

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：33918

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700568

研究課題名(和文) 骨格筋加温と電気刺激を併用した糖尿病に対する治療効果に関する実験的研究

研究課題名(英文) An experimental study on the effect of therapy with both skeletal muscle hyperthermia and electrical stimulation for diabetes mellitus

研究代表者

岩田 全広 (IWATA, Masahiro)

日本福祉大学・健康科学部・准教授

研究者番号：60448264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン抵抗性を呈する骨格筋に対する温熱刺激と電気刺激の併用効果を検討した。細胞実験より、両刺激を単独で負荷した場合と両刺激を同時に負荷した場合のいずれにおいてもインスリン感受性が改善したが、両刺激を組み合わせることに伴う併用効果は得られなかった。動物実験より、電気刺激を繰り返し負荷することでインスリン感受性が改善するとともに、電気刺激の対象筋である大腿直筋内のHSP72やGLUT4発現量が増加した。したがって、電気刺激の継続実施は骨格筋の質的変化を引き起こしてインスリン抵抗性を改善させる効果あり、この作用機序にはHSP72やGLUT4の発現増加が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the effect of therapy with both heat stress and electrical stimulation on amelioration of insulin resistance. In vitro experiments by using TNF- α -treated insulin-resistant C2C12 myotubes, both heat stress and electrical stimulation increased insulin-stimulated glucose uptake, but the effects were not additive. In vivo experiments by using high-fat diet-fed insulin-resistant rats, the daily application of electrical stimulation improved insulin action and increased HSP72 and GLUT4 expression in the rectus femoris muscle. The present results suggest that the daily application of electrical stimulation can ameliorate insulin resistance, and this mechanism is related to increased expression of HSP72 and/or GLUT4 in myocytes.

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：インスリン抵抗性 骨格筋 温熱刺激 電気刺激 インスリン感受性 heat shock protein glucose transporter

1. 研究開始当初の背景

一般に有酸素運動は、2型糖尿病の発症を防止するだけでなく、その病態のひとつであるインスリン抵抗性を効果的に改善させ、生体全体の代謝状態を正常へと導くことから、臨床現場では多くの糖尿病患者に適用されている。また、2009年に発表されたシステマティックレビューの結果から、レジスタンス運動が骨格筋重量の増大(骨格筋肥大)を促すことでインスリン抵抗性を改善させ、良好な血糖コントロールの維持に有効であることが示されている(Gordon BA, et al.: *Diabetes Res Clin Pract* 83: 157-175, 2009)。糖尿病治療ガイド2014-2015においても、有酸素運動とレジスタンス運動を組み合わせることで、骨格筋の質的及び量的改善を図ることが推奨されている。しかし、超高齢社会を迎えた今日、寝たきり患者や慢性的な運動不足者、体力の低下した人々、あるいは過度の肥満や整形外科疾患を有するなどの理由から積極的な運動を十分に行えない糖尿病患者が多数存在する。したがって、運動が制限される患者を対象にした場合においても優れた運動効果をもたらすことができる、運動負荷以外の治療法の早期開発が求められている。

近年、2型糖尿病の治療を目的とした運動負荷以外の方法で応用が試みられているものとしては、骨格筋電気刺激を利用した方法がある。この手法は、骨格筋組織を司る末梢運動神経に対して、表面電極を用いて低周波電気パルス刺激を施すことにより、刺激に応じた骨格筋の収縮活動を人為的に誘発するものであり、寝たきり患者や体力の低下した患者が対象であっても実施可能である。電気刺激誘発性の骨格筋収縮活動は、自発的な軽い運動と同程度のエネルギー消費をもたらすことが明らかにされており(Hamada T, et al.: *J Appl Physiol* 94: 2107-2112, 2003)。2型糖尿病の予防とその治療を目的とした応用が試みられている。例えば、Changらは健康ラットの両後肢筋に対して60分間の電気刺激を負荷したところ、刺激中から刺激後の耐糖能が有意に改善したと報告している(*Life Sci* 79: 967-971, 2006)。また、Johanssonらはインスリン抵抗性モデルラットに対して電気刺激を、最初の3週間で1日15分間から1日25分間へと徐々に刺激時間を延長させ、その後1~2週間にわたって1日25分間、週5回の頻度で負荷したところ、インスリン感受性が亢進したと報告している(*Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E551-E559, 2010)。さらに、インスリン抵抗性を呈するヒト培養骨格筋細胞を対象に用いたAasらの研究では、骨格筋細胞に直接電気刺激を負荷したところ、電気刺激を負荷していない骨格筋細胞と比較して、インスリン刺激による糖取り込み活性が有意に亢進したとの報告もなされている(*Ann NY Acad Sci* 967: 506-515, 2002)。

これらのことは、動物実験ならびに培養細胞実験の結果ではあるが、電気刺激誘発性の骨格筋収縮活動によっても、糖代謝に対して急性の運動効果を十分に発揮できる可能性を示している。そこで、平成22~23年度に科学研究費補助金若手研究(B)の助成を受け、肥満から2型糖尿病を発症するモデルである高脂肪食摂取ラットを対象に用いて、両後肢筋への継続的な電気刺激によってインスリン抵抗性が改善できるか否かを検討した。その結果、高脂肪食を3週間摂取したラットはインスリン抵抗性を示したが、その後1日30分間の電気刺激を7日間(毎日)負荷すると、惹起されたインスリン抵抗性が有意に改善されることを確認している(Watanabe H, et al.: 16th International Congress of WCPT, 2011)。しかし、その改善率は約50%にとどまり、糖尿病態を完全に改善させ得るまでには到っておらず、この原因として、電気刺激のみでは有酸素運動様の糖代謝亢進効果は発揮されるものの、レジスタンス運動時に観察されるような骨格筋肥大効果は十分に得られない可能性が考えられた。そこで、今後の臨床応用に向けて、骨格筋の質的改善と同時に量的改善を図ることでより効果的かつ効率的にインスリン抵抗性を改善させ得る方法論を検討する必要があり、これには温熱刺激を併用した手段が有効ではないかと考えている。

この点に関してChungらは、分子シャペロン機能を有する熱ショックタンパク質(heat shock protein: HSP)72に着目し、以下の実験結果を報告している。すなわち、高脂肪食摂取マウスを用いて、この高脂肪食摂取の過程で1日15分間、41.5の全身温熱暴露を週1回の頻度で行うと、骨格筋内のHSP72発現量が温熱暴露を行わない群より増加し、インスリン抵抗性の進行も抑制できたと報告している(*PNAS USA* 105: 1739-1744, 2008)。また、諸家の報告によれば、予め骨格筋を加温してHSP72発現量を増加させてから運動負荷を行った方が骨格筋肥大効果は著しいとされている(Yamashita-Goto K, et al.: *J Gravit Physiol* 9: P145-P146, 2002)。

したがって、これらの知見を参考にすると、インスリン抵抗性を呈する骨格筋の糖代謝を改善させるには、電気刺激を単独で負荷するよりも、骨格筋の加温と電気刺激を組み合わせる方が、より効果的かつ効率的に奏効する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

先にも述べたが、有酸素運動やレジスタンス運動は、2型糖尿病にみられるインスリン抵抗性の改善や進行予防に有効であるが、臨床で遭遇する糖尿病患者の中には、過度の肥満や整形外科疾患などによって運動制限を有する人々も多数存在するため、運動負荷以外の治療法の早期開発が急務となっている。そこで、本研究課題では骨格筋の加温や電気

刺激がインスリン抵抗性を呈する骨格筋の糖代謝に及ぼす影響とその作用機序の解明を行うとともに、骨格筋の加温と電気刺激を組み合わせた治療介入が、骨格筋の質的・量的改善を促すことで、より効果的かつ効率的にインスリン抵抗性を改善させ得るのではないかといった仮説を培養細胞とモデル動物を用いて検証することが目的である。

3. 研究の方法

本研究は、培養細胞実験ならびに動物実験の2つの実験系により構成された。動物実験については、名古屋大学動物実験委員会保健学部会に実験計画書を提出し、承認を受けた後(承認番号:023-019)、名古屋大学が定める動物実験指針に準じて実施した。

(1) 培養細胞実験

培養細胞

実験には、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株(C2C12)を筋管細胞に分化させたものを使用し、無処置にて通常培養した群(対照群)、tumor necrosis factor- α を培地に添加することでインスリン抵抗性を惹起した群(IR群)、インスリン抵抗性を惹起し、60分間/日の温熱刺激(41 $^{\circ}$ Cの温熱暴露)を3日間負荷した群(H群)、インスリン抵抗性を惹起し、60分間/日の電気刺激(パルス幅0.2 msec、周波数100 Hz、刺激時間200 msec、休止時間800 msec、刺激強度50 Vの矩形波)を3日間負荷した群(ES群)、インスリン抵抗性を惹起し、両刺激を併用(同時に負荷)した群(H+ES群)の5群を設定した。

生化学的検索

3日目の各刺激終了から24時間後に、筋管細胞のインスリン感受性を評価した。具体的には、各刺激終了から24時間後の筋管細胞に対してインスリン刺激(100 nM)を行った後に2-デオキシグルコース(2-DG)を添加することで、一定時間内に細胞が取り込む2-DG量を算出した。

形態学的検索

3日目の各刺激終了から24時間後に、筋管細胞の形態応答を評価した。具体的には、各刺激終了から24時間後の筋管細胞に対してギムザ染色を行った後に画像解析ソフトウェアを用いて細胞直径を計測した。

分子生物学的検索

3日目の各刺激終了直後を基準(0時間)として、0、12、24、48時間後にWestern blotting法を用いて、筋管細胞内のHSP72発現量を定量した。

(2) 動物実験

実験動物

実験には、6週齢のSD系雄性ラットを使用し、高脂肪食(High Fat Diet [HFD] 32)

を3週間摂取させることでインスリン抵抗性モデルラットを作成した。3週間の高脂肪食摂取後、ラットをさらに麻酔のみを7日間投与した群(HFD群)と、電気刺激を7日間負荷した群(HFD+ES群)に振り分けた。電気刺激(周波数20 Hz、パルス幅200 μ sec、電流1.6 mA、duty cycle 1秒on-off)は吸入麻酔下で実施し、両側の大腿四頭筋の近位部(-極)と遠位部(+極)に位置する皮膚に表面電極を貼付した後、1日1回、30分間負荷した。なお、対照は同期間に通常の餌を与えて飼育した群(normal群)とし、normal群には電気刺激を負荷せず麻酔のみを7日間投与した。

生化学的検索

7日目の電気刺激終了から24時間後に高インスリン正常血糖クランプ法を実施し、ラットのインスリン感受性及びインスリン反応性を評価した。具体的には、頸静脈に挿入したカテーテルからグルコース溶液とインスリン溶液を同時に注入し、血糖値を空腹時と同レベルに維持するグルコース注入速度を求めることで、グルコース注入率を算出した。なお、インスリン注入速度が3.0 mU/kg/min(低濃度注入)時のグルコース注入率をインスリン感受性の指標とし、30.0 mU/kg/min(高濃度注入)時のグルコース注入率をインスリン反応性の指標とした。

分子生物学的検索

高インスリン正常血糖クランプ法を実施した後に大腿直筋を採取し、Western blotting法を用いて、大腿直筋内のHSP72、glucose transporter(GLUT)1、GLUT4、insulin receptor substrate(IRS)1発現量を定量した。

(3) 統計処理

得られた結果は、平均値 \pm 標準偏差で表記した。各群間の比較には、一元配置分散分析を適用し、有意差を判定した。そして、一元配置分散分析にて有意差を認められた場合には多重比較検定にTukey法を適用し、2群間の比較を行った。なお、全ての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

(1) 培養細胞実験

インスリン感受性の変化

IR群の2-DG取り込み量は、対照群、H群、ES群、H+ES群と比較して有意に低値を示した($P < 0.05$)。一方、対照群、H群、ES群、H+ES群の間には有意差を認めなかった。

細胞直径の変化

筋管細胞の直径は、5群間には有意差を認めなかった。

HSP72発現量の変化

H 群の HSP72 発現量は、対照群と比較して刺激終了直後（0 時間後）ではほとんど差を認めなかったが、12 時間後には高値を示し、この発現量は 24 時間後まで維持された。その後は緩やかに低下したが、48 時間後においても対照群の値より高値を示した。

ES 群の HSP72 発現量は、対照群と比較して 0 時間後ではほとんど差が認められなかったが、12 時間後では高値を示した。その後は緩やかに低下し、48 時間後には対照群の値にまで低下した。

H+ES 群の HSP72 発現量は、対照群と比較して 0 時間後ではほとんど差を認めなかったが、12 時間後には高値を示し、この発現量は 48 時間後まで維持された。

H 群、ES 群、H+ES 群における各刺激終了から 48 時間後の HSP72 発現量を比較すると、H+ES 群が有意に高値を示した ($P < 0.05$)。

以上の結果をまとめると、インスリン抵抗性を惹起した C2C12 筋管細胞を用いた培養細胞実験では、インスリン感受性、細胞直径、HSP72 発現量を指標として、インスリン抵抗性に対する温熱刺激と電気刺激の併用効果を検討した。その結果、温熱刺激または電気刺激を単独で繰り返し負荷した場合と両刺激を同時に繰り返し負荷した場合のいずれにおいても、インスリン感受性の亢進や HSP72 発現量の増加を認めた。しかし、両刺激を組み合わせることによる併用効果は得られなかった。

そこで、高脂肪食摂取によりインスリン抵抗性を惹起したラットを用いた動物実験では、インスリン抵抗性に対する継続的な骨格筋電気刺激の効果を検討し臨床応用に向けた基礎的なデータを得ることを目的として、表面電極を用いた電気刺激の繰り返しはラットの糖代謝に及ぼす影響を検討した。さらに、その作用機序について HSP72、GLUT1、GLUT4、IRS1 発現量の変化に注目し、分子生物学的検索を行った。

(2) 動物実験

インスリン感受性の変化

インスリン注入速度が 3.0 mU/kg/min 時の HFD+ES 群、HFD 群のグルコース注入率は、normal 群と比較して有意に低値を示した ($P < 0.05$)。一方、HFD+ES 群と HFD 群のグルコース注入率を比較すると、HFD+ES 群が有意に高値を示した ($P < 0.05$)。

インスリン注入速度が 30.0 mU/kg/min 時の HFD 群のグルコース注入率は、normal 群と比較して有意に低値を示した ($P < 0.05$)。一方、HFD+ES 群と HFD 群のグルコース注入率を比較すると、HFD+ES 群が有意に高値を示した ($P < 0.05$)。

HSP72、GLUT1、GLUT4、IRS1 発現量の変化
HFD+ES 群の HSP72 及び GLUT4 発現量は、normal 群、HFD 群と比較して有意に高値を示

した ($P < 0.05$)。

GLUT1 及び IRS1 発現量は、3 群間には有意差を認めなかった。

以上の結果をまとめると、高脂肪食摂取によりインスリン抵抗性を惹起したラットを用いた動物実験では、両側の大腿四頭筋に対する経皮的電気刺激の繰り返しはラットの糖代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、7 日間という短期間の電気刺激負荷によってインスリン作用（インスリン感受性及びインスリン反応性）が改善するとともに、電気刺激の対象筋である大腿直筋内の HSP72 や GLUT4 発現量が増加することが明らかとなった。したがって、電気刺激の継続実施は骨格筋の質的变化を引き起こしてインスリン抵抗性を改善させる効果があり、この作用機序には HSP72 や GLUT4 の発現増加が関与している可能性が示唆された。

以上の検証は、骨格筋の糖代謝をターゲットにした培養細胞実験ならびに動物実験に基づくものであるが、その成果は骨格筋電気刺激が 2 型糖尿病の治療法として有用である可能性を示唆している。そして、これは整形外科疾患を有する患者や、体力の低下した患者など積極的な運動を十分に行えない糖尿病患者においても実施可能な手法であり、今後は臨床応用についても検討していきたい。

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)

岩田全広, 渡辺裕之, 土田和可子, 鈴木重行. 2 型糖尿病に対する電気刺激療法 - インスリン抵抗性改善作用の可能性 - . 理学療法学 40(8): 553-557, 2013. (査読無)

Matsuo S, Suzuki S, Iwata M, Banno Y, Asai Y, Tsuchida W, Inoue T. Acute effects of different stretching durations on passive torque, mobility, and isometric muscle force. J Strength Cond Res 27(12): 3367-3376, 2013. (査読有)

DOI: 10.1519/JSC.0b013e318290c26f.

岩田全広, 西浜かすり, 土田和可子, 鈴木重行. 電気刺激による培養骨格筋細胞の肥大効果. 日本福祉大学健康科学論集 16: 1-7, 2013. (査読有)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009573838>

渡辺裕之, 鈴木重行, 岩田全広, 坂本圭, 井上貴行, 坂野裕洋. 骨格筋経皮的電気刺激が健常ラットの耐糖能及びインスリン感受性に与える影響. 理学療法科学 27(4): 503-508, 2012. (査読有)

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1589/rika.27.503>

土田和可子, 岩田全広, 鈴木重行, 坂野裕洋, 井上貴行, 松尾真吾, 浅井友詞. 温熱刺激による筋萎縮の進行抑制効果の検討 - グルココルチコイド誘導性筋萎縮の進行抑制効果と熱ショックタンパク質発現との関連性から - . 理学療法 29(7): 795-802, 2012. (査読有)
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ai0rgryh&vo=29&nu=7>

〔学会発表〕(計 18 件)

岩田全広, 土田和可子, 坂野裕洋, 井上貴行, 浅井友詞, 鈴木重行. メカニカルストレスによる骨格筋肥大がインテグリンを介して誘導される可能性. 第 68 回日本体力医学会大会, 2013 年 9 月 22 日, 日本教育会館・学術総合センター・共立講堂(東京都).

Iwata M, Tsuchida W, Yuminamochi R, Banno Y, Inoue T, Fujiwara M, Hayashi K, Matsuo S, Asai Y, Suzuki S. Mechanical stretching increases glucose transport into skeletal myocytes in culture by mechanism other than via adenosine triphosphate. 34th Annual Meeting International Gravitational Physiology, June 24, 2013, Honokuni Toyohashi Art Theater PLAT (Toyohashi, Japan).

土田和可子, 弓納持里奈, 坂野裕洋, 井上貴行, 松尾真吾, 藤原光宏, 鈴木重行, 岩田全広. 温熱刺激によるグルココルチコイド誘導性筋萎縮の進行抑制と FOXO3a および NF- κ B 活性化の関連性. 第 17 回日本体力医学会東海地方会学術集会, 2013 年 3 月 16 日, 愛知学院大学 楠元キャンパス(愛知県).

岩田全広, 弓納持里奈, 土田和可子, 坂野裕洋, 井上貴行, 浅井友詞, 鈴木重行. 熱ストレスによるデキサメタゾン誘導性筋萎縮の進行抑制における NF- κ B の関与. 第 67 回日本体力医学会, 2012 年 9 月 14 日, 長良川国際会議場・岐阜都ホテル(岐阜県).

Hayashi K, Suzuki S, Inukai N, Inoue T, Imoto S, Banno Y, Iwata M, Fujiwara M. Treadmill exercise reverses mechanical hyperalgesia in acid-induced rats. 14th World Congress of Pain (IASP), August 31, 2012, Milano Convention Centre (Milan, Italy).

〔図書〕(計 1 件)

鈴木重行, 岩田全広, 坂野裕洋, 井上貴行, 松尾真吾, 波多野元貴. ストレッチングの科学, 三輪書店, 2013, 230 (214-226).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.n-fukushi.ac.jp/about/university/professor/file/kenko/iwata.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 全広 (IWATA, Masahiro)

日本福祉大学・健康科学部・准教授

研究者番号: 60448264