

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2011

課題番号：20500628

研究課題名（和文）酸化ストレスから見た糖尿病性筋萎縮のメカニズムとその抑制に関する研究
 研究課題名（英文）Effects of antioxidant on muscular atrophy accompanied by type II diabetes

研究代表者

大森 大二郎 (OHMORI DAIJIRO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：00124967

研究成果の概要（和文）：① 2 型糖尿病発症初期：インスリン抵抗性発症をしたモデルラット（OLETF、25 週齢）では、骨格筋の委縮が起こり、この時、骨格筋における Akt のリン酸化が低下した。この筋萎縮は抗酸化物質投与により抑制され、Akt のリン酸化は維持されていた。その後、52 週齢では抗酸化物質投与群でも筋萎縮が進行し Akt のリン酸化が低下した。② 2 型糖尿病後期：98 週齢では糖尿病発症群の体重はコントロール群に対して有意に減少していたが、抗酸化物質投与群では体重減少は認められなかった。また、抗酸化物質投与群では、糖負荷試験で血中インスリン濃度が維持されていた。

研究成果の概要（英文）：There was no significant difference in body weight and food intake between D group and A group till 52 weeks. GTT at 25 weeks showed that blood glucose at fasting and 30 minutes in D group were significantly increased and insulin level at 30 and 60 minutes were also significantly increased, but not in A group. Hindlimb muscles in D group at 25 weeks showed significant decrease of muscle weight and reduction of Akt phosphorylation, but not those in A group. The body weight of D group decreased at 98 weeks, but that of A group was maintained. GTT at 98 weeks showed that the insulin level in A group was maintained, but not in D group.

From these results, Asx supplementation of before onset of type 2 diabetes transiently improves insulin resistance and attenuates atrophy, and that maintains Akt phosphorylation in muscles. Long term Asx supplementation conserved insulin secretory function for OLEF rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	1000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：応用健康科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：生活習慣病、抗酸化食品、アスタキサンチン、インスリン抵抗性、筋萎縮、Akt

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の90%以上を占める2型糖尿病は遺伝的素因と過食、肥満などの環境因子

が発症の原因となり、組織のインスリンへの感受性が低下するインスリン抵抗性を経て、

膵β細胞の機能低下によるインスリンの分泌低下が加わり、高血糖を来している。

糖尿病は、様々な合併症を引き起こすことが知られているが、その一つに骨格筋量の低下、すなわち筋萎縮があげられる。骨格筋は、インスリンの働きを介して、あるいは運動によって直接的に血糖を調整する重要な組織であるために、その萎縮は糖尿病患者にとって運動機能の低下のみならず、血糖調整能を低下させる点から非常に深刻な問題である。

一般に、骨格筋の萎縮には筋タンパク合成の低下と分解の昂進が関与するが、最近、糖尿病においては、酸化ストレスがインスリン抵抗性と共に筋タンパク合成の低下と分解に強く関わる可能性が示唆されている。以上の観点から、我々は抗酸化物質投与がインスリン抵抗性を改善して糖尿病発症を遅延すると共に骨格筋の萎縮を軽減することを、2型糖尿病モデルラットを用いて明らかにしてきた。また、抗酸化物質投与が、細胞増殖、アポトーシス、糖尿病などに関与する重要なシグナル伝達酵素であるAktの活性化を維持することが明らかになった。そこで、それらの詳細なメカニズムについて、特に糖尿病に伴う筋萎縮を筋タンパク合成の低下と分解に関わる細胞内シグナル伝達の観点から明らかにする研究を計画した。また、酸化ストレスとの関わりから、糖尿病に伴う筋萎縮へのカウンターメジャーとして抗酸化物質および運動の効果を検証する研究を計画した。

2. 研究の目的

アスタキサンチンは赤色カロテノイドの一種で、共役二重結合ポリエン鎖の両端のイオノン環に水酸基およびケト基の両基を持つカロテノイドである。この構造により、一重項酸素消去作用とともにポリエン鎖によるフリーラジカル捕捉作用を示し、その抗酸化力はβ-カロテン、カンタキサンチンなど他のカロテノイドより大きく、ビタミンEの500倍強と報告されている。アスタキサンチンはその高い抗酸化能とともに、自然界ではエステル体またはタンパク質と結合して安定に存在し、摂取後加水分解により活性の高いフリー体に変換することから、生体中での有力な抗酸化物質として期待できる。このことから、抗酸化物質としてアスタキサンチンを採用し、2型糖尿病モデルラットとしてOLETFを用いて研究を行うこととした。

大塚製薬(株)徳島研究所で開発された2型糖尿病モデルラット、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)は15週齢から肥満を呈し、24週齢で雄の約90%が糖尿病を発症し、内脂肪型の肥満を伴うインスリン非依存型糖尿病モデルであり、現在社会問題となっているメタボリックシンドロームの良いモデルとなる。また、OLETFは60週齢を過ぎる

頃から、膵臓内のβ細胞が萎縮してインスリン分泌能力が低下する1型糖尿病の症状が現れ、より重篤な症状へ進行する。そこで、本研究では糖代謝のターゲット臓器として骨格筋に注目し、2型糖尿病発症予防および糖尿病後期における合併症の軽減を達成目標とした。

3. 研究の方法

糖尿病モデルラット(OLETF)を用いて、抗酸化物質としてアスタキサンチンを投与し、糖尿病発症に伴うインスリン抵抗性、筋萎縮に対する抗酸化物質摂取の効果について検討する実験を次のようなプロトコルで行った。対照群としてOLETFのコントロールラットであるLETOを用いた。

[実験開始:] 2週間の馴化の後、6週齢から実験を開始する。開始時点でLETOラットとOLETFラットの一部(約8匹)の臓器を採取して実験開始前コントロールサンプルとする。

[糖負荷試験:] LETO群(C群)、OLETF-抗酸化物質非投与対照群(D群)、OLETF-アスタキサンチン投与群(A群)の3群について6週齢、12週齢、24週齢、41週齢で糖負荷試験を実施する。同時に採血を行い血中インスリン濃度の測定を行い、インスリン抵抗性の評価を行った。

[採尿:] 採尿は糖負荷試験を実施する前日に行い、尿タンパクを測定し腎機能障害についての知見を得た。

[臓器採取:] 糖負荷試験でC群-D群で差が出た24週齢および52週齢で各群ラットの内の一部(各6匹)の臓器を採取した。

[筋萎縮:] 採取した骨格筋の筋重量を計量し、筋萎縮の有無を検証した。

[分析:] 採取した筋肉を用いて、シグナル伝達系酵素AktおよびmTORのリン酸化の有無をウェスタンブロット法で解析を行った。

[長期飼育:] 残りのラットは98週齢まで飼育を続け、糖負荷試験、血中インスリン濃度、c-peptideの尿中排泄量、尿中アルブミン含量の測定を行った。また、血漿の生化学検査もあわせて実施した。

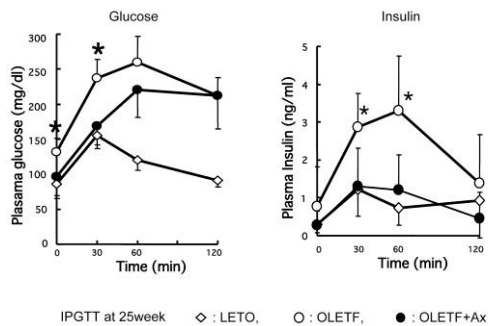
4. 研究成果

[I] OLETFラットの約90%が糖尿病を発症する25週齢でのアスタキサンチン投与の効果についての結果は以下の通りである。

- (1) 25週まではD群、A群における飼料摂取量はC群に比べ有意に多かったが、D群とA群における飼料摂取量は46週まで差は認められなかった。体重は、D群とA群に差はなく、共にC群に比べ有意に重かった。この結果は過食による著しい体重増加、肥

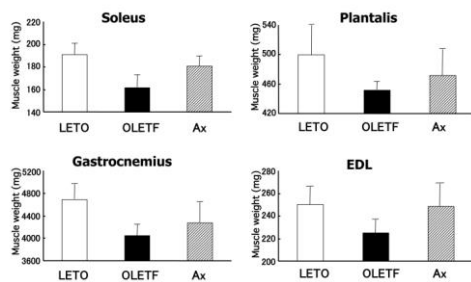
満を呈するOLETFラットの特徴を示している。

- (2) D群では空腹時(0分)の血糖値が 131.8 ± 6.9 mg/dL (平均値 \pm 標準誤差)と高く、グルコース投与60分後には 259.6 ± 13.1 mg/dL にまで上昇するという糖尿病の特徴的な血糖値推移が観察された。これに対してA群では空腹時の血糖値が 96.4 ± 11.0 mg/dL と有意に低く、30分、60分の値もアスタキサンチン非摂取群の値を下回っていた(図1)。また、血漿中インスリン濃度推移も同様の傾向を示し、アスタキサンチン摂取群の数値は全時点でアスタキサンチン非摂取群の値を下回っており、特に30分、60分値では有意に低い値であった(図2)。これらの結果は、アスタキサンチン投与がOLETFラットのインスリン抵抗性を改善して2型糖尿病発症を抑制していることを示している。



- (3) 25週齢でD群はC群に比べて尿蛋白量が有意に増加していて、糖尿病初期で糖尿病性腎症を示すOLETFラットの特徴を示していたが、A群ではC群に比べて尿蛋白量が増加しているものの、D群に比べて有意に低い値を示した。この結果から、アスタキサンチン投与が糖尿病性腎症の軽減に寄与していることが分かった。

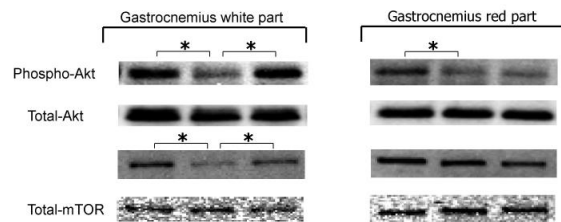
- (4) D群では下肢骨格筋の重量が正常ラット群に比べて約10%減少していたが、A群では殆ど減少していなかった。



そこで、細胞増殖を促進し、アポトーシスを阻害する因子であるAktのリン酸化を調べたところ、リン酸化レベルは低下していたが、A群ではC群と同様にリン酸化レベルの低下は見られなかった。その後、52週齢では抗酸化物質投与群でも筋萎縮が進行しAktのリン酸化が低下した。

また、Akt下流のmTORのリン酸化についてもAktと同様と同様の結果を得た。

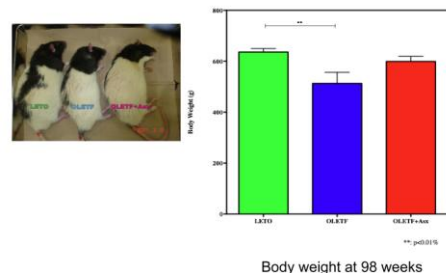
このことから、アスタキサンチン投与により、糖尿病発症初期では骨格筋の萎縮を軽減していることが明らかになった。



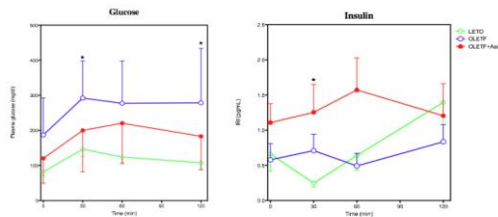
以上の結果から、アスタキサンチン投与により、糖尿病発症初期でのインスリン抵抗性を一時的に改善して糖尿病発症を遅延することが明らかとなった。また、同時にインスリン由来シグナル伝達因子Aktのリン酸化の減少を抑え、骨格筋の萎縮を軽減していることも明らかになった。

- [II] 1型糖尿病が発症している98週齢でのアスタキサンチン投与の効果についての結果は以下の通りである。

- (1) D群の体重はC群に対して有意に減少していたが、A群では体重減少は認められなかった。



- (2) 糖負荷試験では、D群ではインスリン分泌能力が低下し、空腹時の血糖値が高値を示し、グルコース投与後は2時間まで高血糖が維持されていた。対して、A群ではインスリンの分泌能力を保持していて、空腹時血糖値はD群に対して低値を示し、グルコース投与後C群に対して高値を示すもののD群より血糖値は低く、60分後から血糖値が低下していた。



Glucose tolerance test at 96 weeks

(3) 尿中のc-peptideは個体差が大きく有意差は認められなかったが、D群に比べA群で高値を示した。インスリンの前駆体であるプロインスリンは、膵臓β細胞内でプロセッシングを受け、インスリンとc-peptideを生成した後に、ほぼ等モル比で血中に放出される。更にc-peptideは腎臓から排出され、再吸収されることはないことから、A群ではインスリン分泌能がある程度維持されているものと考えられる。

(4) D群、A群は共にC群に比べてpHが低下し、アシドーシスが進行していた。また、OLETF群とOLETF+Ax群間には有意差がなかった。

(5) 98週齢での血漿生化学検査ではOLETF+Ax群で総コレステロール値およびLDL値がLETO群およびOLETF群に比べて高値を示した。

以上の結果から、98週齢ではD群で体重が減少し、インスリン分泌能力が低下する1型糖尿病の症状が現れているのに対して、A群ではインスリン分泌能力を保持していたことから、アスタキサンチン投与が2型糖尿病から1型糖尿病への進行をある程度抑制しているものと考えられる。

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2件)

① Iwasaki, T., Samoilova, R.I., Kounosu, A., Ohmori, D. and Dikanov, S. A., Continuous-Wave and Pulsed EPR Characterization of the [2Fe-2S](Cys)₃(His)₁ Cluster in Rat MitoNEET., J. Am. Chem. Soc., 査読有, Vol. 131, 2009, 13659-13667

② Baba T, Kobayashi H, Kawasaki H, Mineki R, Naito H and Ohmori D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with phosphorylated Akt resulting

from increased blood glucose in rat cardiac muscle., FEBS Letter, 査読有り, Vol. 584, 2010, 2796-2800

[学会発表] (計5件)

① 馬場猛、小林裕幸、角誠二郎、内藤久士、内田桂吉、大森大二郎、抗酸化物質投与による糖尿病に伴う筋萎縮の抑制、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2008年12月

② 馬場猛、小林裕幸、内藤久士、川崎広明、大森大二郎：心筋における血糖値制御に関わる新規ネットワークの探索、第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月23日

③ 馬場 猛, 小林 裕幸, 川崎 広明, 内藤 久士, 大森 大二郎、ラット心筋における血糖値上昇時のリン酸化されたAktとGAPDHの相互作用、BMB2010、第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会、神戸、2010年12月9日

④ Kobayashi H, Baba T, Naito H, Uchida K and Ohmori D, Effects of astaxanthin on type II diabetes model rat, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats (OLETF), Pacificchem 2010, Dec. 19, 2010, Honolulu, Hawaii, USA

⑤ 馬場 猛, 小林 裕幸, 川崎 広明, 宇田 宗弘, 大森 大二郎、心臓における解糖系酵素GAPDHを介した新規インスリンシグナル伝達経路、第84回日本生化学会大会、2011年9月、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大森 大二郎 (OHMORI DAIJIRO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：00124967

(2) 研究分担者

内藤 久士 (NAITO HISASHI)

順天堂大学・スポーツ健康科学部・教授

研究者番号：70188861