

食塩過剰摂取によるインスリン分泌不全発症機構の解明とその治療法の開発

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 食塩過剰摂取は、高血圧症、心血管障害、腎機能障害などの発症・増悪因子である。しかしながら、食塩過剰摂取と2型糖尿病との関連は未だ明らかになっていない。食塩過剰摂取は食欲亢進やソフトドリンク過剰摂取を介して二次的に肥満や2型糖尿病を発症させることは想定されるが、研究代表者は、食塩過剰摂取がインスリン分泌自体にも影響するのではないかと着想し、マウスモデルで検証した。8週齢のC57BL/6雄マウスに普通食(食塩濃度0.8%)または高塩分食(食塩濃度4.0%)を30週負荷した結果、両群の体重、耐糖能、膵島の数・面積に差を認めなかった。続いて、8週齢のC57BL/6雄マウスに高脂肪食(脂肪由来カロリー60%、食塩濃度0.4%)または高脂肪+高塩分食(脂肪由来カロリー60%、食塩濃度4.0%)を30週負荷した結果、高脂肪+高塩分食群では、高脂肪食群と比較して体重増加が抑制されるにも関わらず、耐糖能が悪化しており、ブドウ糖負荷後の血漿インスリン値は有意に低く、インスリン分泌不全を呈していることが示された。30週時点での膵島の数・面積は高脂肪食群と比較して、高脂肪+高塩分食群で有意に低下していた。普通食の摂取ではマウスの耐糖能に差を認めなかったことから、脂質の摂取によって生じる膵β細胞の増殖を食塩過剰摂取が抑制する可能性が示唆された。そこで、C57BL/6雄マウスに高脂肪食または高脂肪食+高塩分食を摂取し、3日~1週間後に膵または単離膵島を解析した。膵の免疫組織化学において、高脂肪食群では、高脂肪+高塩分食群と比較して膵β細胞におけるKi67陽性率が有意に高かった。また、高脂肪食群では単離膵島における*Ki67*、*CyB1*、*CyD1*の遺伝子発現が増加するのに対し、高脂肪+高塩分食摂取ではこうした変化は認めなかった。候補となる機序として自律神経系の関与を検討した。高塩分食によってマウスの尿中カテコラミン排泄が増加することを確認し、食塩摂取過剰によって交感神経系が活性化することが示唆された。膵β細胞には $\alpha 2$ 受容体が発現するとされており、 $\alpha 2$ 遮断薬を投与して膵β細胞におけるKi67陽性細胞率の変化を検討した。高脂肪+高塩分食を摂取するマウスモデルは肥満が軽度でインスリン分泌不全を呈する糖尿病モデルと考えられる。このようなモデルの病態を解析することによって、糖尿病の新たな治療法の開発に結びつく可能性があると考えられる。

1. 研究の背景と目的

食塩過剰摂取は、高血圧症、心血管障害、腎障害など多くの疾患の発症・増悪因子である。しかしながら、食塩過剰摂取と2型糖尿病との関連は明らかになっていない。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。インスリン分泌不全の背景には遺伝的要因も存在するが、助成研究者はアジア人に特徴的な食習慣である食塩過剰

摂取がアジア人型の2型糖尿病の病態形成に関与するのではないかと着想し研究を行っている。

食生活の欧米化が日本における2型糖尿病患者の増加の要因の一つとして挙げられている。そのため、食塩摂取が飽和脂肪酸を多く含有する欧米型の食生活と組み合わせることによって、2型糖尿病の病態に悪影響を与えるのではないかと仮説を立てマウスモデルでの検討を開始した。

C57BL/6J 雄マウスに高脂肪食または高脂肪+高塩分食を負荷して、体重推移、摂餌量、体組成、耐糖能、膵の組織学的所見を評価した。さらに、膵β細胞の増殖促進を解析した。以上のような解析によって、食塩過剰摂取の肥満症、2型糖尿病の病態形成における意義を明らかにし、代謝疾患の予防・進展防止を着眼点とした食塩摂取量の適正化、新しい機序による膵β細胞増殖不全を標的とした2型糖尿病の予防・治療法を確立することを目指して本研究を実施した。

2. 研究方法

脂質と食塩過剰摂取が2型糖尿病の病態形成に与える影響を明らかにする目的で検討を行った。

2.1 体重・摂餌量・組織重量・耐糖能の評価

8週齢のC57BL/6J雄マウスに、普通食(食塩濃度0.8%)、高塩分食(食塩濃度4%)、高脂肪食(脂質含有割合60%、食塩濃度0.8%)あるいは高脂肪+高塩分食(脂質含有割合60%、食塩濃度4%)を負荷して、マウスの体重推移、摂餌量、組織重量を検討した。腹腔内ブドウ糖負荷試験、腹腔内インスリン負荷試験を用いて耐糖能、インスリン感受性を検討した。腹腔内ブドウ糖負荷試験において、負荷前、負荷30分後の血漿中インスリン濃度をELISA法で測定した。マウスから膵を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定、パラフィン包埋後に薄切し、免疫組織化学で膵島の形態を検討した。

2.2 単離膵島の評価

C57BL/6J雄マウスを用い、普通食、高脂肪食、高脂肪+高塩分食を給餌し、3日後にコラゲナーゼ法によって膵島を単離した。単離した膵島における遺伝子発現をRT-PCR法で解析した。

2.3 交感神経活性化の影響の薬理的解析

C57BL/6J雄マウスに普通食または高塩分食を摂取させ、メタボリックケージ内で飼育して蓄尿し、尿中カテコラミンをHPLC法で測定した。

C57BL/6J雄マウスに、高脂肪食、高脂肪+高塩分食を給餌するとともに、 α_2 遮断薬であるyohimbineを投与して、3日後にマウスの膵を摘出し、免疫組織化学で膵島におけるKi67陽性細胞の数を比較した。

2.4 糖尿病薬による治療法の検討

C57BL/6J雄マウスに、高脂肪+高塩分食を6週間給餌した後、2週間SGLT-2阻害薬であるdapagliflozinを投与して体重、耐糖能の変化を検討した。

3. 研究結果

3.1 体重・摂餌量・組織重量・耐糖能の評価

C57BL/6J雄マウスに、普通食、高塩分食を給餌した結果、体重、摂餌量に差を認めなかった。また、肝、ヒラメ筋、精巣周囲脂肪組織の重量に差を認めなかった。腹腔内ブドウ糖負荷試験、腹腔内インスリン負荷試験の結果、耐糖能、インスリン感受性に差を認めなかった。

C57BL/6J雄マウスに、高脂肪食あるいは高脂肪+高塩分食を給餌した結果、高脂肪+高塩分食群は、高脂肪食群と比較して、摂餌後1週間の摂餌量が、高脂肪+高塩分食で有意に低下した。高脂肪+高塩分食は、高脂肪食群と比較して、30週における体重が有意に低下し(図1)、精巣周囲脂肪組織重量が有意に大きく、肝重量が有意に小さかった(図2)。高脂肪+高塩分食群は、高脂肪食群と比較して、腹腔内インスリン負荷試験における血糖値が有意に低く(図3)、インスリン感受性の亢進が認められ、腹腔内ブドウ糖負荷試験における血糖値が有意に高く、耐糖能の低下が認められた。腹腔内ブドウ糖負荷前と30分における血漿中インスリン濃度は有意に低く(図3)、インスリン分泌の低下によって耐糖能が悪化したことが示唆された。

膵の組織学的検討の結果、高脂肪+高塩分食群は、高脂肪食群と比較して、30週における、膵島の面積・数が有意に低かった(図4)。

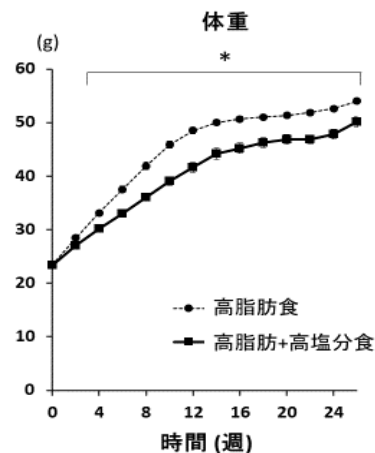


図1. 高脂肪食群、高脂肪+高塩分食群の体重変化

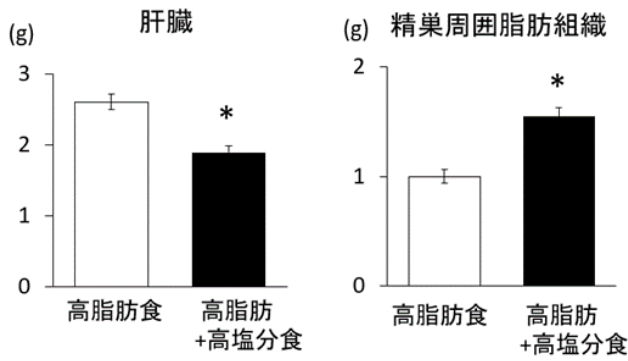


図 2. 高脂肪食群, 高脂肪+高塩分食群の臓器重量

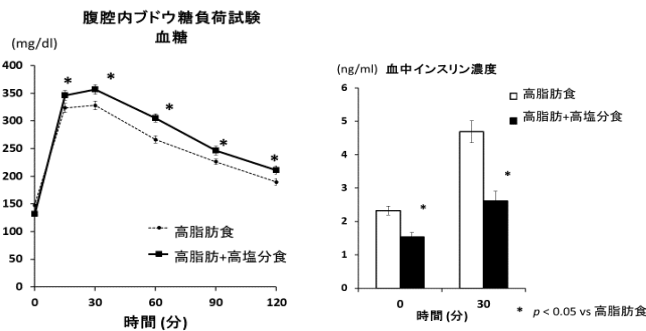


図 3. 高脂肪食群, 高脂肪+高塩分食群の耐糖能とインスリン分泌能

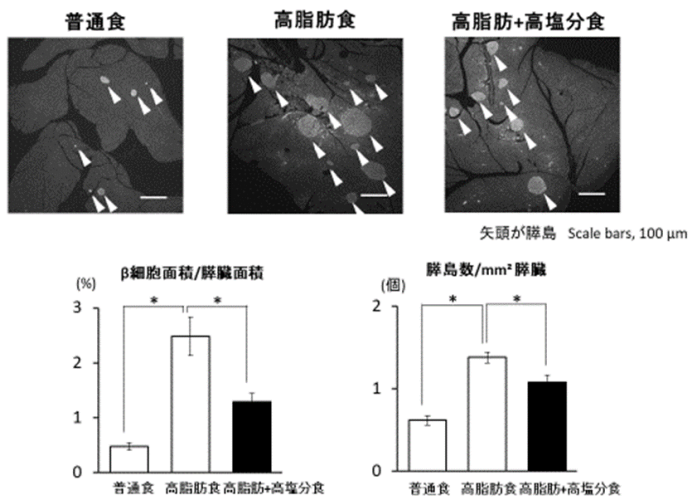


図 4. 高脂肪食群, 高脂肪+高塩分食群の膵島免疫組織化学

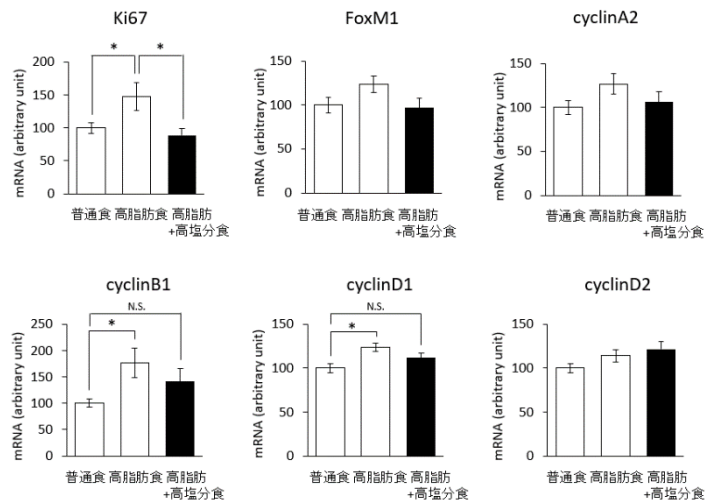


図 5. 高脂肪食群, 高脂肪+高塩分食群の単離膵島における遺伝子発現

3. 2 単離膵島の解析

C57BL/6J 雄マウスを用い, 普通食, 高脂肪食, 高脂肪+高塩分食を給餌し, 7 日後に膵島を単離し, 単離膵島における遺伝子発現を比較した結果, 高脂肪群においては, 普通食群に比較して *Ki67*, *CyB1*, *CyD1* 遺伝子発現が有意に増加したのに対して, 高脂肪+高塩分食群ではこれらの遺伝子の発現増加を認めなかった(図 5)。

3. 3 交感神経活性化の影響の薬理的解析

食塩過剰摂取によって交感神経系が活性化することが報告されている。C57BL/6J 雄マウスに普通食または高塩分食を摂取させた間の尿中カテコラミン排泄量は, 高塩分食で普通食群より有意に多かった。脂質によって誘導される膵 β 細胞の増殖がエピネフリンによって抑制されるという報告がある(文献 1)ため, 食塩過剰摂取が交感神経系の活性化を介して膵 β 細胞の増殖を抑制している可能性を想定した。膵 β 細胞に発現しているカテコラミン受容体は α2 受容体であると報告されているため α 遮断薬 yohimbin を投与して膵における Ki67 陽性細胞数を比較した。高脂肪食群では高脂肪+高塩分食に比較して有意に Ki67 陽性細胞が増加していた。一方で yohimbin 投与によって Ki67 陽性細胞の割合は有意差を認めなかった。

3. 4 糖尿病薬による治療法の検討

現在, ヒトに用いられている糖尿病薬の中で, SGLT-2 阻害薬は尿中へのブドウ糖排泄を介して血糖値を低下さ

せる薬剤であるが、尿中ナトリウム排泄増加や交感神経抑制作用も報告されている。

高脂肪＋高塩分食群に dapagliflozin を投与した結果、体重に差は認めなかったが、ブドウ糖負荷試験において血糖値は有意に低下しており耐糖能の改善を認めた。

4. 考察

C57BL/6J 雄マウスに高脂肪食(食塩濃度 0.38%)、あるいは高脂肪＋高塩分食(食塩濃度 4.0%)を負荷したところ、高脂肪＋高塩分食群は、体重増加が抑制されたにも関わらず耐糖能が悪化しており、ブドウ糖負荷後の血漿インスリン値は有意に低く、インスリン分泌不全を呈していることが示された。また、高脂肪食摂取 3 日～1 週間後に膵組織、単離膵島において、Ki67 や細胞周期関連因子の発現が増加するが、食塩過剰摂取が伴うとそれらの発現が抑制されることを見出した。また、膵の組織学的検討の結果、高脂肪＋高塩分食群では膵島の数や面積の低下していた。インスリン負荷試験の結果、インスリン感受性は高脂肪＋高塩分食で改善しており、インスリン感受性によっても補えないインスリン分泌不全を生じて耐糖能障害を呈していると想定された。一方で、普通食または高塩分食を給餌した場合は、両群に体重、耐糖能の差は認めなかったため、食塩過剰摂取は、高脂肪食によって誘導される膵 β 細胞増殖に対して抑制的に作用することが示唆された(文献 2)。

膵 β 細胞の増殖を示唆する Ki67 陽性細胞の増加は高脂肪食摂取後数日の段階で生じる。候補となる機序として自律神経系の関与を検討した。高塩分食によってマウスの尿中カテコラミン排泄が増加することを確認し、食塩摂取過剰によって交感神経系が活性化することが示唆された。膵 β 細胞に発現しているカテコラミン受容体は $\alpha 2$ 受容体であると報告されているため、yohimbin の膵 β 細胞増殖に対する影響を検討した。高脂肪食または高脂肪＋高塩分食を摂餌させ、yohimbin を腹腔内投与したマウス膵組織を用いて膵 β 細胞の Ki67 陽性率を解析した。摂餌後 3 日の検討において高脂肪食群に比較して、高脂肪＋高塩分食群では膵 β 細胞の Ki67 陽性細胞率は低下したものの、yohimbin 投与群において Ki67 陽性細胞率の上昇は認められなかった。薬剤を全身に作用させてい

ることから膵局所における $\alpha 2$ 遮断の影響を見出せなかった可能性もあると考えられた。今後薬剤の種類、投与量の変更も検討して病態解明を進める方針である。

高脂肪＋高塩分食を摂餌するマウスモデルは肥満が軽度でインスリン分泌不全を呈する糖尿病モデルと考えられる。このような病態に有用な糖尿病薬を検討する目的で、SGLT-2 阻害薬を投与してその効果を解析し、ブドウ糖負荷試験で耐糖能の改善を確認した。今後、インスリン分泌能の変化についても解析する予定である。

5. 今後の課題

今後、病態形成機序をより詳細に解析するために、マウスに高脂肪食または高脂肪＋高塩分食を給餌した後に膵島を単離して、単離膵島における遺伝子発現を解析し、食塩過剰摂取によって膵島で特異的に発現が変化する遺伝子群を同定することを検討している。また、単離膵島を用いて、各群のグルコース応答性インスリン分泌、増殖能の比較も検討課題である。

他に、減塩療法の効果の検討や SGLT-2 阻害薬以外の薬剤の効果も検討したい。

本研究を進展させることによって、食塩摂取量の適正化による 2 型糖尿病の予防・進展抑制、膵 β 細胞の増殖不全を標的とした 2 型糖尿病の新しい予防・治療法への応用を目指したい。

6. 文献

1. Valentine S Moullé, Caroline Tremblay, Anne-Laure Castell, Kevin Vivot, Mélanie Ethier, Grace Fergusson, Thierry Alquier, Julien Ghislain, Vincent Poitout. The autonomic nervous system regulates pancreatic β -cell proliferation in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019 317:E234
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 β -cell mass to cause glucose intolerance in mice under a high-fat diet. *PLOS One*. 16(3):e0248065. 2021.

Clarification of the Mechanism of Impaired Insulin Secretion Induced by Sodium Chloride Intake

Hiroshi Takagi

Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

Summary

Excessive intake of sodium chloride (NaCl) is known as a risk factor for hypertension, cardiovascular disorders, renal dysfunction. However, the association between excessive NaCl intake and type 2 diabetes has not been clarified. Excessive NaCl intake is expected to cause obesity and type 2 diabetes secondarily through increased appetite and intake of soft drinks, but some reports suggest that excessive NaCl intake also affects insulin secretion itself. In the experiments, 8-week-old C57BL/6J male mice were loaded with a normal diet (NaCl concentration 0.8%) or a high-salt diet (NaCl concentration 4.0%) for 30 weeks. No differences in body weight, glucose tolerance, and the number and area of pancreatic islets were observed between the two groups. Subsequently, 8-week-old C57BL/6 male mice were loaded with a high-fat diet (HFD, fat-derived calories 60%, NaCl concentration 0.4%) or a high-fat + high-salt diet (HFSD, fat-derived calories 60%, NaCl concentration 4.0%) for 30 weeks. As a result, in the HFSD diet group, although the weight gain was suppressed as compared with the HFD group, the glucose tolerance was deteriorated, and the plasma insulin level after glucose loading was significantly lower. It was shown to present with insulin deficiency. The number and area of pancreatic islets at 30 weeks were significantly lower in the HFSD group than in the HFD group. These results suggested that excessive salt intake may suppress the proliferation of pancreatic β -cells caused by ingestion of lipids. Therefore, after feeding a HFD or a HFSD for 3 to 7 days, pancreas or isolated islets were analyzed. Immunohistochemistry showed that the HFD group had a significantly higher Ki67-positive rate in pancreatic β -cells than the HFSD group. The mRNA expression of Ki67, Cyb1 and Cyd1 in isolated islets increased in the HFD group, whereas such an increase was not observed in the HFSD group. We confirmed that high-salt diet increased urinary catecholamine excretion in mice, suggesting that excessive salt intake activates the sympathetic nervous system. The α_2 receptor is assumed to mainly express in pancreatic β cells, so the change in the Ki67-positive cell rate in pancreatic β cells after α_2 blocker administration was investigated. Our mouse model fed a HFSD is considered as a model of diabetes in which obesity is mild and insulin secretion is deficient. The clarification of the pathophysiology of such a model may lead to the development of new treatments for diabetes.