

# 食塩過剰摂取による自律神経系を介した膵β細胞量調整機序の解明

高木 博史

名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学

## 概要

日本人健診の検討において、食塩摂取量過多と糖尿病発症リスクの関連が示唆されているが、その機序は十分明らかになっていない。近年の日本人の食習慣の特徴として、脂質と食塩の過剰摂取が挙げられる。研究代表者は、高脂肪高食塩食負荷マウスモデルにおいてインスリン分泌不全を伴う耐糖能障害を呈することを報告した。本マウスモデルに有効な治療法を探索する中で、SGLT2 阻害薬によってインスリン分泌能が改善することが確認された。食塩過剰摂取は交感神経を活性化させることが報告されている。本病態においても、高脂肪高食塩食によって交感神経が活性化され、SGLT2 阻害薬によって交感神経活性化が抑制されたことが効果の一因であると想定し、交感神経系の関与を検討した。

8 週齢 C57BL/6 雄マウスを普通食群、高脂肪食群、及び高脂肪高食塩食群に分けて給餌し、膵臓を免疫組織化学で解析した。交感神経終末を tyrosine hydroxylase (TH)、副交感神経終末を choline acetyl transferase (ChAT) で標識し、神経線維の分布を検討した。また、高脂肪高食塩食群を 2 群に分け、一方に SGLT2 阻害薬である dapagliflozin を投与し、尿中ノルアドレナリン量、膵島における TH 陽性面積を比較した。

これらの検討の結果、高脂肪高食塩食投与群に対して dapagliflozin を投与することにより、尿中ノルアドレナリン排泄量が減少し、膵島における TH 陽性面積低下を認めた。高脂肪高食塩食群では膵島内の TH 陽性領域が有意に増大し、ChAT 陽性領域も増加傾向を示した。α 細胞数に変化はなかった。また、組織透明化試薬 LUCID を用いて、マウス視床下部を透明化して観察することが可能になった。

本検討により、食塩過剰摂取が交感神経系を活性化し、膵β細胞増殖・インスリン分泌を抑制するという機序が想定された。また、SGLT2 阻害薬による交感神経抑制作用はインスリン分泌能の回復にも寄与し得ることが示唆された。これらの知見は、アジア人特有の軽度インスリン抵抗性とインスリン分泌能低下の病態形成解明に寄与するとともに、食塩過剰摂取制限の有用性を示し、2 型糖尿病に対する新たな治療法を提唱することにつながると考えられる。

## 1. 研究目的

食塩過剰摂取は高血圧症、心血管障害、脳卒中、慢性腎臓病の発症および増悪因子として確立されている。食塩過剰摂取は二次的に過食や清涼飲料水の摂取を引き超すことによって肥満や 2 型糖尿病などの代謝疾患に関与すると想定されるが、食塩過剰摂取の直接的な影響は未解明である。日本人健診受検者において食塩摂取量の多い群で糖尿病発症頻度が上昇する傾向が示唆された<sup>(1)</sup>。しかしながら、その分子機序は十分明らかになっていない。また、近年の日本人における国民健康・栄養

調査では、食塩摂取量が緩やかに低下傾向にあるものの依然として平均摂取量は世界保健機関 (WHO) の推奨値を上回っており、同時に脂質摂取量の増加も認められている。これらの背景から、現代日本人の食習慣は脂質と食塩の過剰摂取という特徴を有していると言える。2 型糖尿病は、遺伝素因に環境因子が組み合わさって発症する。研究代表者は、環境因子として食塩過剰摂取に着目し、食塩過剰摂取が肥満症や 2 型糖尿病の病態形成に直接的に関与するかを明らかにする目的で研究を進めた。

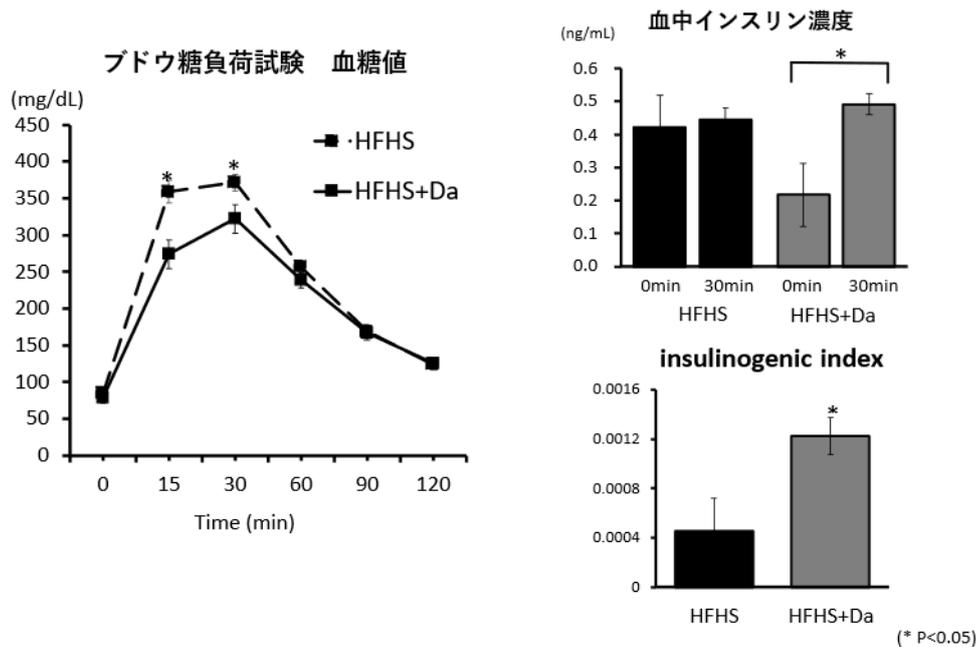


図 1.

研究代表者は、高脂肪高食塩負荷マウスモデルにおいて、高脂肪食に高食塩が伴うと、高脂肪食のみの場合に比較して、体重増加が抑制される一方、内臓脂肪重量の増加、肝重量の低下を伴い、インスリン感受性は改善するものの、ブドウ糖負荷試験におけるインスリン分泌が低下し、耐糖能障害を呈するという結果を報告した<sup>(2)</sup>。さらに、普通食または高食塩食のみを負荷したマウスではこれらの変化が認められなかった。そのため、脂質過剰摂取に食塩過剰摂取が組み合わさることで特有の病態が誘発されることが明らかとなった。

続いて同モデルにおいて有効な治療法を探索した。2 型糖尿病治療薬のナトリウムグルコース共輸送体-2 (Sodium glucose co-transporter 2: SGLT2) 阻害薬を投与した結果、体重差が生じない投与後1週間の段階において、耐糖能の改善、インスリン分泌能の改善を認めた(図 1)。さらに2週間の段階において、膵β細胞の増殖・膵島の増大を認めた。これらの結果から、食塩過剰摂取は脂質摂取によって誘導されるインスリン分泌促進、膵β細胞増殖を抑制するが、SGLT2 阻害薬がその作用を抑制することが示唆された。食塩過剰摂取は交感神経系を活性化することが報告されている<sup>(3)</sup>。本研究では、食塩過剰摂取による交感神経系活性化が脂質摂取によって誘発されるインスリン分泌促進や膵β細胞増殖を抑制するという機序を想定し、

膵島および中枢神経系における自律神経の分布の変化を解明することを目的とした。本研究により、2 型糖尿病の病態形成過程における食塩過剰摂取の意義を明らかにし、将来的には2 型糖尿病の予防・治療戦略への応用展開を目指す。

## 2. 研究方法

### 2.1 高脂肪高食塩食摂取による交感神経活性化の検討

本研究では高脂肪食として Test Diet 58Y1 (fat 60.9%, PMI Nutrition International, Clayton, MO, USA) を用いた。また高脂肪高食塩食として、上記 Test Diet 58Y1 に食塩含有率が 4.0%となるよう塩化ナトリウムを混合した飼料を作成して用いた。通常食として CE-2 (CLEA Japan, Tokyo, Japan; 4.6% fat, 0.78% NaCl) を用いた。

8週令 C57BL/6 雄マウスに対して、高脂肪高食塩食を6週間投与した。その後、高脂肪高食塩食を継続する群と、SGLT2 阻害薬 dapagliflozin を 10 mg/kg/day の投与量となるように高脂肪高食塩食に混合した飼料を摂餌する群に分けた。2群に分けた後1週間において代謝ケージを用いて一定量の塩酸を添加した上で12時間蓄尿を行い、尿中アドレナリン・ノルアドレナリン・カテコラミン濃度を測定した。カテコラミン濃度は HLC-725CAIII (Tosoh Co., Yamaguchi, Japan) で測定した。また、別日に蓄尿を施行し、尿中ナトリウム、糖量を測定した。

2群に分けた2週間後において、マウスを麻酔後、膵を摘出し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で固定後、パラフィン包埋した。パラフィン包埋した膵組織を用いて、200 μm 間隔、4 μm 厚で連続切片を作成した。キシレンで脱パラフィン後、免疫組織化学で検討した。交感神経を反映する Tyrosine hydroxylase (TH), 膵β細胞を反映するインスリンを標的にそれぞれの一次抗体を用いて染色した。

## 2.2 膵島の免疫組織化学による解析

8週令 C57BL/6 雄マウスを普通食群, 高脂肪食群, 高脂肪高食塩食群の3群に分割し30週にわたり給餌を行った。30週時点で、マウスを麻酔後、膵臓を摘出し、4%PFAで固定し、パラフィン包埋後に薄切片、免疫組織化学を行った。交感神経を TH, 副交感神経終末を Choline acetyltransferase (ChAT), 神経線維を Tubulin beta-III, α細胞をグルカゴンで標識して解析した。

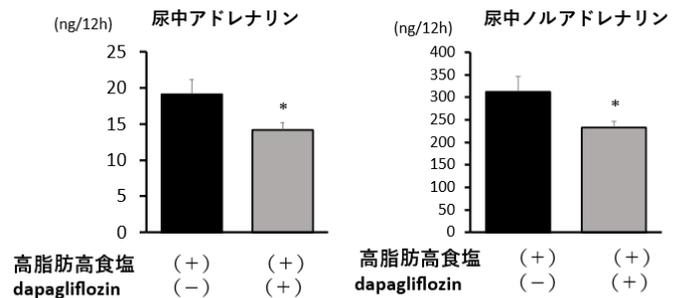
## 2.3 脳組織透明化

食塩, 脂質の摂取によって活性化する神経核を同定し, 中枢神経系の変化をより詳細に解析することを目指して, 組織透明化試薬 LUCID を用いてマウス脳を透明化した。視床下部に存在する, Agouti-related peptide (AgRP ニューロン特異的に GFP-Red が発現するマウス)を用い, 麻酔下に4%PFAで還流固定した。脳を摘出し, 純水で洗浄後, LUCID液に浸漬し, 37度下で振盪させた。24時間後, 透明化した脳組織を蛍光顕微鏡または共焦点顕微鏡で観察した。

## 3. 研究結果

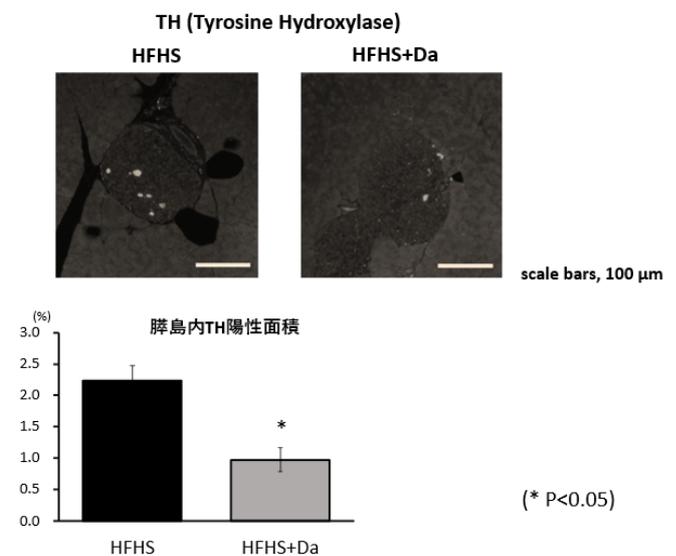
### 3.1 高脂肪高食塩食による交感神経活性化の検討

高脂肪高食塩群とdapagliflozin投与群を比較した結果, dapagliflozin投与群において, 尿中ノルアドレナリン・尿中アドレナリン量の低下を認めた(図2)。また, 尿中ナトリウム・糖量はdapagliflozin投与群で有意に高値であった。高脂肪高食塩食群(HFHS)において, 膵島にTH陽性領域を認めた。dapagliflozin投与群(HFHS+Da)においては, 膵島内のTH陽性面積の低下を認めた(図3)。



(\* P<0.05)

図 2.



(\* P<0.05)

図 3.

### 3.2 膵島の免疫組織化学による検討

高脂肪食または高脂肪高食塩食を約30週飼育したマウスの膵を用いて免疫組織化学で解析した。交感神経の指標となるTHで染色した結果, 普通食群に比較して, 高脂肪食群・高脂肪高食塩群において膵島におけるTH陽性領域が増加した。また, 神経線維の指標となるTubulin beta-IIIと共染色した結果, TH陽性領域は, 膵島の内分泌細胞とTH陽性神経線維で構成されていることが明らかとなった(図4)。

## マウス膵（高脂肪高食塩食摂取30週）

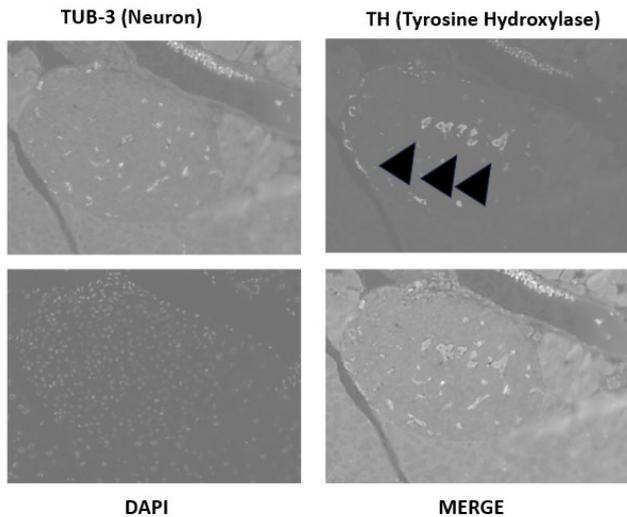


図 4.

図 4 においては、黒矢頭が TH 陽性、Tubulin beta -III 陰性の領域であり、 $\beta$  細胞と想定される。副交感神経の指標となる Choline acetyltransferase (ChAT) で染色した結果、普通食群に比較して、高脂肪食群・高脂肪高食塩食群において膵島における ChAT 陽性領域が増大した。インスリンを分泌する  $\beta$  細胞と相互作用する膵  $\alpha$  細胞の指標となるグルカゴンで染色した結果、グルカゴン陽性細胞の数や局在には有意な変化を生じないことを確認した。

### 3. 3 脳組織透明化

予備的検討として、マウス大脳を LUCID で浸漬した結果、透明化は不十分であった。条件検討を行い、より小さく特異的な領域を切り出して操作することとした。AgRP-GFP-red マウスを PFA で環流固定後、視床下部を 2 mm 大に切り出し、LUCID で浸漬した結果、観察に十分な透明化が得られた。透明化した組織を共焦点顕微鏡で観察した結果、視床下部の AgRP ニューロンとその神経線維の走行を観察できた。

## 4. 考察

### 4. 1 交感神経活性化

食塩過剰摂取には交感神経活性化作用が報告されており<sup>(4)</sup>、交感神経終末から分泌されるノルアドレナリンは、インスリン分泌や膵  $\beta$  細胞増殖を抑制することが示唆されている<sup>(5)</sup>。高脂肪高食塩食を摂取したマウスに対して、dapagliflozin を投与した結果得られたインスリン分泌能の

改善には、交感神経活性化を伴うことから食塩過剰摂取は交感神経活性化によってインスリン分泌・膵  $\beta$  細胞増殖を抑制する可能性が示唆された。SGLT2 阻害薬は多面的な作用が報告されているが、心不全、慢性腎臓病に対しても有効性が報告されている。心・腎において、組織中のノルアドレナリン量の低下や免疫組織化学による TH の低下が報告されている<sup>(6)</sup>。これらの所見は SGLT2 阻害薬が交感神経活性化を抑制して、それぞれの臓器の保護作用に貢献したことを示唆する。

膵島に分布する自律神経終末はインスリン分泌・ $\beta$  細胞増殖に作用する<sup>(7)</sup>。高脂肪食および高脂肪高食塩食負荷マウスの膵島を TH 染色すると、普通食群に比べて TH 陽性領域面積が有意に増大した。また、Tubulin  $\beta$ -III との共染色により、これら TH 陽性領域が交感神経線維と膵  $\beta$  細胞の両者で構成されていることが確認された。先行研究では、膵  $\beta$  細胞自身における TH 発現が小胞体ストレスの指標となることが報告されている<sup>(8)</sup>。そのため、高脂肪食や高脂肪高食塩食摂取においては、交感神経活性化や神経線維の増大が生じ、ノルアドレナリンによって膵  $\beta$  細胞の小胞体ストレスが増大して、膵  $\beta$  細胞自体にも TH 発現を引き起こしたことが想定される。SGLT2 阻害薬が膵島内の TH 陽性領域を低下させたことから、交感神経活性化抑制と膵  $\beta$  細胞の小胞体ストレス軽減作用によって、インスリン分泌能や膵  $\beta$  細胞増殖を改善させるという機序が示唆された。さらに ChAT 陽性領域も高脂肪食・高脂肪高食塩食群で増加を示していたため、副交感神経線維の増加も示唆された。副交感神経の関与や交感神経との相互作用については今後の検討課題である。グルカゴン陽性  $\alpha$  細胞数には群間差が見られなかった。グルカゴンとインスリンは膵島局所で分泌されて相互作用していると想定されている。高脂肪高食塩食群にグルカゴン分泌異常が伴うかは今後の検討課題である。

過去の報告においても、ヒトドナー膵においてインスリン分泌能の低い例で TH 陽性線維数の増加が認められた<sup>(9)</sup>。今回の検討において、膵島内の TH 陽性領域の面積はインスリン分泌能と相関していることから、ヒトにも関与する病態形成機序と考えられる。

### 4. 2 脳透明化解析の初期所見

LUCID による組織透明化を適用してマウス視床下部の内因性蛍光タンパク発現を観察することができた。

LUCID は膵において 3 次元的に解析できる利点を示した報告がある<sup>(12)</sup>。今回の検討では内因性に蛍光タンパクを発現しているマウスを用いて検討した。今後、抗体を用いた免疫組織化学を併用することによって、多くの因子を 3 次元的に正確に評価できる可能性があるため、条件検討を進めたい。膵においては、細胞増殖を示唆する Ki 陽性細胞の数や分布、脳においては、神経活性化マーカーである c-FOS 陽性細胞の数や分布などの解析に本手法を応用したい。

ヒトのドナー膵においてインスリン分泌能が低い症例では膵島内の TH 陽性線維数が増加していたことが報告されている。SGLT2 阻害薬の多面的な作用の機序として交感神経系の抑制が挙げられており、その投与によって心臓や腎臓における TH 陽性線維が減少することが報告されている。

高脂肪高食塩食を摂取するモデルの他国の研究グループからの報告においても、実験結果からはインスリン分泌不全が示唆されるが十分解析されていない<sup>(10)</sup>。インスリン分泌能に注目して検討しているのが申請者のグループの特徴である。本研究をさらに発展させ、食塩過剰摂取が交感神経系を活性化し、膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌・増殖を抑制する新たな機序を提唱したい。

## 5. 今後の課題

本研究成果によって、高脂肪高食塩食によって引き起こされたインスリン分泌不全による耐糖能障害に対して、dapagliflozin を投与することによって、交感神経活性化が低下し膵島内の TH 陽性領域が低下するとともに、インスリン分泌能・膵  $\beta$  細胞増殖を改善させることが明らかとなり、その成果を論文として報告した<sup>(12)</sup>。今後は、TH 陽性となる成分として神経線維と膵  $\beta$  細胞が存在することが明らかとなったため、その相互作用と病態における意義を検討したい。また、ヒト膵島組織を用いた自律神経終末分布の比較にも着手したい。脂質の摂取による膵  $\beta$  細胞増殖と食塩摂取によるその抑制を担う神経経路をより詳細に検討する必要がある。また、減塩による病態改善効果の動物実験および臨床研究などに展開したい。

日本人を含むアジア人の 2 型糖尿病は、内臓脂肪蓄積によって生じる軽度のインスリン抵抗性をインスリン分泌によって代償しきれないために発症するという特徴がある。近年、2 型糖尿病にインスリン分泌不全ややせを背景とし

たサブタイプがあることが改めて認識され<sup>(13)</sup>、国際的にも人種や病態の差を考慮した治療法の個別化が求められているが、その基盤となる研究は多くない。本研究により食塩過剰摂取とインスリン分泌不全を関連付ける病態概念を提唱し、インスリン分泌不全を特徴とするアジア人型の 2 型糖尿病に対する適切な治療法を提案するとともに、適切な食塩摂取量の提唱、個人の疾患感受性に基づいた個別化医療への応用展開を目指したい。

## 6. 文献

1. Lanaspá MA, Kuwabara M, Andres-Hernando A, Li N, Cicerchi C, Jensen T, Orlicky DJ, Roncal-Jimenez CA, Ishimoto T, Nakagawa T, Rodriguez-Iturbe B, MacLean PS, Johnson RJ. High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism. *Proc Natl Acad Sci* 2018 115:3138-3143.
2. Taki K, Takagi H, Hirose T, Sun R, Yaginuma H, Mizoguchi A, Kobayashi T, Sugiyama M, Tsunekawa T, Onoue T, Hagiwara D, Ito Y, Iwama S, Suga H, Banno R, Sakano D, Kume S, Arima H. Dietary sodium chloride attenuates increased  $\beta$ -cell mass to cause glucose intolerance in mice under a high-fat diet. *PLOS One*. 2021;16(3):e0248065.
3. Balafa O, Rigas G, Kalaitzidis RG. Salt sensitivity and hypertension. *J Hum Hypertens* 2021 35:184-192.
4. Scheen AJ. Effect of SGLT2 Inhibitors on the Sympathetic Nervous System and Blood Pressure. *Curr Cardiol Rep* 2019 21;21(8):70.
5. Moullé VS, Tremblay C, Castell A, Vivot K, Ethier M, Fergusson G, Alquier T, Ghislain J, Poitout V. The autonomic nervous system regulates pancreatic  $\beta$ -cell proliferation in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019 1;317:E234-E243.
6. Matthews VB, Elliot RH, Rudnicka C, Hricova J, Herat L, Schlaich MP. Role of the sympathetic nervous system in regulation of the sodium glucose cotransporter 2. *J Hypertens* 2017 35(10):2059-2068.

7. Faber CL, Deem JD, Campos CA, Taborsky G, Morton GD. CNS control of the endocrine pancreas. *Diabetologia*. 2020 63(10):2086-94.
8. Aguayo-Mazzucato C, Stitzel ML "FunDNAmethyl" Mechanism for Developmental Restriction of a  $\beta$ -Cell Subpopulation. *Diabetes* 2023 72(5):557-559.
9. Cinti F, Mezza T, Severi I, Suleiman M, Cefalo CNAA, Sorice GP, Moffa S, Impronta F, Quero G, Alfieri S, Mari A, Pontecorvi A, Marselli L, Cinti S, Marchetti J, Giaccari A. Noradrenergic fibers are associated with beta-cell dedifferentiation and impaired beta-cell function in humans *Metabolism* 2021 114:154414.
10. Frieler RA, Vigil TM, Song J, Leung C, Lumeng CN, Mortensen RM. High-fat and high-sodium diet induces metabolic dysfunction in the absence of obesity. *Obesity* 2021 29:1868-1881.
11. Ikeda E, Shinozaki S, Sakaguchi M, Sano N, Kabasawa S, Kanno A, Ando K, Yokoyama K, Tamada K, Onodera H, Yamamoto H, Fukushima N. The Ki67 index evaluation of pancreatic neuroendocrine tumors using 3D immunohistochemistry in small tissue specimens. *Pancreatology* 2023 23:537-42.
12. Hirose T, Takagi H, Kuno M, Sasaki T, Taki K, Ito Y, Miyata T, Kobayashi T, Sugiyama M, Onoue T, Hagiwara D, Iwama S, Suga H, Banno R, Arima H. Dapagliflozin increased pancreatic beta cell proliferation and insulinogenic index in mice fed a high-fat and high-sodium chloride diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 749:151364. 2025.
13. Tanabe H, Masuzaki H, Shimabukuro M. Novel strategies for glycaemic control and preventing diabetic complications applying the clustering-based classification of adult-onset diabetes mellitus: A perspective. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021 180:109067.

## Clarification of the Mechanism Controlling Beta Cell Volume via the Autonomic Nervous System in Response to Sodium Chloride Intake

Hiroshi Takagi

Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

### Summary

In studies conducted among Japanese, an association between excessive salt intake and an increased risk of developing diabetes has been suggested; however, the underlying mechanisms remain insufficiently elucidated. A recent characteristic of dietary habits among the Japanese population includes excessive intake of both fat and salt. We previously reported that a high-fat, high-sodium chloride diet in a mouse model induces impaired glucose tolerance accompanied by impaired insulin secretion. In the course of exploring effective therapeutic strategies for this mouse model, it was confirmed that insulin secretion was improved by treatment with an SGLT2 inhibitor. It has been reported that excessive salt intake activates the sympathetic nervous system. Based on this, it was hypothesized that in this pathological condition, the high-fat, high-sodium chloride diet activates the sympathetic nervous system, and that suppression of this activation by the SGLT2 inhibitor contributed to its therapeutic effect. Thus, the involvement of the sympathetic nervous system was investigated. Eight-week-old male C57BL/6 mice were divided into groups receiving a normal diet, a high-fat diet, or a high-fat, high-sodium chloride diet, and their pancreata were analyzed using immunohistochemistry. Sympathetic nerve terminals were labeled with tyrosine hydroxylase (TH) and parasympathetic nerve terminals with choline acetyltransferase (ChAT) to examine the distribution of nerve fibers. Additionally, the high-fat, high-salt diet group was subdivided, with one subgroup receiving the SGLT2 inhibitor dapagliflozin, and urinary norepinephrine levels and TH-positive areas in pancreatic islets were compared. Dapagliflozin led to a reduction in urinary norepinephrine excretion and a decrease in the TH-positive area within the islets. In the high-fat, high-sodium chloride diet group, the TH-positive areas within the islets were significantly increased, and there was also a trend toward an increase in ChAT-positive areas. The number of  $\alpha$ -cells remained unchanged. These findings suggest that excessive sodium chloride intake activates the sympathetic nervous system, thereby suppressing  $\beta$ -cell proliferation and insulin secretion. They also indicate that the sympathetic inhibitory effects of SGLT2 inhibitors may contribute to the restoration of insulin secretory function. Overall, these insights are expected to contribute to understanding the pathophysiology specific to Asians, who characteristically exhibit mild insulin resistance and impaired insulin secretion, as well as to underscore the importance of limiting excessive salt intake and to propose new therapeutic approaches for type 2 diabetes.