

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590290

研究課題名(和文) 自発的運動による長寿遺伝子の活性化は2型糖尿病誘発性心不全を改善するのか

研究課題名(英文) Does Sirtuin gene expression, upregulated by voluntary exercise, improve type 2 DM-induced heart failure?

研究代表者

坂田 進 (Sakata, Susumu)

畿央大学・健康科学部・教授

研究者番号：20142383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病OLETFラット(1か月齢)を16か月間回転カゴ付き飼育ケージで飼育した(回転群)。対照群は、標準飼育ケージで飼育したOLETF(標準群)である。高血糖と高HbA1cを示す標準群に対して、回転群の血糖とHbA1cは正常値であった。心エコーで標準群の左室弛緩機能は低下していた。圧カテーテルによる心機能解析で、標準群では $\pm dP/dt$ の低下と τ の延長が見られたが、回転群の $\pm dP/dt$ と τ は正常値であった。標準群の左室SERCA2a発現量は低下していた。DNAマイクロアレイにより回転群で25個の糖尿病関連遺伝子の発現に変化があり、これらの遺伝子発現と生理機能との関連を調査している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine whether voluntary wheel-running (WR) suppress development of diabetes mellitus (DM) and improve heart failure in a type 2 DM model rat OLETF. Five-week-old OLETF rats were housed either in cages equipped with wheels (OLETF-WR) or in standard cages (OLETF-SED) for 16 months. Blood glucose (BG) and Hb A1c were higher in OLETF-SED rats than in OLETF-WR and LETO rats. Echocardiography and left ventricle (LV) catheterization clarified that OLETF-SED rats have decreased maximal LV pressure, decreased $\pm dP/dt$ and slower LV relaxation as compared with OLETF-WR and LETO rats. In addition, LV of OLETF-SED rats showed down-regulated SERCA2a expression and increased collagen fibers. These results indicate that long-term WR can suppress development of heart failure in OLETF rats. Relationship between such cardiac functions and DM- or Sirtuin-related gene expression, estimated by DNA microarray, is under examination.

研究分野：心臓生理学

キーワード：2型糖尿病 心不全 自発的運動 OLETF 長寿遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は、2 型糖尿病モデルラット OLETF の左心室弛緩機能が低下していることを明らかにした。この弛緩機能低下には、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) の発現低下により引き起こされる Ca^{2+} ハンドリング障害が関与することを示した (*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H138-H148)。次に、OLETF 糖尿病ラットの心臓において、SERCA2a の発現低下に伴い収縮/弛緩機能の低下と左室収縮性の酸素コストの増大、すなわちエネルギー利用の無駄使いを明らかにした (*Mol Therapy* 2006; 13: 987-996)。さらに、DNA マイクロアレイ解析法を用いて糖尿病誘発性心臓病に関連する遺伝子の発現を解析した。OLETF 不全心では、SERCA2a を含む 5 6 6 個の遺伝子が発現低下を引き起こしていた (*PLoS ONE* 2009; 4(7): e6474)。

(2) 長寿遺伝子と言われる NAD 依存性脱アセチル化酵素 Sirtuin 1 遺伝子発現が 2 型糖尿病の病態との間に関連があることが報告された。Sirtuin 1 を全身で発現させたトランスジェニックマウスは、高脂肪食で誘発される糖代謝異常に対して抵抗性を持っていた (*Trends Pharmacol. Sci.* 31:212-220, 2010) ので、Sirtuin 1 は 2 型糖尿病を改善する働きがあると考えられる。一方、運動が AMP 活性化キナーゼを介して細胞内 NAD^+ を増加させ、Sirtuin 1 活性を促進することが報告された (*Nature* 458:1056-1060, 2009)。

2. 研究の目的

日常的な自発的運動により 2 型糖尿病ラット OLETF の糖尿病の症状は改善されるが、発症前の幼若期から 1 年以上に亘る回転カゴ付き飼育ケージでの飼育により 2 型糖尿病の発症や糖尿病誘発性不全心の発症が抑制されるのか、あるいは発症しても症状が改善されているのか、を明らかにしたい。この長期間の自発的運動により、Sirtuin 1 活性が促進されるのか、さらに 2 型糖尿病の発症が、どの程度抑制されるのか、について調べる。これらに加えて、長期間の自発的運動により、脂肪組織・筋組織の形態学的特徴、血中アディポサイトカイン/ホルモン濃度、持久的運動パフォーマンス、腎機能がどのように影響されるか、についても明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) 幼若期ラットの長期間飼育と定期的な測定：1 ヶ月齢雄性 OLETF ラットを回転カゴ付き飼育ケージ (回転 OLETF) あるいは標準飼育ケージ (標準 OLETF) にて飼料と水の自由摂取にて 16 か月間飼育した。また、対照ラットとして 1 ヶ月齢雄性 LETO ラットを標準飼育ケージにて 16 か月間飼育した (標準 LETO)。飼育期間中、1 週間毎に全ラットの体重と回転カゴの回転数 (自発的運動量) を記録した。また、1 ヶ月毎に血糖値・血圧・心拍数を測定した。血圧と心拍数は非観血的なテールカフ法により測定した。

(2) 耐糖能およびインスリン抵抗性の測定：ラットの耐糖能とインスリン抵抗性を調べるために、糖負荷試験とインスリン負荷試験を実施した。ラットにグルコース溶液あるいはインスリンを投与した後、30 分毎に投与後 2 時間まで血糖値を測定した。

(3) 心機能解析：超音波画像診断装置により M モードで心機能を解析した。さらに、イソフルラン吸入麻酔下において、左心室内に圧カテーテルを挿入し、左心室圧を計測した。左室圧波形の解析により左室収縮機能 (+dP/dt、収縮期圧) と左室拡張機能 (-dP/dt、拡張期圧、時定数 Tau) を求めた。

(4) 組織解析：腸間膜脂肪組織、骨格筋、心臓、腎臓の重量を測定した。また、心臓・膵臓・腎臓の組織切片の HE 染色とアザン染色を行った。アザン染色標本の顕微鏡写真を画像解析し、コラーゲン線維の割合を求めた。

(5) 蛋白質解析：ウェスタンブロット法により心筋中の SERCA2a、ホスホランパン、Na-Ca 交換体のタンパク発現量を測定した。また、骨格筋 (ヒラメ筋、外側広筋) 中のクエン酸合成酵素活性、ヘキソキナーゼ活性、グリコーゲン量などを測定した。血清中のアディポサイトカインやインスリンなどに加えて、尿中腎障害マーカーを ELISA と BioPlex により測定した。

4. 研究成果

(1) 運動による糖尿病発症抑制：標準 OLETF 群の血糖値は 33 週齢から増加したが、回転 OLETF 群

と標準 LETO 群の血糖値は 16 か月間の飼育期間において増加しなかった。回転 OLETF 群と標準 LETO 群の経口糖負荷試験 (OGTT) では、糖負荷後 2 時間で血糖値は正常値 (約 90 mg/dl) に減少したが、標準 OLETF 群では、糖負荷後 2 時間の平均血糖値は 328 mg/dl と高いままであった。また、経口糖負荷試験における回転 OLETF 群の血糖値時間曲線下面積は、標準 LETO 群と差がなかった。さらに、インスリン抵抗性試験において、インスリン投与後 1 時間の血糖値は、標準 OLETF 群では 220 mg/dl と高いままであったが、回転 OLETF 群では 26 mg/dl に低下した。この回転 OLETF 群のインスリン感受性の増大は、骨格筋における GLUT4 発現量の増加によるものであった。16 か月間の飼育後において、標準 OLETF 群の血糖値は 234 mg/dl で HbA1c 値は 8.3% であった。一方、回転 OLETF 群の血糖値は 69 mg/dl で HbA1c 値は 4.8% となり、標準 LETO 群の値と差がなかった。標準 OLETF 群の膵臓組織において、コラーゲン線維の増大が見られ、インスリン産生能も低下していた。さらに、標準 OLETF 群において、血中の炎症性サイトカインおよび走化性サイトカインが増加していた。しかしながら、回転 OLETF 群においては、膵臓組織のコラーゲン線維の増大、インスリン産生能の低下、炎症性/走化性サイトカインの増加は見られなかった。

(2) 運動による心不全発症抑制: 16 か月間の飼育後において、標準 OLETF 群の最大血圧と最小血圧は、回転 OLETF 群に比して低下していた。超音波画像解析の結果から、標準 OLETF 群では左室収縮/弛緩機能が低下していたが、回転 OLETF 群では低下していないことが明らかになった。また、左心室への圧カテーテルの挿入による直接的な心機能解析の結果から、標準 OLETF 群では $\pm dP/dt$ の低下および τ の延長が見られたが、回転 OLETF 群の $\pm dP/dt$ と τ は標準 LETO 群と同じ値であり、超音波画像解析の結果とよく一致することが判明した。標準 OLETF 群の心重量/体重比は、他の 2 群に比較して高い値であった。また、標準 OLETF 群の左室において、コラーゲン線維の増大が認められた。また、標準 OLETF 群の左室 SERCA2a 発現量は低下していたが、回転 OLETF 群では低下していなかった。

(3) 運動による腎不全発症抑制: 標準 OLETF 群において、血清カリウム、尿素窒素、クレアチニ

ンは、回転 OLETF 群や標準 LETO 群に比し高値であり糖尿病性腎症の症状が現れた。腎重量と腎重量/体重比については、標準 LETO 群に比べて、回転 OLETF 群と標準 OLETF 群の値は高かった。また、標準 OLETF 群の糸球体膨大部面積は増大していた。血清総蛋白濃度については、3 群で有意な差はなかったが、1 日尿蛋白量については、標準 LETO 群、回転 OLETF 群、標準 OLETF 群の順で高値となった。また、1 日尿アルブミン量については、標準 LETO 群、回転 OLETF 群、標準 OLETF 群の順で高値となった。ELISA と Bio-Plex による尿中腎障害マーカーの測定結果より、2 型糖尿病を発症している標準 OLETF 群では糸球体、近位・遠位尿細管に障害を受けているが、回転 OLETF 群では糸球体のみ軽度な障害を受けていることが明らかになった。

(4) 運動パフォーマンス低下抑制: 14 か月間の飼育後において、トレッドミル走行テストでの持久力、ぶら下がりテストでの筋持久力、前後肢の握力テストのいずれにおいても標準 LETO 群が最も高く、次に回転 OLETF 群で、糖尿病を発症している標準 OLETF 群が最も低かった。回転 OLETF 群の骨格筋において、ヘキソキナーゼ活性、クエン酸合成酵素活性、FABP 活性およびグリコーゲン含量は標準 OLETF 群の値に比べて高い値を示した。一方、筋組織解析の結果から、SO 線維と FOG 線維の割合や筋繊維横断面面積は両群で差は認められなかったが、回転 OLETF 群の FG 線維横断面面積は標準 OLETF 群に比べて大きい値を示した。このように、長期間の自発的運動により運動パフォーマンスの低下が軽減された。この要因として、Ht 値、速筋線維面積、骨格筋酵素活性、骨格筋グリコーゲン含量が低下しなかったことが考えられる。

(5) 遺伝子発現: 骨格筋での遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により調べた。回転 OLETF 群において、糖尿病関連遺伝子 1428 個の内 25 個の遺伝子の発現に変化が見られた。現在、これらの遺伝子発現量と上記の生理機能との関連を調査している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Imagita H, Nishikawa A, Sakata S, Nishii Y, Minematsu A, Moriyama H, Kanemura N & Shindo H Tidal volume and diaphragm muscle

activity in rats with cervical spinal cord injury. *J Phys Ther Sci* 2015; 27(3): 791-794. 査読有

Ishizawa R, Masuda K, Sakata S & Nakatani A Effects of different fatty acid chain lengths on fatty acid oxidation-related protein expression levels in rat skeletal muscles. *J Oleo Sci* 2015; 64(4): 415-421. Doi: 10.5650/jos.ess14199 査読有

Imagita H, Sakata S, Minematsu A, Kanemura N, Moriyama H, Takemoto H & Mita T Effects of exercise on fiber properties in the denervated rodent diaphragm. *Am J Biomed Life Sci* 2014; 2(6): 141-145. Doi: 10.11648/j.ajbls.20140206.11 査読有

Sakata S, Nakatani A & Waki H Possible mechanism underlying wheel-running-induced hypotensive effects. *J Phys Fitness Sports Med* 2014; 3(4): 429-433. Doi: 10.7600/jpfs.3.429 査読有

Minematsu A, Nishii Y, Imagita H & Sakata S Time course of changes in trabecular bone microstructure in rats with spinal cord injury. *J Life Sci* 2014; 8(6): 522-528. 査読有

Chemaly ER, Chaanine AH, Sakata S & Hajjar RJ Stroke volume/wall stress ratio as a load-adjusted and stiffness-adjusted indicator of ventricular systolic performance in chronic loading. *J Appl Physiol* 2012; 113: 1267-1284. Doi: 10.1152/jappphysiol.00785 査読有

[学会発表] (計 10 件)

Takeshita D, Yasui T, Washio H, Takada Y & Sakata S Development of rat diabetic nephropathy is suppressed by voluntary exercise in OLETF rats. 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 23 日、神戸国際会議場

高田義弘、竹下大輔、花岡智子、奥田俊詞、鷺尾弘枝、石見恵子、保井俊英、今北英高、峯松亮、星野聡子、山田崇史、和気秀文、中村友浩、岡田修一、平川和文、中谷 昭、坂田 進 自発的運動を課した 2 型糖尿病ラットにおける運動パフォーマンスと筋組成、筋酵素活性について 第 6 9 回日本体力医学会大会、2014 年 9 月 21 日、長崎大学

保井俊英、竹下大輔、高田義弘、花岡智子、鷺尾弘枝、石見恵子、奥田俊詞、今北英高、峯松亮、中村友浩、進藤大典、鈴木政登、中谷 昭、

坂田 進 自発的運動による糖尿病誘発性腎不全の発症抑制 第 6 9 回日本体力医学会大会、2014 年 9 月 21 日、長崎大学

竹下大輔、保井俊英、鷺尾弘枝、高田義弘、奥田俊詞、坂田 進 2 型糖尿病モデルラットの糖尿病誘発性腎不全の発症は、自発的運動により抑制される 第 24 回日本病態生理学会大会、2014 年 8 月 9 日、北九州国際会議場

中谷 昭、高田義弘、保井俊英、竹下大輔、花岡智子、鷺尾弘枝、石見恵子、奥田俊詞、今北英高、峯松 亮、星野聡子、中村友浩、坂田 進 長期の自発的運動が OLETF ラット骨格筋の解糖系及び酸化系酵素活性に及ぼす影響 第 22 回日本運動生理学会大会、2014 年 7 月 19 日、川崎医療福祉大学

保井俊英、竹下大輔、花岡智子、鷺尾弘枝、石見恵子、奥田俊詞、今北英高、峯松 亮、高田義弘、星野聡子、中村友浩、進藤大典、鈴木政登、中谷 昭、坂田 進 自発的運動は糖尿病誘発性腎不全の発症を抑制する 第 22 回日本運動生理学会大会、2014 年 7 月 19 日、川崎医療福祉大学

Sakata S, Hanaoka T, Takada Y, Okuda S, Yasui T, Washio H, Takeshita D, Iwami K, Imagita H, Minematsu A, Waki H & Nakatani A Voluntary exercise suppresses development of diabetes mellitus and improves exercise performance in OLETF rats. 第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 18 日 鹿児島大学

高田義弘、奥田俊詞、竹下大輔、保井俊英、坂田 進 自発的運動により発症が抑制された 2 型糖尿病モデルラットの運動パフォーマンス 第 23 回日本病態生理学会 2013 年 8 月 3 日 東京慈恵会医科大学

坂田 進、花岡智子、石見恵子、竹下大輔、奥田俊詞、峯松 亮、保井俊英、高田義弘、中村友浩、中谷 昭 自発的運動による 2 型糖尿病の発症抑制 第 21 回日本運動生理学会大会 2013 年 7 月 27 日 東京国際大学

高田義弘、花岡智子、石見恵子、竹下大輔、奥田俊詞、峯松 亮、保井俊英、中村友浩、中谷 昭、坂田 進 ラットにおける 2 型糖尿病と運動パフォーマンス 第 21 回日本運動生理学会大会 2013 年 7 月 27 日 東京国際大学

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 進 (SAKATA, Susumu)
畿央大学 ・ 健康科学部 ・ 教授
研究者番号 : 20142383

(2) 研究分担者

中谷 昭 (NAKATANI, Akira)
奈良教育大学 ・ 教育学部 ・ 教授
研究者番号 : 70116284

(3) 研究分担者

西井 康恵 (NISHII, Yasue)
畿央大学 ・ 健康科学部 ・ 助手
研究者番号 : 50461207