

平成23年5月31日現在

機関番号：34521  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21700559  
 研究課題名（和文） 糖尿病の運動療法と血糖コントロールおよび筋毛細血管ネットワークとの関連性  
 研究課題名（英文） Relation of exercise training, blood sugar level and muscle capillaries network with type 2 diabetes mellitus  
 研究代表者  
 村上 慎一郎 (MURAKAMI SHINICHIRO)  
 姫路獨協大学・医療保健学部・講師  
 研究者番号：30454763

研究成果の概要（和文）：本研究は、Ⅱ型糖尿病モデル動物に対して、有酸素運動を処方した。結果、血糖値とHbA1cは、糖尿病群と比し糖尿病の運動群は、低値を示したが、正常群と比すると高値をであった。そして、筋線維全体のミトコンドリア活性は糖尿病群より高値を示した。また、筋毛細血管直径、ねじれ、および、毛細血管容量は維持され、血管新生因子の上昇が確認された。これらより、糖尿病の運動療法は、血糖コントロールの効果は十分でない。しかし、筋毛細血管構築の破綻を防ぐことができ、糖尿病の二次的合併症に対して治療効果が得られることが確認できた。

研究成果の概要（英文）：The aerobic exercise training has long been utilized as one of therapy in the type 2 diabetes mellitus. The effects of a therapeutic exercise on the myocyte and the microcirculation of skeletal muscle in diabetic rats were investigated. The aerobic exercise program consisted of 2 weeks running on a treadmill (0° incline, 10m/min, 60min/day, 6day/wk). Treated diabetic rats exhibited a decrease in plasma glucose, glycohemoglobin, and reactive oxygen species (ROS) compared with those of the diabetic rats but did not completely normalize levels. Usually, in the soleus muscles of the non-diabetic rats were composed by higher percentage of type I MyHC isoform and lower percentage of type II MyHC isoform. But there were no type II fibers in the soleus muscles of the diabetic rats. The succinate dehydrogenase (SDH) activity in training diabetic rat was significantly higher than that in diabetic rat. The capillary volume in diabetic muscle was significantly less. In the aerobic exercised diabetic muscles, the capillary volumes were increased toward control levels and completely normalize levels. In summary, the results of the present study provide evidence for the effectiveness of exercise training in reducing some of the muscle circulatory complications associated with diabetes mellitus.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：リハビリテーション科学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：糖尿病, 運動療法, 血糖値, 微小循環

## 1. 研究開始当初の背景

II型糖尿病は、インスリン抵抗性のために慢性的な高血糖が続く代謝性疾患であるため、長期にわたると網膜症、腎症、神経障害などの合併症を併発し、ADL (Activities of daily living)、QOL (Quality of life) や寿命に多大な影響を与え、また、動脈硬化の進展を早めるため、虚血性心疾患や脳血管疾患などを高率に合併することが知られている。糖尿病の治療目標は「完全治癒」であろうが、その発生機序は、完全に明らかになっておらず、根治は困難である。そのため、「糖尿病に起因する自覚症状や、慢性合併症の発現や進行を予防すること」となる。そのための血糖値のコントロールは、薬物療法、食事療法、運動療法が重要となる。その中で、運動療法は、継続して習慣的に行われなくてはならないものである。(藤井, 臨床スポーツ医学, 1988; 佐藤, 診断治療, 1988)

そこで、II型糖尿病にみられる高血糖状態と三次元毛細血管構築の退行性変化をきたす血管増殖系因子の低下が密接に関連し、血管と血管結合の副側循環路の形成不全にかかわり、有酸素運動は、これを妨げるとする仮説を検証するためにこの研究を企画した。II型糖尿病の発生の原因とされるインスリン抵抗性は長きにわたると、臓器に種々の障害をもたらす。また、高血糖状態は活性酸素を発生し、血管内皮細胞に障害を与え、微小血管系障害を惹起する。運動療法は、これらを予防する効果があり、特に骨格筋の代謝活動の変化が血糖値の改善や二次障害の予防等に影響を与える。藤野他 (Fujino, 2005) はII型糖尿病モデル動物である内臓肥満型のOLETFラットを用いて後脚筋に見られる筋線維の変化と毛細血管三次元構築の蛍光造影剤を灌流した鋳型筋標本において共焦点レーザー顕微鏡により100マイクロメートルの深さまで可視化することに成功している。心筋および骨格筋では血管新生の抑制はインスリン抵抗性の後期に見られ (Jesmin, 2002)、心臓では血管増殖因子 (以下 VEGF) の発現が低下しているとされている (Chou, 2002)。OLETFラットにおいて比較的早期には VEGF をはじめ血管新生系の因子が増大し毛細血管ネットワークのうち縦走毛細血管が結ぶ側路 (吻合路) の数の増大を観察している。しかし、インスリン抵抗性が進行するに従いPI3-kinaseの減弱を介する VEGF の新生の抑制およびAMP-activated protein kinase (AMPK) 不活性化による VEGF の新生の抑制が起こると考えられる (Ouchi, 2005)。本研究では、この時期の毛細血管三次元構築を明らかにするとともに糖尿病に対する有酸素運動の効果と血管新生と退行への関与が明確になる。

## 2. 研究の目的

自然発症二型糖尿病モデル動物に対して、骨格筋の形態観察や毛細血管の三次元構造解析をおこない、高血糖との関連を検証すると共に、糖尿病に対する治療的運動 (特に有酸素運動) の効果を検証した。本研究では、1点目とし、ミオシン重鎖 (MyHC) の型の同定に免疫染色およびATPase染色と、ミトコンドリアによる酸化酵素活性の同定のためコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性を行い筋線維の組織化学的変化の検証とする。2点目として筋線維の萎縮と血管増殖因子の低下を密接に関連づける新規の因子を想定し、その存在を証明する、または、血管増殖系との関連をリアルタイムPCRを用いて遺伝子発現を測定し検討する。3点目は共焦点レーザー法により三次元毛細血管構築を観察し、毛細血管の可視化を行い、側副循環路の形成・退行を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、II型糖尿病モデル動物を用いて検証を行った。本研究で使用したモデル動物は、自然発症II型糖尿病モデルラットであるGK (Goto-Kakizaki)ラット (非肥満タイプ)、SDT (Spontaneously Diabetic Torii fatty)ラット (非肥満タイプ)、OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)ラット (肥満タイプ)を用いた。ここでは、特に日本人に多い非肥満タイプのGK、SDTラットで行った実験について報告する。本研究では、II型糖尿病モデル動物を用いる検証を行った。本研究で使用したモデル動物は、自然発症II型糖尿病モデルラットであるGK (Goto-Kakizaki)ラット (非肥満タイプ)、SDT (Spontaneously Diabetic Torii fatty)ラット (非肥満タイプ)、OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty)ラット (肥満タイプ)を用いた。ここでは、特に日本人に多い非肥満タイプのGK、SDTラットで行った実験について報告する。

糖尿病モデル動物に対して治療的運動プログラム (レコンディショニング) を行った。運動の種類は (1) 有酸素的持久的運動 (Ex; 速度15m/min, 角度0°, 60分間, 5回/wk) 及び (2) 無酸素的レジスタンス運動 (resEx; 速度20m/min, 角度20°, 30分間, 5回/wk) をトレッドミル上で行った。この運動を行った直後の血中乳酸値はExが平均1.96 mmol/L, resExが平均8.66 mmol/Lであった。運動期間は3週間として、Exの一部は (3) 最終測定時の1週間前に運動を終了した (preEx)。

1) 採血した全血からグリコヘモグロビン (HbA1c, %) を測定し、遠心分離した血漿より、酸化ストレス度 (dROM, U. CARR)、血糖

(mg/dL) インスリン濃度 (ng/mL) を分析した。

2) Alkaline phosphatase (AP) 染色を用いて毛細血管密度と筋毛細血管比を測定するため光学顕微鏡を用いて2次元解析を行った。

3) 共焦点レーザー顕微鏡を使用して、骨格筋内の毛細血管三次元構造を解析した。1 $\mu$ m毎に筋標本をスキャンして、100 $\mu$ mをスタックして、三次元像を構築した。

4) 毛細血管の変化を惹起するシグナル伝達系について、血管内皮増殖因子(VEGF)とその受容体 kinase insert domain-containing receptor (KDR), fms-like tyrosine kinase (Flt-1), angiopoietin-1, angiopoietin-2, その受容体 angiopoietin-1 and -2 receptor (Tie-2)の発現を測定した。また、血管新生抑制因子である Thrombospondin-1 (TSP1) の測定も行った。

5) 骨格筋の代謝と関係のある AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK; AMP-activated protein kinase, 糖輸送体 (GLUT4; Glucose transporter type 4), 脱共役蛋白質 3 (UCP3; uncoupling protein 3)を測定した。さらに骨格筋細胞内の酸素の需給供給や筋細胞と毛細血管のクロストークを調べるために低酸素誘導物質 (HIF-1 $\alpha$ ; Hypoxia-inducible factor) を測定した。

6) 筋線維のタイプ変化について、MyHC type II 抗体を用いた免疫染色と、ATPase 染色 (pH10.6) を行い筋線維の MyHC のタイプ変化を観察した。

7) 筋線維内の酸化酵素活性を測定するためコハク酸脱水素酵素 (SDH; Succinate dehydrogenase) 活性を測定した。その活性は、SDH 染色を施し、デジタルカメラで撮影し濃度を測定し標準化した。

#### 4. 研究成果

糖尿病における骨格筋の毛細血管三次元構造解析では、毛細血管構造が乱れると共に、毛細血管径の縮小、蛇行性の減少などが観察され、毛細血管容積は減少した(図1 Diab)。また、通常、骨格筋線維に縦走する毛細血管や毛細血管同士を結合する吻合毛細血管が、不規則な走行になることが観察された(図1 Diab)。一方、治療的運動プレコンディショニング (Ex, preEx, resEX) を行った骨格筋では、骨格筋退行等の変化が抑制され、毛細血管容量が保持されていた(図1 Diab+Ex, Diab+preEx, Diab+resEx)。

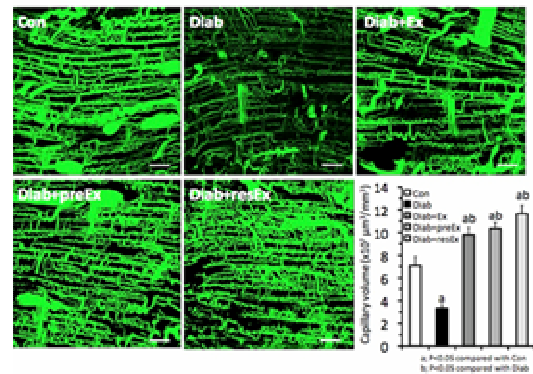


図1 共焦点レーザー顕微鏡像

糖尿病では、血管新生因子である VEGF 系, angiopoietin-Tie2 系は共に低下し(図2), 血管抑制因子である TSP1 は増加した。

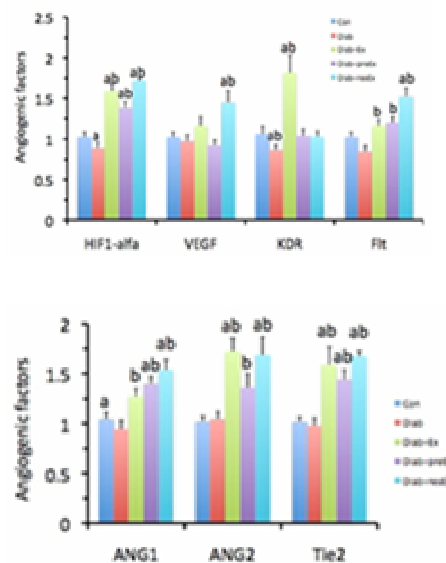


図2 血管増殖因子

また、廃用性萎縮筋でも同様のことが観察された。一方、運動処方を行った場合に糖尿病ラットでは、血糖、HbA1c は運動をしなかった群と比較して、低値を示した。また、酸化ストレスの指標である血漿中の活性酸素代謝物 (d-ROMs) も低下した。しかし、正常ラットと比較すると、何れも高値を示した。インスリンについては、有意な変化が観察されなかった。正常ラットヒラメ筋の筋線維 MyHC 型を免疫染色(図3)と ATPase 染色確認した。筋線維は、多数の I 型と少量の II 型線維で構成されていた(図3A)。しかし糖尿病における筋線維のタイプは全て I 型に変化していた(図3B)。そして、運動療法の処方では変化を防止することはできなかった。(図3C, D)

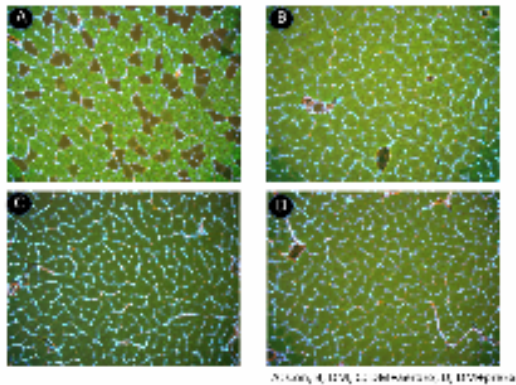
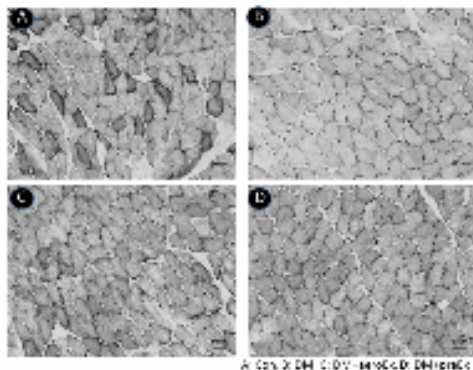


図3 MyHC type I の免疫染色

酸化酵素活性は、SDH 染色によって染められた濃度によって測定した。正常ラットでは、濃く染まる MyHC I 型と薄く染まる II 型線維が確認された (図 4 A)。糖尿病ラットでは、すべてが薄く染まっていた (図 4 B)。運動を処方された糖尿病ラットも I 型であり、薄く染色された (図 4 C)、しかし、糖尿病ラットよりも濃く染色された。

図4 SDH 活性



本研究では、運動を低強度（有酸素運動）と高強度（無酸素運動）の二種類運動を行ったが、何れの運動も同様の結果が得られた。一方、骨格筋では、酸化酵素活性の高い MyHC II 型が消失し I 型に変わっていた。この変化は、今回の運動処方（有酸素運動、および、無酸素運動）で防ぐことはできなかった。しかし、骨格筋の酸化酵素活性の低下はある程度防ぐことができた。これらの結果より糖尿病の運動処方のみでは、血糖などに対しては、ある程度の効果は見られるが、十分に正常域まで低下させることは困難である。骨格筋内の毛細血管に関しては、運動を行うことにより毛細血管径、容量の維持が観察され、三次元構造が温存されていることが明確となった。したがって、毛細血管ネットワークの破綻など糖尿病における二次的合併症に対して、予防的な効果は運動療法により十分得られることが検証できた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Fujita N, Murakami S, Arakawa T, Miki A, Fujino H. The Combined Effect of Electrical Stimulation and Resistance Isometric Contraction on Muscle Atrophy in Rat Tibialis Anterior Muscle. *Bosn J Basic Med Sci.* 査読有. 11(2): 1-6, 2011.
- ② Murakami S, Fujino H, Takeda I, Momota R, Kumagishi K, Ohtsuka A. Comparison of Capillary Architecture between Slow and Fast Muscles in Rats Using a Cofocal Laser Scanning Microscope. *Acta Medica Okayama.* 査読有. 64(1):11-18, 2010.
- ③ 田尻直輝, 武田功, 藤野英己, 村上慎一郎, 松永秀俊, 小幡太志, 高見博文, 森彩子, 森経介, 小原教考. 後肢懸垂前の温熱療法が筋に及ぼす影響. *理学療法岡山.* 査読無. No, 29. 4-6, 2009
- ④ 森 彩子, 武田功, 藤野英己, 村上慎一郎, 小幡太志, 高見博文, 田尻直輝, 松永秀俊, 石井禎基, 小田桐匡, 森経介, 小原教考. 運動習慣と運動中止が体重増加に与える影響. *理学療法岡山.* 査読無. No, 29. 12-15, 2009.
- ⑤ Thermal Preconditioning Prevents Fiber Type Transformation of The Unloading Induced-atrophied Muscle in Rats. Takeda I, Fujino H, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Ishihara A. *J Muscle Res Cell Motil.* 査読有. 30 (3-4):145-152. 2009.

[学会発表] (計 3 4 件)

- ① Murakami S, Kondo H, Fujita N, Fujino H. Abnormality of Myosin Heavy Chain Isoform Type and Succinate dehydrogenase Activity in Soleus Muscle of Diabetic Rat. 16<sup>th</sup> International WCPT Congress, Amsterdam, 2011.06. 20-23.
- ② Fujino H, Murakami S, Kondo H, Fujita N, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A. Therapeutic Exercise Attenuates Microangiopathy of Skeletal Muscle in type II Diabetes. 16<sup>th</sup> international WCPT Congress, Amsterdam, 2011.06. 20-23.
- ③ Murakami S, Kondo H, Fujita N, Fujino H. Effect on Capillary of Aerobics Exercise to Diabetic Muscle. ACSM 58th Annual Meeting and 2nd World Congress on Exercise is Medicine, Denver, 2011.05.01-06.04.
- ④ Fujino H, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A,

- Roland R. Roy. High-intensity Exercise Training Attenuates Diabetes-induced Muscle Capillary Regression in Non-obese NIDDM Rats. ACSM 58th Annual Meeting and 2nd World Congress on Exercise is Medicine, Denver, 2011. 05. 01-06. 04.
- ⑤ Kondo H, Fujino H, Murakami S, Fujita N, Morifuji T, Shiina S, Nagatomo F, Ishihara A. Low-intensity Exercise Prevents Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Spontaneously Type 2 Diabetic Torii rat. ACSM 58th Annual Meeting and 2nd World Congress on Exercise is Medicine, Denver, 2011. 05. 01-06. 04.
- ⑥ Fujino H, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Morifuji T, Nagatomo F, Ishihara A. Low-Intensity Exercise Training Prevents Muscular Microangiopathy in Non-obese Type 2 Diabetic Rats. Experimental biology 2011, Washington D.C., 2011. 4. 9-13.
- ⑦ Murakami S, Morifuji T, Kondo H, Takeda I, Fujita N, Fujino H. Effects of Exercise Preconditioning on Capillary in Soleus Muscle of Type 2 Diabetic Rats. Experimental biology 2011, Washington D.C., 2011. 4. 9-13.
- ⑧ Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Ishihara A. Decreased Capillary Volume and Angiogenic Factors in Type 2 Diabetic Skeletal Muscle. The 50th annual meeting of American society for cell biology, Philadelphia, 2010. 11. 11-15.
- ⑨ Fujino H, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Nagatomo F, Ishihara A. Three-dimensional visualization of capillary and exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes. The 50th annual meeting of American society for cell biology, Philadelphia, 2010. 11. 11-15.
- ⑩ Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Ishihara A. Capillarity and angiogenic factors in soleus muscle associated with type II diabetes mellitus. ACSM conference on Integrative physiology of exercise 2010, Miami, 2010. 09. 22-25.
- ⑪ Fujino H, Kondo H, Murakami S, Fujita N, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A. Endurance exercise attenuates microangiopathy of muscle capillary in non-insulin-dependent diabetic rat. ACSM conference on Integrative physiology of exercise 2010. Miami, 2010. 09. 22-25.
- ⑫ Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Ishihara A. The influence of angiogenic and anti-angiogenic factors on the degradation of the capillary in Type II diabetic rat. 第18回日本運動生理学会大会. 鹿児島. 2010. 07. 31-8. 1.
- ⑬ Fujino H, Murakami S, Kondo H, Fujita N, Nagatomo F, Ishihara A. Effects of endurance exercise on muscle capillary network in non-insulin-dependent diabetic rats. 第18回日本運動生理学会大会. 鹿児島. 2010. 07. 31-8. 1.
- ⑭ Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A. Exercise preconditioning attenuates oxidative stress and hyperglycemia in spontaneously diabetic torii rat. 57th Annual meeting of American college of sports medicine, Baltimore, 2010. 06. 1-5.
- ⑮ Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A, Roy RR. Capillary hemodynamics and expression of angiogenic regulators in metabolically different rat muscles. 57th American college of sports medicine, Baltimore, 2010. 06. 1-5.
- ⑯ 村上慎一郎, 藤野英己, 近藤浩代, 小幡太志, 弓影秀樹, 高見博文, 松永秀俊, 武田功. 非インスリン依存型糖尿病モデルラットのヒラメ筋ミオシン重鎖アイソフォームのタイプ移行と酸化的リン酸化活性の変化. 第45回日本理学療法学会大会, 岐阜, 2010, 5/27-29.
- ⑰ Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A, Roy RR. Fiber capillary regression and endothelial apoptosis against disuse atrophy in rat soleus muscle: role of angiogenic regulators. Experimental Biology 2010, Anaheim, 2010. 04. 24-28
- ⑱ Murakami S, Fujino H, Kondo H, Takeda I, Momota R, Kumagishi K, Ohtsuka A. Abnormality of capillarity and oxidative enzyme activity in slow muscle of type 2 diabetic rats. Experimental Biology 2010, Anaheim, 2010. 04. 24-28.
- ⑲ Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A. Responses of pro- and anti-angiogenic factors to capillary in rat soleus muscle after

hindlimb unloading. 49th The American Society for Cell Biology, San Diego, 2009. 12.

⑳Fujino H, Ishihara A, Murakami S, Kondo H, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR: Implications of angiogenic factors and thrombospondin-1 underlying capillary regression in chronically unloaded rat soleus muscle. American college of sports medicine, Seattle, 2009. 05.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上慎一郎 (MURAKAMI SHINICHIRO)  
姫路獨協大学・医療保険学部・講師  
研究者番号：30454763