

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01769

研究課題名(和文) 糖尿病による運動昇圧応答亢進機序解明とそれに関わるインスリンの新規生理作用の探究

研究課題名(英文) The mechanism(s) underlying the exaggeration in the exercise pressor response in type II diabetes and exploration of new physiological effects of insulin

研究代表者

堀田 典生 (HOTTA, Norio)

中部大学・生命健康科学部・准教授

研究者番号：60548577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：日本の糖尿病人口は世界上位であり、解決の緊急性は非常に高い。運動療法は、2型糖尿病に対する効果的な治療戦略である。しかし、2型糖尿病が運動時の過剰な血圧応答を引き起こすことで、運動の安全性を低下させ、運動処方を困難にするため、その機序の解明が不可欠であった。本研究により、インスリンやインスリン抵抗性が、運動時循環調節に重要な役割を果たす骨格筋からの求心神経の機械・化学刺激に対する応答を増強することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：インスリンは、筋細径求心神経において、熱や酸に感受性をもつtransient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)の感受性を増大させることを明らかにした。機械受容チャネルの候補分子の解明には至らなかったものの、インスリンが、筋細径求心神経における機械応答を増強することを示唆した。

社会的意義：糖尿病における循環応答以上に対する有効な介入手法や医薬品開発への道筋をたて、運動時心血管イベントリスクを抑制しながら運動療法の実施を目指すことが可能となり得る。

研究成果の概要(英文)：Japan is one of the countries with high diabetes population in the world, and decreasing and controlling diabetes patients is an urgent issue. While exercise therapy is an effective treatment, type 2 diabetes causes an excessive blood pressure response during exercise, which diminishes the safety of exercise and makes exercise prescription difficult; thus, elucidation of the mechanism(s) of the excessive blood pressure response is essential. The present study revealed that insulin and/or insulin resistance enhanced the sensitivities of thin muscle afferents, which play important roles in cardiovascular regulation during exercise, to mechanical and chemical stimuli.

研究分野：運動生理学

キーワード：筋細径求心神経 高インスリン血症 血圧 循環 運動昇圧反射 機械受容チャネル TRPV1 脊髄後根神経節細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界の糖尿病人口は約4億2200万人であり、糖尿病とその関連疾患で死亡する人口はおよそ400万人と報告されている。日本の糖尿病人口は世界9位と上位であり、解決の緊急性は非常に高い。現在、運動療法は、骨格筋への糖取り込みを促進するため、血糖値のコントロールや糖尿病の改善に有効であることは周知の事実である。しかし、糖尿病の病態は運動中の循環(昇圧)応答を強くしてしまうことが知られている(Holwerda et al. 2016a)。糖尿病自体が、虚血性心疾患や脳卒中のリスクを高めていることに加え、一過性の血圧増加は、突然死を含む心臓・血管リスクを増加させるため、運動処方コンプライアンスを低下させる。結果的に運動療法の質や効果を下げてしまうため、その機序解明は急務である。

運動時、循環応答は反射的に増強される。その神経性機序には、(1)中枢神経系の運動領域からの指令による調節であるセントラルコマンド、(2)圧受容器反射、(3)活動筋からの筋細径求心神経を介した調節(運動昇圧反射)がある。運動昇圧反射には、活動筋の収縮などの機械的な刺激の受容による筋機械受容器反射と、運動によって生じる化学物質やpH低下などの代謝情報を受容することで昇圧応答を導く筋代謝受容器反射がある(図1)。

これまでに、慢性心不全、慢性腎不全、高血圧、末梢血管疾患の病態で運動時の循環応答異常は、少なくとも運動昇圧反射亢進によることが分かっている(Koba 2015; Mizuno et al. 2015; Park and Middlekauff 2015)。また、糖尿病の病態時の過剰な運動時循環応答に、(a)圧受容器反射は関係していない(Holwerda et al. 2016b)、(b)少なくとも筋代謝受容器反射亢進が関わっている、ということも分かっている(Holwerda et al. 2016a)。しかし、これまでのところ、2型糖尿病病態時の循環応答異常の機序を明らかにしようとした研究は1報のみで情報が不足し(Holwerda et al. 2016a)、(A)筋機械受容器反射への影響、(B)筋細径求心神経上のチャネルや受容体レベルの変化、(C)インスリンとの関係については分かっていなかった。

*2016年から現在に至るまで、2型糖尿病時の運動昇圧反射異常の機序解明については、本報告以外にも複数の研究によりアプローチされた(Kim et al. 2019; Grotle et al. 2019)。

2. 研究の目的

2型糖尿病による過剰な運動昇圧反射の機序を、ヒト・神経線維・神経細胞レベルにて、インスリンの影響を交えて明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 仮説

2型糖尿病では高インスリン血症を呈し、transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1)は筋代謝受容器反射に関わるイオンチャネルであることから(Mizuno et al. 2011)、インスリンが、筋細径求心神経のTRPV1を増強するとの仮説を立てた(図2)。また、インスリンは機械受容チャネルの候補分子の増強に関わっていることから(Uchida et al. 2018)、インスリンは筋細径求心神経の機械応答を増強するとの仮説を立てた(図2)。

(2) 概要

本研究では以下の3つの研究をデザインした。

研究1 インスリンが2型糖尿病時の運動昇圧応答増強に関与しているのであれば、2型糖尿病でなくても、インスリン抵抗性と運動時血圧応答は関係すると予想した。そこで、非糖尿病のヒトを対象にして、片手のハンドグリップ運動時の昇圧応答とインスリン抵抗性関連因子との関係を検討した(Hotta et al. in revision)。

研究2 インスリンは筋細径求心神経の機械応答を増強するとの仮説を検証するために、ラット神経-筋標本(ex vivo)とマウス脊髄後根神経節(DRG)細胞(in vitro)を用いて、軸索末端及びDRGレベルにおいてインスリン暴露前後にて機械刺激に対する応答が増強するか検討した(Hotta et al. 2019)。

研究3 インスリンは、TRPV1を増強するとの仮説を検証するために、2)と同じ2種類の実験系を使って、インスリン暴露前後にてTRPV1の作動薬であるカプサイシンに対する応答が増強するか検討した。

(3) 倫理手続き

研究1においては、すべての被検者に本研究の目的と方法を、文章と口頭により詳細に説明した後、研究参加の同意を書面にて得た。また、中部大学倫理委員会の承認を得て実施した。

研究2と3においては、中部大学動物実験委員会の承認を経て実施した。

4. 研究成果

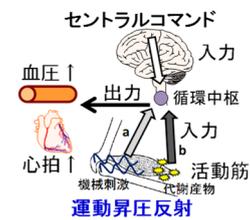


図1 運動時神経性循環調節メカニズム
a: 筋機械受容器反射. b: 筋代謝受容器反射

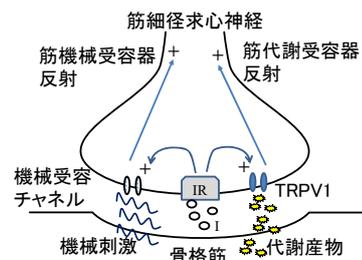


図2 インスリンの(Ⅰ)とインスリン受容体(Ⅱ)を介した感作機構の予想
Transient receptor potential cation channel subfamily V member (TRPV1)は、熱やカプサイシンなどに応じて非選択的にカチオンを通すチャネル。

(1) 研究 1

運動時循環応答に影響を与える糖尿病, 慢性心不全, 慢性腎不全, 末梢血管疾患を持たない 60 歳以上の高齢者 45 名を対象にした。

インフォームドコンセント取得後, 医師・看護師による問診や心電図の確認後, 採血をしてインスリン抵抗性関連指標であるヘモグロビン A1c (HbA1c) や homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) を測定・算出した。その後, 脈波伝播速度, 運動時血圧応答 (図 3), 運動耐用能の評価の順にて測定を実施した。

運動後虚血中の動的掌握運動に対する拡張期血圧と HbA1c に有意な相関関係が認められた (図 4A)。HOMA-IR をその値から 3 グループに分けた場合, HOMA-IR 異常値群の運動後虚血中の動的掌握運動に対する拡張期血圧応答は境界群や正常群のそれに比べて有意に高いことが明らかになった (図 4B)。

また, 運動後虚血中の動的掌握運動に対する拡張期血圧とは, HbA1c のみならず, 性別, 心臓-足首間脈波伝播速度, 安静時血圧と有意な相関関係が認められたが, それら指標で調整したとしても, HbA1c は運動後虚血中の動的掌握運動に対する拡張期血圧の有意な説明因子となった。

以上より, インスリン抵抗性が, 2 型糖尿病による異常運動昇圧応答の機序の一つとして関与していることが示唆された。

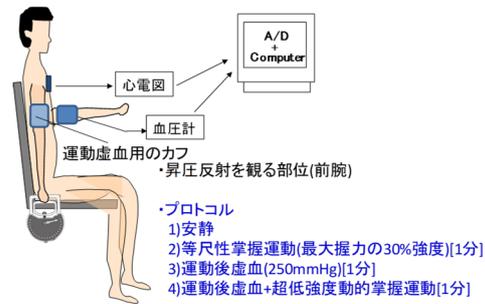


図3 測定と実験プロトコル
4)運動後虚血+超低強度動的掌握運動を実施した理由は, 運動昇圧反射を増強させて血圧応答を大きくして差を観察しやすくするため

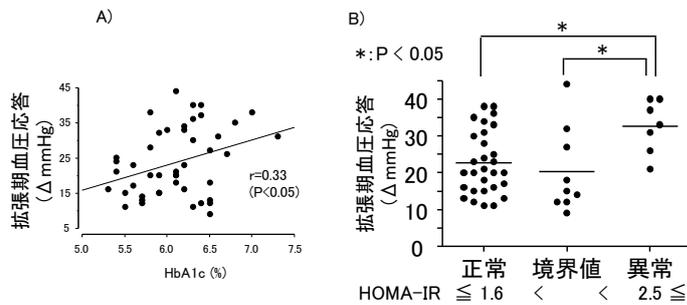


図4 運動後虚血+超低強度動的掌握運動に対する拡張期血圧応答とヘモグロビンA1c(HbA1c) (A)とインスリン抵抗性(HOMA-IR) (B)の関係

HOMA-IRは, 血中グルコース濃度とインスリン濃度より算出し, その値から3グループに分けた。

(2) 研究 2

C57BL/6J マウスの小型 DRG 細胞を対象として, 全細胞パッチクランプ法を用いた実験により (図 5A), 機械刺激に対する反応である機械感受性電流を測定した (図 5B, C, D)。その結果, 細胞外液として用いたヘパース緩衝液暴露では, 機械感受性電流は有意な変化を示さなかった (図 5E), インスリン暴露は機械感受性電流を増強させた (図 5B, C, E)。しかし, インスリン受容体拮抗薬である GSK1838705 にて前処理した場合, インスリンによる有意な機械感受性電流の増加は観察できなかった (図 5D, E)。

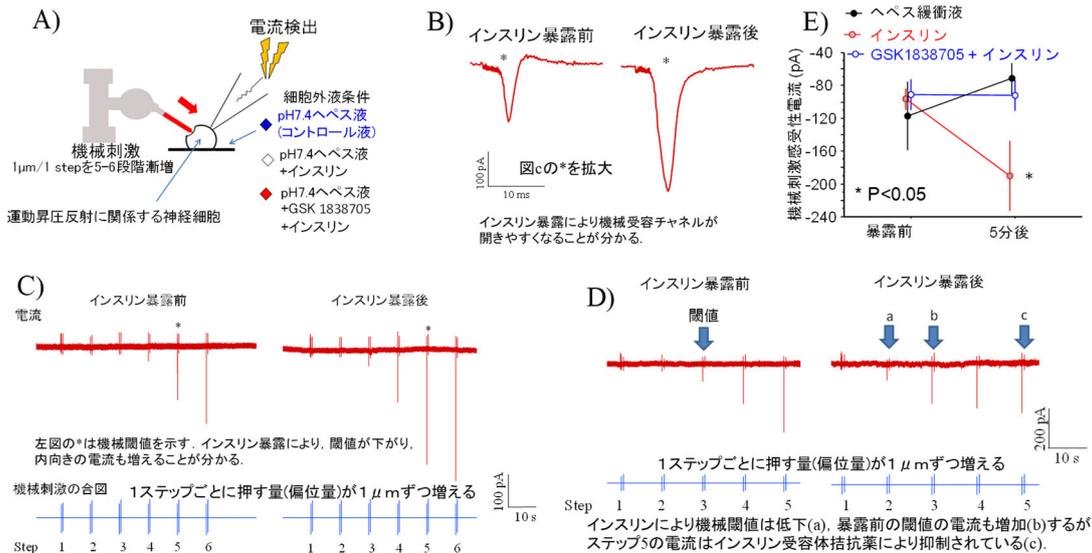


図5 全細胞パッチクランプ法(A)と機械感受性電流の典型例(B, C, D)と3試行の比較(E)

C: インスリン試行の典型例, D: 事前にインスリン受容体拮抗薬(GSK1838705)処理をした後のインスリン試行

Sprague-Dawley (SD) ラット神経-筋標本を用いて筋細径求心神経の単一記録を実施し (図 6A), 受容野に対する圧迫機械刺激誘発性活動電位を記録した (図 6B)。その結果, 細胞外液として用いたクレブス緩衝液筋注では, 機械刺激誘発性活動電位が出る機械刺激の強度 (閾値) と機械刺激誘発性活動電位数 (応答の大きさ) に有意な変化は認められなかったが, インスリン筋注によ

り、機械閾値は有意に低下し(図 6B, C), 機械刺激に対する応答の大きさは有意に増大した。一方で、インスリンとインスリン受容体拮抗薬である GSK1838705 を筋注した場合は、2 つの機械応答の指標に有意な変化は認められなかった。

以上より、インスリンは筋細径求心神経の機械感作に関わることが分かり、2 型糖尿病時の運動昇圧反射異常の機序の一つとなり得る筋機械受容器反射増大に寄与していることが示唆された。

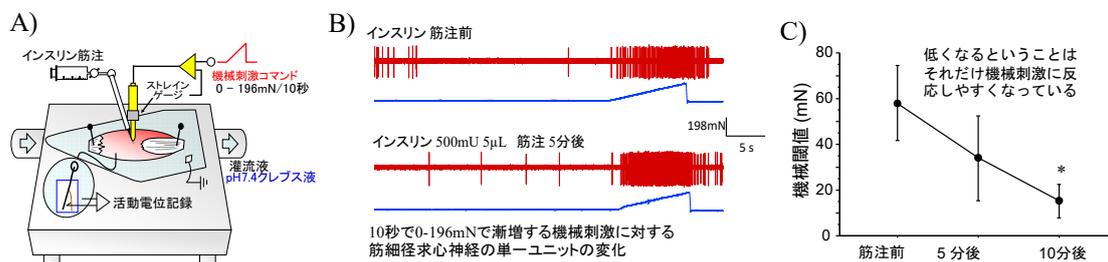


図6 単一神経記録(A)と機械刺激誘発活動電位の典型例(B)とインスリン筋注後の閾値の変化(C)

(3) 研究 3

C57BL/6J マウス DRG 小型細胞を対象として、全細胞パッチクランプ法を用いた実験により、TRPV1 作動薬のカプサイシンに対する感受性電流測定した(図 7A). 対照溶液のヘベス緩衝液、またはインスリンの暴露前と 5 分後のカプサイシン感受性電流の総電荷移動の倍率変化を比較した(図 7B, C). また、インスリン受容体拮抗薬である GSK1838705 を前処理した後にインスリン暴露をする試行も実施した(図 7B). その結果、インスリン試行が、対照試行や GSK1838705+インスリン試行に比べて有意に高かった (図 7C).

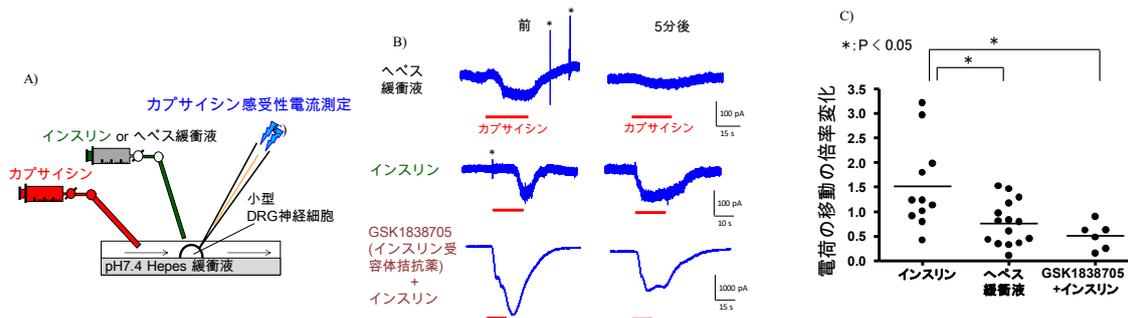


図7 全細胞パッチクランプ法(A)とカプサイシン感受性電流の典型例(B)と3試行の電荷の移動の倍率変化比較(C)
Bのアスタリスクはアーチファクト

次に、SD ラット神経-筋標本を対象とした単一神経記録を用いてカプサイシン誘発活動電位を測定した(図 8A). その結果、カプサイシン誘発活動電位数は、対照液(クレブス緩衝液)投与後に低下する傾向であったのに対し($P=0.08$) (図 8B), インスリン投与後ではその低下は見られなかった ($P=0.91$) (図 8C).

さらに、カプサイシン感受性がない線維がインスリン投与後にカプサイシンに反応する割合は有意に増加した(インスリン試行: 8/15 本 vs. 対照試行: 1/15 本, $P<0.05$) (図 9 に典型例を示した).

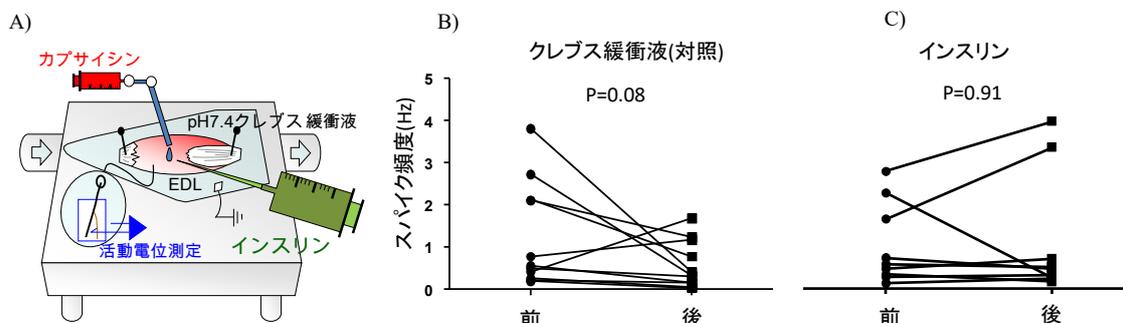


図8 単一神経記録(A)とカプサイシン刺激誘発活動電位のスパイク頻度の変化(B, C)

以上より、インスリンは筋細径求心神経の TRPV1 を増強することが分かり、2 型糖尿病時の運動昇圧反射異常の機序の一つとなり得る筋代謝受容器反射増大に TRPV1 の感作が寄与していることが示唆された。

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト, 今後の展望

インスリンが運動昇圧反射に関係することを世界に先駆けて示唆した。一方でインスリンが感作する機械受容チャネルの特定には至っておらず, その解明が今後必要である。

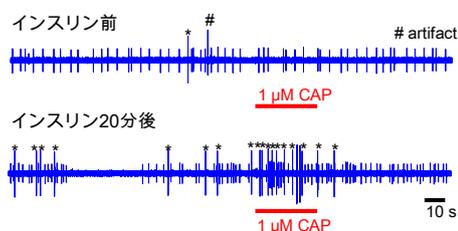


図9 インスリンによりカプサイシンへの感受性を獲得した典型例
アスタリスクがはターゲットである単一神経の活動電位を示す。

(5) 総括

2 型糖尿病時の運動昇圧応答異常の機序として, インスリンやインスリン抵抗性の関与が示唆された。また, 筋細径求心神経において, インスリンにより機械応答の増強や TRPV1 の増強が引き起こされることが示唆された。その結果, 運動昇圧反射が(筋機械受容器反射と筋代謝受容器反射)が過剰となり, 運動時血圧応答を高める可能性を示唆した。

<引用文献>

- Grotle A-K, Crawford CK, Huo Y, et al (2019) Exaggerated cardiovascular responses to muscle contraction and tendon stretch in UCD Type-2 Diabetes Mellitus rats. *Am J Physiol Circ Physiol* *ajpheart*.00229.2019. doi: 10.1152/ajpheart.00229.2019
- Holwerda SW, Restaino RM, Manrique C, et al (2016a) Augmented pressor and sympathetic responses to skeletal muscle metaboreflex activation in type 2 diabetes patients. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* *310*:H300-H309. doi: 10.1152/ajpheart.00636.2015
- Holwerda SW, Vianna LC, Restaino RM, et al (2016b) Arterial baroreflex control of sympathetic nerve activity and heart rate in patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Circ Physiol* *311*:H1170-H1179. doi: 10.1152/ajpheart.00384.2016
- Hotta N, Katanosaka K, Mizumura K, et al (2019) Insulin potentiates the response to mechanical stimuli in small dorsal root ganglion neurons and thin fibre muscle afferents in vitro. *J Physiol* *597*:5049-5062. doi: 10.1113/JP278527
- Kim HK, Hotta N, Ishizawa R, et al (2019) Exaggerated pressor and sympathetic responses to stimulation of the mesencephalic locomotor region and exercise pressor reflex in type II diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *317*:R270-R279. doi: 10.1152/ajpregu.00061.2019
- Koba S (2015) Exercise pressor reflex in health and diseases: Animal studies. *J Phys Fit Sport Med* *4*:151-160. doi: 10.7600/jpfsm.4.151
- Mizuno M, Downey RM, Mitchell JH, et al (2015) Aldosterone and Salt Loading Independently Exacerbate the Exercise Pressor Reflex in Rats. *Hypertension* *66*:627-633. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05810
- Mizuno M, Murphy MN, Mitchell JH, Smith SA (2011) Antagonism of the TRPV1 receptor partially corrects muscle metaboreflex overactivity in spontaneously hypertensive rats. *J Physiol* *589*:6191-6204. doi: 10.1113/jphysiol.2011.214429
- Park J, Middlekauff HR (2015) Abnormal neurocirculatory control during exercise in humans with chronic renal failure. *Auton Neurosci* *188*:74-81. doi: 10.1016/j.autneu.2014.10.013
- Uchida K, Sun W, Yamazaki J, Tominaga M (2018) Role of thermo-sensitive transient receptor potential channels in brown adipose tissue. *Biol Pharm Bull* *41*:1135-1144. doi: 10.1248/bpb.b18-00063

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 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hotta N, Katanosaka K, Mizumura K, Iwamoto GA, Ishizawa R, Kim HK, Vongpatanasin W, Mitchell JH, Smith SA, Mizuno M.	4. 巻 597
2. 論文標題 Insulin potentiates the response to mechanical stimuli in small dorsal root ganglion neurons and thin fibre muscle afferents in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol.	6. 最初と最後の頁 5049 ~ 5062
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP278527	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 該当する
1. 著者名 Ishizawa R, Kim HK, Hotta N, Iwamoto GA, Vongpatanasin W, Mitchell JH, Smith SA, Mizuno M.	4. 巻 75
2. 論文標題 Skeletal muscle reflex-induced sympathetic dysregulation and sensitization of muscle afferents in type 1 diabetic rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1072 ~ 1081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14118	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 該当する
1. 著者名 Hotta Norio, Kubo Asako, Mizumura Kazue	4. 巻 126
2. 論文標題 Chondroitin sulfate attenuates acid-induced augmentation of the mechanical response in rat thin-fiber muscle afferents in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 1160 ~ 1170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00633.2018	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 Kim Han-Kyul, Hotta Norio, Ishizawa Rie, Iwamoto Gary A., Vongpatanasin Wanpen, Mitchell Jere H., Smith Scott A., Mizuno Masaki	4. 巻 317
2. 論文標題 Exaggerated pressor and sympathetic responses to stimulation of the mesencephalic locomotor region and exercise pressor reflex in type 2 diabetic rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology	6. 最初と最後の頁 R270 ~ R279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpregu.00061.2019	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 堀田典生, Masaki Mizuno
2. 発表標題 Exercise pressor reflex in type 2 diabetes-the role of insulin in circulatory control during exercise.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Norio Hotta, Kimiaki Katanosaka, Kazue Mizumura, Rie Ishizawa, Jere H. Mitchell, Scott A. Smith, and Masaki Mizuno
2. 発表標題 Responses to Mechanical and Chemical Stimuli are Augmented by Insulin Administration in Neurons Innervating Skeletal Muscle
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀天, 堀田典生, 水村和枝, Masaki Mizuno
2. 発表標題 インスリンは筋細径求心神経のカプサイシン誘発活動電位を増強する.
3. 学会等名 第24回日本体力医学会東海地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rie Ishizawa, Han-Kyul Kim, Norio Hotta, Gary A. Iwamoto, Wanpen Vongpatanasin, Jere H. Mitchell, Scott A. Smith, Masaki Mizuno.
2. 発表標題 An Exaggerated Muscle Mechanoreflex in Type 2 Diabetic Rats Is Mediated by Potentiated Skeletal Muscle Afferent Discharge to Mechanical Stimulation.
3. 学会等名 Experimental Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rie Ishizawa, Han-Kyul Kim, Norio Hotta, Gary A. Iwamoto, Wanpen Vongpatanasin, Jere H. Mitchell, Scott A. Smith, Masaki Mizuno.
2. 発表標題 An Exaggerated Muscle Metaboreflex In Diabetic Rats Is Mediated By Potentiated Skeletal Muscle Afferent Responsiveness .
3. 学会等名 66th ACSM Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀田典生, 片野坂公明, 水村和枝, Mitchell Jere, Smith Scott, Mizuno Masaki.
2. 発表標題 インスリンは機械・代謝刺激に対する筋細胞径急伸神経応答を増強する.
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hotta, N. Katanosaka, K. Mizumura, K. Mitchell JH. Smith SA. Mizuno M.
2. 発表標題 Neural Responses to Mechanical Stimulation in Thin Muscle Afferents and Dorsal Root Ganglia are Sensitized by Insulin.
3. 学会等名 Experimental Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hotta, N. Katanosaka, K. Mizumura, K. Mitchell JH. Smith SA. Mizuno M.
2. 発表標題 Insulin Potentiates Neuronal Responses to Chemical Stimulation in Thin Muscle Afferents and Dorsal Root Ganglia.
3. 学会等名 65th ACSM Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hotta, N
2. 発表標題 Chondroitin sulfate and exercise pressor reflex.
3. 学会等名 International Conference for Adaptations and Nutrition in Sports (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀田典生, 久保亜抄子, 水村和枝
2. 発表標題 筋細径求心性神経の酸による機械感受性増大にプロテオグリカンが関与する
3. 学会等名 第72回日本体力医学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hotta, N. Kubo, A. Yamada, K. Sakurai, H. Mizumura, K.
2. 発表標題 Chondroitin sulfate suppresses the low-pH induced mechanical response in thin muscle afferents of rats
3. 学会等名 The International Society for Autonomic Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究協力者	水野 正樹 (MIZUNO Masaki)	テキサス大学南西校メディカルセンター・Departments of Health Care Sciences・Assistant Professor (PI)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	片野坂 公明 (KATANOSAKA Kimiaki) (50335006)	中部大学・生命健康科学部・准教授 (33910)	
連携研究者	水村 和枝 (MIZUMURA Kazue) (00109349)	中部大学・生命健康科学部（現在，日大歯学部 生理学講座） ・名古屋大学名誉教授 (33910)	