

2型糖尿病モデルマウスでは、
骨格筋酸化ストレスがミトコンドリア機能を障害し、
運動能力を低下させる

学位論文内容の要旨

【背景と目的】2型糖尿病は肥満・インスリン抵抗性を基盤とした代謝異常であり、動脈硬化の主要な危険因子として心筋梗塞や脳血管障害の発症率を高めることが知られている。糖尿病の予防・治療は適切な食事と適度な運動によって達成されるが、2型糖尿病患者では運動能力が低下していることが示されており、効果的な運動療法を行えないことが病態の更なる悪化・進展へ導くという悪循環を形成している可能性がある。運動能力を規定する因子として骨格筋エネルギー代謝が重要であることはこれまで多くの研究で示されている。2型糖尿病では骨格筋ミトコンドリアでのエネルギー産生において中心的な役割を果たしている電子伝達系機能が低下していることが示されているが、その詳細なメカニズムはわかっていない。糖尿病では全身の酸化ストレスが増加していることが報告されており、さらに心血管組織、脂肪組織および腎臓などの局所臓器において NAD(P)H oxidase (Nox) 由来のスーパーオキシドアニオン (O_2^-) が過剰に増加し、病態の悪化に関わっていることが示唆されている。骨格筋においても Nox が存在していることから、骨格筋 Nox 由来の O_2^- が運動能力を制限している可能性が考えられる。

本研究の目的は、高脂肪食負荷による2型糖尿病モデルマウスを用いて、1) 運動能力は低下しているか、2) 骨格筋ミトコンドリア呼吸能が障害されているか、3) 骨格筋において O_2^- 産生が増加し、その制御によって運動能力が改善するかどうかを明らかにすることであった。

【材料と方法】8~12週齢オス C57BL/6J マウスを無作為に分け、標準食 (ND) または高脂肪食 (HFD) を8週間投与した。さらに HFD 投与マウスから無作為に抽出し、NAD(P)H oxidase 活性阻害剤であるアポサイニン (Apocynin; A) 10 mmol/L 水溶液を飲水用ボトルより投与する群を作成した。本研究では、標準食8週間投与群 (ND群)、高脂肪食8週間投与群 (HFD群)、高脂肪食+アポサイニン8週間投与群 (HFD+A群) で実験を行った。

8週間飼育したマウスを、6時間の絶食後に 1mg/g body weight グルコースを腹腔内投与し、糖負荷前後で尾静脈より採血し、血糖測定を行った。同様に6時間の絶食後に麻酔下で各種臓器を摘出し重量測定を行い、下大静脈より採取した血液で血液生化学検査を行った。また臓器摘出前に、麻酔下で心エコーおよびミラーカテーテルによる心内圧測定を行った。運動能力の評価には小動物用トレッドミルを用い、速度漸増負荷を行った。運動量の指標として、マウスの体重を考慮した垂直方向の仕事量 (= 体重 x 重力加速度 x 垂直方向の走行距離) を用い、運動中の呼気ガスを mixing chamber 法で分析し最大酸素摂取量、最大二酸化炭素産生量を計測した。骨格筋ミトコンドリア呼吸能は、両下肢骨格筋よりミ

トコンドリアを単離した後、クラーク型酸素電極を用いて、NADH（グルタミン酸 + リンゴ酸）を基質とした ADP 存在下 (State 3) および ADP 非存在下 (State 4) の酸素消費速度を計測した。同様に単離したミトコンドリアから電子伝達系複合体 III 活性を吸光度計で測定した。下肢骨格筋 O_2 産生量および Nox 活性は、ルシジェニン化学発光法により測定した。

【結果】ND 群と比較して HFD 群で、体重 (31 ± 1 vs 39 ± 1 g, $p < 0.05$)・内臓脂肪重量 (399 ± 48 vs 2035 ± 54 mg, $p < 0.05$)・空腹時血糖 (108 ± 7 vs 207 ± 16 mg/dL, $p < 0.05$)・インスリン (0.28 ± 0.05 vs 1.11 ± 0.33 ng/mL, $p < 0.05$)・中性脂肪 (69 ± 5 vs 125 ± 16 mg/dL, $p < 0.05$) が有意に増加した。また糖負荷試験でも HFD 群でいずれの時間経過においても有意に血糖値が増加した。一方、血圧や心機能には影響がなかった。トレッドミルテストでは、ND 群と比較して HFD で仕事量が 36%低下し、骨格筋重量で補正した最大酸素摂取量は 11%低下した。また骨格筋ミトコンドリア呼吸能では、State 3 呼吸能が HFD 群で 33%低下し、ミトコンドリア電子伝達系複合体 III 活性においても HFD 群で 31%の低下を認めた。一方、State 4 呼吸能は変化がなかった。さらに骨格筋での O_2 産生量および Nox 活性は、ND 群と比べて HFD 群で有意に増加した。一方アポサイニン投与により、高脂肪食負荷による骨格筋 O_2 の過剰産生が軽減し、体重や糖代謝には影響せずに運動能力・骨格筋ミトコンドリア呼吸能が有意に改善した。

【考察】今回の研究で最も重要な所見は、2 型糖尿病モデルマウスの運動能力が有意に低下したことであった。このことは最大酸素摂取量の低下を伴っていた。さらに HFD 群より摘出した下肢骨格筋ミトコンドリアの State 3 呼吸能の低下および電子伝達系複合体 III 活性の低下を認めた。また HFD 群における運動能力低下と骨格筋ミトコンドリア機能障害は、Nox の活性化を阻害するアポサイニンの慢性投与によって抑制された。この時 HFD 群の骨格筋における O_2 産生および Nox 活性の増加は、アポサイニン投与によって抑制された。したがって、Nox 由来の O_2 がミトコンドリア機能障害を引き起こし、HFD 群の運動能力低下に重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究で観察された HFD 群での運動能力および最大酸素摂取量の低下は、2 型糖尿病患者におけるこれまでの報告と一致する。持続的な運動能力は運動筋のミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に依存している。本研究において、下肢骨格筋から単離したミトコンドリアの State 3 呼吸能は HFD 群で有意に低下し、さらに電子伝達系複合体 III 活性が低下した。このことは糖尿病モデルマウスにおいて最大酸素摂取量が低下したことを支持するものである。

HFD 群の運動能力低下および骨格筋ミトコンドリア機能異常に骨格筋における Nox 由来の O_2 が関与していた。同様の糖尿病モデル動物で脂肪、血管、腎臓などの臓器で Nox 由来の O_2 が増加することが報告されているが、骨格筋で増加した O_2 の役割については今回の研究ではじめて明らかにされた。しかし HFD 群において、どのような作用機序で Nox が活性化されるのかは明らかではない。培養平滑筋あるいは内皮細胞を用いた実験においては高濃度グルコース、インスリンあるいは遊離脂肪酸の刺激が直接 Nox を活性化することが示されており、今回のモデルでも高血糖および高インスリン血症が骨格筋において Nox の活性化に関与している可能性が考えられる。また、Nox 由来の O_2 がミトコンドリア機能を障害する詳細な機序も不明である。

【結論】今回の研究において、糖尿病モデルマウスで運動能力が低下し、骨格筋ミトコンドリア機能障害が起こっていること、さらに骨格筋における NAD(P)H oxidase 由来の O_2 産生がこれらの現象に関わっていることを明らかにした。骨格筋 O_2 の制御は糖尿病における運動能力の改善、結果として糖尿病自体の改善に有効な治療法となることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 三 輪 聡 一

学位論文題名

2型糖尿病モデルマウスでは、 骨格筋酸化ストレスがミトコンドリア機能を障害し、 運動能力を低下させる

2型糖尿病は動脈硬化の主要な危険因子の1つである。2型糖尿病患者では運動能力が低下していることが以前から示されているが、詳細なメカニズムについては明らかにされていない。2型糖尿病の予防・治療にとって運動療法は重要であるが、効果的な運動療法を行えないことが病態の悪化・進展へと導いている可能性がある。一方2型糖尿病では全身の酸化ストレスが亢進していることが報告されている。さらに心血管組織などの局所臓器においてNAD(P)H oxidase (Nox)由来のスーパーオキシドアニオン(O_2^-)が増加していることも報告されている。骨格筋にもNoxが存在することから、骨格筋Nox由来の O_2^- が運動能力を制限している可能性が考えられる。本研究の目的は、高脂肪食負荷による2型糖尿病モデルマウスを用いて、1)運動能力は低下しているか、2)骨格筋ミトコンドリア呼吸能が障害されているか、3)骨格筋において O_2^- 産生が増加し、その制御によって運動能力が改善するかどうかを明らかにすることであった。

材料と方法：8~12週齢オスC57BL/6Jマウスを無作為に分け、標準食(ND)または高脂肪食(HFD)を8週間投与した。さらにHFD投与マウスから無作為に抽出し、NAD(P)H oxidase活性阻害剤であるアポサイニン(Apocynin; A)10 mmol/L水溶液を飲水用ボトルより投与する群を作成した。本研究では、標準食8週間投与群(ND群)、高脂肪食8週間投与群(HFD群)、高脂肪食+アポサイニン8週間投与群(HFD+A群)で実験を行った。8週間後に、空腹時採血、糖負荷試験を行った。また心機能評価のため、心エコーおよび心内圧測定を行った。運動能力の評価には小動物用トレッドミルを用い、速度漸増負荷中の走行距離、仕事量および呼気ガスを測定した。骨格筋ミトコンドリア呼吸能は、クラーク型酸素電極を用いてADP存在下(State 3)およびADP非存在下(State 4)の酸素消費速度を計測した。さらに電子伝達系複合体III活性を吸光度計で測定した。下肢骨格筋 O_2^- 産生量およびNox活性は、ルシジェニン化学発光法により測定した。

結果：ND群と比較してHFD群で、体重・内臓脂肪重量・空腹時血糖・インスリン・中性脂肪が有意に増加した。また糖負荷試験では、HFD群で糖負荷後の血糖値が有意に増加した。一方、血圧や心機能には影響がなかった。トレッドミルテストでは、ND群と比較してHFDで仕事量が36%低下し、骨格筋重量で補正した最大酸素摂取量は11%低下した。また骨格筋ミトコンドリア呼吸能は、State 3呼吸能がHFD群で33%低下した。さら

に複合体 III 活性が HFD 群で 31%低下した。骨格筋での O_2 産生量および Nox 活性は、HFD 群で有意に増加した。一方、アポサイニン投与により、高脂肪食負荷による骨格筋 O_2 の過剰産生が軽減し、体重や糖代謝には影響せずに運動能力・骨格筋ミトコンドリア呼吸能が有意に改善した。

考察：本研究では HFD 群の運動能力が低下し、同時に最大酸素摂取量も低下していた。さらに HFD 群の骨格筋ミトコンドリア機能が低下し、酸化ストレスが亢進していた。一方 HFD 群において Nox 活性を抑制したところ、骨格筋での酸化ストレスが減少し、骨格筋ミトコンドリア機能および運動能力が改善した。以上から骨格筋 Nox 由来の酸化ストレスがミトコンドリア機能を障害し、2 型糖尿病モデルマウスの運動能力低下に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに培養平滑筋あるいは内皮細胞を用いた実験にて、高濃度グルコース、インスリンあるいは遊離脂肪酸の刺激が直接 Nox を活性化することが示されており、2 型糖尿病モデルマウスでは高血糖および高インスリン血症が骨格筋 Nox の活性化に関与している可能性が考えられた。

口頭発表に際し、三輪教授から運動中の心機能や血管拡張反応が運動能力に与える影響および正常マウスに薬剤を投与した際の運動能力の変化についての質問がなされた。次いで小池教授から本研究で用いた薬剤（アポサイニン）の臨床応用の可能性についての質問がなされた。最後に筒井教授から動物実験の結果が臨床においても起こり得るか否かについての質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果および過去の文献を引用し、適切な回答を行った。

この論文は、2 型糖尿病の運動能力低下には骨格筋での酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害が関与していることを示し、2 型糖尿病の新たな治療戦略の可能性として意義のあるものと評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。