

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12616

研究課題名(和文)末梢交感神経電気刺激によるエネルギー代謝の人工制御法に関する開発研究

研究課題名(英文)Development of methods for artificial control of energy metabolism with microstimulation of peripheral sympathetic nerve

研究代表者

佐藤 大介 (Sato, Daisuke)

山形大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：60536960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高脂肪食によるインスリン抵抗性亢進下での末梢交感神経電気刺激の糖取り込み亢進効果を検証するとともに、この電気刺激による脂質代謝制御の可能性について検討した。ラット片側坐骨神経内を走行する交感神経へ電気刺激を行うと、健常及び高脂肪食ラットのいずれにおいても糖取り込みを亢進したが、血糖値の低下には寄与しなかった。この電気刺激は、健常ラットでは骨格筋のPGC-1 を介して糖取り込みを亢進するのみならず、脂肪組織での脂肪分解も亢進することで肝臓での糖新生も亢進し、結果的に血糖低下を補償している可能性が示唆された。その一方で、高脂肪食ラットでの血糖調節機序は本研究では明らかにならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耐糖能障害や脂質異常症等の諸症状に対する有効な治療法のニーズは高く、例えば、良好な血糖・血中脂質を維持することは、糖尿病の進展や合併症予防の主軸とされている。その一方で、高齢化社会を背景に、長時間の運動は困難を伴う可能性も高く、薬物療法であっても、注射剤使用時の苦痛や低血糖等の副作用は依然として存在する。

本研究は、糖及び脂質代謝を人工的に制御する医療機器の開発へと繋げるために、末梢交感神経系の人工的な賦活を介したエネルギー代謝制御を目指すとともに、その作用メカニズムの解明にも寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I conducted microstimulation of peripheral sympathetic nerve to enhance glucose uptake and lipid metabolism under insulin resistance.

The microstimulation of sympathetic nerve fascicle in the unilateral sciatic nerve elevated glucose uptake in standard chow-fed and high-fat-fed, insulin-resistant rats whereas the stimulation did not contribute to reduction of blood glucose level.

The present study revealed that the microstimulation enhanced not only glucose uptake via skeletal muscle PGC-1 but also lipolysis in the adipose tissue, and that the lipolysis resulted in elevation of gluconeogenesis and compensatory glucose production in the liver. However, the mechanisms of glycemic control in the high-fat-fed rats remained unclear in the present study.

研究分野：代謝学

キーワード：末梢交感神経 糖取り込み インスリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの進行は糖尿病や脂質異常症に起因する動脈硬化性疾患等多数の合併症の重積リスクを意味するため、有効な予防・治療法に対する社会的ニーズが非常に高い。これら諸疾患に対して、投薬や運動によって良好な血糖・血中脂質を維持することは有効な手段とされているが、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は困難を伴う。また、薬物治療においても、注射剤使用時の苦痛や低血糖等の副作用は依然として存在する。したがって、糖・脂質代謝のコントロールを目的とした、新たな手法の提案が必要である。

生体の糖取り込み経路は、インスリン依存と非依存の二つに大別されるが、中枢由来の交感神経活動が末梢組織の糖取り込みをインスリン非依存的に亢進することが報告されている[1]。申請者らはこれまでに、微小電極を用いたラット末梢交感神経への電気刺激がインスリンの機能とは独立に一過性の血糖値低下を誘発することを明らかにした[2]。

また、脂肪組織は交感神経の支配を受けており、脂肪組織の脂肪分解や熱産生等の機能亢進には、交感神経活動が深く関わっていることが指摘されている[3]。

これらのことは、末梢交感神経系の人工的な賦活によって、生体の糖取り込みや脂質の利用を制御しうることを強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究計画を含む一連の研究は、インスリン分泌不全、あるいは機能不全(インスリン抵抗性)に陥った糖尿病患者や、運動が困難な脂質異常症患者に対し、末梢交感神経系の人工的な賦活を介した低侵襲な糖・脂質代謝コントロールを可能にする新手法の開発に挑戦するものである。その初期段階として本研究では(1)インスリン抵抗性亢進下での糖代謝調節における末梢交感神経電気刺激の有用性を検証するとともに、(2)末梢交感神経電気刺激の糖取り込み亢進メカニズムについて検討した。また、(3)この電気刺激が脂肪組織の機能発現、特に脂肪酸組成や脂肪燃焼に関係するタンパク発現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

(1) 糖取り込み能の定量

実験には6週齢から標準飼料(CE-2, 日本クレア; ND群)または高脂肪食(High Fat Diet 32, 日本クレア; HFD群)を5週間任意に摂取させたWistar系オスラットを用いた。

イソフルラン及びペントバルビタールナトリウムによる麻酔下仰臥位にて露出した片側坐骨神経より、タングステン製微小電極(FHC)によって交感神経信号を導出した[2]。

交感神経信号を確認した後、糖取り込みを定量する方法として一般的なeuglycemic clamp法を適用しながら、幅0.25 msのパルス10個を25 ms間隔で並べたバーストで構成される電気刺激(日本光電工業)を、微小電極を介して印加した。刺激強度は、交感神経線維近傍を走行する他種の神経線維の賦活を低減するため、電気刺激による微小な筋収縮が目視で確認できるスレッショルド電圧から0.1 V低い値とした[4]。糖取り込み能の指標には、euglycemic clamp法におけるグルコース注入速度(GIR)を用いた。

(2) 電気刺激が脂質代謝に及ぼす影響の検討

標準飼料または高脂肪食を用いて前項と同様に飼育したラットに対し、同条件の電気刺激を60分間行った後、精巣上体周囲(EPI)、腸間膜(MES)、後腹膜(RET)及び鼠径部皮下脂肪組織(SUB)を採取し、Folch液中でホモジナイズすることで脂質を抽出した。抽出した総脂質はメチル化処理(ナカライテスク)後、(50%-シアノプロピル)-メチルポリシロキサンのキャピラリーカラム(内径0.25 mm, 長さ60 m, アジレント・テクノロジー)ならびに水素炎イオン化検出器を備えたガスクロマトグラフィ(アジレント・テクノロジー)にて脂肪酸組成分析を行った。

(3) 電気刺激が糖代謝調節機構に及ぼす影響の検討

標準飼料または高脂肪食を用いて前項と同様に飼育したラットに対し、同条件の電気刺激を60分間行った。電気刺激中は適宜採血を行い、血糖値(グルコカードプラスケア, アークレイ)及び血漿インスリン濃度(AKRIN-010T, 富士フィルムワコーシバヤギ)を測定した。

刺激終了後は速やかに両側のヒラメ筋(Sol)、長趾伸筋(EDL)及び肝臓を採取し、それぞれの組織での糖代謝に関連する遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにて定量した。また、肝臓のグリコーゲン含有量もフェノール硫酸法によって測定した。

これらの測定は電気刺激を行った群(ND-Stim群及びHFD-Stim群)と電気刺激を行わなかった群(ND-NS群及びHFD-NS群)の両方で行い、両者を比較した。

4. 研究成果

(1) 末梢交感神経電気刺激が糖取り込みに及ぼす効果

Euglycemic clamp法による糖取り込み能の定量において、指標となるGIRは電気刺激開始前

(before) 刺激中 (during) 及び刺激停止後 (after) の3回測定した。

電気刺激開始前の GIR は、HFD 群が ND 群に対して有意に低値であり、高脂肪食飼育によってインスリン抵抗性が亢進したことが示唆された。電気刺激中は、両群ともに GIR が刺激開始前の値に対して有意に上昇し、刺激停止後もその傾向を維持したことから、電気刺激はインスリン抵抗性が亢進した状態下であっても糖取り込みを促進することが明らかとなった(図1)。HFD 群では刺激中の GIR が ND 群の刺激開始前の値近傍にまで上昇したものの、刺激中及び刺激停止後は一貫して ND 群の GIR に対して有意に低値のまま推移したことから、この電気刺激による糖取り込み亢進作用は、インスリン抵抗性亢進下では減弱する可能性が示唆された。

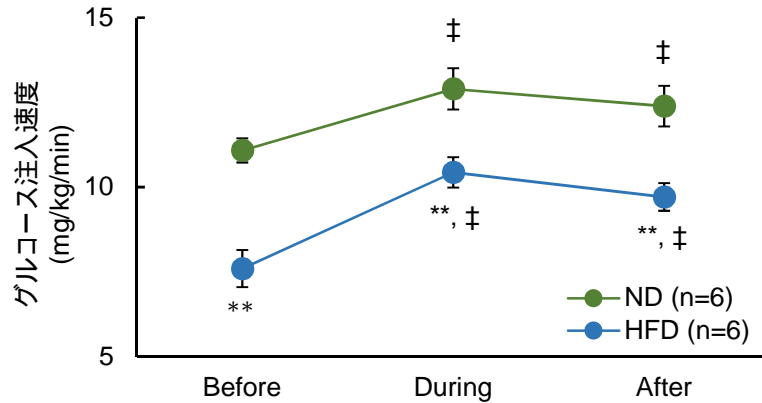


図1 片側末梢交感神経電気刺激が糖取り込み能に及ぼす影響 (Mean ± SE, **P<0.01 vs. ND 群, †P<0.01 vs. “Before”)

(2) 末梢交感神経電気刺激が亢進する糖取り込みの作用経路

片側末梢交感神経へ電気刺激を60分間行った結果、ND-Stim 群の両側の Sol 及び EDL において、*Pgc-1* mRNA 発現量が ND-NS 群に対して高値を示す傾向にあった。一方、*Glut4* mRNA 発現量は、両側の EDL でのみ ND-Stim 群が ND-NS 群に対して有意に低値であった(図2)。骨格筋の *Pgc-1* mRNA は 2 アドレナリン受容体作動薬によって発現が増加し[5]、PGC-1 は骨格筋において GLUT4 を介した糖取り込みの増加にも関与していることから[6]、末梢交感神経電気刺激は末梢交感神経系を賦活し、その結果骨格筋の糖取り込みを促進した可能性が示唆された。しかしながら、EDL では電気刺激によって *Glut4* mRNA 発現がむしろ抑制されたことから、糖取り込みは Sol で亢進する一方で、EDL ではむしろ抑制される可能性が考えられた。

また、この電気刺激は片側に行ったにもかかわらず両側に影響がみられたことから、作用経路は不明であるものの、片側末梢交感神経電気刺激は対側の糖取り込みにも作用する可能性が示唆された。

HFD-Stim 群の *Pgc-1* 及び *Glut4* mRNA 発現量は HFD-NS 群に対して有意差がみられなかったことから、インスリン抵抗性が亢進した状態下では糖取り込み経路に PGC-1 が関与しておらず、そのことが HFD 群での糖取り込み減弱の一因となっている可能性が考えられた。

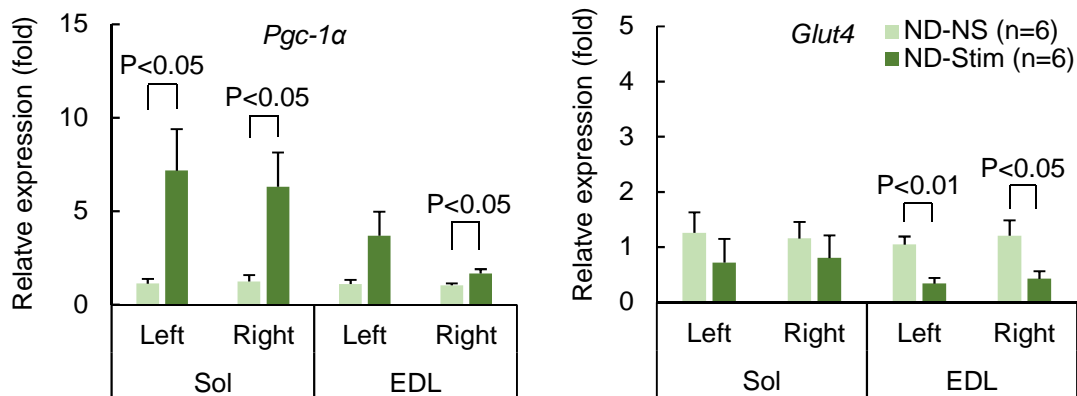


図2 片側末梢交感神経電気刺激が標準食飼育ラット骨格筋の *Pgc-1* 及び *Glut4* mRNA 発現量に及ぼす影響 (電気刺激は左側に印加; mean ± SE)

(3) 末梢交感神経電気刺激が脂質代謝に及ぼす影響

ND-Stim 群及び HFD-Stim 群の片側末梢交感神経へ電気刺激を60分間行った後、EPI、MES、RET 及び SUB の各脂肪組織の長鎖脂肪酸を22分画して定量し、ND-NS 群及び HFD-NS 群とそれぞれ比

較したところ、ND-Stim 群において、EPI ではそれぞれ 2 種の飽和脂肪酸及び一価不飽和脂肪酸ならびに 9 種の多価不飽和脂肪酸含有量が、SUB では 3 種の飽和脂肪酸、1 種の一価不飽和脂肪酸ならびに 5 種の多価不飽和脂肪酸含有量が ND-NS 群に対してそれぞれ有意に低値 ($P<0.05$) であった一方で、その他の部位での脂肪組織では全ての脂肪酸含有量に有意差はみられなかった。このことは、電気刺激が SUB での脂肪酸利用を促進するとともに、内臓脂肪においてはこの作用が部位特異的である可能性を示唆している。

HFD-Stim 群では、RET において 2 種の一価不飽和脂肪酸及び 1 種の多価不飽和脂肪酸含有量が HFD-NS 群に対してそれぞれ有意に高値 ($P<0.05$) であり、その他の部位では脂肪酸含有量に有意差はみられなかったことから、電気刺激が脂肪組織中脂肪酸含有量に及ぼす影響はやはり部位特異的でありながら、健常状態とインスリン抵抗性亢進下とは互いに逆の作用をもたらす上に、作用部位も異なる可能性が示唆された。電気刺激の影響の部位依存性については、ラット脂肪組織での神経線維の密度が $MES>EPI>RET>SUB$ であることが知られており [7]、少なくとも神経線維の密度からはこの現象は説明できなかった。

(4) 末梢交感神経電気刺激が血糖調節系に及ぼす影響

ND 群及び HFD 群へ片側末梢交感神経電気刺激を 60 分間行いながら血糖値及び血漿インスリン濃度を測定したところ、ND 群では血糖値及び血漿インスリン濃度に有意な変化はみられなかった。HFD 群では電気刺激開始後 60 分の血糖値が刺激開始直前の値に対して有意に高値 ($P<0.05$) を示したが、血漿インスリン濃度では 60 分間有意な変化はみられなかった (表 1)。

両群ともに電気刺激中は血糖値が低下せず、HFD 群ではむしろ上昇する結果となったことから、電気刺激は糖取り込みを亢進しながらも、肝臓等でのグルコース産生も促進する可能性が示唆された。ただし、刺激中は血漿インスリン濃度が大きく変化しなかったことから、インスリン抵抗性の有無にかかわらず、この電気刺激が亢進する糖取り込みはインスリン非依存的である可能性が示唆された。

表 1 片側末梢交感神経電気刺激が血糖値及び血漿インスリン濃度に及ぼす影響

	刺激開始前	20 分後	40 分後	60 分後
ND 群				
血糖値 (mg/dL)	83 ± 2	80 ± 3	81 ± 1	80 ± 3
血漿インスリン濃度 (ng/mL)	1.31 ± 0.07	1.01 ± 0.13	1.36 ± 0.19	1.16 ± 0.10
HFD 群				
血糖値 (mg/dL)	89 ± 2	94 ± 3**	89 ± 3*	96 ± 3**†
血漿インスリン濃度 (ng/mL)	2.24 ± 0.30*	2.41 ± 0.34**	2.32 ± 0.26*	2.43 ± 0.34**

Mean ± SE, n=5, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs. ND 群, † $P<0.05$ vs. 刺激開始前

60 分間の電気刺激終了後に肝臓を摘出し、肝臓でのエネルギー代謝に関わる mRNA 発現量を測定した結果、ND-Stim 群ではホルモン感受性リパーゼ (*Hsl*)、グルコース脱リン酸化酵素 (*G6Pase*)、*Srebp1c* 及び *Chrebp* の mRNA 発現量が ND-NS 群に対してそれぞれ有意に高値であった一方で、*Pepck* の mRNA 発現量には両群間で有意差はみられなかった (図 3)。

HFD-Stim 群においても同様の mRNA 発現量を測定し、HFD-NS 群と比較したが、両群間にこれら mRNA 発現量の有意差はみられなかった。

ChREBP は G6Pase を介してグルコース産生を促進するとともに、SREBP1c を介して脂質合成にも関与している。したがって本研究では、少なくとも健常ラットにおいて、電気刺激が前述のように糖取り込みを亢進する一方で (図 1)、肝臓でのグルコース産生も同時に促進し、両者の作用が拮抗した結果、電気刺激中は血糖値が大きく変化しなかった可能性が示唆された。また、電気刺激によって、肝臓では脂質合成が促進していた可能性も示唆された。

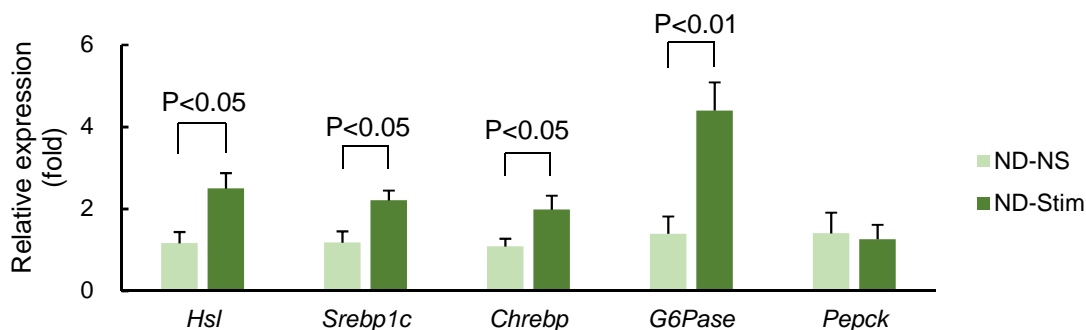


図 3 片側末梢交感神経電気刺激が標準食飼育ラット肝臓におけるエネルギー代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響 (Mean ± SE, n=6)

電気刺激によって肝臓からのグルコース産生が促進されたことが考えられたため、電気刺激後の肝グリコーゲン含有量の減少を予想したが、ND-Stim 群の肝グリコーゲン含有量は ND 群に対して有意に高値であった。その一方で、HFD-Stim 群と HFD-NS 群との間には有意差はみられなかった (図 4)。

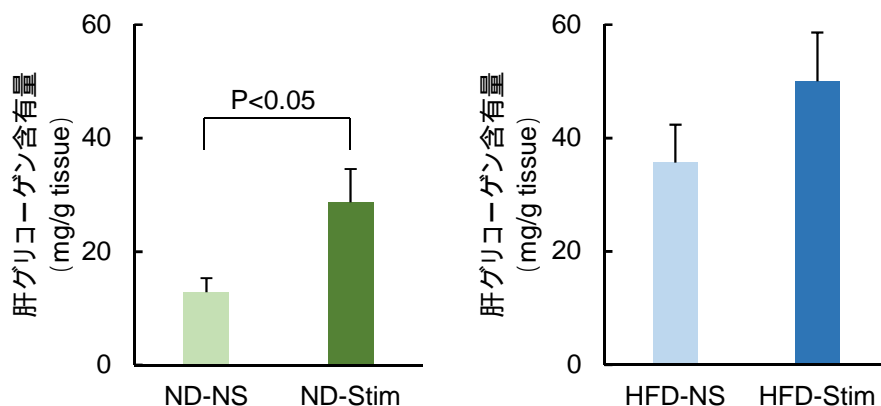


図 4 片側末梢交感神経電気刺激が肝グリコーゲン含有量に及ぼす影響 (Mean ± SE, n=5-7)

このことは、健常ラットにおいて、電気刺激が肝臓のグルコース産生のみならず、糖取り込みあるいは糖新生も惹起する可能性を示唆している。アミノ酸や乳酸を基質とした糖新生には PEPCCK が関与することが知られているが、本研究では *Pepck* mRNA 発現量において ND-Stim 群と ND-NS 群との間に有意差はみられなかったことから、肝臓での糖新生においてこれらが主要な基質となった可能性は低い。しかしながら、ND-Stim 群では *Hsl* mRNA 発現量が ND-NS 群に対して高値であったことから、トリグリセライドの分解によって生じるグリセロールが糖新生の基質となった可能性は残されている。前述の通り、電気刺激は脂肪組織での脂質代謝を亢進する可能性が示唆されたが、脂肪組織に貯蔵される脂質のほとんどはトリグリセライドであり、グリセロールが基質となる糖新生に PEPCCK は関与しないため、電気刺激は少なくとも健常ラットにおいてグリセロールを基質とした糖新生の促進ならびに肝グリコーゲンの蓄積に関与した可能性が高い。

HFD-Stim 群では電気刺激によって肝グリコーゲンの著明な蓄積を認めず、血糖値は上昇傾向にあった上に、脂肪組織での脂質代謝亢進もみられなかったことから、インスリン抵抗性が亢進した状態下では、電気刺激が肝臓での糖新生に及ぼす影響は小さく、糖取り込みよりもグルコース産生が上回っている可能性が示唆されるとともに、その産生経路が健常ラットとは異なる可能性が考えられた。

結論として、ラット片側末梢交感神経への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が、インスリン抵抗性が亢進した状態下ではこの作用が減弱し、骨格筋の PGC-1 がその一因である可能性が示唆された。また、この電気刺激は糖取り込みのみならずグルコース産生も惹起し、健常状態では両者の作用が拮抗的である一方で、インスリン抵抗性亢進下ではこのバランスが崩れる可能性も示唆された。

<引用文献>

1. Sudo et al. Am J Physiol 1991;261:E268-E303
2. Sato et al. J Artif Organs 2013;16:352-358
3. Bartness et al. Front Neuroendocrinol 2014;35:473-493
4. Sato et al. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2013:6329-6332
5. Miura et al. Endocrinology 2007;148:3441-3448
6. Wende et al. J Biol Chem 2007;282:36642-36651
7. DiGirolamo et al. Am J Physiol 1998;274:R1460-R1467

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daisuke Sato, Takao Nakamura, Jota Amarume, Mizuna Yano, Atsuyoshi Nishina, Zhonggang Feng, Masataka Kusunoki	4. 巻 148
2. 論文標題 Effects of dapagliflozin on peripheral sympathetic nerve activity in standard chow- and high-fat-fed rats after a glucose load	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 86-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.09.009	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 佐藤大介, 楠正隆, 馮忠剛, 中村孝夫	4. 巻 51
2. 論文標題 インスリン抵抗性亢進下におけるラット末梢交感神経電気刺激の糖取り込み亢進効果	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 人工臓器	6. 最初と最後の頁 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daisuke Sato
2. 発表標題 Understanding of energy metabolism and its artificial control
3. 学会等名 International Symposium of Health Care Technology, Drug Discovery and Chemical Biology 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤大介, 楠正隆, 馮忠剛, 中村孝夫
2. 発表標題 インスリン抵抗性亢進下におけるラット末梢交感神経電気刺激の糖取り込み亢進効果
3. 学会等名 第59回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 餘目 謙太, 梅原 悠太, 佐藤 大介, 馮 忠剛, 楠 正隆
2. 発表標題 高脂肪食ラット末梢交感神経電気刺激の糖取り込み亢進効果
3. 学会等名 第54回日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 大介, 餘目 謙太, 伊藤 禎浩, 坂野 僚一, 楠 正隆
2. 発表標題 標準食及び高脂肪食ラットにおける末梢交感神経電気刺激の糖取り込みに及ぼす効果
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤大介, 中野那都, 今泉希, 坂野僚一, 楠正隆, 中村孝夫
2. 発表標題 ラット末梢交感神経系を介した糖取り込み亢進経路における骨格筋Pgc-1 の関与の可能性
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 佐藤大介
2. 発表標題 交感神経の直接活動計測と電気刺激からせまる糖代謝調節系の理解
3. 学会等名 DiaMond Seminar ~ 目指すべき血糖目標値を再考する ~ in 名古屋 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤大介, 今泉希, 楠正隆, 宮本理人
2. 発表標題 ラット末梢交感神経系を介した糖取り込みにおける骨格筋Pgc-1 の関与
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤大介, 今泉希, 楠正隆
2. 発表標題 ラット末梢交感神経電気刺激の脂肪組織中脂肪酸組成に及ぼす影響
3. 学会等名 第26回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤大介, 今泉希, 坂野僚一, 楠正隆, 中村孝夫
2. 発表標題 ラット末梢交感神経電気刺激は肝臓での解糖と糖放出を同時に亢進する
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023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

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