

(続紙 1)

京都大学	博士 (人間・環境学)	氏名	近藤 浩代
論文題目	Effects of exercise on capillary regression and inhibitory expression of angiogenic factors in the rat skeletal muscle of type 2 diabetes (2型糖尿病のラット骨格筋における毛細血管退行及び血管新生因子の発現抑制に対する運動の効果)		
(論文内容の要旨)			
<p>2型糖尿病の罹患者は、日本を含む東アジアを中心に世界的に急増している。2型糖尿病によって生じる合併症の発症率は、新規治療薬の開発や運動療法が普及してきたにも関わらず、2型糖尿病の罹患者の増加にともなって上昇している。糖尿病の合併症は血管障害に起因するものが多く、早期に微小血管が障害を受け、その後は大血管障害へと移行していく。したがって、糖尿病による合併症を予防するには、微小血管障害を予防することが重要であると考えられる。本学位申請論文では、2型糖尿病の合併症に関係する骨格筋での毛細血管障害に焦点をあて、毛細血管退行の解析とそれを予防するための運動の効果について検討した。</p> <p>第1章では、本論文の研究背景と目的を説明した。先行研究から糖尿病を発症した骨格筋では有酸素的な代謝に優れた筋線維の割合が減少していること、骨格筋全体での有酸素的な代謝が低下していること、毛細血管密度が減少していることについて説明して、糖尿病における骨格筋と毛細血管の特徴をまとめた。とくに毛細血管の退行は糖尿病の合併症に深く関係することから詳細な観察が必要であること、従来の組織染色による方法では毛細血管障害を適切に評価することが困難であることを説明した。そこで、毛細血管の退行を解析するために、毛細血管を可視化して評価する方法を検討する必要があること、骨格筋の種類(遅筋・速筋)での毛細血管構造の特徴を確認する必要があることを説明した(第2章での実験)。また、2型糖尿病の骨格筋における毛細血管退行の特徴(第3章での実験)や2型糖尿病の骨格筋での毛細血管退行に対する運動の予防・改善効果(第4章での実験)について検証することを説明した。</p> <p>第2章では、骨格筋での毛細血管構造を可視化して、遅筋や速筋での毛細血管構造の特徴を確認することを目的に実験を行った。ペンシル型生体顕微鏡で正常なラットのヒラメ筋(遅筋)と腓腹筋表層部(速筋)の血流動態について<i>in situ</i>で検討した。ヒラメ筋では腓腹筋表層部と比較して毛細血管や吻合毛細血管が多いことが明らかになった。記録された画像より時間-空間的解析法で赤血球の流速や毛細血管径を測定し、ヒラメ筋では腓腹筋表層部と比較して緩やかな赤血球の流速と細い毛細血管径を持つことが明らかになった。また、赤血球の流速は毛細血管径に関係していることが明らかになった。さらに、ヒラメ筋では腓腹筋表層部と比較して血管新生関連因子の発現量が高いことが明らかになった。これらの結果から、ヒラメ筋では、毛細血管や吻合毛細血管が豊富に存在し、血管新生因子や有酸素的な代謝が高いことが示された。さらに、共焦点レーザー法による三次元構造解析によって、吻合毛細血管を含めた毛細血管構造の可視化や毛細血管密度の解析が可能であることが検証された。</p> <p>第3章では、2型糖尿病モデル動物であるGoto-Kakizaki (GK) ラットを用いた骨格筋での毛細血管の三次元構造解析から、毛細血管の形態的な変化について検討した。毛細血管を三次元構築した画像から、糖尿病の骨格筋では毛細血管容積が半減していることが明らかになった。正常なラットと糖尿病を有するラットの骨格筋では毛細血管数に違いは認められなかったが、糖尿病のラットの骨格筋で毛細血管径が減少していることが明らかになり、毛細血管容積の減少は毛細血管径の低下によることが示された。また、糖尿病を有するラットの骨格筋では、血管新生因子の発現量が減少しており、血管新生抑制因子の発現量が増大していることが明らかになり、血管新生調節が負に傾いている</p>			

ことが示された。さらに、様々な血管新生因子の関連を解析したところ、angiopoietin/tie-2経路でangiopoietin-2/angiopoietin-1比（血管内皮細胞の結合状態を示す指標）が上昇しており、血管内皮細胞の結合状態が低下していることが明らかになった。一方、vascular endothelial growth factor (VEGF) には変化が認められず、血管新生抑制因子であるthrombospondin-1の発現量が増大することによって血管退行を導いていることが明らかになった。これらの結果から、2型糖尿病の骨格筋では毛細血管の後退を惹起するシグナル（とくにthrombospondin-1）が発現して、毛細血管網の後退を導いていることが示された。

第4章では、2型糖尿病モデル動物であるGKラットの骨格筋での毛細血管退行に対する低強度運動の効果について検証した。2型糖尿病の骨格筋では有酸素的な代謝が低下して、ミトコンドリア新生等に関係するperoxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) の発現量に減少が認められた。一方、低強度運動は骨格筋におけるPGC-1の発現量の減少を改善し、低下していた有酸素的な代謝を回復させた。また、骨格筋の毛細血管退行に対して、低強度運動は毛細血管数を増加させる役割を有することが明らかになった。これらの結果から、低強度運動によって骨格筋での有酸素的な代謝が向上することで、毛細血管退行を予防できたと結論した。血管新生因子の解析では、血管新生抑制因子であるthrombospondin-1の発現量の増大が運動によって抑制され、糖尿病によるVEGF/thrombospondin-1比の低下を抑制する調節が行われたことが示された。

第5章では、第2章から第4章までの実験結果をまとめて総合考察を行った。糖尿病の骨格筋では、毛細血管退行が惹起されていること（第3章）、低強度運動は糖尿病によって生じる骨格筋での毛細血管退行を予防できること（第4章）、これらの変化には血管新生因子と血管新生抑制因子の調節機構が作用していること（第3、4章）を説明した。また、低強度運動は、毛細血管退行に対して有効な予防法であること、血管新生抑制因子の発現を抑制できることを説明した。

(論文審査の結果の要旨)

糖尿病による合併症は、血管障害に起因するものが多く、毛細血管レベルでの微小血管障害から始まり、その後、大血管の破綻へと進行する。したがって、毛細血管の変化を早期に捉えて、毛細血管障害を予防することが糖尿病による合併症の予防につながる。

本学位申請論文では、骨格筋内の毛細血管に焦点をあて、糖尿病モデル動物の骨格筋における毛細血管網の変化について検討している。申請者は、毛細血管は組織特有の構造を示すことから、骨格筋での毛細血管構造の特徴を遅筋と速筋の間で比較することから研究を始めている。骨格筋では、筋線維と縦走する毛細血管の他に毛細血管同士を結合する吻合毛細血管が走行している。従来から毛細血管構造を観察するために組織染色を用いた方法が使用されてきたが、平面的な組織切片から毛細血管網（とくに吻合毛細血管）を評価することは困難であった。そこで本学位申請論文では、吻合毛細血管を含めた毛細血管網の詳細な観察を可能にする立体的（三次元）構造を可視化する方法を使用した。可視化された遅筋と速筋における毛細血管の形態的な相違や糖尿病における骨格筋での毛細血管網の退行的な変化を検討した先行研究はこれまでになく、本学位申請論文には独創的な研究成果が含まれている。

毛細血管の新生と退行には、血管新生因子や血管新生抑制因子の調整機構が作用している。血管新生因子にはangiopoietin/tie-2経路やvascular endothelial growth factor (VEGF) 経路が含まれ、angiopoietin/tie-2経路は内皮細胞の結合状態を調整して、新たな毛細血管が形成されたときに重要な役割を担う。また、血管新生抑制因子と共に作用することにより毛細血管退行を促す。本学位申請論文では、毛細血管の新生と退行に関係する血管新生因子や血管新生抑制因子による調整機構が検討されており、さらに、細胞の低酸素状態で発現する低酸素誘導因子であるhypoxia-induced factor-1 α (HIF-1 α) も検討されており、これらの解析によって新しい知見が得られている。

本学位申請論文では、最初に骨格筋での毛細血管構造の特徴を遅筋と速筋で比較している。ラットのヒラメ筋（遅筋）と腓腹筋表層部（速筋）における毛細血管の血流動態について*in situ*で検討している。毛細血管内での赤血球の流速は毛細血管径に関係していることを明らかにした。また、遅筋は速筋と比較して多数の吻合毛細血管が存在することや血管新生関連因子の発現が高いことを明らかにした。さらに、毛細血管の三次元構造を共焦点レーザー法で可視化し、遅筋と速筋の毛細血管構造の相違を明らかにした（第2章）。本方法は学位申請者らが開発した独自の方法であり、本学位申請論文の一連の実験で使用されている。本研究の成果は、*Muscle and Nerve* (45巻、242-249頁、2012年。DOI: 10.1002/mus.22267) に掲載されている。

近年、糖尿病の罹患者が世界的に増加し、合併症を有する糖尿病の罹患者も急増している。糖尿病の合併症は、高血糖の影響による微小血管の障害から始まる。本学位申請論文では、糖尿病の骨格筋における毛細血管構造の変化を三次元構造解析から検討している（第3章）。その結果、糖尿病の骨格筋では毛細血管容積が半減していることを明らかにした。さらに、毛細血管数は変化を示さないが、毛細血管径が減少していることを明らかにし、毛細血管容積の減少は毛細血管径の低下によることを示した。これは従来の平面的な二次元解析では得られない結果であり、毛細血管構造を三次元で可視化することによって得られた独創性のある研究成果である。さらに、血管新生関連因子の解析によって、糖尿病の骨格筋では血管新生因子であるangiopoietin経路でangiopoietin-2/angiopoietin-1比が上昇しており、血管内皮細胞の結合状態が低下していることを明らかにした。一方、VEGFには変化が認められず、血管新生抑

制因子であるthrombospondin-1の発現量が増大していることが明らかになった。これらの結果から、2型糖尿病の骨格筋では毛細血管の後退を惹起するthrombospondin-1の発現量が増大して、毛細血管網の後退を導いていることを明らかにした。本研究の成果は、*Nutrition and Metabolism* (8巻、77号、2011年。DOI: 10.1186/1743-7075-8-77) に掲載されている。

糖尿病の管理には、薬物療法の他に運動療法が重要となる。本学位申請論文では、低強度運動が骨格筋での毛細血管退行に対して有効な予防法になることを検証した(第4章)。2型糖尿病の骨格筋では有酸素的な代謝が低下し、ミトコンドリア新生等に関係するperoxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) の発現量の減少が認められた。一方、低強度運動は骨格筋のPGC-1の発現量の減少を抑えて、低下していた有酸素的な代謝を改善した。また、2型糖尿病の骨格筋での毛細血管退行に対して、低強度運動は毛細血管数を増加させる役割を有することが示された。申請者は、これらの結果から骨格筋の代謝が向上することによって酸素需要が増大し、毛細血管退行が予防されたものと推察している。血管新生因子の解析では、低強度運動によって血管新生抑制因子であるthrombospondin-1の発現量の増大が抑制され、糖尿病によるVEGF/thrombospondin-1比の低下を抑制する調節が行われていることを明らかにした。本研究の成果は、*Muscle and Nerve* (51巻、391-399頁、2015年。DOI: 10.1002/mus.24316) に掲載されている。

以上のように、本学位申請論文では、糖尿病の骨格筋では毛細血管退行が生じていること、血管新生因子と血管新生抑制因子の調整機構が毛細血管退行を導いていること、さらに、低強度運動は骨格筋の毛細血管退行の予防に有効であることを明らかにした。これらの研究成果は、人を使用した今後の臨床研究に対して基礎的なデータを提供できる。実験動物を使用した研究であるが、価値が高い研究成果が得られたと結論される。

以上のとおり、本学位申請論文の研究成果は国際学術雑誌に掲載されており、その独創性と学術的価値は高く評価できる。また、臨床研究へと発展する可能性を有する基礎的な知見を提供しているところも評価に値する。したがって、本学位申請論文は、共生人間学専攻 認知・行動科学講座に相応しい内容を備えており、博士(人間・環境学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年3月31日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降