

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19300196

研究課題名（和文）

糖尿病性筋萎縮・後肢虚血に対する治療的運動プレコンディショニング法の開発

研究課題名（英文）

Research and development of a therapeutic exercise preconditioning for muscle atrophy and circulatory failure with non-insulin-dependent diabetes mellitus

研究代表者

武田 功 (Isao Takeda) 姫路獨協大学・医療保健学部・教授

研究者番号：00163402

研究成果の概要（和文）：本研究では、II 型糖尿病モデル動物に対して、低強度（有酸素）と高強度（無酸素）の二種類の予防的運動プレコンディショニングを行った。その結果、血糖値、HbA1c 及び活性酸素代謝物は低値を示した。しかし、正常動物と比較すると、何れも高値を示した。骨格筋内の毛細血管は、糖尿病発症により毛細血管が退行し、極度の虚血状態になっていた。一方、運動を行うことにより毛細血管径、毛細血管容量の維持が観察され、三次元構造が温存されていることが明確となった。また、血管内皮細胞増殖因子系やアンジオポイチン系の血管新生因子が上昇していることが観察された。これらの結果より予防的運動プレコンディショニングは、血糖コントロールに対しては、ある程度の効果は見られるが、十分に正常域まで低下させることは困難である。一方、毛細血管構造の崩壊など糖尿病における二次的合併症に対して、予防的な効果は十分得られることが検証できた。

研究成果の概要（英文）：Exercise training has long been utilized as one of therapy in the non-insulin-dependent diabetes mellitus. The effects of a therapeutic exercise preconditioning on the myocyte and the microcirculation of skeletal muscle in diabetic rats was investigated. The preconditioning consisted of exercise at either low- (aerobic) or Hi- (anaerobic) intensity and included five 60 or 30 min sessions per week for 3 weeks, respectively. Both treated diabetic rats exhibited a decrease in plasma glucose, glycohemoglobin, and reactive oxygen species (ROS) compared with those of the diabetic rats but did not completely normalize levels. The capillary volume in diabetic muscle was significantly less, i.e., capillary regression. In three exercise-trained diabetic muscles, the capillary volumes were increased toward control levels and completely normalize levels. In summary, the results of the present study provide evidence for the effectiveness of exercise training in reducing some of the muscle circulatory complications associated with diabetes mellitus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
20年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
21年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：リハビリテーション科学

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション，運動療法，糖尿病，微小循環，プレコンディショニング

1. 研究開始当初の背景

II 型糖尿病にみられる筋線維萎縮と毛細血管三次元ネットワーク構造の退行性変化を来す血管増殖系因子の低下が密接に関連し，血管—血管結合の副側循環路の形成不全にかかわるとする仮説を検証するためにこの研究を企画した。II 型糖尿病の発生の原因とされるインスリン抵抗性は長い時間経過を経て，臓器に種々の障害をもたらしていく。肥満は現代の不活動がもたらす内臓脂肪症候群がその根底にあるとされている (Matsuzawa, 2004)。また，高血糖は活性酸素種を発生し，血管内皮細胞に障害を与え，微小血管系障害を惹起する。我々は II 型糖尿病モデル動物である内臓肥満型の OLETF ラットを用いて後脚筋に見られる筋線維の変化と毛細血管三次元ネットワーク構造を造影剤灌流した鋳型筋標本において共焦点レーザー顕微鏡により 100 マイクロメートルの深さまで可視化することに成功している (Fujino, 2005)。心筋および骨格筋では血管新生の抑制はインスリン抵抗性の後期に見られ (Jesmin, 2002)，心臓では VEGF の発現が低下しているとされている (Chou, 2002)。インスリン抵抗性を示す II 型糖尿病ラットの OLETF において比較的早期には VEGF をはじめ血管新生系の因子が増大し毛細血管ネットワークのうち縦走毛細血管の結ぶ側路 (吻合路) の数が増大していることを観察している。しかし，インスリン抵抗性が進行するに従い PI3-kinase の減弱を介する VEGF の新生の抑制および AMP-activated protein kinase (AMPK) 不活性化による VEGF の新生の抑制が起こると考えられる (Ouchi, 2005)。この時期の毛細血管三次元構造による血管ネットワークを明らかにするとともに微小循環赤血球速度と血管新生と退行への関与が明確になる。文献的には筋萎縮のシグナル系と血管新生系のシグナル系の接点はインスリンまたはインスリンシグナル系そのものにあると考えることもできる。

2. 研究の目的

自然発症 II 型糖尿病モデル動物に対して，骨格筋の形態観察や毛細血管の三次元構造解析をおこない，糖尿病性筋萎縮を検証すると共に，治療的運動プレコンディショニング (有酸素運動，無酸素運動) による効果を検証した。本研究では，1 点目として筋線維萎縮

と血管増殖因子の低下を密接に関連づける新規の因子を想定し，その存在を証明するか，または既知の血管増殖系と筋萎縮シグナル系の関連をリアルタイム PCR 用いて遺伝子発現を測定し検討する。2 点目は共焦点レーザー法により 3 次元毛細血管ネットワークを観察し，毛細血管領域の可視化を行い，側副循環路の形成・退行過程を明らかにしていく。3 点目は運動によるプレコンディショニングを行い骨格筋の循環障害や毛細血管の退行を予防し，糖尿病の合併症である末梢部の循環障害を予防することが出来るかどうかについて検証する。さらに運動の種類が骨格筋の末梢の毛細血管構築に影響するかどうかについて検証を行った。

3. 研究の方法

本研究では，II 型糖尿病モデル動物を用いる検証を行った。本研究で使用したモデル動物は，自然発症 II 型糖尿病モデルラットである GK (Goto-Kakizaki) ラット (非肥満タイプ)，SDT (Spontaneously Diabetic Torii fatty) ラット (非肥満タイプ)，OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラット (肥満タイプ) を用いた。ここでは，特に日本人に多い非肥満タイプの GK，SDT ラットで行った実験について報告する。

糖尿病モデル動物に対して治療的運動プレコンディショニングを行った。運動の種類は (1) 有酸素的持久的運動 (Ex; 速度 15m/min, 角度 0°, 60 分間, 5 回/wk) 及び (2) 無酸素的レジスタンス運動 (resEx; 速度 20m/min, 角度 20°, 30 分間, 5 回/wk) をトレッドミル上で行った。この運動を行った直後の血中乳酸値は Ex が平均 1.96 mmol/L, resEx が平均 8.66 mmol/L であった。運動期間は 3 週間として，Ex の一部は (3) 最終測定時の 1 週間前に運動を終了した (preEx)。

1) 採血した全血からグリコヘモグロビン (HbA1c, %) を測定し，遠心分離した血漿より，酸化ストレス度 (dROM, U.CARR)，血糖 (mg/dL) インスリン濃度 (ng/mL) を分析した。

2) 共焦点レーザー顕微鏡を使用して，骨格筋内の毛細血管三次元構造を解析した。1µm 毎に筋標本をスキャンして，100µm をスタックして，三次元像を構築した。

3) 毛細血管の変化を惹起するシグナル伝達

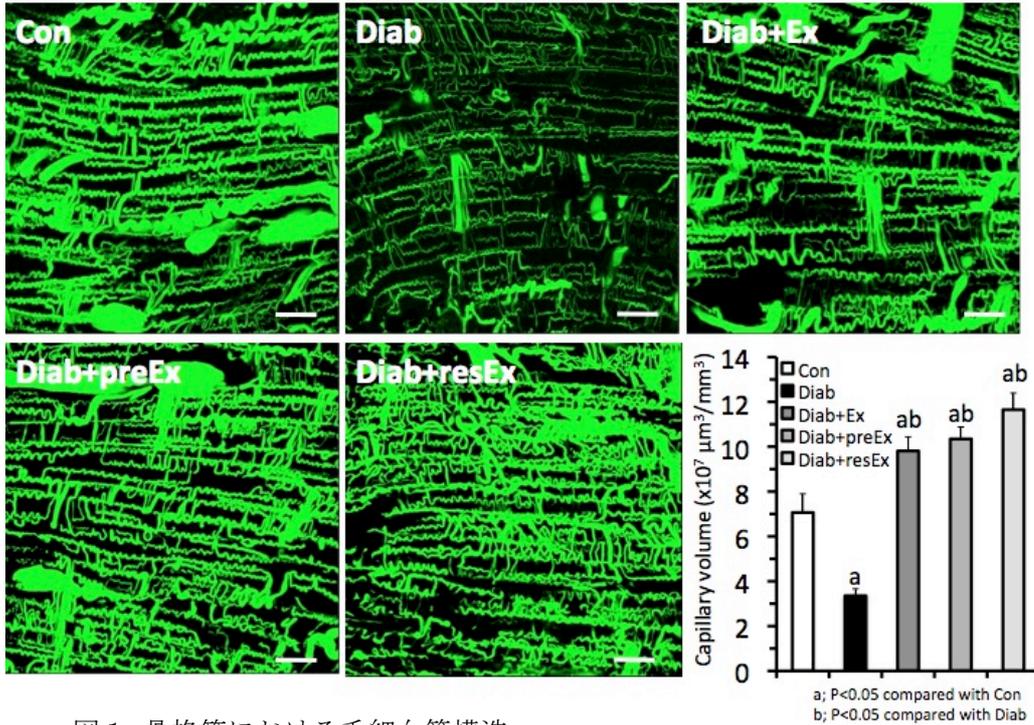


図1 骨格筋における毛細血管構造

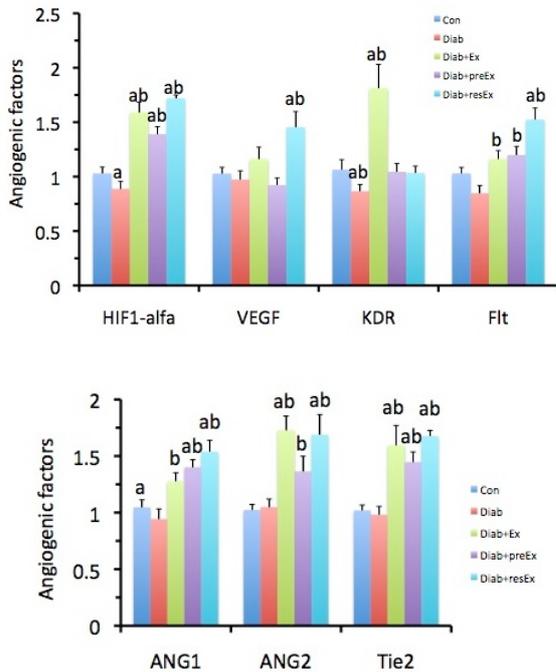


図2 血管増殖因子の発現

系について、血管内皮増殖因子(VEGF)とその受容体 kinase insert domain-containing receptor (KDR), fms-like tyrosine kinase (Flt-1), angiopoietin-1, angiopoietin-2, その受容体 angiopoietin-1 and -2 receptor (Tie-2) の発現を測定した。また、血管新生抑制因子である Thrombospondin-1 (TSP1) の測定も

行った。

4) 骨格筋の代謝と関係のある AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK; AMP-activated protein kinase, 糖輸送体 (GLUT4; Glucose transporter type 4), 脱共役蛋白質 3 (UCP3; uncoupling protein 3) を測定した。さらに骨格筋細胞内の酸素の需給供給や筋細胞と毛細血管のクロストークを調べるために低酸素誘導物質 (HIF-1alpha; Hypoxia-inducible factor) を測定した。

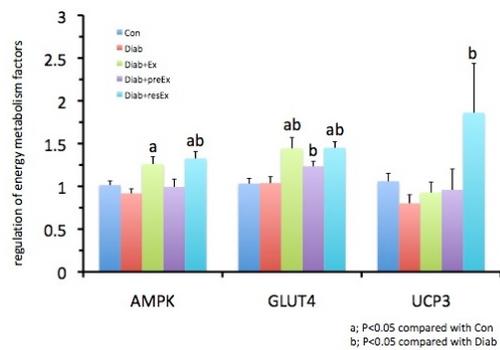


図3 代謝系因子の発現

4. 研究成果

糖尿病における骨格筋の毛細血管三次元構造解析では、毛細血管構造が乱れると共に、毛細血管径の縮小、蛇行性の減少などが観察され、毛細血管容積は減少した(図1 Diab)。また、通常、骨格筋線維に縦走する毛細血管や毛細血管同士を結合する吻合毛細血管が、

不規則な走行になることが観察された (図 1 Diab). 一方, 治療的運動プレコンディショニング (Ex, preEx, resEX) を行った骨格筋では, 骨格筋退行等の変化が抑制され, 毛細血管容量が保持されていた (図 1 Diab+Ex, Diab+preEx, Diab+resEx).

糖尿病では, 血管新生因子である VEGF 系, angiopoietin-Tie2 系は共に低下し, 血管抑制因子である TSP1 は増加を示した. また, 廃用性萎縮筋でも同様のことが観察された. 一方, 予防的な運動プレコンディショニングを行った場合に糖尿病ラットでは, 血糖, HbA1c は運動をしなかった群と比較して, 低値を示した. また, 酸化ストレスの指標である血漿中の活性酸素代謝物 (d-ROMs) も低下した. しかし, 正常ラットと比較すると, 何れも高値を示した. インスリンについては, 有意な変化が観察されなかった. 本研究では, 運動を低強度 (有酸素運動) と高強度 (無酸素運動) の二種類運動を行ったが, 何れの運動も同様の結果が得られた. 一方, 骨格筋内の毛細血管に関しては, 運動を行うことにより毛細血管径, 容量の維持が観察され, 三次元構造が温存されていることが明確となった. これらの結果より予防的な運動プレコンディショニングは, 血糖などに対しては, ある程度の効果は見られるが, 十分に正常域まで低下させることは困難である. しかし, 毛細血管構造の崩壊など糖尿病における二次的合併症に対して, 予防的な効果は十分得られることが検証できた.

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 40 件)

1. Effects of exposure to hyperbaric oxygen on oxidative stress in rats with type II collagen-induced arthritis. Nagatomo F, Gu N, Fujino H, Takeda I, Ishihara A. Clin Exp Med. 10:7-13, 2010.

2. Comparison of capillary architecture between slow and fast muscles in rats using a cofocal laser scanning microscope. Murakami S, Fujino H, Takeda I, Momota R, Kumagishi K, Ohtsuka A. Acta Medica Okayama 64(1):11-18, 2010.

3. Hyperbaric oxygen exposure improves blood glucose level and muscle oxidative capacity in rats with type 2 diabetes. Gu N, Nagatomo F, Fujino H, Takeda I, Tsuda K, Ishihara A. Diabetes Technology and Therapeutics 12(2):125-133, 2010.

4. Hyperbaric oxygenation restores age-related

decline in oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in mice. Nishizaka T, Nagatomo F, Fujino H, Nomura T, Sano T, Higuchi K, Takeda I, Ishihara A. Enzyme Research. in press. .

5. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, Wang F, Baba T, Tayra JT, Morimoto T, Jing M, Kikuchi Y, Kuramoto S, Agari T, Miyoshi Y, Fujino H, Obata F, Takeda I, Furuta T, Date I. Brain Res. 1310C:200-207, 2010.

6. Effects of hyperbaric oxygenation on blood pressure levels of spontaneously hypertensive rats. Nagatomo F, Gu N, Fujino H, Takeda I, Ishihara A. Clin Exp Hypertens. in press.

7. Protective effects of exercise preconditioning on hindlimb unloading-induced atrophy of rat soleus muscle. Fujino H, Ishihara A, Murakami S, Yasuhara T, Kondo H, Mohri S, Takeda I, Roy RR. Acta Physiol (Oxf) 197(1): 65-74. 2009.

8. Thermal preconditioning prevents fiber type transformation of the unloading induced-atrophied muscle in rats. Takeda I, Fujino H, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Ishihara A. J Muscle Res Cell Motil 30 (3-4):145-152. 2009.

9. Skeletal muscle characteristics of rats with obesity, diabetes, hypertension, and hyperlipidemia. Nagatomo F, Gu N, Fujino H, Takeda I, Tsuda M Ishihara A. J Atheroscler Thromb 16: 576-585, 2009.

11. Gene expression levels of heat shock proteins in the soleus and plantaris muscles of rats after hindlimb suspension or spaceflight. Ishihara A, Fujino H, Nagatomo F, Takeda I, Ohira Y. J Physiol Sci 58(6):413-417, 2008.

11. Lack of exercise, via hindlimb suspension, impedes endogenous neurogenesis. Yasuhara T, Hara K, Maki M, Matsukawa N, Fujino H, Date I, Borlongan CV. Neuroscience. 149, 182-191. 2007.

[学会発表] (計 49 件)

1. Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A, Roy RR. Capillary hemodynamics and expression of angiogenic regulators in metabolically different rat muscles. 57th American college of sports medicine, Baltimore, 2010.06.1-5.

2. Kondo H, Fujino H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A. Exercise Preconditioning Attenuates Oxidative Stress and Hyperglycemia in Spontaneously Diabetic Torii rat. 57th American college of sports medicine, Baltimore, 2010.06.1-5.
3. 藤野英己, 村上慎一郎, 近藤浩代, 武田功. II型糖尿病に対するプレコンディショニング運動が酸化ストレスに及ぼす予防効果. 第45回日本理学療法学会大会, 岐阜, 2010.5/27-29.
4. 村上慎一郎, 藤野英己, 近藤浩代, 小幡太志, 弓影秀樹, 高見博文, 松永秀俊, 武田功. 非インスリン依存型糖尿病モデルラットのヒラメ筋ミオシン重鎖アイソフォームのタイプ移行と酸化的リン酸化活性の変化. 第45回日本理学療法学会大会, 岐阜, 2010.5/27-29.
5. 永友文子, 顧寧, 藤野英己, 武田功, 津田謹輔, 石原昭彦. 高脂肪食および自発走運動がメタボリックシンドロームラットの骨格筋における遺伝子発現と筋線維の代謝特性に与える影響. 第53回糖尿病学会, 岡山, 2010.05/27-5/29.
6. Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A, Roy RR. Fiber capillary regression and endothelial apoptosis against disuse atrophy in rat soleus muscle: role of angiogenic regulators. *Experimental Biology* 2010, Anaheim, 2010.04.24-28.
7. Murakami S, Fujino H, Kondo H, Takeda I, Momota R, Kumagishi K, Ohtsuka A. Abnormality of capillarity and oxidative enzyme activity in slow muscle of type 2 diabetic rats. *Experimental Biology* 2010, Anaheim, 2010.04.24-28.
8. Kondo H, Fujino H, Murakami S, Takeda I, Ishihara A. Interaction of the effects between estrogen receptor-alpha polymorphism and physical activity or nutrient on bone mass in Japanese young women. *Experimental Biology* 2010, Anaheim, 2010.04.24-28.
9. 村上慎一郎, 藤野英己, 近藤浩代, 武田功, 百田龍輔, 熊岸加苗, 大塚愛二. 非インスリン依存型糖尿病モデルラットのヒラメ筋の毛細血管構築、ミオシン重鎖アイソフォーム、及び酸化的リン酸化活性の変化. 第115回解剖学会総会, 岩手, 2010.3/28-30.
10. Nagatomo F, Gu N, Fujino H, Tsuda K, Ishihara A. Skeletal muscle characteristics of rats with type 2 diabetes. 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, 2010.3/26-30.
11. Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Takeda I, Ishihara A. Responses of pro- and anti-angiogenic factors to capillary in rat soleus muscle after hindlimb unloading. 49th The American Society for Cell Biology, San Diego, 2009. 12.
12. Kondo H, Fujino H. Statins differentiate adult rat bone marrow stromal cells into neurons. 49th The American Society for Cell Biology, San Diego, 2009. 12.
13. Zhong H, Fujino H, Tillakaratne N.JK, Lavrov I, Edgerton VR, Roy RR. c-fos expression in spinal neurons in response to different hindlimb loading during treadmill locomotion in adult rats. Society of Neuroscience meeting, Chicago, 2009.10.
14. 村上慎一郎, 藤野英己, 武田功, 百田龍輔, 熊岸加苗, 近藤浩代, 大塚愛二. 共焦点レーザー顕微鏡を用いたラットの遅筋と速筋の毛細血管構築の比較. 日本解剖学会 64 回中国・四国支部学術集会, 高知, 2009.10.
15. 熊岸加苗, 村上慎一郎, 藤野英己, 武田功, 百田龍輔, 近藤浩代, 大塚愛二. II 型糖尿病ラット (GOTO-KAKIZAKI ラット) のヒラメ筋の筋線維タイプの変化. 日本解剖学会 64 回中国・四国支部学術集会, 高知, 2009.10.
16. 藤野英己, 村上慎一郎, 近藤浩代, 永友文子, 武田功, 石原昭彦. 廃用性筋萎縮による遅筋型ミオシン重鎖の減少に対するプレコンディショニング温熱負荷の予防効果. 第17回日本物理療法学会, 神戸, 2009. 10.
17. 藤野英己, 永友文子, 近藤浩代, 村上慎一郎, 武田功, 石原昭彦. 萎縮筋での毛細血管網退行と血管新生抑制因子の発現. 第64回日本体力医学会, 新潟, 2009. 09. (学会賞受賞)
18. 近藤浩代, 藤野英己, 山下剛範, 武田功, 石原昭彦. 閉経後女性の身体特性とエストロゲンレセプター α 遺伝子多型の踵骨と大腿骨骨指標の比較. 第64回日本体力医学会, 新潟, 2009. 09.
19. 永友文子, 藤野英己, 森彩子, 松本垂希子, 武田功, 石原昭彦. 高気圧・高濃度酸素への曝露による関節炎ラットの酸化ストレス抑制効果. 第64回日本体力医学会, 新潟, 2009. 09.
20. Fujino H, Zhong H, Tillakaratne N.JK, Ishihara A, Edgerton VR, Roy RR: Activation of spinal neurons during treadmill stepping:

incline effect. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, Kyoto, 2009. 07.

21. 永友文子, 顧 寧, 藤野英己, 武田功, 津田謹輔, 石原昭彦. 糖尿病モデルラットにおける骨格筋の組織化学的特性と遺伝子発現. 第 52 回日本糖尿病学会, 大阪, 2009. 05.

22. Fujino H, Ishihara A, Murakami S, Kondo H, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR: Implications of angiogenic factors and thrombospondin-1 underlying capillary regression in chronically unloaded rat soleus muscle. American college of sports medicine, Seattle, 2009. 05.

23. Kondo H, Fujino H, Funahashi T, Suzuki K: Estrogen receptor-alpha genotype affects exercise and nutrient intake-related change of bone mass. American college of sports medicine, Seattle, 2009.05.

24. Fujino H, Takeda I, Matsumoto A, Ishihara A. Effects of Exercise Preconditioning on the Microvasculature of Atrophied Muscle. 55th American College of Sports Medicine Annual meeting, Indianapolis, 2008.05.

25. Fujino H, Ishihara A, Murakami S, Kondo H, Takeda I, Tillakatatne NJ, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR. Microvascular remodeling and decreased angiogenic factors in the atrophied rat soleus muscle. The Integrative Biology of Exercise V, Hilton Head, 2008.10.

26. Matsumoto A, Mori A, Nagatomo F, Fujino H, Ishihara A. Effects of voluntary running exercise under low-or high- oxygen conditions on the soleus muscle in rats. XXX International Federation of Sports Medicine, Barcelona, 2008.11.

27. Zhong H, Fujino H, Roy RR, Tillakatatne NJ, Lavrov I Edgerton VR. The effects of loading on spinal neuron c-fos expression in intact adult rats. Neuroscience 2008, Washington DC, 2008.12.

28. Fujino H, Kohzuki H, Takeda I, Kajiya F. Exercise preconditioning attenuates capillary regression in atrophied soleus muscle. World Physical Therapy 2007, Vancouver, 2007. 06.

[図書] (計 1 件)

からだと酸素の辞典 (田村守 編), 朝倉書店 (東京), 藤野英己・他 116 名, p245-p247, p417-p419, 2009.

[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

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~fujitan/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 功 (TAKEDA ISAO)

姫路獨協大学・医療保健学部・教授

研究者番号: 00163402

(2) 研究分担者

石原 昭彦 (ISHIHARA AKIHIKO)

京都大学大学院・人間環境学研究所・教授

研究者番号: 90184548

梶谷 文彦 (KAJIYA FUMIHIKO)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号: 70029114

菅原 基晃 (SUGAWARA MOTOAKI)

姫路獨協大学・医療保健学部・教授

研究者番号: 60010914

村上慎一郎 (MURAKAMI SHINICHIRO)

姫路獨協大学・医療保健学部・教授

研究者番号: 30454763

藤野 英己 (FUJINO HIDEMI)

神戸大学大学院・保健学研究科・教授

研究者番号: 20278998

最後に本研究は故上月久治教授が代表となり, 企画された研究である. しかし, 研究を開始して間もないときに急性心筋梗塞のためご急逝された. 故人の遺志を引き継いだ研究分担者によって最後まで研究を継続し, 成果をあげることが出来た. ここに謹んで, ご冥福をお祈り申し上げたい.