

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11358

研究課題名（和文）糖尿病が骨格筋の易疲労性を引き起こす血管内皮依存性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of the endothelium-dependent mechanism by which diabetes causes fatigability of skeletal muscle

研究代表者

曾野部 崇（Sonobe, Takashi）

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70548289

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肥満・糖尿病において、なぜ骨格筋疲労が生じやすいのかという問いに対し、筋収縮時の末梢血管応答を血管イメージング技術で可視化し、内皮由来の血管拡張メカニズムの寄与についてより詳細に検証した。下肢血管網の可視化画像解析から、肥満・糖尿病モデルZFDMLラットでは筋収縮負荷後における導管血管近位部の拡張応答が減弱しており、これは内皮由来過分極を引き起こすCa<sup>2+</sup>依存性K<sup>+</sup>チャンネル（特にSK3チャンネル）の寄与が低下したことで上行性の血管拡張シグナル伝搬が抑制された結果であることが示唆された。さらに持続的な低強度の運動トレーニングは、SK3チャンネルの寄与を亢進させ、これを改善す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

X線微小血管造影法をラット下肢に対して用いることで、従来困難であったin vivoでの生体深部血管の可視化を大血管から微小血管まで網羅的に行った。電氣的に骨格筋を収縮させた後の血管拡張応答を画像解析することによって、これまで小動物摘出血管標本やヒト大血管の局所的な応答を調べた研究において蓄積されてきたエビデンスに対して新たな統合的知見を重ねることができた。また、すでに運動耐用能が低下している肥満・糖尿病のラットにおいても、持続可能なレベルの低強度走運動が血管応答性の改善に効果があることが示されたことから、運動が及ぼす様々な効果に対する社会的関心を引き付ける一助となると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To investigate why skeletal muscle fatigue is more likely to occur in condition of obesity and diabetes, a vascular imaging technique was used to visualize the peripheral vascular response following electrically evoked muscle contraction in anesthetized rats and to examine the contribution of endothelium-derived vasodilator mechanisms. Image analysis of the hindlimb vascular tree showed that the muscle contraction-induced vasodilatory response was attenuated in the proximal portion of the conduit artery in the obese diabetic ZFDM rat. It is suggested that the reduced contribution of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels (especially SK3 channels), which mediate endothelium-derived hyperpolarization, is the result of suppression of ascending vasodilatory signal propagation. In addition, sustained low-intensity exercise training was suggested to improve this signaling by increasing the contribution of SK3 channels.

研究分野：運動生理学・生理学（呼吸・循環）

キーワード：内皮依存性血管拡張 微小血管造影 糖尿病 骨格筋収縮 内皮依存性過分極 運動トレーニング Ca<sup>2+</sup>依存性K<sup>+</sup>チャンネル アセチルコリン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

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り、さらに1000万の糖尿病予備軍が控えているとされている[厚生労働省、平成28年および平成30年国民健康・栄養調査より]。糖尿病患者においては早期から大・小血管障害を発症し、QOLが著しく低下するとともに生命予後にも悪影響を与えることから、如何にしてこれを予防・治療するかについては今日において重要な課題となっている。運動トレーニングに代表される継続的な身体活動量の増加は、糖尿病・糖尿病予備軍の血管障害に対する医薬品に依存しない重要な予防戦略のひとつである。しかしながら、糖尿病患者では易疲労性があり運動耐容能が低いことから[Sacre et al. JACC Cardiovasc Imaging. 2015]、身体活動量の低下を招き、その結果血糖コントロールも不良となり、血管機能障害ひいては糖尿病そのものを悪化させるといった悪循環を引き起こしていると考えられる。

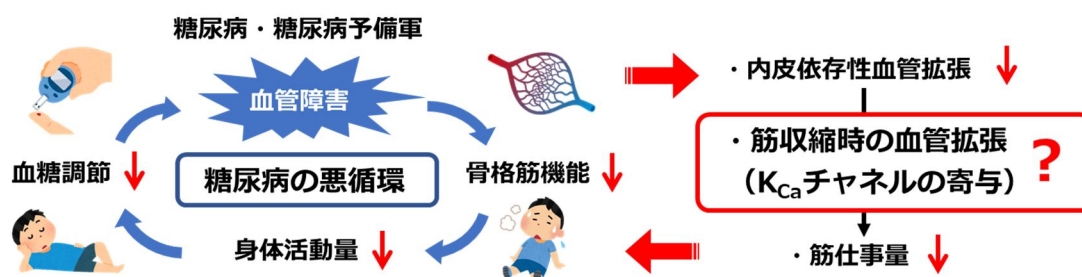


図1: 推定される糖尿病の悪循環

この背景には、骨格筋そのものの特性変化(筋組成・代謝・ミトコンドリア機能)や心機能などの変化とは独立して、運動時における骨格筋の血流再分配に異常があることがヒトでの研究結果から示唆されている[Senefeld et al. J Appl Physiol. 2019]。前述のように糖尿病では血管機能障害を呈するが、申請者らや他グループによる糖尿病モデル動物を対象とした先行研究から、特に細動脈レベルにおける血管拡張応答が減弱していることが明らかになっている[Sonobe et al. Cardiovasc Diabetol. 2015, Novielli & Jackson. Acta Physiol. 2014]。この細動脈領域における血管拡張能の低下に寄与する因子として、血管内皮および平滑筋のCa<sup>2+</sup>活性化型K<sup>+</sup>チャネル(KCaチャネル)が関与する内皮依存性過分極(endothelium-dependent hyperpolarization, EDH)が、糖尿病において障害されていることが示されている[Matsumoto et al. Am J Physiol. 2003]。また、EDHは骨格筋の運動誘発性充血を引き起こすのに重要な因子であると報告されていることから[Sinkler et al. J Physiol. 2017]、EDHの障害は運動誘発性充血にも影響することが推察される。

## 2. 研究の目的

本研究は、1)糖尿病による血管機能低下がどのように易疲労性に関与しているのか、2)このときEDH由来血管拡張能の変化が関与しているのか、3)これに対して低強度運動トレーニングがどのような影響を与えるか、について明らかにすることを目的とした。具体的には、筋収縮依存性の血管拡張反応における、KCaチャネルを介したEDH由来成分の寄与に焦点を当て、機能的in vivo血管イメージング法を用いた実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 機能的in vivo血管イメージング法による筋収縮誘発性下肢血管拡張応答の画像解析

ラットをイソフルランで麻酔し、呼吸管理下で血圧測定用・薬剤投与用・造影剤注入用のカテーテルを血管内に挿入した。血流測定用超音波プローブを対象脚の大腿動脈に留置し、筋収縮刺激用電極を坐骨神経に留置した後に、ラットの足底部を張力計に固定して刺激中の筋発揮張力をモニターした。

下肢骨格筋群を電気刺激により収縮させ、筋収縮(40Hz, rhythmic contraction x20 or tetanic contraction, 60 s)後にラボ型X線装置(HITEX社)を用いた下肢血管イメージングを行った。

KCaチャネル阻害薬(apamin+charybdotoxin, 50 μg/kg)を静脈内投与前後で下肢血管イメージングを行った。

肥満・2型糖尿病モデルラット(ZFDM fa/faラット)に対して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 および の実験を行った。  
 非肥満・2型糖尿病モデルラット(Goto-Kakizaki ラット)に対して AMPK 活性化剤 AICAR(20 mg/kg) を静脈内投与前後で下肢血管イメージングを行った。

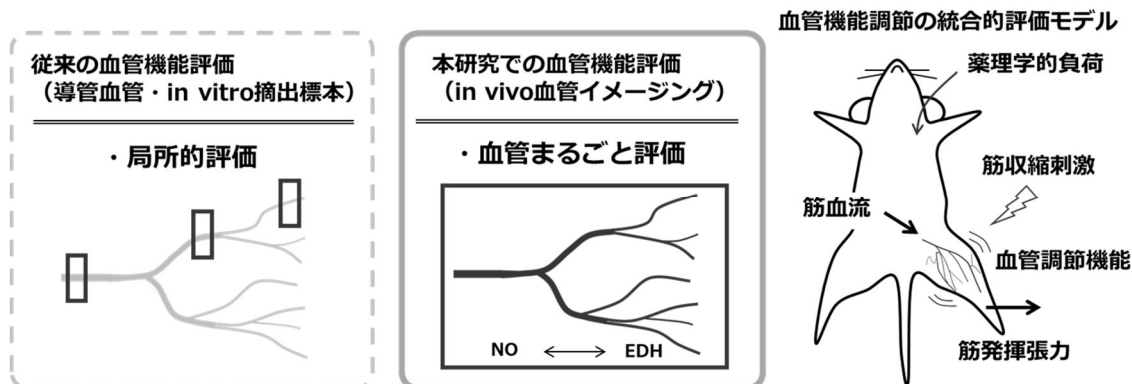


図2：本研究で用いた in vivo 血管イメージングの概要図

(2) 内皮由来アセチルコリン産生系の抑制による血管拡張応答への影響  
 血管内皮細胞に対してアセチルコリンを外的に作用させることで血管拡張能を調べることができる。我々の先行研究においても糖尿病マウスではアセチルコリン投与に対する血管拡張応答が減弱していることを示した [Sonobe et al. Cardiovasc Diabetol. 2015]。一方で、アセチルコリンは内皮細胞そのものによって産生されていることが知られており、内皮細胞が産生するアセチルコリンが内皮依存性血管拡張応答にどのように寄与しているかについて検証するため、内皮細胞特異的にアセチルコリン産生を抑制するマウス (VEcad-Cre<sup>ERT2</sup>+ChAT<sup>fllox/fllox</sup>, eChAT KO mice) を用いて実験を行った。

非麻酔下の eChAT KO mice に対してテールカフ法を用いて体血圧を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 機能的 in vivo 血管イメージング法による筋収縮誘発性下肢血管拡張応答の画像解析

###### 筋収縮誘発性血管拡張応答の特徴

骨格筋の収縮に対して生じるダイナミックな血管応答は、これまでに多く用いられてきた分岐血管の太さや本数の比較といった従来の評価手法では十分な評価が得られていないと考え、新しい血管造影画像の評価法(ユークリッド距離計算を用いた連続した血管径のヒストグラム表示)を試み、それらを組み合わせた複合的な検討手法を考案した。

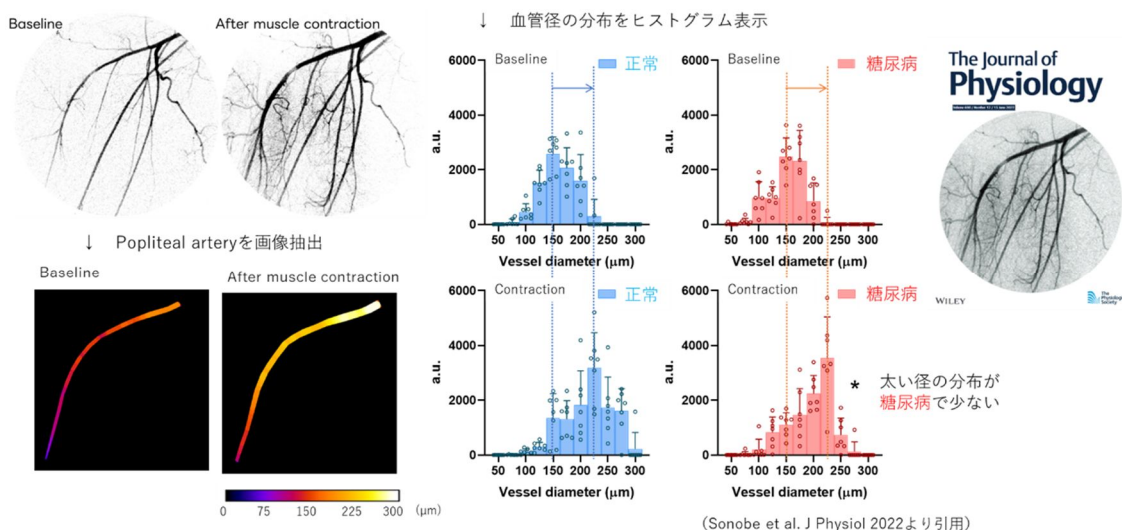


図3：ユークリッド距離計算を用いた血管径ヒストグラム表示による血管応答特性

画像解析結果からは、正常ラットでの筋収縮刺激後には、導管動脈として機能する血管近位部の血管拡張により太いセグメント(200 μm以上)の割合が増加するとともに、最も頻出するセグメントの太さが150 μmから225 μmへと右シフトすることを示している。糖尿病モデルラットでは、ヒストグラム全体の右シフトは正常ラットと同様に生じているものの、太いセグメント



の増加率が低いことが分かった。筋収縮に対する血管応答は、末梢の細小動脈レベルで局所的な血管拡張応答が先んじて生じ、それが上行性に伝搬して導管動脈レベルの血管拡張を引き起こすメカニズムが知られているが、本解析結果は、糖尿病ラットではそのメカニズムに異常が生じている可能性が示唆された。

#### 筋収縮誘発性血管拡張応答に対する KCa チャネル阻害の影響

前述の細小動脈から導管動脈への上行性の血管拡張シグナルの伝搬は、内皮依存性過分極 (EDH) が担っているとされている。EDH の発生に寄与する KCa チャネルの阻害薬 (apamin+charybdotoxin, 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を静脈内投与すると、正常ラットにおいても筋収縮後の太いセグメントの増加率が減少した。KCa チャネル阻害薬の太いセグメントに対する効果は糖尿病ラットでは見られなかった。さらに、糖尿病ラットでは KCa チャネルのうち SK3 (KCNN3) のタンパク質発現が低下していた。このことから、糖尿病ラットでは KCa チャネルの寄与が低下することで EDH が抑制され、末梢で生じた上行性の血管拡張シグナル伝搬に異常が生じることで、上流の導管動脈における血管拡張が制限されたものと考えられた。

#### 低強度運動トレーニングの効果

本研究で対象とした肥満・糖尿病モデルラットは、正常ラットに比べて運動能力が低い。それでも 1 日 30 分の連続的な走運動を維持できる程度の低強度運動トレーニングを 12 週間行った。低強度運動トレーニングはモデルラットの血糖・HbA1c の高値そのものを改善することはできなかった。しかしながら運動トレーニング群では、筋収縮後の血管応答のうち、太いセグメントの増加率が上がっていた。

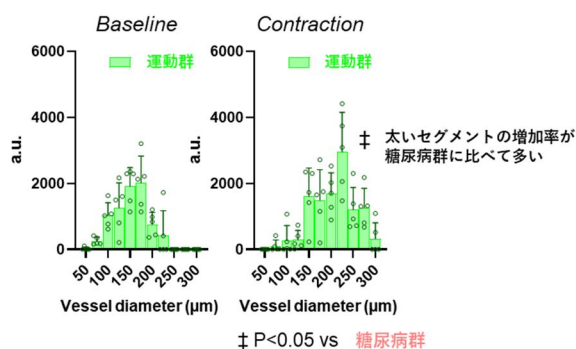


図 4：低強度運動トレーニング群の筋収縮後血管応答特性

また SK3 タンパク質発現も正常ラットと同程度を示したことから、低強度運動トレーニングは KCa チャネルの寄与を増加させ、EDH を亢進することによって血管の応答性を改善することが示唆された。

#### AMPK の活性化が筋収縮誘発性血管拡張応答に与える影響

正常 (Wistar) ラットおよび非肥満型の 2 型糖尿病モデル動物である Goto-Kakizaki (GK) ラットを対象として、機能的血管イメージングおよび下肢血流測定による血管機能の評価を行った。内皮・平滑筋細胞内の AMP-activated protein kinase (AMPK) が KCa チャネルに作用して前述の EDH を修飾するとされているが、それが促進性なのか抑制性なのかについては先行する研究によって結果が異なっている。そこで、本実験系において AMPK 活性化薬である AICAR を投与した後に血管イメージングを行うことにより、下肢血管系がどのような影響を受けているかについて調べた。血管イメージングにより得られた下肢血管の造影画像から AICAR (20 mg/kg, i.v.) 投与前後での血管径の変化を網羅的に解析したところ、対照群の Wistar ラットでは顕著な血管の拡張を示した一方で、Goto-Kakizaki ラットではそれが減弱していた。これは、Goto-Kakizaki ラットでは AMPK の活性化によって誘発される血管拡張メカニズムが障害を受けており、下肢血流の調節機能に影響を与えている可能性が示唆された。

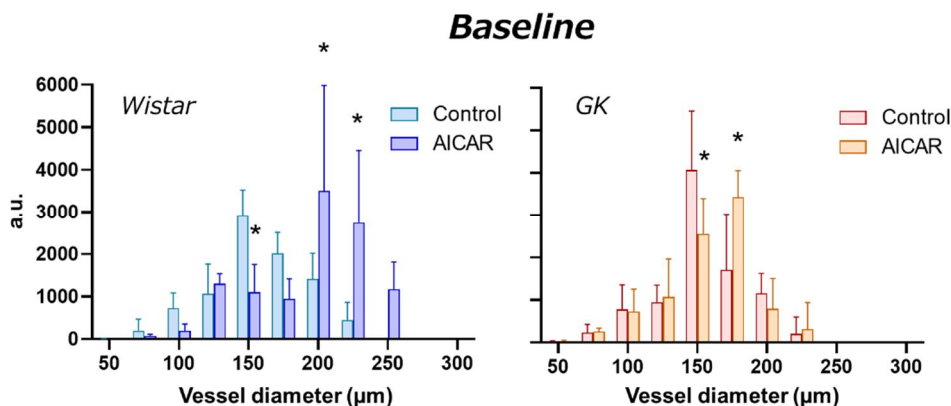


図 5：AMPK 活性による血管拡張応答特性

## (2) 内皮由来アセチルコリン産生系の抑制による血管拡張応答への影響

外的ストレスに反応して内皮機能を局所的に調節するとされている非神経性のコリン作動系 (non-neuronal cholinergic system) に焦点を当て、特に内皮細胞自体が産生する血管拡張物質アセチルコリンによる血管調節機能への寄与について検証した。内皮細胞内でのアセチルコリン産生が抑制される内皮特異的コリンアセチルトランスフェラーゼ欠損マウス (eChAT KO マウス) を用いた予備実験では体血圧の上昇が観察された。内皮由来アセチルコリンの役割について、筋収縮依存性の血管拡張応答や、糖尿病などの病態下での関与も含めて更なる検証が必要であると考えられた。

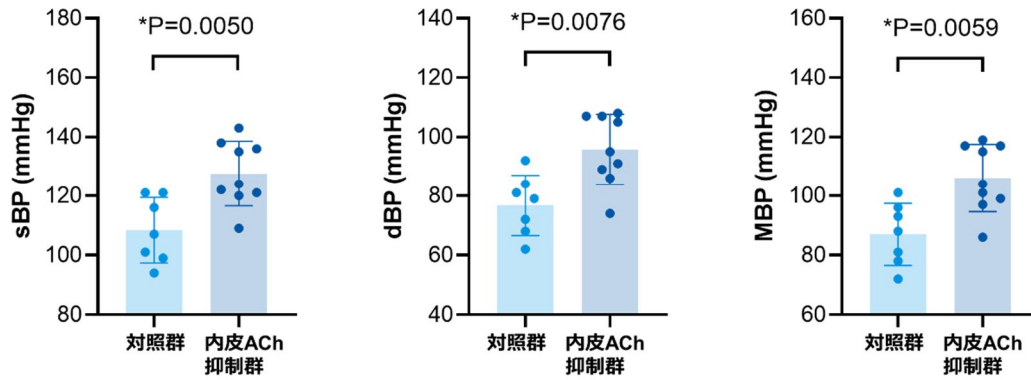


図6：内皮アセチルコリン産生の抑制による血圧への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sonobe T, Tsuchimochi H, Maeda H, Pearson JT.	4. 巻 600 (12)
2. 論文標題 Increased contribution of KCa channels to muscle contraction induced vascular and blood flow responses in sedentary and exercise trained ZFDM rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Physiol	6. 最初と最後の頁 2919-2938
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP282981	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sonobe T, Kakinuma Y.
2. 発表標題 Loss of endothelial cell-derived acetylcholine production causes elevated systemic blood pressure and impaired exercise capacity in mice
3. 学会等名 The 101st Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Sonobe T, Kakinuma Y.
2. 発表標題 Endothelial specific non-neuronal acetylcholine plays an important role in regulation of blood pressure via endothelial cell dependent mechanisms
3. 学会等名 The 7th JCS Council Forum on Basic Cardiovascular Research
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sonobe T, Tsuchimochi H, Pearson JT.
2. 発表標題 Effects of AMPK activation on skeletal muscle contraction-induced vasodilation in the hindlimb of non-obese type 2 diabetes Goto-Kakizaki rats
3. 学会等名 The 100th Anniversary Annual Meeting of The Physiological Society of Japan
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 曾野部崇, 土持裕胤, Pearson James
2. 発表標題 ラット骨格筋収縮に伴う血管拡張能の可視的機能評価
3. 学会等名 第34回 呼吸研究会
4. 発表年 2022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
研究分担者	Pearson James  (Pearson James)  (30261390)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長   (84404)	
研究分担者	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)	

	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
研究協力者	柿沼 由彦  (Kakinuma Yoshihiko)  (40233944)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授   (32666)	

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