

研究テーマ：爪郭部毛細血管から診る糖尿病性運動器血管障害の発症リスク	
研究代表者：保健福祉学部 保健福祉学科 理学療法学科 助教 金指美帆	連絡先：m-kanazashi@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：保健福祉学部 保健福祉学科 看護学コース 教授 津森登志子	
<p><b>【研究概要】</b></p> <p>筋萎縮は健康寿命を短縮させる主要なリスク要因であり、そのリスクを早期に捉え予防する必要がある。筋線維を取り巻く毛細血管の退行を起点として筋萎縮が発症することから、筋萎縮発症リスクを早期発見するための指標として『毛細血管の退行』に着目した。本研究では、糖尿病モデル動物を用い、爪郭部毛細血管形態と、筋毛細血管退行及び筋萎縮との関連性について検証した。結果、①筋萎縮に先行して毛細血管退行が生じること、②筋萎縮が進行する前に爪郭部毛細血管形態に異常所見が非侵襲的に観察できることを明らかにした。</p>	

**研究内容・成果**

**【背景】** 超高齢社会を迎えた本邦において、『骨格筋の健康維持』は健康長寿社会実現に必要不可欠であり、加齢や糖尿病などの慢性疾患により進行する筋萎縮(サルコペニア)の予防は喫緊の課題である。慢性疾患や加齢により血液中の生化学的ストレス物質(終末糖化産物、活性酸素種、炎症性サイトカインなど)が増加することで、大小様々な血管の障害が誘発されることから、全身で毛細血管のリモデリングが同時的に生じていると考えられる。そこで、骨格筋内の毛細血管の状態を、体表から観察可能な毛細血管から非侵襲的に評価できると着想を得た。本研究では、糖尿病モデル動物の爪郭部毛細血管形態と、筋毛細血管退行及び筋萎縮との関連性を検証し、筋萎縮の前兆である筋毛細血管退行を示す爪郭部毛細血管所見を検出することを目的とし、組織形態学的・分子生物学的な検証を実施した。

**【方法】** 群分け：対照群(SDラット)、及び非肥満型2型糖尿病群(SDTラット)の2群を経時的に2時点(血糖値判断)で試料採取した。全4群にて下記の検証及び解析を実施した。

**<段階1>実験動物を用いた検証：糖尿病の進行が爪郭部毛細血管に与える影響**

筋毛細血管の構造、筋量、筋機能、及び血液や骨格筋中の糖化産物や、活性酸素種、炎症性サイトカインなどの発現を解析し、爪郭部毛細血管と各解析項目との関連性を検証した。

**<段階2>筋毛細血管退行や筋萎縮を反映する爪郭部毛細血管異常所見の特定と分類**

段階1で得られた結果から、筋毛細血管退行と筋萎縮の有無や進行度に応じた爪郭部毛細血管の異常所見を分類した(図1)。さらに、血管退行と筋萎縮の関連を分子生物学的に解析した。8週目および18週目における対照群(CON)および糖尿病群(SDT)の2群間比較には対応のないt検定を用い、有意水準は5%未満とした。統計解析には統計ソフト GraphPad Prism

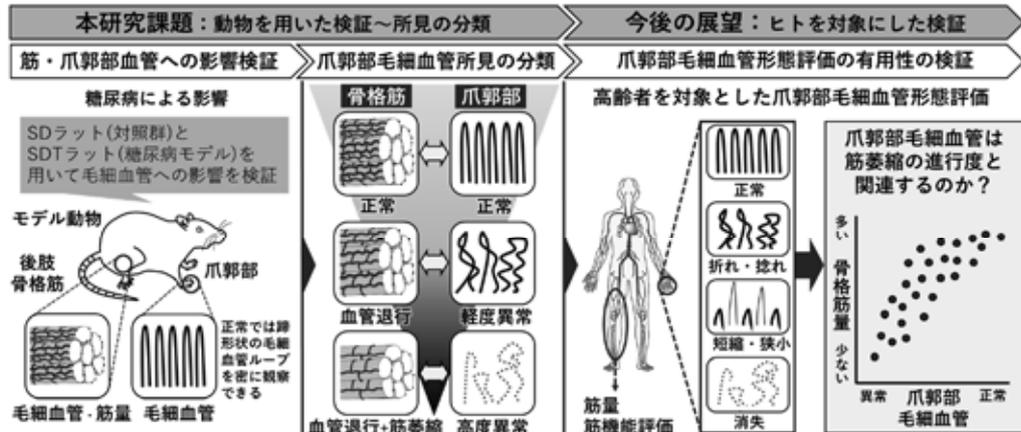


図1 本研究の概要と研究の流れ

ver. 7 を用いた。解析により得られた測定値は平均値±標準誤差で表示した。

**【結果】** 10週齢から実験を開始し、8週間経過時点(8w)では常時血糖値に対照群との差を認めなかったが糖負荷試験の結果、耐糖能異常が認められた。また、8wの段階では、速筋(足底筋; PL&EDL)および遅筋(ヒラメ筋; SOL)とともに各群間に重量および筋線維横断面積に差を認めず、筋萎縮は生じていないことを確認した(図2)。一方で、筋線維あたりの毛細血管数(C/F ratio)は、8wにおいてCON群と比較してSDT群が有意に低値を示し、骨格筋毛細血管の退行を認めた(図2)。血糖値は12週以降急激な増加を示し、16週にてモデル動物全てにおいて200mg/dl以上を呈し、糖尿病発症を確認した(図3)。また、2群間の爪郭部毛細血管形態を経時的に解析した結果、SDT群では8w以降、出血や炎症の所見が観察され、18週目(18w)では血管径の狭小化および血管数の減少が観察された(図4)。以上の結果から、高血糖曝露期間の延長(糖尿病発症)による骨格筋の萎縮(図5)に先行して、耐糖能異常、骨格筋の毛細血管退行および爪郭部毛細血管(非侵襲的に観察が可能)の形態異常がみられることが明らかになった。

骨格筋の量や質の変化に関わる分子メカニズムについてウェスタンブロッティング法で解析したところ、筋タンパク質合成に関わるシグナル(S6rp)は8週の時点でCON群に比べて活性化していたが、18週の時点でCON群と同程度となった。一方で、骨格筋のタンパク質分解に関わる因子については、主要な分解経路であるユビキチンプロテアソーム系の活性化は、8週および18週ともにCON群と同程度であったが、オートファジーに関連する因子(LC3B)の発現量が18週目の時点で増加していた。これらのことから、18週目において筋タンパク質合成と分解のバランスが、オートファジー系の活性化により分解優位となったため、筋萎縮が起こった示唆される。

骨格筋の毛細血管を制御するメカニズムについて、毛細血管の新生を促す因子(VEGF)は8週目および18週目ともにCON群との差を認めなかった。一方で、毛細血管の退行に関与する因子(TSP-1)については18週目の時点で発現量増加が見られた。筋萎縮を呈する前段階における毛細血管退行のメカニズムには今回検証したVEGFやTSP-1以外の因子の関与が疑われ、今後さらなる検証が必要であると考えている。

**【結論】** 筋萎縮に先行して骨格筋の微小血管障害が生じること、そして、筋の萎縮や機能不全が進行する前に非侵襲的に爪郭部毛細血管形態に異常所見を観察可能であることを明らかにした。本研究は、糖尿病が爪郭部と骨格筋の毛細血管に及ぼす影響を解析する初めての研究であり、爪郭部毛細血管評価により筋毛細血管退行を早期に検出できれば、それに引き続く筋萎縮の進行に対して予防的に介入できると考えられる。

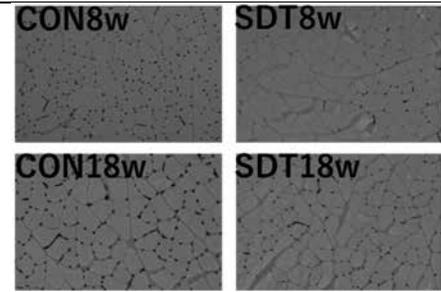


図2 CON群およびSDT群における観察開始から8wおよび18wのアルカリホスファターゼ染色画像(血管染色)

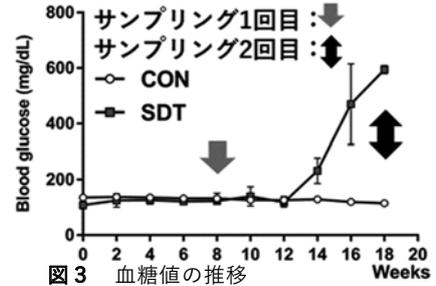


図3 血糖値の推移

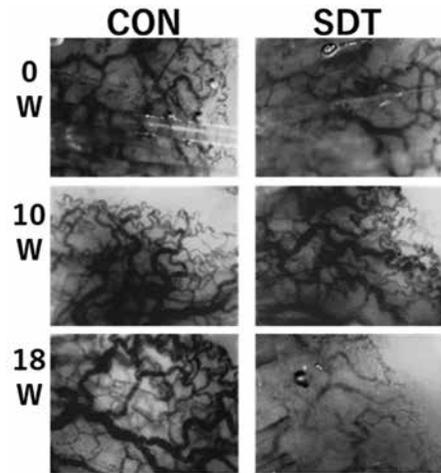


図4 CON群およびSDT群における、観察開始時(0w)、観察開始から10週間目(10w)および18週間目(18w)の爪郭部毛細血管の撮影画像

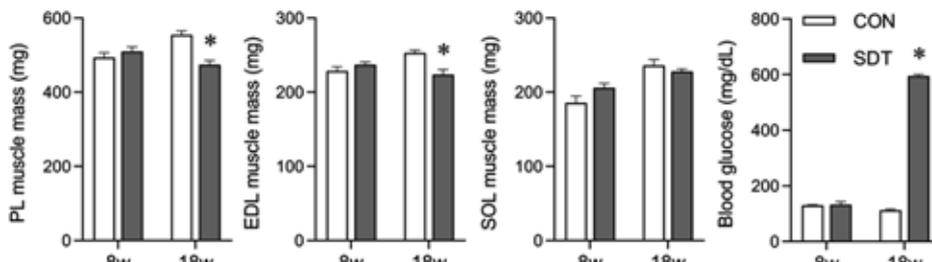


図5 筋重量(PL・EDL・SOL)および血糖値。\*は各週齢でのCON群に対する有意差あり(p<0.05)。