

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10882

研究課題名(和文) 運動が糖尿病性微小血管障害を改善するメカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of exercise training on endothelium dependent microvascular function in hindlimb of diabetic rats

研究代表者

曽野部 崇 (Sonobe, Takashi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：70548289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病では末梢血管の拡張機能が低下し、運動耐容能低下の一因となるという仮説を検証した。麻酔下の糖尿病モデルラット(ZFDM fa/fa)にX線血管造影と超音波血流測定を用いて、薬理的もしくは筋収縮刺激に対する下肢血管・血流応答を調べた。糖尿病ではpre-capillary動脈の機能が低下しており、筋収縮依存性の血流応答が抑制されていることが示唆された。このとき微小血管拡張に寄与するKCaチャネルは、血流応答に強く関与していた。低強度運動トレーニングは糖尿病で低下する血流応答を改善し、KCaチャネル由来の血管拡張作用を改善していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、血管イメージングによる“血管まるごと評価”と、超音波血流測定とを組み合わせることにより、糖尿病による下肢微小血管がどのような機能において障害されているのかを明らかにした。このとき、骨格筋収縮による血管と血流の応答は病態下において異なっており、さらには微小血管の拡張能に関与する内皮依存性過分極の寄与度も血管・血流の調節において異なっていたことから、多角的な評価法の重要性が示された。また運動トレーニングは、糖尿病で減弱する速い血流応答を改善している可能性があり、日常動作における疲労性の軽減に効果的であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that downregulation of endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) inhibits exercise-induced vasodilation in diabetic patients and causes exercise intolerance. To test this hypothesis, we evaluated peripheral vascular function and blood flow distribution in response to muscle contraction in anesthetized diabetic (ZFDM) rats using X-ray in vivo microangiography and transit-time ultrasonic blood flow measurement. In ZFDM rats, hindlimb vascular function was impaired in the pre-capillary level arterioles and muscle contraction-induced increase in blood flow was suppressed. KCa channels, which involves in EDH-dependent vasodilation contributed to the impaired blood flow response in diabetes. Low-intensity exercise training improved muscle contraction-induced blood flow response, therefore it was suggested that contribution of KCa channels to vascular function was upregulated by exercise training in diabetic condition.

研究分野：生理学，運動生理学，呼吸，循環

キーワード：運動 糖尿病 微小血管 血管造影 EDH ZFDMラット

## 1. 研究開始当初の背景

今日、糖尿病は日本国内の総患者数が 1000 万人を超えると推定される生活習慣病である [厚生労働省, 平成 28 年 国民健康・栄養調査]. 糖尿病の病態下では様々な合併症を併発するが, その中でも微小血管障害は早期の段階から発現し, 血管拡張機能が低下することで末梢循環不全が生じ, 骨格筋酸素需要の変化に対するレスポンスが低下するものと考えられる. その結果として運動耐用性の低下を引き起こし, 患者の Quality of Life (QOL) を著しく低下させる要因になるとともに, 生命予後にも悪影響を与える. 糖尿病(さらには循環器疾患, 口コミティブシンドロームなど)におけるリスク低減のため, 厚生労働省は日常生活における身体活動量の増加を目的とした「健康づくりのための身体活動基準 2013」を策定している. 従来, 糖尿病患者および糖尿病予備軍に対する運動療法は, 血糖値のコントロールとインスリン抵抗性の改善を主眼に置いたものであったが, 近年では様々な研究報告から, 糖尿病患者における心機能の改善や, 抗炎症・抗酸化作用の亢進などの, 生理学的な効果が示されてきている [Lew et al. Cardiovasc Diabetol. 2017]. 1 型糖尿病モデルマウスを用いた我々の先行研究においても, 運動トレーニングが下肢骨格筋の薬理的血管拡張応答を改善することを明らかにしてきた [Sonobe et al. Cardiovasc Diabetol. 2015]. しかしながら, 運動がどのようなメカニズムを介して下肢の血管拡張機能を改善したのかについての詳細は不明なままであった. 末梢血管の拡張機能に関しては, 太い導管動脈と, そこから分岐した細動脈, および微小(細小)動脈では, それぞれの血管内皮細胞に由来する拡張因子が異なることが知られている. 太い動脈では一酸化窒素(NO)やプロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)が主な拡張因子としての割合を占めているが, より末梢の細小動脈では内皮依存性過分極(EDH)の占める割合が高くなる. 糖尿病では, この細小動脈における EDH の寄与が低下することで微小血管障害を引き起こすと報告されており [Matsumoto et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003], それゆえに, 運動による下肢血管拡張応答の改善は, この細小動脈における EDH の機能改善に依存するのではないかと推察された.

## 2. 研究の目的

本研究では, 運動がどのように糖尿病病態下にある血管の拡張機能を改善するかを明らかにすることを目的とした. 具体的には内皮細胞依存性血管拡張因子である EDH に焦点を当て, X 線血管造影法を用いて, in vivo のラット下肢血管における各血管拡張因子の寄与について明らかにする. 本研究で用いる in vivo の X 線血管造影法は, 生体の組織内部に位置する血管について, 大血管から小血管までを連続的に, リアルタイムで, かつ機能的に評価することが可能な現状唯一の方法である [Shirai et al. Circ Res. 2013]. 当部に既存のラボ型 X 線装置(HITEX 社)を用いた血管造影では, ラット骨格筋の抵抗血管であるとされる約 100 μm 以下の細小血管についても画像解析が可能である. 多様な太さの血管における血管応答を同時に測定することで, どの部位で, どの因子が改善されているかを明らかにすることができると考えた.

## 3. 研究の方法

### (1) 糖尿病モデルラット下肢血管における血管拡張応答の評価

実験には 2 型糖尿病モデルラットである ZFDM(fa/fa)およびその対照ラット(fa/+)を用いた. 本研究で用いた ZFDM fa/fa ラット(22-24 週齢)は, fa/+ラットと比べて著明に高い non-fasting blood glucose (576 ± 30 vs 190 ± 18 mg/dl) と HbA1c(9.0 ± 0.5 vs 3.4 ± 0.1 %)を示していた. イソフルラン麻酔・呼吸管理下にて左大腿動脈に血管造影剤注入用カテーテルを留置し, ラボ型 X 線装置(HITEX 社)を用いて右下肢の血管造影を行った. 造影像の画像解析から描出された血管径の変化を測定した. この時, 右大腿動脈には超音波血流計のプローブを留置し, 同時に右下肢の血流量を測定した.

#### アセチルコリン誘発性血管拡張応答の評価

頸静脈に留置したカテーテルから内皮依存性血管拡張剤アセチルコリン(ACh, 10 μg/kg/min)を連続投与したのちに血管造影を行った.

#### 筋収縮誘発性血管拡張応答の評価

右坐骨神経に刺激電極を取り付け, 連続的な筋収縮負荷(40Hz tetanic contraction, 20 times)を負荷したのちに血管造影を行った.

#### 内皮依存性過分極(EDH)による血管拡張への寄与について

EDH に関与する KCa チャネルの阻害薬(apamin+charybdotoxin, 50 μg/kg)を静脈内投与し, 上記 および を行った.

### (2) 運動トレーニングが ZFDM ラット下肢血管拡張応答に与える影響

ZFDM ( fa/fa ) ラットに対し、12 週間のトレッドミルによる低強度運動トレーニング負荷 ( 週 5 日 , 30 分 / 日 ) を行った。トレーニング期間終了後 , 上記 ( 1 ) と同様の実験を行い , ZFDM ( fa/fa ) ラットの血管拡張応答に対する運動トレーニングの効果を検証した。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 糖尿病モデルラット下肢血管における血管拡張応答の評価

麻酔下ラット右下肢の代表的な血管造影画像を図 1 に示す。本実験手法では、下肢を走行する大小さまざまな血管を同時に描出することが可能であった。Digital subtracted angiography ( DSA ) により造影剤が流れた血管を強調し、DSA 画像から、大小血管径やシグナル強度を用いた angiographic index を画像解析的に算出し、以下の条件下における血管応答を評価した。

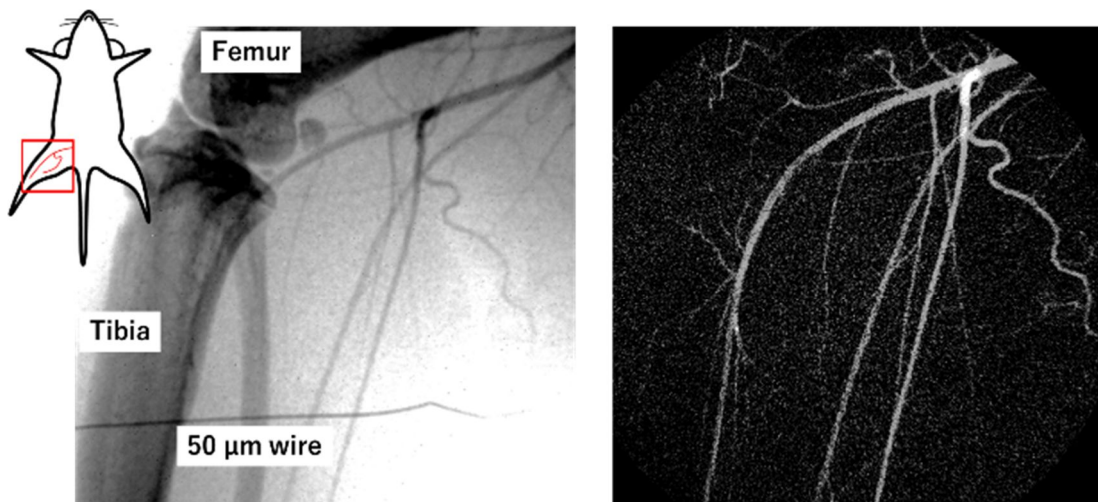


図 1 : オリジナルの下肢血管造影像 ( 左 ) と描出された血管を強調した DSA 画像 ( 右 )

##### アセチルコリン誘発性血管拡張応答

ZFDM fa/+ラットおよび fa/fa ラットにおいて、ACh の全身投与は計測したほぼすべてのサイズの血管 ( 内径約 50-150 μm ) において血管径の拡張を誘発した。血管径の変化率はサイズの小さな血管であるほど大きく、かつ fa/fa ラットでは応答が小さい傾向にあった。また angiographic index は、fa/+ラットでは ACh によって 1.5 倍程度に増加するものの、fa/fa では応答が低下していた。

##### 筋収縮誘発性血管拡張応答の評価

電気刺激により誘発したリズム的な下肢骨格筋収縮は血管径の拡張を引き起こしたが、薬理的に誘発した血管拡張とは異なり、骨格筋の外側を走行する血管 ( saphenous artery など ) については血管径の減少が観察された。また fa/+ と fa/fa の血管径の変化は同程度であった。一方で、angiographic index は fa/fa において低い傾向を示していた ( 図 2 ) 。

##### EDH による血管拡張への寄与について

KCa チャネル阻害剤の全身投与後には、fa/+、fa/fa の両群においても軽度な血管径の減少・angiographic index の減少が観察された。阻害条件下においては、ACh の血管拡張作用は減弱していたが、筋収縮刺激による血管拡張作用は影響を受けなかった。このとき、fa/+ と fa/fa の有意な違いは観察されなかった。

##### ( 2 ) 運動トレーニングが ZFDM ラット下肢血管拡張応答に与える影響

12 週間の低強度運動トレーニング期間後、運動群の fa/fa ラット ( fa/fa-Ex ) では、ACh・筋収縮刺激に対する血管拡張応答が非運動群の fa/fa ラットに比べて高い傾向にあった。特に、angiographic index が高い値を示したことから、本実験で観察可能であった約 30-50 μm の細動脈よりもさらに細い pre-capillary レベルの血管における灌流量が増加していたことが考えられた。

KCa チャネル阻害条件下では、ACh 投与に対する応答が fa/fa-Ex 群において fa/fa に比べて高い値を示した。これは、fa/fa-Ex 群においては ACh によって刺激される NO もしくは PG12 依存性の血管拡張作用が増強されていた可能性を示唆している。筋収縮によって誘発される血管拡張には、両群において顕著な差は観察されなかった。筋収縮によって刺激される血管拡張には KCa チャネルを介した EDH などの内皮依存性物質のみならず、代謝性因子など様々な要因が関与していることから、今回観察した筋収縮後の細動脈における最大血管拡張レベルには EDH の寄

与は小さいことが示唆された。

その一方で，筋収縮刺激に対する大腿動脈血流の変化は fa/fa-Ex 群において fa/fa と比べて高い応答性を示し，さらには KCa チャンネル阻害条件下では血流増加の時定数，最大血流量が有意に低下することがわかった（図3）。

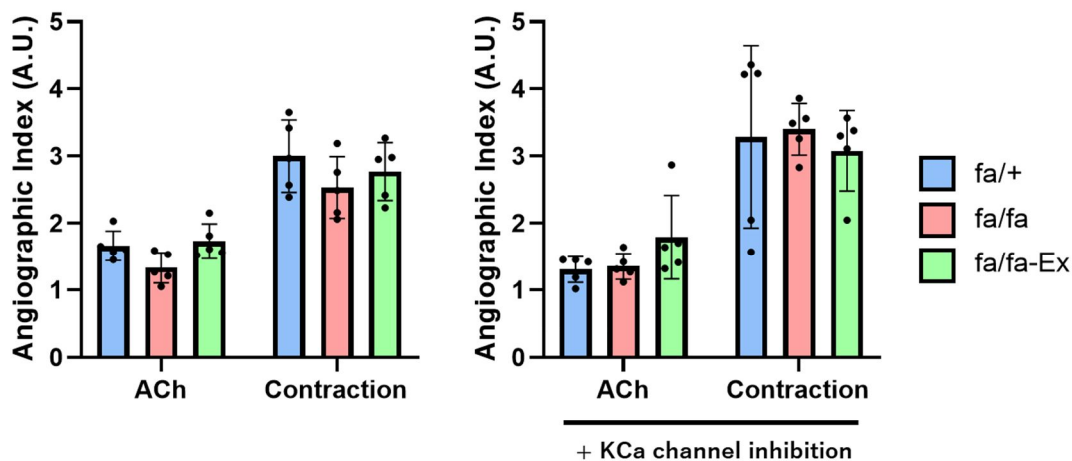


図2：血管画像解析によるAngiographic index. 右はKCaチャンネル阻害条件下。

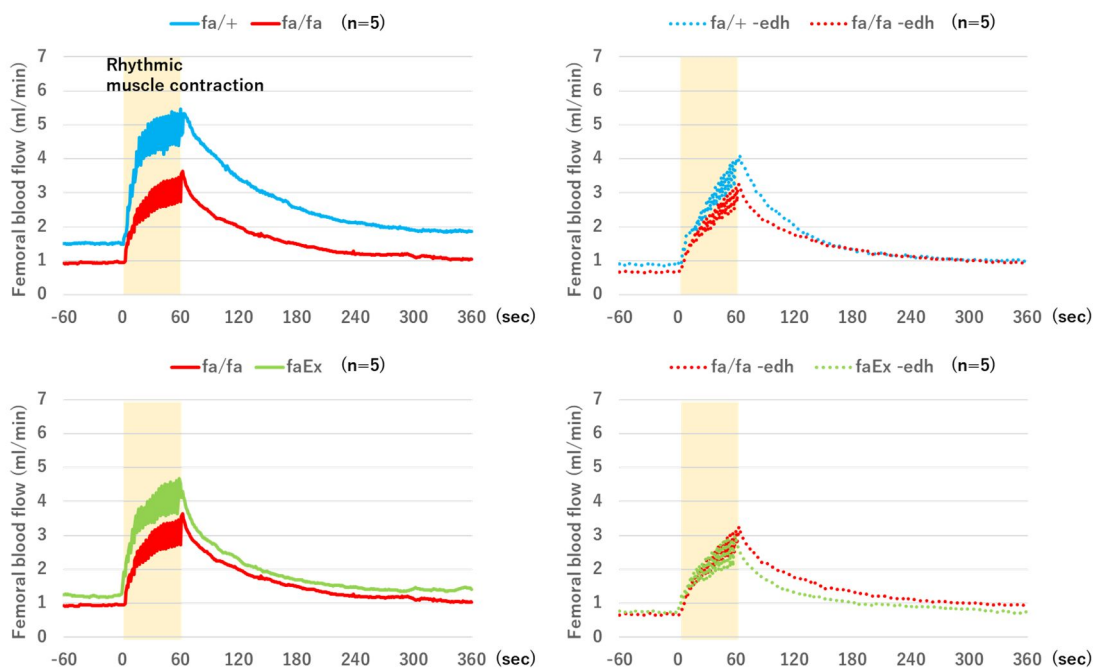


図3：リズム的な筋収縮刺激に対する下肢血流応答. 右はKCaチャンネル阻害条件下。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 曾野部 崇, 土持 裕胤, Pearson James.
2. 発表標題 糖尿病モデルラットにおける運動誘発性血管拡張応答に対する内皮依存性過分極の寄与
3. 学会等名 第74回 日本体力医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sonobe T, Tsuchimochi H, Pearson JT.
2. 発表標題 Evaluation of Hindlimb Arteriolar Vasodilation Evoked by Dynamic Muscle Contraction in Goto-Kakizaki Rats Using in vivo X-ray Microangiography
3. 学会等名 Experimental Biology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

糖尿病病態下での運動時血流再分配を調節する因子について <a href="http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/cardiac_physiology/09-theme02.html">http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/cardiac_physiology/09-theme02.html</a>
--

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	土持 裕胤 (Tsuchimochi Hirotsugu) (60379948)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	

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
---------	---------