

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：33504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700564

研究課題名(和文) 糖尿病に起因する運動ニューロンの機能障害

研究課題名(英文) Pathologic alterations in motoneuron in experimental diabetic animal

研究代表者

村松 憲 (Muramatsu, Ken)

健康科学大学・健康科学部・准教授

研究者番号：00531485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病に関連して生じる運動ニューロンの変化について調べるために、内側腓腹筋(MG)の運動ニューロンを逆行性標識し、その数と大きさを調べた。また、運動療法が持つ運動ニューロン障害の予防効果を調べた。実験の結果、糖尿病ラットのMG運動ニューロン数が減少することが明らかになった。MG運動ニューロンの細胞体の分布は大型の運動ニューロンと小型の運動ニューロンが明瞭に区別可能であったが、特に運動ニューロンが減少していた。また、運動療法を実施していた糖尿病ラットでは細胞減少はされなかったため、運動ニューロンの減少は運動療法によって予防できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Alterations in the number and size of motoneurons were studied in the medial gastrocnemius (MG) motor nucleus of diabetic rats and age-matched controls. MG motoneurons were retrogradely labeled and the number and size of cell bodies were examined. Additionally, we investigate the prevention effect of 20 weeks of exercise training on motoneuronal loss in diabetic rats.

Significantly fewer labeled MG motoneurons were found in diabetic rats as compared with control animals. The size distribution of MG nucleus was bimodal; cells with larger size were presumed to be alpha-motoneurons and those with smaller were presumed to be gamma. Compared to control animals, the number of smaller MG motoneurons was reduced in diabetic animals but exercise training prevent decrease the number of MG motoneurons. We conclude that there is a significant decrease occurred predominantly among the smaller gamma-motoneurons and there is a possibility that exercise training prevent these motoneuronal loss.

研究分野：糖尿病性ニューロパチーの病態生理

キーワード：糖尿病性ニューロパチー 運動ニューロン 筋紡錘

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性ニューロパチー(以下, DPN)は糖尿病患者が罹患する代表的な合併症の一つである。体性神経に注目すると DPN の症状は「靴下・手袋症状」と呼ばれる四肢遠位部の感覚障害が主体で, 同部位の最大筋力はかなりの長期間にわたって維持されるという特徴がある。これらの事実から運動ニューロンは DPN に対して高い耐性を持つと考えられてきた。また, 糖尿病モデル動物を用いた複数の先行研究もこの考えを支持していた。

しかし, 運動ニューロンの DPN に対する耐性を支持する先行研究には共通する問題が認められた。その問題とは, 全ての先行研究が DPN の標的になりやすいとされる四肢遠位部を支配する運動ニューロンと影響を受けにくいとされる四肢近位部を支配する運動ニューロンを区別することなく解析を行っていた点である。そこで, 我々は DPN の影響を受けやすい四肢の遠位部に位置する内側腓腹筋を支配する運動ニューロン(以下, MG 運動ニューロン)に着目し, トレーサーを用いて MG 運動ニューロンを選択的に標識し, それを解析することで, DPN に関連する運動ニューロン障害について調査することとした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の3点とした。

- (1) DPN による運動ニューロン障害は存在するか確かめること。
- (2) DPN による運動ニューロン障害が存在するのであれば, 除神経による筋収縮特性・形態学的変化が観察されるか確かめること。
- (3) DPN による運動ニューロン障害は運動療法によって予防可能であるか確かめること。

## 3. 研究の方法

(1) DPN による運動ニューロン障害は存在するのか?

本研究は糖尿病モデル動物(1型・2型糖尿病モデルラット)を対象に実験を行った。1型あるいは2型糖尿病モデルラットの病期が12週間, 22週間となるように飼育した上で, 同週齢の健常なラットと MG 運動ニューロンの数, 細胞体の大きさを比較した。実験は麻酔下にて右の膝窩を切開し, 右の内側腓腹筋を支配する神経線維を切断, その断端を10% Dextran-TexasRed に2時間浸した。その後, 一度動物を回復させ15日間の生存期間を与えた後に深麻酔下にて左心室から4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定した。次に下部腰髄を摘出し, ビプラトームを用いて脊髄から80 $\mu$ mの厚さの連続切片を作成し, 蛍光顕微鏡で逆行性標識された MG 運動ニューロンを観察, その数と細胞体の大きさを計測した。

(2) DPN による運動ニューロン障害が存在するのであれば, 除神経による筋収縮特性や形態の変化が観察されるか?

本研究は先の実験同様に病期12週間もしくは22週間の1型・2型糖尿病モデルラットと同週齢の健常ラットを対象に行った。実験は麻酔下にて行った。まず, 脛骨神経を剖出し, 切断して末梢側の断端に電気刺激用のカフ電極を設置した。ついで, アキレス腱を切断して内側腓腹筋と筋張力計を接続した。筋は37のパラフィンオイルで覆い, 温度を一定に維持した。次に脛骨神経を最大強度で電気刺激した際に生じる筋の張力曲線(単収縮・最大強縮)を記録した。

緊張力の記録が終了したら, 麻酔薬の過剰投与により動物を安楽死させた上で, 内側腓腹筋を摘出し, 4%パラホルムアルデヒドによる固定後にパラフィンブロックを作成, 厚さ10 $\mu$ mの連続切片を作成し, ヘマトキシリン・エオシン染色を施して筋の形態を観察した。

(3) DPN による運動ニューロン障害は運動療法によって予防可能であるか?

本研究は先の研究で明らかにした運動ニューロンの減少が運動療法を行うことによって改善可能か調べるために行った。実験には2型糖尿病モデルラットと同週齢の健常ラットを用いた。2型糖尿病モデルラットは糖尿病を発症した直後からトレッドミルを用いた運動療法を20週間行う群と通常飼育を20週間継続する群に分類した。運動療法は速さ15-20 m/min, 長さ60minの運動を5回/週, 20週間行った。飼育期間が終了したら実験1で記載した方法で MG 運動ニューロンを逆行性標識し, その数と断面積を計測した。また, 耐糖能の異常を調べるために定期的な腹腔内ブドウ糖試験(IPGTT)を行った。

## 4. 研究成果

(1) DPN に関連して 運動ニューロンが減少することを発見した。

実験1の結果から1型糖尿病・2型糖尿病ラットとも共通して糖尿病発症後約20週間程度で運動ニューロンが減少することが明らかになった。また, 2型糖尿病に比べて1型糖尿病の方が運動ニューロンの減少が顕著であることを見出した。また, 健常な動物の MG 運動ニューロンの細胞体径の分布は二峰性の分布を示し, 大型の運動ニューロン群と小型の運動ニューロン群が明瞭に区別可能であった。しかし, 糖尿病モデルラットでは糖尿病の病期に依存して小型の運動ニューロンが減少していく一方, 大型の運動ニューロンの数は保たれる様子が観察された(図1)。多くの先行研究によって MG 運動ニューロンの細胞体の大きさの分布を示すヒストグラムは二峰性の分布を示し, 小型の神経細胞のほとんど全てが筋紡錘の錘内筋線維を

支配する運動ニューロンであることが知られているため、DPNに関連する運動ニューロンの消失は運動ニューロンに生じる可能性が高いと考えられる。運動ニューロンは筋紡錘の感度調節を行う一方、錘外筋線維は支配しないため、最大筋力にはほとんど影響を及ぼさない。DPN患者では四肢遠位部の最大筋力の維持とアキレス腱反射の消失などが観察されるが、このまだらな運動障害の一部は運動ニューロンの選択的減少によって説明可能である可能性がある。

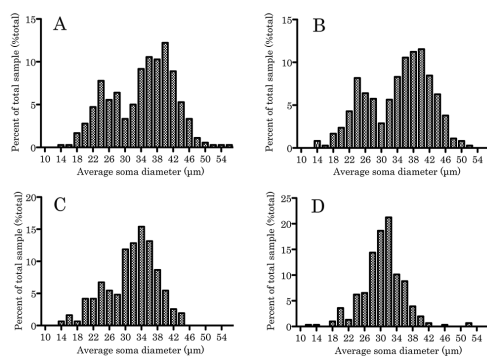


図 1. MG 運動ニューロンの細胞体の大きさの分布の変化 (Neurosci Lett.2012;531:109 - 113 より許可を得て転載)

A)19 週齢の健常ラット, B)29 週齢の健常ラット, C)19 週齢の 1 型糖尿病ラット (病期 12 週間) D)29 週齢の 2 型糖尿病ラット (病期 22 週齢)

(2) DPN に関連して筋紡錘の錘内筋線維に変性が生じることが明らかになった。

糖尿病モデルラットと健常動物の筋張力特性を計測したが、特筆すべき新知見は得られなかった。一方、内側腓腹筋の組織学的解析の結果、錘外筋線維に比べて錘内筋線維の変性が強く生じていることが明らかとなった(図 2)。また、錘内筋線維の変性は運動ニューロン消失の時期にほぼ一致して生じていたことから、運動ニューロンの消失に伴う筋紡錘の二次変性が生じている可能性が高いと判断した。

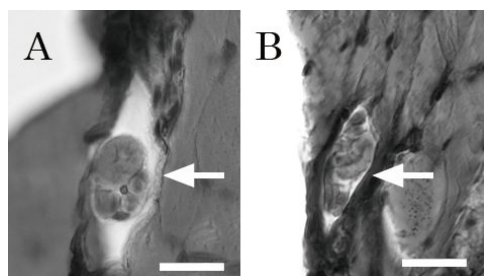


図 2. 変性した筋紡錘の組織像

A)正常な形態の筋紡錘, B)走行が異常な筋紡錘. スケールバーは 25 μm.

運動障害研究会誌 2013; 23(2): 81-84 より転載

(3) DPN による運動ニューロン障害は運動療法によって予防可能であることを発見した。

糖尿病モデルラットに前述した方法で 20 週間の運動を行わせると、運動を行わなかった糖尿病モデルラットと比較して耐糖能に改善が認められた。また、運動ニューロンの総数は運動療法を行わなかった糖尿病モデルラットにおいてのみ減少し、運動療法を行った糖尿病モデルラットではその数が維持されていた(図 3)。これは、運動療法がなんらかの機序によって運動ニューロンの消失を予防したものと考えられる。

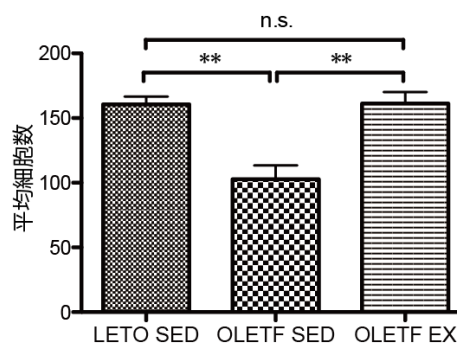


図 3. 運動療法による運動ニューロン減少の予防効果

LETO-SED は健常ラット, OLETF-SED は通常飼育を行った糖尿病モデルラット, OLETF-EX は運動療法を行った糖尿病モデルラットの運動ニューロンの総数を示す。OLETF-SED 群においてのみ、細胞数が減少している様子がわかる。

運動障害研究会誌 in press より転載

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. 村松憲, 玉木徹, 生友聖子, 丹羽正利, 升佑二郎, 石黒友康, 佐々木誠一. 運動療法は OLETF ラットの運動ニューロン障害を予防する. 運動障害研究会誌 in press (査読あり)
2. 村松憲, 玉木徹, 丹羽正利, 升佑二郎, 永野克人, 長谷川達也, 石黒友康, 佐々木誠一. 2 型糖尿病ラットの運動ニューロンが減少する. 運動障害研究会誌 2014; 24(2): 25-28. (査読あり)
3. 村松憲, 丹羽正利, 石黒友康, 長谷川達也, 佐々木誠一. 糖尿病による錘内筋線維の変性. 運動障害研究会誌 2013; 23(2): 81-84. (査読あり)
4. Ken Muramatsu, Masatoshi Niwa,

Masanori Nagai, Takashi Kamimura, Sei-ichi Sasaki, Tomoyasu Ishiguro. The size of motoneurons of the gastrocnemius muscle in rats with diabetes. *Neurosci Lett.* 2012; 531: 109 - 113 (査読あり)

[学会発表](計 16 件)

1. Ken Muramatsu. Prevention of Gamma Motoneuronal Loss in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats by Exercise Training. 第 50 回 日本理学療法学会 2015.6.5 東京
2. 村松憲. 運動療法は OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットの運動ニューロン減少を予防する. 第 58 回 日本糖尿病学会年次学術集会 2015.5.23 山口
3. 村松憲. 糖尿病性ニューロパチーは運動ニューロンを選択的に減少させる. 第 1 回 日本糖尿病理学療法学会 2015.1.31 大阪
4. 村松憲. 運動療法は OLETF ラットの運動ニューロン障害を予防する. 第 49 回 日本運動障害研究会 2015.1.17
5. 村松憲. DPN は OLETF ラットの運動ニューロンを選択的に減少させる. 第 29 回 日本糖尿病合併症学会 2014.10.3 東京
6. Ken Muramatsu. The number of gamma motoneurons decreased in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat. 第 37 回 日本神経科学大会 2014.9.11 横浜
7. 村松憲. OLETF ラット(2 型糖尿病モデルラット)の運動ニューロンが選択的に減少する第 49 回 日本理学療法学会 2014.5.31 横浜
8. 村松憲. 糖尿病性ニューロパチーによって運動ニューロンが減少する. 第 21 回 脳機能とリハビリテーション研究会学術集会 2014.4.20 千葉
9. 村松憲. 2 型糖尿病モデルラットの運動ニューロンが減少する. 第 47 回 日本運動障害研究会 2013.1.18 東京
10. Ken Muramatsu. Diabetic polyneuropathy targets gamma motoneurons of the distal muscle of hindlimb in STZ rats. 第 36 回 日本神経科学大会 2013.6.20 京都

11. 村松憲. 糖尿病によって運動ニューロンが選択的に減少する. 第 48 回 日本理学療法士学会 2013.5.25 名古屋
12. Ken Muramatsu. Diabetic polyneuropathy target gamma motoneurons of the gastrocnemius muscle in STZ rats. 第 90 回 日本生理学会 2013.3.29 東京
13. 村松憲. 糖尿病によって生じる錐内筋線維の変性. 第 45 回 日本運動障害研究会 2013.1.26 東京
14. 村松憲. 糖尿病ラットの内側腓腹筋を支配する運動ニューロンの形態変化. 第 59 回 中部日本生理学会 2012.11.16 岡崎
15. Ken Muramatsu. Sustained hyperglycemia decreases the volume of motor nucleus of medial gastrocnemius. 第 35 回 日本神経科学大会 2012.9.19 名古屋
16. 村松憲. 糖尿病に起因する運動ニューロンの障害. 第 47 回 日本理学療法士学会 2012.5.26 神戸

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

村松 憲 (MURAMATSU KEN)  
健康科学大学・健康科学部・准教授  
研究者番号: 00531485