

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06718

研究課題名（和文）糖尿病性神経障害とミトコンドリア機能異常：ミトコンドリア機能改善薬の効果

研究課題名（英文）Mitochondrial dysfunction and diabetic Neuropathy: the efficacy of mitochondrial function-improving agents.

研究代表者

加藤 宏一 (Kato, Koichi)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：40319322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、高血糖および低血糖が神経系細胞のミトコンドリア機能異常を介して糖尿病性神経障害を引き起こすメカニズムを解明し、イメグリミンを含むミトコンドリア機能改善薬の糖尿病性神経障害への効果を明らかにすることを目的とした。シュワン細胞において高グルコースおよび低グルコースがミトコンドリア機能異常を惹起するが、イメグリミンはこれらの異常を改善した。さらにSTZ糖尿病ラットにおける検討では、イメグリミン投与により糖尿病ラットにおける感覚神経伝導速度低下と坐骨神経内血流量減少が有意に改善した。これらの結果から、イメグリミンは糖尿病性神経障害に対して有効な治療薬となる可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性神経障害は、合併頻度が高く患者のQOLや生命予後に影響するが、有効な治療法は確立されておらず、治療法の確立が急務と考えられている。本研究では、シュワン細胞における高血糖および低血糖によるミトコンドリア機能異常をイメグリミンが改善することが明らかになった。さらに糖尿病ラットへのイメグリミン投与によって糖尿病性神経障害の改善が認められた。これらの結果から、イメグリミンが糖尿病性神経障害に有効な治療薬となる可能性が考えられる。イメグリミンの糖尿病性神経障害治療薬として有効性が確立すれば、神経障害の発症・進行予防、患者QOL向上、さらに生命予後改善に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to elucidate the mechanism by which hyperglycemia and hypoglycemia induce diabetic neuropathy through mitochondrial dysfunction in neuronal cells and to clarify the efficacy of mitochondrial function-improving agents, including imeglimin, on diabetic neuropathy. In in vitro experiments using Schwann cells, it was confirmed that high glucose and low glucose induced mitochondrial dysfunction, and that imeglimin improved these abnormalities. Additionally, in in vivo experiments using STZ-diabetic rats, administration of imeglimin to diabetic rats significantly improved the decreases in sensory nerve conduction velocity and sciatic nerve blood flow. These findings suggest that imeglimin could be an effective therapeutic agent for the treatment of diabetic neuropathy.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病性神経障害 高血糖 酸化ストレス ミトコンドリア イメグリミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性神経障害は糖尿病合併症の中でも合併頻度が高く、患者の QOL や生命予後にも影響するが、有効な治療法は確立されておらず、病態解明と治療法の確立が急務と考えられている。

糖尿病性神経障害に対して影響する因子として、高血糖だけでなく SU 薬やインスリン製剤などの糖尿病治療薬による低血糖や血糖変動も糖尿病性神経障害に影響を与えると想定されている。血糖コントロールの改善により合併症の発症・進展を阻止できる一方、血糖値の完全な正常化は困難であり、IGT(境界型糖尿病)でも神経障害の発症が報告されている。ACCORD 試験では、低血糖が心血管疾患を含む多くの合併症を引き起こし、死亡率を増加させる可能性が示唆され、血糖変動による酸化ストレス亢進や低血糖による炎症性サイトカインの亢進も報告されており、食後血糖スパイクなどの短時間の高血糖、低血糖、血糖変動が糖尿病合併症に關与する可能性が示唆されている。

糖尿病性神経障害の成因は多岐にわたり、ポリオール代謝亢進、酸化ストレス、protein kinase C (PKC) 活性異常、非酵素的糖化反応などが關与していると考えられる。これらの成因の中で酸化ストレスは他の成因と關連して亢進するため、中心的な役割を担っているとされる。この酸化ストレス亢進の機序として、高血糖状態におけるミトコンドリアでの Reactive Oxygen Species (ROS) 産生の増加が想定されている。ミトコンドリアは電子伝達系によって ATP を産生するが、電子伝達の際にスーパーオキシドが発生する。発生したスーパーオキシドは、SOD などの抗酸化酵素により消去されるが、糖尿病状態では高血糖により TCA からの NADH と FADH₂ 供給が増加し、ROS 産生が亢進する。また、抗酸化能の低下によりミトコンドリアの酸化ストレスが増加し、ATP 産生が減少すると考えられる。糖尿病性神経障害におけるミトコンドリア由来の酸化ストレスに関しては、詳細な検討が行われておらず、神経障害の病態解明と治療法開発には高血糖、低血糖や血糖変動とミトコンドリア酸化ストレスの関係を解明することが重要と考えられる。

糖尿病状態ではミトコンドリアでの酸化ストレス亢進によりミトコンドリア機能障害をきたすことが報告されている。一方、シュワン細胞のミトコンドリア遺伝子欠損マウスでは顕著な神経障害を発症することが報告されており、神経障害におけるミトコンドリア機能の重要性が明らかにされている。そこでミトコンドリア機能を改善する治療が糖尿病性神経障害に対して有効な治療法となりうる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経における高血糖および低血糖によるミトコンドリア機能異常の糖尿病性神経障害の病態に対する關与を解明し、イメグリミンを含むミトコンドリア機能改善薬の糖尿病性神経障害への効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) グルコース濃度変動の培養条件

細胞は、神経系細胞であるマウス不死化シュワン細胞 (IMS) 32 細胞を用いた。培養培地のグルコース濃度は、低グルコース(2.5mM)、高グルコース(25mM)、正常グルコース(5.5mM)に調製した。

(2) 酸化ストレスおよび細胞死の評価

各グルコース条件による酸化ストレス、細胞生存率への影響を評価した。酸化ストレスは ce1IROX を用いた蛍光染色法、細胞生存率は MTT 法により測定した。

(3) cytochrome c のミトコンドリアからの放出について評価

各グルコース条件によるミトコンドリアからの cytochrome c の放出は免疫蛍光染色法およびウエスタンブロット法により評価した。

(4) ミトコンドリア機能評価

ミトコンドリア由来の ROS の評価は、MitoSOX を用い蛍光染色法で行った。測定は、プレートリーダー、In cell analyzer、共焦点顕微鏡画像による解析を行った。ミトコンドリアの膜電位は、JC-10 を用いて評価した。ミトコンドリアの呼吸能は、ミトコンドリア酸素消費速度測定キットを用いて評価した。ミトコンドリア complex I 活性を測定キットで評価した。また、CellTiter-Glo を用いて ATP 産生能を評価した。

(5) ミトコンドリア機能改善薬の酸化ストレス、細胞死、ミトコンドリア機能異常に対する効果

ミトコンドリア機能改善機能を有するイメグリミンの各種異常に対する効果を評価した。

(6) シュワン細胞におけるミトコンドリア機能改善薬の NAD⁺ 合成系に対する効果

各グルコース濃度条件において、解糖系やミトコンドリアの ATP 産生において重要な補酵素である NAD⁺、加えて NAD⁺ の生合成経路である salvage 経路の律速酵素である NAMPT 活性は測定キットを用いて評価し、これらに対するイメグリミンの効果についても検討した。

(7) 1型糖尿病ラット神経障害におけるミトコンドリア機能改善薬の効果

ラットに対する STZ 投与後 4 週から 200 mg/kg 1 日 2 回朝夕のイメグリミン経口投与を 4 週間行い、体重・血糖を測定した。坐骨神経伝導速度(MNCV)、腓腹神経伝導速度(SNCV)を NeuropackS-1(Nihon-Koden)を用いて測定した。坐骨神経内血流量(SNBF)は、レーザー・ドップラー血流計(Omega Flow FLO-N1)を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) IMS32 細胞における酸化ストレスおよび細胞生存率に対するグルコース濃度およびイメグリミンの影響

IMS32 細胞において、高グルコースおよび低グルコースにより細胞内の酸化ストレスが増加し、細胞生存率が低下することが明らかになった。イメグリミンは高グルコースおよび低グルコースによって増加した酸化ストレスおよび細胞死を減少した。

(2) IMS32 細胞におけるミトコンドリアからの cytochrome c の放出に対するグルコース濃度およびイメグリミンの影響

IMS32 細胞において、高グルコースおよび低グルコースにより細胞質での cytochrome c の蛍光強度が増強し、cytochrome c の細胞質への漏出を惹起した。また、高グルコースおよび低グルコースによりミトコンドリア内の cytochrome c タンパク発現量が減少し、細胞質内の発現量が増加した。これより、高グルコースおよび低グルコースによりミトコンドリアからの cytochrome c の放出が増加することが明らかになった。イメグリミンは、このミトコンドリアからの cytochrome c の放出を抑制した。

(3) IMS32 細胞におけるミトコンドリア機能に対するグルコース濃度およびイメグリミンの影響

IMS32 細胞において、高グルコースおよび低グルコースによりミトコンドリア酸化ストレスの増加、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア酸素消費率の上昇、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 活性の増加、ATP 量の低下が認められた。イメグリミンは高グルコースおよび低グルコースによるミトコンドリア膜電位の低下を改善し、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 活性の増加を抑制し、ミトコンドリア酸化ストレスの亢進やミトコンドリア呼吸の増加を抑制し、ATP 量の低下を増加し、ミトコンドリア機能異常を改善した。

(4) IMS32 細胞における NAD⁺合成系に対するイメグリミンの効果

正常グルコースおよび高グルコース条件において、イメグリミンにより NAMPT 活性が亢進、NAD⁺量が有意に増加した。イメグリミンはシュワン細胞において、NAMPT 活性を亢進させ NAD⁺産生量を亢進することが明らかになった。

(5) 1型糖尿病ラット神経障害におけるイメグリミンの効果

体重および血糖値に対するイメグリミンの効果

STZ 糖尿病ラットを用いた検討において、イメグリミンの投与は体重、血糖値に有意な影響を与えなかった。

坐骨神経伝導速度(MNCV)および腓腹神経伝導速度(SNCV)に対するイメグリミンの効果

コントロール群に比して糖尿病群では MNCV は低下傾向を示し、イメグリミン投与により糖尿病群の MNCV は改善傾向を示した。コントロール群に比して糖尿病群では SNCV の有意な低下を認めしたが、糖尿病群における SNCV の低下はイメグリミン投与により有意に改善した。

坐骨神経内血流量(SNBF)に対するイメグリミンの効果

SNBF はコントロール群に比し糖尿病群で有意に減少したが、糖尿病群における SNBF の減少はイメグリミン投与により有意に改善した。

シュワン細胞における *in vitro*での検討では、高グルコースおよび低グルコースにより、細胞生存率の低下、ミトコンドリアからの cytochrome c 放出の増加、ミトコンドリア酸化ストレスの亢進、細胞全体の酸化ストレスの亢進、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア酸素消費率の上昇、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 活性の増加、ATP 量の低下を含む様々なミトコンドリア機能の障害が認められたが、イメグリミンは細胞生存率低下とこれらのミトコンドリア機能異常を改善した。さらに *in vivo*での検討ではイメグリミン経口投与により STZ 糖尿病ラットにおける SNCV 低下および SNBF 減少を改善した。これらの結果からイメグリミンは糖尿病性神経障害に対して有効である可能性が考えられる。

ミトコンドリア機能異常の糖尿病性神経障害への関与の解明は、糖尿病性神経障害の病態を解明しミトコンドリア機能異常の成因としての重要性を明らかにするものであり、増え続ける糖尿病患者と神経障害を含む糖尿病合併症治療において重要な意味を持つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakai-Shimoda H, Himeno T, Okawa T, Miura-Yura E, Sasajima S, Kato M, Yamada Y, Morishita Y, Tsunekawa S, Kato Y, Seino Y, Inoue R, Kondo M, Seino S, Naruse K, Kato K, Mizukami H, Nakamura J, Kamiya H	4. 巻 25(1):103609
2. 論文標題 Kir6.2-deficient mice develop somatosensory dysfunction and axonal loss in the peripheral nerves	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103609	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 Yako H, Niimi N, Kato A, Takaku S, Tatsumi Y, Nishito Y, Kato K, Sango K. 2. 論文表題： Role of pyruvate in maintaining cell viability and energy production under high-glucose conditions	4. 巻 11:18910
2. 論文標題 Role of pyruvate in maintaining cell viability and energy production under high-glucose conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98082-w	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 Tatsumi Y, Kato A, Niimi N, Yako H, Himeno T, Kondo M, Tsunekawa S, Kato Y, Kamiya H, Nakamura J, Higai K, Sango K, Kato K.	4. 巻 23(8)
2. 論文標題 Docosahexaenoic Acid Suppresses Oxidative Stress-Induced Autophagy and Cell Death via the AMPK-Dependent Signaling Pathway in Immortalized Fischer Rat Schwann Cells 1.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 4405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23084405	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 Nakai-Shimoda H, Himeno T, Motegi M, Ozeki N, Inoue R, Hayami T, Miura-Yura E, Yamada Y, Morishita Y, Tsunekawa S, Kato Y, Seino Y, Kondo M, Naruse K, Kato K, Mizukami H, Nakamura J, Kamiya H.	4. 巻 3(3)
2. 論文標題 Protocol to image and analyze the morphology of mouse peripheral nerves using transmission electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protoc.	6. 最初と最後の頁 101591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101591	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 Nihei W, Kato A, Himeno T, Kondo M, Nakamura J, Kamiya H, Sango K, Kato K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Hyperglycaemia Aggravates Oxidised Low-Density Lipoprotein-Induced Schwann Cell Death via Hyperactivation of Toll-like Receptor 4.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neurol Int.	6. 最初と最後の頁 370-379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/neurolint16020027	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14件(うち招待講演 5件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 加藤文子、巽康彰、八子英司、三五一憲、姫野龍仁、近藤正樹、加藤義郎、神谷英紀、中村二郎、加藤宏一
2. 発表標題 イメグリミンはシュワン細胞において高・低グルコースによるミトコンドリア機能障害を改善し細胞死を抑制する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuaki Tatsumi, Ayako Kato, Naoko Niimi, Hideji Yako, Tatsuhito Himeno, Masaki Kondo, Shin Tsunekawa, Yoshiro Kato, Hideki Kamiya, Jiro Nakamura, Kazunori Sango, Koichi Kato
2. 発表標題 Docosahexaenoic Acid Suppresses Oxidative Stress-Induced Autophagy and Cell Death through the AMPKDependent Signaling Pathway in Immortalized Adult Rat Schwann (IFRS1) Cells.
3. 学会等名 The American Diabetes Association's 81st Scientific Sessions (ADA) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 巽 康彰、加藤 文子、新見 直子、八子 英司、姫野 龍仁、近藤 正樹、加藤 義郎、神谷 英紀、中村 二郎、三五一憲、加藤 宏一
2. 発表標題 DHAはラット不死化シュワン細胞においてAMPK依存性シグナル経路を介して酸化ストレス誘導オートファジーと細胞死を抑制する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤文子、巽康彰、二瓶渉、八子英司、三五一憲、姫野龍仁、近藤正樹、加藤義郎、神谷英紀、中村二郎、加藤宏一
2. 発表標題 糖尿病性神経障害における高グルコース・低グルコースの神経ミトコンドリア機能に対する影響 ミトコンドリア機能改善薬の効果
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤宏一
2. 発表標題 糖尿病性神経障害の治療の進歩
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Kato, Hideji Yako, Yasuaki Tatsumi, Wataru Nihei, Tatsuhito Himeno, Masaki Kondo, Yoshiro Kato, Hideki Kamiya, Jiro Nakamura, Kazunori Sango, Koichi Kato.
2. 発表標題 Effects of imeglimin, a new oral hyperglycemic agent, on high glucose and low glucose-induced cell death and mitochondrial dysfunction in Schwann cells
3. 学会等名 The American Diabetes Association's 82nd Scientific Sessions (ADA) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayako Kato, Koichi Kato
2. 発表標題 Pathogenesis of diabetic neuropathy induced by blood glucose fluctuation and hypoglycemia: oxidative stress and mitochondrial dysfunction
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤文子、加藤宏一
2. 発表標題 糖尿病性神経障害の発症メカニズム-シュワン細胞における高血糖および低血糖の酸化ストレスとアポトーシスへの影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤文子、八子英司、巽康彰、二瓶涉、姫野龍仁、近藤正樹、加藤義郎、神谷英紀、中村二郎、加藤宏一
2. 発表標題 シュワン細胞における高・低グルコースによる酸化ストレス亢進に対するミトコンドリア機能改善薬の効果
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koichi Kato, Ayako Kato, Wataru Nihei, Hideji Yako, Tatsuhito Himeno, Masaki Kondo, Yoshiro Kato, Kazunori Sango, Jiro Nakamura, Hideki Kamiya.
2. 発表標題 IMEGLIMIN, A NEW ORAL HYPOGLYCEMIC AGENT, IMPROVES HYPERGLYCEMIA AND HYPOGLYCEMIA-INDUCED CELL DEATH AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN SCHWANN CELLS.
3. 学会等名 33rd annual meeting of the diabetic neuropathy study group, Neurodiab 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤宏一
2. 発表標題 糖尿病合併症の病態生理 「糖尿病性神経障害の病態生理と治療薬の開発」
3. 学会等名 第32回日本病態生理学会大会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wataru Nihei, Ayako Kato, Tatsuhiro Himeno, Masaki Kondo, Jiro Nakamura, Hideki Kamiya, Kazunori Sango, Koichi Kato.
2. 発表標題 Synergistic Effects of Hyperglycemia and Dyslipidemia on Diabetic Neuropathy-High Glucose Aggravates Oxidized LDL-Induced Schwann Cell Death via Hyperactivation of TLR4
3. 学会等名 American Diabetes Association 83rd scientific sessions. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤宏一
2. 発表標題 糖尿病性神経障害を再考する～課題と進歩～ 「糖尿病性神経障害研究のトピックスと治療への展開」
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤文子、二瓶涉、八子英司、巽康彰、姫野龍仁、近藤正樹、加藤義郎、中村二郎、神谷英紀、三五一憲、加藤宏一
2. 発表標題 イメグリミンはシュワン細胞において高血糖・低血糖によるミトコンドリア機能障害を改善しNAD+産生およびNAMPT活性を亢進する
3. 学会等名 第66回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>愛知学院大学 薬学部 医療薬学科 薬物治療学講座ホームページ http://www.phar.agu.ac.jp/lab/medicine/index.html</p>
--

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	加藤 文子 (Kato Ayako) (60513934)	愛知学院大学・薬学部・講師 (33902)	
研究分担者	巽 康彰 (Tatsumi Yasuaki) (40335055)	東邦大学・薬学部・准教授 (32661)	
研究分担者	加藤 義郎 (Kato Yoshiro) (40513429)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	近藤 正樹 (Kondo Masaki) (00717910)	愛知医科大学・医学部・講師 (33920)	
研究分担者	姫野 龍仁 (Himeno Tatsuhito) (60753762)	愛知医科大学・医学部・准教授 (33920)	
研究分担者	神谷 英紀 (Kamiya Hideki) (70542679)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	中村 二郎 (Nakamura Jiro) (40283444)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	

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