

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32507

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560374

研究課題名(和文)慢性膵炎治療・予防への運動療法導入の可能性(慢性膵炎肥満モデルラットでの検証)

研究課題名(英文)Effectiveness of exercise therapy on chronic pancreatitis in WBN/Kob-Fatty rats

研究代表者

湊 久美子(Minato, Kumiko)

和洋女子大学・生活科学系・教授

研究者番号：70211589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：膵炎患者には運動は原則禁忌とされている。慢性膵炎と肥満を起こす遺伝的膵炎肥満ラットを用いて、脂質代謝異常を伴う慢性膵炎に対する運動療法の効果を検討した。膵炎肥満ラットでは、12週齢で膵の萎縮、高血糖、低インスリン、ラ島の崩壊、膵の内外分泌細胞の異常形態、脂肪膵、炎症や小胞体ストレスの増加など、慢性膵炎と糖尿病の症状を呈したが、非肥満ラットでは認められなかった。食餌制限により血糖、血中脂質が改善し、さらに運動療法の併用によって膵の形態やインスリン抵抗性が改善し、食餌制限のみに比較して膵内外分泌機能の改善が高かった。脂質代謝異常を伴う慢性膵炎の予防・治療に運動療法が適用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic pancreatitis is an inflammatory disorder, causing a progressive and irreversible dysfunction of exocrine and endocrine pancreas. Recently, leptin receptor-deficient WBN/Kob-Fatty (WKF) rat was developed for a model of chronic pancreatitis and diabetes with obesity. The purpose of this study was to investigate whether chronic exercise with restricted diet improved the exocrine and endocrine pancreas of WKF rats.

Male 12wks WKF rats had symptoms of pancreatitis and diabetes (hyperglycemia, hyperlipidemia, insulin resistance, fatty pancreas, inflammation, morphological abnormality), but WK rats did not. These results indicated that obesity was a major factor to aggravate pancreatitis and diabetes. Chronic exercise with restricted diet beneficially affected the exocrine and endocrine pancreas in WKF rats through the treatment of obesity.

Pancreatic dysfunction of chronic pancreatitis and diabetes may be improved by adequate exercise habit with restricted diet.

研究分野：運動生理生化学

キーワード：慢性膵炎 肥満 運動習慣 食餌制限 膵腺房細胞 膵B細胞 炎症 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

最近、脂質代謝異常を伴う非アルコール性の慢性膵疾患が注目され、肥満やメタボリックシンドロームとの関連が指摘されている。このような状態の膵では、組織中に“異所性”脂肪が蓄積する“脂肪膵”が認められ、膵炎や膵癌の発症との関連性が指摘されている。申請者グループは、これまでに運動習慣による膵外分泌機能の亢進効果や低下した膵外分泌機能への回復効果を報告してきた。組織の線維化や間質浮腫などが起きている膵に対する運動による改善効果を検討し、肥満と糖・脂質代謝異常を伴う慢性膵炎の治療への運動療法の導入の可能性を探ることを本研究の目的とする。本研究は運動が禁忌とされている慢性膵炎への運動の効果を見る初の研究である。

2. 研究の目的

肥満は、すべての生活習慣病、メタボリックシンドロームの元凶となっている。膵臓の生活習慣病では、糖尿病以外に膵炎と膵癌が重篤な疾患で効果的な治療法の解明が待たれている。最近、脂質代謝異常を伴う非アルコール性の慢性膵疾患が注目され、肥満やメタボリックシンドロームとの関連で起こる慢性膵炎が指摘されている。このような状態の膵では、組織中に“異所性”脂肪が蓄積する“脂肪膵”が認められ、膵炎や膵癌の発症との関連性も指摘されている。

膵臓と運動について、運動習慣により糖尿病が改善することは知られているが、膵外分泌機能と運動との関連性をみた検討は申請者グループ以外にはほとんど見当たらない。我々は、持久的トレーニングによる膵消化酵素活性の増加、膵腺房細胞の肥大、酵素原顆粒の増加、コレシストキニン持続刺激による膵酵素分泌の増大など、ラットにおいて運動習慣による膵外分泌機能の亢進を指摘してきた。また、肥満モデル (Zucker Fatty) ラットを用いた検討では、運動による膵酵素活性の増加とともに、超微形態学的解析により細胞内に蓄積した脂肪滴が運動習慣によって明らかに減少し、組織中“異所性脂肪”の蓄積が改善していることを確認した。

従って、習慣的な運動の実施は、肥満と糖・脂質代謝異常を伴うメタボリックシンドローム状態の臓器、組織の異常の改善に、脂質代謝の改善を通して関与していることが窺われる。

膵炎は、アルコールの多飲、高脂肪食などが原因で高トリグリセリド血症や高カイロミクロン血症と関連している。食事療法が主な療法であり、激しい運動は腹圧を高め、膵胆管圧を高めて膵炎や胆細管炎を引き起こすという報告もあり、運動は原則禁忌とされている。しかし、肥満を伴う膵炎においては、

脂質代謝を改善して膵組織に蓄積された脂肪を排除することにより組織機能が正常化する可能性は十分に考えられる。

そこで、糖・脂質代謝異常を伴う肥満の慢性膵炎発症モデルラット (WBN/Kob-Fatty rat) を用いて低強度の運動トレーニングを導入して膵の内・外分泌機能の変化について検討し、慢性膵炎の予防や治療への運動療法導入の可能性を探った。

3. 研究の方法

本研究は、和洋女子大学動物を対象とする実験研究に関する倫理委員会の承認を得て実施された (1214号)。

実験動物：5週齢の雄の遺伝的慢性膵炎肥満モデル (WBN/Kob-Fatty) ラット 27例と、同系非肥満 (WBN/Kob) ラット 6例を用い、1週間の予備飼育後に、コントロール群 (C群; n=6)、膵炎肥満群 (F群; n=10)、制限食群 (FD群; n=8)、運動&制限食群 (FT群; n=9) に4群別した。飼料にはオリエンタル酵母工業 (株) 製の NMF を用い、C群とF群は自由摂食で、FD群はF群の摂餌量の70%になるように制限給餌し、FT群は、FD群と体重が一致するように制限給餌した。その結果、FT群はF群の69%の摂餌量となった。FT群は加負荷式自発運動測定装置内で飼育し、回転輪に体重の30%負荷をかけた自発走を課した結果、平均走行距離は $1711 \pm 458\text{m}$ となった。

実験：6週間の介入後にイソフルラン麻酔下で開腹し、腹部大静脈より採血した後、膵、骨格筋、脂肪組織を摘出し湿重量を測定した。膵組織は一部に生食水を加えてホモゲナイズし、遠心分離後、上清中のたんぱく濃度を測定した。別の膵組織の一部にたんぱく抽出用バッファーを加えてホモゲナイズし、遠心分離後にサンプル調製し、炎症マーカーの IL6 ならびに小胞体ストレスマーカーの XBP1 のたんぱく発現をウエスタンブロットング法で解析した。血液は遠心分離後、血清中のグルコース、インスリン、アミラーゼ、脂質等を測定した。

光学顕微鏡試料の作製：膵組織片を20%ホルムアルデヒド溶液で固定し、外注 (SRL 東京メディカル) にて薄片を作成、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

電子顕微鏡試料の作製：膵組織片を2.5%グルタルアルデヒド、1%オスミウム酸固定後、エタノール系列で脱水し、エポキシ樹脂に包埋、超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1220) にて加速電圧 80kV で観察した。

統計処理：結果は各群の平均値と標準偏差で表し、4群間の有意差検定には一元配置の分散分析 (ANOVA) を実施し、その結果が有

意の場合には、各群間の比較に Fisher's PLSD を用いた。危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) をもって有意と判定した。

4. 研究成果

図 1 に、実験時の体重と摂餌量の平均値と標準偏差を示した。

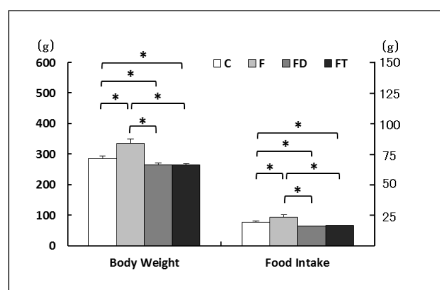


図 1 体重及び摂餌量

F 群は摂餌量が C 群に比較して多く、体重も最も多かった。30% 減の給餌により F D 群の摂餌量は F 群に比較して有意に少なく、C 群に比較しても少なかった。F T 群の摂餌量も同様で、F D 群と F T 群の体重には有意差は認められず、当初の計画通り、制限食のみ (F D 群) と運動と制限食 (F T 群) による体重抑制は同程度となった。

また、腸間膜脂肪重量においても F 群では C 群に比較して高く、内臓脂肪量の増大が確認された。F D 群と F T 群では F 群に比較して少ない傾向があったが、F D 群では有意ではなく、F T 群で有意に低値を示した。

ヒラメ筋重量では、F 群で C 群に比較して有意に低く、筋萎縮が観察され、F D 群ではさらに低かったのに対し、F T 群ではこれら 2 群に比較して有意に高く、運動習慣により筋萎縮の改善が認められた。

図 2 に、血中脂質 (トリグリセリドと総コレステロール) を示した。

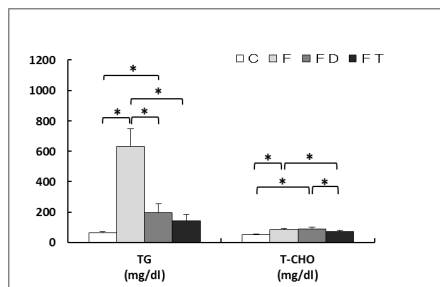


図 2 血中脂質

トリグリセリドは F 群で極めて高く、それに比較して F D 群、F T 群では有意に低値を示した。F D 群では C 群より有意に高い値を維持していたが、F T 群では C 群と同程度であった。総コレステロール値は C 群に比較して F 群で有意に高かった。F D 群では改善が

認められなかったが、F T 群ではそれに比較して有意に低値を示し、C 群と同程度であった。また、血中遊離脂肪酸濃度もトリグリセリドの結果と同様の結果となった。

これらの結果から、C 群に比較して F 群では、血中脂質の増加、内臓脂肪の蓄積などが観察され、明らかに脂質代謝異常が起こっていたことが確認された。

図 3 に血糖値と血中アミラーゼ活性値を、図 4 に血中インスリン値および HOMA-IR 値を示した。

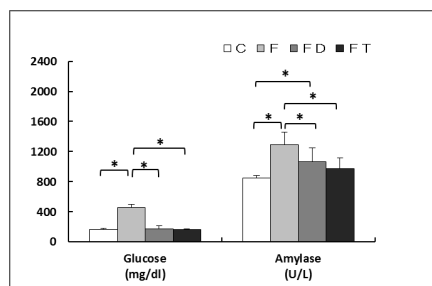


図 3 血糖値および血中アミラーゼ活性値

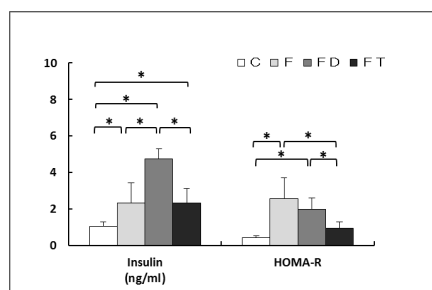


図 4 血中インスリン値および HOMA-R 値

血糖値は F 群で C 群に比較して有意に高値を示し、F D 群と F T 群では同程度に低値を示した。一方、インスリン値は F 群で C 群に比較して高値を示したが F D 群ではさらに高く、F T 群ではそれに比較して有意に低値を示した。その結果、HOMA-R 値は F 群で最も高く、次いで F D 群、F T 群では C 群と同程度に低値を示した。

これらの結果から、F 群では、インスリン抵抗性が高く、膵でのインスリン生成機能も低下していることが推察された。F D 群では膵でのインスリン生成機能は改善していたが、インスリン抵抗性が高い状態、F T 群はインスリン抵抗性が改善している可能性が示された。

血中アミラーゼ活性も F 群が最も高値を示し、膵からの逸脱が高く、F D 群、F T 群では改善傾向にあった。特に F T 群でその傾向が高かった。

図 5 に血中の GOT (AST)、GPT (ALT) 活性値を示した。

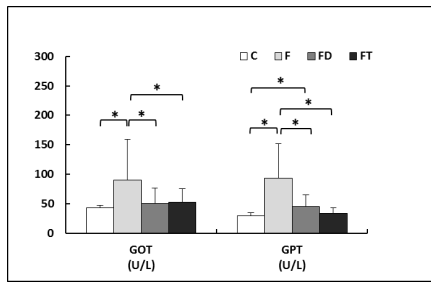


図5 血中GOT, GPT値

血中GOT, GPT値はC群に比較してF群で有意に高く, FD群, FT群では有意に低かった。

肝機能についてもF群では機能が低下していることが確認され, FD, FT群で改善傾向にあった。

図6に膵重量を絶対値と体重100g当たりの相対値で示した。

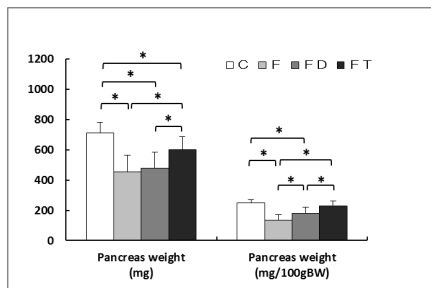


図6 膵重量

膵重量はC群に比較してF群では有意に低く, 肥満により膵萎縮が認められた。F群に比較してFD群, FT群で高い傾向にあり, 特にFT群で高い傾向にあった。

図7に膵たんぱく含量を組織1mg当たりと全膵組織当たりで示した。

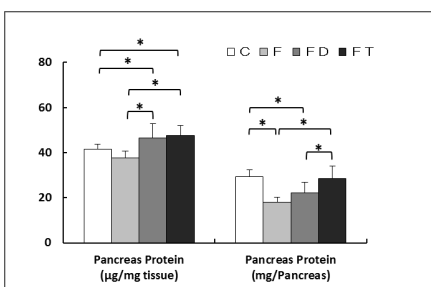


図7 膵たんぱく含量

膵たんぱく含量はC群に比較してF群で少ない傾向にあり, FD群, FT群では改善する傾向が見られ, 特にFT群で高かった。膵組織中のアミラーゼ活性値も同様の傾向を示した。

これらの結果より, 膵外分泌機能は非肥満群では維持されており, 肥満により低下する

傾向がみられ, 肥満の解消により改善する傾向があったが, 特に運動を行ったFT群でより改善していた。

図8に, IL6とXBP1の膵組織中のたんぱく発現について示した。

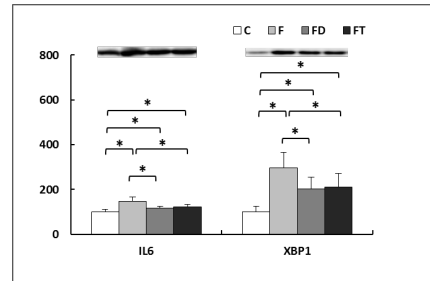


図8 IL6およびXBP1相対値

IL6, XBP1のたんぱく発現量はC群に比較してF群で高かった。それに比較してFD群とFT群では有意に低かった。肥満により組織の炎症と小胞体ストレスが悪化し, 食餌制限と運動により改善傾向が見られた。

図9に, F群ラットの膵組織の光学顕微鏡像を示した。

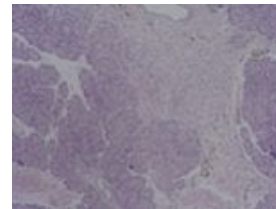


図9 F群ラット膵組織の光学顕微鏡像(HE染色)

外分泌細胞群と内分泌細胞群が入り乱れた像が観察され, C群, FT群で観察されている球形のランゲルハンス島がほとんど見られなかった。また, FD群においても球形のランゲルハンス島はみられず, いびつなランゲルハンス島が多かった。

図10に, F群ラットの膵腺房細胞の電子顕微鏡像を示した。

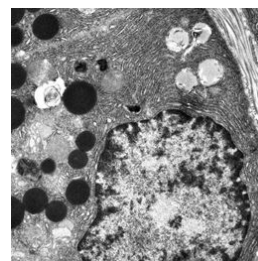


図10 F群ラットの膵腺房細胞の電子顕微鏡像(×6000倍)

F群ラットの膵腺房細胞内には、C群ではほとんど見られない脂肪滴が観察された。また、いびつな核や膨化したミトコンドリアなど、形態学的な異常も観察された。FD群の細胞内にも脂肪滴が観察されたが、FT群ラットでは脂肪滴は少ない傾向があった。また、酵素原顆粒はFT群で多い傾向があった。

ランゲルハンス島の電顕像では、C群ラットに比較して、F群ラットではランゲルハンス島自体の形状が崩れ、球形を維持していない状態が確認された。外分泌組織と内分泌組織が入り組んでいたり、内分泌組織周辺に線維状の構造も見られた。F群ラットのB細胞では、C群ラットに比較して分泌顆粒が少なかった。FD群ラットのランゲルハンス島も球形でないものが多く、F群ラットと同様に線維状の構造が確認された。B細胞においても異常な形態が観察された。分泌顆粒はF群ラットに比較して多かった。FT群ラットでは、球形なランゲルハンス島が確認され、F群ラット、FD群ラットに比較して、改善された形態が観察された。分泌顆粒はFD群ラットほど多くなかった。

以上の結果から、慢性膵炎を自然発症するWBN/Kobラットに肥満遺伝子を導入したWBN/Kob-Fattyラットでは、12週齢で膵の萎縮、高血糖、低インスリン、高アマラーゼ、ラ島や外分泌組織構造の崩壊、膵腺房細胞やB細胞の異常形態、炎症マーカー、小胞体ストレスマーカーの増加など、初期の慢性膵炎と糖尿病の症状を呈したが、非肥満ラットではほとんど認められなかった。これらの結果は、肥満が慢性膵炎や糖尿病の増悪因子となっていることを明確に示していた。膵炎肥満ラットへの食餌制限は、血糖、血中脂質などの血液性状を改善したが、悪化した膵の形態やインスリン抵抗性は改善し得なかった。一方、食餌制限に運動を併用した場合には、膵の形態やインスリン抵抗性も改善し、食餌制限のみに比較して膵重量や膵蛋白含量も高く、膵内外分泌機能の改善が明らかに認められた。少なくとも、運動の実践による膵炎症状の増悪は認められなかった。

したがって、肥満の改善が糖脂質代謝の改善を伴って膵の構造や機能の改善をもたらす、適切な食習慣と運動習慣が肥満を伴う慢性膵炎の予防や改善に有効であることが示された。脂質代謝異常を伴う慢性膵炎の予防・治療に運動は禁忌ではなく、運動療法が適用できる可能性が示唆された。

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 1 件)

黒坂裕香、北村裕美、山内秀樹、代谷陽子、湊久美子、Zucker 肥満ラットの肝脂肪蓄積の抑制に対する運動習慣と食餌制限の効果、体力科学、63、223-229、2014。

[学会発表](計 3 件)

Minato K、Shiroya Y、Kurosaka Y、Yamauchi H, Effect of chronic exercise on the exocrine and endocrine pancreas in WBN/Kob-Fatty rats. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015.5.17. Yokohama, JAPAN.

湊久美子、代谷陽子、黒坂裕香、山内秀樹、運動習慣と食餌制限が慢性膵炎肥満ラット(WBN/Kob Fatty rat)の膵内外分泌機能に及ぼす影響、第 69 回日本体力医学会大会、2014.9.19.長崎。(体力科学、63:616、2014.)

Shiroya Y、Minato K、Kurosaka Y、Yamauchi H, Effects of exercise training and detraining on fatty liver in Zucker Fatty rats. 20th International Congress of Nutrition, 2013.9.17. Granada, Spain. (Ann Nutr Metab, 63-S1, 893.)

[図書](計 1 件)

湊久美子、代谷陽子、ニュー運動生理学(宮村実晴編)、セクション7 運動と内臓、2 膵臓、分担執筆、316-324、2014、真興交(株)医書出版部、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湊久美子(MINATO Kumiko)
和洋女子大学・生活科学系・教授
研究者番号：70211589

(2) 研究分担者

代谷陽子(SHIROYA Youko)
和洋女子大学・生活科学系・准教授
研究者番号：80183408

黒坂裕香(KUROSAKA Yuka)
和洋女子大学・生活科学系・助手
研究者番号：30633002