

## 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 5 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500685

研究課題名（和文） 加圧空気負荷での脂質代謝改善機構解明によるメタボリック症候群新規治療法の探索

研究課題名（英文） Finding the novel anti-metabolic syndrome treatment by examining the mechanism of improvement for lipid metabolism with hyperbaric oxygen.

研究代表者

保坂 利男（HOSAKA TOSHIO）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60403698

研究成果の概要（和文）：肥満糖尿病状態マウスを使った実験から、加圧空気カプセル長期負荷は、血糖値には影響せず、血清中性脂肪などの脂質異常症が改善することがみいだされた。そのメカニズムとして筋肉、肝臓で脂肪燃焼が進んでいた。さらに脂肪細胞でインスリンの効き目を悪くする悪玉因子の脂肪細胞からの分泌も減っており、加圧空気カプセル負荷を継続することで抗肥満、抗メタボリック症候群につながると考えられ、今後の分子メカニズムの探索による新規治療薬の足掛かりとなった。

研究成果の概要（英文）：Serum levels of free fatty acid and triglyceride, but not glucose and insulin, were significantly decreased after chronic treatments with HBA (hyperbaric air). The mRNA expressions related to lipid metabolism were significantly up-regulated in the muscle and liver. Increases in adipocytokine mRNA, which impaired lipid metabolism, were also attenuated by HBA treatment. These results suggest that exposure of HBA could have beneficial effects on lipid metabolism in patients with obesity and metabolic syndrome and then, belong to the finding of new targets of treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

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

## 1. 研究開始当初の背景

高圧空気チャンバーは、最近では、流行に乗り筋肉疲労の回復、美肌を謳い文句にスポーツジムなどでも健康器具として使用されるようになってきている。しかしながら、あくまでも経験的なサポートを背景に普及したものであり、医学的エビデンスは全なく、今後エビデンスの集積が急務となる。高圧空気

チャンバーによる高圧空気療法(Hyper Baric Air : HBA)は、高圧酸素療法に比べて安全な健康器具とはいえるが、人気だけが先走った現在において、分子レベルから臨床レベルまでの検討をおこない、将来的にはエビデンスに基づいた治療法として確立させるべきである。

## 2. 研究の目的

HBA の研究代表者らの初期解析から血清脂質を抑制することを見出しており、今後の解析によってHBA 処置の糖脂質代謝の分子生物学的エビデンスおよび、HBA から派生した新規メタボリック症候群治療法の開発など世界に先駆けた研究を発信し、人気だけが先走った現在において、エビデンスに基づいた治療法としてHBA の意義を確立させるために以下のことを明らかとする。

(1)HBA 処理による脂質代謝改善効果の生理的、分子メカニズムを明らかにする。

HBA 処理後の・酸化関連酵素、転写因子の発現をマウス肝臓、骨格筋、脂肪組織で確認

アディポサイトカインおよび炎症性サイトカインの血清濃度の測定、脂肪細胞での発現の確認をおこなう

HBA で動員される細胞内シグナルのメカニズムを明らかにする。

(2)エネルギー消費に関連したタンパク発現の分析。

(3)HBA とインスリン抵抗性改善薬(チアゾリジンなど)、高血圧薬(アンジオテンシン II レセプター阻害薬など)との併用による血糖改善、動脈硬化改善効果の検討

(4)HBA 処理の voluntary 運動好性 or compulsory endurance 運動における耐性などの解析及びその分子生物学的解析

(5)HBA 負荷により副作用として懸念される活性酸素の検討

(6)DNA microarray を使用してHBA で動員されるタンパクの解析

## 3. 研究の方法

(1)肥満2型糖尿病マウスに対しての HBA の生理学的効果の検討

高圧処置による db/db マウスの脂質代謝改善のデータは我々が初めてであり、血清脂質の改善の背後にインスリン抵抗性が改善している可能性は否定できない。それを明らかにするために今後経口血糖負荷試験、インスリン負荷試験をおこなう。さらに負荷期間を延長して長期的な(4-6 months)HBA の効果も検討する。

軽度肥満モデルの(OLETF ラット、SD ラットに高脂肪食負荷)での上記と同様に糖脂質

代謝の解析も行う。

糖脂質代謝に関与しているアディポサイトカイン(Leptin, adiponectin, Resistin)、炎症性サイトカイン(TNF $\alpha$ , IL6, MCP1)を ELLISA 法で測定する。また、呼吸商の測定、甲状腺ホルモン、コルチゾールの測定もおこなう。

(2)肥満2型糖尿病マウスに対しての HBA と薬剤、運動との併用効果の生理学的検討  
高圧負荷とインスリン抵抗性改善薬(チアゾリジンなど)、高血圧薬(アンジオテンシン II レセプター阻害薬など)との併用、高圧負荷の voluntary 運動好性 or compulsory endurance 運動における耐性などの解析として糖尿病モデルマウスなどを使って糖脂質関連の負荷検査、血清、生理学的解析等をおこなう。

(3)HBA 効果の組織学的、分子生物学的検討

長期的効果を生理学的に検討していくと同時に、血清脂質値に有意さを認めた HBA 処理後8週目のマウスの解剖を行い、糖、脂質代謝に重要と考えられている骨格筋、肝臓、精巣上体脂肪の組織染色を行う。さらに有酸素運動に重要でなおかつ糖代謝に重要な骨格筋のサブタイプ遅筋の割合の増加を免疫染色で検討する。

それぞれの組織での脂肪代謝関連酵素(CPT-1, ACC など)の発現、脂質代謝関連転写因子(PPAR $\alpha$ , SREBP-1, PGC-1)の発現も RT-PCR 法、ウエスタンブロット法で定量する。また、エネルギー代謝に関与している UCP1, UCP3, AMPK の組織ごとの発現を RT-PCR およびウエスタンブロット法で確認する。

(4)HBA 効果の分子生物学的検討による新規メタボリック症候群治療ターゲットタンパクの探索

高圧負荷で変化するタンパクの検索のための DNA microarray をおこなう。

高圧負荷でドラマティックに変化している遺伝子群に関して蛋白の発現変化の確認

で同定された候補蛋白の糖脂質代謝に関してのさらなる培養細胞を利用した分子生物学的機能解析から抗メタボリック症候群薬となる候補遺伝子の同定を行う。

## 4. 研究成果

(1)HBA 負荷は肥満モデルマウスの脂質異常症を改善する。

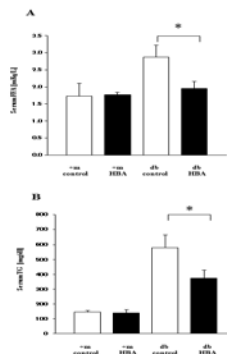


図1 HBA 負荷後の血清遊離脂肪酸値(A)と中性脂肪値(B)  
FFA:遊離脂肪酸, TG:中性脂肪, +m 正常マウス, db 肥満マウス  
control: コントロール, \* P<0.05

HBA 処理で糖代謝に関するパラメーターに関しては有意な変化は認めず、体重も HBA 処理により優位な変化は認めなかった。血清遊離脂肪酸、中性脂肪値は、HBA 処理マウス肥満マウス(db)で有意に(P<0.05)低下を示し(図 1)、原因と1つとして、脂肪酸の・酸化過程酵素である CPT1 発現が HBA 負荷によりヒラメ筋(CPT1b)、肝臓(CPT1a)で有意に増加していた。さらにヒラメ筋、肝臓における・酸化に関する酵素の遺伝子発現を調節する PPAR $\alpha$ とミトコンドリアを増生させる働きのある PGC1 $\alpha$ (結果として・酸化を促進させると推測される)の2つの転写因子の発現変化の検討で、PPAR $\alpha$ は両方の組織で HBA 負荷群において有意に発現量が増加しており、PGC1 $\alpha$ は筋肉での発現量が負荷群で有意に増加していた(図 2)。

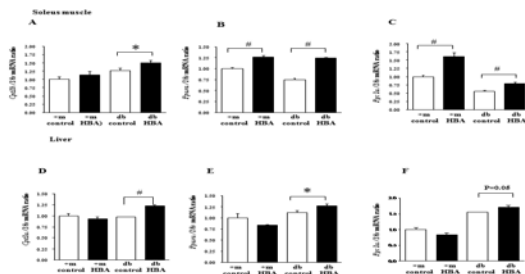


図2 肝臓、骨格筋での・酸化、脂質代謝関連転写因子のmRNA発現  
\* P<0.05, # <0.01

(2)HBA 負荷は脂肪組織で炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ , MCP-1 の発現量を低下、Leptin の発現量を増加させる。糖脂質代謝調節で重要な役割を担っていることが明らかとなってきている内臓脂肪組織でのアディポサイトカイン発現の検討で、HBA 負荷で炎症性サイトカインとして糖脂質代謝を悪化させると注目されている TNF $\alpha$ , MCP1 の発現量の有意な低下を認めた(図 3)。一方でインスリン感受性をあげる働きがあ

ると考えられている Adiponectin の発現量には変化は認めなかった。

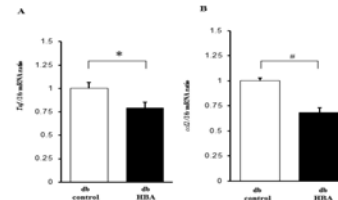


図3 脂肪組織における炎症性サイトカインのmRNA発現  
\* P<0.05, # <0.01

(3)HBA 負荷は肥満モデルマウスでは、摂食量が多いにも関わらず体重には有意な差は両群間で認められず、ヒラメ筋で基礎エネルギー消費、熱産生に関する UCP3 の発現は有意に増加していた。

今回の HBA 負荷による糖尿病肥満モデルマウスでの脂質代謝改善、エネルギー代謝亢進、悪玉アディポサイトカイン減少の発見は、HBAT が筋肉疲労回復や足壊疽など治療のみならず、メタボリック症候群の治療にも使用可能と思われる。さらに、HBA はインスリン抵抗性改善薬といわれているチアゾリジン系抗糖尿病薬や脂質代謝異常改善薬との併用で相乗、相加効果が期待でき、さらに一日一時間の負荷でも薬との併用で効果が期待され、将来的には補完医療としての一役を担うかもしれない。現在、研究目的、方法に述べた内容で実験を継続中である。今回の研究は、現在進行中である HBA 負荷による遺伝子変化の DNA マイクロアレー解析の結果も含めて、HBA 効果の更なるメカニズムを解明後、HBA 効果の重要な鍵蛋白鍵蛋白をターゲットに新規メタボリック症候群治療薬の開発につながるものと思われる。

## 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1件)

Long-term treatment with hyperbaric air improves hyperlipidemia of db/db mice. Kiyoshi Teshigawara, Toshio Hosaka, Miwa Yamaguchi, Eri Terada, Yuka Kisyuku, Keiko Fukunaga, Yohko Hirata, Bayasgalan Jambaldorj, Nagakatsu Harada, Tohru Sakai and

Yutaka Nakaya. The journal of medical investigation 査読あり 2010 Aug; 57(3,4) 224-231

〔学会発表〕(計2件)

加圧空気療法 (Hyperbaric air therapy : HBAT) は糖尿病マウスの脂質異常症を改善する。山口美輪、保坂利男、勅使川原匡、寺田依里、福永恵子、西脇由佳、平田容子、酒井徹、中屋豊 第14回日本統合医療学会 2010年12月11-12日、徳島大学

加圧空気治療 (Hyperbaric air therapy : HBAT) の糖脂質代謝への影響の検討 山口美輪、勅使川原匡、寺田依里、福永恵子、西脇由佳、Li Qinkai、平田容子、船木真理、中屋豊、保坂利男 第51回日本糖尿病学会年次学術集会 2008年5月22-24日、東京国際フォーラム

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

保坂利男 (HOSAKA TOSHIO)  
埼玉医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60403698

### (2) 研究分担者

中屋豊 (NAKAYA YUTAKA)  
徳島大学大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：50136222

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

犬飼浩一 (INUAKI KOUICHI)  
杏林大学大学院・医学研究科・准教授  
研究者番号：20333007