

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：33920

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06720

研究課題名(和文) 糖尿病性多発神経障害におけるグルコース応答性KATPチャネルの役割の解明

研究課題名(英文) The Functions of Glucose-Responsive ATP-sensitive K (KATP) Channels in Peripheral Nervous Systems

研究代表者

姫野 龍仁 (Himeno, Tatsuhito)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：60753762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性多発神経障害の病態解明を目的とした。インスリン分泌促進薬スルフォニルウレア(SU)薬の標的であるグルコース応答性KATPチャネル(KATP)がエネルギー代謝状態に応じて神経興奮性を制御するという知見に基づき、KATPの末梢神経系における生理的役割を評価した。

その結果、後根神経節ニューロン培養において、SU薬及びKATP開口薬が、神経保護作用あるいは逆に神経傷害作用を発揮することを明らかにした。KATPノックアウトマウスにおいては、末梢神経系が加齢に伴い野生型マウスよりも早期に機能低下することが明らかとなった。以上より、KATPは末梢神経系の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： We aimed to clarify the pathology of diabetic polyneuropathy. Based on the finding that glucose responsive KATP channel (KATP), a target of insulin secretagogue sulfonyl urea (SU) drug, controls nerve excitability according to energy metabolic state, we investigated the physiological role of KATP in the peripheral nervous system.

As a result, it was revealed that SUs and KATP openers can exert neuroprotective action or conversely nerve injury action in dorsal root ganglion neuron cultures. In the KATP knockout mice, it was revealed that the peripheral nervous system declined at an earlier stage than the wild type mice with aging. Thus, it was suggested that KATP plays an important role in maintaining the peripheral nervous system.

研究分野：糖尿病性合併症

キーワード：糖尿病性多発神経障害 糖尿病性合併症 糖尿病神経障害 グルコース応答性カリウムチャネル KATP channel

## 1. 研究開始当初の背景

Diabetic polyneuropathy (DPN)は糖尿病患者の約半数に認められ(Dyck PJ, Neurology 1993)、自発痛・しびれ感・異常知覚・知覚低下などのQOL低下をきたす感覚障害の他、病期の進行に伴い、一部の患者には足潰瘍・足壊疽といったADL低下・生命予後悪化をもたらす疾患が併発する。

DPNの発症・進展メカニズムとしては、高血糖に伴う代謝障害(ポリオール代謝亢進、神経栄養因子の低下、PKC活性の変化、AGE蓄積、酸化ストレス亢進など)と糖尿病性細小血管障害に伴う末梢神経組織における血流障害が重要であり、この2つの因子が相互に作用しながらDPNが発症・進展すると考えられている。

代謝障害に注目し、アルドース還元酵素阻害薬(ARI)を始め、いくつかの治療薬が提案され、実験医学においてはそれらの有効性が報告されている。私の所属する研究室は、ポリオール代謝、PKC活性に注目し研究を継続しており、その結果ARIの一つepalrestatの臨床応用において主導的研究を行った(Hotta N, Diabetes Res Clin Pract 2007)。よく計画されたstudyにおいてepalrestatは自覚症状と神経伝導速度の改善をもたらした。しかしながら糖尿病罹病期間が長期化し、その結果として進行したDPNに対する臨床における効果は不十分な症例が多い。

一方、血流障害に注目した治療法として血管内皮増殖因子遺伝子治療がヒトにおいて報告されたが(Ropper AH, Ann Neurol 2009)、遺伝子治療を行った下肢の対側でも症状が改善するなどといった矛盾やangiogenesisとの相関が認められないといった問題が残されており、広く臨床に応用するには更なる研究の積み重ねが必要と考えられている。

以上のように、DPNは進行予防・機能改善を目的とした治療法が確立されておらず、疼痛に対する対症療法の領域において若干の進展がみられる状況である。

本研究で取り上げるグルコース応答性KATPチャネル(KATPC)は、スルフォニルウレア(SU)受容体タンパクと内向き整流Kチャネル(Kir)タンパクのヘテロ8量体より構成され、膵細胞においてはグルコース誘発性インスリン分泌(GSIS)の中心的役割を担っている。GSISの機序の概略であるが、膵細胞において、細胞外グルコース濃度上昇が細胞膜上のグルコーストランスポーターを介して感知され、細胞内でのATP産生亢進によりKATPCが閉鎖し、細胞膜電位の脱分極を経て細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇し、インスリン分泌顆粒の細胞膜への移動・細胞外への分泌を促すことでインスリン分泌を起こす。SU薬はこのGSISの機序の後半部分を利用する、即ち、SU受容体に結合することでKATPCを閉鎖し、以降のインスリン分泌機序を進行させる。この作用はSU薬を強力な血糖降下薬たらしめ、現在、臨床現場で広く使

用されている。一方、KATPC closerであるSU薬とは逆にKATPC openerであるnicorandilおよびdiazoxideもまた臨床応用されており、このうちnicorandilについては血管拡張作用による狭心症への適応の他、心筋保護作用を有することより循環器疾患領域で広く使用されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、糖尿病性多発神経障害DPNの新規発症機序の解明を目的とする。DPNにはいくつかの発症機序が提案されているものの、治療法が確立されていない。インスリン分泌促進作用のあるスルフォニルウレア(SU)薬は臨床現場で汎用されているが、近年、本薬の標的であるKATPCが中枢神経系にも広く分布し、エネルギー代謝状態に応じた神経興奮性の制御、摂食行動の変化および全身の代謝状態変化に寄与することが解明されつつある。そこで本研究では、KATPCの末梢神経系における生理学的役割を評価し、KATPCに作用するKATPC openerおよびKATPC closerのDPNの病態に及ぼす影響を検討することにより、DPNの新たな発症機序と治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究は大別して以下の4つの実験系に分かれる。

(1)末梢神経系におけるKATPCの発現・分布の評価：マウスの末梢神経系組織を試料として、逆転写PCR法・免疫組織学的染色法により各種KATPC構成タンパクの発現を確認する。

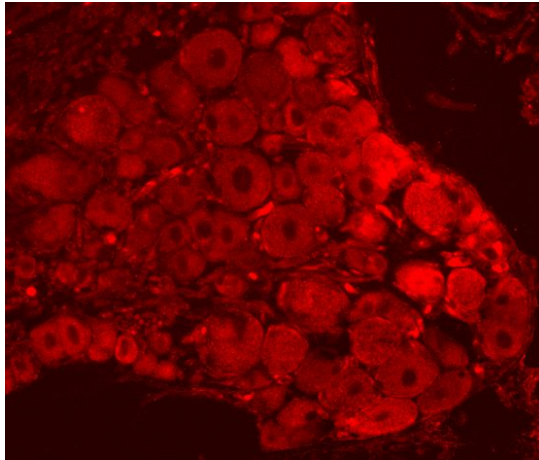
(2)マウス後根神経節ニューロン及びSchwann細胞の初代培養におけるKATPC closer及びopenerの影響の評価：各々の細胞における細胞障害・細胞死・増殖、ニューロンにおける神経突起長、Schwann細胞におけるミエリン鞘形成関連タンパク発現変化などを評価する。

(3)KATPC機能欠損マウスにおける末梢神経障害の評価：既に確立・入手済みのKATPC機能欠損マウスであるKir6.2ノックアウトマウスを用い、末梢神経障害の有無を評価する。

(4)1型糖尿病モデルマウスにおけるDPNに対するKATPC作動薬による治療効果の検討：streptozotocin誘発糖尿病モデルマウスのDPNに対し、KATPC openerおよびcloserの影響を評価する。

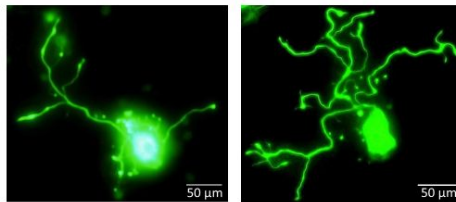
## 4. 研究成果

マウス後根神経節及び坐骨神経における各種KATPC構成タンパク発現を確認した。(次頁図にSUR1の分布を示す。)



また、streptozotocin 誘発糖尿病モデルマウスおよび肥満 2 型糖尿病モデル db/db マウスにおける KATPC タンパクの発現量を比較し、糖尿病状態での KATPC の発現に変化を認めないことが判明した。次に、マウス後根神経節ニューロンの初代培養細胞を用いて、各種 KATPC 作動薬の末梢神経系細胞に及ぼす影響を評価したところ、各種の SU 薬は、各々のチャンネル選択性に依存して、神経保護作用あるいは逆に神経傷害作用を発揮することが明らかとなった。下図に gliclazide による神経突起伸長促進作用の代表例を示す。

DRGニューロンの神経突起伸長  
- KATP channel closer -



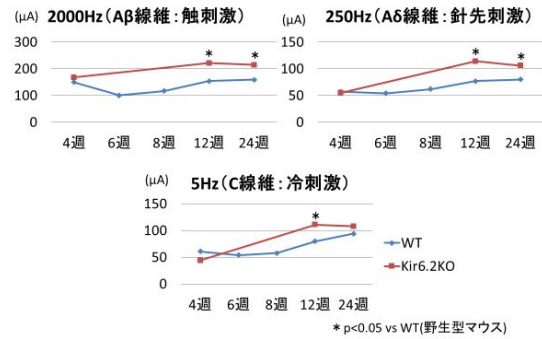
Control Gliclazide 0.5 μM

緑: Neurofilament Heavy Chain

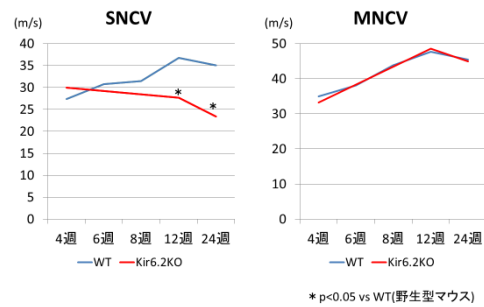
また、KATPC の開口薬は、神経保護作用を発揮することが示された。

最後に、KATPC ノックアウトマウスにおける末梢神経系の機能及び病理学的変化を評価したところ、いったん正常に発達した末梢神経系が、加齢に伴い野生型マウスよりも早期に末梢神経機能が低下することが明らかとなった。(下に神経伝導速度および電流知覚閾値の変遷を示す。)

### Neurometer



### 神経伝導速度



以上より、KATPC は末梢神経系の維持に重要な役割を果たすことが証明された。

## 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. Tosaki T, Kamiya H, Himeno T, Kato Y, Kondo M, Toyota K, Nishida T, Shiroma M, Tsubonaka K, Asai H, Moribe M, Nakaya Y, Nakamura J. Sodium-glucose Co-transporter 2 Inhibitors Reduce the Abdominal Visceral Fat Area and May Influence the Renal Function in Patients with Type 2 Diabetes. Intern Med (査読有). 2017;56(6):597-604.
2. Himeno T, Nakamura J. Novel mechanism for counter-regulatory responses to hypoglycemia. J Diabetes Investig (査読有). 2017 Jan;8(1):29-31.

[学会発表](計2件)

1. Himeno T, Kamiya H, Seino Y, Naruse K, Hayami T, Motegi T, Noda S, Okawa T, Kondo M, Tsunekawa S, Seino S, Nakamura J. The 76th the American Diabetes Association Scientific Sessions 2016.6.10-16 New Orleans, USA. The functions of glucose-responsive ATP-sensitive potassium channels in the peripheral

nervous system of mice.

2. 姫野龍仁、神谷英紀、清野祐介、野田紗恵子、速水智英、茂木幹雄、大川哲司、恒川 新、近藤正樹、加藤義郎、大磯ユタカ、中村二郎 . 末梢神経系におけるグルコース応答性 KATP チャンネルの生理的機能に関する検討 第30回日本糖尿病合併症学会 2015.11.27-28 名古屋

〔図書〕(計2件)

1. 姫野龍仁、中村二郎 . 感覚運動神経障害と自律神経障害の病態・診断法・治療法の特、Diabetes Strategy Vol.6 no.1、pp.23-29、2016.
2. 姫野龍仁、中村二郎 . 成因に基づく治療 糖尿病神経障害の薬物療法 特集 糖尿病神経障害の早期診断と薬物療法、月刊 糖尿病 vol.8 no.8 pp.77-83、2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060703/06.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

姫野 龍仁 (TATSUHITO HIMENO)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：60753762

(2)研究分担者:該当なし

(3)連携研究者:該当なし

(4)研究協力者:該当なし