

温度感受性 TRP チャンネル TRPM2 の生理機能

Physiological Function of Thermosensitive TRPM2 Channels

(日本生理学会推薦)

代表研究者 自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所)
富永真琴
Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute
for Physiological Sciences), National Institutes of Natural
Sciences Makoto Tominaga

There are eight thermosensitive TRP channels in mammals, and TRPM2 was found to be the 9th one which can be activated by exposure to warm temperatures (>35°C) apparently via direct heat-evoked channel gating. In pancreatic islets, TRPM2 was co-expressed with insulin, and mild heating of these cells evokes increased in both cytosolic Ca²⁺ and insulin release which is diminished by treatment with TRPM2-specific siRNA. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) exhibited the rapid and reversible inhibition of TRPM2 channels that were activated by its ligands and heat in a dose dependent manner, and 2-APB inhibited heat-evoked insulin release from the pancreatic islets as well. Thus, TRPM2 is one of the key molecules important for blood glucose control, and its in vivo function is now being investigated using TRPM2-deficient mice. TRPM2 involvement in immune function is now also being examined.

研究目的

哺乳類において8つの温度感受性TRPチャンネルが知られており、特異的な活性化温度閾値を有する（カプサイシン受容体TRPV1（43度以上）、TRPV2（52度以上）、TRPV3（30-35度以上）、TRPV4（30-35度以上）、メントール受容体TRPM8（28度以下）、TRPA1（17度以下）、TRPM4 & TRPM5（15-35度））。申請者はほかにも温度感受性TRPチャンネルが存在すると考えてスクリーニングを行い、TRPM2が約36度の温度で活性化するCa²⁺透過性の高い非選択性陽イオンであることを見いだした。そして、これまで温度感受性が感覚神経に担われているという概念を覆し、生体内の多くの細胞（深体温に暴露されている）が温度を感知して生存し機能していること明らかにした。本研究では、新たな温度感受性TRPチャンネルTRPM2の生理学的意義を明らかにすることを目的とする。膵臓でのTRPM2機能制御によるインスリン分泌調節を目指し、TRPM2の温度による活性化機構とその制御メカニズムを異所性発現系及び膵臓β細胞で明らかにすることを第一の目標とする。現在保有しているTRPM2欠損マウスを用いて、個体レベルでTRPM2のインスリン放出における意義を検討することが可能である。糖尿病は生活習慣病の1つとして年々増加しており、その予備軍も含めると数百万人の日本人が患っている疾患である。したがって、その発症メカニズムの解明と治療法の開発が強く望まれており、インスリン放出機構の解析は新たな糖尿病治療法の開発へと発展する可能性を持っている。発熱時には免疫細胞の活性が増強することが知られているが、その分子メカニズムは明らかではない。体温近傍の温度で活性化するTRPM2は2度程度の温度上昇でもそのチャンネル活性が増大することを確認しており、発熱時のリンパ球活性化に必要な細胞内Ca²⁺濃度の増加に寄与する可能性がある。この仮説を検証して、免疫細胞活性化におけるTRPM2の関与を明らかにすることを本申請の第二の目標とする。保有するTRPM2欠損マウスの解析によって個体レベルでのTRPM2活性化の免疫機能への影響も検討することができ、免疫研究へも大きな貢献となるであろう。さらには、TRPM2の機能制御から免疫機能の調節が可能となるかもしれない。

研究経過

(1) TRPM2 とインスリン放出機構

TRPM2をHEK293細胞に強制発現させてCa²⁺イメージング法で解析を行い、TRPM2が体温近傍の温度で活性化する新たな温度感受性TRPチャネルであることが明らかとなった。高いCa²⁺透過性を有し、直線的な電流・電圧関係を示した。このことは、既知のリガンドによる活性化と温度による活性化でチャネル開口メカニズムが大きく異なることを示している。また、温度がチャネルの電位依存性を変化させて開口をもたらしているとされている熱刺激受容体TRPV1、冷刺激受容体TRPM8とは異なる開口メカニズムであることが明らかとなった。Inside-out法による単一電流記録によって、パッチ膜だけの状態でTRPM2の活性化が観察されたことから、温度によってTRPM2はおそらく直接活性化されるであろうことも分かった。ラットインスリンノーマ由来培養細胞RIN-5F細胞でも、異所性発現系（HEK293細胞）と同じような性質をもつ温度刺激による細胞内Ca²⁺濃度上昇や活性化電流が観察された。さらに、この温度依存性の現象がTRPM2特異的なsiRNA処理によって有意に抑制されたことから、RIN-5F細胞の内因性のTRPM2チャネルが関与していると結論された。抗TRPM2抗体を用いてラット膵臓を染色したところ、TRPM2は膵島に局限し、インスリンの発現と重なった。グルカゴンとは重ならなかったことから、TRPM2の発現は膵β細胞で機能しているものと考えられた。ラット膵臓から単離したβ細胞においても、温度依存的な細胞内Ca²⁺濃度上昇を観察した。ラットの膵島からのグルコース依存性のインスリン放出を検討したところ、このインスリン放出が温度依存性であること、TRPM2特異的なsiRNA処理によって熱刺激で起こったインスリン放出が有意に抑制されることが明らかとなった。よって、内因性のTRPM2が膵臓からの温度依存的なインスリン放出に関与することが判明した。

以上のことから、TRPM2機能制御は血糖コントロールにつながると推定される。特に、TRPM2活性化物質は糖尿病治療薬となる可能性がある。そこで、Ca²⁺イメージング法を用いてTRPM2機能を制御する物質を探索した。スクリーニングによってTRPM2の活性化物質を発見することはできなかったが、阻害物質として2-aminoethoxyphenyl borate (2-APB)を同定した。2-APBは、特異性は高くないものの、これまでのTRPM2阻害物質より低濃度

で (EC_{50} 約 $1 \mu\text{M}$)、電位非依存的、細胞内 Ca^{2+} 濃度非依存的に TRPM2 の活性をほとんど完全にしかも可逆的に阻害することが明らかとなった。その作用は、リガンド活性化 TRPM2 電流のみならず、リガンドと熱によって活性化した大きな電流に対しても確認され、阻害濃度の依存曲線は刺激間で差はなかった。さらに、膵臓ランゲルハンス島からの 37 度でのグルコースによるインスリン放出および excendin-4 によるインスリン放出が 2-APB によって有意に抑制された。

TRPM2 のインスリン放出への関与を個体レベルで検証するために、野生型マウスと TRPM2 欠損マウス (京都大学森泰生教授から供与) の比較検討を行った。TRPM2 欠損マウスは、野生型マウスと比較して、体重、空腹時血糖に差は見られなかった。現在、解析を進めているが、TRPM2 欠損マウスは経口および腹腔内グルコース負荷による耐糖能試験において、野生型マウスと比較して耐糖能に異常が認められている。さらなる解析が必要と思われる。

(2) TRPM2 と免疫機構

免疫細胞において複数種の温度感受性 TRP チャンネルが発現していることを遺伝子レベルで確認した。また、マウスリンパ球において温度依存性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がみられることを Ca^{2+} イメージング法で確認した。セルソーターを用いてリンパ球を分取し、より詳細な温度感受性 TRP チャンネルの発現解析と温度応答解析を進めているところである。

考察

TRPM2 チャンネルが体温下で活性化して膵臓からのインスリン放出に関与することが明らかとなった。インスリン放出に関しては、グルコース取り込みによって ATP が産生され、ATP 感受性 K^+ チャンネルが閉じることによる脱分極で電位作動性 Ca^{2+} チャンネルが活性化されて引き起こされる Ca^{2+} 流入が最も重要なメカニズムと考えられてきたが、インスリン放出は生体にとって非常に重要であるので、複数のメカニズムが働くことは不思議ではない。これまで、インスリン分泌測定には温度管理が重要であるとされてきており、それは TRPM2 の関与を示唆するものである。また、高体温時に血中インスリン濃度が上昇することが知られており、そのメカニズム

は TRPM2 の活性化による Ca^{2+} 流入かもしれない。現時点では終わっていない TRPM2 欠損マウスの解析が、個体レベルでの血糖コントロールにおける TRPM2 の重要性を示してくれるものと期待される。また、糖尿病は生活習慣病の1つとして年々増加しており、その予備軍も含めると数百万人の日本人が患っている疾患である。したがって、TRPM2 活性化物質の探索は急務であるといえよう。

免疫系細胞に発現する TRPM2 を含む温度感受性 TRP チャンネルの機能に関しては、より一層解析を進める必要があるものと思われる。

研究発表（本研究課題に関連したもの）

口頭発表

1. 富永真琴；「 Ca^{2+} influx through TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion」2006 FASEB Summer Research Conferences; Calcium and Cell Function、(Colorado (USA)、2006).
2. 富永真琴；「Physiological significance of the thermosensitive TRP channels.」2007 Keystone Symposium, The Transient Receptor Potential Ion Channel Super Family、(Colorado (USA)、2007).

紙上発表

1. Togashi K Kazuya, Hara Yuji, Tominaga Tomoko, Higashi Tomohiro, Konishi Yasunobu, Mori Yasuo and Tominaga Makoto; “TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion.” EMBO J 25 (9): 1804-1815, 2006.
2. Inada Hitoshi, Iida Tohko and Tominaga Makoto; “Different expression patterns of TRP genes in murine B and T lymphocytes.” Biochem. Biophys. Res. Commun. 350: 762-767, 2006.
3. Togashi Kazuya, Inada Hitoshi and Tominaga Makoto; “Inhibition of TRPM2 channels by 2-APB.” Br. J. Pharmacol. 153 (6): 1324-1330, 2008.