

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：33915

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25282165

研究課題名(和文) 糖尿病性微小血管障害に対する運動・高酸素プレコンディショニング併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of exercise trainings and hyperbaric oxygen preconditioning therapy for diabetic microangiopathy

研究代表者

近藤 浩代 (Kondo, Hiroyo)

名古屋女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：50333183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病に伴う骨格筋の微小血管障害に対して、運動や軽度高圧高酸素曝露は毛細血管三次元構造や容積を温存し、微小血管障害を予防することが示された。また、運動は強度に依存されず、効果を示すことが明らかとなった。運動や軽度高圧高酸素曝露は、同様の効果が得られたことから、糖尿病患者の状態に合わせて適切な治療法を選択することで、患者への負担も少なくなり、合併症の予防として用いることが可能であると結論づけられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to explore the effects of low- and high-intensity exercise training, mild hyperbaric oxidation, and nutrition strategies on the changes of the three-dimensional capillary networks and associated angiogenic factors in the skeletal muscle of type 2 diabetes. The capillary volume and angiogenic factors in skeletal muscle were higher in the exercise trainings and hyperbaric oxidation than in the control and diabetic muscle, whereas that in the diabetic muscle was the lowest. In addition, there is no difference between the low- and high-intensity exercise, and hyperbaric oxidation in the capillary volume and the almost angiogenic factors of skeletal muscle. These results revealed that exercise and hyperbaric oxidation therapies are effective to maintain the architecture of capillary network in diabetic skeletal muscle.

研究分野：健康科学、生活習慣病、微小血管、骨格筋

キーワード：糖尿病 運動 高酸素 微小血管

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の合併症は大血管障害と細小血管(微小血管)障害に大別できる。糖尿病性大血管障害は脳血管障害や虚血性心疾患の原因になり、糖尿病性微小血管障害では組織血流が不十分となり、組織の壊死を惹起する。糖尿病性足壊疽は非外傷性足切断原因の第1位であり、組織の微小血管の退行に起因している。研究代表者が糖尿病の骨格筋毛細血管網を観察した研究では、毛細血管網が退行した、糖尿病性微小血管障害像を明らかにした(Nutr Metab 2011, Scientific WorldJournal 2012)。特に血管径の縮小化、毛細血管密度の減少の構造的変化が観察された。また、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現は正常筋と比較して変化を示さなかったが、血管内皮細胞間の不安定性の指標であるangiopoietin-2/angiopoietin-1比(Ang-2/Ang-1比)が上昇し、血管新生抑制因子であるthrombospondin-1(TSP-1)の発現が増加していることを明らかにした(Nutr Metab 2011)。一方、運動は糖尿病の合併症を予防するのに必要不可欠な介入方法であるが、骨格筋の微小血管の変化について報告がなく、糖尿病性微小血管障害に対しての予防効果が明らかでない。また、運動は治療法の一つであるが、運動の出来ない症例も存在し、他の治療の開発も望まれている。

2. 研究の目的

運動は糖尿病の糖コントロールや合併症予防に必要不可欠な治療の一つである。一方、運動を実施することで合併症を悪化させる場合や新たな合併症を惹起する場合があります、注意を要する(Balducci, 2014)。そこで、運動の種類による微小循環障害の治療効果を明らかにすると共に、運動に依存しない物理療法(軽度高圧高酸素療法)の微小循環障害についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)モデル実験動物を使用して、骨格筋の微小循環障害に対する運動の効果を検証するために、研究代表者らが開発した共焦点レーザー法で骨格筋内の微小血管を3次元可視化し、その変化を検証した。また、血管新生や退行に関連する因子を測定し、運動による効果を検証した。

(2)モデル実験動物を使用して、運動強度野相違による効果を上記と同様の方法で検証した。

(3)モデル実験動物を使用して、軽度高圧高酸素曝露による効果を検証した。

(4)抗酸化等の栄養素材の摂取による効果を検証した。

4. 研究成果

(1)微小血管障害に対する運動の効果

糖尿病モデルの骨格筋においても運動(低強度)はTCAサイクル内の酵素であるコハク酸

脱水酵素(SDH)を増加させた(図1)。また、ミトコンドリア新生に関するPGC-1

の発現も増加させた。これらの結果から糖尿病筋においても運動は代謝活性を増加させることが明らかとなった。

また、微小血管を観察すると、同様に運動は糖尿病筋で生じる毛細血管退行を予防していた(図2)。

さらに糖尿病筋で減少を示した血管新生因子であるVEGF, Flk-1, Flt-1は運動により増加した。また、血管新生抑制因子であるTSP-1は糖尿病筋では増加したが、運動はその増加を減衰させた。これらの結果から低強度の運動は糖尿病筋の微小循環障害を予防・改善できることが明らかとなった。

(2)運動強度による効果相違

運動強度による効果の相違について検証を実施した。可視化した毛細血管の3次元像より毛細血管容積を測定すると、糖尿病筋では著しく減少した

のに対して運動は毛細血管容積を増加させた。一方、運動強度(低強度, 高強度)による相違は観察されなかった(図3)。さらに血管新生因子であるVEGF, Flk-1, Flt-1, angiopoietin-1, angiopoietin-2, Tie-2を測定すると何れも糖尿病筋で減少したが、運動

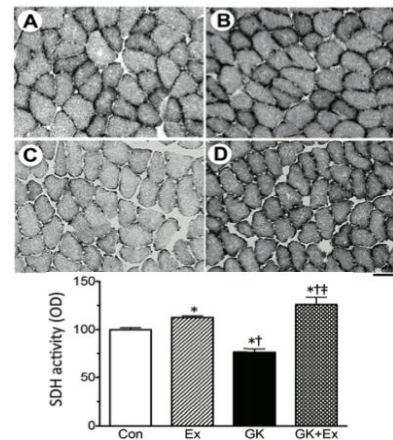


図1. コハク酸脱水酵素(SDH)の活性 A: 正常筋(Con), B: 正常+運動筋(Ex), C: 糖尿病筋(GK), D: 糖尿病+運動筋(GK+Ex)

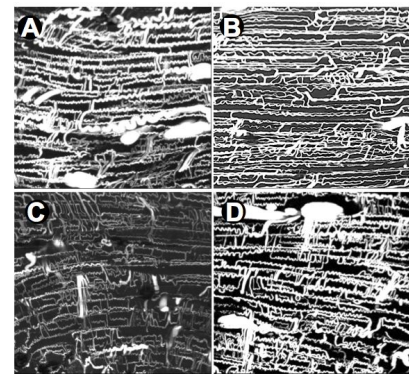


図2. 毛細血管の3次元可視化像

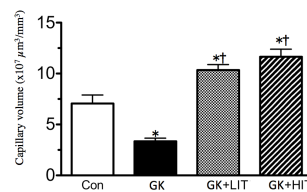


図3. 運動強度の相違による毛細血管容積. GK: 糖尿病筋, LIT: 低強度運動, HIT: 高強度運動

により増加が確認された。一方、運動強度による効果の相違は見られなかった。低酸素誘導因子である HIF-1 も同様に運動により発現が増加したが、運動強度による相違は観察されなかった。また、AMPK や GLUT4 の発現も運動により増加を示した。これらの結果から運動強度に依存されず、運動は骨格筋内の代謝を増加させ、微小血管障害を改善できることが明らかになった。

(3) 軽度高圧高酸素 (HBO) 曝露の効果

軽度高圧高酸素曝露 (1.25 気圧, 酸素濃度 36%) の効果について検証を実施した。糖尿病モデル動物を軽度高圧高酸素曝露 (4 時間/日) して、骨格筋の変化を測定した。糖尿病筋では毛細血管の退行が観察されたが、軽度高圧高酸素曝露により毛細血管容積が温存された。また、毛細血管-筋線維比 (C/F 比) は改善されなかったが、毛細血管径の増加が観察された (図 4)。これらの結果から軽度高

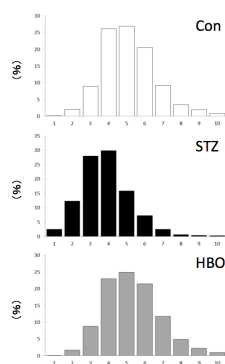


図 4. 毛細血管径のヒストグラム
STZ; 糖尿病筋, HBO; 糖尿病 + 高酸素曝露

から軽度高圧高酸素曝露は糖尿病に伴う骨格筋の萎縮やアポトーシスを抑制する作用や代謝を改善する作用があることが示唆され、糖尿病に伴う合併症の予防や改善に寄与すると考えられる。

(4) 抗酸化等の栄養素材の摂取による効果

糖尿病モデルに対して抗酸化栄養素を経口摂取させ、毛細血管の変化について検討した。抗酸化栄養素は糖尿病筋における毛細血管退行を抑制した。また、糖尿病に伴う湿重量や Bax/Bcl-2 発現比における変化を軽減した。また、血流増加に伴い毛細血管退行を抑制する作用も観察された。

これらの研究結果より運動や軽度高圧高酸素曝露は糖尿病に伴う骨格筋の微小血管障害を予防・改善することが可能であり、糖尿病の合併症の予防に効果があることが示された。また、どの治療も同様の効果が得られたことから、糖尿病患者の状態に合わせて適切な治療法を選択することで、患者への負担も少なくなり、治療の補助手段、合併症の予防として用いることが可能であると結論づけられる。一方、血糖値の顕著な改善については、さらに条件検討が必要なことから、運

動や高酸素曝露は合併症の予防に有効であると考えられ、血糖コントロールなど糖尿病の治療には食事や薬物療法等との併用も必要であると考えられる。

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 35 件)

1) Hirayama Y, Nakanishi R, Tategaki A, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Enterococcus faecium strain R30 increases red blood cell velocity and prevents capillary regression in the soleus of hindlimb unloaded rats via the eNOS/VEGF pathway. *Microcirculation* 24(4). e12356, 2017. 査読; 有
doi: 10.1111/micc.12356.

(2) Nakanishi R, Hirayama Y, Tanaka M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Nucleoprotein supplementation enhances the recovery of rat soleus mass with reloading after hindlimb unloading-induced atrophy via myonuclei accretion and increased protein synthesis. *Nutr Res* 36(12):1335-1344, 2016. 査読; 有
doi: 10.1016/j.nutres.2016.10.007.

(3) Hirayama Y, Nakanishi R, Maeshige N, Fujino H. Preventive effects of nucleoprotein supplementation combined with intermittent loading on capillary regression induced by hindlimb unloading in rat soleus muscle. *Physiological Reports* 5(4). pii: e13134. 2017. 査読; 有
doi: 10.14814/phy2.13134

(4) Maeshige N, Koga Y, Tanaka M, Aoyama-Ishikawa M, Miyoshi M, Usami M, Fujino H. Low-Intensity Ultrasound Enhances Histone Acetylation and Inhibition of IL-6 mRNA Expression by Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate in Fibroblasts. *J Ultrasound Med* 36(5):879-885, 2017. 査読; 有
doi: 10.7863/ultra.16.04020..

(5) Maezawa T, Tanaka M, Kanazashi M, Maeshige N, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. Astaxanthin supplementation attenuates immobilization-induced skeletal muscle fibrosis via suppression of oxidative stress. *J Physiol Sci*. 2017 in press. 査読; 有
doi:10.1007/s12576-016-0492-x

(6) Uchida K, Tanaka M, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. L-arginine supplementation attenuates capillary

regression without increasing integrated succinate dehydrogenase activity and VEGF expression in skeletal muscle during hindlimb unloading. *General Physiology and Biophysics* 35(4): 425-432, 2016. 査読 ; 有 doi: 10.4149/gpb_2016016

(7) 森藤武, 村上慎一郎, 藤野英己. 非肥満型2型糖尿病ラットにおける足底筋の筋線維タイプ移行に対する持久運動の予防効果. *体力科学* 第 65 卷 第 1 号 p.197-p.203. 2016. 査読 ; 有

(8) Takemura A, Ishihara A. Mild hyperbaric oxygen Inhibits growth-related decrease in muscle oxidative capacity of rats with metabolic syndrome. *J Atheroscler Thromb* 41(9):2336-2344. 2016. 査読 ; 有 doi: 10.5551/jat.34686.

(9) Takemura A, Ishihara A. Mild hyperbaric oxygen improves decreased oxidative capacity of spinal motoneurons innervating the soleus muscle of rats with type 2 diabetes. *Neurochem Res* 41(9): 2336-2344.2016. 査読 ; 有 doi: 10.1007/s11064-016-1947-4.

(10) Tanaka M, Kanazashi M, Maezawa T, Kondo H, Fujino H. Abnormalities in three-dimensional capillary architecture and imbalance between vascular endothelial growth factor-A and thrombospondin-1 in soleus muscle of ovariectomized rat. *Acta Histochem* 117:605-611, 2015. 査読 ; 有 doi: 10.1016/j.acthis.2015.06.001.

(11) Kondo H, Fujino H, Murakami S, Tanaka M, Kanazashi M, Nagatomo F, Ishihara A, Roy RR. Low-intensity running exercise enhances the capillary volume and pro-angiogenic factors in the soleus muscle of type 2 diabetic rats. *Muscle Nerve* 51: 391-399, 2015. 査読 ; 有 doi: 10.1002/mus.24316.

(12) 中西亮介, 平山祐介, 田中稔, 前重伯壮, 近藤浩代, 石原昭彦, 藤野英己. 廃用性筋萎縮の回復過程におけるヌクレオプロテイン摂取が筋タンパク質の合成と筋核数増加に与える影響. *日本基礎理学療法学雑誌* 18, 43-49.2015. 査読 ; 有

(13) Fujino H, Kondo H, Nagatomo F, Ishihara A. Capillary growth and regression in skeletal muscle. *J Phys Fitness Sports Med* 5, 483-491, 2014. 査読 ; 有 doi: org/10.7600/jpfsm.3.483

(14) Kondo H, Fujino H, Nagatomo F, Ishihara A. Influence of estrogen receptor polymorphisms on bone density in response to habitual exercise in Japanese postmenopausal women. *Scientific World Journal* 2014; 2014:593927. 7 pages. 2014. 査読 ; 有 doi: 10.1155/2014/593927.

(15) Tillakaratne N, Duru P, Fujino H, Zhong H, Xiao M, Edgerton VR, Roy RR. Identification of interneurons activated at different inclines during treadmill locomotion in adult rats. *J Neurosci Res* 92: 1714-1722. 2014. 査読 ; 有 doi: 10.1002/jnr.23437.

(16) Kanazashi M, Tanaka M, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Amelioration of capillary regression and atrophy of the soleus muscle in hindlimb unloaded rats by astaxanthin supplementation and intermittent loading. *Exp Physiol* 99:1065-1077, 2014. 査読 ; 有 doi: 10.1113/expphysiol.2014.079988.

(17) Kanazawa Y, Maekawa K, Okumura Y, Fujita N, Fujino H. Preventive effect of nucleoprotein on hindlimb unloading-induced capillary regression in rat soleus muscle. *Biotech Histochem* 89: 220-227, 2014. 査読 ; 有 doi: 10.3109/10520295.2013.835444.

(18) Ishihara A, Nagatomo F, Fujino H, Kondo H. Exposure to mild hyperbaric oxygen increases blood flow and resting energy expenditure but not oxidative stress. *J Sci Res Reports* 3: 1886-1896, 2014. 査読 ; 有 doi: 10.9734/JSRR/2014/10101

(19) Sakita M, Murakami S, Fujino H. The morphological changes in the capillary architecture of the tibial nerve associated with spontaneous aging and aerobic exercise intervention during aging in rats. *J Phys Ther Sci* 26: 263-267, 2014. 査読 ; 有 doi: 10.1589/jpts.26.263.

(20) Ishihara A, Nagatomo F, Fujino H, Kondo H, Ohira Y. Decreased Succinate Dehydrogenase Activity of Gamma and Alpha Motoneurons in Mouse Spinal Cords Following 13 Weeks of Exposure to Microgravity. *Neurochemical Research* 38: 2160-2167, 2013. 査読 ; 有

[学会発表] (計 135 件)

(1) Kondo H, Fujino H, Kanazashi M,

Tanaka M, Ishihara A. Propolis supplementation prevents capillary regression and endothelial cell death via inhibiting thrombospondin-1 activation in atrophied muscle. 63rd Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, June 1-4, 2016. Boston (アメリカ)

(2) Kondo H, Fujino H, Ishihara A. Protective role of moderate-intensity short-term and low-intensity long-term exercise training on muscle capillary regression in a rat model of type 2 diabetes. American Heart Association Scientific Sessions, 2015. 11.12-16. Orlando (アメリカ)

(3) Kondo H, Fujino H, Nagatomo F, Ishihara A. Capillary and metabolic actions of exercise in skeletal muscle of type 2 diabetes. 2014 American Society for Cell Biology meeting, 2014, 12.6-10. Philadelphia (アメリカ)

(4) Zeidan H, Tanaka M, Yoshikawa M, Kondo H, Fujino H. Mild Hyperbaric Oxygen Exposure Attenuates Hyperglycemia-related Decrease in Oxidative Capacity of Skeletal Muscle of Rats. 第 24 回日本運動生理学会, 7 月 23-24 日, (熊本)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 浩代 (KONDO, Hiroyo)
名古屋女子大学・家政学部・准教授
研究者番号：50333183

(2) 研究分担者

藤野 英己 (FUJINO, Hidemi)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：20278998

石原 昭彦 (ISHIHARA, Akihiko)
京都大学・大学院人間・環境学研究科・
教授
研究者番号：90184548