

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20日現在

機関番号：33918

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700558

研究課題名（和文） 電気刺激と熱刺激を併用した新たな糖尿病の治療法の開発に関する実験的研究

研究課題名（英文） An experimental study on the development of new therapy for treatment of diabetes mellitus by using the combination of electrical stimulation and heat-stress

研究代表者

岩田 全広（IWATA MASAHIRO）

日本福祉大学・健康科学部・准教授

研究者番号：60448264

研究成果の概要（和文）：インスリン抵抗性の改善を目的とした電気刺激と熱刺激の併用効果について検討した。培養骨格筋細胞を用いた実験より、電気刺激または熱刺激を単独で実施した場合と併用した場合のいずれにおいても、インスリン感受性の亢進が認められた。しかし、それらを併用することによる加算効果は得られなかった。インスリン抵抗性モデルラットを用いた動物実験より、電気刺激を継続することで、インスリン感受性の改善が認められた。さらに、電気刺激の対象筋である大腿直筋において heat shock protein (HSP) 72 及び HSP27 発現量の増加が観察された。したがって、電気刺激の継続実施は骨格筋の質的変化を引き起こしてインスリン抵抗性を改善させる効果を有することが示唆された。そして、その作用機序のひとつとして HSPs 発現量の増加により、骨格筋でのインスリン作用が促進される可能性が窺えた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the effects of therapeutic heat-stress before electrical stimulation (ES) on improvement of insulin resistance. In vitro experiments by using cultured muscle cells (C2C12 myotubes), both ES and heat-stress increased insulin-stimulated glucose uptake, but the effects were not additive. In vivo experiments by using high-fat diet-induced insulin-resistant rats, the daily application of ES improved insulin responses and increased heat shock protein (HSP) 72 and HSP27 expression in the rectus femoris muscle. These results suggest that the daily application of ES can improve insulin sensitivity, and this mechanism is related to the expression of HSPs in myocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

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：糖尿病、インスリン抵抗性、電気刺激、熱刺激

1. 研究開始当初の背景

適度な運動は、2型糖尿病の発症を防止するのみではなく、その病態のひとつであるイ

ンスリン抵抗性を効果的に改善し、生体全体の代謝状態を正常へと導くことが知られている。さらに、運動はインスリン作用に依存

せず、骨格筋内への糖の取り込みを増加させることができ、リハビリテーション医療の現場においても運動療法は多くの糖尿病患者に適応されている。しかしながら、超高齢化社会を迎えた今日、寝たきり患者や慢性的な運動不足者、あるいは過度の肥満症や整形外科疾患などのために、運動を十分に行えない人々が多数存在する。さらに、糖尿病性合併症や心血管系合併症などの臓器障害により、運動制限を有する患者も多く認められ、これらの人々への運動処方、メタボリックシンドローム対策が直面している大きな課題のひとつとなっている。したがって、運動が制限される患者を対象にした場合においても優れた運動効果をもたらすことができる、運動負荷以外の治療法の早期開発が求められている。

リハビリテーション医療の現場において電気刺激は、治療手段のひとつとして萎縮筋や痙攣性筋などに対して施行される。また、宇宙飛行による無重力環境下での筋萎縮予防にも電気刺激が利用されている。この手法は、筋組織を司る末梢運動神経に対して、表面電極を用いて低周波電気パルス刺激を施すことにより、刺激に応じた筋の収縮活動を人為的に誘発するものであり、寝たきり患者や体力が低下した患者であっても施行可能である。また、この電気刺激誘発性の筋収縮活動は、自発的な軽い運動と同程度のエネルギー消費をもたらすことが明らかにされており、2型糖尿病の予防や治療を目的とした応用が試みられている。例えば、健常ラットの両後肢筋に対して60分間の電気刺激を加えたところ、電気刺激を加えていないラットに比べて、刺激中～刺激後のインスリン感受性が有意に亢進したとの報告(Chang SL, et al.: Life Sci 79: 967-971, 2006.)や、インスリン抵抗性を示すヒト培養骨格筋細胞を対象に用いて筋細胞に直接電気刺激を加えた結果、電気刺激を加えていない筋細胞に比べて、インスリン刺激による糖取り込み活性が有意に亢進したとの報告(Aas V, et al.: Ann N Y Acad Sci 967: 506-515, 2002.)もなされている。

これらのことは、動物実験ならびに培養細胞実験の結果ではあるが、電気刺激による骨格筋の収縮活動によっても、糖代謝能に対して急性の運動効果を十分に発揮できる可能性を示しており、前述のような臨床応用に向けた科学的エビデンスの構築につながるものと考えられる。

一方、一旦進行したインスリン抵抗性などの2型糖尿病の病態を改善していくためには、多くの時間と期間を費やさなければ効果が認められないのは事実である。ただ、現状の医療情勢では入院期間の短縮や医療費削減などの問題もあり、対象者に十分な治療時

間・期間を提供できない。そのため、短期間でインスリン抵抗性の改善をさせ得る方法論を検討する必要がある、本研究課題で着目しているものが上記に示した電気刺激で、これと熱刺激を併用した手段を用いればインスリン抵抗性の早期改善が可能ではないかと考えている。

この点に関して Chung らは、分子シャペロン機能を有する熱ショックタンパク質(heat shock protein: HSP) 72に着目し、以下の実験結果を報告している。すなわち、肥満から2型糖尿病を発症するモデルである高脂肪食負荷マウスを用いて、この高脂肪食負荷の過程で1日15分間、41.5°Cの全身温熱暴露を1回/週の頻度で行うと、骨格筋内のHSP72発現量が温熱暴露を行わない群より増加し、インスリン抵抗性の進行も抑制できたと報告している(PNAS USA 105: 1739-1744, 2008.)。さらに、細胞は筋とは異なるが、インスリン抵抗性を示す培養肝細胞に対して42°Cの熱刺激を行うと同時に電気刺激を併用すると、電気刺激単独または熱刺激単独群と比較して、インスリン刺激により引き起こされる糖代謝能亢進の情報伝達経路(IRS/PI3K/Akt経路)がHSP72発現量の増加を介してより活性化されるとの報告もなされている(Morino S, et al.: PLoS ONE 3: e4068, 2008.)。

したがって、これらの知見を参考にすると、インスリン抵抗性を示す骨格筋の治療には、電気刺激や熱刺激をそれぞれ単独で使用するよりも、それらを併用して行うことでより効果的で効率的な糖代謝能の改善効果を得ることが期待できると考えられる。

2. 研究の目的

先にも述べたが、適度な運動は糖尿病、肥満症や高血圧症など生活習慣病の病態改善や予防に重要な役割を担っている。しかし、リハビリテーション医療領域で遭遇する患者の中には、疾病の急性期や心循環器系の疾患を合併しているなどの理由で、積極的な身体活動を伴うような運動療法を実施することが困難なケースも多く存在し、その代償となる治療法の早期開発が急務となっている。

そこで、本研究課題では電気や熱などの物理的刺激に対する筋細胞応答に着目し、電気刺激または熱刺激が糖代謝能に及ぼす影響とその作用機序の解明を行い、臨床応用に向けた科学的エビデンスを集積するとともに、電気刺激と熱刺激を組み合わせた治療介入がインスリン抵抗性を示す骨格筋の治療において、より効果的かつ効率的に作用するのではないかとした仮説を培養細胞とモデル動物を用いて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、培養細胞実験ならびに動物実験の2つの実験系により構成された。動物実験については、名古屋大学動物実験委員会保健学部会に実験計画書を提出し、承認を受けた後に名古屋大学が定める動物実験指針に準じて実施した（承認番号；022 - 025）。

（1）培養細胞実験

①培養細胞

実験には、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株（C2C12）を使用した。I型コラーゲンをコーティングした細胞培養皿に筋芽細胞を播種し、増殖培地にて2日間培養しサブコンフルエント状態にまで増殖させた。その後、分化培地に交換して培養することで筋管細胞に分化させた後、実験を行った。実験群としては、無処置にて通常培養した対照群、60分間の電気刺激（パルス幅0.2 msec、周波数100 Hz、刺激時間200 msec、休止時間800 msec、刺激強度50 Vの矩形波）を行った群（電気刺激群）、60分間の熱刺激（41°Cの温熱暴露）を行った群（熱刺激群）、熱刺激から6時間後に電気刺激を行った群（併用群）の4群を設定した。

②生化学的検索

刺激終了直後（0時間後）を基準として、刺激終了から6時間後に糖負荷テストを行い、筋管細胞のインスリン感受性の変化を検討した。具体的には、刺激終了から6時間後の筋管細胞に対してインスリン刺激（100 nM）を行った後に tritium で標識された2-deoxy-D-glucose（2-DG）を負荷することで、一定時間内に細胞が取り込む2-DG量を算出した。

③分子生物学的検索

刺激終了直後（0時間後）を基準として、刺激終了から0、2、4、6、12、18、24、30時間後にWestern blotting法を用いて、筋管細胞内のHSP72及びHSP27発現量の変化を検討した。

（2）動物実験

①実験動物

実験には、6週齢のSD系雄性ラットを用い、高脂肪食を3週間摂取させることでインスリン抵抗性モデルラットを作成した。3週間の高脂肪食摂取後、ラットをさらに麻酔のみを7日間投与した群（高脂肪食群；n=6）と電気刺激を7日間実施した群（高脂肪食+電気刺激群；n=6）に振り分けた。電気刺激（周波数20 Hz、パルス幅200 μ sec、電流1.6 mA、duty cycle 1秒on-off）は吸入麻酔下で行い、大腿直筋の起始部（-極）と停止部（+極）に位置する皮膚に表面電極を貼付した後、1日1回、30分間実施した。なお、対照は同期

間に通常の餌を与えて飼育した群（正常群；n=5）とし、正常群には電気刺激を行わず、麻酔のみを投与した。

②生化学的検索

7日目の電気刺激終了から24時間後にeuglycemic clamp（インスリンランプ）を覚醒下で実施し、ラットのインスリン感受性を評価した。インスリンランプでは、頸静脈に挿入したカテーテルからグルコースとインスリン（3.0 mU/kg/min）を同時注入し、血糖値を空腹時レベルに維持するグルコースの注入速度を求め、インスリン感受性の指標である糖注入率を算出した。

③分子生物学的検索

インスリンランプ終了後に大腿直筋を採取し、Western blotting法を用いて、大腿直筋内のHSP72及びHSP27発現量の変化を検討した。

（3）統計処理

すべての値は平均±標準偏差で表記した。各群間の比較には、一元配置分散分析を用いた。分散分析により有意差を認めた場合は多重比較検定にTurkey法を適用し、各群間及び各検索時期の有意差を判定した。なお、全ての統計手法とも有意水準は5%未満とした。

4. 研究成果

（1）培養細胞実験

①インスリン感受性の変化

電気刺激群、熱刺激群、併用群の糖取り込み活性は、対照群に比べて有意に亢進した（ $P < 0.05$ ）。一方、電気刺激群、熱刺激群、併用群の間には有意な差が認められなかった。

②HSP72及びHSP27発現量の変化

電気刺激群のHSP72発現量は、対照群に比べて刺激終了直後（0時間後）ではほとんど差が認められなかったが、2時間後ではわずかに高値を示し、6時間後になるとその差は最も大きくなった。その後は緩やかに低下し、30時間後には対照群の水準にまで低下した。電気刺激群のHSP27発現量は、対照群に比べて0時間後ではほとんど差が認められなかったが、2時間後にはわずかに高値を示し、4時間後になるとその差は最も大きくなり、この発現量は18時間後まで維持された。その後は緩やかに低下したが、30時間後においても対照群の値に比べて高値を示した。

熱刺激群と併用群のHSP72及びHSP27発現量は、電気刺激群とほぼ同様の経時的変化を示した。

電気刺激群、熱刺激群、併用群における刺激終了から6時間後のHSP72及びHSP27発現

量を比較したところ、各群間には有意な差は認められなかった。

以上の結果をまとめると、C2C12 筋管細胞を用いた培養細胞実験では、糖取り込み活性や HSPs 発現量を指標として、電気刺激と熱刺激の併用による急性の加算効果の有無を検討した。その結果、電気刺激または熱刺激を単独で実施した場合と併用した場合のいずれにおいても、糖取り込み活性の亢進や HSPs 発現量の増加を認めた。しかし、それらを併用することによる加算効果は得られなかった。

そこで、モデル動物を用いた動物実験では、糖代謝に対する骨格筋電気刺激の効果を検証し臨床応用に向けた基礎的なデータを得ることを目的として、表面電極を用いた電気刺激介入がインスリン抵抗性モデルラットの糖代謝能に及ぼす影響を検討した。さらに、その作用機序について HSPs 発現量の変化に注目し、分子生物学的検索を行った。

(2) 動物実験

①インスリン感受性の変化

高脂肪食群 (3.1±0.3 mg/kg/min) と高脂肪食+電気刺激群 (5.9±1.3 mg/kg/min) の糖注入率は、正常群 (9.0±2.3 mg/kg/min) に比べて有意に低値を示した (P < 0.01 vs. 高脂肪食群、P < 0.05 vs. 高脂肪食+電気刺激群)。一方、高脂肪食+電気刺激群の糖注入率は、高脂肪食群に比べて有意に高値を示した (P < 0.05)。

②HSP72 及び HSP27 発現量の変化

高脂肪食+電気刺激群の HSP72 発現量は、正常群及び高脂肪食群に比べて有意に高値を示した (P < 0.01)。高脂肪食+電気刺激群の HSP27 発現量は、高脂肪食群に比べて有意に高値を示した (P < 0.05)。

以上の結果をまとめると、インスリン抵抗性モデルラットを用いた動物実験では、両側の大腿四頭筋に対する電気刺激の繰り返しがラットの糖代謝能に及ぼす影響を検討した。その結果、電気刺激を繰り返し実施するとインスリン感受性が改善すること、電気刺激の対象筋である大腿直筋の HSP72 や HSP27 発現量が増加することを確認した。したがって、電気刺激の継続実施は骨格筋の質的变化を引き起こしてインスリン抵抗性を改善させる効果を有することが示唆された。そして、その作用機序のひとつとして HSPs 発現量の増加により、骨格筋でのインスリン作用が促進される可能性が窺えた。

以上の検証は、骨格筋の糖代謝能をターゲットにした培養細胞実験及び動物実験に基づくものであるが、その成果はインスリン抵

抗性の改善をさせ得る運動負荷以外の新たな治療・介入法の開発に向けた基礎的資料につながるものであり、2型糖尿病の効果的な運動療法のあり方にも示唆を与えることができるものと考えている。

一方、電気刺激と熱刺激の併用による急性の加算効果の有無を検討した培養細胞実験では、電気刺激または熱刺激を単独で実施した場合と併用した場合のいずれにおいても、糖取り込み活性の亢進及び HSPs 発現量の増加を認めたが、それらを併用することによる加算効果は得られなかった。十分な効果が得られなかった理由のひとつとしては、熱刺激によって誘導された HSPs によるストレス耐性の獲得による影響が挙げられる。すなわち、一度熱刺激によって HSPs が誘導されてストレスによる耐性を得ると、次の電気刺激後には HSPs の誘導が抑制されてしまい、結果的に電気刺激効果がマスクされた可能性がある。したがって、今後は電気刺激と熱刺激の併用条件 (同時に負荷するなど) を再検討するとともに、急性効果のみではなく、継続して行うことで繰り返し効果が発揮されるかどうかを検討する必要があると考える。

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 5 件)

- ① 渡辺裕之, 鈴木重行, 岩田全広, 坂本 圭, 井上貴行, 坂野裕洋. 骨格筋経皮的電気刺激が健常ラットの耐糖能及びインスリン感受性に与える影響. 理学療法科学. 27 (4), 2012 (印刷中). (査読有)
- ② M. Iwata, S. Suzuki, Y. Asai, T. Inoue, K. Takagi. Involvement of nitric oxide in a rat model of carrageenin-induced pleurisy. *Mediators Inflamm.* 2010: Article ID 682879 (11 pages), 2010. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 岩田全広, 坂野裕洋, 土田和可子, 長谷紀志, 鈴木重行. 熱刺激によるデキサメタゾン誘導性筋萎縮の進行抑制効果と heat shock protein 27 の発現状況. 第 66 回日本体力医学会大会, 2011 年 9 月 18 日, 海峡メッセ下関・下関市生涯学習プラザ (山口県).
- ② W. Tsuchida, M. Iwata, S. Suzuki, Y. Banno, T. Inoue, Y. Asai. Effect of heat shock on dexamethasone-induced muscle atrophy in cultured skeletal muscle cells. 16th International WCPT Congress, June 23, 2011, RAI Convention Center (Amsterdam,

- Holland).
- ③ H. Watanabe, S. Suzuki, M. Iwata, K. Sakamoto. Effect of transcutaneous electrical stimulation on glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. 16th International WCPT Congress, June 21, 2011, RAI Convention Center (Amsterdam, Holland).
 - ④ 渡辺裕之, 岩田全広, 井上貴行, 坂野裕洋, 鈴木重行. 骨格筋経皮的電気刺激がラットのインスリン感受性に及ぼす影響. 第46回日本理学療法学会大会, 2011年5月27日, シーガイアコンベンションセンター (宮崎県).
 - ⑤ 宮嶋大地, 岩田全広, 坂野裕洋, 長谷紀志, 中村円香, 石本恭太, 矢田絵理奈, 浅井友詞, 鈴木重行. 電気刺激による培養骨格筋細胞の肥大と mTOR 発現量の変化. 第26回東海北陸理学療法学会大会, 2010年11月7日, AOSSA (福井県).
 - ⑥ 岩田全広, 鈴木重行. 伸張刺激と ATP 刺激の併用が培養骨格筋細胞の糖輸送能におよぼす影響. 第65回日本体力医学会大会, 2010年9月18日, 千葉商科大学 (千葉県).
 - ⑦ 坂本 圭, 岩田全広, 鈴木重行. ラット骨格筋への経皮的電気刺激がインスリン感受性に及ぼす影響. 第45回日本理学療法学会大会, 2010年5月28日, メモリアルセンターで愛ドーム (岐阜県).
 - ⑧ 岩田全広, 矢田絵理奈, 坂野裕洋, 井上貴行, 浅井友詞, 鈴木重行. 電気刺激による培養骨格筋細胞の肥大とミオシン重鎖アイソフォームの発現変化. 第15回理学療法の医学的基礎研究会学会大会, 2010年5月26日, 日本福祉大学 (愛知県).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 全広 (IWATA MASAHIRO)
日本福祉大学・健康科学部・准教授
研究者番号：60448264