

2022 年度

博士学位論文

インスリンが TRPV1 を介した
筋代謝受容器反射に及ぼす影響

**Impacts of insulin on the skeletal muscle metaboreflex via
TRPV1**

中部大学大学院
生命健康科学研究科 生命医科学専攻

堀 天

目次

第1章. 序論	4
1-1. 運動時の神経性循環調節機構	4
1-2. 2型糖尿病による運動時循環応答の過剰亢進	13
1-3. 仮説と目的	14
第2章. インスリンが脊髄後根神経節細胞上の TRPV1 に及ぼす影響 —<i>in vitro</i> の系における検討—	21
2-1. 実験動物	23
2-2. 脊髄後根神経節細胞の培養	23
2-3. 全細胞パッチクランプ法	24
2-4. 実験手順	25
2-5. データの取り込みと解析方法	26
2-6. 統計処理	26
2-7. 結果	27
第3章. インスリンが TRPV1 の活性化を介した交感神経活動および血圧 応答に及ぼす影響—<i>in vivo</i> の系における検討—	33
3-1. 実験動物	36
3-2. 外科手術	36
3-3. 実験の手順	39
3-4. データの取り込みと解析方法	40

3-5. 統計処理	42
3-6. 結果	42
第4章. 考察	52
4-1. インスリンによる TRPV1 感作の機序	52
4-2. 本研究の生命医科学分野における意義.....	61
4-3. 本研究の限界と長所	65
第5章. 結語	67
参考文献.....	68
謝辞.....	77

要旨

運動時、活動筋への酸素需要を満たすために循環応答は亢進する。循環器系疾患などの特定の疾患によって運動時の循環応答が過剰亢進することがあり、これが心筋梗塞や脳梗塞に代表される心血管イベントの発生リスクになることが報告されている。運動時の循環応答を過剰亢進させる疾患の 1 つに、インスリン抵抗性を主徴とする 2 型糖尿病がある。これは、活動筋における代謝産物によって反射的に循環応答が増大する筋代謝受容器反射が、2 型糖尿病によって亢進するためであることが報告されている。しかし、2 型糖尿病による筋代謝受容器反射の亢進の機序の全容解明には未だ至っていない。2 型糖尿病では、初期に高インスリン血症を呈する。筋代謝受容器反射を担うタンパク質に、transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) という陽イオンチャネルがあり、TRPV1 とインスリン受容体は筋代謝受容器反射の求心路である筋細径求心神経に共局在している。そこで我々は、インスリンが TRPV1 の感作を介して筋代謝受容器反射を亢進させると仮説を立てた。

健常な C57Bl/6J マウス由来の小型の培養脊髄後根神経節細胞を対象に全細胞パッチクランプ法を実施し、TRPV1 作動薬であるカプサイシン (1 μ M) 感受性

電流を測定した。インスリン（500 mU/ml）添加前後のカプサイシン感受性電流の増大は（n=13）、対照液である HEPES 緩衝液添加前後と比べて（n=14）、有意に高値を示した（ $P < 0.05$ ）。さらに、インスリン添加によるカプサイシン感受性電流の増大は、インスリン受容体拮抗薬である GSK1838705（2–20 nM）の添加によって（n=13）、有意に抑制された（ $P < 0.05$ ）。

次に、健常な Sprague–Dawley ラットを対象に、無麻酔・除脳下にてカプサイシン生理食塩水溶液（0.1 mL, 0.3 μ g）の下肢動脈投与に対する腎臓交感神経活動および平均血圧応答を測定した。対照の生理食塩水の筋注投与（対照試行：平均血圧，n = 18；腎臓交感神経活動，n = 9）と比べて、インスリン溶液（5 U/ml）筋注投与（インスリン試行：平均血圧，n = 22；腎臓交感神経活動，n = 8）は、腎臓交感神経活動および平均血圧応答を有意に増大させた（ $P < 0.05$ ）。

本研究により、脊髄後根神経節細胞において、カプサイシンに対する応答がインスリンにより増大することが明らかとなった。さらに、インスリンはカプサイシンに対する交感神経活動および血圧応答を増大させることも明らかとなった。以上の研究成果は、インスリンは筋細径求心神経において、TRPV1 を感作することで筋代謝受容器反射を亢進させるというインスリンの新規生理作用を示唆

する。また、本研究成果は 2 型糖尿病による筋代謝受容器反射の亢進の機序解明に寄与し得る。

第1章. 序論

1-1. 運動時の神経性循環調節機構

身体運動は我々人類に多様な健康的利益をもたらす。例えば、全死亡率の低下、認知機能の向上・改善、心理的ストレスの解消、生活習慣病の予防・改善などがある¹。また、身体運動の実施は健康的利益だけでなく、医療費の削減などによる経済的負担の軽減にもつながる²。そのため、身体運動や、身体活動量の増加が世界的に強く推奨されている²⁻⁵。米国スポーツ医学会は、成人において、中強度（およそ 3-5.9 metabolic equivalents; METs）の有酸素運動を週に 5 回以上、1 回に 30 分以上（合計で 150 分/週以上）、または高強度（6 METs 以上）の有酸素運動を週に 3 回以上、1 回に 20 分以上（合計で 75 分/週以上）に加え、主要筋群のレジスタンストレーニングを週に 2, 3 回以上行うことを推奨している³。

また、世界保健機関（WHO）は、全ての成人に対して、週に 150-300 分の中強度の有酸素的身体活動または、75-150 分の高強度の有酸素的身体活動を行うことを推奨している⁵。わが国においても 2013 年に、健康づくりのための身体活動基準 2013 が策定され、64 歳以下の成人に対しては、3METs 以上の強度の運動またはそれと同等の強度の身体活動を毎日 60 分は行うことを運動指針として打ち出している⁶。

運動時、ヒトは様々な生理応答を引き起こすことにより、運動の継続・適応が可能となる。運動時の生理応答の 1 つに、心拍数や血圧などの循環応答の増大がある。これは、活動筋の酸素需要の増大を満たすために重要な生理応答であり、強度依存的に変化する^{7,8}。

自律神経系は運動時の循環調節において重要な役割を担う。運動時、心臓を支配する副交感神経活動は減弱し、心臓および全身の血管を支配する交感神経活動は増大する。この運動時の自律神経活動の変化は、主に圧受容器反射、セントラルコマンド、そして運動昇圧反射によって調節されており、心拍数や血圧の増大に寄与している⁹⁻¹³。

圧受容器反射は、安静時および運動時の循環応答におけるネガティブフィードバック調節を担っている。圧受容器反射には、動脈圧受容器反射と、心肺圧受容器反射と呼ばれる反射があり、前者は、大動脈弓ならびに頸動脈洞に位置する受容器が、血圧の変化を感知することで、自律神経活動を調節する¹⁴⁻¹⁶。後者の心肺圧受容器反射は、心臓、大静脈、肺血管に位置する受容器が、血液量の変化を感知することで、自律神経活動を調節する反射である^{14,17}。圧受容器反射では血圧増大を感知、心肺圧受容器反射では血液量の増大を感知すると、交感神経活

動を減弱させて血圧を下げようと働き、反対に圧受容器反射が血圧の低下、心肺圧受容器反射が血液量の低下を感知すると、交感神経活動を増大させて血圧を上げようと働く。通常、運動時に血圧は増大するが、圧受容器反射特性は維持されている。運動時には、圧受容器反射の作動する血圧閾値が高値へシフトするリセッティングが起こり、安静時と比べて高い血圧調節の動作点にて圧受容器反射が作動するため、運動時の血圧増大に寄与している¹⁴⁻¹⁶。

セントラルコマンドとは、高次脳中枢から発せられる電気信号が、運動指令と並行して循環中枢を活性化させることで循環応答を増大させるフィードフォワード調節機構と考えられている^{7,18-23}。セントラルコマンドの発生機序は不明な点が多いが、近年、中脳歩行誘発野から、循環中枢を担う頭側延髄腹外側野への入力がセントラルコマンドにおいて重要な経路を担うことが示唆された²⁴。また、セントラルコマンドによる昇圧応答の程度は、運動に対する努力感覚に依存すると考えられている^{22,23}。

1937年に活動筋由来の循環調節機構の存在が提案され²⁵、その後、運動昇圧反射と呼ばれる活動筋由来のフィードバック調節機構の存在が明らかとなった^{11,26-29}。運動昇圧反射は、活動筋の伸張や短縮といった機械刺激や、代謝産物に

よる化学刺激によって循環応答の増大が引き起こされる，筋細径求心神経を介した末梢性反射である²⁵⁻²⁹．運動昇圧反射のうち，機械刺激により起こる反射は筋機械受容器反射，化学刺激により起こる反射は筋代謝受容器反射と呼ばれている¹³．ここで，運動昇圧反射の経路を図1に示した．

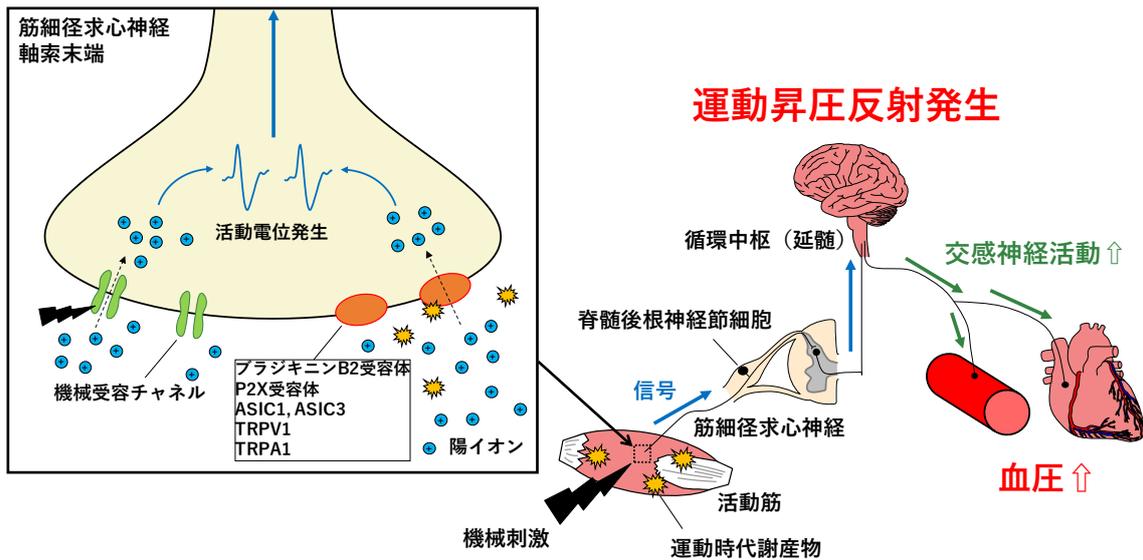


図 1. 運動昇圧反射

運動時、活動筋の伸張や短縮といった機械刺激や、代謝産物による化学刺激を、筋細径求心神経軸索末端に存在するイオンチャネルなどの特定のタンパク質が感知する。それにより発生した電気的信号が筋細径求心神経を介し、循環中枢の延髄に送られることで交感神経活動が増大し、結果的に循環応答が増大する。以上の一連の流れが運動昇圧反射の発生機序である。ASIC1, acid-sensing ion channel 1; ASIC3, acid-sensing ion channel 3; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1; TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1.

筋細径求心神経の軸索末端に発現している特定のタンパク質が活動筋における化学刺激および機械刺激を感知することが運動昇圧反射の起源であると考えられている^{10,12,13,30-33}。これまでに、筋代謝受容器反射における内因性化学刺激の感知に関与するタンパク質として、ブラジキニン B2 受容体^{34,35}、ATP を感受する P2X 受容体³⁶⁻³⁸、水素イオンを感受する酸感受性イオンチャネル (acid-sensing ion channel, ASIC) の内の ASIC1 と ASIC3³⁹⁻⁴⁴、酸 (水素イオン)、リポキシゲナーゼ産物、アナンダミドを感受する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)^{34,45,46} (図 2)、また、ブラジキニン⁴⁷ や、過酸化水素^{48,49}、酸素⁵⁰ によって活性化される TRP ankyrin 1 (TRPA1)⁵¹ が報告されている。一方で、筋機械受容器反射の起源における機械刺激の感知に関与するタンパク質は不明な点が多いが、近年、齧歯類を対象にした *in vivo* の系の実験から、機械受容チャネルとして同定された Piezo チャネル⁵² が、筋機械受容器反射に関与することが示唆された⁵³。

活動筋の化学刺激および機械刺激により発生した電気信号は、筋細径求心神経を介して脊髄後角において 2 次ニューロンに投射された後に、循環中枢である延髄に投射される¹²。これにより、交感神経活動の増大と副交感神経活動の抑

制を通じて、心拍数および血圧の増大をもたらす¹²。

重要なことに、運動時の循環応答の増大は生体において重要な生理応答である一方で、その過剰な増大は急性心筋梗塞や、脳梗塞などの心血管イベント発生のリスクを増大させることがいくつもの追跡研究⁵⁴⁻⁶¹によって報告されている(表1)。

表 1. 運動時循環応答と心血管イベントとの関係性を報告した追跡研究

文献	対象者	年齢	運動種目	心血管イベントに関連した運動時循環指標	関連する心血管イベント
Mundal et al., 1994 ⁵⁴	健康な就労男性 (n = 31984)	40-59歳	自転車運動	収縮期血圧	心血管疾患による死亡
Kurl et al., 2001 ⁵⁵	冠動脈疾患や脳卒中の既往がなく、 降圧剤を服用していない男性 (n = 1026)	42-60歳	自転車運動	収縮期血圧	虚血性脳卒中
Laukkanen et al., 2004 ⁵⁶	男性 (n = 2336)	42-61歳	自転車運動	収縮期血圧	急性心筋梗塞
Laukkanen et al., 2006 ⁵⁷	冠動脈疾患の既往のない男性 (n = 1731)	42-61歳	自転車運動	収縮期血圧	急性心筋梗塞
Lewis et al., 2008 ⁵⁸	心血管疾患の既往がなく、 降圧剤を服用していない男女 (n = 3045)	20-69歳	走行運動	拡張期血圧	心血管疾患
Weiss et al., 2010 ⁵⁹	収縮期/拡張期血圧が140/90 mmHg未満の 健康な男女 (n = 6578)	30-70歳	走行運動	収縮期/拡張期血圧	心血管疾患による死亡
Mariampillai et al., 2020 ⁶⁰	心血管疾患や糖尿病などの慢性疾患を有さ ず、降圧剤を服用していない健康な男性 (n = 2014)	40-59歳	自転車運動	収縮期血圧	冠動脈疾患
Jae et al., 2020 ⁶¹	心血管系疾患を有する男性 (n = 884) と 有さない男性 (n = 1526)	42-61歳	自転車運動	収縮期血圧	心臓突然死

ここに示した文献は、運動時血圧応答が高値であると心血管イベント発生やそれに伴う死亡のリスクが高まることを追跡研究にて報告している。

例えば、Mittleman ら⁶²は、6METs 以上の強度の身体活動中または身体活動後 1 時間以内の心血管イベント発生のリスクは、安静時と比べて約 5.9 倍高いことを報告している。Kurl ら⁵⁵は、自転車エルゴメーターを用いて、毎分 20W ずつ負荷が増加する漸増運動負荷試験に対する収縮期血圧の上昇率が平均 19.7 mmHg/分よりも大きい者は、その上昇率が 16.1 mmHg/分よりも小さい者と比べて、虚血性脳卒中の発生リスクが 2.3 倍高いことを報告した。さらに、Laukkanen ら⁵⁷は、上記と同様の自転車エルゴメーターによる漸増運動負荷試験中の収縮期血圧の最大値が 230 mmHg よりも高い場合は、急性心筋梗塞の発生リスクが 2.47 倍高くなることを示した。さらに近年、中強度程度（100W）の自転車運動中の収縮期血圧の最大値は、冠動脈疾患の発生リスクと直線的な関係にあることが示された⁶⁰。興味深いことに、Weiss ら⁵⁹は、安静時の血圧が正常範囲内（収縮期血圧 120 mmHg 未満かつ、拡張期血圧 80 mmHg 未満）だとしても、運動時の血圧応答が高値であると、将来心血管イベント発生による死亡リスクが 2.44 倍増加することを報告している。以上の先行研究より、安静時血圧の評価が臨床において重要であることは良く知られているが、それに加えて運動時の循環応答も評価する臨床的意義は高いと考えられる。運動時の突然死のほとんどの原

因が心血管イベント発生によるものであり⁶³、中年者における運動関連急性心停止は、100万人当たり年間22人程度であり、これは急性心停止全体の約5%を占めるとの報告もある⁶⁴。以上より、運動時の循環応答の過剰亢進の機序解明は急務と言えるだろう。

1-2. 2型糖尿病による運動時循環応答の過剰亢進

循環器系疾患をはじめとした疾患によって運動時の循環応答が過剰亢進することが報告されている^{10,12,13}。その1つに2型糖尿病がある。2型糖尿病とは、インスリン抵抗性の増大と慢性高血糖を主徴とする代謝性疾患であり、生活習慣病の1つである。これまでに、2型糖尿病は心血管イベント発生のリスクやそれによる死亡リスクを増大させることが明らかにされている⁶⁵⁻⁶⁷。Mittlemanら⁶²は、6METs以上の身体活動中またはその後1時間以内の心血管イベント発生のリスクについて、糖尿病を有していない者では、安静時と比べて約5.4倍高い一方で、糖尿病患者におけるそれは約18.9倍高いことを報告していることから、運動時循環応答の過剰亢進が、心血管イベント発生のリスク増大に関与している可能性がある。Holwerdaら⁶⁸は、最大随意筋力の30%および40%の強度の等尺性ハンドグリップ運動に対する筋交感神経活動および平均血圧応答において、

2 型糖尿病患者は健常者と比べて高値であることを明らかにした。これまでに、2 型糖尿病によって、低強度から高強度までの様々な運動強度において運動時循環応答の亢進が観察されており、運動様式においても静的収縮⁶⁸⁻⁷¹だけでなく、動的収縮⁷²⁻⁷⁵においても循環応答の亢進が報告されている。また、2 型糖尿病による運動時の過剰循環応答亢進は、男女ともに報告されており、年齢においても青年から高齢者までの幅広い年齢層で観察されている⁶⁸⁻⁷⁵。加えて、2 型糖尿病モデル動物を用いた研究においても同様に、運動を模擬した機械・化学刺激や電気刺激を用いた筋収縮に対する循環応答が亢進することを示している⁷⁶⁻⁷⁸。このように、いくつもの先行研究が 2 型糖尿病による運動時循環応答の過剰亢進を報告しているものの、重要なことに、2 型糖尿病による運動時循環応答の過剰亢進の機序の全容解明には至っていない。

1-3. 仮説と目的

これまでに、2 型糖尿病によって筋代謝受容器反射が亢進する可能性が示されている⁶⁸。Holwerda ら⁶⁸は、等尺性ハンドグリップ運動後直後に、カフを用いて活動筋への循環を閉塞すること（運動後虚血）で筋代謝受容器反射を評価した。その結果、2 型糖尿病患者では健常者と比較して、運動後虚血に対する筋交感神

経活動および平均血圧応答が高値を示した⁶⁸。この結果より、2型糖尿病による運動時の循環応答の過剰亢進に、筋代謝受容器反射の亢進が関与する可能性が示された。これまでに、2型糖尿病モデル動物において、糖尿病による高血糖誘発性の筋細径求心神経上の TRPV1 の感作が、筋代謝受容器反射の亢進に関与することが示唆されている^{77,79}。しかし、2型糖尿病により筋代謝受容器反射が亢進する機序の全容は今のところ明らかとなっていない。

TRPV1 とは、カプサイシン、アナンダミドなどのリガンドや、43°C以上の熱や pH5.9 以下の酸によって活性化する非選択的陽イオンチャネルである⁸⁰⁻⁸⁶(図2)。これまでに動物やヒトを対象とした実験で TRPV1 が筋代謝受容器反射に関与する結果が示されており、筋代謝受容器反射を担うタンパク質であると考えられている^{34,45,77,87,88}。

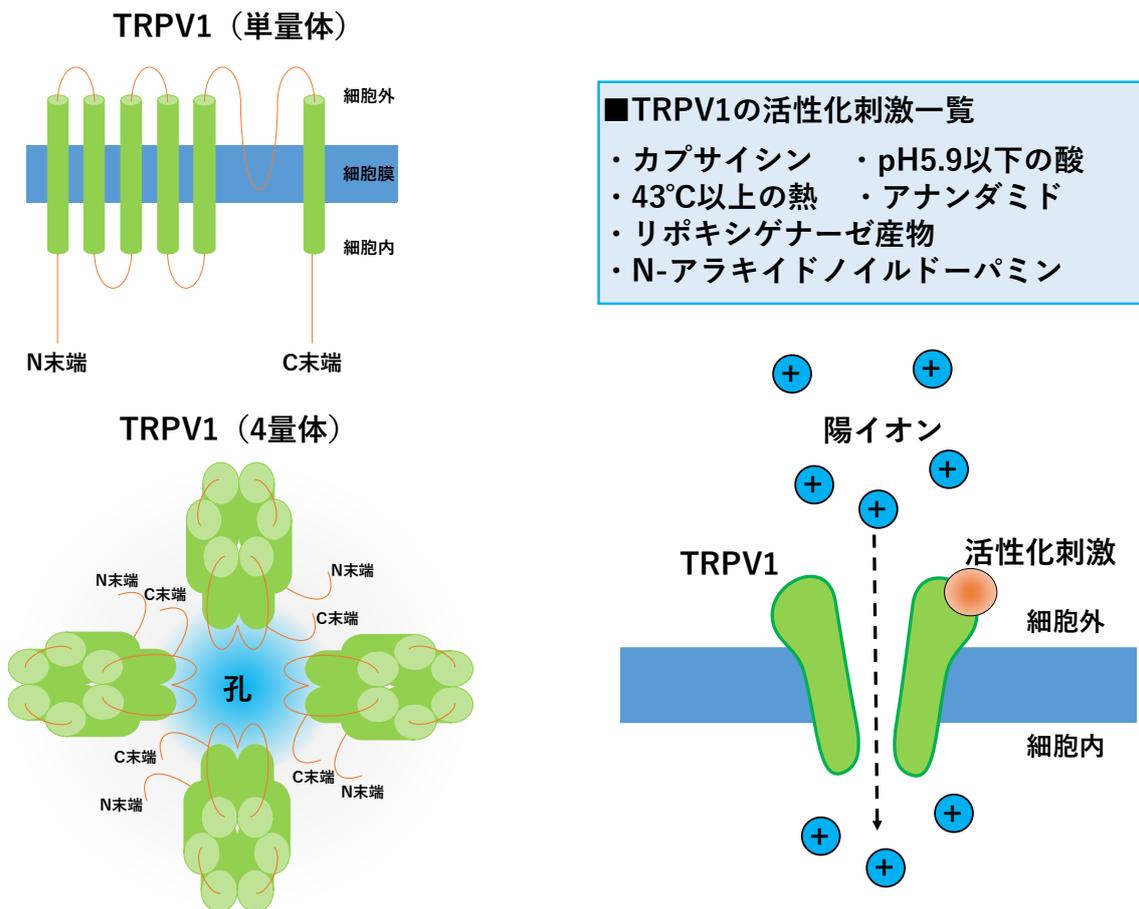


図 2. transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)

富永⁸⁹および堀⁹⁰を参考に作成した. 非選択的カチオンチャネルである TRPV1 は, 様々な哺乳類に発現しているが, ヒトの TRPV1 は 839 個のアミノ酸から構成される^{80,91}. TRPV1 は, 細胞膜 6 回貫通型のイオンチャネルタンパク質 (図の左上) が 4 量体を構成して陽イオンが透過する孔を形成していると考えられている (図の左下)^{92,93}. また, TRPV1 の N (アミノ) 末端と C (カルボキシ) 末端は細胞内に面していると考えられている^{92,93}. TRPV1 の活性化刺激として, カプサイシン, pH5.9 以下の酸, 43°C以上の熱, アナンダミド, リポキシゲナーゼ産物や, N-アラキイドノイルドーパミンがこれまでに報告されており⁸⁰⁻⁸⁶, TRPV1 が活性化されることで細胞内に陽イオン (カチオン) が流入する (図の右下). これにより脱分極 (起動電位) が発生し, 電位依存性イオンチャネルが活性化されることで活動電位が生じる⁸⁹. また, pH5.9 よりも弱い酸や, ATP, ブラジキニン, プロテアーゼ受容体 PAR-2 作動薬 (SL-NH₂) により温度閾値が低下し, 体温以下の熱 (< 約 37°C) でも活性化することが示されている⁹⁴⁻⁹⁸.

2型糖尿病では、初期にインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症を呈することが一般的である⁹⁹。これまでに我々は、非糖尿病の健康な高齢者を対象に、インスリンと運動時の血圧応答との関連性を検討した¹⁰⁰。すると、インスリン抵抗性の指標である homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) が異常高値である者は、正常範囲内の者と比べて、最大随意筋力の30%強度の1分間の等尺性ハンドグリップ運動後の虚血中（すなわち筋代謝受容器反射が生じている/亢進している状態）の低強度動的運動に対する拡張期血圧応答が有意に高くなることを明らかにした。さらに、HOMA-IRとは別のインスリン抵抗性関連指標であるヘモグロビンA1cは、上記と同様の等尺性運動後の虚血時に実施した低強度動的運動に対する拡張期血圧と有意な関連があることが示され、インスリンが運動時循環応答に関与する可能性が示唆された。筋細径求心神経上にはインスリン受容体が発現しており、神経の保護作用や神経細胞新生、機械的な侵害刺激の受容に関与することが示唆されている¹⁰¹⁻¹⁰³。重要なことに、TRPV1とインスリン受容体は筋細径求心神経上に共局在している¹⁰⁴。そこで我々は、インスリンがインスリン受容体を介してTRPV1を感作することで、筋代謝受容器反射を亢進させるとの仮説を立てた（図3）。

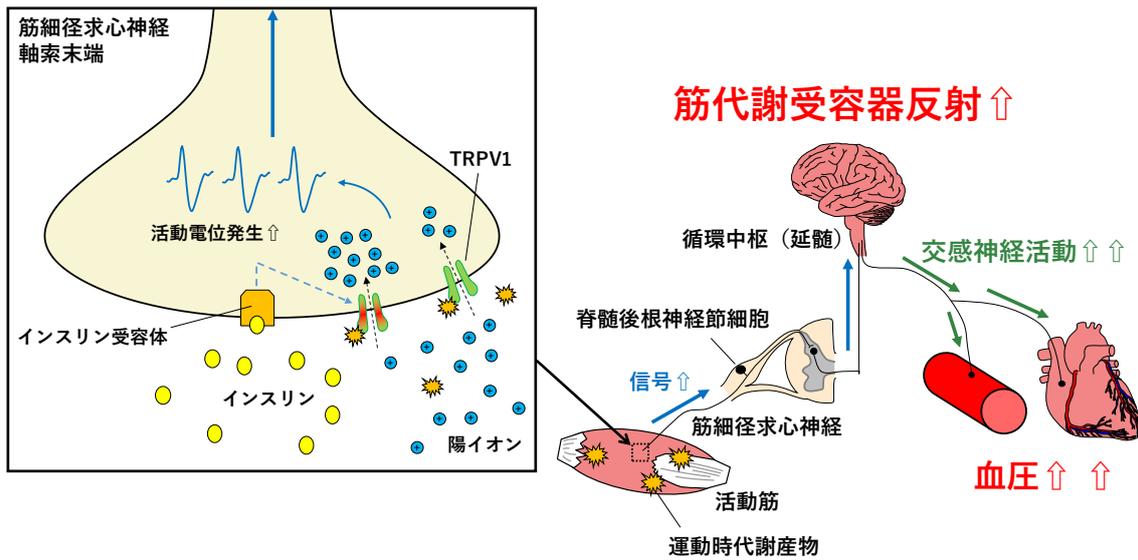


図 3. 本研究の仮説

堀⁹⁰を参考に作成した。transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) は筋細径求心神経に発現しており筋代謝受容器反射を担うイオンチャネルと考えられている^{34,45,77,87,88}。また、TRPV1 はインスリン受容体と共局在している¹⁰⁴。そこで、我々は運動時に放出される一部の物質（水素イオンやアナンダミド¹⁰⁵、リポキシゲナーゼ産物¹⁰⁶など）による TRPV1 の活性化が、インスリンによるインスリン受容体を介した感作により増大することで、筋代謝受容器反射が亢進するという仮説を立てた。

これまでに我々は、健常な Sprague-Dawley ラットの筋-神経標本を対象に、*ex vivo* の系の単一神経記録法を実施したところ、TRPV1 作動薬のカプサイシンに対する単一の筋細径求心神経の応答がインスリンにより増大すること、さらにインスリンによるその増大は、インスリン受容体拮抗薬によって抑制されることを明らかにした⁹⁰。しかし、この実験系では、電位依存性イオンチャネルの活性化も含めた神経活動応答を評価しているため、TRPV1 の活性化を純粋に評価することはできない。TRPV1 の活性化を純粋に評価するために、筋代謝受容器反射の求心路を担う、小型の脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) 細胞を対象に、単一細胞の TRPV1 の活性化を評価することが有効であると考えられた。また、インスリンによるカプサイシンに対する筋細径求心神経の活動の増大が、交感神経活動や血圧応答の増大として表現されるか否かも不明である。そこで、本研究は、(1) 筋代謝受容器反射の求心路を担う、小型 DRG 細胞において、インスリンが TRPV1 に及ぼす影響を *in vitro* の系にて明らかにすること、(2) インスリンが TRPV1 を介した交感神経活動および血圧応答に及ぼす影響を *in vivo* の系にて明らかにすることを目的とした。

なお、本博士論文における研究成果は、修士論文⁹⁰の研究成果の一部と合わ

せて公表している¹⁰⁷.

第2章. インスリンが脊髄後根神経節細胞上の TRPV1 に及ぼす影響

—*in vitro* の系における検討—

運動時循環応答に関与する一次求心神経の小型神経細胞レベルにて，インスリンが TRPV1 に及ぼす影響を検討するために，培養した小型 DRG 細胞を対象に全細胞パッチクランプ法を用いて，インスリンによるカプサイシンに対する応答の変化を評価した (図 4).

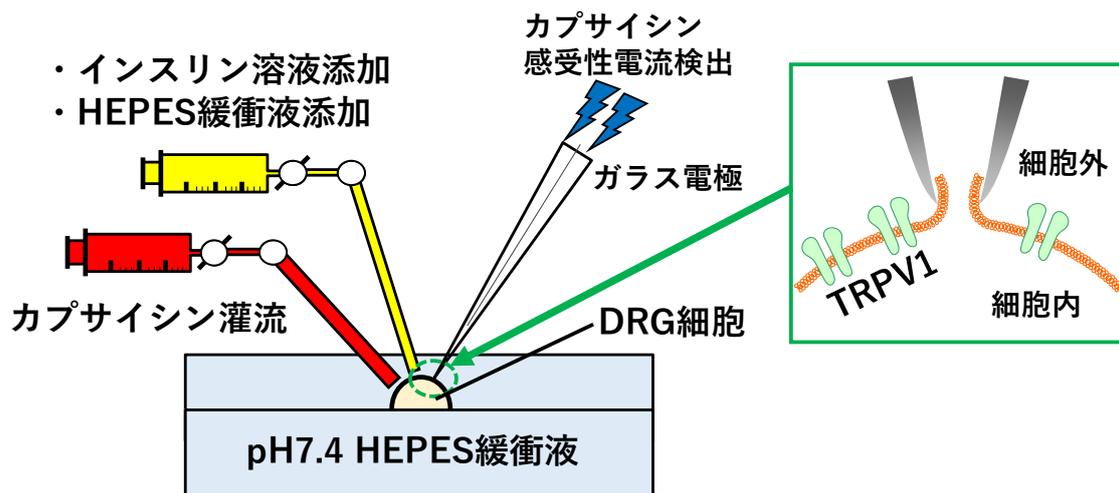


図4. 全細胞パッチクランプ法

transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) のカプサイシンによる活性化を評価するために、培養した小型の脊髄後根神経節 (DRG) 細胞に対してカプサイシンを灌流し、その際に生じる内向き電流 (カプサイシン感受性電流) を測定した。さらに、インスリン溶液または HEPES 緩衝液 (コントロール溶液) を添加した後に再びカプサイシンを灌流し、TRPV1 の活性化の変化を評価した。

2-1. 実験動物

健常な週齢 3-6 週（体重 12-24 g）の C57Bl/6J マウス 22 匹を対象とした。すべてのマウスは、12 時間の明暗サイクルかつ、室温 22-24°C に管理された環境のケージ内で飼育された。なお、1 ケージあたり 1-4 匹を飼育し、餌および水は 24 時間自由に摂取させた。DRG 細胞採取の当日に、二酸化炭素を用いて安楽死させた。なお、本実験は、中部大学動物実験委員会にて承認された実験計画に基づき実施された（承認番号 202120007, 修正番号 21-038）。

2-2. 脊髄後根神経節細胞の培養

DRG 細胞の培養方法は、先行研究に従った^{108,109}。安楽死させたマウスの脊椎から DRG を摘出し、コラゲナーゼ IV（1.0 mg/ml, Sigma）で約 30 分間処理することにより DRG に付着するコラーゲンを分解した。続けて、DRG 細胞に付着した余分なタンパク質を除去するために、トリプシン-EDTA（0.05%, Sigma）で約 20 分間処理した。両処理とも、37°C 下で行った。その後、室温にてトリプシン阻害薬（0.08 mg/ml, 富士フイルム和光純薬）で 5 分間処理することにより、酵素反応を停止させた。その後 DRG 細胞を、神経成長因子（0.1 µg/ml, NGF-7S, Sigma）、ウシ胎児血清（5%, 富士フイルム和光純薬）、glutamax（1%, Thermo Fisher

Scientific), グルコース (0.8%), ペニシリン-ストレプトマイシン (10 μ l/ml, Sigma) を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 (富士フィルム和光純薬) を用いて, 火炎研磨されたパスツール・ピペットにて洗浄した. そして, DRG 細胞をポリ-L-リジン (0.1 mg/ml, Sigma) とラミニン (0.13%, Thermo Fisher Scientific) でコーティングされたカバーガラス上に置いた. その後, DRG 細胞はインキュベーター内で 2 日間培養した.

2-3. 全細胞パッチクランプ法

全細胞パッチクランプ記録は室温にて実施された. ガラス電極は, マイクロピペットプレー (P-97, Sutter Instrument) を用いてガラス管 (G-1.5, NARISHIGE) から作成した. ガラス電極内は, 1 N の水酸化カリウムで pH を約 7.3 に調製した溶液 (NaCl: 10, KCl: 130, MgCl₂: 1, EGTA: 1, HEPES: 10, ATP: 2, GTP: 0.2 [mM]) で満たした. また, 細胞外液として, 1 N の水酸化ナトリウムで pH を約 7.4 に調整した HEPES 緩衝溶液 (NaCl: 140, KCl: 5, CaCl₂: 2, MgCl₂: 2, グルコース: 10, HEPES: 10 [mM]) を使用した. 細胞外液を灌流させたチャンバー内に, DRG 細胞が接着したガラスカバーを設置した. マニピュレータを用いて DRG 細胞表面にガラス電極を近づけ, ガラス電極内に陰圧をかけることでギガ Ω シールを形

成した。さらに陰圧を付加することで、電極先端の細胞膜を穿孔してホールセルを形成した。そして、細胞膜電位を-60 mV に固定して、細胞膜を通過する内向き電流を測定した。

2-4. 実験手順

標的の小型 DRG 細胞に対して 1 μ M のカプサイシン(富士フィルム和光純薬)を灌流した。1 μ M のカプサイシンで応答を示さない場合、5 μ M のカプサイシンを灌流し、それでも反応を示さない場合は、10 μ M のカプサイシンを灌流した⁹⁴。その後、HEPES 緩衝液 (コントロール試行) または、500 mU/mL のインスリン溶液 (NovoRapid, Novo Nordisk) を標的の DRG 細胞に添加した (インスリン試行)。なお、使用したインスリン濃度は先行研究^{108,110}を参考にした。さらに、インスリン受容体の関与を検討するために、2 nM または 20 nM のインスリン受容体拮抗薬 (GSK1838705, Tocris) を 2-6 時間培養地に添加した DRG 細胞を標的として、インスリン溶液を添加する試行 (GSK1838705+インスリン試行) を実施した。そして、HEPES 緩衝液またはインスリン溶液添加後に、再びカプサイシンを灌流した。灌流したカプサイシンの濃度および灌流時間は、各溶液添加前後で同じにした。

2-5. データの取り込みと解析方法

細胞の内向き電流および膜電位は、パッチクランプ増幅器 (Axopatch 200B, Molecular Devices) にて増幅後、アナログデータを Digidata 1550A (Molecular Devices) にてデジタル化し、Clampex ソフトウェア (Molecular Devices) を介してコンピューターに記録し分析した。

カプサイシンに対する反応の大きさを定量化するために、Clampex ソフトウェアを用いて、カプサイシン暴露によって惹起された内向き電流を記録し、その時の積分値を算出した。そして、DRG 細胞のカプサイシン暴露中の振幅が、50 pA 以上であれば、カプサイシン感受性のある細胞と定義し¹¹¹、その際の内向き電流をカプサイシン感受性電流とした。

2-6. 統計処理

初めに、正規性を確認するために Shapiro-Wilk 検定を実施した。一对の比較には、対応のない t 検定または Mann-Whitney U 検定を適宜用いた。3 試行間の比較には、対応のない 1 要因分散分析または、Kruskal-Wallis 検定を実施し、有意であった場合は Bonferroni 法による多重比較を行った。

全ての統計処理は、SPSS Statistics 25.0 for windows (IBM) を使用した。有意水準は 5%未満とし、値は平均値±標準偏差で示した。

2-7. 結果

本研究では、カプサイシンに反応を示す 40 個の小型 DRG 細胞¹¹²を同定した (直径: $21.4 \pm 3.5 \mu\text{m}$ [範囲: 15.3 – 29.2 μm])。初めのカプサイシン投与前のガラス電極とチャンバー内灌流液間の抵抗は、 $6.5 \pm 1.5 \text{M}\Omega$ であり、膜電位は、 $-52.1 \pm 10.3 \text{mV}$ であった。また、小型 DRG 細胞の直径および膜電位は、試行間に有意差はみられなかった (表 2)。

表 2. 培養小型脊髄後根神経節細胞の直径および膜電位

	直径 (μm)	膜電位 (mV)
コントロール試行 (n = 14)	20.2 \pm 3.4	-49.2 \pm 9.0
インスリン試行 (n = 13)	22.7 \pm 4.6	-53.4 \pm 11.8
GSK1838705 + インスリン試行 (n = 13)	21.5 \pm 1.8	-54.0 \pm 9.9
	$P = 0.19$	$P = 0.22$

試行間の比較には、対応のない 1 要因分散分析または Kruskal–Wallis 検定を実施した。値は平均値 \pm 標準偏差。

図5は、培養した小型 DRG 細胞のカプサイシン感受性電流の各試行の典型例を示している。コントロール試行では、溶液添加後にカプサイシン感受性電流が減弱するような傾向を示した。一方で、インスリン試行では、溶液添加後にカプサイシン感受性電流が増大することが観察された。さらに、培養中にインスリン受容体拮抗薬を添加した小型 DRG 細胞では、インスリン添加によるカプサイシン感受性電流の増大が抑制されることが観察された。

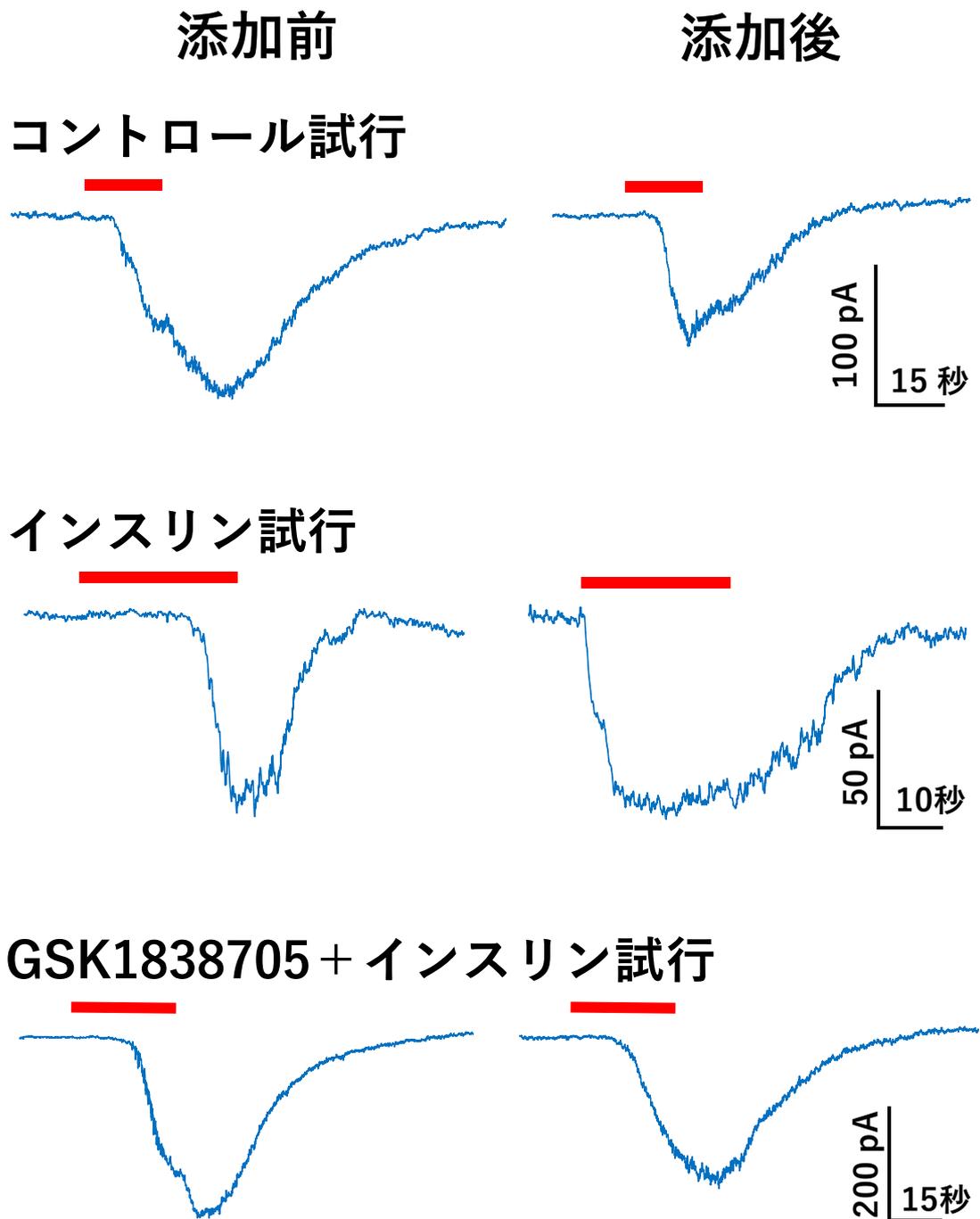


図 5. 培養小型脊髄後根神経節 (DRG) 細胞における HEPES 緩衝液 (コントロール試行), またはインスリン溶液 (インスリン試行) の添加前後のカプサイシン感受性電流の典型例および, 培養中にインスリン受容体拮抗薬を添加された小型 DRG 細胞におけるインスリン溶液 (GSK1838705+インスリン試行) 添加前後のカプサイシン感受性電流の典型例

赤色のバーは, カプサイシン投与期間を示している.

図 6 に、カプサイシン感受性電流の倍率変化（添加後/添加前）を示した。本研究では、全体で 60.0%の小型 DRG 細胞において、溶液添加後のカプサイシン感受性電流が、添加前のそれと比べて小さかった。これはカプサイシンの短時間の繰り返し暴露によるタキフィラキシー（急性の脱感作）であると考えられた。一方で、カプサイシン感受性電流の倍率変化が 1.2 倍以上のものをカプサイシンに対する反応の大きさが増大したと仮定した場合、コントロール試行では 3 標本 (21.4%)、GSK1838705+インスリン試行では 1 標本 (7.7%) のみ見られた一方で、インスリン試行では 7 標本 (53.8%) 観察された (図 6)。

本研究ではインスリン受容体拮抗薬の濃度を 20 nM (n=3) と 2 nM (n=10) の 2 つの異なる濃度を用いた。しかし、この濃度間に、インスリン溶液添加前後のカプサイシン感受性電流の倍率変化に有意な違いはみられなかったため (20 nM: 0.71 ± 0.16 , 2 nM: 0.64 ± 0.44 , $P = 0.67$)、検定力の向上のために 2 つの濃度試行のデータを統合して試行間の比較を行った。インスリン試行の倍率変化はコントロール試行のそれと比べて有意に高値であり、さらに、GSK1838705+インスリン試行は、インスリン試行と比べて有意に低値を示した (図 6)。

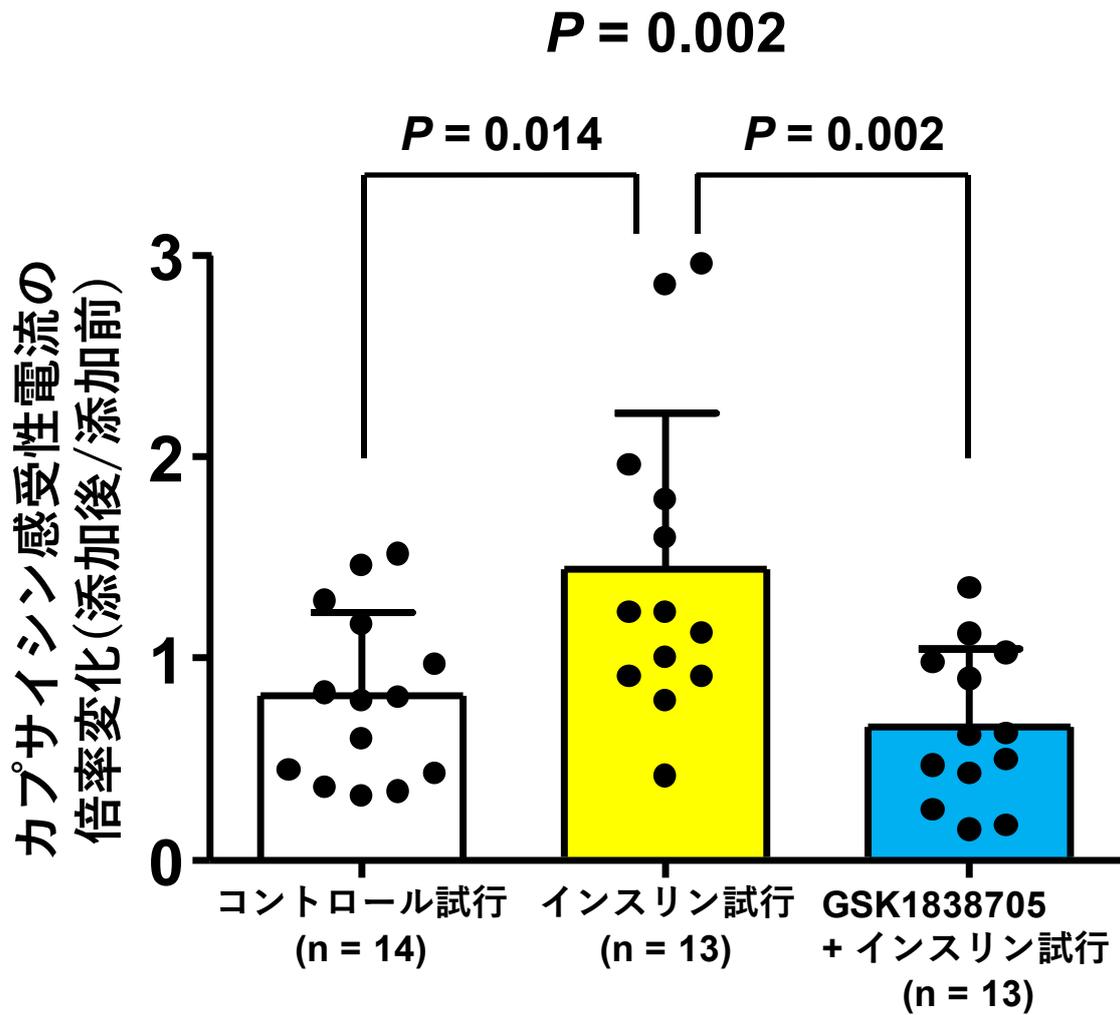


図 6. 培養小型脊髄後根神経節 (DRG) 細胞における HEPES 緩衝液 (コントロール試行), またはインスリン溶液 (インスリン試行) 添加前後のカプサイシン感受性電流の倍率変化および, 培養中にインスリン受容体拮抗薬を添加された小型 DRG 細胞におけるインスリン溶液 (GSK1838705+インスリン試行) 添加前後のカプサイシン感受性電流の倍率変化

試行間の比較には, 対応のない 1 要因分散分析とそれに続く Bonferroni 法による多重比較を実施した. 黒色の円は個々のデータを示している. 値は平均値+標準偏差.

第3章. インスリンが TRPV1 の活性化を介した交感神経活動および血圧 応答に及ぼす影響—*in vivo* の系における検討—

我々のこれまでの研究成果⁹⁰と、第2章の実験結果より、筋細径求心神経および培養小型 DRG 細胞において、インスリンはカプサイシンに対する応答を増大させることを明らかにした。そこで、インスリンによってカプサイシンに対する交感神経活動および血圧応答が増大するのかを検討するために、無麻酔・除脳動物を用いた *in vivo* の実験系によって検討した (図 7A)。

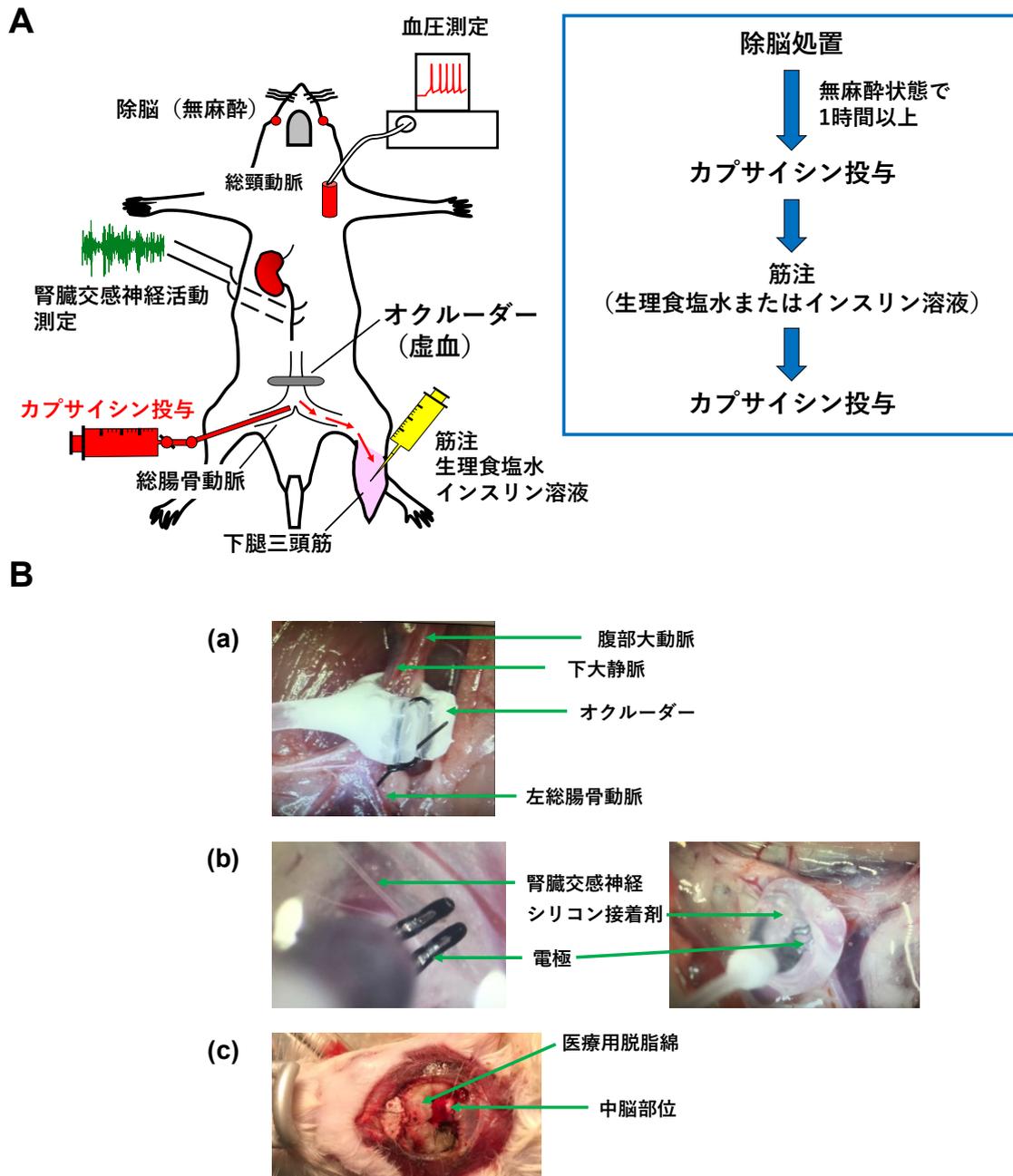


図7. カプサイシンに対する腎臓交感神経活動および血圧応答の測定法および除脳処置

A は、カプサイシンに対する腎臓交感神経活動および血圧応答の測定法と測定手順の概要を示してある。総頸動脈から動脈圧を測定し、腎臓交感神経から交感神経活動を測定した。麻酔による循環応答への影響を排除するために¹¹³、除脳処置を行った。その後、無麻酔状態にて1時間以上経過した後にカプサイシン投与に対する腎臓交感神経活動および血圧応答を測定した。また、右下肢にカプサイシンを灌流するために、カプサイシン投与前から腹部大動脈分岐部直上

の腹部大動脈および下大静脈に設置されたオクルーダーにて循環を遮断した。その後、コントロール溶液である生理食塩水またはインスリン溶液を下腿三頭筋に筋注し、再びカプサイシンを投与し、腎臓交感神経活動および血圧応答の変化を評価した。B は、腹部大動脈分岐部直上の腹部大動脈および下大静脈に設置されたオクルーダー (a)、腎臓交感神経 (b)、除脳処置 (c) に関する写真である。一時的かつ可逆的な下肢静脈の遮断のために、オクルーダーを用いて加圧することで、腹部大動脈および下大静脈を遮断した (a)。腎臓交感神経と電極を固定するためにシリコン接着剤を用いた (b)。除脳処置では、上丘前縁 (precollicular) レベルで除脳を行い、除脳部位には医療用脱脂綿を敷き詰めて止血を防ぎ、パラフィンオイルを満たした (c)。

3-1. 実験動物

健常な雄性の Sprague-Dawley ラット (n=47, 体重, 335 ± 43 g; 週齢, 10 ± 1 週) を用いた. すべてのラットは, 1 ケージあたり 1-3 匹にて 12 時間の明暗サイクルかつ, 室温 $22-24^{\circ}\text{C}$ に管理された環境で飼育され, 餌および水は 24 時間自由摂取であった. なお, 本実験は, 中部大学動物実験委員会にて承認された実験計画に基づき実施された (承認番号 202120007, 修正番号 21-038).

3-2. 外科手術

ほぼすべての外科的手術は, 先行研究と同様の方法に従って行われた^{88,113,114}. 外科的手術は, 100%濃度の酸素ガスと 1-4%濃度のイソフルラン (富士フィルム和光純薬) の混合ガスによる麻酔下にて行われた. 手術中はサーモメータ (BAT-12, Physitemp) で直腸温を測定し, 体温を $35.5-37.5^{\circ}\text{C}$ に保つように, 加熱パッドや発熱ランプを用いた. また, ピンセットを用いたテールピンチ法によって麻酔の深度が適切に保たれているかを適宜評価した.

まず, 頸部を切開し, 気管切開を行って気管支に挿管し, 人工呼吸器 (シナノ製作所) につなげて人工的に換気を行った. この時, 1 回換気量は $2-4$ mL, 呼吸数は約 70 回/分を保った. また, 心電図は, 上肢に針電極を付けることで II 誘

導法により記録した。

次に、血圧の測定のために、総頸動脈に外径 0.965 mm のカテーテル（ポリエチレンチュービング PE 50, BD Intramedic）を挿入し、外れないように 4.0 号の糸で血管とカテーテルを結んだ。カテーテルは三方活栓と、チューブ（15366, TOP 社）を用いて、圧力変換器（MLT0380/D, ADInstruments）につなげた。カテーテル中は、血液の凝固を防ぐために 0.5%濃度のヘパリンを含んだ生理食塩水で満たした。また、後述する除脳に伴う大量出血を防ぐために、もう一方の総頸動脈を 4.0 号の糸で結紮した。補液や薬物投与のために、同様のカテーテルを外頸静脈に挿入した。このカテーテルは三方活栓とチューブを用いて、シリンジポンプ（KDS100, KD Scientific）とつなげた。実験中、体液のバランスの安定化と血圧の維持のために、シリンジポンプから 3–5 mL/kg/時の速度にて重炭酸ナトリウム溶液（1 M の NaHCO_3 : 8 mL, 5%デキストロース: 40 mL, リンゲル液: 152 mL）を投与し続けた。以上の手術後、切開した頸部を 3.0 号の糸で縫合した。

次に、カプサイシンの下肢動脈投与のための手術を行った。腹部を切開し、左総腸骨動脈を露わにした。この時、内臓や脂肪などの組織の外気への暴露を限りな

く防ぐために、生理食塩水で湿らせたガーゼで覆って保護した。そして、外径 0.61 mm のカテーテル（ポリエチレンチュービング PE 10, BD Intramedic）を腹部大動脈分岐部よりおよそ 1cm 末梢側の左総腸骨動脈から、腹部大動脈の分岐部直前まで挿入し、外れないように 5.0 号の糸で血管と結んだ。カテーテル内部には、血液の凝固を防ぐために上記と同様のヘパリンが含まれた生理食塩水を満たした。さらに、左総腸骨動脈から投与する薬物を下肢に蓄積させ、下腿三頭筋への筋注によって投与する外因性インスリンの全身循環への波及を防ぐために、腹部大動脈分岐部直上の腹部大動脈および下大静脈にオクルーダーを設置した（18080-01, Fine Science Tools）（図 7B）。

次に、インスリン筋注のために、右下肢の皮膚を切開し、下腿三頭筋を露わにした。下腿三頭筋の乾燥を防ぐため、筋注実施時以外はパラフィンオイルで満たしたガーゼで覆った。

次に、左腹部を切開して左腎臓交感神経を露わにし、双極電極（OT220-064a, ユニークメディカル）に腎臓交感神経枝をのせ、絶縁と固定のためにシリコン接着剤（Kwik-Sil, World Precision Instruments）で覆った（図 7B）。その後、腹部の皮膚を 3.0 号の糸と接着剤を用いて縫合した。

上記全ての手術後、脳定位固定装置（900, David Kopf Instruments）にラットを移動させ、上丘前縁（precollicular）レベルで除脳を行った。ラットの頭皮を切開し頭蓋骨を露出させ、電動ドリルで穿孔した。そして、ミクロスパーテルとサクシヨンポンプ（SP40S, ハイテック）を用いて、除脳を施した。除脳直後にイソフルランによる麻酔を解除した。また、除脳直後には除脳部位からの出血を防ぐために、医療用脱脂綿を除脳した箇所に敷き詰め、パラフィンオイルを満たした（図 7B）。さらに、脳浮腫を抑えるためにデキサメタゾン（0.2 mg）を静脈内投与した。本研究にて、除脳（動物の苦痛からの解放）が必要な理由は、麻酔の循環応答に及ぼす影響を排除するため、無麻酔下で測定を行う必要があったためである¹¹³。

3-3. 実験の手順

除脳後、無麻酔下にて1時間以上経過した後¹¹³、カプサイシンに対する応答を測定した。オクルーダーにて後肢の循環を遮断した10分後に0.1 mLのカプサイシン（0.3 µg/100 µL）を左総腸骨動脈に挿入したカテーテルから投与した。カプサイシンに対する応答を評価した後に、血糖値と血漿インスリン濃度を評価するために、頸静脈および尾静脈から血液を採取した。血液採取後にオクルー

ダーを開放し、5分以上のインターバルの後、再びオクルーダーにて下肢循環を遮断して 30 μ L の生理食塩水（コントロール試行）または 30 μ L のインスリン溶液（5 U/mL）（インスリン試行）を右下腿三頭筋の 6 部位に 5 μ L ずつ、30 ゲージ針付きマイクロシリンジを用いて筋注した。溶液筋注 10 分後に、上記と同様の方法で、カプサイシンを投与した。そして再び、下肢循環を閉塞した状態のまま、頸静脈および尾静脈から血液を採血した。

全ての測定を終えた後に、臭化ヘキサメトニウム（60 mg/kg, 富士フィルム和光純薬）を頸静脈から投与し、それによる腎臓交感神経活動の著しい減弱を観察することで、実験にて測定した神経活動が、節後性交感神経線維のものであることを確認した。塩化カリウム飽和溶液（4 M, 2 mL/kg）を頸静脈投与して供して 30 分以上経過後、交感神経活動が完全に消失していることを確認し、腎臓交感神経活動のバックグラウンドノイズを測定した。

3-4. データの取り込みと解析方法

血圧、心拍数、腎臓交感神経活動の解析は先行研究に従って行った¹¹⁴。動脈圧は、PowerLab 16/35（ADInstruments）にてデジタル信号に変換され、LabChart 8（ADInstruments）を用いて平均血圧を算出した。また、心電図から LabChart 8

を用いて心拍数を算出した。腎臓交感神経活動は電圧増幅器（EBA-100, ユニークメディカル）にて信号の増幅に加え、1000 Hz 以上または 100 Hz 以下の周波数をフィルター（Hum Bug 50/60 Hz Noise Eliminator, Quest Scientific Instruments）にて遮断し、その後、2つ目の電圧増幅器（6L01 DC アンプ, NEC 三栄）にてバンドパスした信号をさらに増幅して A/D 変換器（PowerLab 16/35）にて信号をデジタル化しコンピューターに取り込んだ。そして、ソフトウェア（LabChart 8）上で腎臓交感神経活動信号を全波整流した。

これらの値の 1 秒平均値を解析に用いた。また、カプサイシン投与前 30 秒間の心拍数、平均血圧、腎臓交感神経活動の平均値をベースライン値とした。カプサイシンに対する応答の評価について、心拍数および平均血圧はカプサイシン投与開始から 30 秒間の最大値からベースラインの差（ Δ 心拍数, Δ 平均血圧）をカプサイシンに対する応答とした。腎臓交感神経活動においては、ベースラインを 100%とし、カプサイシンに対する応答をベースラインに対するパーセンテージで示し、ベースラインからの相対変化（ Δ 腎臓交感神経活動, %）で評価した。

血糖値は、自己検査用グルコース測定器（サラチェッカーグルコースメーター、

サラヤ)にて測定した。血漿インスリン濃度は酵素結合免疫吸着測定法にて、超高感度ラットインスリン測定キット(森永生科学研究所)を用いて測定した。

3-5. 統計処理

初めに正規性を確認するために、Shapiro-Wilk 検定を実施した。一对の比較には、対応のない t 検定または Mann-Whitney U 検定を適宜用いた。Δ 心拍数、Δ 平均血圧、Δ 腎臓交感神経活動、血糖値、血漿インスリン濃度の解析には、対応のある 2 要因分散分析を行った(試行 [コントロール試行とインスリン試行] × 筋注 [筋注前と筋注後])。交互作用または主効果が有意であった場合、Bonferroni 法による多重比較を行った。

全ての統計処理は、SPSS Statistics 25.0 for windows を使用した。有意水準は 5% 未満とし、値は平均値±標準偏差で示した。

3-6. 結果

図 8 は、コントロール試行およびインスリン試行の筋注前後の下肢循環遮断中の血糖値および血漿インスリン濃度を示している。尾静脈の血糖値は、生理食塩水またはインスリン溶液を筋注する前後ともに試行間に有意な差はみられなかった(図 8A)。また、筋注による有意な変化もみられなかった(図 8A)。一方

で、血漿インスリン濃度は、筋注前は試行間で有意な違いはみられなかったが、インスリン試行でのみ、筋注前と比べて筋注後に有意に増大し、コントロール試行の筋注後のそれと比べて有意に高値であった (図 8B)。本研究では試行ごとに 5 サンプルずつ頸静脈から血液を採取することに成功した。尾静脈と同様に、経静脈の血液サンプルから得られた血糖値も、試行間および筋注前後で有意な違いはみられなかった (図 8A)。一方、血漿インスリン濃度においては、尾静脈サンプルとは異なり、試行間だけではなく筋注前後でも有意な差は認められなかった (図 8B)。この結果から、オクルーダーによる阻血が行われ、筋注した外因性のインスリン溶液が下肢循環に留まっていることが考えられた。

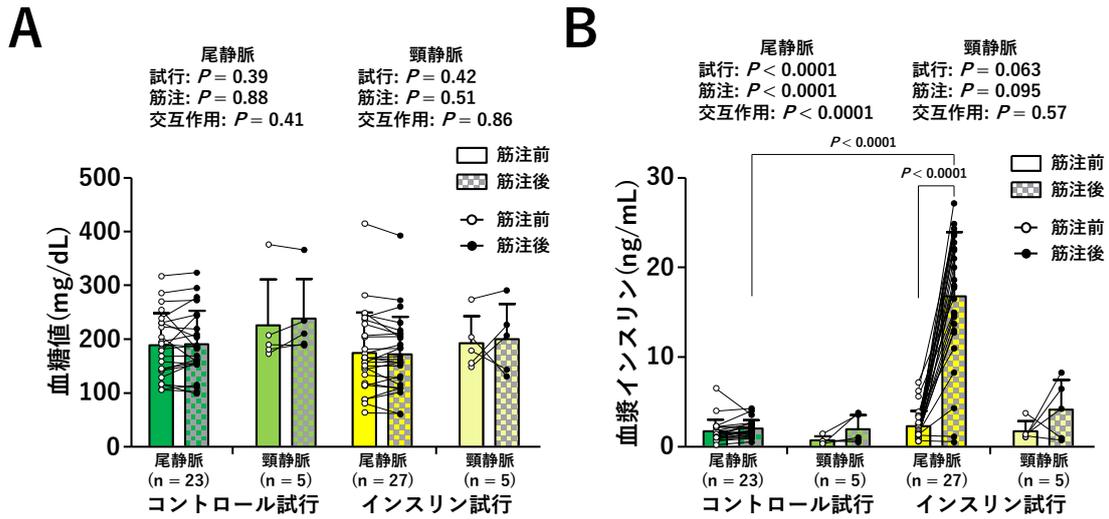


図 8. 生理食塩水 (コントロール試行) またはインスリン溶液 (インスリン試行) 筋注前後の尾静脈および頸静脈における血糖値 (A) および血漿インスリン濃度 (B)

試行間および筋注前後の比較は, 対応のある 2 要因分散分析とそれに続く Bonferroni 法による多重比較を行った. 白色と黒色の円は個々のデータを示している. 値は平均値+標準偏差.

表 3 に、各試行の筋注前後の心拍数、平均血圧、および腎臓交感神経活動のシグナルノイズ比のベースラインの値を示した。平均血圧および腎臓交感神経活動のシグナルノイズ比は、筋注前、筋注後の値ともに、試行間に有意差はみられなかった。一方で、心拍数は筋注前と筋注後の値ともに、コントロール試行の方が有意に高値であった。

表 3. 生理食塩水（コントロール試行）またはインスリン溶液（インスリン試行）筋注前後のベースラインにおける心拍数，平均血圧，腎臓交感神経活動のシグナルノイズ比

		コントロール試行	インスリン試行	P値
心拍数 (bpm)	筋注前	504 ± 36	474 ± 50	0.038
	筋注後	500 ± 35 (n = 18)	468 ± 49 (n = 22)	0.042
平均血圧 (mmHg)	筋注前	90.9 ± 23.4	90.4 ± 25.7	0.95
	筋注後	89.2 ± 29.6 (n = 18)	92.1 ± 29.0 (n = 22)	0.88
シグナルノイズ比	筋注前	6.8 ± 6.0	3.5 ± 2.0	0.15
	筋注後	6.7 ± 5.7 (n = 9)	3.4 ± 2.0 (n = 8)	0.13

試行間の比較には, 対応のないt検定またはMann-Whitney U検定を実施した. 値は平均値±標準偏差.

図 9 には、各試行の筋注前後の腎臓交感神経活動および血圧応答の典型例を示している。コントロール試行では、筋注後に腎臓交感神経活動および血圧応答が減弱する傾向がみられた一方で、インスリン試行では、腎臓交感神経活動（筋注前: $\Delta 84\%$ 、筋注後: $\Delta 95\%$ ）および血圧応答（筋注前: $\Delta 47$ mmHg、筋注後: $\Delta 58$ mmHg）が筋注後に増大することが観察された（図 9）。

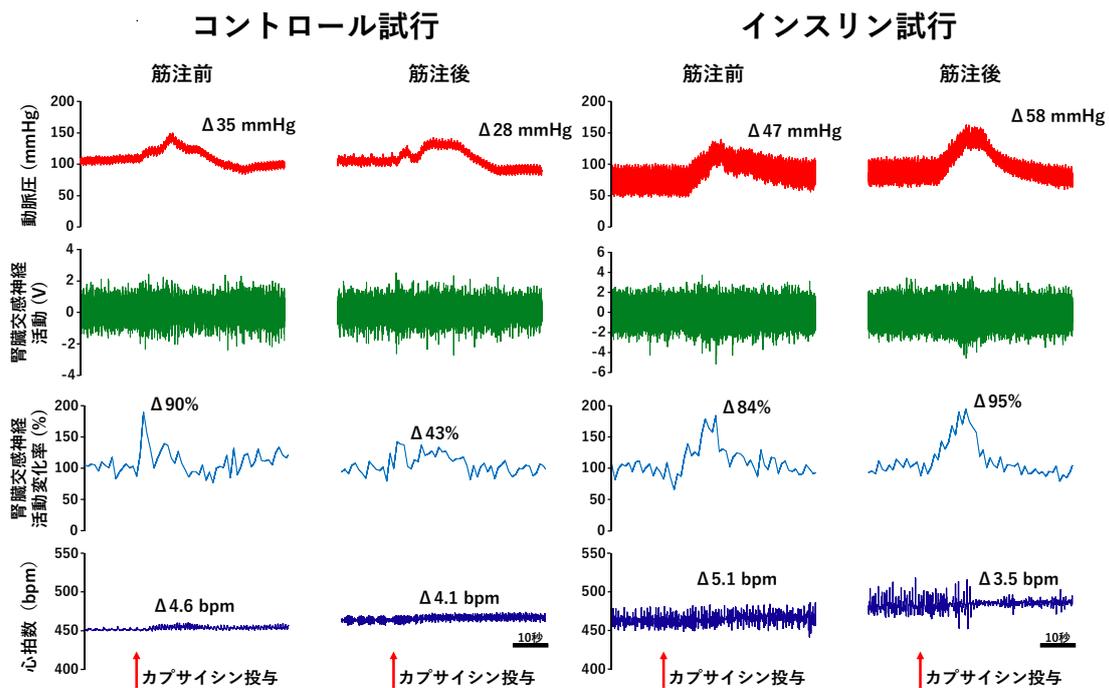


図9. 生理食塩水(コントロール試行)またはインスリン溶液(インスリン試行)筋注前後のカプサイシンに対する腎臓交感神経活動, 血圧および心拍応答の典型例

腎臓交感神経活動変化率は, 投与前のベースラインを 100%とした相対変化 (%) を示している. Δ, カプサイシン投与開始から 30 秒間の最大値からベースラインの差.

図 10 に腎臓交感神経活動と平均血圧応答との全体の結果を示した。Δ 平均血圧では、交互作用が有意であり、インスリン試行でのみ Δ 平均血圧が有意に増大した (図 10A)。本研究では、コントロール試行では 18 サンプルのうち 9 サンプル、インスリン試行では 22 サンプルのうち 8 サンプルの腎臓交感神経活動の測定に成功した。Δ 腎臓交感神経活動変化率においても交互作用が有意であり、コントロール試行の筋注後と比してインスリン試行の筋注後は有意に高値であった (図 10B)。Δ 心拍数は、試行間および筋注前後に有意な違いはみられなかった (表 4)。

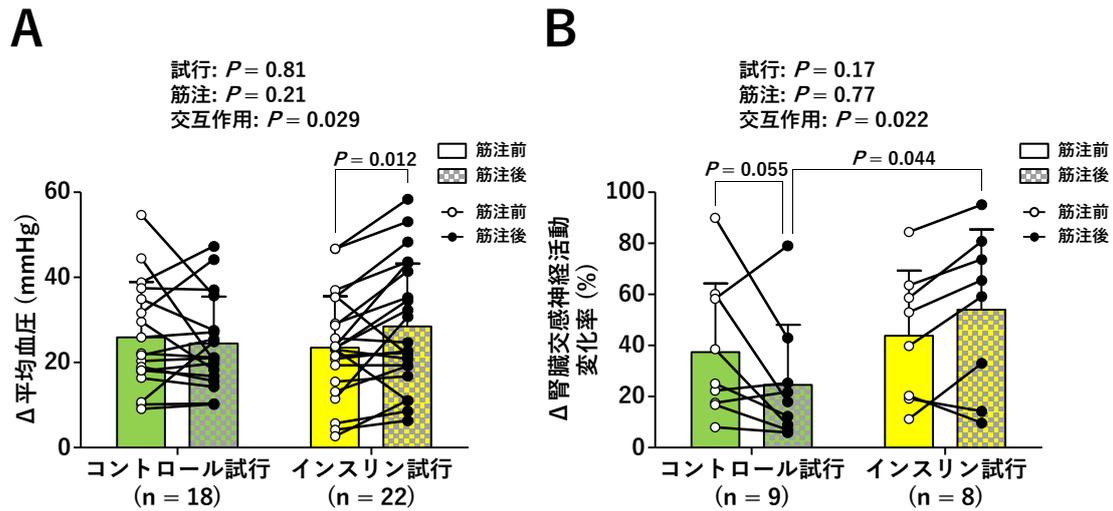


図 10. 生理食塩水 (コントロール試行) またはインスリン溶液 (インスリン試行) 筋注前後のカプサイシンに対する平均血圧 (A) および腎臓交感神経活動応答 (B)

腎臓交感神経活動変化率は、投与前のベースラインを 100%とした相対変化 (%) を示している。Δ, カプサイシン投与開始から 30 秒間の最大値からベースラインの差。試行間および筋注前後の比較は、対応のある 2 要因分散分析とそれに続く Bonferroni 法による多重比較を行った。白色と黒色の円は個々のデータを示している。値は平均値+標準偏差。

表 4. 生理食塩水（コントロール試行）またはインスリン溶液（インスリン試行）
筋注前後のカプサイシンに対する心拍応答

	Δ心拍数 (bpm)	
	筋注前	筋注後
コントロール試行 (n = 18)	1.9 ± 3.0	1.4 ± 2.5
インスリン試行 (n = 22)	3.3 ± 5.7	4.8 ± 5.4
試行	<i>P</i> = 0.070	
筋注	<i>P</i> = 0.43	
交互作用	<i>P</i> = 0.11	

Δ, カプサイシン投与開始から 30 秒間の最大値からベースラインの差. 試行間および筋注前後の比較は, 対応のある 2 要因分散分析を行った. 値は平均値±標準偏差.

第4章. 考察

本研究では、筋代謝受容器反射の求心路を担う小型 DRG 細胞において、インスリンが TRPV1 に及ぼす影響を明らかにすることと、インスリンが TRPV1 を介した交感神経活動および血圧応答に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。本研究で得られた主な新規知見は以下の 3 つである。(1) *in vitro* の系において、インスリンは健常マウスの培養小型 DRG 細胞のカプサイシンに対する応答を有意に増大させたこと。(2) 培養小型 DRG 細胞において、インスリン受容体拮抗薬である GSK1838705 はインスリンによるカプサイシンに対する応答の増大を有意に抑制したこと。(3) *in vivo* の系において、インスリンは、無麻酔・除脳下における健常ラットのカプサイシンに対する腎臓交感神経活動および平均血圧応答を有意に増大させたこと。

4-1. インスリンによる TRPV1 感作の機序

培養された小型 DRG 細胞 (*in vitro*) や動物個体 (*in vivo*) において、インスリンにより TRPV1 作動薬であるカプサイシンに対する応答が増強した。これは、カプサイシンに対する筋細径求心神経の応答がインスリンにより増大するというこれまでの我々の結果と一致するものであり⁹⁰、インスリンにより TRPV1 の

感作がもたらされたと考えられる。加えて、インスリンによるカプサイシンに対する小型 DRG 細胞の応答の増大がインスリン受容体拮抗薬によって抑制された。これまでの我々の筋細径求心神経を用いた検討においても、インスリンによるカプサイシンに対する筋細径求心神経の応答の増大が、インスリン受容体拮抗薬によって抑制されたことから⁹⁰、TRPV1 のカプサイシンに対する応答の増大は、インスリン受容体を介したものであることが示唆される。

コントロール試行において、小型 DRG 細胞のカプサイシンに対する応答は、筋注後に減弱する傾向がみられた。*in vivo* の系においても、カプサイシンに対する筋注後の腎臓交感神経活動応答は、筋注前のそれと比べて有意ではないものの減弱する傾向がみられた。このカプサイシンの繰り返し暴露による反応の減弱は、カルシウムイオン依存的な TRPV1 の脱感作によるものと考えられる^{94,115}。

一方で、小型 DRG 細胞の約 54%がインスリンによってカプサイシンに対する応答が増大した。また、これまでの我々の研究でも、筋細径求心神経の内のIV群神経の約 44%が、インスリンによりカプサイシンに対する応答の増大を示した⁹⁰。

これらの結果から、インスリンによってカプサイシンの繰り返し暴露に伴う TRPV1 の脱感作が抑制されるだけでなく、TRPV1 の感作によりカプサイシンに

対する応答が増大し得ることが示唆された。骨格筋を支配する一次求心神経において、免疫組織学的に TRPV1 とインスリン受容体が共局在している割合は約 15%であるとの報告と比べ¹⁰⁴、本研究でインスリンによってカプサイシンに対する反応が感作された小型 DRG 細胞の割合(約 54%)は高いように考えられる。しかし、TRPV1 とインスリン受容体は、共に比較的小径の一次求心神経細胞で発現する傾向があり^{104,116}、小型の DRG 細胞では共局在の割合が高いため、インスリンによる TRPV1 の感作が、インスリン受容体を介したものであるという可能性を排除するものではない。

現在までに、TRPV1 感作の機序は、(1) TRPV1 のリン酸化による直接的な感作、(2) TRPV1 のリン酸化による細胞表面への移動(膜移動)、(3) TRPV1 発現量の増加、(4) TRPV1 の微小管との結合、の 4 つが考えられている^{117,118}。なお、本研究は、著者の修士論文⁹⁰における研究と一連のものであるため、後述する TRPV1 感作の機序の考察に関しては、修士論文⁹⁰での考察と同様である部分がある。

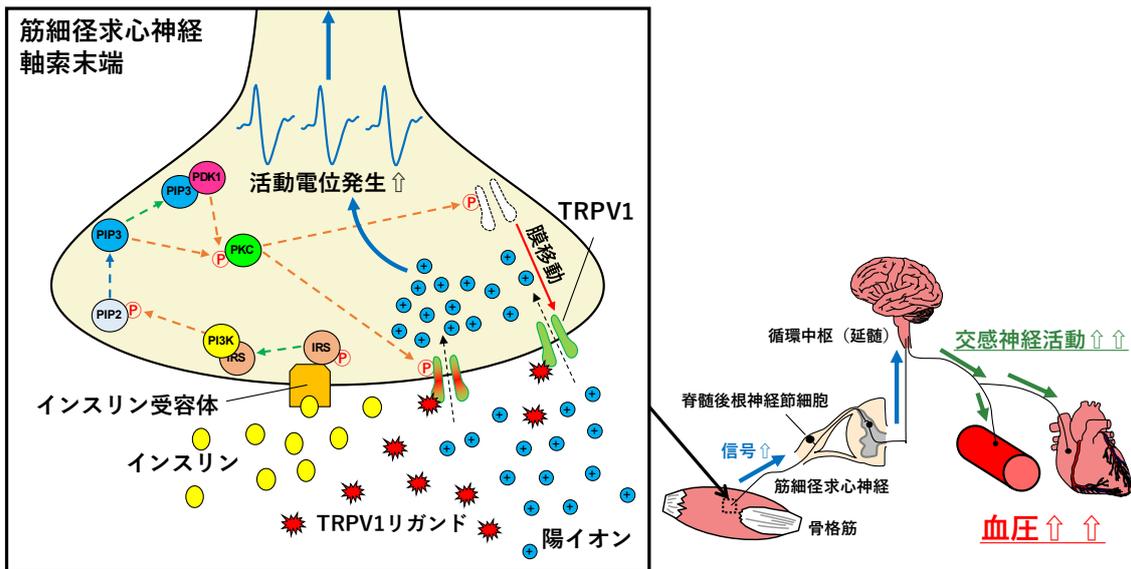
1 つ目の機序について(図 11)、インスリンがインスリン受容体に結合することで、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)

/Akt 経路を活性化するが、これはインスリンによる糖代謝に関与する経路として知られている¹¹⁹。これまでに、PI3K/Akt 経路の活性化により、プロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) を活性化させることが報告されている¹²⁰⁻¹²⁵。インスリンがインスリン受容体に結合すると、インスリン受容体基質 (insulin receptor substrate, IRS) がリン酸化され、IRS が PI3K に結合することで PI3K を活性化させることが知られている^{120,122-125}。PI3K はホスファチジルイノシトール 2 リン酸をリン酸化することにより、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PIP3) への変換を促進する^{120,122-125}。PIP3 はホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ 1 と結合することにより、PKC を活性化させる^{120,123-125}。また、PIP3 は直接的に PKC をリン酸化することも報告されている^{121,122}。PKC は TRPV1 のスレオニン残基やセリン残基をリン酸化することが示されている^{97,126-128}。これまでに、TRPV1 のセリン残基のうち S800 および S502 が、PKC によりリン酸化を受けて、カプサイシンに対する応答の増大に関与することが示されている^{97,127,128}。また、Mandadi ら¹²⁶ は、PKC による S800 のリン酸化が TRPV1 の脱感作後のカプサイシンに対する応答の回復に関与していることを明らかにした。また、PKC による TRPV1 のスレオニン残基の

T704 のリン酸化は熱刺激に対する応答の増大に関与することが示されている¹²⁷。しかし一方で、T704 は、PKC 依存的なカプサイシンに対する TRPV1 の応答の増大には関与していないことが報告されている^{127,128}。以上より、本研究においても、インスリンが PKC を介するシグナル伝達カスケードの活性化による TRPV1 のリン酸化を引き起こした可能性が考えられた。

2 つ目の機序について (図 11), TRPV1 の膜移動とは、細胞内 (細胞質) に存在する TRPV1 が細胞表面へ移動することで機能することである。PI3K と PKC を介した TRPV1 のチロシン残基のリン酸化は TRPV1 の膜移動に関与することが報告されている^{129,130}。Zhang ら¹²⁹ は、TRPV1 におけるチロシン残基の Y200 がリン酸化されることで TRPV1 の膜移動が誘発されることを報告した。さらに、Van Buren ら¹³⁰ は、培養 DRG 細胞において、15 分間のインスリン暴露により TRPV1 の細胞膜上の発現量が増大していることを、免疫組織化学的手法を用いて明らかにした¹³⁰。これまでに我々が実施した筋細径求心神経を対象とした検討では⁹⁰、カプサイシンに対して応答を示さなかった IV 群線維が、インスリン投与によりカプサイシンに対して応答を示すことが観察された (15 標本の内 8 標本 [53.3%])。そのため、推測の域を出ないが、IV 群線維のインスリンによるカ

プサイシン感受性の獲得の機序の一部は、インスリンによる TRPV1 の膜移動によって説明できる可能性がある。



TRPV1

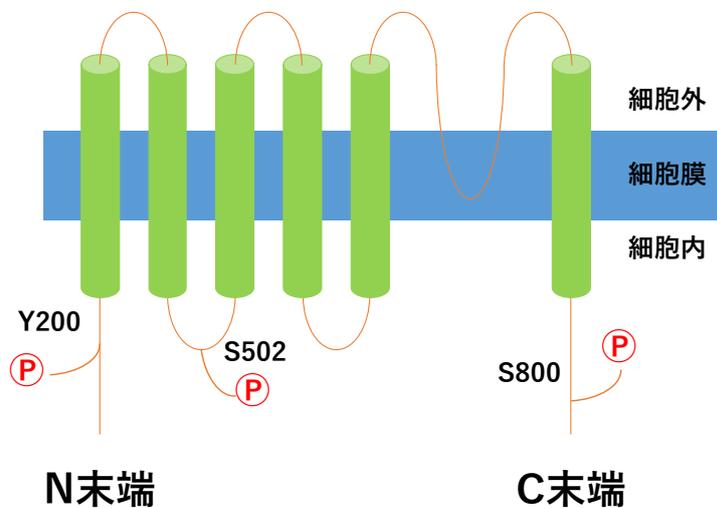


図 11. インスリンによる transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の感作の機序の考察

堀⁹⁰を参考に作成した。インスリンがインスリン受容体に結合し、インスリン受容体基質 (insulin receptor substrate, IRS) がリン酸化され、IRS がホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K) に結合し、PI3K を活性化させる。PI3K はホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (phosphatidylinositol phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, PIP2) からホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PIP3) への変換を促進する。PIP3 はホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ 1 (phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1) 依存的または非依存的にプ

ロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) をリン酸化し, PKC を活性化させる. PKC は TRPV1 のセリン残基 (S502, S800) をリン酸化することで, TRPV1 を感作させる. また, PKC により TRPV1 のチロシン残基 (Y200) がリン酸化されることで, 膜移動が促進される.

TRPV1 の発現量の増加について Lilja ら¹³¹ は、TRPV1 の核酸を持続的に導入（安定トランスフェクション）したヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY5Y をインスリンに 72 時間暴露することで、TRPV1 の発現が約 2 倍増加することを報告した。加えて、インスリン暴露による TRPV1 の発現の増大は時間依存的であり、インスリン暴露 8 時間後では、TRPV1 発現量の増大は観察されなかったことも報告している¹³¹。本研究のインスリンによるカプサイシンに対する応答増大は、20 分以内のであり、Lilja ら¹³¹ が報告した TRPV1 の発現量の増大がみられた経過時間と比べて短時間であるため、上記のインスリンの効果が働いたとは考えにくい。

TRPV1 感作について考えられる 4 つ目の機序は、TRPV1 と細胞骨格である微小管との結合である。微小管とは、チューブリンと呼ばれるタンパク質からなる管状の細胞骨格であり、実際に、TRPV1 と結合することが確認されている^{132,133}。一方で、インスリンは微小管の形成・安定化の促進に関与する^{134,135}。微小管の安定化とは微小管を形成するチューブリンの脱重合（チューブリンどうしの結合が離れること）を抑制することである。微小管が TRPV1 のカルボキシ末端に結合することで、TRPV1 の感作を起こす機序がこれまでに提案されている

^{117,132,136}. また、この微小管による TRPV1 の感作は、細胞への機械刺激が生じた際に起こることが示唆されている^{117,136}. これまでに、筋細径求心神経および培養した小型 DRG 細胞において、インスリンにより筋細径求心神経受容野近傍および小型 DRG 細胞表面への外からの圧力による直接的な機械刺激に対する応答が増強し、さらに、インスリン受容体拮抗薬によりその感作が抑制されることが示されている¹⁰⁸. そのため、インスリンが微小管を介して TRPV1 を感作する可能性が考えられる. しかし、本研究では、カプサイシン刺激中に意図的な機械刺激を与えていないため、本研究においては微小管による TRPV1 の感作が起こったとは考えにくい.

以上より、本研究における、培養小型 DRG 細胞および動物個体におけるインスリンによるカプサイシンに対する応答の増大の機序として、リン酸化による TRPV1 の活性化と、TRPV1 の膜移動が関与している可能性が考えられた.

4-2. 本研究の生命医科学分野における意義

身体運動は様々な健康的利益をもたらすが、それは 2 型糖尿病患者に対しても同様であり、2 型糖尿病の症状改善のためにも運動の実施が強く推奨されている¹³⁷⁻¹³⁹. 例えば、運動療法による血糖値改善の効果は、食事療法、薬物療法、

インスリン療法と同程度であることがメタ解析にて報告されている¹⁴⁰。有酸素運動は、2型糖尿病に対して基本的な運動療法として用いられるが、近年、米国スポーツ医学会は、定期的な有酸素運動の実施により2型糖尿病成人患者の血糖値が改善されると公表している¹³⁹。さらに同学会は、2型糖尿病成人患者に対して、週に3-7回の頻度で、中強度（40-59%酸素摂取予備能）の有酸素運動を150-300分/週以上または、高強度（60-89%酸素摂取予備能）の有酸素運動を75-150分/週以上のどちらかを実施することを推奨している。また、有酸素運動に加えて、レジスタンス運動を行うことも推奨している（週に2-3回の頻度で、中強度[最大挙上重量の50-69%]または高強度[最大挙上重量の70-85%]の負荷で、10-15回挙上を1-3セット[各種目]）¹³⁹。興味深いことに、有酸素運動やレジスタンストレーニングを単体で行うよりも、これら運動様式を組み合わせたほうが、血糖値やインスリン感受性、血中脂質の改善の効果が大きいことが示唆されている¹⁴⁰⁻¹⁴³。また、有酸素運動とレジスタンストレーニングの両方とも、低強度よりも高強度で行う方が、血糖値やインスリン感受性の改善に効果的である可能性も示唆されている^{144,145}。一方で、2型糖尿病による運動時の循環応答の過剰亢進が、2型糖尿病による心血管イベント発生のリスクの増大

に關与している可能性がある⁶²。そのため、2型糖尿病患者では高強度の有酸素運動やレジスタンストレーニングは血圧の増大が大きいため実施に制限がかかる可能性がある。

2型糖尿病初期では、高インスリン血症を呈することがある⁹⁹。これまでに、2型糖尿病患者において、筋代謝受容器反射が亢進することが報告されている⁶⁸。TRPV1は、筋代謝受容器反射の発生に關与するイオンチャネルであることが多くの研究から示されている^{34,45,77,87,88}。本研究より、インスリンが筋代謝受容器反射の求心路を担う小型DRG細胞のカプサイシンに対する反応を増大させることが明らかになった。さらに、カプサイシンに対する交感神経活動や血圧応答もインスリンにより増大することが明らかになった。これらの結果は、インスリンがTRPV1感作を介して筋代謝受容器反射を亢進させる可能性を示すものである。事実、血漿インスリン濃度の増大が観察された2型糖尿病モデル動物では、カプサイシンに対する腎臓交感神経活動および血圧応答が増大することが報告されている⁷⁷。

2型糖尿病では、運動昇圧反射の代謝性成分である筋代謝受容器反射だけでなく、機械性成分である筋機械受容器反射も増大することがヒト⁷¹および動物⁷⁶

を対象とした研究より示唆されている。現在に至るまで、健常な状態において TRPV1 は筋機械受容器反射には関与しないと考えられている^{46,146}。一方で、TRPV1 は、生理的条件下で高張力刺激による細胞膜の変形という機械刺激に応答を示すことが報告されている¹⁴⁷。また、筋機械受容器反射の求心路を担う小型 DRG 細胞および筋細径求心神経の機械刺激に対する応答が、インスリンによって増大することが示されている¹⁰⁸。これまでに、健常な状態では、TRPV1 と同様に ASIC1 のアイソフォームである ASIC1a も筋機械受容器反射には関与しないと考えられていたが⁴⁰、慢性心不全モデル動物においては筋機械受容器反射の亢進に関与していることが示唆された¹⁴⁸。そのため、推測の域を出ないが、2 型糖尿病における筋機械受容器反射の亢進に、インスリンによる TRPV1 の感作が関与するかもしれない。今後、TRPV1 が 2 型糖尿病による筋機械受容器反射の亢進に関与することを明らかにするために、2 型糖尿病モデル動物における筋機械受容器反射の亢進が、TRPV1 阻害薬によって抑制されるのか否かを検討する必要があるだろう。

以上より、本研究成果は 2 型糖尿病による運動時循環応答の過剰亢進の機序の一部解明に寄与するものであると考えられる。現在、TRPV1 を標的とした創

薬のための臨床薬理試験が行われている¹⁴⁹。そのため将来、TRPV1 に対する新規阻害剤を用いて、2型糖尿病における運動時の過剰な循環応答を抑えることが、運動処方強度や頻度の幅を広げることにつながるかもしれない。降圧剤は、安静時の血圧を低下させるが、運動に対する血圧応答の過剰な亢進は抑制できないことが示されていることから¹⁵⁰、運動時循環応答亢進を抑制する創薬は社会的意義が高いだろう。

糖尿病の治療法の1つであるインスリン投与によって、重度の神経障害性疼痛を引き起こすことがあるが、これは、インスリン神経炎や糖尿病治療誘発性神経障害と呼ばれる¹⁵¹。いまだこの機序の全容は明らかとなっていないが¹⁵²、TRPV1 が関与する可能性が挙げられている^{117,153}。従って、インスリンによってTRPV1 が感作されることを示した本研究成果は、糖尿病治療誘発性神経障害の機序解明にも寄与する可能性がある。

4-3. 本研究の限界と長所

本研究には方法論的限界がある。本研究は、先行研究^{108,154}を参考にして非生理学的範囲の高濃度のインスリンを用いて検討した。したがって今後、生理学的範囲の濃度のインスリンを用いた検討や、インスリンによるTRPV1の感作が用

量依存的であるかどうか検討する必要がある。また、本研究では、TRPV1 作動薬として、外因性物質であるカプサイシンを用いた。そのため、今後、インスリンによる TRPV1 の感作を介した血圧応答の増大に関して、酸や熱などの TRPV1 の内因性刺激を用いた検討が必要である。

本研究では上記で示した限界や制限があるものの、インスリンが TRPV1 を介して運動時の循環応答に関与するというインスリンの新規生理作用を初めて提案したという点で、意義のあるものと考えられた。

第5章. 結語

インスリンは、培養小型 DRG 細胞のカプサイシンに対する応答を増大させる。さらに、動物個体において、インスリンはカプサイシン動脈投与に対する交感神経活動および血圧応答を増大させる。これらの結果は、インスリンが TRPV1 を感作することで、筋代謝受容器反射を亢進させ、運動時の循環応答を亢進させることを示唆する。

参考文献

1. Thompson, W. R. *et al.* Exercise is medicine. *Am. J. Lifestyle Med.* **14**, 511–523 (2020).
2. Powell, K. E. *et al.* The scientific foundation for the physical activity guidelines for Americans, 2nd edition. *J. Phys. Act. Heal.* **16**, 1–11 (2019).
3. Garber, C. E. *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **43**, 1334–1359 (2011).
4. Berryman, J. W. Exercise is medicine: a historical perspective. *Curr. Sports Med. Rep.* **9**, 195–201 (2010).
5. Bull, F. C. *et al.* World Health Organization 2020 guidelines on physical activity and sedentary behaviour. *Br. J. Sports Med.* **54**, 1451–1462 (2020).
6. 厚生労働省. <https://www.mhlw.go.jp/content/000306883.pdf>. (2023年1月6日参照).
7. Krogh, A. & Lindhard, J. The regulation of respiration and circulation during the initial stages of muscular work. *J. Physiol.* **47**, 112–136 (1913).
8. Fadel, P. J. Reflex control of the circulation during exercise. *Scand. J. Med. Sci. Sport.* **25**, 74–82 (2015).
9. Fisher, J. P., Young, C. N. & Fadel, P. J. Autonomic adjustments to exercise in humans. *Compr. Physiol.* **5**, 475–512 (2015).
10. Grotle, A. K., Macefield, V. G., Farquhar, W. B., O’Leary, D. S. & Stone, A. J. Recent advances in exercise pressor reflex function in health and disease. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **228**, 102698 (2020).
11. Mitchell, J. H., Kaufman, M. P. & Iwamoto, G. A. The exercise pressor reflex: its cardiovascular effects, afferent mechanisms, and central pathways. *Annu. Rev. Physiol.* **45**, 229–242 (1983).
12. Smith, S. A., Mitchell, J. H. & Garry, M. G. The mammalian exercise pressor reflex in health and disease. *Exp. Physiol.* **91**, 89–102 (2006).
13. Teixeira, A. L. & Vianna, L. C. The exercise pressor reflex: An update. *Clin. Auton. Res.* **32**, 271–290 (2022).
14. Fadel, P. J. & Raven, P. B. Human investigations into the arterial and cardiopulmonary baroreflexes during exercise. *Exp. Physiol.* **97**, 39–50 (2012).
15. Raven, P. B., Fadel, P. J. & Ogoh, S. Arterial baroreflex resetting during exercise: a current perspective. *Exp. Physiol.* **91**, 37–49 (2006).
16. Raven, P. B., Young, B. E. & Fadel, P. J. Arterial baroreflex resetting during exercise in humans: underlying signaling mechanisms. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **47**, 129–141 (2019).
17. Katayama, K. & Saito, M. Muscle sympathetic nerve activity during exercise. *J. Physiol. Sci.* **69**, 589–598 (2019).
18. Bedford, T. G., Loi, P. K. & Crandall, C. C. A model of dynamic exercise: the decerebrate rat locomotor preparation. *J. Appl. Physiol.* **72**, 121–127 (1992).
19. Eldridge, F. L., Millhorn, D. E., Killey, J. P. & Waldrop, T. G. Stimulation by central command of locomotion, respiration and circulation during exercise. *Respir. Physiol.* **59**, 313–337 (1985).

20. Gandevia, S. C. *et al.* Respiratory sensations, cardiovascular control, kinaesthesia and transcranial stimulation during paralysis in humans. *J. Physiol.* **470**, 85–107 (1993).
21. Goodwin, G. M., McCloskey, D. I. & Mitchell, J. H. Cardiovascular and respiratory responses to changes in central command during isometric exercise at constant muscle tension. *J. Physiol.* **226**, 173–190 (1972).
22. Williamson, J. W. *et al.* Hypnotic manipulation of effort sense during dynamic exercise: Cardiovascular responses and brain activation. *J. Appl. Physiol.* **90**, 1392–1399 (2001).
23. Williamson, J. W., Fadel, P. J. & Mitchell, J. H. New insights into central cardiovascular control during exercise in humans: a central command update. *Exp. Physiol.* **91**, 51–58 (2006).
24. Koba, S. *et al.* A brainstem monosynaptic excitatory pathway that drives locomotor activities and sympathetic cardiovascular responses. *Nat. Commun.* **13**, (2022).
25. Alam, M. & Smirk, F. H. Observations in man upon a blood pressure raising reflex arising from the voluntary muscles. *J. Physiol.* **89**, 372–383 (1937).
26. Kaufman, M. P., Longhurst, J. C., Rybicki, K. J., Wallach, J. H. & Mitchell, J. H. Effects of static muscular contraction on impulse activity of groups III and IV afferents in cats. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **55**, 105–112 (1983).
27. Coote, J. H. & Perez-Gonzalez, J. F. The response of some sympathetic neurones to volleys in various afferent nerves. *J. Physiol.* **208**, 261–278 (1970).
28. McCloskey, D. I. & Mitchell, J. H. Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *J. Physiol.* **224**, 173–186 (1972).
29. Rotto, D. M. & Kaufman, M. P. Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J. Appl. Physiol.* **64**, 2306–2313 (1988).
30. Cristina-Oliveira, M. *et al.* Clinical safety of blood flow-restricted training? A comprehensive review of altered muscle metaboreflex in cardiovascular disease during ischemic exercise. *Am. J. Physiol. Hear. Circ. Physiol.* **318**, H90–H109 (2020).
31. Grotle, A. K. & Stone, A. J. Exaggerated exercise pressor reflex in type 2 diabetes: Potential role of oxidative stress. *Auton. Neurosci.* **222**, 102591 (2019).
32. Grotle, A. K., Kaur, J., Stone, A. J. & Fadel, P. J. Neurovascular dysregulation during exercise in type 2 diabetes. *Front. Physiol.* **12**, 1–11 (2021).
33. Teixeira, A. L., Fernandes, I. A. & Vianna, L. C. Cardiovascular control during exercise: the connectivity of skeletal muscle afferents to the brain. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **48**, 83–91 (2020).
34. Notay, K. *et al.* TRPV1 and BDKRB2 receptor polymorphisms can influence the exercise pressor reflex. *J. Physiol.* **596**, 5135–5148 (2018).
35. Pan, H. L., Stebbins, C. L. & Longhurst, J. C. Bradykinin contributes to the exercise pressor reflex: Mechanism of action. *J. Appl. Physiol.* **75**, 2061–2068 (1993).
36. Cui, J., Leuenberger, U. A., Blaha, C., King, N. C. & Sinoway, L. I. Effect of P2 receptor blockade with pyridoxine on sympathetic response to exercise pressor reflex in humans. *J. Physiol.* **589**, 685–695 (2011).
37. Hanna, R. L. & Kaufman, M. P. Role played by purinergic receptors on muscle

- afferents in evoking the exercise pressor reflex. *J. Appl. Physiol.* **94**, 1437–1445 (2003).
38. McCord, J. L., Tsuchimochi, H. & Kaufman, M. P. P2X_{2/3} and P2X₃ receptors contribute to the metaboreceptor component of the exercise pressor reflex. *J. Appl. Physiol.* **109**, 1416–1423 (2010).
 39. Campos, M. O. *et al.* Acid-sensing ion channels blockade attenuates pressor and sympathetic responses to skeletal muscle metaboreflex activation in humans. *J. Appl. Physiol.* **127**, 1491–1501 (2019).
 40. Ducrocq, G. P., Kim, J. S., Estrada, J. A. & Kaufman, M. P. ASIC1a plays a key role in evoking the metabolic component of the exercise pressor reflex in rats. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **318**, H78–H89 (2020).
 41. Ducrocq, G. P. & Kaufman, M. P. Inorganic phosphate and lactate potentiate the pressor response to acidic stimuli in rats. *Exp. Physiol.* **105**, 613–621 (2020).
 42. Hayes, S. G., McCord, J. L., Rainier, J., Liu, Z. & Kaufman, M. P. Role played by acid-sensitive ion channels in evoking the exercise pressor reflex. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **295**, 1720–1725 (2008).
 43. Light, A. R. *et al.* Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J. Neurophysiol.* **100**, 1184–1201 (2008).
 44. Stone, A. J., Copp, S. W., Kim, J. S. & Kaufman, M. P. Combined, but not individual, blockade of ASIC3, P2X, and EP4 receptors attenuates the exercise pressor reflex in rats with freely perfused hindlimb muscles. *J. Appl. Physiol.* **119**, 1330–1336 (2015).
 45. Mannozi, J. *et al.* Chronic ablation of TRPV1-sensitive skeletal muscle afferents attenuates the muscle metaboreflex. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* **321**, R385–R395 (2021).
 46. Smith, S. A. *et al.* The TRPV1 receptor is a mediator of the exercise pressor reflex in rats. *J. Physiol.* **588**, 1179–1189 (2010).
 47. Bandell, M. *et al.* Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849–857 (2004).
 48. Sawada, Y., Hosokawa, H., Matsumura, K. & Kobayashi, S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur. J. Neurosci.* **27**, 1131–1142 (2008).
 49. Andersson, D. A., Gentry, C., Moss, S. & Bevan, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J. Neurosci.* **28**, 2485–2494 (2008).
 50. Takahashi, N. *et al.* TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 701–711 (2011).
 51. Koba, S., Hayes, S. G. & Sinoway, L. I. Transient receptor potential A1 channel contributes to activation of the muscle reflex. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **300**, 201–213 (2011).
 52. Coste, B. *et al.* Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. **330**, 55–60 (2010).
 53. Copp, S. W., Kim, J. S., Ruiz-Velasco, V. & Kaufman, M. P. The mechano-gated channel inhibitor GsMTx4 reduces the exercise pressor reflex in decerebrate rats. *J. Physiol.* **594**, 641–655 (2016).
 54. Mundal, R. *et al.* Exercise blood pressure predicts cardiovascular mortality in

- middle-aged men. *Hypertension* **24**, 56–62 (1994).
55. Kurl, S. *et al.* Systolic blood pressure response to exercise stress test and risk of stroke. *Stroke* **32**, 2036–2041 (2001).
 56. Laukkanen, J. A. *et al.* Systolic blood pressure during recovery from exercise and the risk of acute myocardial infarction in middle-aged men. *Hypertension* **44**, 820–825 (2004).
 57. Laukkanen, J. A. *et al.* Systolic blood pressure response to exercise testing is related to the risk of acute myocardial infarction in middle-aged men. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **13**, 421–428 (2006).
 58. Lewis, G. D. *et al.* Exercise blood pressure and the risk of incident cardiovascular disease (from the Framingham Heart Study). *Am. J. Cardiol.* **101**, 1614–1620 (2008).
 59. Weiss, S. A., Blumenthal, R. S., Sharrett, A. R., Redberg, R. F. & Mora, S. Exercise blood pressure and future cardiovascular death in asymptomatic individuals. *Circulation* **121**, 2109–2116 (2010).
 60. Mariampillai, J. E. *et al.* Exercise systolic blood pressure at moderate workload is linearly associated with coronary disease risk in healthy men. *Hypertension* **75**, 44–50 (2020).
 61. Jae, S. Y., Kurl, S., Kunutsor, S. K., Franklin, B. A. & Laukkanen, J. A. Relation of maximal systolic blood pressure during exercise testing to the risk of sudden cardiac death in men with and without cardiovascular disease. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **27**, 2220–2222 (2020).
 62. Mittleman, M. A. *et al.* Triggering of acute myocardial infarction by heavy physical exertion -- protection against triggering by regular exertion. *N. Engl. J. Med.* **329**, 1677–1683 (1993).
 63. Marijon, E. *et al.* Sports-related sudden death in the general population. *Circulation* **124**, 672–681 (2011).
 64. Marijon, E. *et al.* Sudden cardiac arrest during sports activity in middle age. *Circulation* **131**, 1384–1391 (2015).
 65. Chen, R., Ovbiagele, B. & Feng, W. Diabetes and stroke: epidemiology, pathophysiology, pharmaceuticals and outcomes. *Am. J. Med. Sci.* **351**, 380–386 (2016).
 66. Nathan, D. M., Meigs, J. & Singer, D. E. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: How sweet it is . . . or is it? *Lancet* **350**, 4–9 (1997).
 67. Rawshani, A. *et al.* Mortality and cardiovascular disease in type 1 and type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1407–1418 (2017).
 68. Holwerda, S. W. *et al.* Augmented pressor and sympathetic responses to skeletal muscle metaboreflex activation in type 2 diabetes patients. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **310**, H300–H309 (2016).
 69. Petrofsky, J., Lee, S. & Cuneo-Libarona, M. The impact of rosiglitazone on heat tolerance in patients with type 2 Diabetes. *Med. Sci. Monit.* **11**, 21–26 (2005).
 70. Petrofsky, J. S. *et al.* Cardiovascular responses and endurance during isometric exercise in patients with Type 2 diabetes compared to control subjects. *Med. Sci. Monit.* **11**, 470–477 (2005).
 71. Vranish, J. R., Holwerda, S. W., Kaur, J. & Fadel, P. J. Augmented pressor and sympathoexcitatory responses to the onset of isometric handgrip in patients with

- type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **318**, R311–R319 (2020).
72. Papavasileiou, M. V. *et al.* Impaired glucose metabolism and the exaggerated blood pressure response to exercise treadmill testing in normotensive patients. *J. Clin. Hypertens.* **11**, 627–635 (2009).
 73. Pinto, T. E. *et al.* Systolic and diastolic abnormalities reduce the cardiac response to exercise in adolescents with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **37**, 1439–1446 (2014).
 74. Brett, S. E., Ritter, J. M. & Chowienczyk, P. J. Diastolic blood pressure changes during exercise positively correlate with serum cholesterol and insulin resistance. *Circulation* **101**, 611–615 (2000).
 75. Scott, J. A. *et al.* Patients with type 2 diabetes have exaggerated brachial and central exercise blood pressure: Relation to left ventricular relative wall thickness. *Am. J. Hypertens.* **21**, 715–721 (2008).
 76. Grotle, A. K. *et al.* Exaggerated cardiovascular responses to muscle contraction and tendon stretch in UCD type-2 diabetes mellitus rats. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **317**, H479–H486 (2019).
 77. Ishizawa, R. *et al.* TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) sensitization of skeletal muscle afferents in Type 2 diabetic rats with hyperglycemia. *Hypertension* **1**, 1360–1371 (2021).
 78. Kim, H. K. *et al.* Exaggerated pressor and sympathetic responses to stimulation of the mesencephalic locomotor region and exercise pressor reflex in type 2 diabetic rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **317**, R270–R279 (2019).
 79. Mizuno, M. *et al.* The impact of insulin resistance on cardiovascular control during exercise in diabetes. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **49**, 157–167 (2021).
 80. Caterina, M. J. *et al.* The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816–824 (1997).
 81. Smart, D. *et al.* The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br. J. Pharmacol.* **129**, 227–230 (2000).
 82. Ross, R. A. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* **140**, 790–801 (2003).
 83. Zygmunt, P. M. *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452–457 (1999).
 84. Hwang, S. W. *et al.* Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6155–6160 (2000).
 85. Huang, S. M. *et al.* An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8400–8405 (2002).
 86. Chu, C. J. *et al.* N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J. Biol. Chem.* **278**, 13633–13639 (2003).
 87. Vianna, L. C., Fernandes, I. A., Barbosa, T. C., Teixeira, A. L. & Nóbrega, A. C. L. Capsaicin-based analgesic balm attenuates the skeletal muscle metaboreflex in healthy humans. *J. Appl. Physiol.* **125**, 362–368 (2018).
 88. Smith, S. A., Williams, M. A., Mitchell, J. H., Mammen, P. P. A. & Garry, M. G. The capsaicin-sensitive afferent neuron in skeletal muscle is abnormal in heart failure. *Circulation* **111**, 2056–2065 (2005).

89. 富永真琴. 温度感受性TRPチャンネル. *漢方医学* **37**, 164–175 (2013).
90. 堀天. インスリンは筋細径求心神経の軸索末端にてカプサイシン感受性を増強する. *2020年度修士論文* (2021).
91. Hayes, P. *et al.* Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* **88**, 205–215 (2000).
92. Liao, M., Cao, E., Julius, D. & Cheng, Y. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature* **504**, 107–112 (2013).
93. Moiseenkova-Bell, V. Y., Stanciu, L. A., Serysheva, I. I., Tobe, B. J. & Wensel, T. G. Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7451–7455 (2008).
94. Tominaga, M. *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531–543 (1998).
95. Tominaga, M., Wada, M. & Masu, M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6951–6956 (2001).
96. Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H. & Mizumura, K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J. Neurophysiol.* **88**, 544–548 (2002).
97. Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H. & Tominaga, M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C ϵ and identification of two target serine residues. *J. Biol. Chem.* **277**, 13375–13378 (2002).
98. Dai, Y. *et al.* Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J. Neurosci.* **24**, 4293–4299 (2004).
99. Dankner, R., Chetrit, A., Shanik, M. H., Raz, I. & Roth, J. Basal-state hyperinsulinemia in healthy normoglycemic adults is predictive of type 2 diabetes over a 24-year follow-up: A preliminary report. *Diabetes Care* **32**, 1464–1466 (2009).
100. Hotta, N. *et al.* Insulin resistance is associated with an exaggerated blood pressure response to ischemic rhythmic handgrip exercise in non-diabetic older adults. *J. Appl. Physiol.* **129**, 144–151 (2020).
101. Sugimoto, K., Murakawa, Y. & Sima, A. A. F. Expression and localization of insulin receptor in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **7**, 44–53 (2002).
102. Sugimoto, K., Rashid, I. B., Shoji, M., Suda, T. & Yasujima, M. Early changes in insulin receptor signaling and pain sensation in streptozotocin-induced diabetic neuropathy in rats. *J. Pain* **9**, 237–245 (2008).
103. Grote, C. W. & Wright, D. E. A role for insulin in diabetic neuropathy. *Frontiers in Neuroscience* **10**, 581 (2016).
104. Lázár, B. A., Jancsó, G., Nagy, I., Horváth, V. & Sántha, P. The insulin receptor is differentially expressed in somatic and visceral primary sensory neurons. *Cell Tissue Res.* **374**, 243–249 (2018).
105. Raichlen, D. A., Foster, A. D., Gerdeman, G. L., Seillier, A. & Giuffrida, A. Wired to run: exercise-induced endocannabinoid signaling in humans and cursorial mammals with implications for the ‘runner’s high’. *J. Exp. Biol.* **215**, 1331–1336 (2012).

106. Gollasch, B., Dogan, I., Rothe, M., Gollasch, M. & Luft, F. C. Maximal exercise and plasma cytochrome P450 and lipoxygenase mediators: a lipidomics study. *Physiol. Rep.* **7**, e14165 (2019).
107. Hori, A. *et al.* Insulin potentiates the response to capsaicin in dorsal root ganglion neurons *in vitro* and muscle afferents *ex vivo* in normal healthy rodents. *J. Physiol.* **600**, 531–545 (2022).
108. Hotta, N. *et al.* 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 (2019).
109. Kubo, A., Katanosaka, K. & Mizumura, K. Extracellular matrix proteoglycan plays a pivotal role in sensitization by low pH of mechanosensitive currents in nociceptive sensory neurones. *J. Physiol.* **590**, 2995–3007 (2012).
110. Rahmouni, K. *et al.* Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin. *J. Clin. Invest.* **114**, 652–658 (2004).
111. Xing, J., Sinoway, L. & Li, J. Differential responses of sensory neurones innervating glycolytic and oxidative muscle to protons and capsaicin. *J. Physiol.* **586**, 3245–3252 (2008).
112. Zhang, Y. *et al.* Peripheral pain is enhanced by insulin-like growth factor 1 through a G protein-mediated stimulation of T-type calcium channels. *Sci. Signal.* **7**, ra94 (2014).
113. Smith, S. A., Mitchell, J. H. & Garry, M. G. Electrically induced static exercise elicits a pressor response in the decerebrate rat. *J. Physiol.* **537**, 961–970 (2001).
114. Mizuno, M. *et al.* High dietary phosphate intake induces hypertension and augments exercise pressor reflex function in rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **311**, R39–R48 (2016).
115. Numazaki, M. *et al.* Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8002–8006 (2003).
116. Baiou, D. *et al.* Neurochemical characterization of insulin receptor-expressing primary sensory neurons in wild-type and vanilloid type 1 transient receptor potential receptor knockout mice. *J. Comp. Neurol.* **503**, 334–347 (2007).
117. Majhi, R. K. & Pourteymour, S. Insulin sensitizes mechanosensitive ion channels, which aggravates pain. *J. Physiol.* **598**, 19–21 (2020).
118. Sousa-Valente, J., Andreou, A. P., Urban, L. & Nagy, I. Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2508–2527 (2014).
119. Huang, X., Liu, G., Guo, J. & Su, Z. Q. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 1483–1496 (2018).
120. Jiang, G. & Zhang, B. B. Pi 3-kinase and its up- and down-stream modulators as potential targets for the treatment of type II diabetes. *Front. Biosci.* **7**, d903-917 (2002).
121. Singh, S. S., Chauhan, A., Brockerhoff, H. & Chauhan, V. P. S. Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 104–112 (1993).
122. Alsadat, S. & Khorami, H. PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in diabetes. *Ann. Med. Biomed. Sci.* **1**, 46–55 (2015).
123. Fyffe, C. & Falasca, M. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 as an emerging target in the management of breast cancer. *Cancer Manag. Res.* **5**, 271–

- 280 (2013).
124. Boucher, J., Kleinridders, A. & Kahn, C. R. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a009191 (2014).
 125. Strycharz, J., Drzewoski, J., Szemraj, J. & Sliwinska, A. Is p53 involved in tissue-specific insulin resistance formation? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 8036902 (2017).
 126. Mandadi, S. *et al.* Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKC ϵ -mediated phosphorylation at S800. *Pain* **123**, 106–116 (2006).
 127. Wang, S., Joseph, J., Ro, J. Y. & Chung, M. K. Modality-specific mechanisms of protein kinase C-induced hypersensitivity of TRPV1: S800 is a polymodal sensitization site. *Pain* **156**, 931–941 (2015).
 128. Bhawe, G. *et al.* Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12480–12485 (2003).
 129. Zhang, X., Huang, J. & McNaughton, P. A. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* **24**, 4211–4223 (2005).
 130. Buren, J. J. Van, Bhat, S., Rotello, R., Pauza, M. E. & Premkumar, L. S. Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol. Pain* **1**, 17 (2005).
 131. Lilja, J., Laulund, F. & Forsby, A. Insulin and insulin-like growth factor type-I up-regulate the vanilloid receptor-1 (TRPV1) in stably TRPV1-expressing SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* **85**, 1413–1419 (2007).
 132. Goswami, C. *et al.* Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *J. Neurochem.* **91**, 1092–1103 (2004).
 133. Goswami, C. TRPV1-tubulin complex: involvement of membrane tubulin in the regulation of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J. Neurochem.* **123**, 1–13 (2012).
 134. Olson, A. L., Eyster, C. A., Duggins, Q. S. & Knight, J. B. Insulin promotes formation of polymerized microtubules by a phosphatidylinositol 3-kinase-independent, actin-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* **144**, 5030–5039 (2003).
 135. Parker, S. S. *et al.* Insulin induces microtubule stabilization and regulates the microtubule plus-end tracking protein network in adipocytes. *Mol. Cell. Proteomics* **18**, 1363–1381 (2019).
 136. Prager-Khoutorsky, M. & Bourque, C. W. Mechanical basis of osmosensory transduction in magnocellular neurosecretory neurones of the rat supraoptic nucleus. *J. Neuroendocrinol.* **27**, 507–515 (2015).
 137. Colberg, S. R. *et al.* Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* **39**, 2065–2079 (2016).
 138. Colberg, S. R. *et al.* Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: Joint position statement. *Diabetes Care* **33**, e147–e167 (2010).
 139. Kanaley, J. A. *et al.* Exercise/physical activity in individuals with type 2 diabetes: a consensus statement from the American College of Sports Medicine. *Med. Sci. Sports Exerc.* **54**, 353–368 (2022).
 140. Snowling, N. J. & Hopkins, W. G. Effects of different modes of exercise training

- on glucose control and risk factors for complications in type 2 diabetic patients: a meta-analysis. *Diabetes Care* **29**, 2518–2527 (2006).
141. Sigal, R. J. *et al.* Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycaemic control in type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **147**, 357–369 (2007).
 142. Church, T. S. *et al.* Effects of aerobic and resistance training on hemoglobin A1c levels in patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **304**, 2253–2262 (2010).
 143. Schwingshackl, L., Missbach, B., Dias, S., König, J. & Hoffmann, G. Impact of different training modalities on glycaemic control and blood lipids in patients with type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis. *Diabetologia* **57**, 1789–1797 (2014).
 144. Grace, A., Chan, E., Giallauria, F., Graham, P. L. & Smart, N. A. Clinical outcomes and glycaemic responses to different aerobic exercise training intensities in type II diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc. Diabetol.* **16**, 37 (2017).
 145. Liu, Y. *et al.* Resistance exercise intensity is correlated with attenuation of HbA1c and insulin in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **16**, 140 (2019).
 146. Li, Q. & Garry, M. G. A murine model of the exercise pressor reflex. *J. Physiol.* **598**, 3155–3171 (2020).
 147. Nishihara, E., Hiyama, T. Y. & Noda, M. Osmosensitivity of transient receptor potential vanilloid 1 is synergistically enhanced by distinct activating stimuli such as temperature and protons. *PLoS One* **6**, e22246 (2011).
 148. Butenas, A. L. E. *et al.* Novel mechanosensory role for acid sensing ion channel subtype 1a in evoking the exercise pressor reflex in rats with heart failure. *J. Physiol.* **600**, 2105–2125 (2022).
 149. Weyer-Menkhoff, I. & Lötsch, J. Human pharmacological approaches to TRP-ion-channel-based analgesic drug development. *Drug Discovery Today* **23**, 2003–2012 (2018).
 150. Chant, B. *et al.* Antihypertensive treatment fails to control blood pressure during exercise. *Hypertension* **72**, 102–109 (2018).
 151. Leow, M. K. S. & Wyckoff, J. Under-recognised paradox of neuropathy from rapid glycaemic control. *Postgrad. Med. J.* **81**, 103–107 (2005).
 152. Nicodemus, J. M., Enriquez, C., Marquez, A., Anaya, C. J. & Jolival, C. G. Murine model and mechanisms of treatment-induced painful diabetic neuropathy. *Neuroscience* **354**, 136–145 (2017).
 153. Sloan, G. *et al.* A new look at painful diabetic neuropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **144**, 177–191 (2018).
 154. Rahmouni, K. *et al.* Hypothalamic PI3K and MAPK differentially mediate regional sympathetic activation to insulin. *J. Clin. Invest.* **114**, 652–658 (2004).

謝辞

本研究の遂行にあたり、パッションにあふれた御指導、御助言を受け賜りました本研究科准教授の堀田典生博士には、学部 1 年次から今日に至るまでの約 8 年間、研究活動だけでなく、研究者および教育者としての人生を歩んでいくために大切なことを数多くご教示いただきました。その全てが、私の研究者および教育者としての骨格となりました。ここに深甚なる深謝の意を表します。

本研究科准教授の片野坂公明博士には、快く主査を引き受けて戴き、本論文に対する貴重な御助言をいただきました。ここに心から感謝の意を表します。

本研究科准教授の尾方寿好・水上健一両博士には、快く副査を引き受けて戴き、本研究に対して細部にわたり御助言を受け賜りました。ここに深く御礼申し上げます。

University of Texas Southwestern Medical Center 准教授の Masaki Mizuno 博士の研究主宰と多大なる御指導ならびに貴重な御助言を賜りましたこと、深く御礼申し上げます。

名古屋大学名誉教授の水村和枝博士には、本研究の遂行にあたり、多大なる御指導ならびに貴重な御助言を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。

本研究科教授の佐藤純博士、University of Texas Southwestern Medical Center 教

授の Gary A. Iwamoto 博士，同大学教授の Scott A. Smith 博士，同大学教授の故 Jere H. Mitchell 博士，同大学教授の Wanpen Vongpatanasin 博士，同大学博士研究員の Rie Ishizawa 博士，同大学博士研究員の Han-Kyul Kim 博士，同大学博士研究員の Ayumi Fukazawa 博士には，本研究に対する的確な御助言を受け賜りましたこと，深く御礼申し上げます。

本研究科の那須輝顕博士には，実験動物の扱いについて多くの有益な御助言を頂きましたこと，深く感謝いたします。技術補佐員の木原ちあき氏には，本研究に用いた実験手技についての温かいご指導を受け賜りました。ここに感謝の意を表します。秘書の加藤君枝氏，秘書の小島真由美氏には，本研究に関わる事務手続きにご協力していただきましたこと，感謝いたします。

私が研究活動に専念できるよう御援助をいただきました，日本学術振興会，日本学生支援機構に深く感謝申し上げます。

最後に，研究活動を通じて共に苦楽を共にした堀田研究室の在学生や卒業生，そして，私の本学大学院への進学に理解を示し，多大なる支援をしてくれた父 仁，母 里恵をはじめとした家族にこの場を借りて深い感謝の意を表します。