

令和元年6月11日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16516

研究課題名(和文)血管機能と構造をターゲットとした食品由来因子による糖尿病治療戦略の開発

研究課題名(英文)Development of nutritional strategy for microvascular function and structure in diabetic skeletal muscle

研究代表者

金指 美帆(Kanazashi, Miho)

県立広島大学・保健福祉学部(三原キャンパス)・助教

研究者番号：10734527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化作用を有する食品由来因子であるアスタキサンチンの摂取は、肥満2型糖尿病に伴う骨格筋微小血管障害を抑制することを明らかにした。共焦点レーザー顕微鏡を用いた3次元構造解析、及び組織切片を用いた解析の結果から、肥満2型糖尿病の発症に伴い、微小血管の退行性変化及び骨格筋代謝障害を引き起こしたが、アスタキサンチンの摂取がそれらの微小血管障害及び代謝障害を抑制した。一方で、骨格筋への効果については、非肥満型及び肥満型糖尿病モデルにおいてアスタキサンチン摂取による代謝機能改善効果を認めたと、筋萎縮予防に関しては、非肥満型糖尿病モデルに対してのみ有効であり、肥満型については効果が限定的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では食生活の欧米化に伴い、肥満による糖尿病患者数が急速に増加し、医療費の大きな割合を占めている。そのため、2型糖尿病の患者や予備軍とされる者に対して治療・予防プログラムとして運動療法が推奨されているが、加齢や関節疾患、内科的問題等により効果的な運動を継続的に行うことが困難な場合が多い。アスタキサンチンを摂取することで肥満2型糖尿病に伴う骨格筋微小血管障害を抑制するという本研究結果は、運動が困難な者を含めたより多くの糖尿病患者及び予備軍を対象とした臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to investigate the effects of astaxanthin supplementation on microvascular dysfunction in skeletal muscle induced by type 2 diabetes. Type 2 diabetes resulted in three-dimensional capillary regression and decreased oxidative capacity within the skeletal muscle. On the other hand, astaxanthin treatment reversed these changes within the diabetic muscle. Although astaxanthin exerted positive effects on diabetes-induced skeletomuscular alterations, there was little efficacy on blood glucose level.

研究分野：応用健康科学

キーワード：糖尿病 微小血管障害 骨格筋 酸化ストレス 栄養 生活習慣病 食品

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

1. 研究開始当初の背景

肥満は骨格筋におけるインスリン抵抗性を惹起し糖尿病発症の要因となり得る。最近の研究報告では、筋細胞自体のインスリン感受性の低下の他に、血管機能の破綻が骨格筋のインスリン抵抗性に関わることが明らかにされている。また、申請者らは2型糖尿病により骨格筋内微小血管の蛇行性、直径、容積の減少を伴う3次元構造の破綻を明らかとし (Kondo et al. Muscle Nerve 2014)、血管の3次元構造の退行もインスリン抵抗性に寄与するものと考えた。一方で、肥満や2型糖尿病ではインスリン刺激による血管拡張の障害がインスリン抵抗性に関わっていることが示され、eNOS 発現を促すことで、この障害を改善できることが報告されている。

これらの報告から、骨格筋におけるインスリン抵抗性の改善には、血管機能と血管構造を治療ターゲットとした介入が必要と考えられる。本研究では、肥満2型糖尿病骨格筋のインスリン刺激性糖取り込み障害の改善を目的に、骨格筋内微小血管の構造的及び機能的破綻を治療ターゲットとし、血管の3次元構造を可視化することで微小血管径、微小血管容積、血管の蛇行性・吻合、血管ネットワークを構造的に検証し、食品由来因子アスタキサンチンによる効果を分子生物学的に明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、2型糖尿病 (T2DM) モデルラットの微小血管機能と構造をターゲットとして、食品由来因子であるアスタキサンチン投与による改善効果を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肥満2型糖尿病モデルによる検証

研究デザイン

15週齢のZFDM (fa/fa) ラットを、アスタキサンチンを投与する (DM+ASX) 群、Ax を含まないオイルを投与する (DM) 群に区分し、さらに糖尿病を呈さないZFDM (fa/t) ラットも同様にアスタキサンチンを投与する (ASX) 群、Ax を含まないオイルを投与する対照 (CONT) 群の4群に区分した。介入期間は8週間とした。

糖尿病モデルラットの作製

2型糖尿病 (T2DM) モデル動物として、肥満、インスリン抵抗性、レプチン受容体異常症を呈する Hos:ZFDM-Leprfa (ZFDM) ラットを用いる。ZFDM ラットは2008年に発見され、非絶食時血糖値が15週齢で250mg/dl前後を示し、経口糖負荷試験 (OGTT) が20週齢でほとんどの動物において負荷後30分で400mg/dl以上、負荷後2時間で300mg/dl以上を呈し、糖尿病と診断されるモデルである (Yokoi, J Diabetes Res 2013)。

アスタキサンチンの投与

ASX 群及び DM+ASX 群にはアスタキサンチン 100mg/kg を、CONT 群及び DM 群へはアスタキサンチンを含まないオイルを1日2回 (投与間隔9時間) に分けて8週間毎日投与した。

(2) 1型糖尿病モデルによる検証

研究デザイン

1型糖尿病モデルを作製し、アスタキサンチンを投与する (T1DM+ASX) 群、Ax を含まないオイルを投与する (T1DM) 群に区分し、さらに糖尿病を呈さない対照 (Control) 群には Ax を含まないオイルを投与した。介入期間は6週間とした。

糖尿病モデルラットの作製

6週齢の Wistar 系ラットにストレプトゾトシン (50 mg/kg) を尾静脈投与し、2日後の空腹時血糖値が250 mg/dL の動物を1型糖尿病 (T1DM) モデル動物として使用した。

アスタキサンチンの投与

T1DM+ASX 群にはアスタキサンチン 100mg/kg を、Control 群及び T1DM 群へはアスタキサンチンを含まないオイルを1日2回 (投与間隔9時間) に分けて6週間毎日投与した。

4. 研究成果

(1) 肥満2型糖尿病モデルによる検証

アスタキサンチンは肥満2型糖尿病に伴う骨格筋微小血管障害を抑制することを明らかにした。共焦点レーザー顕微鏡を用いた3次元構造解析 (図2)、及び組織切片を用いた Alkaline phosphatase 染色の結果 (図3) から、肥満2型糖尿病の発症に伴い、微小血管の数のみならず容積、直径、赤血球が通過可能である 2.5µm 以上の機能的毛細血管割合が減少した。一方で、アスタキサンチンの摂取がそれらの微小血管障害を抑制することを明らかにした。アスタキサンチンによる血管保護作用が認められたものの、血管新生を司る VEGF の発現量は各群間とも差を認めなかった。したがって、アスタキサンチンによる血管保護作用はその他の因子が関与していることが考えられた。また、組織切片を用いた SDH 染色、及び CS 活性の結果から、肥満2型糖尿病モデルラットへのアスタキサンチン投与はミトコンドリア代謝を活性化することを明らかにした。

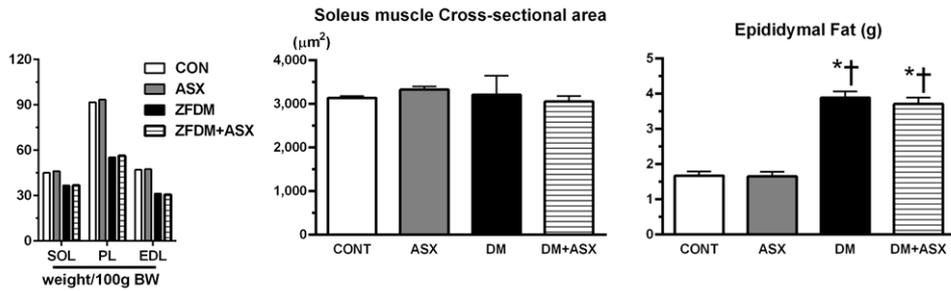


図1. 肥満2型糖尿病モデル動物の筋湿重量, ヒラメ筋の筋線維横断面積, 精巣上脂肪重量. BW: 体重. 図中の値は平均値 ± 標準誤差. *, †, ‡ はそれぞれ CONT 群, ASX 群, DM 群との有意差 ($p < 0.05$) を示す.

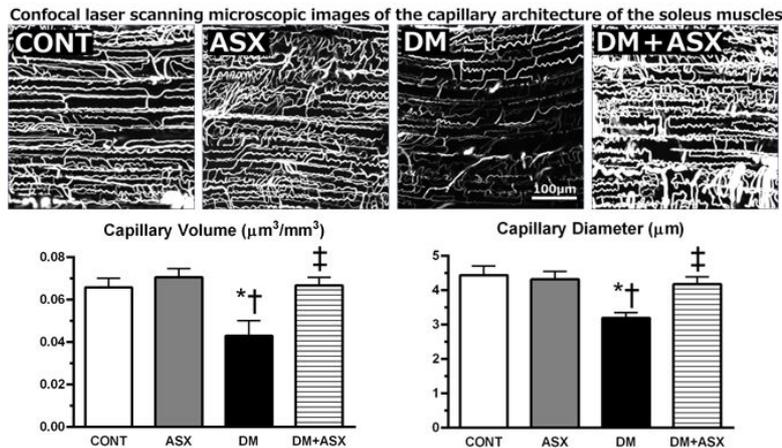


図2. 肥満2型糖尿病モデル骨格筋における共焦点レーザー解析による微小血管構造の画像所見と毛細血管容積・直径. 図中の値は平均値 ± 標準誤差. *, †, ‡ はそれぞれ CONT 群, ASX 群, DM 群との有意差 ($p < 0.05$) を示す.

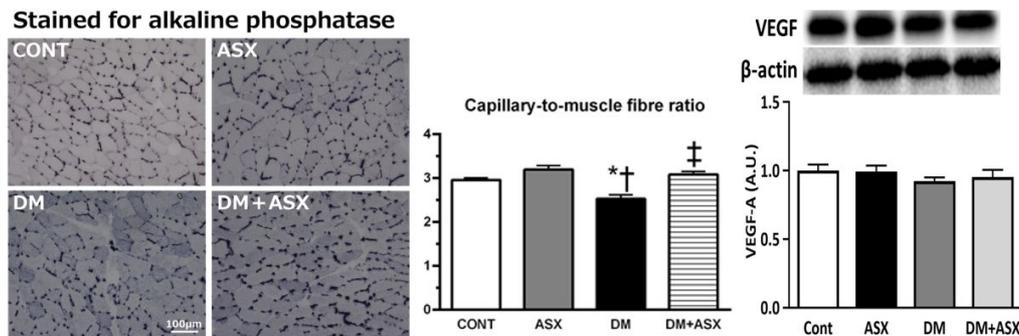


図3. 肥満2型糖尿病モデル骨格筋におけるアルカリフォスファターゼ染色の画像所見, 筋線維あたりの毛細血管比率, VEGF 発現量. 図中の値は平均値 ± 標準誤差. *, †, ‡ はそれぞれ CONT 群, ASX 群, DM 群との有意差 ($p < 0.05$) を示す.

(2) 1型糖尿病モデルによる検証

アスタキサンチンの作用メカニズム検証を目的に実施した1型糖尿病モデルラットによる検証では, アスタキサンチンが糖尿病に伴う筋萎縮や微小血管障害を抑制することを明らかにし, その作用機序として Bax の発現抑制を介したアポトーシスの抑制が関与していることを確認した. Bax は酸化ストレスにより誘導され, ミトコンドリア障害を介したアポトーシスを促すタンパク質である. 糖尿病では活性酸素種の産生に伴う酸化ストレス, 及び高血糖曝露による血管内皮細胞アポトーシスが微小血管障害を引き起こすと言われている.

以上の結果より, 本研究で認めたアスタキサンチンによる微小血管障害抑制機序には, アスタキサンチンが, 酸化ストレス及び高血糖曝露によるミトコンドリア障害や血管内皮細胞アポトーシスを抑制したことが考えられる. 一方で, 糖取り込み器官である骨格筋への効果については, 1型及び肥満2型糖尿病モデルにおいてアスタキサンチン摂取による代謝機能改善効果を認めたが, 筋萎縮予防に関しては, 1型糖尿病モデルに対してのみ有効であり, 肥満2型糖尿病モデルについては効果が限定的であった.

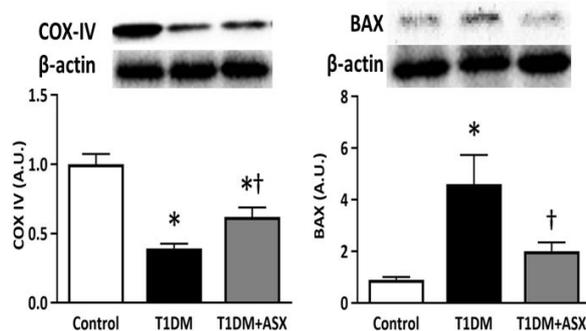


図4. 1型糖尿病モデル骨格筋におけるCOX- とBAX発現量. 図中の値は平均値 ± 標準誤差. *, †はそれぞれControl群, T1DM群との有意差 ($p < 0.05$)を示す.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

Masayuki Tanaka, Miho Kanazashi, Toshiyuki Maezawa, Hiroyo Kondo and Hidemi Fujino. Abnormalities in three-dimensional capillary architecture and imbalance between vascular endothelial growth factor-A and thrombospondin-1 in soleus muscle of ovariectomized rat. *Acta Histochemica*, 117(7): 605-611, 2015. 査読有

DOI: 10.1016/j.acthis.2015.06.001.

Toshiyuki Maezawa, Masayuki Tanaka, Miho Kanazashi, Noriaki Maeshige, Hiroyo Kondo, Akihiko Ishihara and Hidemi Fujino. Astaxanthin supplementation attenuates immobilization-induced skeletal muscle fibrosis via suppression of oxidative stress. *The Journal of Physiological Sciences*, 67(5): 603-611, 2017. 査読有

DOI: 10.1007/s12576-016-0492-x.

Tadayuki Iida, Yasuhiro Ito, Hiroaki Ishikawa, Miho Kanazashi, Ryoji Teradaira, Asami Tatsumi and Satoko Ezoe. Effects of psychological stress from a national license examination on the urine 8-hydroxy-deoxyguanosine levels in young female students, taking into account the menstrual cycle. *Open Journal of Preventive Medicine*, 8(2): 21-31, 2018. 査読有

DOI: 10.4236/ojpm.2018.82003

田中雅侑, 前重伯壮, 金指美帆, 中西亮介, 藤野英己. モノクロタリン誘発性肺高血圧症ラットのヒラメ筋におけるミトコンドリア機能障害と毛細血管退行に対する中周波電気刺激の介入効果. *物理療法科学*, 25: 42-49, 2018. 査読有

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cq2e1eag/2018/002500/007&name=0042-0049j&UserID=202.245.169.15>

上野瑞季, 田中雅侑, 平山佑介, 金指美帆, 松本智博, 前重伯壮, 藤野英己. 心不全による骨格筋の毛細血管退行に対するレーザー照射の治療効果. *物理療法科学*, 25: 50-56, 2018. 査読有

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=cq2e1eag/2018/002500/008&name=0050-0056j&UserID=202.245.169.15>

Masayuki Tanaka, Miho Kanazashi, Noriaki Maeshige, Hiroyo Kondo, Akihiko Ishihara and Hidemi Fujino. Protective effects of Brazilian propolis supplementation on capillary regression in the soleus muscle of hindlimb unloaded rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 69(2): 223-233, 2019. 査読有

DOI: 10.1007/s12576-018-0639-z.

[学会発表](計 14件)

Toshiyuki Maezawa, Miho Kanazashi, Masayuki Tanaka, Noriaki Maeshige, Hiroyo Kondo and Hidemi Fujino. Astaxanthin supplementation improves decreased mitochondrial enzyme activity and capillary regression during recovery from muscle atrophy. *Experimental Biology*, 2015

Miho Kanazashi, Masayuki Tanaka, Ryosuke Nakanishi, Yusuke Hirayama, Toshiyuki Maezawa, Hiroyo Kondo, Akihiko Ishihara and Hidemi Fujino. Propolis supplementation modulates the angiogenic response to unloading in soleus muscle of rats. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015

Masayuki Tanaka, Miho Kanazashi, Ryosuke Nakanishi, Yusuke Hirayama, Toshiyuki Maezawa, Hiroyo Kondo, Akihiko Ishihara and Hidemi Fujino. Protective effects of omega-3 fatty acids on capillary regression in soleus muscle of hindlimb unloaded rats. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015

Toshiyuki Maezawa, Miho Kanazashi, Masayuki Tanaka, Noriaki Maeshige, Hiroyo Kondo, Akihiko Ishihara and Hidemi Fujino. Preventive effects of astaxanthin on capillary regression

during recovery from disuse-induced skeletal muscle atrophy in rats. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015

田中雅侑, 金指美帆, 前沢寿亨, 中西亮介, 平山佑介, 近藤浩代, 藤野英己. 卵巣摘出がラットヒラメ筋の毛細血管ネットワークと血管新生シグナルに与える影響. 第 50 回日本理学療法学会大会, 2015

金指美帆, 田中雅侑, 中西亮介, 平山佑介, 前沢寿亨, 前重伯壮, 藤野英己. 抗酸化栄養素摂取下の治療的電気刺激が筋萎縮及び代謝活性に与える効果. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015

田中雅侑, 金指美帆, 中西亮介, 平山佑介, 近藤浩代, 石原昭彦, 藤野英己. 廃用性筋萎縮に伴う毛細血管退行に対する ω3 系多価不飽和脂肪酸の予防効果. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015

金指美帆, 田中雅侑, 中西亮介, 平山佑介, 前沢寿亨, 前重伯壮, 藤野英己. 抗酸化栄養素を併用した治療的電気刺激が廃用性筋萎縮予防に及ぼす効果. 第 23 回日本物理療法学会大会, 2015

Shinichiro Murakami, Masahiro Sakita, Ming Huo, Satoshi Hayashi, Kazuyoshi Kameyama, Miho Kanazashi, Masayuki Tanaka, Minoru Tanaka, Hiroyo Kondo, Hitoshi Maruyama and Hidemi Fujino. Observation of muscle capillary construction of kidney disease Rat. 18th International Meeting of Physical Therapy Science, 2016

Shinichiro Murakami, Masahiro Sakita, Ming Huo, Hiroyo Kondo, Miho Kanazashi, Minoru Tanaka, Masayuki Tanaka, and Hidemi Fujino. Capillary architecture in skeletal muscle on chronic kidney disease rats. Experimental Biology, 2016

金指美帆, 田中雅侑, 中西亮介, 藤野英己. 2 型糖尿病に伴う骨格筋毛細血管構造の破綻に対するアスタキサンチンの抑制効果. 第 72 回日本体力医学会大会, (愛媛), 2017

田中雅侑, 金指美帆, 藤野英己. 糖尿病に伴う筋萎縮に対するアスタキサンチン摂取の効果. 第 72 回日本体力医学会大会, 2017 年

上野瑞季, 田中雅侑, 平山佑介, 金指美帆, 松本智博, 前重伯壮, 藤野英己. 心不全による骨格筋障害に対するレーザー療法の治療効果の検証. 第 25 回日本物理療法学会大会, 2017

Miho Kanazashi, Masayuki Tanaka, Noriaki Maeshige and Hidemi Fujino. Combinational effects of electrical stimulation and antioxidant astaxanthin supplementation on muscle atrophy and impaired oxidative capacity within unloaded skeletal muscle. World Confederation for Physical Therapy Congress, 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://hiris.pu-hiroshima.ac.jp/profile/ja.NaaMFQ1WRUIYSF5drvxDrw==.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 田中 雅侑

ローマ字氏名: TANAKA, Masayuki

所属研究機関名: 大阪人間科学大学

部局名: 人間科学部

職名: 助教

研究者番号: 10780497

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。