

令和元年6月10日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01505

研究課題名(和文) 内部障害に伴う骨格筋ミトコンドリア機能障害に対する受動的な物理的刺激の開発

研究課題名(英文) Development of passive physiological stimulation for mitochondrial dysfunction on skeletal muscle in internal impediment

研究代表者

藤田 直人(Fujita, Naoto)

広島大学・医系科学研究科(保)・講師

研究者番号：90584178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：受動的な物理的刺激として高気圧処置を採用し、2型糖尿病などの内部障害に対する影響を検証した。その結果、習慣的な高気圧処置は骨格筋における抗炎症性サイトカインの発現を促すことで、2型糖尿病における耐糖能やインスリン感受性を向上させる可能性が示された。しかし、高気圧処置は運動と比べて、肥満や脂質異常症に対しては有効性が不十分であったため、プロトコルの工夫や他の介入など、高気圧処置を運動の代替処置として臨床応用を図るには更なる検証を重ねる必要がある。また、高酸素は酸化ストレスを伴うため、肺高血圧症のように既に酸化ストレスが生じている場合には適応に注意を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2型糖尿病に対する高気圧処置の有効性はこれまでも報告されているが、その機序は未だ不明であった。よって、本成果の学術的意義は、高気圧処置による耐糖能やインスリン感受性の向上に、骨格筋の抗炎症作用、並びに脂肪組織における炎症の軽減が関与している可能性を示した点である。また、現在、2型糖尿病に対するリハビリテーションは運動が主であるが、当該患者が、長期間、積極的に運動を継続するのは困難であり、非現実的である。よって、2型糖尿病などの内部障害患者にとって遂行が安全かつ容易である受動的な介入を確立し、その具体的なプロトコルや適応の確立を図る点が、本成果の社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the influences of regular hyperbaric treatment as passive physiological stimulation on glucose tolerance in type 2 diabetes with obesity. Glucose tolerance and insulin sensitivity were significantly higher in the diabetic rats treated with 1.3 ATA than the untreated diabetic rats. Hyperbaric treatment also increased IL-10 expression in skeletal muscle and decreased TNF expression in adipose tissue. These results suggested that TNF downregulation and IL-10 upregulation in diabetic rats subjected to hyperbaric treatment participate in the crosstalk between adipose and skeletal muscle tissue and improve glucose intolerance. Nevertheless, it had no efficacy for obesity or hyperlipidemia. Further research is required to elucidate the mode of action of hyperbaric treatment in type 2 diabetes with obesity.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：2型糖尿病 高気圧処置 耐糖能 インスリン感受性 骨格筋 脂肪組織 サイトカイン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における全死亡者の半数以上を占め、また、内部障害を伴う疾患は死亡数・死亡率ともに増加傾向にあることから、内部障害の予防や治療は多くの国々における重要課題である。近年、2型糖尿病、及びそれに続発する可能性があるがんや心疾患などの内部障害に関して、骨格筋ミトコンドリア機能障害の関与が示唆されている。

ミトコンドリアの主な機能は電子伝達系における酸化リン酸化と脂肪酸の $\beta$ 酸化によるエネルギー産生であり、糖質と脂質は骨格筋のミトコンドリアにおける主要なエネルギー基質である。よって、肥満を伴う2型糖尿病など、糖質や脂質の過度な蓄積は骨格筋のミトコンドリアにとって過負荷となり、その機能障害を引き起こす。機能障害に陥った骨格筋のミトコンドリアでは抗酸化機構の破綻によって活性酸素種(ROS)が過剰に発現し、酸化ストレスが亢進する。酸化ストレスの亢進は、ASK1やJNKなどの活性化によってIRS-1におけるセリンリン酸化の促進とチロシンリン酸化の抑制を生じ、骨格筋にインスリン抵抗性を惹起する。また、過度な内臓脂肪の蓄積は、抗炎症作用を有するアディポネクチンの放出を減少させることで慢性炎症を誘発し、TNF- $\alpha$ やIL-6などの炎症性サイトカインの発現を増加させる。増加した炎症性サイトカインは骨格筋のミトコンドリアにおけるROSの発現を増加させるため、ミトコンドリア機能障害と炎症性サイトカインの両者は、酸化ストレスの亢進によって骨格筋にインスリン抵抗性を引き起こす誘因となる。

2型糖尿病に伴う骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性は、他の臓器における過剰なインスリン作用を引き起こし、インスリン受容体を介したPI3K/Akt経路の活性化によって細胞増殖を誘発し、発がんに関与する可能性がある。また、インスリンはIGF-1受容体に対して交差反応を有するため、高インスリン血症はIGF-1受容体を介して発がんを促進する可能性もある。加えて、2型糖尿病は過度な糖質の蓄積によってがん細胞におけるWarburg効果を助長するため、発がんのリスクを高めるとされている。これらのことより、2型糖尿病、及び続発する可能性のあるがんや心疾患など、内部障害を伴う疾患の予防や治療を図るには、骨格筋ミトコンドリア機能障害に対する介入を企てる必要がある。

我々はこれまでに、骨格筋におけるミトコンドリア機能障害は、運動によって軽減できることを確認している。しかし、内部障害を伴う疾患に対する運動に関して、肥満を伴う2型糖尿病の場合、過度な運動は心疾患や整形外科的疾患を引き起こす可能性がある。また、がんや心疾患のような消耗性疾患の場合、ランニングやスクワットのような全身性の能動的な運動を積極的に実施する事は現実的ではない。よって、内部障害を伴う疾患における骨格筋ミトコンドリア機能障害に対する介入は、運動のような能動的なものではなく、運動と類似した効果を有する受動的なものが望ましいと考える。

骨格筋に対して運動と類似した効果を及ぼす受動的な介入として、我々は低周波などの電磁波、温熱、伸張、高気圧・高酸素などの物理的刺激による影響を検証してきた。しかし、これらの受動的な物理的刺激が骨格筋のミトコンドリア機能障害を軽減する事は既に検証済みであるが、その作用機序には不明な点があり、介入時期の決定や治療プロトコルの設定等、具体的な臨床応用には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では内部障害を伴う疾患における骨格筋ミトコンドリア機能障害と、同時進行する骨格筋内における微小循環構造の退行性変化や酸化ストレス、インスリン抵抗性、筋核アポトーシス、ミトファジーなどの所見のタイムコースと因果関係を検証し、それらに対する受動的な物理的刺激の効果を確認する事で、骨格筋の弱化だけでなく、内部障害を伴う疾患の予防や治療手段の開発を試みることを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究は以下の順序で実施した。

#### (1) 高気圧処置が骨格筋に及ぼす即時効果の検証

Wistar系雄性ラットを1.25気圧の環境に短時間滞在させた直後に長指伸筋とヒラメ筋を摘出し、定量PCR法によって各種のmRNAの発現量を測定することで、軽度な高気圧環境が骨格筋に及ぼす即時効果を検証した。

#### (2) 持久運動が2型糖尿病モデルラットの耐糖能に及ぼす影響の検証

肥満を伴う2型糖尿病モデル動物であるOLETFラットを用いて、1日60分間の持久運動が耐糖能等に及ぼす影響を検証した。

#### (3) 高気圧処置が2型糖尿病モデルラットの耐糖能に及ぼす影響の検証

肥満を伴う2型糖尿病モデル動物であるOLETFラットを用いて、1日8時間の高気圧処置が耐糖能や各種組織におけるサイトカインの発現に及ぼす影響を検証した。

#### (4) 高酸素治療が肺高血圧症モデルラットの生存率に及ぼす影響の検証

モノクロタリン誘導性肺高血圧症モデルラットを90%酸素環境に終日暴露し、生存率や酸化ストレスに及ぼす影響を検証した。

### 4. 研究成果

### (1) 高気圧処置が骨格筋に及ぼす即時効果の検証

PGC-1 $\alpha$  の発現量など、タンパクレベルでは 1.25 気圧の環境に短時間滞在させた影響を認めず、同様に、CS 活性や SDH 活性など、組織レベルでの影響も検出できなかった。一方、非処置の対照群と比べて、1.25 気圧の環境に 1 時間暴露した群のヒラメ筋では、PGC-1 $\alpha$  の mRNA の発現量が有意に高値を示した。このことより、習慣的に高気圧環境に暴露した場合、骨格筋に適応が生じる可能性が示唆された。これらの研究成果は関連学会、及び国際誌にて報告した。

### (2) 持久運動が2型糖尿病モデルラットの耐糖能に及ぼす影響の検証

1 日 60 分間の持久運動を 4 週間継続したところ、OLETF ラットの耐糖能及びインスリン感受性は、運動を実施しない場合に比べて有意に高値を示した。また、持久運動は肥満と脂質異常症の改善にも有効であった。加えて、持久運動はヒラメ筋において筋線維横断面積の有意な増加をもたらせた。これらの研究成果は関連学会、及び国際誌にて報告した。

### (3) 高気圧処置が2型糖尿病モデルラットの耐糖能に及ぼす影響の検証

1 日 8 時間の高気圧処置を 16 週間継続したところ、OLETF ラットの耐糖能及びインスリン感受性は、運動を実施しない場合に比べて有意に高値を示した。OLETF ラットの脂肪組織では TNF- $\alpha$  の発現量が増加しており、それは高気圧処置によって有意に軽減した(図左)。また、高気圧処置を行った骨格筋では IL-10 の発現量が有意に高値を示した(図右)。一方、今回の高気圧処置は、肥満と脂質異常症、及び骨格筋の萎縮に対しては有効性を認めなかった。このことより、習慣的に高気圧環境に暴露した場合、骨格筋において抗炎症性作用が生じ、耐糖能やインスリン感受性の向上に参与した可能性が示唆された。これらの研究成果は関連学会にて報告した。なお、現在は追加実験を行い、国際誌への投稿準備中である。

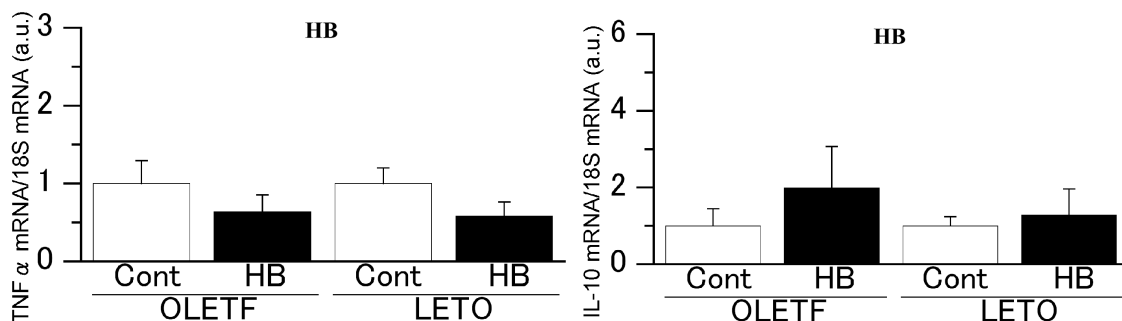


図 脂肪組織における TNF $\alpha$  の発現量(左)と足底筋における IL-10 の発現量(右)

OLETF: 2型糖尿病モデルラット

LETO: 通常ラット

Cont: 非処置の群

HB: 高気圧処置を行った群

### (4) 高酸素治療が肺高血圧症モデルラットの生存率に及ぼす影響の検証

モノクロタリン誘導性肺高血圧症モデルラットの SpO<sub>2</sub> は低値を示すが、90%酸素環境に暴露すると即時的に上昇することを確認した。しかし、90%酸素環境での終日飼育を数日間継続すると、SpO<sub>2</sub> は正常を保つにもかかわらず、生存率は低下した。また、肺高血圧症モデルラットを高酸素環境に暴露した場合、肺動脈壁の肥厚が助長され、右心不全への移行が促進された。このように、高酸素が病期を進行させる要因として、酸化ストレスの増加が確認された。これらの研究成果は関連学会、及び国際誌にて報告した。

### (5) まとめと今後の展望

受動的な物理的的刺激として高気圧処置を採用し、2型糖尿病モデルラットや肺高血圧症モデルラットなどの内部障害に対する影響を検証した。その結果、習慣的な高気圧処置は骨格筋における抗炎症性サイトカインの発現を促すことで、2型糖尿病における耐糖能やインスリン感受性を向上させる可能性が示された。運動は肥満と脂質異常症に対して有効であった一方で、高気圧処置はそれらに対しては有効性が不十分であったため、プロトコルの工夫や他の介入など、高気圧処置を運動の代替処置として臨床応用を図るには更なる検証を重ねる必要がある。また、高酸素は酸化ストレスを伴うため、肺高血圧症のように既に酸化ストレスが生じている場合には負の作用が生じる危険性がある。よって、今後は、酸素濃度や気圧量などのプロトコルの改善を含めて、高気圧処置の機序や適応を検証する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. Fujita N, Yamasaki N, Eto K, Asaeda M, Kuwahara W, Imagita H. Oxygen therapy may worsen the survival rate in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *PLoS One* 13:

- e0204254, 2018. (査読あり) DOI:10.1371/journal.pone.0204254
2. Fujita N, Aono S, Karasaki K, Sera F, Kurose T, Fujino H, Urakawa S. Changes in lipid metabolism and capillary density of the skeletal muscle following low-intensity exercise training in a rat model of obesity with hyperinsulinemia. *PLoS One* 13: e0196895, 2018. (査読あり) DOI:10.1371/journal.pone.0196895
  3. Fujita N, Tomioka T, Ono M, Deie M. Acute influence of mild hyperbaric oxygen at 1.25 atmospheres absolute with normal air on mitochondrial enzymes and PGC-1 $\alpha$  mRNA levels in rat skeletal muscle. *Biomed Res Clin Prac* 1: 42-45, 2016. (査読あり) DOI:10.15761/BRCP.1000109

〔学会発表〕(計14件)

1. Natsuki Goto, Naoto Fujita, Wataru Nino, Kazuyoshi Hisatsune, Ryosuke Ochi, Hisao Nishijo, Susumu Urakawa. Hemodynamic responses to hyperbaric treatment in skeletal muscle of obesity and type 2 diabetes rats. 9<sup>th</sup> Federation of the Asian and Oceanian Physiological Sciences Congress. Kobe. Japan. 2019.3.30
2. Ryosuke Ochi, Naoto Fujita, Natsuki Goto, Hisao Nishijo, Susumu Urakawa. Parvalbumin positive neurons in the basolateral amygdala and anxiety-like behavior in OLETF rats. 9<sup>th</sup> Federation of the Asian and Oceanian Physiological Sciences Congress. Kobe. Japan. 2019.03.29
3. 越智亮介, 藤田直人, 渡部芳美, 後藤夏季, 西条寿夫, 浦川将. 2型糖尿病用モデルラットの不安様行動と扁桃体基底外側核の介在ニューロンとの関連. 第8回日本情動学会大会. 広島市. 2018.12.08
4. Ryosuke Ochi, Naoto Fujita, Natsuki Goto, Hiroshi Nishimaru, Jumpei Matsumoto, Hisao Nishijo, Susumu Urakawa. The effects of enriched environment from weaning to adolescence period on anxiety-like behavior in rats. The 5<sup>th</sup> International Scientific Conference on Occupational and Environmental Health. Hanoi. Vietnam. 2018.09.11
5. Natsuki Goto, Naoto Fujita, Wataru Nino, Ryosuke Ochi, Hisao Nishijo, Susumu Urakawa. Hyperbaric treatment at 1.3 atmospheres absolute with normal air improves glucose tolerance in type 2 diabetes. The 5<sup>th</sup> International Scientific Conference on Occupational and Environmental Health. Hanoi. Vietnam. 2018.09.11
6. 後藤夏季, 藤田直人, 二井野涉, 中村智哉, 越智亮介, 西条寿夫, 浦川将. 空気加圧による1.3気圧の高気圧処置がOLETFラットの糖代謝と骨格筋血流量に与える影響. 第73回日本体力医学会大会. 福井市. 2018.9.7-9
7. 藤田直人, 後藤夏季, 中村智哉, 二井野涉, 浦川将. 軽度な高気圧環境への暴露がOLETFラットの骨格筋特性に及ぼす影響. 第73回日本体力医学会大会. 福井市. 2018.9.7-9
8. Natsuki Goto, Naoto Fujita, Tomoya Nakamura, Wataru Nino, Ryosuke Ochi, Susumu Urakawa. Effects of hyperbaric treatment at 1.3 atmospheres absolute on hyperglycemia and hyperinsulinemia in type 2 diabetes. 第95回日本生理学会. 香川. 2018.3.28-30
9. 藤田直人, 後藤夏季, 中村智哉, 二井野涉, 越智亮介, 浦川将. OLETFラットの病期の進行に伴う骨格筋内毛細血管密度の変化. 第123回日本解剖学会全国学術集会. 東京. 2018.3.28-30
10. 後藤夏季, 藤田直人, 中村智哉, 二井野涉, 越智亮介, 浦川将. 空気加圧による1.3気圧処置が肥満を伴う2型糖尿病モデルラットの血糖値と内臓脂肪量に与える影響. 第29回広島スポーツ医学研究会. 広島市. 2018.2.3
11. 藤田直人, 青野沙紀, 唐崎航平, 世羅布実, 黒瀬智之, 藤野英己, 浦川将. 持久運動が高インスリン血症を伴う肥満の脂質代謝と骨格筋内毛細血管に及ぼす影響. 第69回日本生理学会中国・四国地方会. 徳島. 2017.10.28-29
12. 藤田直人, 青野沙紀, 唐崎航平, 世羅布実, 黒瀬智之, 藤野英己, 浦川将. 持久運動が高インスリン血症を伴う肥満の脂質代謝に及ぼす影響. 第72回日本体力医学会大会. 松山. 2017.9.16-18
13. 藤田直人, 青野沙紀, 唐崎航平, 世羅布実, 黒瀬智之, 藤野英己, 浦川将. 運動の時間配分が肥満を伴う2型糖尿病ラットのブドウ糖負荷応答に及ぼす影響. 第52回日本理学療法学会大会. 幕張. 2017.5.12-14
14. 藤田直人, 青野沙紀, 唐崎航平, 世羅布実, 黒瀬智之, 藤野英己, 浦川将. 運動の時間配分の違いが肥満第28回広島スポーツ医学研究会. 広島市. 2017.1.28

〔その他〕

ホームページ等

1. 広島大学研究者総覧

<http://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.5e006975e285125d520e17560c007669.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤野 英己

ローマ字氏名：(Hidemi Fujino)

所属研究機関名：神戸大学

部局名：保健学研究科

職名：教授

研究者番号 ( 8 桁 ): 20278998

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。