

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2017

課題番号：24700525

研究課題名(和文)糖尿病ラットの廃用性筋萎縮に対する運動効果

研究課題名(英文)Effect of exercise on muscle atrophy in diabetic rat

研究代表者

間所 祥子(MADOKORO, Sachiko)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：60595445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非肥満型2型糖尿病ラットであるGoto-Kakizakiラット(以下GKラット)に対し、尾部懸垂法を2週間実施し廃用性筋萎縮を作成、その後再荷重を行いその回復過程について検討した。ラット後肢よりヒラメ筋、足底筋を摘出し、切片を作成、HE染色を行い、筋横断面積を測定した。ヒラメ筋については、WistarラットとGKラットは同様の経過を示したが、足底筋については、GKラットの方が萎縮しやすい傾向にあり、また再荷重を行っても回復しにくいことが筋横断面積より示唆された。壊死線維については有意差はみられなかったが、GKラットヒラメ筋において、若干多くみられ、高血糖による筋線維の脆弱性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to create disuse muscle atrophy in Goto-Kakizaki rats (GK rats), which are a type of non-obese type 2 diabetes model rat, using hindlimb suspension. We then investigated the effects of reloading. The target muscles were the soleus muscle and the plantaris muscle. Hematoxylin-eosin staining was performed and the samples were observed using an optical microscope. We used the image analysis software ImageJ to measure the cross-sectional areas. Investigation of myofiber cross-sectional area for GK rat soleus muscle samples showed the same trend as Wistar rat soleus muscle samples. However, investigation of plantaris muscles in GK rats indicated that the suspension group and the reload group had significant decreases compared to those in the control group. No significant differences were found between suspension group and reload group.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：糖尿病ラット 廃用性筋萎縮 運動効果

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は増加の一途を辿り、その予防および進展予防は重要課題である。糖尿病に対する運動療法の効果は人体最大の糖の消費器官である骨格筋にアプローチすることにある。身体運動による骨格筋の糖の取り込み改善のメカニズムは、インスリン刺激を改善し細胞内の糖輸送体である GLUT 4 が細胞膜へ移動すること(トランスポレーション)により、糖を取り込むこと促進させることによるものと、筋収縮自体がインスリン作用とは無関係に GLUT 4 をトランスポレーションさせ糖の取り込みを亢進させることが明らかとなっている。一般的によく知られている運動方法としては、歩行やジョギングなどの有酸素運動(低強度・長時間)があげられる。一方、近年では無酸素運動(高強度・短時間)やレジスタンス運動(低負荷での筋力トレーニング)の筋力トレーニングにより、筋重量を増大することで、インスリン感受性を高めることが報告されている。しかし、高齢化社会を迎え、有酸素運動や高負荷な筋力トレーニングが困難な高齢糖尿病患者や障害をもった糖尿病患者も増加している。そこで、申請者は高齢者・運動困難者にも可能な効果的筋力強化運動確立のため、糖尿病ラットを用い廃用性筋萎縮モデルを作成、各種の運動を負荷し、その筋と毛細血管および血糖値に与える影響を組織化学的・生化学的に検証することとした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、日本人に多いとされる非肥満型 2 型糖尿病ラット (Goto-Kakizakir rat: 以下 GK ラット) と健常ラット(Wistar 系ラット)に対し廃用性筋萎縮モデルを作成し、運動負荷を加え、筋および毛細血管、血糖値に与える影響の違いを明らかにすることである。なお、対象筋はほとんどが type 線維で構成され、多くの先行研究で用いられているヒラメ筋と、type 分布として、type , type a, type b 線維が混在した筋であり、ヒラメ筋に比べ変化は少ないものの非荷重による特徴である萎縮と速筋化が認められることから足底筋を対象とすることとした。

**実験** : GK ラットと健常ラットに対し尾部懸垂法を用い廃用性筋萎縮モデルを作成、組織学的・生化学的に比較検討していく。

**実験** : GK ラットと健常ラットに対し廃用性筋萎縮を作成後、運動負荷として臨床応用可能な荷重を用い、その回復に与える影響について検討することとした。

### 3. 研究の方法

1)実験 GK ラットと Wistar ラットをそれぞれ、コントロール群と、実験群として尾部懸垂法を用いて廃用性筋萎縮を作成する群に群分けした。尾部懸垂処置として、本研究で

は、Morey-Holton ら<sup>1)</sup>の尾部懸垂法を用いた。2 週間の実験期間後、血糖値・体重測定を行い、ラット後肢からヒラメ筋、足底筋を摘出し、筋湿重量を測定した。また、採取した筋から凍結横断切片を作成、HE 染色を行った。光学顕微鏡を用いて、検鏡し 1 標本あたり 200 本程度の筋線維について画像解析ソフト ImageJ を用いて筋線維横断面積を測定、それぞれの種類のラットについて群間比較を行った。

2)実験 Wistar ラットと GK ラットをそれぞれ、コントロール群、懸垂群、懸垂後再荷重を行う再荷重群に群分けした(以下 Wistar ラットコントロール群:WC 群、懸垂群:WS 群、再荷重群:WR 群、GK ラットコントロール群:GC 群、懸垂群:GS 群、再荷重群:GR 群)。懸垂群、再荷重群に対しては 2 週間の尾部懸垂法を実施し、再荷重群に対してはその後 1 週間の再荷重を行った。実験期間終了後、実験 同様に筋の摘出、凍結横断切片の作成を行い、筋線維横断面積の測定を行った。さらに、壊死線維、中心核線維についてもその発生率について検討した。

### 4. 研究成果

1)実験 より、尾部懸垂法により、type 線維が多いとされるヒラメ筋については、GK ラットと Wistar 系ラットで同様の傾向を示し、著明な筋萎縮がみられた。一方、type b 線維が多いとされる足底筋については Wistar ラットに比較し GK ラットでより萎縮しやすい傾向がみられた。なお、尾部懸垂前後の血糖値は各群において有意差はなく、尾部懸垂が血糖に与える影響はないと考えられた。

2)実験 の筋線維横断面積より、ヒラメ筋については、実験 同様に尾部懸垂法により著明な筋萎縮がおり、さらに、再荷重を行うことで、GK ラットも Wistar ラット同様に回復することが示唆された(図 1 a , b )

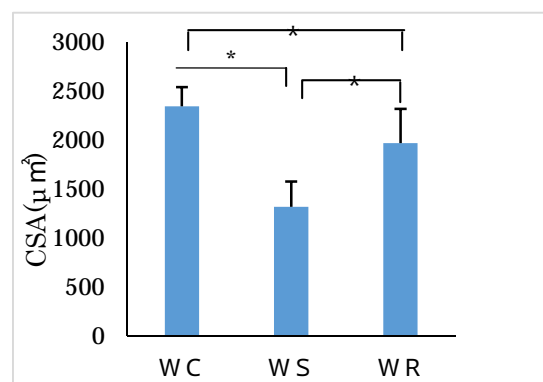


図 1 a Wistar ラットヒラメ筋線維横断面積

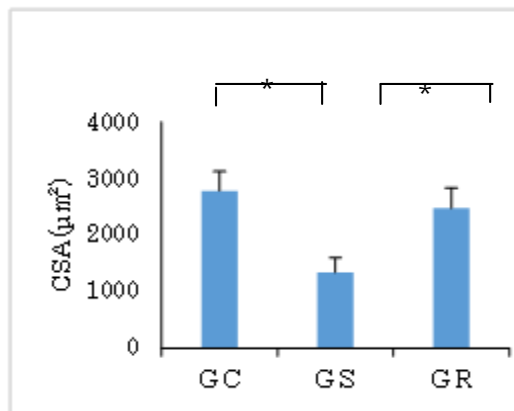


図 1b GK ラットヒラメ筋線維横断面積  
\* p<0.05

これは、先行研究同様、尾部懸垂の結果、筋萎縮が発生し、再荷重することで筋肥大が起こったためと考えられる。Wistar 系ラットヒラメ筋の懸垂による影響として、ヒラメ筋ではタイプ変化が顕著に生じることが報告されており、本研究の Wistar 系ラットでも type 線維から type b 線維への移行が起きていた可能性がある。また、GK ラットにおいても、コントロール群と比較し、懸垂群は有意に小さい値を示し、懸垂群に比較し再荷重群は有意に大きい値を示した。加えてコントロール群と再荷重群間で有意差はみられず、GK ラットの方が筋萎縮からの回復が早い可能性を示す結果となった。これは、GK ラットは週齢数が増えると酸化酵素活性が高いタイプの線維の比率の減少がみられ、ヒラメ筋では type a 線維が減少し、type 線維のみとなることが影響しているかもしれない。

一方、足底筋においては、Wistar 系ラットでは 3 群間に有意差はみられず、GK ラットでは、コントロール群と比較して、懸垂群、再荷重群が有意に小さい結果となった。

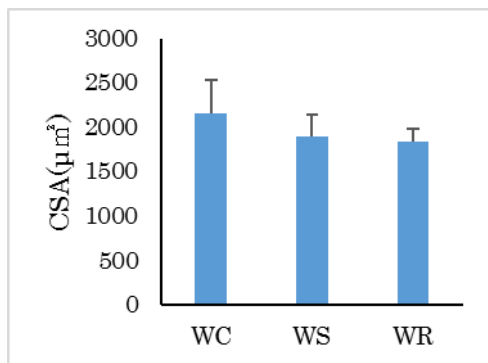


図 2a Wistar ラット足底筋筋線維横断面積

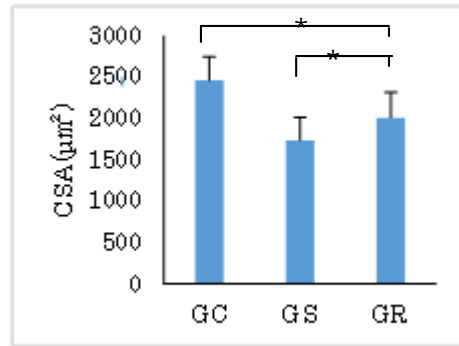


図 2b GK ラット足底筋線維横断面積  
\* p<0.05

GK ラットの足底筋においては type 線維および type a 線維の比率が減少し type b 線維への移行が生じることが報告されている<sup>2)</sup>。また、足底筋に関しては、1 型糖尿病ラットにおいて遅筋線維に先行して速筋線維の萎縮が出現すると報告されている。本研究で用いた GK ラットは 2 型糖尿病モデルであるが、同様に足底筋に多い type b 線維の萎縮が先行して起こったため、懸垂による影響をより強く受けた可能性が考えられる。

壊死線維数については、ヒラメ筋、足底筋ともに Wistar 系ラット、GK ラットとも、コントロール群、尾部懸垂群、再荷重群の 3 群間の比較において有意差はみられなかった。本研究では、再荷重 7 日後の筋摘出であり、筋損傷からの回復過程にあると考えられること、1 標本に対しすべての筋線維を確認できていないことなどから壊死線維数が過去の研究に比較し、少ない傾向となった可能性がある。しかし、GK ラットの再荷重群において、他群より発生数が多く、GK ラットの type 線維についての脆弱性が示唆された。1 型糖尿病モデルラットのヒラメ筋における、運動ニューロンの細胞体数の減少による脆弱性が報告されており<sup>3)</sup>、GK ラットヒラメ筋の筋線維においても、インスリン抵抗性の影響や血管・神経組織同様に高血糖暴露によって脆弱化している可能性が示唆される。

本研究では、2 週間の尾部懸垂後、再荷重 1 週間後しか分析しておらず、再荷重による筋損傷の影響を最もうけるとされる再荷重後 2 日後や、完全に回復するまでのさらに期間を延長した分析が今後必要と考える。また、糖尿病ラットでは筋線維タイプが変化していることも考えられるため、今後は筋線維タイプ別に検討することで、運動方法への示唆を与えるものとなると思う。

## 参考文献

- 1) Morey-Holton E.R., et al: Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. J Appl Physiol 92: 1367-1377, 2002
- 2) Yasuda K, Nishikawa W, et al: Abnormality in fiber type disutribution of soleus and plantaris muscles in non-obese diabetic Goto-Kakizaki rats. Clinical Experimental Pharmacology and Physiology. 29(11):1001-1008,2002
- 3) 玉木 徹, 生友 聖子, 他: ヒラメ筋を支配する運動ニューロンは高血糖に脆弱性をもつ. JMDD 26:99-102,2016

## 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 0 件)

\* 現在投稿中

[学会発表](計 0 件)

\* 平成 30 年度発表予定

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

間所 祥子 (MADOKORO, Sachiko)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号: 60595445

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

山崎 俊明 (YAMAZAKI, Toshiaki)

細 正博 (HOSO, Masahiro)