transient receptor potential melastatin 2) チャネルを活性化することを報告した[13]。その結果、インクレチンホルモン刺激は TRPM2 チャネル刺激による細胞膜脱分極促進を来すことで、グルコース刺激に対して相加的なインスリン分泌を引き起こすという、重要な役割を担っていると考えられる[13]。またこの他に、熱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は TRPM2 チャネルを活性化しインスリン分泌促進に[14-16]、一方でグレリンは TRPM2 チャネルの活性化を抑制しインスリン分泌を減少させる[17]ことが報告されており、様々な物質が TRPM2 チャネルを介するインスリン分泌に関わっている[9]。

膵  $\beta$  細胞において、グルコースおよびインクレチンホルモンによる刺激は、cAMP 産生亢進、TRPM2 チャネルの活性化を介してインスリン分泌を促進させる[13]ことから、アドレナリンはこれとは逆に  $G_i$  蛋白共役型受容体を介してcAMP 産生を阻害し、TRPM2 チャネル活性化を抑制することで、インスリン分泌を減少させることが推測される。しかしながら、これまでのところ、TRPM2 チャネルが  $\alpha_2$  アドレナリン受容体を介したインスリン分泌抑制に関与しているか否かについての研究はない。

以上より本研究では、マウス膵  $\beta$  細胞において、アドレナリンの作用が TRPM2 チャネルを介してインスリン分泌抑制を引き起こしているか否か、さらにこれまでほとんど検討されていない生理学的濃度のアドレナリンが TRPM2 チャネルにどのような影響を与えているかについて検討すること

を目的として、以下の研究デザインを立案した。

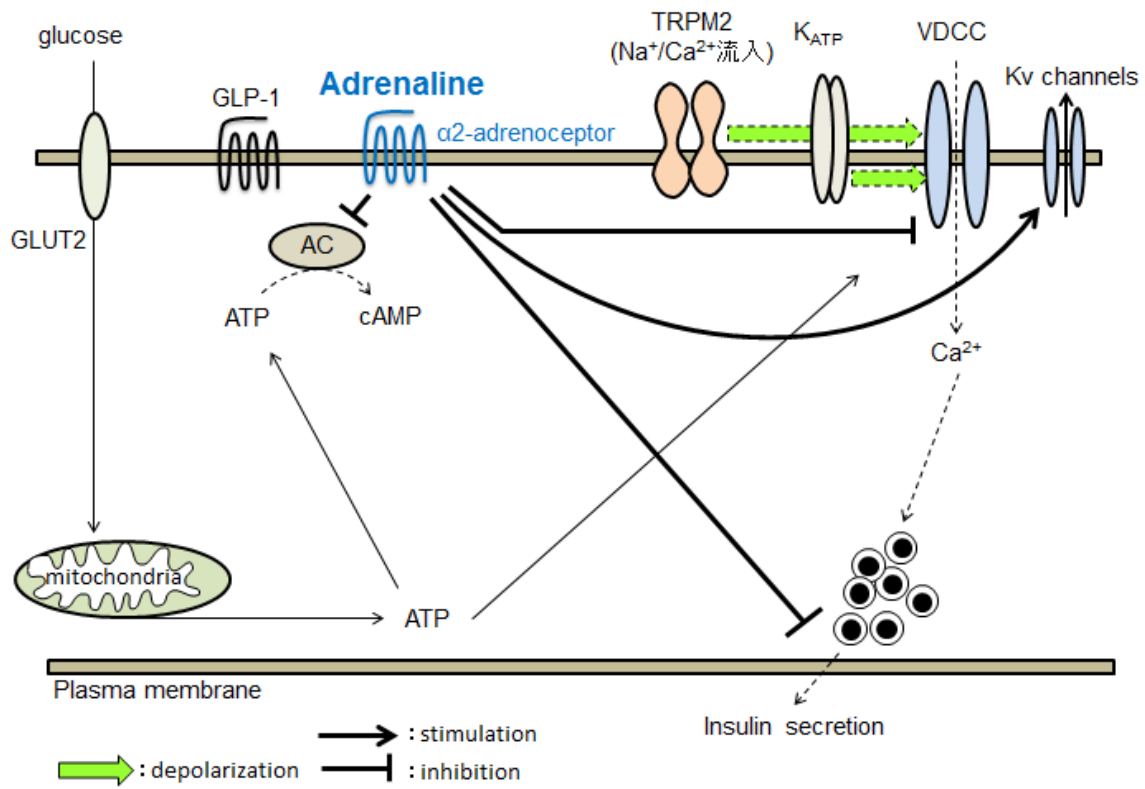


図 1-1. 高濃度アドレナリンによるインスリン分泌抑制機序 (文献[13]を一部改変)

AC : adenylate cyclase、GLUT2 : glucose transporter 2、Kv channels : voltage-gated potassium channels、VDCC : voltage-dependent calcium channels。

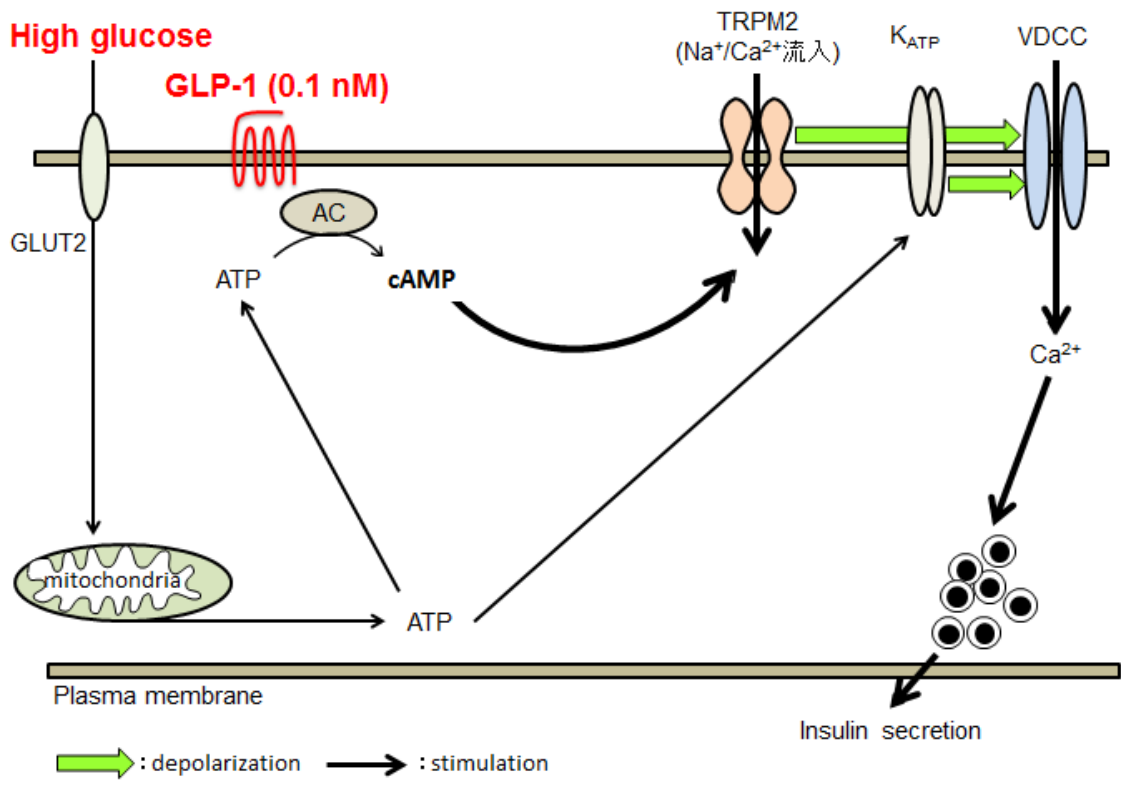


図 1-2. 高グルコース刺激および 0.1 nM GLP-1 による TRPM2 チャンネル電流のインスリン分泌促進機序 (文献[13]を一部改変)



## 2. 材料および方法

### 2. 1 実験動物、および膵島、膵β細胞単離培養方法

#### (1) 実験動物

8～12 週齢の雄性 C57BL/6J マウス(日本 CLEA、東京)を使用した。遺伝子改変マウスとして、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[13、17、18]。実験には 10～12 週齢の雄性 TRPM2-KO マウスを使用した。動物は明暗 12 時間サイクルの環境下において、餌および水は自由に摂取できる状態で飼育された。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、動物実験指針に基づいて行われた。

#### (2) マウス膵島の単離方法

Ca<sup>2+</sup>-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、0.1 %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 CaCl<sub>2</sub> 0.5 mL およびコラゲナーゼ (Sigma-Aldrich Japan、東京) 10 mg を添加したものをを使用した。まず、マウスに 10 mg/mL に調整されたペントバルビタール 0.3 mL を腹腔内に投与し麻酔した。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からカニューレを挿入し、糸で結紮固定した。内頸動脈を切断しマウスを脱血死させた後、左右肝管の合流部を糸で結紮した。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、膵臓全体が溶液により膨張し

たことを確認し、周囲の臓器(腸管、脾臓、胃)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  $37^{\circ}\text{C}$  16 分間加温した。ガラス管付きの 10 mL シリンジを用いて、加温消化された膵臓を吸引ピペッティングすることで、機械的に結合織を分離した。攪拌した膵臓を 10 mL 遠沈管に移し、800 revolution per minute (rpm) で 30 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、氷上シャーレ内で顕微鏡下に白色米粒様に確認できるマウス膵島を採集した。インスリン分泌測定および cAMP 測定には、この過程で採集されたマウス膵島を使用した。

### (3) 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、1 mM 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  $\mu\text{L}$  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 mMG + 10 % ウシ胎児血清 (Biowest, France) + 100 U/mL ペニシリン + 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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、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°C5% CO<sub>2</sub> の環境下で 12 時間以上培養し、マウス膵 β 細胞とした。この過程で作成されたマウス膵 β 細胞をパッチクランプ実験に使用した。

## 2. 2 溶液の組成

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

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

上記の溶液は実験時、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、実験当日に実験毎に、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<sub>2</sub> 5mM、EGTA 0.5 mM、HEPES 10mM

上記の溶液は KOH を用いて pH 7.2 調整され、実験時に dimethyl sulfoxide (DMSO; WAKO、大阪) に溶解した amphotericin B 200 µg/mL (Sigma-Aldrich Japan、東京) を添加して使用した。

## 2. 3 インスリン分泌測定

2. 1 (2) の方法で単離された膵島は、大きさが均一になるように各マイクロ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 HKRB 液下、恒温槽内 37°C で 30 分間静置された。その後各マイクロチューブには、実験に応じて、各濃度のグルコース、0.1 nmol/L (nM) exendin-4 (Ex-4)、各濃度のアドレナリン (WAKO、大阪)、トルブタミド 100  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ ) が 2 mM  $\text{CaCl}_2$  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 60 分間静置された。60 分の静置後、4°C 700 rpm で 30 秒間遠心され、各マイクロチューブの上清を回収し、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) が用いて実施された。

## 2. 4 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、単一もしくは複数の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、amphotericin B を電極内液に充填して、細胞膜リン脂質にイオン透過性の高い人工的イオノフォアを形成することで測定を行う、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。

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[19、20]。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。また、ホールセルモードカレントクランプ法での膜電位測定を行った。TRPM2 チャネル電流は 35°C以上の熱刺激によって活性化されることから[14]、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、26~28°Cで行われた。ガラス電極は電極プラー (PP-830、ナリシゲ、東京) を用いて作成し、作成されたガラス電極の先端を電極用マイクロフォージ (MF-830、ナリシゲ、東京) を用いて熱処理後使用した。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。

パッチクランプ実験では、単離 12 時間後から 2 日以内の膵  $\beta$  細胞を用いた。実験の際には、培養のために静置している CO<sub>2</sub> インキュベーターより取り出した後、細胞が接着しているカバーガラスをダイヤモンドカッターで分割した。その後速やかに、2 mM CaCl<sub>2</sub> 添加 2.8 mM HGRB 液 (コントロール液) 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、ガラス電極を膵  $\beta$  細胞に接着してギガシール形成後、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。灌流液の交換は、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によって行った。

なお、本研究におけるパッチクランプ実験の膵  $\beta$  細胞のキャパシタンス

(膜容量) は  $5.26 \pm 0.08$  pF ( $n = 204$ ) であった。

## (2) 背景電流 (TRP チャンネル電流) 測定

背景電流の一種である TRP チャンネル電流は、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  $\beta$  細胞において、グルコース刺激によって観察される  $K_{ATP}$  チャンネル電流の影響を排除するため、本実験における保持電位は  $K_{ATP}$  チャンネルの逆転電位に近似した  $-70$  mV に固定した。さらにスルホニル尿素薬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確実に  $K_{ATP}$  チャンネルを閉口し、 $K_{ATP}$  チャンネルの開閉の影響を受けない状態で、電流を観察した。グルコース刺激および  $0.1$  nM Ex-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[13]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[12、13、17]。なお、TRPM2 チャンネルは非選択性陽イオンチャンネルで、その開口により主に  $Ca^{2+}$  が細胞内に流入するが、熱刺激や高浸透圧物質によって開口するという温度感受性や浸透圧感受性 [14、21]、酸性下ではチャンネルは開口しないという pH 感受性[22]も有する。使用される溶液は  $2$  mM  $CaCl_2$  添加 HKRB 液を基本として、それぞれ、グルコース濃度、アドレナリン濃度は調整され、その他の試薬も適宜添加された。またアドレナリンおよび各種アンタゴニストは、グルコースを含む TRPM2 電流刺激物質の灌流前に先行投与された。各種受容体アンタゴニスト濃度は、過去の報告や各薬剤の阻害定数を基準に設定した。

## (3) 膜電位測定

細胞膜の脱分極、過分極および再分極、さらに活動電位を観察するため、ホールセルモードカレントクランプ法を用いて、膜電位測定を行った。使用される溶液は電流の観察と同様に、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、アドレナリン濃度は調整され、その他の試薬も適宜添加された。

## 2. 5 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、大きさが均一になるように各マイクロ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。その後各マイクロチューブには、実験に応じて、各濃度のグルコース、0.1 nM Ex-4、各濃度のアドレナリンが 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、ホモジナイザーを用いて十分に粉砕した。その後遠心し、マイクロ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. 6 腹腔内グルコース負荷試験

腹腔内グルコース負荷試験は、野生型マウス (C57BLB/6J マウス) および TRPM2-KO マウスを用いて行われた。また野生型マウスと TRPM2-KO マウスはそれぞれ、コントロール群 (グルコース単独投与) とヨヒンビン

投与群 (グルコース+ヨヒンビン投与) の2群に分けられた。

方法として、既報のように腹腔内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、それぞれのマウスの体重測定を行った。腹腔内グルコース負荷試験開始 30 分前に、野生型および TRPM2-KO マウスそれぞれのコントロール群には体重 10 g あたり 0.1 mL の生理食塩液が、ヨヒンビン投与群には生理食塩液で溶解された 0.1 mg/kg のヨヒンビン (Sigma-Aldrich Japan、東京) が投与された。試験開始時、各マウスの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[23、24]。血糖値測定は、グルコース投与前 30 分 (生理食塩液、もしくはヨヒンビン投与時)、0 分 (グルコース投与時)、投与後 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、グルコカードダイアメーター (アークレイ、京都) を使用して血糖値を測定した。

## 2. 7 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、dibutyl-cAMP (db-cAMP; Sigma-Aldrich)、BRL44408 (Abcam)、JP1302 (Abcam)、プラゾシン (Sigma-Aldrich)、DMSO を用いて溶解した試薬は、プロプラノロール (Sigma-Aldrich) と 2-aminoethoxydiphenyl borane (2-APB; Sigma-Aldrich) であった。

## 2. 8 統計処理

結果は平均値±標準誤差 (mean±SE) により示した。腹腔内グルコース負荷試験における血糖値の曲線下面積 (area under the curve : AUC) は、ニュートンの近似法 (台形則) で計算した。2群間の比較には paired もし



くは unpaired Student-t 検定、多群間の比較には一元配置分散分析を行った後、多重比較検定として、Bonferroni 検定を行った。データ解析は Graph Pad Prism version 6.0 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 野生型マウスより単離した膵 $\beta$ 細胞における低濃度のアドレナリン投与に対するインスリン分泌抑制効果

野生型マウスにおいて、16.6 mMG および 0.1 nM Ex-4 添加 16.6 mMG 下で、濃度依存性アドレナリンのインスリン分泌に対する作用を検討した。

まず、2.8 mMG でのインスリン分泌に対して、16.6 mMG 投与下では有意にインスリン分泌は増加し ( $p < 0.01$ )、さらに 0.1 nM Ex-4 添加 16.6 mMG では 16.6 mMG 単独投与に対して有意にインスリン分泌は増加することを確認した ( $p < 0.01$ )。

次に、グルコース刺激およびインクレチン刺激により促進されるインスリン分泌について、アドレナリンの影響を濃度依存性に検討した。アドレナリンは、0.5 nM、0.7 nM、1 nM、10 nM、50 nM、5000 nM の各濃度を用いて検討し、それらの濃度は既報[25]を参考にして、50 % inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) に近い濃度として選択した。図 2A のように、アドレナリンは濃度依存性にインスリン分泌を抑制した。16.6 mMG における  $IC_{50}$  は 0.798 nM、0.1 nM Ex-4 添加 16.6 mMG における  $IC_{50}$  は 0.797 nM であった。1 nM アドレナリン投与下では、16.6 mMG および 0.1 nM Ex-4 添加 16.6 mMG の両者の条件で有意に抑制し、それぞれアドレナリン非投与下と比較した場合の抑制率は 60%、80%であった。対照的に、2.8 mMG において 1 nM アドレナリンはインスリン分泌を抑制しなかった (図 2B)。本研究において、低濃度アドレナリンは 1 nM を用い、高濃度アドレナリンは 5000 nM (5  $\mu$ M) を用いた。

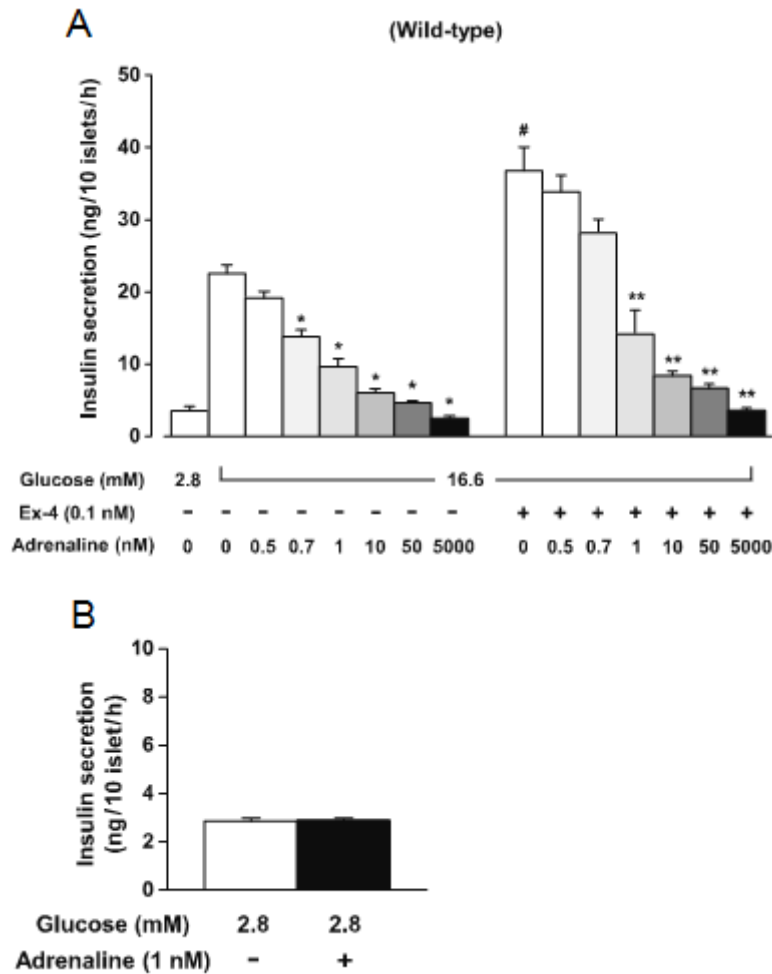


図 2. 野生型マウス膵β細胞におけるアドレナリン投与下のインスリン分泌抑制効果

A : グルコース刺激 (16.6 mMG) および Ex-4 (0.1 nM) 添加 16.6 mMG に対するアドレナリンの濃度依存性インスリン分泌抑制効果 (n = 5-13)。\*P < 0.01 vs. 16.6 mMG 単独、\*\*P < 0.01 vs 16.6 mMG + Ex-4、#P < 0.01 vs. 16.6 mMG 単独。B : 2.8 mMG 下における 1 nM アドレナリンの作用 (n = 5)。

### 3. 2 TRPM2-KO マウスより単離した膵 $\beta$ 細胞における高濃度アドレナリンと低濃度アドレナリンの膵島インスリン分泌抑制効果の違い

TRPM2-KO マウスにおいて、16.6 mMG および 0.1 nM Ex-4 添加 16.6 mMG 下で、高濃度アドレナリン (5  $\mu$ M) と低濃度アドレナリン (1 nM) の単離膵島インスリン分泌に対する影響を検討した。

TRPM2-KO マウスでは、アドレナリン非投与下では既報通り、グルコース刺激およびインクレチン刺激インスリン分泌は、野生型マウスに比べて低下していた[18]。また、1 nM アドレナリンは 16.6 mMG および 0.1 nM Ex-4 添加 16.6 mMG 下でのインスリン分泌を抑制しなかった (図 3)。一方 5  $\mu$ M アドレナリンでは、野生型マウスの場合と同様に、前述の刺激によるインスリン分泌を強く抑制した ( $p < 0.01$ )。これらの結果および野生型マウスのインスリン分泌の結果から、低濃度のアドレナリンの作用は、TRPM2 チャンネルを介した背景電流に影響することにより、インスリン分泌を減弱している可能性が示唆された。

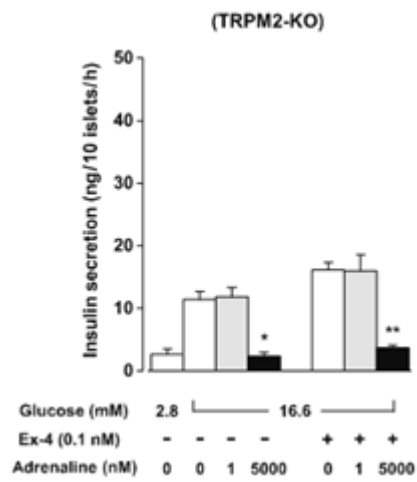


図 3. TRPM2-KO マウス膵β細胞におけるグルコースおよび Ex-4 刺激に対する、高濃度アドレナリン (5 μM) と低濃度アドレナリン (1 nM) 下でのインスリン分泌への作用 (n = 6-13)。\*P < 0.01 vs. 16.6 mMG 単独、\*\*P < 0.01 vs 16.6 mMG + Ex-4。

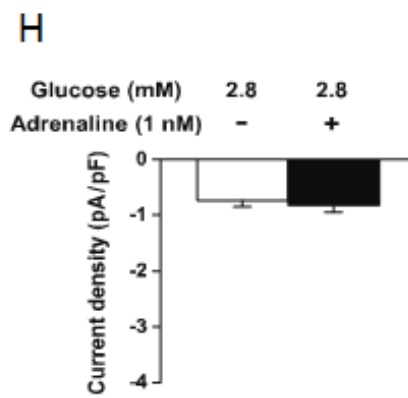
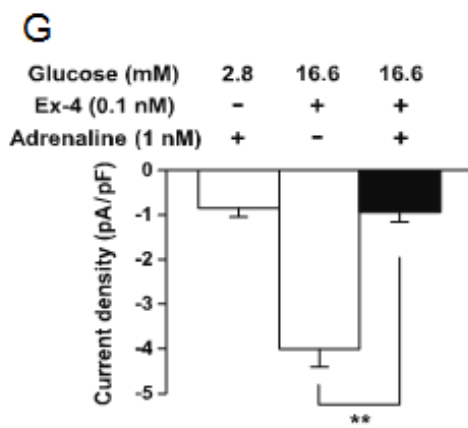
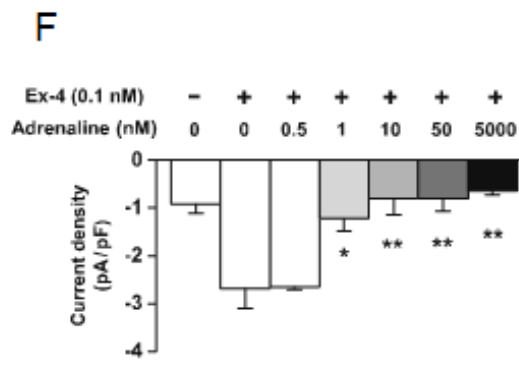
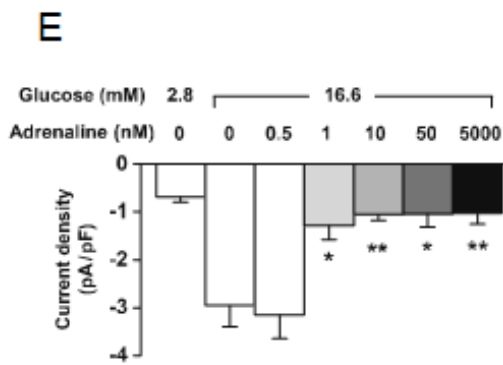
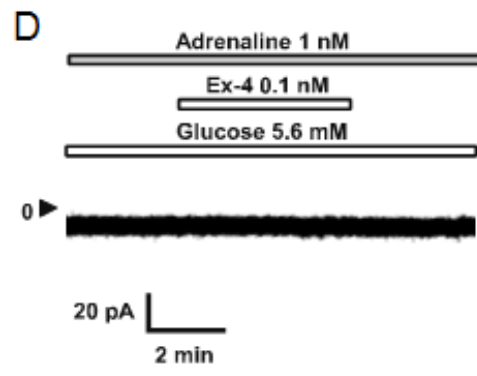
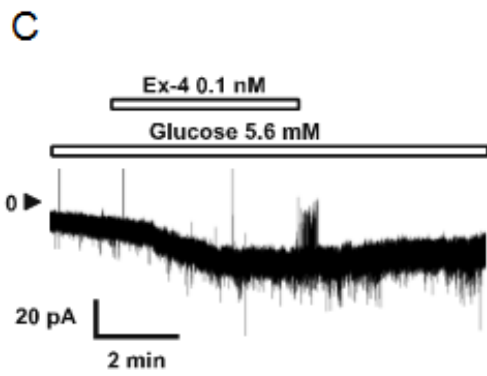
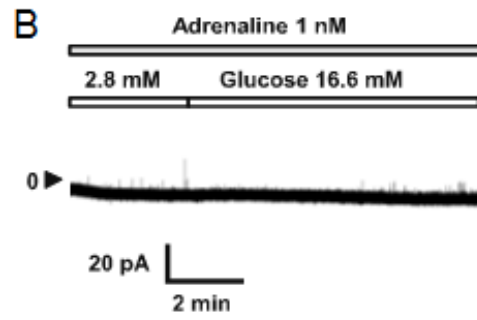
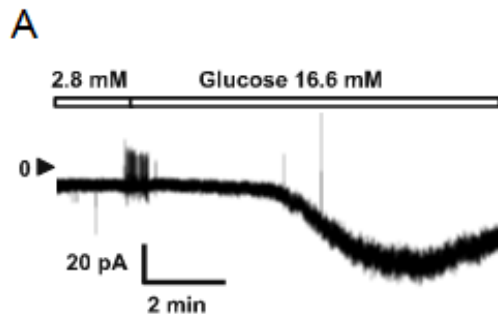
### 3. 3 培養膵β細胞におけるグルコースおよび Ex-4 刺激による背景電流増加に対する低濃度アドレナリンの電流抑制作用

グルコースおよびインクレチン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ネルである TRPM2 チャネルを介する電流であることが報告され[13]、さらに 3.1 および 3.2 で低濃度アドレナリンが TRPM2 チャネルを介して作用している可能性を示唆する結果を得た。それらの結果より、アドレナリンが TRPM2 チャ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。

まず、本実験系において TRPM2 電流が観察された既報と同様、同一条件下 (-70 mV でのボルテージクランプおよび 100 μM トルブタミド存在下) で、グルコース刺激および GLP-1 受容体アゴニスト (0.1 nM Ex-4) を用いて、背景電流 (TRPM2 電流) が増加することを確認した (図 4A、4C)。さらにそれらの刺激による電流増加が、TRP チャネル阻害薬である 10 μM 2-APB で完全に阻害されることを確認した (図 4I、4J、4K、4L)。これらの結果から、本研究で観察・記録された背景電流は TRPM2 電流によるものと判断した。

次に、アドレナリン投与下におけるグルコース刺激および Ex-4 刺激背景電流の観察を行った。16.6 mM グルコース刺激による背景電流増加は、アドレナリン濃度依存性に抑制され、1 nM アドレナリンでも抑制された(図 4B、4E)。同様に、5.6 mM グルコース下 0.1 nM Ex-4 刺激による背景電流増加もアドレナリン濃度依存性に抑制され、1 nM アドレナリン下でも抑制された (図 4D、4F)。また 1 nM アドレナリンは、0.1 nM Ex-4 添加 5.6 mM グルコース液灌流下においてだけでなく、0.1 nM Ex-4 添加 16.6 mM グルコース液灌流下において増加する背景電流も抑制したが (図 4G)、2.8 mM グルコース液灌流下では背景電流に

影響を与えなかった(図 4H)。これらの結果より、高濃度アドレナリンと同様、低濃度アドレナリンはグルコース刺激および Ex-4 刺激による TRPM2 チャンネルを介した背景電流を抑制することが示唆された。





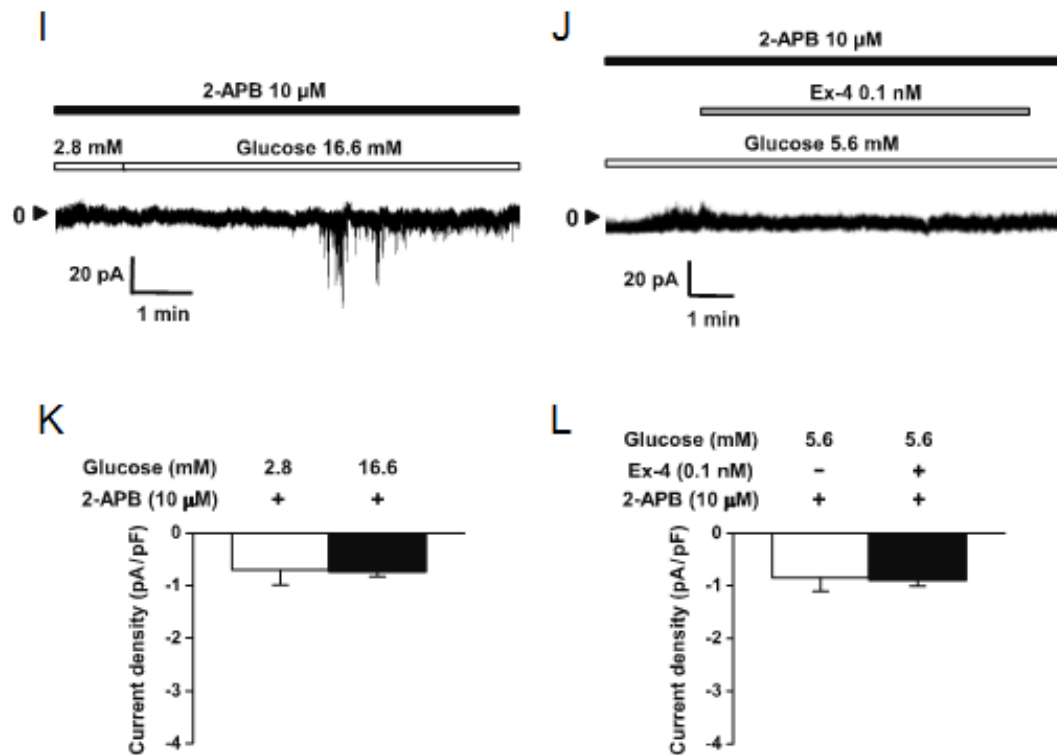


図 4. 培養膵  $\beta$  細胞におけるアドレナリンの背景電流抑制効果

A : グルコース刺激 (16.6 mM) による背景電流増加の典型例。B : グルコース刺激 (16.6 mM) 背景電流増加に対する 1 nM アドレナリンの抑制の典型例。C : 正常グルコース (5.6 mM) 下 0.1 nM Ex-4 刺激による背景電流増加の典型例。D : 0.1 nM Ex-4 刺激背景電流増加に対する 1 nM アドレナリンの抑制の典型例。E : グルコース刺激 (16.6 mM) による背景電流増加に対するアドレナリンの濃度依存性抑制効果 ( $n = 4-13$ )。\* $P < 0.05$  vs 16.6 mM 単独、\*\* $P < 0.01$  vs 16.6 mM 単独。F : 0.1 nM Ex-4 刺激による背景電流増加に対するアドレナリンの濃度依存性抑制効果 ( $n = 4-9$ )。\* $P < 0.05$  vs 5.6 mM + Ex-4、\*\* $P < 0.01$  vs 5.6 mM + Ex-4。G : 0.1 nM Ex-4 添加 16.6 mM 刺激による背景電流増加と、1 nM アドレナリンによ

る背景電流抑制効果 (n = 5)。\*\*P < 0.01 vs 16.6 mMG + Ex-4。H : 2.8 mMG 下における 1 nM アドレナリンの背景電流に対する影響 (n = 5)。I : グルコース刺激 (16.6 mMG) 背景電流増加に対する 10  $\mu$ M 2-APB の抑制の典型例。J : 正常グルコース (5.6 mMG) 下 0.1 nM Ex-4 刺激背景電流増加に対する 10  $\mu$ M 2-APB の抑制の典型例。K : グルコース刺激 (16.6 mMG) 背景電流増加に対する 10  $\mu$ M 2-APB の抑制効果 (n = 5)。L : 0.1 nM Ex-4 刺激背景電流増加に対する 10  $\mu$ M 2-APB の抑制効果 (n = 5)。

### 3. 4 Ex-4 刺激背景電流増加に対する低濃度アドレナリンの抑制効果に関わるアドレナリン受容体についての検討

高濃度アドレナリンは、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体に作用することで、インスリン分泌を抑制することが報告されている[26、27]。しかしながら、グルコースあるいは Ex-4 による背景電流増加に対する抑制作用が  $\alpha 2$  アドレナリン受容体を介したものであるのかどうかは不明である。そこで、各受容体のアンタゴニストを用いて、背景電流に対するアドレナリンの抑制作用に関して、受容体のサブタイプについて検討した。

まず、高濃度アドレナリンの背景電流抑制時の作用受容体について、Ex-4 を用いて検討した。 $\alpha 2$  受容体アンタゴニストであるヨヒンビン (1  $\mu\text{M}$ ) 投与下においては、5  $\mu\text{M}$  アドレナリンによる Ex-4 刺激背景電流増加の抑制効果が消失した (図 5A)。一方で、 $\alpha 1$  受容体アンタゴニストであるプラゾシン (10  $\mu\text{M}$ ) および  $\beta$  受容体アンタゴニストであるプロプラノロール (10  $\mu\text{M}$ ) を用いた場合、高濃度アドレナリンは Ex-4 刺激背景電流増加の抑制効果は消失しなかった (図 5B、5C)。この結果から、背景電流抑制に関しても、高濃度アドレナリンの作用は既報[28]のように、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体を介することを確認した。

次に、例えば GLP-1 受容体アゴニストのように、使用する薬剤の濃度によって作用受容体が異なる場合があることから[10]、低濃度アドレナリンの作用する受容体についても、Ex-4 を用いて検討した。 $\alpha 2$  受容体アンタゴニストであるヨヒンビン (1  $\mu\text{M}$ ) 投与下においては、低濃度アドレナリンは高濃度アドレナリンと同様に、Ex-4 刺激による背景電流増加を抑制しなかった (図 5D)。さらに  $\alpha 2$  アドレナリン受容体におけるサブクラスについて、 $\alpha 2A$  受容体アンタゴニストである BRL44408 (10  $\mu\text{M}$ ) と、 $\alpha 2C$

受容体アンタゴニストである JP1302 (1  $\mu$ M) を用いて、Ex-4 刺激による背景電流増加に対する低濃度アドレナリンの抑制効果を検討した。BRL44408 投与下では、Ex-4 刺激による背景電流増加を低濃度アドレナリンが抑制しないことが確認された (図 5E) のに対し、JP1302 投与下では低濃度アドレナリンによる、Ex-4 刺激背景電流増加に対する抑制効果を認めた (図 5F)。また高濃度アドレナリンによる作用と同様に、プラゾシンおよびプロプラノロール投与下では、低濃度アドレナリンの背景電流増加に対する抑制作用は阻害されなかった (図 5G、5H)。これらの結果から、低濃度アドレナリンの背景電流抑制効果は、 $\alpha$ 2A アドレナリン受容体を介していることが示唆された。なお、各種受容体アンタゴニストの単独投与によって電流の増加・減少は認めなかったことから、それらの結果に対する影響はないと判断した。

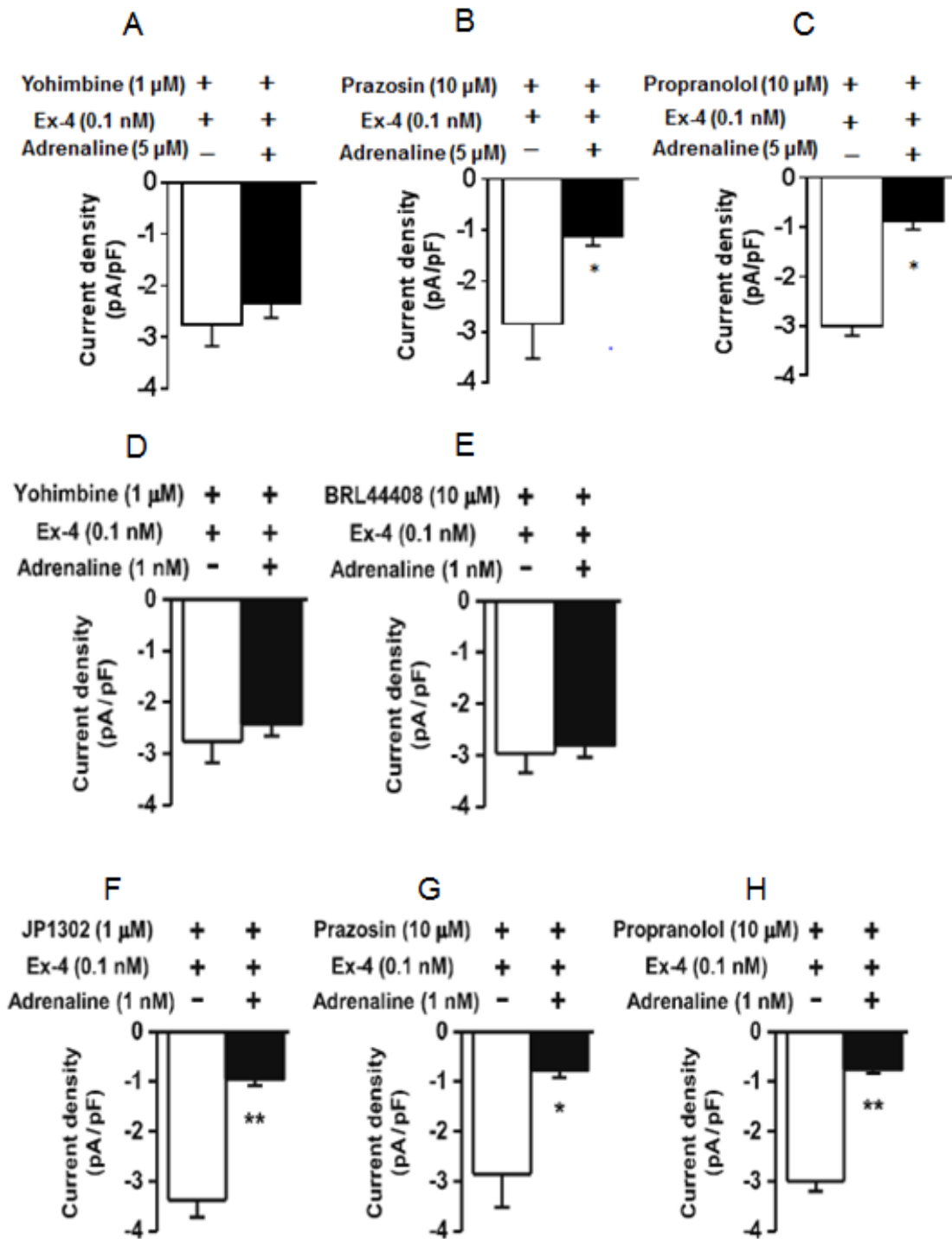


図5. アドレナリンの背景電流抑制作用に対する各種アドレナリン受容体アンタゴニストの効果。

A-H : 背景電流刺激として、正常グルコース (5.6 mM) 下 0.1 nM Ex-4 を用い、各種アドレナリン受容体アンタゴニストは、0.1 nM Ex-4 灌流開始前に前投与した。\*P < 0.05 vs control (control : 各結果におけるアドレナリン非投与下での Ex-4 刺激 current density)、\*\*P < 0.01 vs control (control : 各結果におけるアドレナリン非投与下での Ex-4 刺激 current density)。A-C : 高濃度アドレナリン (5  $\mu$ M) を用いた検討 (n = 5)。D-H : 低濃度アドレナリン (1 nM) を用いた検討 (D-G : n = 5、H : n = 8)。A・D : ヨヒンビン ( $\alpha$ 2 受容体アンタゴニスト) を用いた検討。B・G : プラゾシン ( $\alpha$ 1 受容体アンタゴニスト) を用いた検討。C・H : プロプラノロール ( $\beta$  受容体アンタゴニスト) を用いた検討。E : BRL44408 ( $\alpha$ 2A 受容体アンタゴニスト)を用いた検討。F : JP1302 ( $\alpha$ 2C 受容体アンタゴニスト)を用いた検討。

### 3. 5 野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスより単離した膵β細胞におけるアドレナリンの cAMP 産生抑制効果

アドレナリンのインスリン分泌抑制作用の機序として、G 蛋白共役型受容体およびアデニル酸シクラーゼを介して、cAMP 産生を抑制する機序が想定される。そこで、グルコース刺激およびインクレチン刺激による cAMP 産生の抑制効果について、高濃度および低濃度アドレナリンを用いて検討した。

まず、野生型マウスにおけるグルコース刺激では、コントロール群 (2.8 mMG 投与) の cAMP 産生に比較し、16.6 mMG における cAMP 産生は明らかに増加した (図 6A)。対照的に 1 nM および 5 μM アドレナリン投与下において、その産生増加は抑制された ( $p < 0.01$ )。次に、野生型マウスにおける Ex-4 刺激について検討した。コントロール群 (5.6 mMG) に比較し、Ex-4 刺激により cAMP 産生は増加した (図 6B)。一方で 1 nM および 5 μM アドレナリン投与下では、グルコース刺激と同様に、cAMP 産生は有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。さらに TRPM2-KO マウスにおける Ex-4 刺激についても検討を行った。野生型マウスと同様に、コントロール群 (5.6 mMG) と比較して、0.1 nM Ex-4 添加 5.6 mMG 投与下では cAMP 産生が増加した (図 6C)。1 nM および 5 μM アドレナリン投与下では、いずれも cAMP 産生は有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。これらの結果より、高濃度および低濃度アドレナリンは、野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスの両方で cAMP を抑制する作用を有することが確認された。

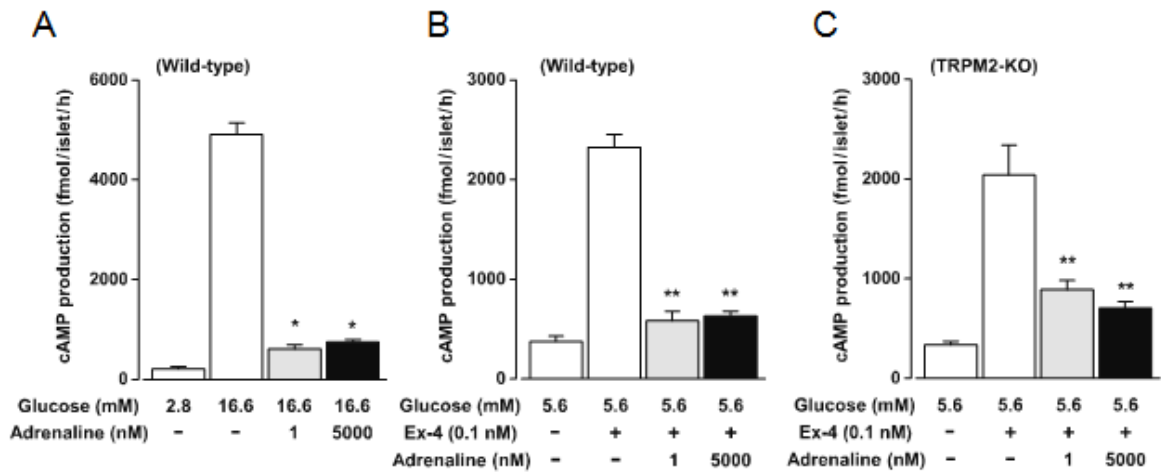


図 6. 野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスより単離した膵β細胞における高濃度および低濃度アドレナリンの cAMP 産生抑制効果

A: 野生型マウスにおけるグルコース刺激 (16.6 mM) に対するアドレナリン抑制効果 (n = 7-9)。B: 野生型マウスにおける Ex-4 刺激 (16.6 mM) に対するアドレナリン抑制効果 (n = 7-9)。C: TRPM2-KO マウスにおける Ex-4 刺激 (16.6 mM) に対するアドレナリン抑制効果 (n = 7-9)。\*P < 0.01 vs. 16.6 mM、\*\*P < 0.01 vs. 5.6 mM + Ex-4。



### 3. 6 培養膵β細胞における db-cAMP 刺激による背景電流増加に対するアドレナリンの作用

3. 5 の結果より、アドレナリンの作用が cAMP 産生を抑制することが示されたが、cAMP 刺激が TRPM2 チャネル電流を増加させるか、さらに cAMP 刺激による TRPM2 チャネル電流の増加に対して、アドレナリンの濃度による違いがあるか否かについて、db-cAMP を用いて検討した。

まず、1 mM db-cAMP 添加 5.6 mM MG 液灌流下において、既報のように背景電流の増加が確認された (図 7A) [13]。次に、アドレナリン投与下で、db-cAMP の背景電流に対する作用を観察した。低濃度アドレナリン投与下では、1 mM db-cAMP 添加 5.6 mM MG 液灌流下において、背景電流増加が観察された (図 7B) 一方で、高濃度アドレナリン投与下では背景電流は増加せず (図 7C)、コントロール群 (1 mM db-cAMP 添加 5.6 mM MG) に比較し、有意に抑制された ( $p < 0.01$ ) (図 7D)。なお、db-cAMP 投与前においては、各群での current density に差はなかった。これらの結果より、低濃度アドレナリンと高濃度アドレナリンでは、背景電流に対する作用に違いがあり、低濃度アドレナリンは cAMP 依存性に、高濃度アドレナリンは cAMP 非依存性に作用している可能性が示唆された。

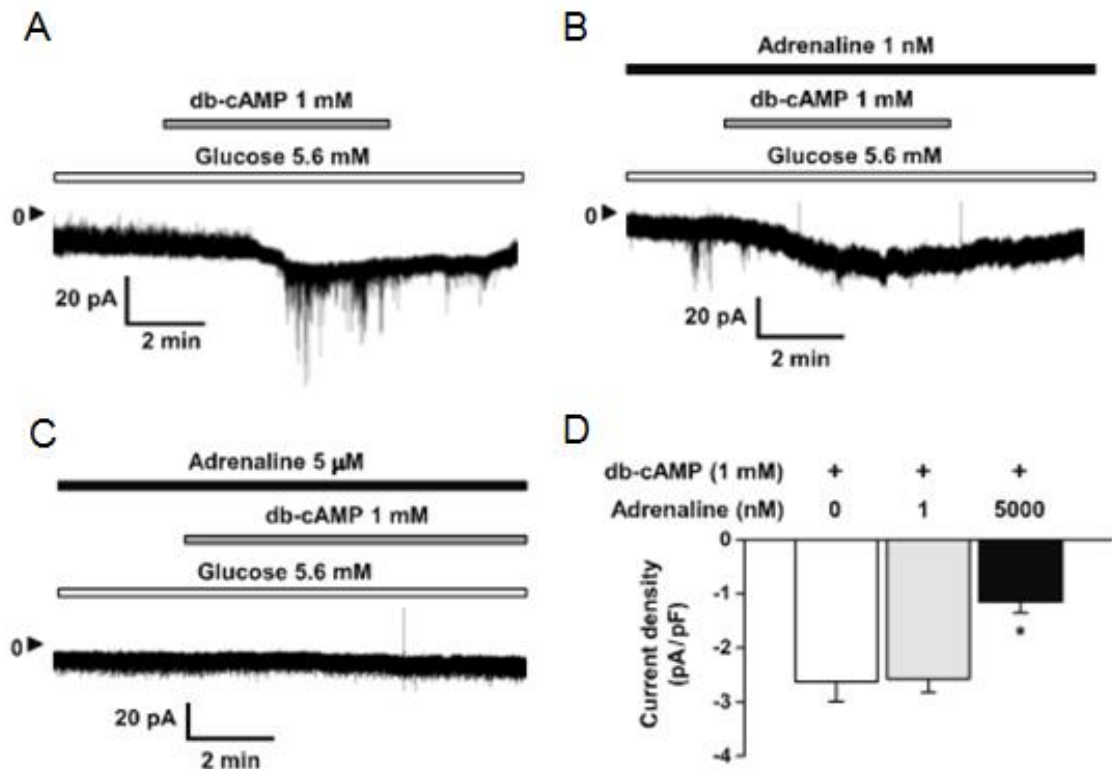


図 7. 培養膵  $\beta$  細胞における db-cAMP 刺激背景電流増加作用に対するアドレナリンの濃度による抑制効果の違い

A : 正常グルコース (5.6 mMG) 下、1 mM db-cAMP 刺激による背景電流増加の典型例。B : 1 mM db-cAMP 刺激背景電流増加に対して 1 nM アドレナリンが抑制作用を示さない典型例。C : 1 mM db-cAMP 刺激背景電流増加に対して 5  $\mu$ M アドレナリンが抑制作用を示す典型例。D : db-cAMP 刺激背景電流増加作用に対するアドレナリンの濃度による抑制効果の違い (n = 6-11)。\* $P < 0.01$  vs. 5.6 mMG + db-cAMP。

### 3. 7 培養膵β細胞におけるアドレナリンによる細胞膜脱分極抑制効果

アドレナリンによる背景電流抑制の結果、膜電位に影響を与えているか否かを確認するために、アドレナリン還流下での膜電位についての検討を行った。

まず、高濃度アドレナリン投与下において検討を行った。16.6 mMG 液灌流下、および 0.1 nM Ex-4 添加 5.6 mMG 液灌流下で脱分極させた細胞に、続けて高濃度アドレナリンを投与し、同一細胞により連続的に膜電位を観察した。5 μM アドレナリンは 16.6 mMG および 0.1 nM Ex-4 刺激により脱分極した膜電位をいずれも有意に再分極した (図 8A、8B)。

次に、低濃度アドレナリン投与下において検討した。16.6 mMG 液灌流下で、図 8C のように活動電位を伴って細胞膜は脱分極した。しかしながら、1 nM アドレナリンを先行灌流した場合の 16.6 mMG 液投与下では、脱分極はおこるものの、16.6 mMG 液のみの灌流下に比べて活動電位は小さく、活動電位発生後の膜再分極を伴った抑制がみられた (図 8D)。一方、アドレナリンに加え、α2A 受容体アンタゴニストである BRL44408 の灌流下では、1 nM アドレナリンの単独灌流時とは異なり、活動電位を伴った細胞膜脱分極を認めた (図 8E)。細胞膜脱分極時の膜電位においても、1 nM アドレナリン添加 16.6 mMG と、16.6 mMG およびアドレナリン/BRL44408 添加 16.6 mMG との間には、それぞれで有意差を認めた ( $p < 0.01$ ) (図 8F)。さらに 2.8 mMG 液から 16.6 mMG 液に灌流液を変更後に活動電位を誘発するまでの時間 (潜時) は、低濃度アドレナリン灌流下では有意に延長したが ( $p < 0.05$ )、アドレナリン/BRL44408 灌流下では 16.6 mMG 液単独投与時と比べて差を認めなかった (図 8C-8E、図 8G)。

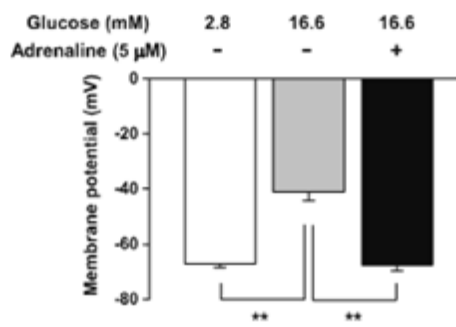
0.1 nM Ex-4 添加 5.6 mMG 液灌流下でも、低濃度アドレナリンを用いた

膜電位の観察・記録を行った。0.1 nM Ex-4 の投与により、細胞膜は有意に脱分極したが ( $p < 0.05$ )、高濃度アドレナリン投与下と同様に、低濃度アドレナリン投与下においても、細胞膜は脱分極しなかった (図 8H)。

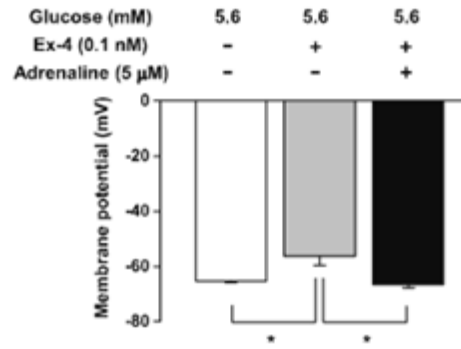
また、細胞膜脱分極後の膵  $\beta$  細胞に対してアドレナリンの作用を検討した。低濃度アドレナリンでは、膜電位は不変であったが、高濃度アドレナリンでは再分極した (図 8I)。

これらの結果から、高濃度アドレナリンが膵  $\beta$  細胞における細胞膜の興奮性を完全に抑制する一方で、低濃度アドレナリンはグルコース刺激に伴う細胞膜の興奮性を一部抑制することが示唆された。低濃度アドレナリンの先行投与では細胞膜の脱分極応答性を遅延させる効果を有し、その結果グルコース応答性を低下させると考えられた。Ex-4 刺激後に生じた細胞膜の脱分極は低濃度アドレナリンで完全に抑制されたことから、低濃度アドレナリンはインクレチンホルモンで刺激される cAMP 依存性伝達経路を抑制している可能性が示唆された。一方、細胞膜脱分極後の膵  $\beta$  細胞では、低濃度アドレナリンで cAMP 依存性伝達経路を抑制しても、膵  $\beta$  細胞の興奮は全く抑制できないことも示唆された。

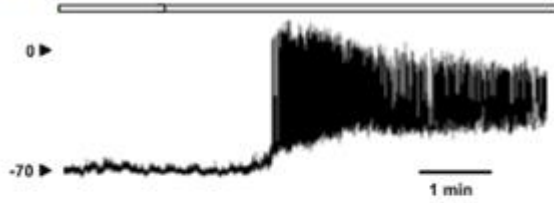
**A**



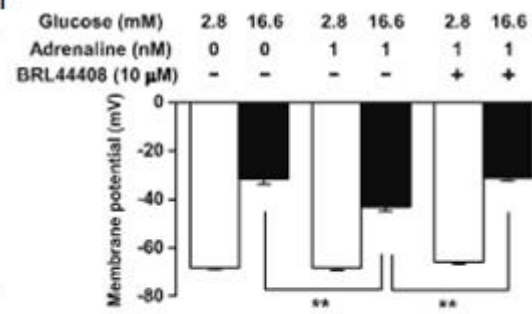
**B**



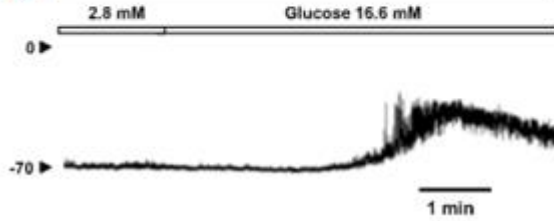
**C**



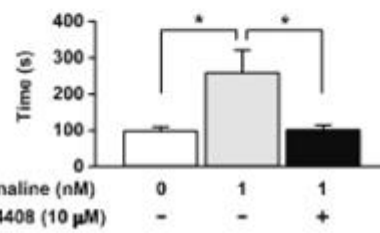
**F**



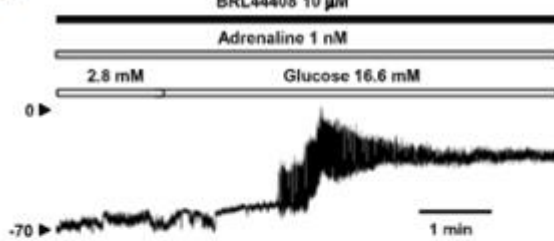
**D**



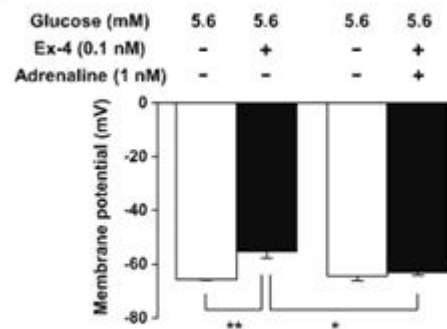
**G**



**E**



**H**



**I**

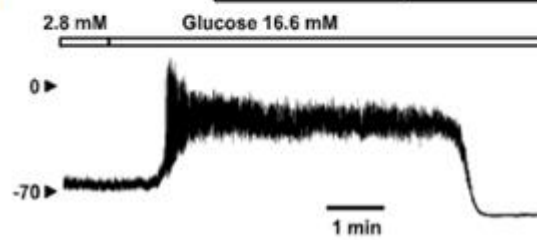


図 8. 培養膵  $\beta$  細胞におけるアドレナリンによる細胞膜脱分極の抑制効果

A : 同一の膵  $\beta$  細胞で連続観察した、グルコース刺激 (16.6 mMG) による細胞膜脱分極に対する高濃度アドレナリン (5  $\mu$ M) の再分極作用 (n = 5)。  
B : 同一の膵  $\beta$  細胞で連続観察した、正常グルコース (5.6 mMG) 下 0.1 nM Ex-4 刺激による細胞膜脱分極に対する高濃度アドレナリンの再分極作用 (n = 6)。  
C : グルコース刺激 (16.6 mMG) による活動電位を伴った細胞膜脱分極の典型例。  
D : 1 nM アドレナリンの先行灌流下でのグルコース刺激による細胞膜脱分極の典型例。本条件下で、細胞膜脱分極後に再分極を認めた。  
E : 1 nM アドレナリンおよび BRL44408 の先行灌流下でのグルコース刺激による細胞膜脱分極の典型例。  
F : C・D・E 条件下での、それぞれの膜電位 (n = 9-10)。  
G : C・D・E 条件下での、2.8 mMG から 16.6 mMG に灌流液を変更した後、活動電位開始までの時間 (n = 9-10)。  
H : 低濃度アドレナリン先行灌流下における、正常グルコース (5.6 mMG) 下 0.1 nM Ex-4 刺激による細胞膜脱分極に対する低濃度アドレナリン (1 nM) の細胞膜脱分極抑制作用 (n = 7)。  
I : グルコース刺激 (16.6 mMG) により、活動電位を伴って脱分極させた後の、低濃度アドレナリンと高濃度アドレナリンの作用の違いを示す連続トレース。A-H : \*P < 0.05、\*\*P < 0.01。

### 3. 8 培養膵 $\beta$ 細胞におけるトルブタミドによる細胞膜脱分極およびインスリン分泌促進に対するアドレナリンの作用

高濃度アドレナリンと低濃度アドレナリンの作用の違いについて検討するため、2.8 mMG 液下で 100  $\mu$ M トルブタミド添加により脱分極した膵  $\beta$  細胞に対するアドレナリンの効果を確認した。

まず、トルブタミド投与により細胞膜が脱分極した細胞に 1 nM アドレナリンを投与したが、再分極はみられなかった。その後、2.8 mMG で再分極させ、再びトルブタミド投与により脱分極させた上で、5  $\mu$ M アドレナリンを投与したところ、速やかに再分極した(図 9A)。低濃度アドレナリンとは異なり、高濃度アドレナリンはトルブタミド投与による細胞膜脱分極を有意に抑制した ( $p < 0.01$ ) (図 9B)。同様にインスリン分泌に関しても、100  $\mu$ M トルブタミド添加 2.8 mMG 液で刺激されたインスリン分泌は、1 nM アドレナリンでは抑制できなかったが、5  $\mu$ M では有意に抑制した( $p < 0.01$ ) (図 9C)。これらの結果から、高濃度アドレナリンは低濃度アドレナリンとは違い、cAMP 依存性伝達経路の抑制に加え、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体を介した複数の機序により抑制的に作用し、グルコース刺激やトルブタミドへの刺激を含むインスリン促進刺激を強く抑制していることが示唆された。

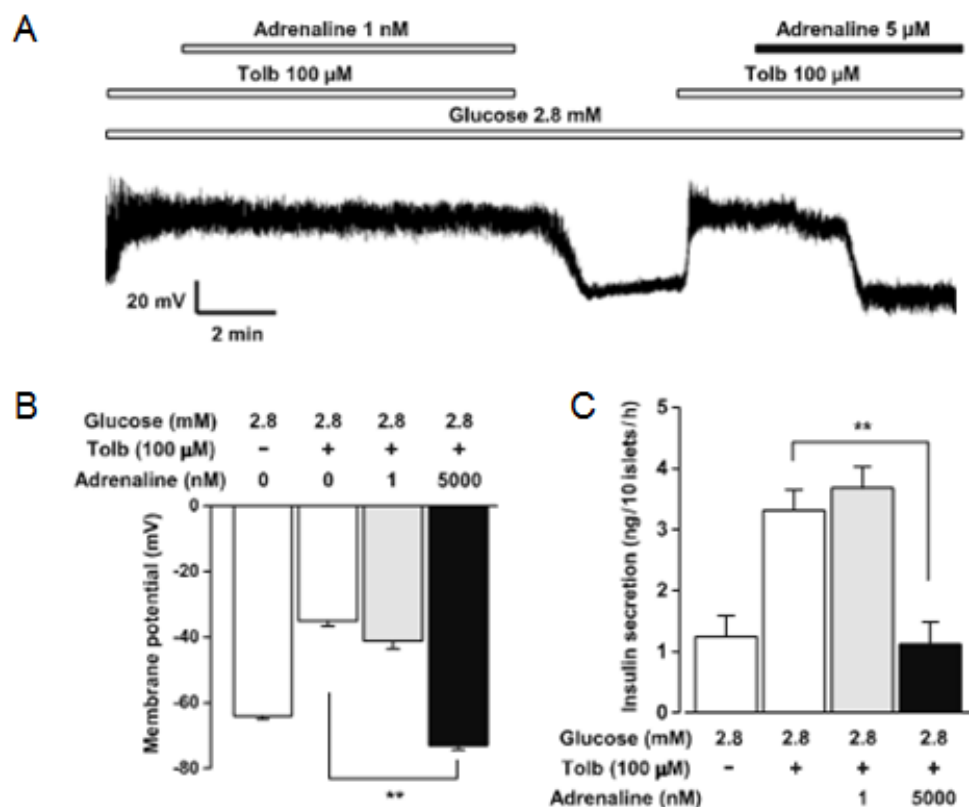


図 9. 培養膵β細胞におけるトルブタミド (Tolbutamide : Tolb) による細胞膜脱分極およびインスリン分泌に対するアドレナリンの抑制効果

A : 2.8 mM Glucose 下 100 μM Tolb による細胞膜脱分極と、それに対するアドレナリン濃度による作用の違いを示す膜電位変化の典型例。B : 2.8 mM Glucose 下 Tolb による細胞膜脱分極に対する高濃度アドレナリン (5 μM) の再分極作用 (n = 3)。C : 2.8 mM Glucose 下 Tolb によるインスリン分泌に対するアドレナリン濃度の違いによる抑制効果の違い (n = 4)。B・C : \*\*P < 0.01。



### 3. 9 野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスでのヨヒンビン投与有無による耐糖能の違い

$\alpha 2$  受容体を介する内因性の交感神経作用が耐糖能に与える影響を検討するため、ヨヒンビンを用いて、野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスにおいて腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った。

ヨヒンビン投与群では腹腔内グルコース負荷試験開始 30 分前に 0.1 mg/kg ヨヒンビンを投与し、野生型および TRPM2-KO マウスのそれぞれのコントロール群およびヨヒンビン投与群に、2 g/kg グルコースが投与された。野生型マウスでは、ヨヒンビン投与群において、グルコース負荷試験開始後 30 分、60 分、120 分で血糖値が有意に低下していた ( $p < 0.05$ ) (図 10A)。一方で TRPM2-KO マウスでは、コントロール群とヨヒンビン投与群において、グルコース負荷試験開始時、開始後 15 分、30 分、60 分、120 分での差を認めなかった (図 10B)。さらに 0 分から 120 分までの AUC に関して、コントロール群およびヨヒンビン投与群のいずれにおいても、野生型マウスに比較して TRPM2-KO マウスで耐糖能の悪化が確認された ( $p < 0.05$ ) (図 10C)。また野生型マウスでは、ヨヒンビン投与群において、有意に耐糖能は改善した ( $p < 0.05$ )。対照的に TRPM2-KO マウスでは、コントロール群とヨヒンビン投与群の間で AUC に差は認めなかった (図 10C)。これらの結果から、TRPM2-KO マウスは、既報のように耐糖能の低下を有することが再確認され[18]、また  $\alpha 2$  受容体を介する内因性の交感神経緊張作用は耐糖能悪化の一つの原因であり、さらにその耐糖能悪化は cAMP/TRPM2 伝達経路を介して引き起こされていることが示唆された。

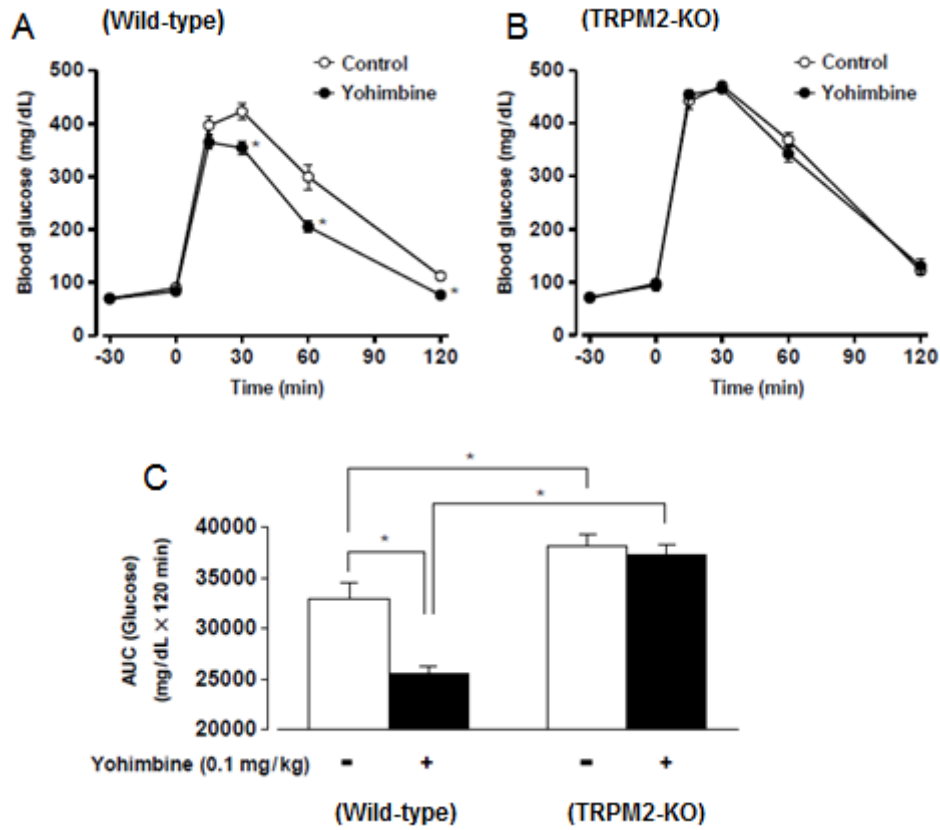


図 10. 野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスにおける、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体アンタゴニスト、ヨヒンビン投与の有無による耐糖能の違い

A : 野生型マウスにおけるヨヒンビン投与下および非投与下でのブドウ糖負荷試験 (n = 6)。\*P < 0.05 vs control。B : TRPM2-KO マウスにおけるヨヒンビン投与下および非投与下でのブドウ糖負荷試験 (n = 6)。C : A・B における 0-120 分までの AUC の比較 (n = 6)。\*P < 0.05。

#### 4. 考察

アドレナリンの糖代謝調節機構について、本研究において以下の知見を得た。

- ① 野生型マウス単離膵島において、アドレナリンはグルコースおよびグルコース/インクレチンホルモン刺激により促進されるインスリン分泌を濃度依存性に抑制した。
- ② TRPM2-KO マウス単離膵島において、低濃度のアドレナリンはグルコースおよびグルコース/インクレチンホルモン刺激により促進されるインスリン分泌を抑制しなかった。
- ③ 低濃度アドレナリンは、グルコースおよびインクレチンホルモン刺激による TRPM2 チャンネル電流増加を抑制し、それらは  $\alpha 2A$  受容体を介していることが示唆された。
- ④ 野生型マウスおよび TRPM2-KO マウスにおいて、低濃度のアドレナリンはグルコースおよびインクレチンホルモン刺激による cAMP 産生を抑制した。
- ⑤ 低濃度のアドレナリンは、グルコースおよびインクレチンホルモン刺激による細胞膜脱分極を抑制し、それらは  $\alpha 2A$  アドレナリン受容体を介していることが示唆された。
- ⑥ 高濃度アドレナリンは、高グルコース刺激に加え、トルブタミドの刺激による細胞膜脱分極およびインスリン分泌を抑制した。
- ⑦  $\alpha 2$  受容体アンタゴニストであるヨヒンビンは、野生型マウスでは、耐糖能を改善したが、TRPM2-KO マウスでは、耐糖能に影響を与えなかった。

アドレナリンやノルアドレナリンのようなカテコールアミンは膵 $\beta$ 細胞において $\alpha 2$  アドレナリン受容体を活性化することで、インスリン分泌を抑制するとされる[28-31]。これまで薬理学的高濃度のアドレナリン ( $\mu\text{M}$  order) のインスリン分泌の抑制機序について、cAMP の産生抑制、遅延整流性カリウム電流の活性化、電位依存性カルシウムチャネルを介する $\text{Ca}^{2+}$  流入の阻害、エキソサイトーシスの阻害等、複数の機序が報告されている[1-8]。しかしながら、膵 $\beta$ 細胞における生理学的濃度アドレナリンのシグナル伝達や作用については十分に明らかとはなっておらず、本研究では生理学的濃度での検討を中心に行った。

ヒトにおける安静時の血漿アドレナリン濃度は、安静時には 0.2-0.4 nM [32、33]、健常男性の運動時には 1 nM を十分に超えるとされる[32]。本研究で用いた 1 nM アドレナリンは前述のような生理学的濃度に近い濃度である。野生型マウスにおいて 1 nM アドレナリンは、 $\alpha 2\text{A}$  アドレナリン受容体を介して 16.6 mMG および Ex-4 による背景電流増加および細胞膜脱分極を抑制し、結果としてインスリン分泌を抑制した。一方 TRPM2-KO マウスでは、グルコース刺激およびインクレチンホルモン刺激によるインスリン分泌を 1 nM アドレナリンは抑制できなかった。さらに本研究では、内因性カテコールアミンの TRPM2 チャンネルに対する関与について検討するため、ヨヒンビン投与下での腹腔内ブドウ糖負荷試験を行った。野生型マウスでは、コントロール群に比較してヨヒンビン投与群で耐糖能を改善したが、TRPM2-KO マウスでは、ヨヒンビンは耐糖能に影響を与えなかった。これらの結果から、アドレナリンを含む生理学的濃度の内因性カテコールアミンが、cAMP/TRPM2 伝達経路を介して耐糖能に関与している可能性が示唆された。

一般に、グルコース代謝によって引き起こされる  $K_{ATP}$  チャンネルの閉口と細胞膜脱分極は、電位依存性カルシウムチャンネルを開口し、 $Ca^{2+}$ の流入とインスリン分泌を引き起こす[34、35]。GLP-1 のようなインクレチンホルモンは  $G_s$  蛋白共役型受容体へ作用することで、cAMP を産生してインスリン分泌を促進する[28、36-38]。また、非選択性陽イオンチャンネルの一つである TRPM2 チャンネルはインスリン分泌において、cAMP 依存性の伝達経路を介する重要な役割を担っている[13]。これらを踏まえて、本研究では TRPM2 チャンネルに対するアドレナリンの作用を検討した。低濃度アドレナリンは高濃度アドレナリンと同様に cAMP 産生を抑制し、インスリン分泌も同様に抑制した。さらに、db-cAMP による背景電流増加を低濃度アドレナリンは抑制することができなかった。これらの結果から、低濃度アドレナリンの作用は、既報のグレリンの作用と同様に[17]、 $G_i$  蛋白共役型受容体への刺激で引き起こされる cAMP 依存性経路を介して TRPM2 チャンネルを抑制することで、引き起こされていると考えられた。さらに細胞膜脱分極を促進する TRPM2 チャンネルの低濃度アドレナリンによる抑制は、グルコースによって引き起こされる細胞膜脱分極を再分極させるとともに、活動電位誘発までの潜時を延長させた。このアドレナリン作用は、グルコース刺激開始から細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇するまでの時間が延長するという過去の報告に矛盾しないものと考えられた[39]。加えて、TRPM2-KO マウスにおいて、低濃度アドレナリンが cAMP 産生を抑制するにも関わらず、同条件でのインスリン分泌を抑制できなかった。また、2.8 mM において 1 nM アドレナリンが背景電流やインスリン分泌に影響を与えなかったことから、生理学的濃度のアドレナリンは、グルコースやインクレチンホルモンによって相加的に刺激される cAMP/TRPM2 伝達経路によるイン

スリン分泌促進を抑制していると考えられた。

一方で薬理学的高濃度のアドレナリンについては、G 蛋白共役受容体を介して抑制される cAMP/TRPM2 伝達経路への作用を含む、複数のメカニズムでインスリン分泌を抑制すると考えられる。実際に本研究でも高濃度アドレナリンは、野生型マウスのみならず、TRPM2-KO マウスでもインスリン分泌を抑制し、野生型マウスにおいて db-cAMP による背景電流刺激も抑制した。さらに、高濃度アドレナリンは 100  $\mu$ M トルブタミドによる細胞膜脱分極も再分極させた。この機序の一つとして、G 蛋白活性化カリウム (GIRK) チャンネルの関与が報告されている[2]。また様々なインスリン分泌促進物質を用いた別の報告においても、高濃度アドレナリンは、トルブタミドやアルギニン、高濃度  $K^+$  等、それぞれの作用機序に関係なく、インスリン分泌刺激を阻害する作用を有していた[25]。TRPM2 チャンネルとは異なる機序でより強力に細胞膜を脱分極させる状況下（上述のトルブタミドやアルギニン、高濃度  $K^+$  等）において低濃度アドレナリンを投与しても、cAMP/TRPM2 チャンネルを介したインスリン分泌抑制作用を検出することは困難である。しかしながら、このような状況下であっても高濃度アドレナリンは、cAMP 非依存性機序を介してインスリン分泌を抑制することが報告されている [6、25、40]。高濃度アドレナリンのインスリン分泌や血糖値に対する作用は、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体サブタイプによって異なる可能性が示唆されている[26、27]。本研究で用いられた各選択的受容体アンタゴニストは、背景電流に影響を与えなかったが、他のサブタイプのアドレナリン受容体に影響を及ぼしている可能性は完全に否定できない。濃度によって異なるアドレナリンの作用が、一つの  $\alpha 2$  アドレナリン受容体を介しているのか、異なるサブタイプの受容体を介しているのかについて

の厳密な検討のためには、各種アドレナリン受容体の KO マウスを用いる必要がある。さらに、高濃度アドレナリンの背景電流抑制について、cAMP 依存性伝達経路の阻害に加えて、cAMP 非依存性のシグナルが TRPM2 チャネルにどのように関与しているのか、更なる検討が必要である。

$\alpha 2$  アドレナリン受容体の阻害は、血糖値を低下させ[41、42]、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体の欠損マウスでは血漿インスリン値の上昇や血糖値の低下、耐糖能の改善が見られたと報告されている[43、44]。また、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体欠損マウスでは  $\alpha 2$  アゴニストの影響を受けない一方で、野生型マウスではその影響を受け、血糖値が上昇し、インスリン値が上昇したと報告されている[43、44]。これらの結果は、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体を介したインスリン分泌の阻害が、生体内での血糖値の調節に関与していることを示唆している。本研究では、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体アンタゴニストであるヨヒンビンの投与が、野生型マウスでの血糖値の上昇を抑制するのに対し、TRPM2-KO マウスではその影響を認めないことを示した。このことから、 $\alpha 2$  アドレナリン受容体を介する内因性交感神経系調節は、TRPM2 チャネル抑制作用によるインスリン分泌阻害によって血糖値を上昇させていると考えられた。膵  $\beta$  細胞における生理学的濃度アドレナリンの cAMP 依存性 TRPM2 チャネルへの影響を明らかにするため、更なる研究が必要である。

臨床医療においても、交感神経緊張亢進は肥満を含む慢性炎症と関連し[45、46]、アドレナリンを含むカテコールアミン増加を伴う病態である褐色細胞腫では、20~25%に耐糖能異常を合併する[47、48]。 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体の刺激は、 $\beta$  細胞の機能異常の出現や 2 型糖尿病の発症のリスクを増加させることが示唆されている[49、50]。 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体を

遺伝的にコードしている ADRA2A の過剰発現が耐糖能異常や 2 型糖尿病の発症に関与しているということ[50-52]、また ADRA2A の危険対立遺伝子を有する患者において、ヨヒンビンの投与はインスリン分泌を改善したと報告されている[53]。膵β細胞にα2A アドレナリン受容体を過剰発現させたマウスでは、食前の血糖やインスリン値は保たれているにも関わらず耐糖能は障害されているという報告[54]からも、α2A アドレナリン受容体の活性化は 2 型糖尿病発症に関連があり、α2 アドレナリン受容体の阻害はグルコース代謝に伴うインスリン分泌を改善し得ると考えられる。膵β細胞α2A アドレナリン受容体を介した cAMP/TRPM2 経路へのアプローチが、今後 2 型糖尿病に対する治療手段の一つとして臨床応用されることが期待される。



## 5. おわりに

本研究によって、アドレナリンが cAMP の下流に位置する TRPM2 チャンネルを制御していることが示された。さらに生理学的濃度のアドレナリンは、膵  $\beta$  細胞における  $\alpha 2A$  アドレナリン受容体を介して TRPM2 チャンネルを制御することで、インスリン分泌を抑制していることが示された。また、薬理学的高濃度アドレナリンと生理学的濃度アドレナリンには、その作用に明らかな差があることも示された。薬理的な高濃度アドレナリンの詳細な作用機序に関しては、更なる検討が必要である。

本研究は、生理学的濃度のアドレナリンが、インクレチンホルモンの作用する経路の一つである、cAMP/TRPM2 経路を制御することでインスリン分泌を抑制しているという観点から、重要な意味を持つ。交感神経系活性化の病態を有する 2 型糖尿病患者において、インクレチン関連薬のインスリン分泌促進効果が不十分な場合、その理由の一つを説明し得るかもしれない。生理学的濃度アドレナリンの作用、すなわち、 $\alpha 2A$  アドレナリン受容体を介した cAMP/TRPM2 シグナル伝達経路を意識した糖尿病治療が、日常臨床において、より適切な糖尿病治療薬の選択につながる可能性があり、さらに膵  $\beta$  細胞におけるこの経路に対するアプローチは新規糖尿病治療薬開発の潜在的な可能性を有していると考えられる。

## 6. 謝辞

本研究の全般にわたりましてご指導賜りました、前自治医科大学附属さいたま医療センター総合診療科兼内分泌代謝科教授加計正文先生、自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門准教授出崎克也先生に深く感謝いたします。

また大学院生としての研究活動をご支援下さいました自治医科大学附属さいたま医療センター腎臓内科教授森下義幸先生、同准教授大河原晋先生、同前教授田部井薫先生、さらに研究に関してご助言およびご支援を賜りました前自治医科大学附属さいたま医療センターセンター長の川上正舒先生、自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門教授矢田俊彦先生、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、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、共に実験をして下さいました同大学院生山田穂高先生、自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門大学院生三浦李菜先生、**Rauza Sukma Rita** 先生に深く感謝いたします。

最後に研究にご協力頂きました自治医科大学医学部生理学講座統合生理学部門の皆様、自治医科大学附属さいたま医療センター腎臓内科、内分泌代謝科ならびに循環器病臨床医学研究所の皆様に感謝いたします。

本研究の内容は、主論文として2016年9月25日に **Diabetes** 誌に投稿し、同年12月21日に同誌に受理された。本論文で使用した図の一部は、掲載雑誌(**Diabetes**)の著作権元である **American Diabetes Association** に許可を得た上で使用した。

## 7. 参考文献

- [1] Komatsu M, McDermott AM, Gillison SL, Sharp GW. Time course of action of pertussis toxin to block the inhibition of stimulated insulin release by norepinephrine. *Endocrinology* 136:1857-1863, 1995.
- [2] Iwanir S, Reuveny E. Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Pflügers Arch* 456:1097-1108, 2008.
- [3] Sieg A, Su J, Munoz A, Buchenau M, Nakazaki M, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Ullrich S. Epinephrine-induced hyperpolarization of islet cells without  $K_{ATP}$  channels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E463-471, 2004.
- [4] Aicardi G, Pollo A, Sher E, Carbone E. Noradrenergic inhibition and voltage-dependent facilitation of omega-conotoxin-sensitive Ca channels in insulin-secreting RINm5F cells. *FEBS Lett* 281:201-204, 1991.
- [5] Schmidt A, Hescheler J, Offermanns S, Spicher K, Hinsch KD, Klinz FJ, Codina J, Birnbaumer L, Gausepohl H, Frank R. Involvement of pertussis toxin-sensitive G-proteins in the hormonal inhibition of dihydropyridine-sensitive  $Ca^{2+}$  currents in an insulin-secreting cell line (RINm5F). *J Biol Chem* 266:18025-18033, 1991.
- [6] Renstrom E, Ding WG, Bokvist K, Rorsman P. Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin. *Neuron* 17:513-522, 1996.
- [7] Straub SG, Sharp GW. Evolving insights regarding mechanisms for the inhibition of insulin release by norepinephrine and heterotrimeric G proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 302:C1687-1698, 2012.

- [8] Zhao Y, Fang Q, Straub SG, Lindau M, Sharp GW. Noradrenaline inhibits exocytosis via the G protein  $\beta\gamma$  subunit and refilling of the readily releasable granule pool via the alpha ( $i1/2$ ) subunit. *J Physiol* 588:3485-3498, 2010.
- [9] Kakei M, Yoshida M, Dezaki K, Ito K, Yamada H, Funazaki S, Kawakami M, Sugawara H, Yada T. Glucose and GTP-binding protein-coupled receptor cooperatively regulate transient receptor potential-channels to stimulate insulin secretion. *Endocrine J* 63:867-876, 2016.
- [10] Shigeto M, Ramracheya R, Tarasov AI, Cha CY, Chibalina MV, Hastoy B, Philippaert K, Reinbothe T, Rorsman N, Salehi A, Sones WR, Vergari E, Weston C, Gorelik J, Katsura M, Nikolaev VO, Vennekens R, Zaccolo M, Galione A, Johnson PR, Kaku K, Ladds G, Rorsman P. GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *J Clin Invest* 125:4714-4728, 2015.
- [11] Uchida K, Tominaga M. The role of TRPM2 in pancreatic  $\beta$ -cells and the development of diabetes. *Cell Calcium* 56:332-339, 2014.
- [12] 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* 6:25912, 2016.
- [13] Yosida M, Dezaki K, Uchida K, Kodera S, Lam NV, Ito K, Rita RS, Yamada H, Shimomura K, Ishikawa SE, Sugawara H, Kawakami M, Tominaga M, Yada T, Kakei M. Involvement of cAMP/EPAC/TRPM2 activation in glucose- and incretin-induced insulin secretion. *Diabetes* 63:3394-3403, 2014.
- [14] Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M.

- TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 25:1804-1815, 2006.
- [15] Togashi K, Inada H, Tominaga M. Inhibition of the transient receptor potential cation channel TRPM2 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Br J Pharmacol* 153:1324-1330, 2008.
- [16] Kashio M, Tominaga M. 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] 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 glycemic effects of ghrelin. *Sci Rep* 5:14041, 2015.
- [18] 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.
- [19] Nakazaki M, Kakei M, Koriyama N, Tanaka H. Involvement of ATP-sensitive  $K^+$  channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes* 44:878-883, 1995.
- [20] Yoshida M, Dezaki K, Yamato S, Aoki A, Sugawara H, Toyoshima H, Ishikawa SE, Kawakami M, Nakata M, Yada T, Kakei M. Regulation of voltage-gated  $K^+$  channels by glucose metabolism in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 583:2225-2230, 2009.
- [21] Numata T, Sato K, Christmann J, Marx R, Mori Y, Okada Y, Wehner F. The  $\Delta C$

- splice-variant of TRPM2 is the hypertonicity-induced cation channel in HeLa cells, and the ecto-enzyme CD38 mediates its activation. *J Physiol* 590:1121-1138, 2012.
- [22] Yang W, Zou J, Xia R, Vaal ML, Seymour VA, Luo J, Beech DJ, Jiang LH. State-dependent inhibition of TRPM2 channel by acidic pH. *J Biol Chem* 285:30411-30418, 2010.
- [23] Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Nakata M, Kakei M, Nagai H, Hosoda H, Kangawa K, Yada T. Blockade of pancreatic islet-derived ghrelin enhances insulin secretion to prevent high-fat diet-induced glucose intolerance. *Diabetes* 55:3486-3493, 2006.
- [24] Sukma Rita R, Dezaki K, Kurashina T, Kakei M, Yada T. 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.
- [25] Debuyser A, Drews G, Henquin JC. Adrenaline inhibition of insulin release: role of the repolarization of the B cell membrane. *Pflügers Arch* 419:131-137, 1991.
- [26] Peterhoff M, Sieg A, Brede M, Chao CM, Hein L, Ullrich S. Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Endocrinol* 149:343-350, 2003.
- [27] Ruohonen ST, Ruohonen S, Gilsbach R, Savontaus E, Scheinin M, Hein L. Involvement of  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes A and C in glucose homeostasis and adrenaline-induced hyperglycaemia. *Neuroendocrinology* 96:51-59, 2012.
- [28] Ahren B. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 8:369-385, 2009.
- [29] Morgan NG, Montague W. Studies on the mechanism of inhibition of

- glucose-stimulated insulin secretion by noradrenaline in rat islets of Langerhans. *Biochem J* 226:571-576, 1985.
- [30] Ullrich S, Wollheim CB. Expression of both alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in an insulin-secreting cell line. Parallel studies of cytosolic free  $Ca^{2+}$  and insulin release. *Mol Pharmacol* 28:100-106, 1985.
- [31] Ullrich S, Wollheim CB. GTP-dependent inhibition of insulin secretion by epinephrine in permeabilized RINm5F cells. Lack of correlation between insulin secretion and cyclic AMP levels. *J Biol Chem* 263:8615-8620, 1988.
- [32] Aarnio P, Lauritsen T, Dela F. Insulin secretion and glucose kinetics during exercise with and without pharmacological alpha(1)- and alpha(2)-receptor blockade. *Diabetes* 50:1834-1843, 2001.
- [33] Grip J, Jakobsson T, Hebert C, Klaude M, Sandstrom G, Wernerman J, Rooyackers O. Lactate kinetics and mitochondrial respiration in skeletal muscle of healthy humans under influence of adrenaline. *Clin Sci* 129:375-384, 2015.
- [34] Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312:446-448, 1984.
- [35] Ashcroft FM, Kakei M, Kelly RP, Sutton R. ATP-sensitive  $K^+$  channels in human isolated pancreatic B-cells. *FEBS Lett* 215:9-12, 1987.
- [36] Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. *Cell* 148:1160-1171, 2012.
- [37] Campbell JE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. *Cell Metab* 17:819-837, 2013.
- [38] Damdindorj B, Dezaki K, Kurashina T, Sone H, Rita R, Kakei M, Yada T. Exogenous and endogenous ghrelin counteracts GLP-1 action to stimulate cAMP

- signaling and insulin secretion in islet  $\beta$ -cells. *FEBS Lett* 586:2555-2562, 2012.
- [39] Hellman B, Dansk H, Grapengiesser E. Activation of alpha adrenergic and muscarinic receptors modifies early glucose suppression of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 445:629-632, 2014.
- [40] Rorsman P, Bokvist K, Ammala C, Arkhammar P, Berggren PO, Larsson O, Wahlander K. Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent  $\text{K}^+$  channel in mouse pancreatic B cells. *Nature* 349:77-79, 1991.
- [41] Abdel-Zaher AO, Ahmed IT, El-Koussi AD. The potential antidiabetic activity of some alpha-2 adrenoceptor antagonists. *Pharmacol Res* 44:397-409, 2001.
- [42] Schafers RF, Nurnberger J, Herrmann B, Wenzel RR, Philipp T, Michel MC. Adrenoceptors mediating the cardiovascular and metabolic effects of alpha-methylnoradrenaline in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 289:918-925, 1999.
- [43] Fagerholm V, Gronroos T, Marjamaki P, Viljanen T, Scheinin M, Haaparanta M. Altered glucose homeostasis in alpha2A-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 505:243-252, 2004.
- [44] Savontaus E, Fagerholm V, Rahkonen O, Scheinin M. Reduced blood glucose levels, increased insulin levels and improved glucose tolerance in alpha2A-adrenoceptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 578:359-364, 2008.
- [45] Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML. Weight gain-induced blood pressure elevation. *Hypertension* 35:1135-1140, 2000.
- [46] Thorp AA, Schlaich MP. Relevance of sympathetic nervous system activation in obesity and metabolic syndrome. *J Diabetes Res* 2015:341583, 2015.
- [47] Stenstrom G, Sjostrom L, Smith U. Diabetes mellitus in pheochromocytoma. Fasting blood glucose levels before and after surgery in 60 patients with



- phaeochromocytoma. *Acta Endocrinol* 106:511-515, 1984.
- [48] Kim KH, Chung JS, Kim WT, Oh CK, Chae YB, Yu HS, Ham WS, Choi YD. Clinical experiences of pheochromocytoma in Korea. *Yonsei Med J* 52:45-50, 2011.
- [49] Gribble FM. Alpha2A-adrenergic receptors and type 2 diabetes. *New Engl J Med* 362:361-362, 2010.
- [50] Rosengren AH, Jokubka R, Tojjar D, Granhall C, Hansson O, Li DQ, Nagaraj V, Reinbothe TM, Tuncel J, Eliasson L, Groop L, Rorsman P, Salehi A, Lyssenko V, Luthman H, Renstrom E. Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science* 327:217-220, 2010.
- [51] Chen X, Liu L, He W, Lu Y, Ma D, Du T, Liu Q, Chen C, Yu X. Association of the ADRA2A polymorphisms with the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *Clin Biochem* 46:722-726, 2013.
- [52] Talmud PJ, Cooper JA, Gaunt T, Holmes MV, Shah S, Palmen J, Drenos F, Shah T, Kumari M, Kivimaki M, Whittaker J, Lawlor DA, Day IN, Hingorani AD, Casas JP, Humphries SE. Variants of ADRA2A are associated with fasting glucose, blood pressure, body mass index and type 2 diabetes risk: meta-analysis of four prospective studies. *Diabetologia* 54:1710-1719, 2011.
- [53] Tang Y, Axelsson AS, Spegel P, Andersson LE, Mulder H, Groop LC, Renstrom E, Rosengren AH. Genotype-based treatment of type 2 diabetes with an  $\alpha$ 2A-adrenergic receptor antagonist. *Sci Transl Med* 6:257ra139, 2014.
- [54] Devedjian JC, Pujol A, Cayla C, George M, Casellas A, Paris H, Bosch F. Transgenic mice overexpressing alpha2A-adrenoceptors in pancreatic beta-cells show altered regulation of glucose homeostasis. *Diabetologia* 43:899-906, 2000.