

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750141

研究課題名(和文)末梢交感神経電気刺激による革新的な糖及び脂質代謝制御法に関する基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental study on artificial control of glucose and lipid metabolism with microstimulation of peripheral sympathetic nerve fascicle

研究代表者

佐藤 大介 (Sato, Daisuke)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60536960

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)：運動や投薬によらない糖及び脂質代謝制御法の確立を目指し、末梢交感神経系への電気刺激が糖及び脂質代謝に及ぼす影響について基礎的な検討を行った。ラット片側坐骨神経内交感神経束へ電気刺激を行った結果、血漿インスリン濃度が変化することなく全身性の糖取り込みを亢進する可能性が示唆された。また、この電気刺激を1時間行うことでラット精巣上体周囲脂肪でのCox4遺伝子の発現が増加したことから、電気刺激が少なくとも同脂肪組織でのミトコンドリアを増加させる可能性が示唆された。結論として、末梢交感神経電気刺激はインスリン非依存的に糖取り込みを亢進するとともに、脂肪組織での脂肪燃焼を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To develop the novel method for artificial control of glucose and lipid metabolism without exercise and drug, we investigated the effects of microstimulation of peripheral sympathetic nervous system on glucose and lipid metabolism. As a result of the microstimulation of sympathetic nerve fascicle in the unilateral sciatic nerve in rats, the stimulation enhanced systemic glucose uptake without change in plasma insulin level. In addition, the stimulation for 1 h elevated gene expression of Cox4 in epididymal adipose tissue in rats, suggesting increase in mitochondria. In conclusion, the microstimulation of peripheral sympathetic nerve fascicle enhanced non-insulin-mediated glucose uptake systemically and fat oxidation in adipose tissue.

研究分野：生物学

キーワード：末梢交感神経 糖取り込み 脂肪酸組成

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病は深刻な社会問題となつて久しく、製薬業界も治療薬を次々と市場に送り込んでいるにもかかわらず、特に糖尿病は血糖コントロールの困難さに起因する合併症の多様さゆえに、未だに治療満足度の低い、アンメットメディカルニーズの代表格の一つである。

糖尿病や高脂血症において、投薬と運動はともに重要な治療戦略に位置づけられているが、例えば高齢者や高血圧を併発している患者にとって、長時間の運動負荷は困難である。また、薬物療法では低血糖リスクをはじめとする種々の副作用も依然として存在する。

生体の糖取り込みは、インスリン依存と非依存の二つの経路に大別されるが、本研究課題を含む一連の研究では、中枢の交感神経活動が末梢の糖取り込みを、インスリン非依存的に亢進する系が存在すること (Sudo et al. *Am J Physiol* 1991;261:E268-E303) ならびに脂肪組織の脂肪分解や熱産生等の機能発現には交感神経活動が深く関わっていること (Fliers et al. *J Neuroendocrinol* 2003;15:1005-1010; Lockie et al. *Diabetes* 2012;61:2753-2762) に着想を得て、インスリン分泌不全、あるいは機能不全に陥った糖尿病患者や、運動が困難な脂質代謝異常患者に対して、末梢交感神経活動を亢進させることで、低侵襲かつ画期的な糖・脂質代謝コントロール方法を見出すことを目指している。

申請者らはこれまでに、微小電極を介して、ラット片側後肢坐骨神経中を走行する交感神経束を電気刺激することで、インスリンの機能とは独立に一過性の血糖値低下が誘発されることを明らかにし、インスリン非依存の糖取り込み亢進を示唆した (Sato et al. *J Artif Organs* 2013;16:352-358)。さらに、この microstimulation が、交感神経系を選択的かつ全身性に賦活している可能性も示した (Sato et al. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2013:6329-6332)。

他方で、申請者らは、インスリン抵抗性の亢進や改善によって脂肪組織中の脂肪酸組成が変化することも明らかにし、特に脂肪組織のインスリン感受性調節における機能発現に脂肪酸組成が深く関わっている可能性についても報告してきた (Sato et al. *Metabolism* 2012;61:92-98; Sato et al. *Eur J Pharmacol* 2016;773:71-77)。したがって、電気刺激による末梢交感神経活動亢進は、交感神経の支配を受ける脂肪組織の脂肪酸組成にも影響を及ぼす可能性が極めて高く、このことは脂肪組織の脂質代謝も人工的に制御しうることを意味している。

しかしながら、末梢交感神経束への電気刺激による血糖低下メカニズムの詳細はいまだ明らかになっておらず、交感神経電気刺激が脂肪組織の機能発現に及ぼす影響につい

ても、ほとんど調べられていない。

2. 研究の目的

ラット末梢交感神経束を電気刺激したときの、血糖コントロールに関連する血中ホルモン濃度、インスリン感受性及びインスリンシグナル伝達、ならびに糖輸送に関わる遺伝子発現量の変化について検討した。

さらに、交感神経電気刺激が脂肪組織の機能発現、特に熱産生に関連する遺伝子発現量ならびに脂肪酸組成に及ぼす影響についても基礎的な検討を行った。

3. 研究の方法

本研究の動物の取り扱い及び実験方法については、研究開始前に山形大学動物実験委員会の承認を得ている。

(1) 末梢交感神経電気刺激が糖代謝系に及ぼす影響の解析

(1-1) 血中ホルモン濃度に及ぼす影響

生後約 11 週齢の Wistar 系雄ラットを用い、一晚の絶食の後に麻酔下仰臥位にて右頸静脈及び左総頸動脈にそれぞれカテーテルを挿入し、静脈ラインを持続麻酔用、動脈ラインを血圧測定及び採血用として確保した。その後片側坐骨神経を露出させ、微小電極を用いたマイクロニューログラム法を適用することで末梢交感神経活動を導出した。

血糖値の安定を確認することで手術侵襲からの回復とし、約 0.2 mL の採血後、交感神経活動導出に用いた微小電極を介して電気刺激を行った。刺激条件は、幅 0.25 ms のパルスを 25 ms 間隔で 10 個並べたバーストを 1 秒間に 2 回印加することとし、刺激強度は、電気刺激による後肢の微小な筋収縮が目視で確認できる強度の最小値から 0.1 V 低い強度とした。この電気刺激の開始直前及び開始後 60 分に採血を行い、血糖値及び血漿インスリン、アディポネクチン及び遊離脂肪酸濃度を測定するとともに、血糖及び血漿インスリン濃度の測定値から、インスリン感受性及びインスリン分泌能の簡易的な指標である HOMA-IR 及び HOMA- β をそれぞれ算出した。

(1-2) 骨格筋での糖輸送に関連する遺伝子の発現量に及ぼす影響

片側後肢末梢交感神経電気刺激を上記に示す条件で 1 時間行ったラット群ならびに非刺激群を設定した。

両側のひらめ筋及び長趾指筋を両群からそれぞれ採取し、TRIzol 試薬の取扱説明書に従ってこれらの組織から RNA を抽出した。

市販の逆転写酵素を用いることで、抽出した mRNA に相補的な DNA (cDNA) を合成し、この cDNA を鋳型として、SYBR Green I を用いたインターカーレータ法によるリアルタイム

Δ PCR で任意の塩基配列を増幅し、非刺激群の mRNA 発現量を基準とした Ct 法によって、電気刺激群における骨格筋の糖輸送に関与する遺伝子の相対発現量を測定した。

増幅の対象とした遺伝子は、グルコース輸送体である Glut1 及び Glut4、インスリン受容体から Glut4 までのシグナル伝達を担うとされる IRS-1 及び Akt ならびにインスリン非依存的な糖輸送に関与するとされる AMPK 1 及び AMPK 2 の 6 種とし、対応するプライマは既存の文献を参考に設計した。遺伝子発現量を規格化する際に用いた内部標準は、*-actin* とした。PCR 条件は、95 °C を 5 秒、60 °C を 30 秒それぞれ維持する 2 つのステップを 1 サイクルとして、これを 45 サイクル繰り返した。

(1 - 3) インスリン感受性に及ぼす影響

前項までと同様の条件で電気刺激を行い、刺激前、刺激中及び刺激停止後のインスリン感受性を測定した。

測定には、インスリン感受性の定量法として一般的な euglycemic clamp 法を適用した。すなわち、頸静脈からインスリンを定速注入し (約 12.5 mU/kg/min)、頸動脈に確保したラインから少量の採血を繰り返して血糖値をモニタするとともに、血糖値が基準値から一定の範囲内に収まるよう、頸静脈から 22.4% グルコースを変速持続注入した。血糖値が一定の範囲に収まり、これを 30 分維持したときのグルコース注入速度 (GIR) をインスリン感受性の指標とした。血糖値の基準値は、電気刺激開始直前の値とした。

(2) 末梢交感神経電気刺激が脂肪組織の機能発現に及ぼす影響の検討

(2 - 1) 脂肪組織中脂肪酸組成に及ぼす影響

前項までと同様の条件で電気刺激を行い、刺激開始後 1 時間で精巢上体周囲脂肪 (EPI) 及び鼠径部の皮下脂肪 (SUB) を採取し、それぞれの脂肪組織中脂肪酸組成を、非刺激群と比較した。

脂肪組織中の脂肪酸は、メタノール及びクロロホルム混合液 (1:2 v/v) 中で採取した組織を破砕することでクロロホルム層に溶出させ、市販の試薬キットを用いて脂肪酸をメチル化し、キャピラリーカラム ((50% - シアノプロピル) - メチルポリシロキサン) を備えたガスクロマトグラフィ装置で 24 種 (飽和脂肪酸 7 種、一価不飽和脂肪酸 6 種、多価不飽和脂肪酸 11 種) の脂肪酸に分画した。ガスクロマトグラフィのキャリアガスにはヘリウム (1 mL/min) を使い、カラム温度を 50 °C から 230 °C まで変化させるグラジエント条件下で、水素炎イオン化型検出器によってメチル化脂肪酸を検出した。

(2 - 2) 脂肪組織の熱産生関連遺伝子の発現に及ぼす影響

前項にて採取した脂肪組織の一部を破砕し、市販の試薬を用いて抽出した total RNA より、脂肪組織の熱産生に関与する遺伝子の発現量をリアルタイム PCR によって測定した。測定対象は、脂肪細胞での熱産生を担う *Ucp1* 及びミトコンドリアのマーカーの一つである *Cox4* とし、PCR 条件及び内部標準、ならびに遺伝子発現量の定量方法は (1 - 2) 項と同様である。

(3) 統計解析

同一群内でのデータ比較には対応のある t 検定を、刺激群と非刺激群との群間比較には対応のない t 検定を用い、有意水準は $P < 0.05$ とした。

4 . 研究成果

(1) 末梢交感神経電気刺激が糖代謝系に及ぼす影響

1 時間の末梢交感神経電気刺激の結果、血漿中アディポネクチン及び遊離脂肪酸濃度は開始直前の値に対してそれぞれ有意に低値であった。血糖値及び血漿インスリン濃度、ならびに HOMA- β 及び HOMA-IR には電気刺激の前後で有意な変化は見られなかった。

血漿中アディポネクチン及び遊離脂肪酸はインスリン感受性との相関関係が指摘されているが、電気刺激開始後にこれらの濃度が有意に変化した一方で、HOMA-IR には有意差がみられなかった。このことから、末梢交感神経末梢電気刺激が及ぼすこれらの濃度変化は、インスリン感受性からは説明ができないものである可能性が示唆された。また、血漿インスリン濃度及び HOMA- β にも刺激前後で有意差がみられなかったことから、この電気刺激はインスリン分泌にも影響を及ぼさない可能性が示唆された。

電気刺激後にひらめ筋及び長趾指筋の遺伝子発現量を測定し、非刺激群と比較した結果、IRS-1、Akt、AMPK 1、AMPK 2、Glut1 及び Glut4 の発現量には、両群で有意な差はみられず、少なくとも 1 時間の電気刺激はこれらの遺伝子発現に影響を及ぼさない可能性が示唆された。

電気刺激による糖取り込み亢進を euglycemic clamp 法で定量した結果、電気刺激中の GIR は刺激開始前の GIR に対して有意に高値であり、刺激停止後の GIR は刺激中の値から低下する傾向にあったものの、刺激開始前に対しては高値であった。すなわち、末梢交感神経電気刺激によって糖取り込みは亢進し、その効果は刺激停止後もある程度残存することが示唆された。ただし、この糖取り込み亢進効果は、先述した血漿インスリン、アディポネクチン及び遊離脂肪酸濃度ならびに HOMA-IR の結果とは矛盾していることが

ら、末梢交感神経電気刺激が亢進する糖取り込みは、ホルモン系とは異なる経路を介して制御されている可能性が考えられた。

(2) 末梢交感神経電気刺激が脂肪組織の機能発現に及ぼす影響

末梢交感神経電気刺激を1時間行った結果、EPIではアラキジン酸(20:0)、リグノセリン酸(24:0)、エルカ酸(20:1n-9)、エイコセン酸(22:1n-9)及びリノール酸(18:2n-6)含有量が、SUBではステアリン酸(18:0)、アラキジン酸(20:0)、エルカ酸(20:1n-9)、エイコセン酸(22:1n-9)、ドコサヘキサエン酸(22:6n-3)及びリノール酸(18:2n-6)含有量が、非刺激群に対してそれぞれ低値であった。脂肪酸の一部は生理活性を有するとともに、脂肪酸組成は脂肪組織の機能発現と関連している可能性が先行研究で明らかになっていることから、これらの結果は、電気刺激が脂肪組織中の脂肪酸消費を促進するとともに、インスリン感受性の調節にも関与している可能性を示唆している。

脂肪酸組成分析に用いた脂肪組織の一部から、熱産生に關与する遺伝子の発現量について検討した結果、Ucp1の発現量はEPI及びSUBともに刺激群と非刺激群との間に有意な差はみられなかった。

Cox4の発現量は、刺激群のEPIが非刺激群に対して有意に高値であった一方で、SUBではこのような差はみられなかった。これらのことから、1時間の電気刺激では、Ucp1の発現に影響を及ぼさない可能性が示唆された。また、電気刺激によってEPIでのCox4の発現が増加したことから、電気刺激が少なくともEPIでのミトコンドリア増加に作用した可能性が示唆された。

申請者らのこれまでの研究で、末梢交感神経電気刺激によって、交感神経活動が全身性に亢進する可能性が示されたが(Sato et al. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2013:6329-6332)。他方で、交感神経活動亢進を全身性に誘発しても、内臓脂肪と皮下脂肪とでは機能発現に及ぼす影響は互いに異なることも報告されているため(Nguyen et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2014;306:R375-R386)。Cox4の発現に及ぼした影響がEPIとSUBとで異なった点については、こうした生理的要因が背景にある可能性が考えられる。

したがって、EPI及びSUBにおいて一部の脂肪酸含有量が電気刺激によって減少したことについて、ミトコンドリアを介した脂質酸化促進が部分的に關与している可能性が示唆されるものの、他の因子の關与も考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

中村嶺一, 塩飽裕, 小泉俊太郎, 佐藤大介,

楠正隆, 中村孝夫. ラット坐骨神経内交感神経束への microstimulation が対側交感神経活動に与える効果. 山形ニューロサイエンス研究会会誌 14, 19-22, 2014 (査読なし)

〔学会発表〕(計8件)

1. 本澤俊明, 佐藤大介, 佐々木寛之, 楠正隆, 中村孝夫. 脂肪組織中脂肪酸組成に及ぼすラット末梢交感神経束電気刺激の影響. 第37回日本肥満学会, 東京ファッションタウン(東京), 2016年10月8日
2. 佐藤大介, 阿部泰樹, 楠正隆, 中村孝夫. ラット末梢交感神経束 microstimulation は骨格筋糖取り込み関連遺伝子の発現に影響を及ぼさない. 第29回日本マイクロニューログラフィ学会, 東京大学山上会館(東京), 2016年7月23日
3. Sato D, Yamaguchi R, Sasaki H, Kusunoki M, Feng Z, Nakamura T. Electrical stimulation of peripheral sympathetic nerve fascicle enhances non-insulin-mediated glucose uptake in rats. American Diabetes Association (ADA) 76th Scientific Sessions, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, LA, USA), 2016年6月12日
4. 山口陸, 阿部泰樹, 佐藤大介, 楠正隆, 中村孝夫. ラット片側坐骨神経内交感神経束への microstimulation が糖代謝へ及ぼす影響. 第53回日本人工臓器学会大会, 東京ドームホテル(東京), 2015年11月20日
5. Sato D, Yamaguchi R, Sasaki H, Kusunoki M, Feng Z, Nakamura T. Effects of microstimulation of a peripheral sympathetic nerve fascicle on blood glucose and insulin sensitivity in rats. 8th Asia-Oceania Conference on Obesity (AOCO), 名古屋国際会議場(名古屋), 2015年10月3日
6. 山口陸, 小泉俊太郎, 白土貴也, 佐藤大介, 楠正隆, 中村孝夫. ラット末梢交感神経束内 microstimulation のインスリン感受性に及ぼす影響. 第28回日本マイクロニューログラフィ学会, 山形大学医学部(山形)2015年6月20日
7. 佐藤大介, 楠正隆, 中村孝夫. ラット末梢交感神経束への microstimulation の性質. 第67回日本自律神経学会総会, ラフレさいたま(さいたま), 2014年10月30日
8. 山口陸, 中村嶺一, 小泉俊太郎, 佐藤大介, 楠正隆, 中村孝夫. ラット末梢交感神経束内 microstimulation が血糖値に及ぼす効果. 第53回日本生体医工学会大会, 仙台国際センター(仙台),

2014年6月25日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 大介 (SATO, Daisuke)
山形大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60536960

(2) 研究協力者

中村 孝夫 (NAKAMURA, Takao)
山形大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00142654

楠 正隆 (KUSUNOKI, Masataka)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・
寄附研究部門教授
研究者番号：80214956

仁科 淳良 (NISHINA, Atsuyoshi)
日本大学・理工学部・教授
研究者番号：00469884

堤 一彦 (TSUTSUMI, Kazuhiko)
徳島文理大学・薬学部・特任教授
研究者番号：なし