

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18012

研究課題名（和文）臓器間神経ネットワークに着目した腎臓による糖代謝制御機構及び心腎連関の解明

研究課題名（英文）regulation of glucose metabolism by the Inter and intra organ networks

研究代表者

山田 穂高（Hodaka, yamada）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70807247

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腎除神経群ではdb/dbマウスに比して経腹腔的ブドウ糖負荷(ipGTT)での耐糖能を改善した。免疫組織学的検討では、SGLT2阻害薬の投与で10週後の腎TUNEL染色陽性細胞数の減少を認め、細胞レベルではアドレナリンのSGLT2機能亢進の関与が示唆された。Ipegliminの全身投与は、GKラットの耐糖能を改善し、インスリン第1相を増強していた。単離膵細胞の検討ではミトコンドリアNAD+代謝を活性化し、TRPM2機能を活性化し、膜電位を脱分極させていることが明らかとなった。TRPM2ノックアウトマウスではIpegliminの上記効果は減弱していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病状態(db/dbマウス)におけるSGLT2阻害や機械的除神経は高血糖の腎障害を軽減する可能性が示唆された。またそのメカニズムの一旦に神経伝達物質アドレナリンによるSGLT2機能亢進の関与が考えられた。また膵細胞にNAD産生刺激をIpegliminで行うと、グルコース濃度依存性インスリン分泌が亢進し、TRPM2チャンネル活性化が関与していた。腎交感神経活性化、腎SGLT2機能制御、腎細胞アポトーシスによる腎障害、Ipeglimin NAD代謝(膵細胞)インスリン分泌経路の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The renal denervation group showed improved glucose tolerance on transperitoneal glucose tolerance (ipGTT) compared to db/db mice. Systemic administration of Ipeglimin improved glucose tolerance and augmented insulin secretion (first phase) in GK rats. In isolated pancreatic β -cells, Ipeglimin activated mitochondrial NAD⁺ metabolism, TRPM2 function, and membrane potential depolarization, but these effects were attenuated in TRPM2 knockout mice.

研究分野：糖代謝

キーワード：臓器間ネットワーク 耐糖能障害 インスリン分泌 膵細胞 糖尿病合併症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の研究で糖恒常性は容易に破綻しないように、神経によって肝臓、脂肪組織、膵細胞にネットワークが形成され密接な関連をもち維持されることが解ってきた。糖尿病における臓器間関連では腎臓が悪くなると心臓が悪化し、その逆も起こり得る「心腎連関」という概念として知られ、临床上重要な介入点となっている。実際、近位尿細管 SGLT2 阻害薬は 2 型糖尿病患者の血糖値を改善するのみならず、心不全死や糖尿病性腎症進展を抑制し、心腎保護作用が示されてきている。我われはこれまでの研究で、Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) が非選択的陽イオンチャネル transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) を活性化し、インスリン分泌を促進するという新規のインスリン分泌経路を報告していた (Diabetes 2014)。これは ATP 依存性 K チャネル (KATP) 非依存性のインスリン分泌機構で、グルコースに対する膵細胞の応答性を改善する機構と考えられる。また他の TRP ファミリーである TRPC も膵細胞に発現し、中長鎖脂肪酸受容体 G タンパク共役型受容体 (GPCR) 刺激で開口し、グルコース濃度依存性インスリン分泌を促進させていることを見出した (Sci Rep 2016)。不飽和脂肪酸のエイコサペンタエン酸 (EPA) を高脂肪高蔗糖食 (HFHS) と共にマウスに給餌したところ内臓脂肪でのケモカイン monocyte chemoattractant protein-1 の発現上昇、マクロファージの浸潤増加が判明し、マクロファージの極性変化が関与していた。脂肪細胞で熱産生関連遺伝子の mRNA 上昇を認め、交感神経系への影響が示唆された (Nutr Metab 2017)。さらにアドレナリンは膵細胞アドレナリン受容体を介して、cAMP の膵島での産生を低下させ、GLP-1 によるインスリン分泌を抑制することを見出した (Diabetes 2017)。さらにアドレナリンは単離膵細胞を高濃度グルコース環境にした際の脱分極と脱分極までの潜時延長を来すことが解った。すなわちアドレナリンによる交感神経ネットワークは生体内で糖代謝維持機構に深く関与していると考えられた。以上のこれまでの研究背景から、神経伝達による腎・膵島ネットワークを介した糖恒常性の破綻と、糖尿病の発症メカニズムの研究を行う事とした。

2. 研究の目的

これまでの申請者らの研究の知見を基盤として、神経伝達による腎・膵島ネットワークを介した糖恒常性の破綻のメカニズムを解明することとした。具体的には腎臓における糖代謝維持と腎臓交感神経の連関を、糖尿病モデル動物を用いて明らかにすること、糖尿病モデル動物への交感神経遮断が腎臓神経ネットワークを介して膵細胞インスリン分泌能・糖代謝、心臓・腎臓病態へどのような影響を与えるか検証することである。

3. 研究の方法

野生型マウスまたは糖尿病病態マウス (db/db マウス) に腎臓除神経処置、あるいは薬剤投与による薬理的除神経を行ったマウス (野生型、db/db マウス) を 8-10 週飼育し、行動解析 (体重変化・摂餌量・尿量測定)、耐糖能解析 (Oral Glucose Tolerance Test : OGTT、intraperitoneal glucose tolerance test : ipGTT、インスリン測定) を実施する。高血糖による臓器障害 (糖尿病合併症) へ与える影響の検討は心臓、及び腎臓で免疫組織学的手法 (臓器線維化 : マッソントリックローム染色、アポトーシス : TUNEL 染色評価) と尿中酸化ストレスなどで検討を行う。インスリンなどの血清因子は ELISA などの kit で測定を行い、遺伝子発現は RT-PCR で解析を行う。糖尿病自然発症モデルとして普通食 Wistar ラット (コントロール)、普通食 Goto-Kakizaki ラットを用いる。摘出膵臓を用いてインスリン・グルカゴン蛍光重染色および TUNEL 染色を行い、ランゲルハンス島の形態学的解析を行う。単離膵島実験 : GK ラット (5-8 週齢) からコラゲナーゼ法を用いて、膵島、膵細胞を単離しパッチインキュベーション法を用いて低グルコース (2.8mmol/L)、高グルコース (16.7mmol/L) 刺激でのインスリンを測定する。単離膵細胞を用いてパッチクランプ法によって細胞膜電位、電流 (Perforated whole-cell clamped current) を測定、-70mV に電位固定することで背景電流を測定する (KATP チャネルは 100 μ M トルブタミド存在下で抑制された条件下で記録)。

4. 研究成果

野生型 (C57B6 マウス) 及び糖尿病病態モデルである db/db マウスに普通食 (MF) と SGLT2 阻害薬混餌投与を行って、10 週間飼育した。薬剤の腎作用を検証するために、両側腎の除神経手術を行った。また薬理的アドレナリン受容体遮断を行う目的で、ヨヒンピンを用いた。腎除神経群では db/db マウスに比して経腹腔的ブドウ糖負荷 (ipGTT) での耐糖能を改善した。ヨヒンピンの前投与も同様に ipGTT での耐糖能を改善した。血中カテコラミン、インスリン、グルカゴン、インクレチン等は B6 マウス、db/db マウス、db/db マウス+SGLT2 阻害薬、db/db マウス (除神経) 群間で差を認めなかった。徐神経群、SGLT2 阻害薬介入群では無介入の糖尿病モデルマウスに比して腎集合管と考えられる細胞の TUNEL 陽性細胞が減少していた。蛋白尿も介入群で減少傾向にあり

った。近位尿細管の SGLT2 の発現は野生型に比して糖尿病モデルマウスで増加しており、各種アドレナリン受容体発現 (mRNA レベル) も増加していた。しかし、薬剤介入群と非介入群間での SGLT2 の発現、アドレナリン受容体の mRNA 発現には差異はなかった (糖尿病モデルマウス間で比較)。心筋組織の組織学的検討 (マッソントリクローム染) では、SGLT2 阻害薬の投与は線維化面積に有意な影響を与えなかった。糖尿病自然発症モデル動物でも検討を行うこととし、Goto-Kakizaki ラットを用いた。ブドウ糖 2g/Body weight Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) を用いて血糖値、インスリン値の測定を行った。インスリン値は負荷前との比：インスリン値を算出した。5 週齢では耐糖能障害を来さず、8 週齢では OGTT 実施後血糖は上昇した。ブドウ糖負荷後 5 分、15 分でのインスリン分泌は 8 週齢で低下しており、インスリン分泌第 1 相の低下が示唆された。Goto-Kakizaki ラットよりランゲルハンス島を分離し、パッチインキュベーション法でインスリン・cAMP 分泌を評価した。5 週齢では高グルコース刺激 (16G) に対するインスリン分泌は保持されていたが、8 週齢で 10 分刺激 (インスリン分泌第 1 相)、60 分刺激 (インスリン分泌第 2 相) 共に低下していた。パッチクランプ法で膵細胞膜電位、電流 (Perforated whole-cell clamped current) を測定した。グルコース刺激に対する TRPM2 の電流密度は 5 週齢では高グルコース刺激 (16G) で増加したが、8 週齢ではこの反応が有意に低下していた。一方で Exendin4 による GLP-1 刺激を行ったところ、5 週齢、8 週齢において TRPM2 の電流密度の増加が確認された。単離ランゲルハンス島を用いて cAMP を評価すると、Wistar ラットでは低グルコース (2.8G) に比して高グルコース下 (16G) で cAMP が増加し、Goto-Kakizaki ラット 5 週齢でも増加したが、8 週齢で低下していた。

db/db マウスに普通食 (MF) と SGLT2 阻害薬混餌投与同様、DPP-4 阻害薬を投与し、10 週間飼育した。DPP-4 阻害薬は db/db マウスの 10 週後の耐糖能 (2g/body OGTT) をほとんど改善しなかったが、SGLT2 阻害薬は改善し、これは DPP-4 阻害薬の作用機序 (内因性インスリン分泌残存を必要とする) によると考えられた。除神経による短期的な耐糖能改善はみられたが、長期的には腎合併症に有意な影響は与えず、より長期飼育が必要と考えられた。糖尿病自然発症モデル動物として Goto-Kakizaki ラットを用いた実験を継続した。グルコース刺激に対する TRPM2 の電流密度が糖尿病発症で低下していたため、TRPM2 のオープナーとして imeglimin を投与した。Imeglimin が膵細胞の NAD⁺ 産生増強を介してグルコース濃度依存性インスリン分泌を促進していた。TRPM2 ノックアウトマウスで、TRPM2 阻害薬は imeglimin のグルコース濃度依存性インスリン分泌が抑制された。野生型ラットより採取した単離膵細胞において imeglimin は非選択的カチオンチャンネル電流を増加させ、TRPM2 ノックアウトマウスで imeglimin はその増加は見られなかった。腎交感神経活性化 腎 SGLT2 機能制御、腎細胞アポトーシスによる腎障害、imeglimin NAD 代謝 (膵細胞) インスリン分泌経路の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shunsuke Funazaki, Masashi Yoshida, Hodaka Yamada, Masafumi Kakei, Masanobu Kawakami, Shuichi Nagashima, Kazuo Hara, Katsuya Dezaki	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel mechanism of imeglimin-mediated insulin secretion via the cADPR-TRP channel pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 34-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13669.	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 Shunsuke Funazaki, Hodaka Yamada, Kazuo Hara	4. 巻 21
2. 論文標題 Pseudo Intestinal Obstruction Caused by Malignant Paraganglioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inter Med 2021 Nov 1;60(21):3507-3508.	6. 最初と最後の頁 3507-3508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.6801-20.	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 Rie Hagiwara, Daisuke Suzuki, Shiori Tonezawa, Rika Saikawa, Shunsuke Funazaki, Masashi Yoshida, Satoshi Washino, Tomoaki Miyagawa, Kazuo Hara, Hodaka Yamada	4. 巻 9
2. 論文標題 Spontaneous recovery of immune checkpoint inhibitor-induced thyroiditis with high free T4 level: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Case Rep	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ccr3.4781.	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 Satoshi Washino, Hideki Takeshita, Masaharu Inoue, Makoto Kagawa, Takahiko Soma, Hodaka Yamada, Yukio Kageyama, Tomoaki Miyagawa, Satoru Kawakami	4. 巻 10
2. 論文標題 Real-World Incidence of Immune-Related Adverse Events Associated with Nivolumab Plus Ipilimumab in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma: A Retrospective Observational Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm10204767.	査読の有無 無
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 Daisuke Suzuki, Hodaka Yamada, Masashi Yoshida, Shunsuke Funazaki, Misato Amamoto, Jun Morimoto, Kazuo Hara	4. 巻 5
2. 論文標題 Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors improved time-in-range without increasing hypoglycemia in Japanese patients with type 1 diabetes: A retrospective, single-center, pilot study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig	6. 最初と最後の頁 1230-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13240.	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 Jumpei Taniguchi, Hitoshi Sugawara, Hodaka Yamada, Katsuyuki Yoshida, Ibuki Kurihara, Masashi Yoshida, Akira Ishii, Takahiko Fukuchi, Wilfred Y Fujimoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Adrenal crisis precipitated by influenza A led to the diagnosis of Sheehan's syndrome 18 years after postpartum hemorrhage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Case Rep	6. 最初と最後の頁 3082-3087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.3355.	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 Yuko Matsumoto, Hodaka Yamada, Masashi Yoshida, Daisuke Suzuki, Rika Saikawa, Misato Amamoto, Shunsuke Funazaki, Isao Horiuchi, Kenjiro Takagi, Kazuo Hara	4. 巻 11
2. 論文標題 Background Factors Determining the Introduction and Dosage of Insulin in Women With Gestational Diabetes Mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med Res	6. 最初と最後の頁 447-451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14740/jocmr3824	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 Toyoda F, Kobayashi M, Takagi R, Tanaka Y, Shimmura M, Kinoshita N, Takano H, Yamada H, Kawakami M and Kakehashi A	4. 巻 5
2. 論文標題 Tofogliflozin, a SGLT2 inhibitor, improves diabetic ocular complications in Spontaneously Diabetic Torii rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Updates	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/DU.1000126	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 船崎俊介、吉田昌史、山田穂高、犀川理加、鈴木大輔、松本裕子、天本美里、原一雄
2. 発表標題 膵 細胞内グルコース/cAMP/TRPM2クロストークの異常と2型糖尿病発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾 明日翔、山田 穂高、鈴木 大輔、犀川 理加、小西 鼓、牧 尚孝、浅野 岳晴、吉田 昌史、永島 秀一、原 一雄
2. 発表標題 Nivolumab及びIpilimumab投与後に複数のirAEを合併した一例
3. 学会等名 第118回日本内科学会総会日本内科学会ことはじめ2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 穂高、吉田 昌史、伊藤 聖学、出崎 克也、川上 正舒、石川 三衛、加計 正文、原 一雄
2. 発表標題 膵 細胞GPR40刺激のK-ATPチャネル非依存的インスリン分泌メカニズム
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 山田穂高、船崎俊介、吉田昌史、伊藤聖学、出崎克也、川上正舒、石川三衛、加計正文、原一雄
2. 発表標題 膵 細胞GPR40 シグナルはTRPチャネル活性化を介してKATP非依存性にインスリン分泌を増強する
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田穂高, 鈴木大輔, 犀川理加, 船崎俊介, 天本美里, 松本裕子, 吉田 昌史, 豊島 秀男, 加計 正文, 川上 正舒, 石川 三衛, 原 一雄
2. 発表標題 エイコサペンタエン酸の脂肪細胞GPR120を介する抗炎症メカニズム
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計7件

1. 著者名 山田穂高、平野勉	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 脂質異常症・早わかり診療ガイドライン100 Medicina(増刊号)	

1. 著者名 鈴木大輔、山田穂高	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 2
3. 書名 糖代謝異常 グルコース(血糖) . 内科(増大号) 2020	

1. 著者名 松本裕子、山田穂高	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 2
3. 書名 糖代謝異常 ヘモグロビンA1c(HbA1c) . 内科(増大号) 2020	

1. 著者名 山田穂高	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 1
3. 書名 糖代謝異常 グリコアルブミン, 1,5-アンヒドロ-D-グルシトール(1,5-AG) 内科(増大号)	

1. 著者名 山田穂高	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 1
3. 書名 糖代謝異常 インスリン(IRI). 内科(増大号) 2020	

1. 著者名 山田穂高	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 1
3. 書名 糖代謝異常 OGTT, I.I, HOMA. 内科(増大号)	

1. 著者名 山田穂高, 平野勉	4. 発行年 2020年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 4
3. 書名 コレステロール代謝と役割 脂質異常症 第2版	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------