

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：25406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2018～2022

課題番号：17K18028

研究課題名（和文）筋細胞と毛細血管のクロストークに着目したインスリン抵抗性治療法の開発

研究課題名（英文）Development of insulin resistance therapy focusing on crosstalk between muscle cells and capillaries

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、骨格筋における毛細血管の新生形態の違いが、骨格筋の量や代謝機能に与える影響を明らかにすることである。毛細血管と筋細胞は相互依存の関係であることから、毛細血管新生において筋収縮の有無を介した酸素需要が必須であると仮説を立てた。筋収縮による酸素需要に応じた毛細血管新生と薬剤（プラゾシン）による酸素需要を介さない毛細血管新生が筋萎縮予防およびインスリン抵抗性に与える影響を比較した。結果、予測に反して、酸素需要の増大の有無に依存することなく筋毛細血管の増加は、骨格筋代謝の向上、インスリン抵抗性の改善を促し、毛細血管への介入により筋萎縮の軽減効果が得られることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、酸素需要の増減に依存することなく、筋毛細血管の増加により筋萎縮予防効果が得られることを見出した。この結果から、既存の毛細血管への治療方法が筋萎縮予防に応用できる可能性が示された。毛細血管と筋細胞は相互依存の関係であることを利用し、筋萎縮予防をターゲットとした毛細血管へのアプローチは、高齢者や肥満者など積極的な運動が困難な者への、新たな物理刺激・栄養介入の確立や創薬開発への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to determine the effect of crosstalk between myocytes and capillaries on skeletal muscle insulin sensitivity. We hypothesized that angiogenesis with increased oxygen demand via muscle contraction would have a more favorable effect on myocyte function and volume than without muscle contraction. In this study, we compared and tested the effects of angiogenesis induced by muscle contraction (with increased oxygen demand) and drug-induced angiogenesis with prazosin (without increased oxygen demand) on muscle volume and function. Results confirmed that, contrary to predictions, muscle contraction and drug-induced increase in muscle capillaries, independent of the presence or absence of an increase in oxygen demand, resulted in increased skeletal muscle aerobic metabolic enzyme activity, improved insulin sensitivity, and a protective effect against muscle atrophy.

研究分野：リハビリテーション科学

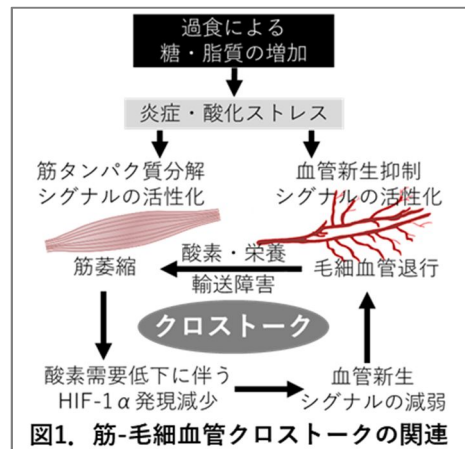
キーワード：骨格筋 毛細血管 パルス磁気刺激 血管新生 インスリン抵抗性 物理療法 筋萎縮 生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

肥満や糖尿病では骨格筋におけるインスリン抵抗性が認められる。最近の研究報告では、骨格筋インスリン抵抗性の発症メカニズムとして、主に 過剰な脂質・糖質による酸化ストレスに起因した毛細血管数の減少(血管構造の破綻)、毛細血管の拡張障害による血中から骨格筋間質へのインスリン移行障害(血管の機能障害)、筋細胞自体のインスリン感受性の低下(筋の機能障害)の3つのメカニズムが関与することが明らかにされている。インスリンによる各器官への糖取り込みのうち 80%が骨格筋により取り込まれるため、骨格筋量の低下や機能障害により糖取り込み障害が生じることから、生活習慣病における骨格筋の健康維持は重要な課題である。

これまでに我々の研究グループでは 2 型糖尿病では骨格筋における血管新生シグナルが減弱することで毛細血管が構造的に破綻することを明らかにした(Kondo, Muscle Nerve 2015)。一方で、我々は、2 型糖尿病ラットにおいて、食品由来因子の摂取により骨格筋の毛細血管退行を軽減しても糖尿病による血糖値の改善には至らないことを確認した。このことから、筋の糖代謝能やインスリン感受性を改善し得る筋毛細血管ネットワークは、筋細胞の需要に応じて構築されたものである必要があるのではないかと考えた。

運動などの筋収縮を伴う刺激により酸素需要が酸素供給能を上回ると、筋細胞が低酸素状態となり、低酸素誘導因子(HIF-1)の発現を介して血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの血管増加因子の発現が誘導され、毛細血管が新生される(藤野, 2008)。一方で、長期臥床など慢性的に筋活動が低下した状態では筋細胞での酸素需要が低下し、HIF-1の発現低下を介した毛細血管の退行が生じる(Kanazashi, Acta Physiologica 2013)。つまり、筋細胞の需要に応じて毛細血管は絶えずリモデリングを行っており、酸素需要の増大を伴う骨格筋の収縮は、筋細胞へ酸素などの物質運搬をより効率的に行える構造と機能を有した毛細血管形成を促している可能性がある。一方で、薬剤や食品などによる酸素需要を介さない毛細血管新生では、筋細胞における酸素需要の増大というイベントを介していないため、筋細胞-毛細血管間の物質交換における効率性の損なわれた毛細血管新生が行われている可能性が考えられる。以上より、毛細血管と筋細胞は相互依存の関係であることから、機能的な毛細血管ネットワークの構築には、筋収縮を介した酸素需要の増大を伴う血管新生が必須であると仮説を立てた。



2. 研究の目的

骨格筋における毛細血管の新生形態の違いが、骨格筋の量や代謝機能に与える影響を明らかにする。

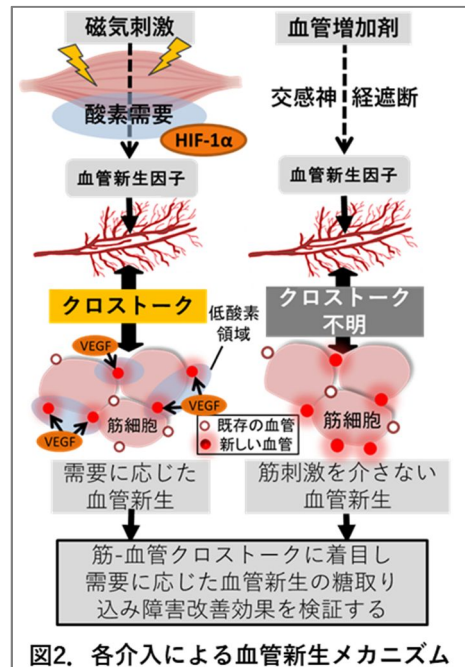
3. 研究の方法

インスリン抵抗性モデル動物を用いて、磁気刺激による酸素需要の増大を伴う毛細血管新生と、毛細血管増加作用を有するプラゾシン投与による酸素需要を介さない毛細血管新生の影響を比較検討した。

<動物モデル作製>

インスリン抵抗性モデルとして、高脂肪食摂取による肥満ラットを用いた。高脂肪食摂取群は6週齢より12週間高脂肪食を摂取させ肥満を惹起させた。介入期間は各2週間として、高脂肪食摂取開始10週間から12週間の間に行った。

インスリン抵抗性モデルとして、廃用性筋萎縮ラットを用いた。廃用性筋萎縮モデルの作製には、先行研究で広く採用されている Morey 法による尾部懸垂を行った。



<異なる血管新生メカニズムを有する2種類の介入が毛細血管新生に与える影響を比較する>

共焦点レーザー顕微鏡を用いた3次元毛細血管の構造的解析、血管新生/抑制の発現量及び活性化を指標とした機能的分析、分子生物学的手法を用いた血管新生を誘発する分子メカニズムの解析を実施した。

<インスリン抵抗性モデル動物に対する磁気刺激および血管増加剤の効果を比較した>

生体内骨格筋を用いて、毛細血管を介したインスリン刺激時のインスリンシグナルの活性化を評価し、各介入が骨格筋のインスリン感受性に与える影響を比較検討した。

<異なるメカニズムを介する毛細血管新生介入>

異なる毛細血管新生形態をとる 後肢骨格筋へ磁気刺激介入（筋活動量の増加による酸素需要の増大を伴う毛細血管新生を促す）と、骨格筋の毛細血管増加作用を有するプラゾシン投与（酸素需要の増大を介さない毛細血管新生を促す）が、インスリン抵抗性モデルラットの骨格筋の組織形態学的特性およびインスリン感受性などの骨格筋機能に及ぼす影響を比較検証した。磁気刺激：刺激条件は刺激強度（NMES を用いて超最大刺激時の足関節底屈トルクを算出し、その20%トルクとなる刺激強度とし、開始前と1週間後で出力を測定・調整した）、刺激周波数（50Hz）、パルス幅（350 μsec）、刺激時間（1.3sec）、休止時間（1.7sec）、および刺激回数（20回×5セット/日）に設定して2週間実施した。プラゾシン投与：プラゾシン（Prazosin 塩酸塩：2 mg/kg/day）を飲料水へ混合し飲料水に混入（Prazosin：50mg/kg/day）させることで摂取させ、2週間実施した。

4. 研究成果

酸素需要の増大の有無に依存することなく筋毛細血管の増加は、骨格筋代謝の向上、インスリン抵抗性の改善を促すことを確認した。また、筋収縮を介さない毛細血管新生でも、毛細血管維持により筋萎縮の軽減効果が得られることを明らかにした。

(1) 酸素需要に応じた毛細血管新生（磁気刺激介入）

インスリン抵抗性モデル（廃用性筋萎縮・高脂肪食摂取による肥満ラット）に対するパルス磁気刺激は、ラット後肢骨格筋における筋毛細血管退行を軽減した。また、筋収縮を促す介入であるため筋萎縮軽減効果も発揮した。さらに、磁気刺激と併用する収縮様式として求心性収縮を用いることが、遠心性収縮および等尺性収縮様式と比較して、毛細血管退行予防に最も効果的であることを確認した。

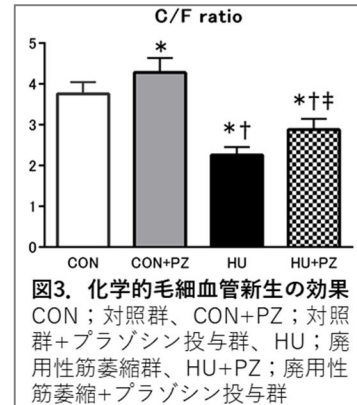


図3. 化学的毛細血管新生の効果  
CON；対照群、CON+PZ；対照群+プラゾシン投与群、HU；廃用性筋萎縮群、HU+PZ；廃用性筋萎縮+プラゾシン投与群

(2) 薬剤による酸素需要の増大を介さない毛細血管新生（プラゾシン投与）

インスリン抵抗性モデル（廃用性筋萎縮・高脂肪食摂取による肥満ラット）に対するプラゾシン投与は、非発芽性の血管新生を促すことで骨格筋毛細血管の退行性変化を抑制し、筋線維あたりの毛細血管比率（C/F ratio）を改善した（図3）。また、血管増加に伴い、有酸素性代謝酵素であるコハク酸脱水素酵素活性が向上し、骨格筋代謝能を改善することも確認した。さらに、プラゾシンによる介入は、筋収縮を促さずとも、筋細胞の萎縮を軽減することを明らかにした。

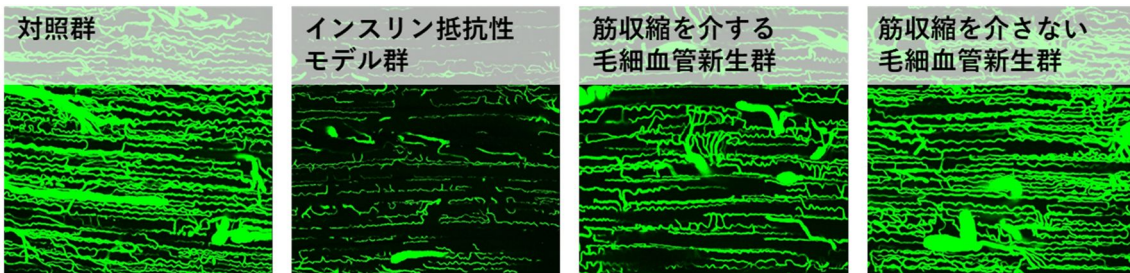


図4. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた3次元毛細血管の構造的解析結果

(3) 磁気刺激およびプラゾシン投与が微小血管構造に及ぼす退行抑制効果

磁気刺激（酸素需要を介する血管新生）およびプラゾシン投与（酸素需要を介さない血管新生）は、両インスリン抵抗性モデルにおける微小血管障害を軽減する効果が認められた（図4）。

(4) インスリン感受性に対する磁気刺激およびプラゾシン投与の効果

廃用性筋萎縮モデル・高脂肪食摂取による肥満ラットにおいて、筋萎縮および筋代謝障害を認めた。また、腹腔内インスリン投与前後における骨格筋のAktのリン酸化をウェスタンブロット法で検証した結果、インスリン刺激後のAktのリン酸化は対照群（CON）に比べて廃用性筋萎縮群（HU）において有意に低値を示し、HU群はインスリン感受性の低下を示した（図5）。一方で、血管増加を促すアプローチを行ったことで、インスリン感受性の改善効果が得られることが明らかとなった。

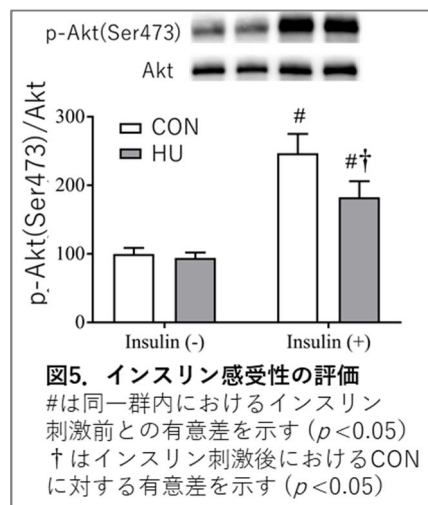


図5. インスリン感受性の評価  
#は同一群内におけるインスリン刺激前との有意差を示す ( $p < 0.05$ )  
†はインスリン刺激後におけるCONに対する有意差を示す ( $p < 0.05$ )

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 金指美帆	4. 巻 30
2. 論文標題 基礎的知見から病態に適した骨格筋電気刺激を再考する	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 物理療法科学	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanazashi Miho, Iida Tadayuki, Nakanishi Ryosuke, Tanaka Masayuki, Ikeda Hiromi, Takamiya Naomi, Maeshige Noriaki, Kondo Hiroyo, Nishigami Tomohiko, Harada Toshihide, Fujino Hidemi	4. 巻 15
2. 論文標題 Brazilian Propolis Intake Decreases Body Fat Mass and Oxidative Stress in Community-Dwelling Elderly Females: A Randomized Placebo-Controlled Trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 364 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15020364	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakanishi Ryosuke, Kanazashi Miho, Tanaka Masayuki, Tanaka Minoru, Fujino Hidemi	4. 巻 19
2. 論文標題 Impacts of Astaxanthin Supplementation on Walking Capacity by Reducing Oxidative Stress in Nursing Home Residents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Environmental Research and Public Health	6. 最初と最後の頁 13492 ~ 13492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph192013492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Masayuki, Kanazashi Miho, Kondo Hiroyo, Fujino Hidemi	4. 巻 65
2. 論文標題 Time course of capillary regression and an expression balance between vascular endothelial growth factor A and thrombospondin 1 in the soleus muscle of hindlimb unloaded rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Muscle & Nerve	6. 最初と最後の頁 350 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.27478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 TANAKA Masayuki、KANAZASHI Miho、KONDO Hiroyo、ISHIHARA Akihiko、FUJINO Hidemi	4. 巻 61
2. 論文標題 Licorice flavonoid oil supplementation promotes a reduction of visceral fat in exercised rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness	6. 最初と最後の頁 480 ~ 488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.23736/S0022-4707.20.11260-X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Hiromi、Iida Tadayuki、Hiramitsu Masanori、Inoue Takashi、Aoi Satomi、Kanazashi Miho、Ishizaki Fumiko、Harada Toshihide	4. 巻 2021
2. 論文標題 Effects of Lemon Beverage Containing Citric Acid with Calcium Supplementation on Bone Metabolism and Mineral Density in Postmenopausal Women: Double-Blind 11-Month Intervention Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nutrition and Metabolism	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/8824753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iida Tadayuki、Ito Yasuhiro、Kanazashi Miho、Murayama Susumu、Miyake Takashi、Yoshimaru Yuki、Tatsumi Asami、Ezoe Satoko	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of Psychological and Physical Stress on Oxidative Stress, Serotonin, and Fatigue in Young Females Induced by Objective Structured Clinical Examination: Pilot Study of u-8-OHdG, u-5HT, and s-HHV-6	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Tryptophan Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/11786469211048443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 TANAKA Masayuki、KANAZASHI Miho、MATSUMOTO Tomohiro、KONDO Hiroyo、ISHIHARA Akihiko、FUJINO Hidemi	4. 巻 42
2. 論文標題 Mild hyperbaric oxygen exposure attenuates rarefaction of capillary vessels in streptozotocin-induced diabetic soleus muscle in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanazashi Miho, Tanaka Masayuki, Maezawa Toshiyuki, Fujino Hidemi	4. 巻 122
2. 論文標題 Effects of reloading after chronic neuromuscular inactivity on the three-dimensional capillary architecture in rat soleus muscle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 151617 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.acthis.2020.151617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanazashi Miho, Tanaka Masayuki, Nakanishi Ryosuke, Maeshige Noriaki, Fujino Hidemi	4. 巻 69
2. 論文標題 Effects of astaxanthin supplementation and electrical stimulation on muscle atrophy and decreased oxidative capacity in soleus muscle during hindlimb unloading in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 757 ~ 767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-019-00692-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Masayuki, Kanazashi Miho, Maeshige Noriaki, Kondo Hiroyo, Ishihara Akihiko, Fujino Hidemi	4. 巻 69
2. 論文標題 Protective effects of Brazilian propolis supplementation on capillary regression in the soleus muscle of hindlimb-unloaded rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 223 ~ 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0639-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 25
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 物理療法科学	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 田中雅侑, 前重伯壮, 金指美帆, 中西亮介, 藤野英己	4. 巻 25
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 物理療法科学	6. 最初と最後の頁 42-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 金指美帆
2. 発表標題 基礎的知見から病態に適した骨格筋電気刺激を再考する
3. 学会等名 日本物理療法合同学会大会2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中雅侑, 金指美帆, 近藤浩代, 藤野英己
2. 発表標題 糖化ストレスはラット前脛骨筋におけるレジスタンス運動誘発性の筋タンパク質合成を減弱する
3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金指美帆
2. 発表標題 サルコペニア対策におけるフィットネスの意義
3. 学会等名 第 125回 理学療法科学学会・作業療法科学学会 学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金指美帆
2. 発表標題 骨格筋萎縮に対する抗酸化栄養素摂取を併用した理学療法戦略の検討
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中雅侑, 金指美帆, 近藤浩代, 藤野英己
2. 発表標題 終末糖化産物前駆体の摂取はレジスタンス運動による筋タンパク質合成を減弱させる
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会 (三重、Web開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金指美帆, 田中雅侑, 奥村将太, 佐竹弘吉, 津森登志子
2. 発表標題 後肢非荷重期間におけるプラゾシンの投与がラットヒラメ筋に与える影響
3. 学会等名 第75回体力医学会大会 (web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中雅侑, 金指美帆, 藤野英己
2. 発表標題 後肢非荷重期間がラットヒラメ筋における毛細血管と血管新生及び退行因子の発現動態に及ぼす経時的変化
3. 学会等名 第75回体力医学会大会 (web開催)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Miho Kanazashi, Masayuki Tanaka, Noriaki Maeshige and Hidemi Fujino.
2. 発表標題 Combinational effects of electrical stimulation and antioxidant astaxanthin supplementation on muscle atrophy and impaired oxidative capacity within unloaded skeletal muscle
3. 学会等名 World Confederation for Physical Therapy Congress 2019, (Geneva) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中雅侑, 金指美帆, 中西亮介, 近藤浩代, 藤野英己.
2. 発表標題 高血糖曝露に伴う骨格筋毛細血管退行に対する軽度高気圧高酸素療法による血管新生因子の発現
3. 学会等名 第74回体力医学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	田中 雅侑  (TANAKA Masayuki)  (10780497)	岡山医療専門職大学・健康科学部 理学療法学科・助教    (35315)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------