

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07483

研究課題名(和文)末梢虚血・再灌流刺激による新たな肝ATP産生調節機構の解明と糖尿病治療への展開

研究課題名(英文) Murine remote ischemic preconditioning suppresses diabetic ketoacidosis by enhancing glycolysis and entry into tricarboxylic acid cycle in the liver with upregulation of hepatic glucose transporter-4

研究代表者

倉林 睦 (Kurabayashi, Atsushi)

高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・准教授

研究者番号：40346713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：虚血・再灌流刺激は、副交感神経系中枢の興奮を介して、肝における糖新生の抑制とグルコーストランスポーター4の細胞膜における発現亢進を介した糖取り込み亢進により血糖低下をもたらすことで、糖尿病マウスの高血糖を減弱させるが、IRは肝において糖取り込みを促進するのみならず、この糖を利用した解糖系の亢進、さらに能動的にクエン酸回路を回転させることで、グルコースを基質としたエネルギー産生促進を促進させる。後肢虚血・再灌流刺激は1型糖尿病モデルマウスにおいて、血中ケトン体濃度を低下させるが、この機序によると思われる、糖尿病合併症であるケトアシドーシスを抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後肢虚血・再灌流刺激は血圧測定マンシエットを巻く程度の極めて侵襲性の少ない手技であり、元来、心筋の虚血に対する臓器保護性の観点より研究が進んできた分野である。我々は、その過程で糖代謝因子の発現亢進を伴う点に着目し、後肢虚血・再灌流刺激が副交感神経中枢・迷走神経を介し、肝において糖新生抑制およびインスリン非依存性の糖取り込み亢進による血糖低下をもたらす、糖を基質としたエネルギー産生を促進して血中ケトン体の低下をももたらすことを示した。このことは後肢虚血・再灌流刺激が糖尿病において、血糖低下効果をもたらすのみならず、その合併症の抑制をももたらす可能性を示唆しており意義あるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hindlimb ischemia-reperfusion (IR) activated the brainstem neurones in the central parasympathetic nervous system and decreased BS levels by downregulating hepatic gluconeogenesis and upregulating glucose uptake. The overexpression of GLUT4 on the membrane peripheries contributed to increasing glucose uptake found in IR-treated livers. This acceleration of glucose uptake via GLUT4 may induce marked glycogen storage. These results indicated that in the IR-treated diabetic liver, energy production was promoted through acceleration of the tricarboxylic acid cycle linked with increased glucose preference rather than fatty acid under feeding conditions. Indeed, serum ketone body levels were significantly suppressed by IR. It is plausible that IR may offer a beneficial therapeutic modality for controlling diabetic hyperglycemia and ketoacidosis.

研究分野：病理学

キーワード：糖代謝 肝臓 副交感神経 虚血再灌流モデル エネルギー産生 クエン酸回路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

四肢など体の末梢の結紮・解除による短時間の虚血の反復刺激(IR)は、遠隔臓器である心筋に虚血抵抗性・臓器保護性をもたらす。我々は、後肢 IR は心筋に Choline acetyltransferase (ChAT) を発現させること (Kakinuma Y(研究分担者) et al. PLoS One. 2012)、コリン作動性の亢進は HIF-1, GLUT-1, 4 を介して心筋への糖取り込みを亢進させること (Kakinuma Y et al. JAMA. 2013) を示し、IR が糖代謝へ影響を与える可能性を示唆している。一方、コンディショナル Von Hippel-Lindau ノックアウトマウス(VHL-KO)系において、VHL 欠損は肝で IGF-1R、HIF-1、GLUT1 高発現により、インスリン非依存性に糖取り込みを亢進させて高度の血糖低下をきたすことを明らかにしている(Kurabayashi A(本研究代表者) et al. PLoS One. 2013)。このメカニズムと IR における糖取り込みのメカニズムとの類似性に着目し、迷走神経遠心路の活性化は糖新生系を抑制するとの報告(Alessandro Pocai et al. Cell Metabolism. 2005) も併せ、後肢 IR は、迷走神経系の興奮を介して、肝で HIF-1、GLUT4 の高発現による糖取り込み亢進と、G6Pase・PEPCK 発現低下による糖新生抑制をもたらしてインスリン非依存性に約 20%の血糖低下をもたらし、1型、2型糖尿病モデルマウスに対しても治療への有用性を示すことを明らかにしている。(Kurabayashi A et al. Diabetes Res Clin Pract. 2018)。

2. 研究の目的

糖尿病は血中の糖を利用できないことを本態とし、糖に代わるエネルギー源としてケトン体が産生されるが、意識障害をもたらす重篤な急性合併症であるケトアシドーシスを引き起こす。後肢 IR は心筋において ChAT の発現を介して糖代謝に関与する sirtuin (Sirt) 6 の発現を亢進、解糖系でピルビン酸をアセチル CoA に変換する pyruvate dehydrogenase (PDH) を阻害する PDK-4 の発現を低下させ、ATP 産生を増加させる (Kakinuma Y et al. Int Immunopharmacol. 2015)。この結果は、心筋において IR は糖取り込みを亢進させるのみならず、能動的にクエン酸回路を回転させて ATP を産生させる可能性を示している。IR 下の心と肝の糖代謝の変化の類似性より、心筋以外の臓器においてもエネルギー産生に影響を及ぼすことが想起され、どのようにこの機序を解明し、糖尿病合併症の予防・治療に結びつけていくかを目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

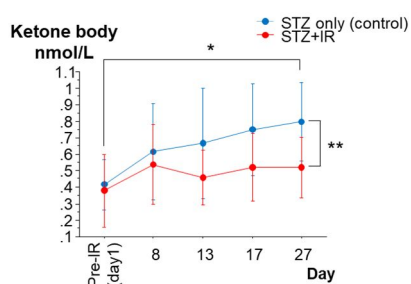
【IRの方法】C57BL/wild type マウスを使用し、イソフルラン麻酔下において後肢を3分結紮3分解除を3回繰り返す IR を1日1回連日行い、以下の検討を行った。また、1型糖尿病モデルマウスの作成に関しては、streptozotocin (STZ) (100mg/kg) を3日間連続腹腔内投与し、血糖を2日間連続測定し、血糖上昇が不十分である場合にはさらに同量を2日間投与した。

4. 研究成果

以下【結果 ~ 】は STZ 誘発 1 型糖尿病モデルマウスを用いて検討を行った。

【結果】

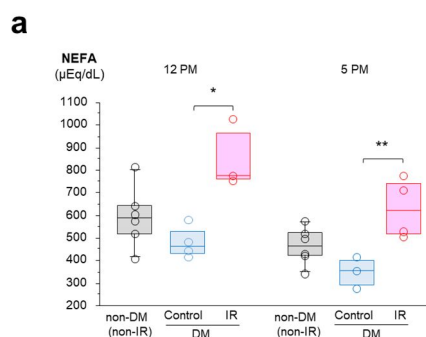
STZ 誘発糖尿病マウスにおける hindlimb IR の血中ケトン体濃度、血糖(BS)への影響



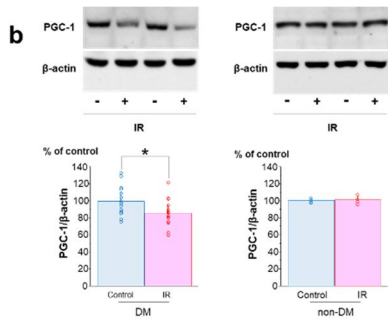
尾静脈より定期的に採血を行い、血糖の推移を観察したところ、IR は優位に血糖を低下させた ($p=0.0239$)。左図に示すとおり、血中ケトン体濃度に関して、IR 非施行群では実験期間中に有意に上昇し続けたが、($*p=0.0260$)、IR 群は優位に抑制された ($**p=0.0432$)。

【結果】

STZ 誘発糖尿病マウスにおける hindlimb IR の脂肪酸代謝への影響



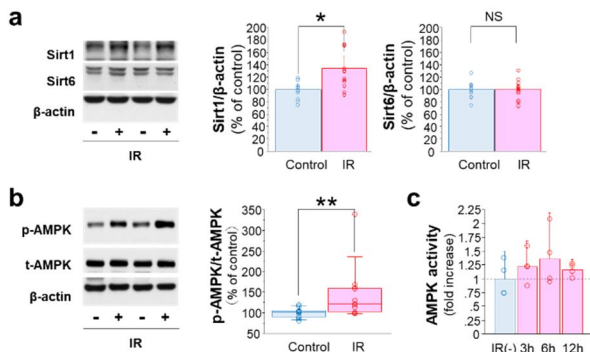
糖尿病 IR 施行群(14 日間施行)では、日中(夜行性のマウスにとってヒトの夜間に相当する)の血清遊離脂肪酸(NEFA)は、control 群(糖尿病非 IR 施行群)に比較して有意に上昇していた ($*p=0.0069$, $**p=0.221$)。また、非糖尿病マウスに比較して control 群の NEFA は低下していた。これは、IR により遊離脂肪酸の消費が抑制されるためと考えられ、IR はグルコースを基質としたエネルギー産生を亢進させるとする我々の仮説に矛盾しない結果であった。



PGC-1は脂肪酸酸化や糖新生に関与することが知られているが、肝における PGC-1 蛋白の発現は、糖尿病 IR 施行群で優位に低下していた(* p=0.0272)。非糖尿病マウスにおいては PGC-1 蛋白の発現は、IR により変化しなかった。

【結果】

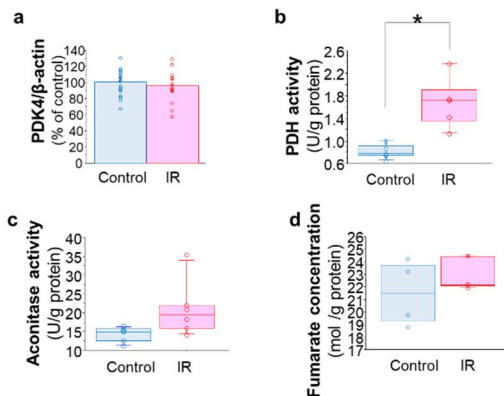
糖尿病肝の Sirt1, Sirt6 およびリン酸化 AMP-activated protein kinase (AMPK) の発現および AMPK 活性における IR の影響



(a) IR は、肝臓における Sirt1 蛋白の発現を亢進させるとともに(*p=0.0032)、(b) total AMPK(t-AMPK) に対するリン酸化 AMPK(p-AMPK)の発現比率を上昇させて AMPK を活性化させることより(**p=0.0416)、エネルギー産生を亢進する方向に作用するものと考えられた。心臓で認められた Sirt6 の発現亢進は、肝臓では指摘できなかった。(c)AMPK 酵素活性を生化学的にも測定したが、糖尿病肝では、IR 後、3 時間~12 時間のすべての時間において、IR 非施行群に比較してその活性は亢進傾向を示した。

【結果】

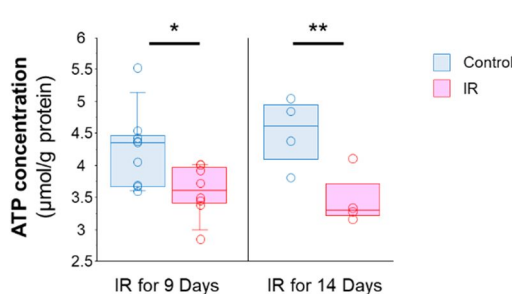
糖尿病肝での解糖系および tricarboxylic acid (TCA) cycle の活性に対する IR の影響



(a)IR 群では PDK-4(解糖系でピルビン酸からアセチル CoA に変換する PDH を抑制する)の発現は抑制傾向を示し、(b)PDH の酵素活性は有意に亢進し、(c)TCA cycle においてクエン酸からイソクエン酸に変換するアコニターゼの酵素活性も亢進傾向を示した。(d)TCA cycle の中間体であるフマル酸の含有量も、IR 群で増加傾向が窺われた。これらの結果は、解糖系から TCA cycle への移行が亢進して TCA cycle の回転が上昇していることを示唆しており、グルコースを基質としたエネルギー産生を亢進させた結果であると考えられる。

【結果】

糖尿病肝における ATP 含有量に対する IR の影響



IR 施行群では肝臓における ATP 含有量は低値であった(*p=0.0222, **p=0.0238)。脂肪酸の酸化によるエネルギー産生率はグルコースを基質としたエネルギー産生に比較して非常に高い。Control 群で ATP 含有量が高値であるということは、IR 群に比較してエネルギー産生の基質がより脂肪酸に依存しているためと考えられる。9 日間の IR 施行群に比較して、14 日間施行群で、Control 群と IR 群の ATP 含有量の差が拡大していることは、糖

尿病に伴って Control 群のエネルギー産生基質がより脂肪酸に依存していくのに対して、IR 群では脂肪酸によるエネルギー産生が抑制され続けていることを示唆していると考えられる。

【結果】

acetylcholine(ACh)刺激が肝細胞 Huh-7 における AMPK の活性化にもたらす影響

迷走神経からの刺激が肝細胞でエネルギー産生亢進をもたらすのか In vitro により検討

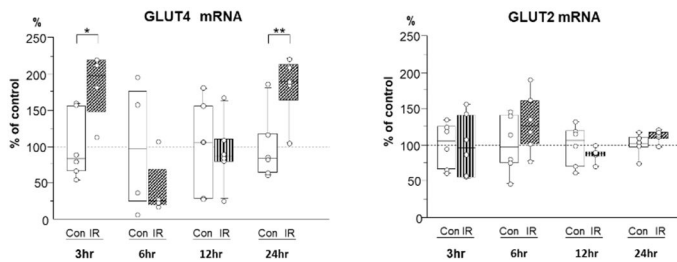
した。ACh 添加培地により培養し、培養時間 3 時間～12 時間で AMPK kinase assay により AMPK 活性を測定した。ACh 刺激により AMPK 活性は亢進され、蛋白レベルにおいてもリン酸化 AMPK の比率が増加しており、AMPK 活性化亢進が示唆された。

以下【結果 ～】は C57BL/wild type マウスを用いて検討を行った。

肝臓では GLUT2 による糖取り込み・放出よりその恒常性が制御される。一方、IR による糖取り込みは GLUT4 の発現亢進を介することが我々のこれまでの western blotting による検討で示唆されているが、さらなる検討が必要であると考えた。

【結果】

IR 後の mRNA 発現の経時的変化

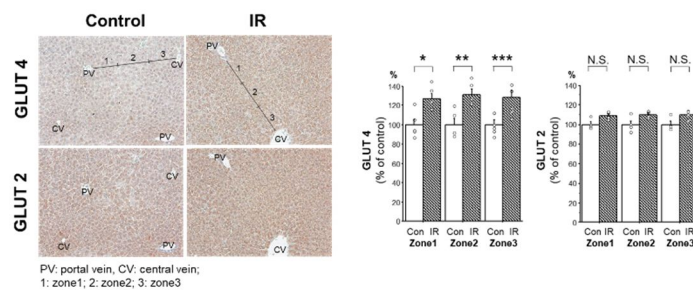


IR 後の肝組織における GLUT4 および GLUT2 の mRNA の発現の変化を qRT-PCR で検討し IR 非施行肝と比較した。

肝臓における GLUT4 の mRNA の発現は二峰性をもって有意に上昇していたが (*p=0.0042, **p=0.0058)、GLUT2 の mRNA の発現は IR に影響されなかった。

【結果】

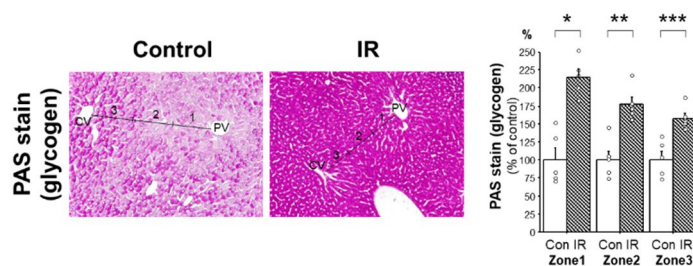
IR 後の肝小葉の各 zone (zone 1: periportal area, zone 2: intermediate area, zone 3: central area) における GLUT4 と GLUT2 の発現



IR 施行肝では有意に GLUT4 の発現の亢進を認めた (*p=0.00283, **p=0.0090, ***p=0.0163)。特に IR 施行肝では zone2 において高発現している傾向がみられた。GLUT2 の発現は、いずれの zone においても IR 施行肝と非施行肝との間に有意差は認めなかった。

【結果】

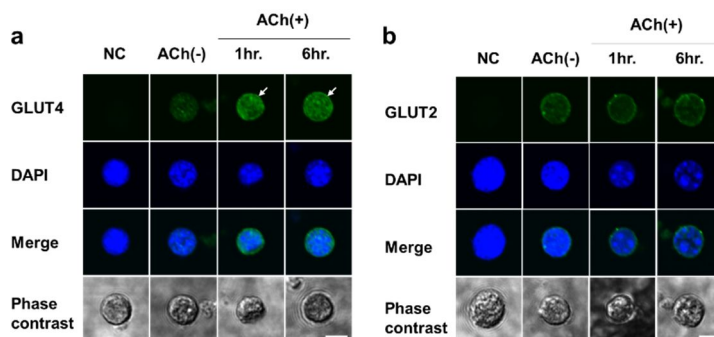
IR 後の肝小葉の zone における glycogen の貯留



IR 施行肝と非施行肝では特に zone1 で glycogen 貯留の差が高度であった (*p=0.0090, **p=0.0090, ***p=0.0090)。IR 非施行肝では、エネルギー産生の基質が glucose から glycogen に移行したのに対して、IR 施行肝では、IR による glucose 取り込み亢進により、glucose を用いたエネルギー産生が維持され、glycogen の消費が抑制された為と考えられた。

【結果】

初代培養肝細胞に ACh がもたらす GLUT4 発現の変化



C57BL6 マウス由来初代培養肝細胞に対して培地に ACh を添加し、添加後の GLUT4 発現の変化を検討した。(a) ACh の刺激により、細胞膜に線状の GLUT4 陽性像を認め(矢印)、これは GLUT4 の細胞膜への移行を示唆する。(b) 一方、GLUT2 の発現は ACh によりその発現に変化は認めなかった。Bar: 5µm

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurabayashi Atsushi, Furihata Kaoru, Iwashita Waka, Tanaka Chiharu, Fukuhara Hideo, Inoue Keiji, Furihata Mutsuo, Kakinuma Yoshihiko	4. 巻 290
2. 論文標題 Murine remote ischemic preconditioning upregulates preferentially hepatic glucose transporter-4 via its plasma membrane translocation, leading to accumulating glycogen in the liver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 120261 ~ 120261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2021.120261	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Keiji, Fukuhara Hideo, Yamamoto Shinkuro, Karashima Takashi, Kurabayashi Atsushi, Furihata Mutsuo, Hanazaki Kazuhiro, Lai Hung Wei, Ogura Shun Ichiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Current status of photodynamic technology for urothelial cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 392 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oikawa Shino, Kai Yuko, Mano Asuka, Ohata Hisayuki, Kurabayashi Atsushi, Tsuda Masayuki, Kakinuma Yoshihiko	4. 巻 71
2. 論文標題 Non-neuronal cardiac acetylcholine system playing indispensable roles in cardiac homeostasis confers resiliency to the heart	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12576-020-00787-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kurabayashi Atsushi, Iwashita Waka, Tanaka Chiharu, Naganuma Seiji, Furihata Mutsuo, Inoue Keiji, Kakinuma Yoshihiko	4. 巻 253
2. 論文標題 Murine remote ischemic preconditioning suppresses diabetic ketoacidosis by enhancing glycolysis and entry into tricarboxylic acid cycle in the liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 117748 ~ 117748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.117748	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 倉林 睦、岩下和花、降幡 薫、田中千遥、長沼誠二、降幡睦夫
2. 発表標題 2型糖尿病モデルマウスにおける後肢虚血-再灌流刺激の効果とその機序.
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉林 睦、岩下和花、田中千遥、長沼誠二、降幡睦夫
2. 発表標題 糖尿病ケトアシドーシスに対する後肢虚血-再灌流刺激の効果とその機序
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉林 睦、岩下和花、田中千遥、長沼誠二、降幡睦夫
2. 発表標題 後肢虚血 再灌流刺激は、糖尿病肝において解糖系およびクエン酸回路を活性化することにより、糖尿病ケトアシドーシスを抑制する。
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉林睦 , 岩下和花 , 田中千遥 , 長沼誠二 , 降幡睦夫 , 柿沼由彦
2. 発表標題 後肢虚血 再灌流刺激の糖尿病ケトアシドーシスに対する抑止効果とそのメカニズムの検討
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉林睦, 岩下和花, 田中千遥, 長沼誠二, 降幡睦夫
2. 発表標題 後肢虚血-再還流刺激がもたらす糖尿病ケトアシドーシスに対する抑止効果とその機序に関する検討
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurabayashi A, Kakinuma Y.
2. 発表標題 Revival of remote ischemic preconditioning modulating energy metabolic substrate preference in cardiohepatic interaction via vagus nerve.
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kurabayashi A, Iwashita W, Tanaka C, Naganuma S, Furihata M, Inoue K, Kakinuma Y.
2. 発表標題 Remote preconditioning improves glucose intolerance in hepatocytes via a brain-liver neurocircuit.
3. 学会等名 International Diabetes Federation (IDF) Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柿沼 由彦 (Kakinuma Yoshihiko) (40233944)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	井上 啓史 (Keiji Inoue) (00294827)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授 (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関