

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08427

研究課題名(和文) 新たなメカニズムによる血糖コントロールと糖代謝異常の治療への展開

研究課題名(英文) Murine remote preconditioning increases glucose uptake and suppresses gluconeogenesis in hepatocytes via a brain-liver neurocircuit, leading to counteracting glucose intolerance

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：後肢虚血 再還流刺激(IR)は、遠隔臓器である心筋でnon-neuronal cardiac cholinergic system活性化を介してアセチルコリン産生および糖取り込みを増加させる。今回、C57BL mouseに、IRを行ったところ、血糖低下を認め、肝の糖取り込み亢進をみた。IRは、副交感神経系中枢を活性化させ、糖新生関連酵素発現・活性を抑制し、副交感神経系の抑制は、IRの血糖低下効果を抑制した。さらに、IRは、I型、II型糖尿病マウスモデルにおいて、高血糖を有意に抑制しており、IRによるこれら神経ネットワークの活性化は、耐糖能異常の治療戦略に新たな見識をもたらす可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our previous study revealed that hindlimb ischaemia-reperfusion (IR) activates cardiac acetylcholine (ACh) synthesis through the cholinergic nervous system and cell-derived ACh accelerates glucose uptake. However, the mechanisms regulating glucose metabolism in vivo remain unknown. Using C57BL/6J mice, the effects of IR on blood sugar (BS), glucose uptake, central parasympathetic nervous system (PNS) activity and hepatic gluconeogenic enzyme activities were assessed. IR decreased BS levels and led to neuronal activation of the center of the PNS. IR specifically downregulated hepatic gluconeogenic enzyme expression and activities and accelerated hepatic glucose uptake. Moreover, IR significantly attenuated hyperglycaemia in murine model of type I and II diabetes mellitus. IR provides another insight into a therapeutic modality for diabetes mellitus due to regulating gluconeogenesis and glucose-uptake and advocates an adjunctive mode rectifying disturbed glucose metabolism.

研究分野：病理学

キーワード：虚血再灌流モデル 糖取り込み 糖新生 副交感神経 迷走神経

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、タモキシフェン誘導コンディショナル von Hippel-Lindau(VHL) ノックアウトマウス系を用いて検討を行い、VHL 遺伝子の欠損は、肝における HIF-1, GLUT-1 を介した、低血糖をもたらすことを明らかにした (Plos One 2013)。また、研究分担者らにより、アセチルコリン(ACh)産生系と心筋保護性の関連について一連の検討のなかで、C57BLwild type マウスを用い、後肢を結紮・解除を繰り返す ischemia-reperfusion(IR)を行うと、遠隔臓器である心筋細胞内のコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の発現を亢進させ (Plos One 2012)、ChAT transgenic マウスによるコリン作動系の亢進は、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 (JAHA 2012) などを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

ACh 産生系の賦活化による心筋における糖取り込みの亢進は、VHL 遺伝子欠損マウスの肝でみられる低血糖の機序に類似する。また、IR は遠隔臓器におけるコリン作動系を賦活することから、IR は全身の血糖低下をもたらすのではないかと仮説を着想した。一方で、迷走神経遠心路の興奮は、肝における G6Pase, PEPCK の発現、糖新生を抑えることが報告されており (Alessandro Pocai et al. cell metabolism 2005)、IR による ACh 産生系の賦活化は糖新生メカニズムにも影響を及ぼす可能性も考えられる。IR における血糖低下の機序を解明することにより、生理学的、低侵襲な方法で、血糖をコントロール出来る可能性も想起され、今後の糖代謝異常の治療の模索に極めて有意義であると考え、本申請研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

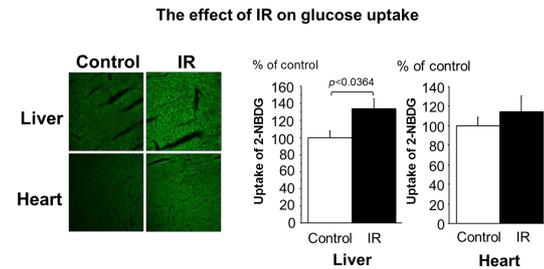
【IR の方法】C57BLwild type マウスを使用し、後肢を 2 分結紮 2 分解除を 3 回繰り返す IR を 1 日 1 回連日行い、以下の検討を行った。

### 4. 研究成果

【結果】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 開始後 18 日目で、前値 20% の血糖低下を認めた ( $p=0.0008$ )。

【結果】この血糖低下の原因に関して、検討を行った。IR による糖取り込みの亢進が反映している可能性考え、glucose analogue 剤 (2-NBDG) を頸部静脈より投与し、共焦点レーザー顕微鏡で、肝臓、心筋、骨格筋における糖取り込みの変化を観察した。その結果、肝において、有意に糖取り込みが亢進しており ( $p=0.0364$ )、心筋においてもその傾向が窺われた。骨格筋では有意な結果は得られなかつ

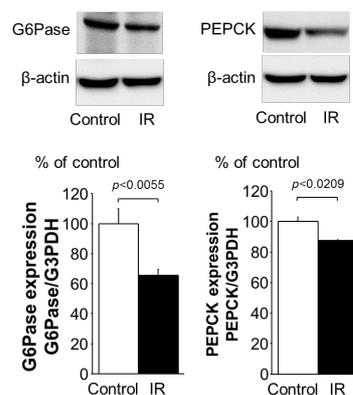
た。肝、心筋では western blot analysis(WB) で、HIF-1、GLUT 4 の発現亢進が認められ、糖取り込みの増加は、これが反映したものと考えられ、心筋では ChAT の発現亢進もみられ、これまでの我々の検討と矛盾しない結果であった。



【結果】副交感神経中枢の活性化およびこれを介した肝臓での糖新生の抑制の関与を検討する為、免疫組織化学的手法を用いた副交感神経系中枢 (parasympathetic nervous system: PNS) における c-fos の発現を検討した。その結果、迷走神経背側核、孤束核を含む中枢 PNS での c-fos 発現が亢進しており ( $p=0.0446$ )、IR はこれら中枢 PNS を活性化することが示唆された。

【結果】結果を踏まえると、迷走神経遠心路の興奮を介して、IR が肝における糖新生を抑えている可能性が考えられる。主要な 2 つの肝糖新生関連酵素 (G6Pase, PEPCK) の発現について検討を行ったところ、IR はこれらの酵素の発現に関して Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) による検索で、両者ともに IR により有意に発現が抑制されていた (G6Pase:  $p=0.0055$ , PEPCK:  $p=0.0209$ )。WB により蛋白レベルでも確認したが、同様の結果であった。

The effect of IR on gluconeogenesis in the liver



【結果】IR における血糖低下とインスリンとの関与を検討する目的で、glucose tolerance test, insulin tolerance test を施行したが、IR による有意な変化は認められず、インスリン負荷後の p-Akt/t-Akt に関しても変化は見られなかった。IR における血糖低下に、インスリンの関与は低いものと考えられた。

【結果】副交感神経系の関与をさらに確認する目的で、迷走神経肝臓枝切除による vagotomy を行ったところ、Sham operation+IR マウスと比較して、迷走神経肝臓枝切除+IR マウスでは、肝における糖取り込みは減少し ( $p=0.0250$ )、IR による血糖低下は抑制された ( $p=0.0367$ )。

さらに ChAT 阻害薬 hemicholinium-3 の側脳室投与を行い、糖新生への影響の変化を検討したところ、生食投与+IR マウス(コントロール群)に比較して IR による PEPCK の発現抑制も解除された ( $p=0.0460$ )。G6Pase に関しても有意差は得られなかったが、その傾向が認められた。

【結果】ACh は実際に肝細胞における糖取り込みを亢進させ、これに GLUT4 の発現亢進が関与しているのか、invitro により、huh-7 cells を使用して検討した。

ACh 添加して培養した細胞では、2-NBDG の取り込みは亢進し ( $p=0.0151$ )、また、免疫組織化学染色による検討により、GLUT4 の発現も亢進していた ( $p=0.0209$ )。GLUT4 の発現亢進は atropine 添加により抑制され ( $p=0.0209$ )、また、ACh による糖取り込み亢進は、GLUT4 阻害剤である si libinin 添加により抑制された ( $p=0.0008$ )。GLUT2 発現に関しては ACh の添加の有無による変化は認めなかった。

【結果】近年、腎、小腸において糖新生が行われることがわかっているが、IR における糖代謝の変化に、これらが関与しているのか検討する目的で、IR による肝、小腸、腎における糖新生酵素活性の変化について生化学的に各々検索した。

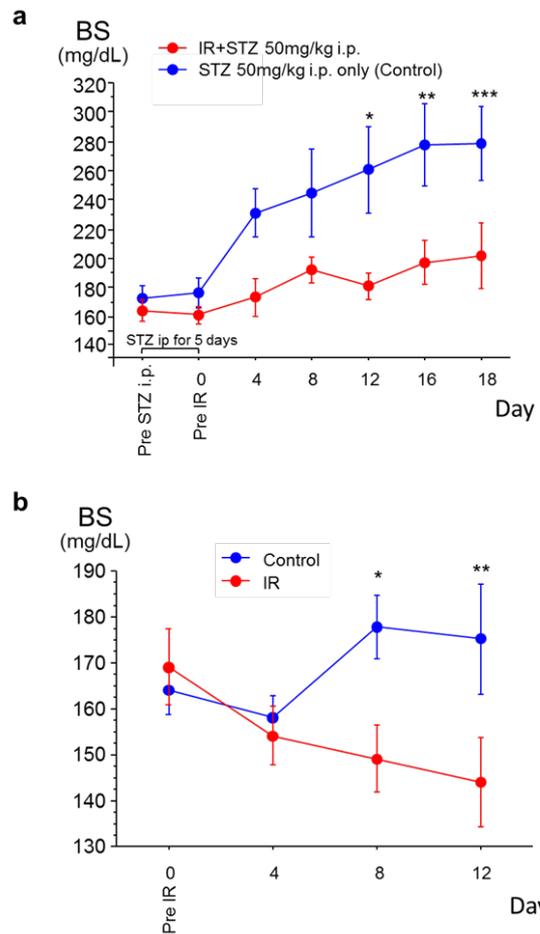
G6Pase, PEPCK の活性について検討したところ、肝ではこれらの活性は IR により有意に抑制されたが (G6Pase:  $p=0.0017$ , PEPCK:  $p=0.0086$ )、小腸、腎では IR による有意な変化は認めなかった。肝では Glucose 6-phosphate の蓄積も認めた ( $p=0.0213$ )。以上の結果から、IR における血糖低下に関して、腎および小腸における糖代謝の関与の可能性は低いものと思われる。

#### 【結果】

糖代謝異常の治療における IR の血糖低下効果の有用性を検討する目的で、(a) I 型糖尿病マウスモデル (streptozotocine (STZ) 50mg/kg 5日間連続腹腔内投与)、(b) II 型糖尿病マウスモデル (high fat diet (HFD) 60% fat) に IR を行い、その血糖の推移を IR 未施行群と比較検討した (図 a, b)。

その結果、I 型糖尿病マウスモデル群、II 型糖尿病マウスモデル群双方において、IR による血糖抑制効果が認められた (a.  $*p=0.0127$ ,  $**p=0.0181$ ,  $***p=0.0476$ ; b.  $*p=0.0250$ ,  $**p=0.0374$ )。

#### IR attenuates hyperglycaemia in both STZ-treated and HFD-fed mice



#### 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7件)

1. Kurabayashi A, Tanaka C, Matsumoto W, Naganuma S, Furihata M, Inoue K, Kakinuma Y. Murine remote preconditioning increases glucose uptake and suppresses gluconeogenesis in hepatocytes via a brain-liver neurocircuit, leading to counteracting glucose intolerance. *Diabetes Res Clin Pract.* 2018;139:288-99. 査読有 doi:10.1016/j.diabres.2018.03.009.
2. Okada T, Kurabayashi A, Akimitsu N, Furihata M. Expression of Cadherin-17 Promotes Metastasis in a Highly Bone Marrow Metastatic Murine Breast Cancer Model. *Biomed Res Int.* 2017;2017:8494286. 査読有 doi: 10.1155/2017/8494286.
3. Oikawa S, Kai Y, Tsuda M, Ohata H, Mano A, Mizoguchi N, Sugama S, Nemoto T,

- Suzuki K, Kurabayashi A, Muramoto K, Kaneda M, Kakinuma Y. Non-neuronal cardiac cholinergic system influences CNS via the vagus nerve to acquire a stress-refractory propensity. Clin Sci (Lond). 2016;130:1913-28. 査読有 doi: 10.1042/CS20160277.
- Wei S, Fukuhara H, Kawada C, Kurabayashi A, Furihata M, Ogura S, Inoue K, Shuin T. Silencing of ATPase Inhibitory Factor 1 Inhibits Cell Growth via Cell Cycle Arrest in Bladder Cancer. Pathobiology. 2015;82:224-32. 査読有 doi: 10.1159/000439027.
  - Fukuhara H, Inoue K, Kurabayashi A, Furihata M, Shuin T: Performance of 5-aminolevulinic-acid-based photodynamic diagnosis for radical prostatectomy. BMC Urol. 2015; 1;15:78 査読有 doi: 10.1186/s12894-015-0073-y.
  - Kurabayashi A, Inoue K, Fukuhara H, Karashima T, Fukata S, Kawada C, Shuin T, Furihata M. Combination with third-generation bisphosphonate (YM529) and interferon-alpha can inhibit the progression of established bone renal cell carcinoma. Cancer Sci. 2015;106:1092-9. 査読有 doi: 10.1111/cas.12711.
  - Mentily N, Okada T, Ebihara T, Sato M, Kurabayashi A, Furihata M, Suga M, Nishiyama H, Mio K, Sato C. Observation of tissues in open aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy: Applicability to intraoperative cancer diagnosis. Int J Oncol. 2015;46:1872-82. 査読有 doi: 10.3892/ijo.2015.2905.

〔学会発表〕(計7件)

- 倉林 睦, 田中千遥, 松本和花, 長沼誠二, 降幡睦夫, 柿沼由彦: 後肢虚血 再灌流刺激の肝糖代謝への影響と中枢神経を介したそのメカニズム, 第60回日本糖尿病学会年次学術集会, 名古屋, 5/18-20, 2017
- 倉林 睦, 田中千遥, 松本和花, 長沼誠二, 降幡睦夫: Hindlimb IR effect on glucose metabolism in the hepatocytes via a brain-liver neurocircuit, 第106回日本病理学会総会, 東京, 4/27-29, 2017
- Kurabayashi A, Fukuhara H, Tanaka C, Matsumoto W, Naganuma S, Shuin T, Inoue K, Furihata M. Mechanisms of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy for bladder and prostatic cancer, The 4th

International ALA and Porphyrin Symposium(IAPS4), Nagasaki. December 11, 2016

- 倉林 睦, 福原秀雄, 近藤千遥, 松本和花, 津田雅之, 小倉俊一郎, 井上啓史, 執印太郎, 降幡 睦夫: 泌尿器科癌におけるALA-PDT, 第6回ポルフィリン-ALA学会年会, 第5回泌尿器科光力学診療研究会 共催シンポジウム, 東京, 4/22-23, 2016
- Kurabayashi A, Kakinuma Y, Inoue K, kuroe T, Furihata M. Conditional VHL gene deletion causes hypoglycemic death through an upregulated IGF-I receptor, International Diabetes Federation (IDF) World Diabetes Congress (WDC) 2015, Vancouver, 30th November-4th December, 2015
- 倉林 睦, 井上啓史, 福原秀夫, 津田雅之, 黒江崇史, 近藤千遥, 執印太郎, 降幡睦夫: 泌尿器科癌に対する5-アミノレブリン酸を用いた光力学治療の病理学的検討, 第36回日本レーザー医学界総会 主題演題 VIII, 栃木, 10/24-25, 2015
- 倉林 睦, 黒江 崇史, 降幡 睦夫: 後肢虚血 再灌流モデルにおける糖代謝への影響, 第104回日本病理学会総会, 名古屋, 4/30-5/2, 2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉林 睦 (ATSUSHI, KURABAYASHI)

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

(2) 研究分担者

柿沼 由彦 (YOSHIHIKO, KAKINUMA)

日本医科大学・大学院・医学研究科・教授

研究者番号: 40233944

井上 啓史 (KEIJI, INOUE)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号: 00294827

(3) 連携研究者

降幡 睦夫 (MUTSUO, FURIHATA)

高知大学・教育研究部医療学系連携医学部門・教授

研究者番号：10209158

