

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月30日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500469

研究課題名（和文）

糖尿病のリハビリテーション—運動療法の中樞効果—

研究課題名（英文）

Exercise controls feeding center activity in type 2 diabetic mice

研究代表者

山野真利子 (YAMANO MARIKO)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・准教授

研究者番号：80192409

研究成果の概要（和文）：

糖尿病モデル動物（*db/db*マウス）は高血糖により特に視床下部のオレキシン神経細胞の活動の指標となる*c-fos*蛋白の出現でみると低下が認められた。次にこの神経活動低下を回復させる方法を検討したところ、1日30分4日のトレッドミル運動（6 m/分速度）で、糖尿病マウスの視床下部神経細胞の低下した活動が回復した。さらに同時にオレキシンmRNAの上昇が認められた。次に糖尿病マウスに高蛋白食摂餌と運動療法を組み合わせ、高蛋白食運動群で萎縮が大幅に回復した。また膵臓β細胞のアポトーシスに関連して出現する物質ganglioside GM3を見つけた。

研究成果の概要（英文）：

The effects of exercise on hypothalamic orexin(OX) neurons were assessed in type 2 diabetic model mice. Orexin controls the feeding behavior as well as the arousal level. C-Fos expression in hypothalamic orexin neurons is decreased in *db/db* mice. We found that exercise by treadmill running (6 m/min, 30 min) for 4 days increased c-Fos expression in orexin neurons of both *db/db* and *db/m* mice. Orexin mRNA levels in the hypothalamus tended to be increased in EX groups of both *db/db* and *db/m* mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2000,000	600,000	2600,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3300,000	990,000	4290,000

研究分野：総合領域

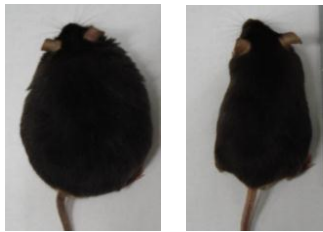
科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学、糖尿病モデル動物、運動療法、オレキシン神経

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は高血糖により起こる全身への様々な障害と平行して、エネルギー代謝等に関与する脳機能の低下がおこる。特に視床下部にある摂食中枢の神経細胞の働きが大きく低下していることがその原因の一つであることを、実験動物を用いて神経科学的に証明することを目的とした。

糖尿病は、インスリン等薬物を用いた血糖の調節が主であり、2型糖尿病では薬物療法と並行して必ず食事療法と運動療法が指導される。運動療法は、筋における摂取エネルギーの増加により、血糖コントロールの改善、脂質代謝の改善、インスリン感受性の増加が認められ、治療の柱となっている（門脇孝他著、糖尿病学基礎と臨床、p915-932、西村書店）。私達はこれまで糖尿病モデル動物（下記左：肥満型2型糖尿病マウス、右：正常マウス）を用い、高血糖動物では視床下部の摂食中枢にあるオレキシン神経細胞の働きが大幅に減少しているのを見つけた（2007年第112回日本解剖学会発表）。



Yamamoto 等は2型糖尿病マウスでオレキシン mRNA の量が減少していることを1999年に報告している。つまり高血糖は末梢器官のみならず、脳の摂食中枢のオレキシン神経の働きを阻害していることが示唆される。我々はこれらの糖尿病動物をトレッドミルで走らせ運動させると、減少していた神経細胞の活動が大幅に上昇し、正常動物と同じ位になることを発見した（2009年第114回日本解剖学会発表）。このことは運動することが低下

していた脳の働きを大幅に改善させたと考えられる。糖尿病患者でも同様に脳内のオレキシンをはじめ神経細胞の働きが低下している可能性が示唆される。ヒトでオレキシンの減少は我慢できない眠気（ナルコレプシー）様症状が報告され、糖尿病患者に起こる様々な症状にも関連している可能性があり、運動療法と脳内機能との関連と、さらに栄養療法を検討し、糖尿病動物でその改善が神経細胞レベルで証明されれば、リハビリテーション医学に大きな意義が与えられると考えた。

## 2. 研究の目的

糖尿病動物は高血糖により起こる全身への様々な障害と平行して、エネルギー代謝等に関与する脳機能にも大きな影響があり、糖尿病動物に運動療法を施すと、低下していた脳機能が正常に近くなることを神経科学的に証明する。

1型・2型糖尿病モデル動物を用い、高血糖を示す動物では視床下部摂食中枢にあるオレキシン神経細胞の働きが減少しているか否かを、神経活動の指標として用いられる *c-fos* 蛋白の発現を免疫組織化学的に検討する。本研究では糖尿病動物の脳内のオレキシン神経細胞のみならず、大脳皮質や他の脳内の神経細胞の活動の変化を同様に *c-fos* 蛋白の発現を用いて詳細に検討し、異常を見つける。次に糖尿病動物にトレッドミル走行運動させる事が、低下したニューロンの働きを回復させることを証明する。

視床下部摂食中枢に存在するオレキシン神経はエネルギー代謝等に関与する自律神経との関連も示唆されている(Peyron 他 2006)。次に糖尿病動物を用いて栄養療法として高蛋白食の効果を中枢と末梢組織で検討する。骨格筋での効果は、同様に2型糖尿病動物を用いて、

下腿3頭筋の異常の有無を検討し、高蛋白食・運動がこれらの筋の異常を回復させるか否かを検討する。

### 3. 研究の方法

#### 動物群

2型糖尿病を示す *db/db* マウスとコントロールとして *db/m* マウスを用いた。また2型糖尿病を発症する *Kob* ラットの膵臓のβ細胞についても検討した。

#### 運動療法の施行



動物をトレッドミル上を走らせる。速度は6 m/分で1日30分間、4日間走らせ、最終日に犠牲死させた。

さらに自発的な運動として、各自ケージに回転車を設置し、長期的な回転運動の測定をし、栄養療法の効果を検討する。

#### 形態学的探求

視床下部のオレキシン神経細胞とMCH神経細胞をターゲットとし、これらの神経の活動性の変化を免疫組織化学的方法により詳細に検討する。活動性の変化は神経細胞の活性化の指標となる *c-fos* 蛋白の出現でみる。さらに神経細胞で内セカンドメッセンジャー系のAMPキナーゼやp-ERK等の変化をも検討する。

次に骨格筋の萎縮の程度を検討するため、ひらめ筋を含む下腿三頭筋を摘出し、筋線維の大きさの比較、筋タイプをミオシンtype1, type2抗体を用いて免疫組織化学的に染色し、遅筋、速筋のタイプ別の変化も検討した。

膵臓のβ細胞の検討は、インスリン、GM3、

Caspase-3を免疫組織化学的に検討した。

#### 行動的探求

本研究費で購入した自動行動追跡・解析ビジョンシステムを用い、夜行性であるマウスの行動を観察し、糖尿病マウスの行動面から検討する。オレキシン神経は減少すると眠くなる(ナルコレプシー)症状を起こすことが知られている。トレッドミルでの運動により、糖尿病の症状であるぼーとするような症状や、ヒトでみられる浅い睡眠パターン、だるい症状等を含めた症状の回復がみられるかを検討し、神経細胞の活動低下の回復によりこれら症状も回復させるのではないかについても検討する。

#### 分子生物学的探求

運動による中枢効果を、神経細胞のmRNAの量的な検討として脳の視床下部を抽出し、RT-PCRを用いて、糖尿病動物でOX, MCH, NPY mRNAが減少しており、糖尿病動物を運動させることによりこれらのタンパク量が正常動物に近くなることを証明する。

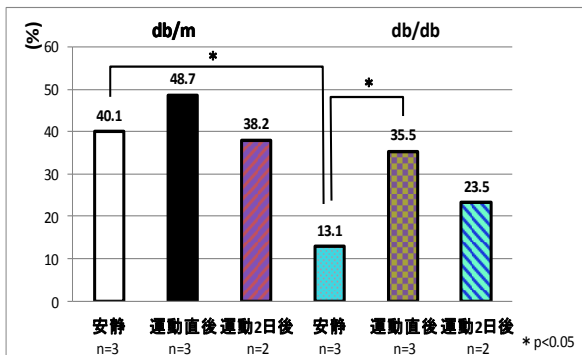
#### 栄養療法の検討

2型糖尿病を示す *db/db* マウスを用い、高蛋白食(40%高蛋白TEST DIET)群と普通食群にわけた。さらに各自ケージに回転車を装着した運動群と、安静群の計4グループにわけた。運動群は回転運動数をモニターしながら4週間後に犠牲死させ、同様に脳の視床下部にある摂食関連神経であるオレキシン神経細胞の検討と下腿三頭筋のひらめ筋の検討をした。

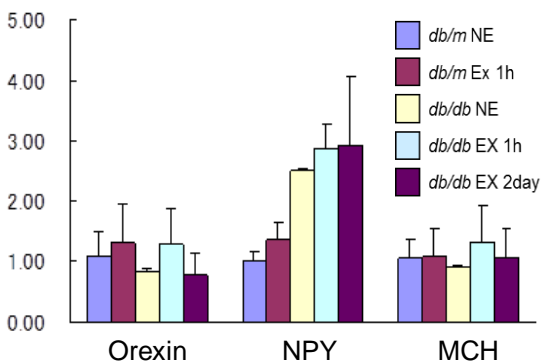
### 4. 研究成果

血糖値は安静群 *db/db* はコントロールに比べて約3倍の高値を示した。しかし *db/m*, *db/db* ともに運動による血糖値の変動はみられず、運動による血糖値の効果はあまり認められなかった。

血中インスリン濃度は、*db/m* では安静群、運動群で差は見られず、低い値を示した。一方 *db/db* は *db/m* に比べて安静群で明らかな高値を示したが、運動群では *db/m* とほぼ同じ程度にまで減少していた。レプチンもインスリンと同様、*db/m* では安静群、運動群で差は見られず、低い値を示した。*db/db* は安静群で *db/m* に比べて高値を示したが、運動群では、*db/m* と同じ程度とまではいかないが、安静群に比べて大きく減少し、糖尿病の高インスリン血漿、高レプチン血漿に対して効果がやや認められた。



上図は視床下部外側野のオレキシン神経細胞中の *c-fos* 蛋白の発現を観察したところ、*c-fos* の割合は、*db/m* 安静群より *db/db* 安静群では有意に低下していた。運動群での *c-fos* 蛋白発現の割合は、*db/m* で安静群より上昇、*db/db* は運動により有意な上昇がみられた。運動による効果の持続性をみると、運動後2日後まで *c-fos* 蛋白の発現が続いた。



視床下部の OX, MCH mRNA は、上図のよう

に糖尿病動物で正常動物に比較して減少しているが、糖尿病動物を運動させることによりこれらの mRNA 量が正常動物に近くなった。このことより運動でオレキシンは mRNA 量も増加していることが認められた。

栄養療法的検討で高蛋白食摂餌の効果は、視床下部摂食中枢のオレキシン神経細胞の核内で、高血糖を示す *db/db* マウスでは、普通食ではコントロールの *db/m* マウスと比較して神経細胞の活性化を示す指標の *c-fos* 蛋白大幅に減少した。同様 *db/db* マウス安静高蛋白食摂餌群は増加しなかった。しかし *db/db* マウス高蛋白運動群では *c-fos* 蛋白は増加し中枢効果が認められた。

*db/db* マウスのひらめ筋断面積は、高蛋白食で肥大、普通食と運動群で萎縮、高たんぱく食運動群で肥大が見られ、高蛋白のみでは効果なく、運動との併用により萎縮が防止され、肥大し効果が大きであった。

## 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 2 件)

- 1) 糖尿病モデルラットの膵臓β細胞のアポトーシスにともなうガングリオシド GM3 の発現について。

山野真利子、城尾恵里奈、J Life Sci. Res. 2012; 10: 1-4. 査読あり

- 2) 2型糖尿病モデルマウスにおける運動負荷の効果—オレキシンニューロンの活性化を指標として—。

細江さよこ、山野真利子、仙波恵美子、和歌山県立医科大学大学院修士論文2012 査読なし

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 山野真利子、三牧理沙

糖尿病マウスにおける高蛋白食摂餌と運動の効果、第 118 回日本解剖学会 (2013 年 3 月 29 日、高松)

- 2) 山野真利子、高蛋白食が糖尿病マウスに与える影響、第 117 回日本解剖学会 (2012 年 3 月 27 日、甲府)
- 3) Hosoe, S., M. Yamano, E. Senba, Exercise controls feeding center activity in type 2 diabetic mice. The 34<sup>th</sup> Annural Meeting of the Japan Neuroscience, (2011 年 9 月 16 日、横浜)
- 4) 細江さよこ、山野真利子、仙波恵美子、二型糖尿病モデルマウスにおいて、トレッドミル運動はオレキシンニューロンを活性化させる。第 116 回日本解剖学会 (2011 年 3 月 29 日、横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://www.osakafu-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山野 真利子 (YAMANO MARIKO)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・准教授

研究者番号：80192409

### (2) 研究分担者

香西 はな (KOUZAI HANA)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学部・講師

研究者番号：00382242