

44

助成番号 0144

コレシストキニンA受容体を欠損し、肥満、糖尿病を自然発症するラットにおける、運動と食餌制限の改善効果と、その効果に対する食塩摂取量の影響

宮坂 京子(東京都老人総合研究所 臨床生理部門)

市川 みね子(東京都老人総合研究所 栄養学部門)

高齢化とともに、糖尿病患者及びその予備軍は急増している。糖尿病は、遺伝的な素因と共に、日常生活習慣の蓄積が関与しているエネルギー代謝性疾患である。肥満や糖尿病など生活習慣病が増加したことの主な原因は、飽食と運動不足により、人間生来の概日リズム(サーカディアンリズム)が乱れ、生物の基本的生理機能であるリズムと代謝調節に異常を来した可能性がある。我々はエネルギー摂取とエネルギー消費という栄養学の基本的な概念に基づき、実験モデル動物を用いて、代謝レベルから調べてきた。ヒトを対象にエネルギー代謝の日内リズムを検討することは、現実には困難であるので、糖尿病実験モデル動物として開発された Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットを用いた。OLETF ラットは、中等度の肥満と、18週齢からインスリン非依存性糖尿病(NIDDM)を発症するという特徴をもつ。本研究は、NIDDM モデル OLETF ラットを長期飼育し、加齢・糖尿病の進行とともに、代謝リズム動態はどのように変るのか、エネルギー燃焼系(糖質・脂質燃焼比)の動態がどのように変化していくのか、食餌制限、軽度運動がこれらの変化を阻止できるか、また食餌中の食塩量の増減により、血圧上昇の度合いを調節できるかどうかを検討した。

今回の結果は、体重増加を制限することにより、すべてについて改善がみられた。血圧と食塩、体重の関係をみると、体重の相違が小さいもの同志では、食塩摂取量が多い方が血圧が高くなる。が、食塩摂取量が少なくても、体重が多ければ、それだけで血圧が高くなった。

肥満そのものが、血圧を上昇させる要因になっている、ということは、経験的に知られているが、メカニズムについては、諸説がある。最近では、脂肪組織から分泌されるサイトカイン等の関与が想定されている。レプチンは交感神経の緊張を高める作用があり、実際、OLETF ラットでは、血中レプチン濃度の上昇がみられる。また、TNF-alpha, IL-6 などのサイトカインも脂肪組織から分泌されインスリン抵抗性を増強する。我々は、インスリン抵抗性を改善するチアゾリジン系薬剤であるピオグリタゾンを用いて OLETF ラットに長期投与したところ、肥満は全く改善しないにもかかわらず、耐糖能の改善がみられ、血中 TNF-alpha の著明な低下を認めた。このラットにおいて、血圧を測定したところ、 132 ± 4.5 mmHg と低下していた。血中レプチン、インスリン、中性脂肪、コレステロールなどのパラメーターは、ピオグリタゾンでは、全く、変化していなかったことから、TNF-alpha の低下が血圧低下に関わっている可能性も考えられる。

8

助成番号 0144

コレシストキニンA受容体を欠損し、肥満、糖尿病を自然発症するラットにおける、運動と食餌制限の改善効果と、その効果に対する食塩摂取量増減の影響

宮坂 京子 (東京都老人総合研究所 臨床生理部門)

市川 みね子 (東京都老人総合研究所 栄養学部門)

①研究目的

高齢化とともに、糖尿病患者及びその予備軍は急増している。糖尿病は、遺伝的な素因と共に、日常の生活習慣の蓄積が関与しているエネルギー代謝性疾患である。肥満や糖尿病など生活習慣病が増加したことの主な原因は、飽食と運動不足により、人間生来の概日リズム(サーカディアンリズム)が乱れ、生物の基本的生理機能であるリズムと代謝調節に異常を来した可能性がある。我々はエネルギー摂取とエネルギー消費という栄養学の基本的な概念に基づき、実験モデル動物を用いて、代謝レベルから調べてきた。ヒトを対象にエネルギー代謝の日内リズムを検討することは、現実には困難であるので、糖尿病実験モデル動物として開発された Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットを用いた¹⁾。OLETF ラットは、中等度の肥満と、18週齢からインスリン非依存性糖尿病(NIDDM)を発症するという特徴をもつ in bred strain である¹⁾。

本研究は、NIDDM モデル OLETF ラットを長期飼育し、加齢・糖尿病の進行とともに、代謝リズム動態はどのように変るのか、エネルギー燃焼系(糖質・脂質燃焼比)の動態がどのように変わって変化していくのか、食餌制限、軽度運動がこれらの変化を阻止できるか、また食餌中の食塩量の増減により、血圧上昇の度合いを調節できるかどうかを検討した。

②研究方法

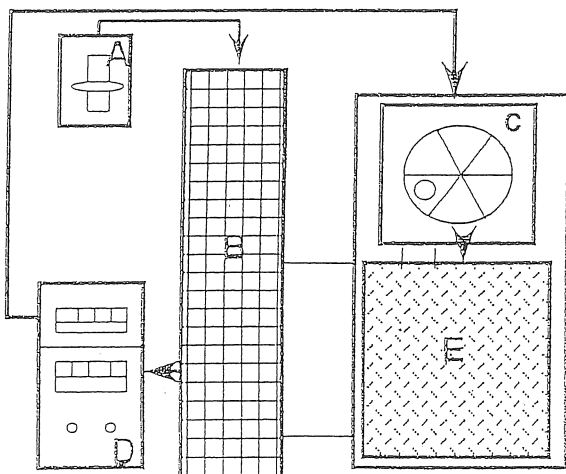
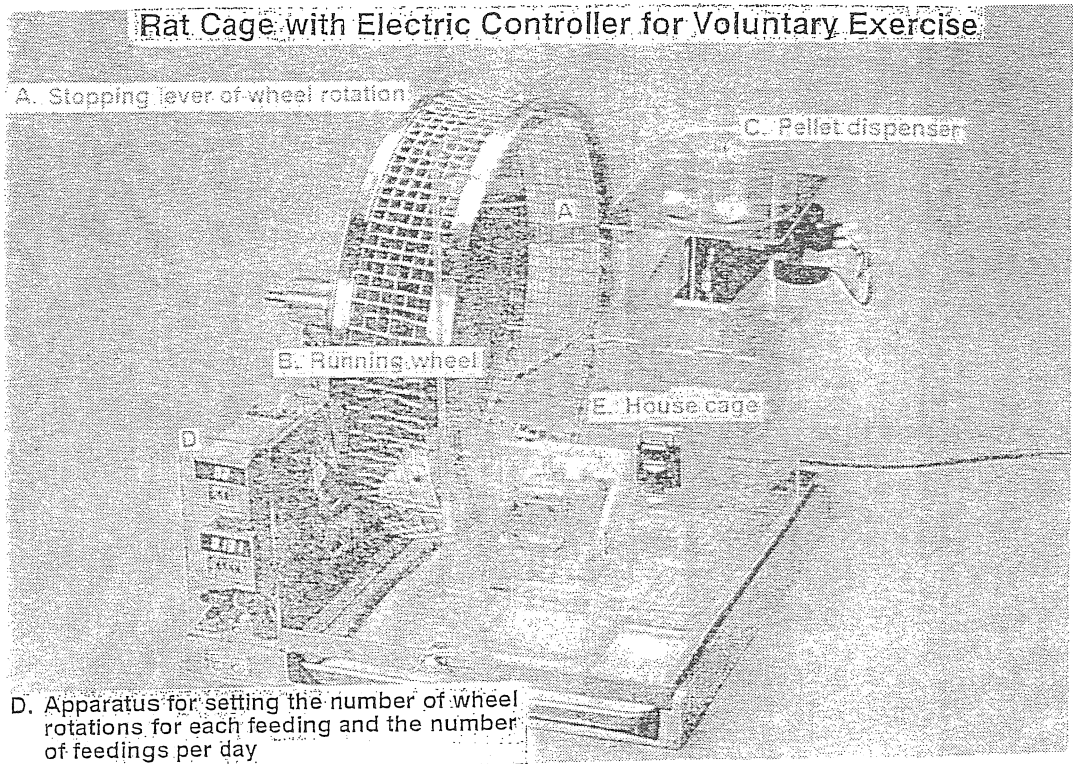
1. 動物

雄性 OLETF ラットを用い、固形飼料(オリエンタル酵母 KK, CRF-1)を対照とし、高食塩食として8%NaClを混入した飼料を用い、生後12週齢より投与を開始した。

1. 実験計画

実験群として、1) CRF-1 自由摂食群、2) CRF-1 自由摂食+3000 m running/日、3) CRF-1 摂餌制限群(20g/日)、4) 高食塩食自由摂食群、5) 高食塩食摂餌制限群とした。OLETF, LETO ラットは、自由走行させると、少ない個体は1,000 m 前後、多いものは10,000 m/日以上走行するというばらつきが大きい²⁾。我々はすでに3,000 m/日の走行が基礎代謝の約10%程度のエネルギーを消費するという、基礎データをえている³⁾。そこで、日常生活で消費される程度のエネルギーを消費する運動として、3000 m running/日を課した。実験には、我々が開発した running wheel 付き個別ケージを用いる (Fig. 1)。

Fig. 1



- A. Stopping lever of the wheel rotation
- B. Running wheel
- C. Pellet dispenser
- D. Apparatus for setting the number of wheel rotations for each feeding and the number of feeding per day
- E. House cage

Fig. 1. Upper panel; The photograph of running wheel, Lower panel; Schema.

さらに対照群として、Long-Evans-Tokushima (LETO)ラットを CRF-1 食にて自由摂食させ、同様のパラメーターを測定した。

ラットは 12 時間明暗サイクル(08:00-20:00)21℃室温条件下で、個別ケージで飼育した。摂食量、体重、血圧を 1—4 週毎に測定し、また、一部のラットでは、経口耐糖能試験(oGTT)を行った。実験開始前ならびに、24 週齢において、エネルギー消費量を測定した。

3. 測定項目と方法

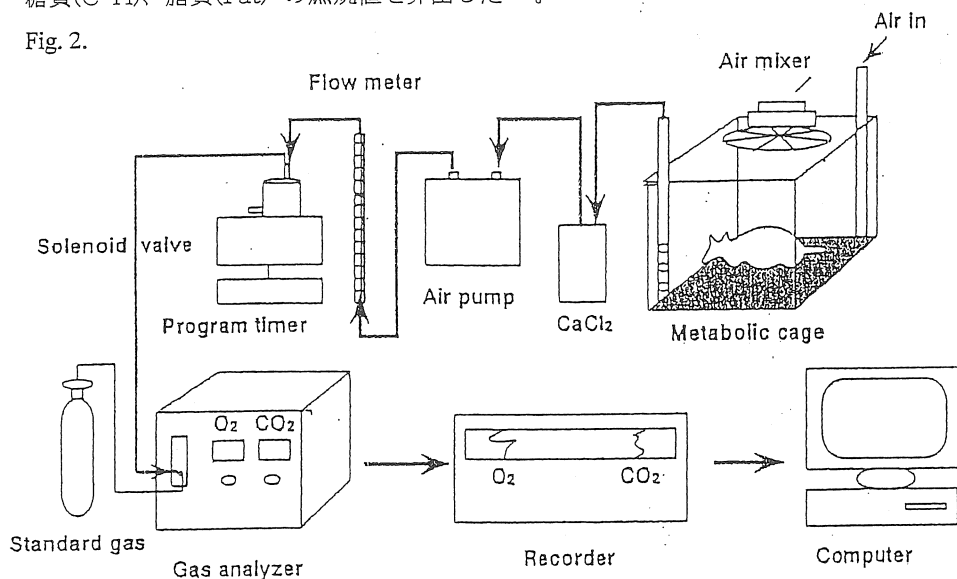
血圧は、室町機械 KK 製無加温型非観血式血圧計を用いて、尾動脈血圧を 3 回測定し、平均値を測定値とした。

耐糖能検査は、一晚絶食ののち、ブドウ糖 2 g/kg body weight を経口投与し、投与前、30,60,120 分の血糖値を簡易測定器 (山之内製薬製) で測定した。

エネルギー代謝測定が終了してから後、午前 10—12 時に尾静脈より採血し、HbA1c と血糖を測定、エーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血、肝臓、腎臓、膵臓を摘出した。血液は EDTA 添加試験管に採取し、遠心分離後、インスリン、中性脂肪、コレステロール、一部で TNF-alpha, leptin を測定した^{4, 5)}。

エネルギー消費量は、呼気ガス測定のために、個別ケージと同様なサイズのアクリル製チャンパーの中で、O₂-CO₂ ガス分析装置 (NEC Medical Systems Co. Ltd., Model Respina 1H26) を用いて測定した。連続 24 時間の酸素消費量および炭酸ガス産生量を測定し、エネルギー消費量と 1 時間当たり呼吸比 (respiratory quotient, RQ) を算出した。呼吸比 (RQ) より、糖質(C-H)、脂質(Fat) の燃焼値を算出した^{6,7)}。

Fig. 2.



* Oxygen and carbon dioxide in the expired air was continuously measured with an automatic analyzer.

Fig. 2. The assay system of energy metabolism.

③研究結果

正常 LETO ラットの CRF-1 による飼育の加齢変化を以下に対比して示した。体重増加は、OLETF ラットほど顕著でなく、oGTT による血糖上昇もすみやかに低下し、血圧も OLETF ラットより低い。臓器重量も同様である。

1. 体重変化と摂食量の変化

CRF-1 摂食群の体重変化を Fig. 3 に示した。自由摂食群では、著しい体重増加がみられたが、3000 m running/日群では、自由摂食群の約 80%、摂餌制限群では、約 60%程度まで体重が低下した(Fig. 3A)。高食塩食自由摂取群も体重増加がみられたが、対照群よりは、低値を示す傾向がみられた。摂餌制限群では、CRF-1 群とほぼ同様の結果を示した (Fig. 3B)。比較のため、LETO の結果を図 2C に示した。高食塩食自由摂取群では、CRF-1 自由摂取群よりも摂食量が低い傾向を示した(CRF-1: 27-34 g に対して高食塩食 21-32 g/日)。LETO ラットの摂食量は 21-26g/日であった。

Fig. 3.

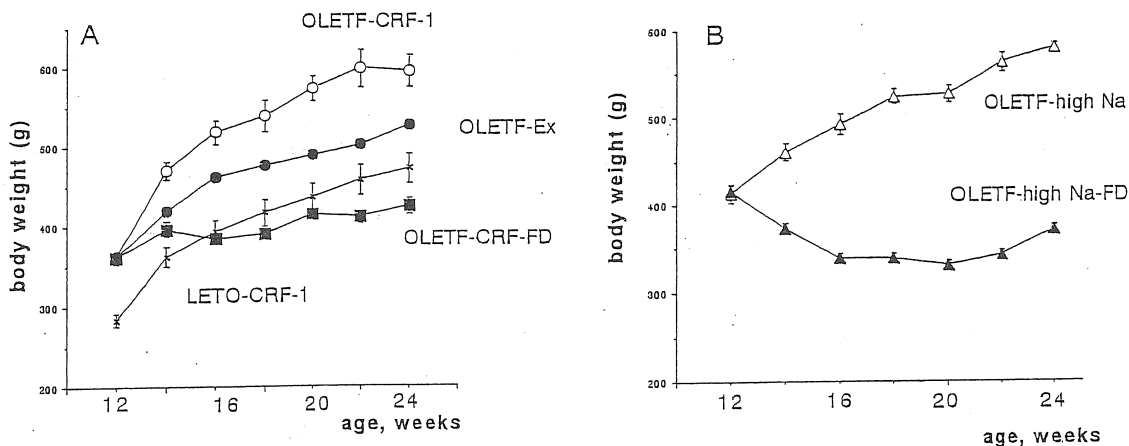


Fig. 3. Changes in body weight. OLETF-CRF-1; Ad lib feeding, OLETF-Ex; 3000 m running/day, OLETF-CRF-FD; food restriction, high Na; high sodium diet. N = 5-8 for each group.

高食塩自由摂食群では、水の多飲がみられたので、糖尿病状態の発症の有無を確認する目的で、一部のラットを用いて、17週齢時に oGTT をおこなったが、耐糖能異常はみとめられなかった (Fig. 4)。23週齢の LETO ラットの oGTT を Fig. 4B に示す。

Fig. 4.

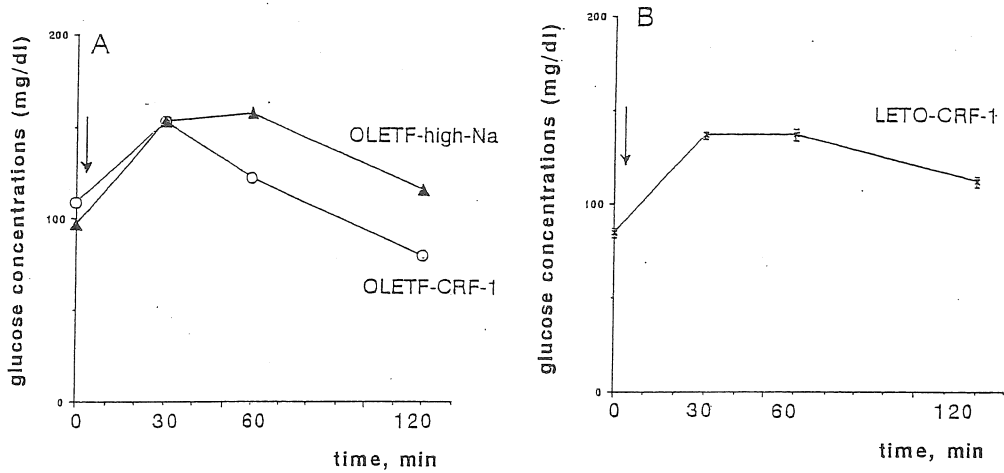
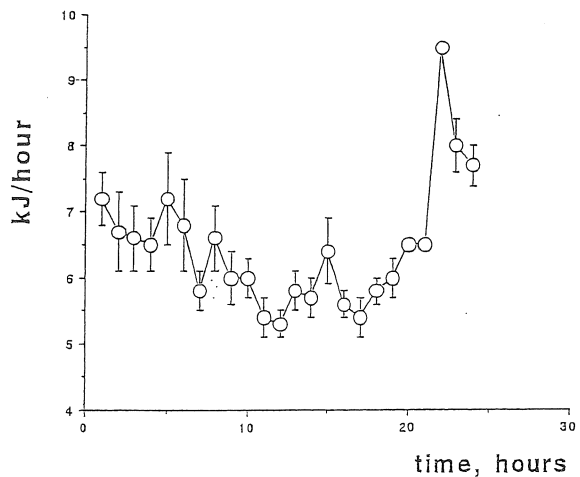


Fig. 4. OGTT in OLETF and LETO rats. The results shown in A are the mean of two OLETF rats at 17 weeks of age selected at random. The results shown in B are the mean \pm SE, $n = 7$ for LETO rats at 23 weeks of age. An arrow indicates the glucose ingestion.

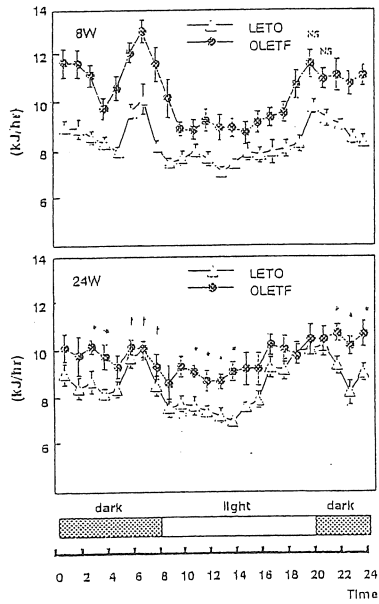
2. エネルギー消費日内変動

OLETF ラットの NIDDM 発症前のエネルギー消費日内リズムは、暗期に2峰性のピークを形成するが、24週齢の OLETF ラットでは、この2峰が消失し平坦化した。しかし、運動、あるいは食事制限により、2峰製が再現された (Fig. 5)。

Fig. 5. Daily energy expenditure in OLETF rats with food restriction. The peaks were reproduced.

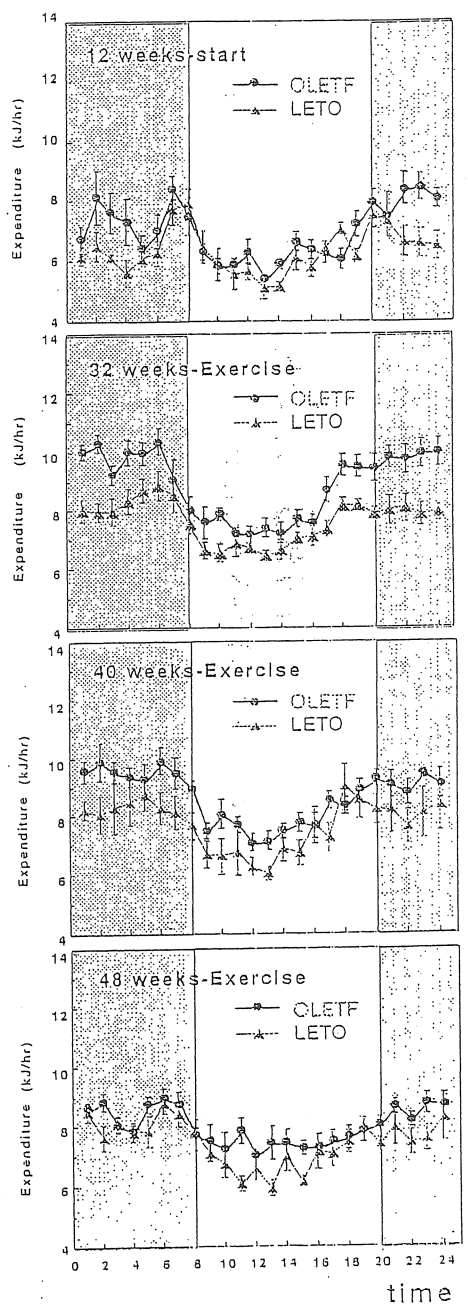


Changes in Energy Expenditure without daily exercise



(Ichi kawa et al. Jpn J Physiol 1998)

Daily exercise without food restriction normalized diurnal rhythm of energy expenditure and improved diabetic state in genetically obese diabetic rats



4. 血圧の変動

血圧はすでに12週齢で、OLETFの方がLETOラットより有意に高値を示した。19週齢では高食塩自由摂取がもっとも高く、CRF-1自由摂取、高食塩制限食、CRF-1制限食の順であった (Table 1)。

Table 1. Systolic blood pressure at 12 and 20 weeks of age

Treatment	OLETF rat			LETO rat	
	CRF ad lib	CRF-FD	high Na ad lib	high Na FD	CRF-1
Age 12 wk	140.7 ± 1.9	-	-	-	120.1 ± 8.5
20 wk	151.9 ± 6.6	133.3 ± 6.1	169.1 ± 5.3	144.6 ± 6.8	139.0 ± 13.6

The value at 12 weeks of age was before treatments. Mean ± SE. ad lib; fed ad libitum, FD; food restriction, high Na; high sodium diet, wk; weeks of age.

5. 主要臓器重量の変化

臓器重量は、各群における体重差が大きいことから、臓器重量/体重 (g/kg) であらわした (Table 2)。肝臓重量は体重減少に伴って、著明に減少した。

Table 2. Ratios of organ wet weight/body weight (g/kg)

Parameters	OLETF			LETO	
	CRF-1 ad lib	CRF-1 FD	high Na ad lib	high Na FD	CRF-1
Liver	3.6 ± 0.1	2.0 ± 1.3	3.1 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1
Pancreas	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.23 ± 0.01

Mean ± SE, the abbreviations were the same as in Table 1.

6. 血中パラメーター

血中パラメーターの変化を Table 2 にしめす。HbA1c と血糖は、CRF-1 自由摂食群でもっとも高値を示した。摂餌制限群は、CRF-1、高食塩群ともに著明な低値を示した。中性脂肪、コレステロール値の変化も同様であった。

Table 3. Blood levels of HbA1, glucose, insulin, triglycerides, cholesterol, leptin, TNF-alpha

	<u>OLETF</u>				<u>LETO</u>
	CRF-1 ad lib	CRF- FD	high Na ad lib	high Na FD	CRF-1
<u>Parameters</u>					
Glucose (mg/dl)	132.9 ± 3.8	61.7 ± 5.0	113.6 ± 3.4	60.3 ± 2.1	106.3 ± 2.5
HbA1c (%)	3.5 ± 0.2	2.56 ± 0.03	2.8 ± 0.05	2.5	2.7 ± 0.03
Insulin (μU/ml)	240.0 ± 24.0				119.0 ± 13.0
TG (mg/dl)	239.6 ± 18.7	19.3 ± 2.3	114.8 ± 13.4	17.0 ± 1.7	73.8 ± 5.3
cholesterol (mg/dl)	131.6 ± 4.3	71.6 ± 4.2	106.5 ± 3.8	102.5 ± 1.7	113.8 ± 2.6
leptin (ng/ml)	273.3 ± 19.3	(Processing)			84.3 ± 9.0
TNF-alpha (pg/ml)	165.1 ± 35.8				86.7 ± 30.9

Mean ± SE, the abbreviations were the same as in Table 1. Ex; exercise = 3000 m running/day. The values of blanks are now determining.

④考察

OLETF ラットは、すでに12週齢で体重がLETO ラットより重く、血圧も高い (Table 1)。いずれも年齢とともに上昇傾向を示した。高食塩自由摂食により、血圧上昇はさらに著明となった。一方、摂餌量を制限し、体重増加を抑制すると、CRF-1 群では、平均値は12週齢よりも低値となり (12週齢群の値とくらべて有意差はない)、高食塩群においても12週齢とほぼ同じ程度まで低下した。今回用いた飼料の食塩濃度とラットの摂食量から換算すると、食塩の摂取量はCRF-1自由摂食群は0.1 g/rat/日、高食塩自由摂食群は1.7 - 2.6 g, CRF-1摂餌制限群では0.1 g 未満、高食塩摂餌制限群では1.6 g である。今回の結果は、体重の相違が小さいもの同志では、食塩摂取量が多い方が血圧が高くなる。が、食塩摂取量が少なくても、体重が多ければ、血圧が高くなる、と、解釈できる。

肥満そのものが、血圧を上昇させる要因になっている、ということは、経験的に知られているが、メカニズムについては、諸説がある。最近では、脂肪組織から分泌されるサイトカイン等の関与が想定されている。レプチンは交感神経の緊張を高める作用があり、実際、OLETF ラットでは、血中レプチン濃度の上昇がみられる。また、TNF-alpha, IL-6 などのサイトカインも脂肪組織から分泌されインスリン抵抗性を増強する⁸⁾。我々は、インスリン抵抗性を改善するチアゾリジン系薬剤であるピオグリタゾンを用いてOLETF ラットに長期投与したところ、肥満は全く改善しないにもかかわらず、耐糖能の改善がみられ、血中 TNF-alpha の著明な低下を認めた⁹⁾。このラットにおいて、血圧を測定したところ、 132 ± 4.5 mmHg と低下していた。血中レプチン、インスリン、中性脂肪、コレステロールなどのパラメーターは、ピオグリタゾンでは、全く、変化していなかったことから、TNF-alpha の低下が血圧低下に関わっている可能性も考えられる。

OLETF ラットにみられる肥満の原因の一つとして、コレシストキニン(CCK)A 受容体の欠損があげられる。ラット CCK-A 受容体遺伝子は、約 10kb で、5つの exon と4つの intron からなりたっている。OLETF ラットでは、プロモーター領域を含み、exon 3 までの約 6.8kb が欠損していた。CCK-A 受容体は、脳内にも存在し、満腹効果を仲介するが、OLETF ラットでは、受容体欠損のため、CCKによる摂食抑制がおこらなかった^{9,10,11)}。

⑤今後の課題

血中インスリン、TNF-alpha, leptin の測定が一部で完了していない。測定予定である。脂肪細胞からサイトカインが分泌されるが、脂肪細胞の大きさによって、分泌能力が異なるという報告がある¹²⁾。脂肪細胞の組織切片から、細胞の大きさを測定する。食事制限や運動によってえられた体重減少の割合より、肝臓重量の減少の割合が大きいことから、おそらく肥満の軽減による脂肪肝の改善があると考えられる。今後組織像の検索をして確認する。

⑥文献等

1. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, and Natori T: Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. *Diabetes* 41,1422-1428 (1992)
2. Shima K, Shi K, Mizuno A, Sano T, Ishida K, and Noma Y: Exercise training has a long-lasting effect on prevention of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty Rats. *Metabolism* 45, 475-480 (1996)
3. Ichikawa M, Fujita Y, Ebisawa H, Ozaki T: Effects of long-term, light exercise under restricted feeding on age-related changes in physiological and metabolic variables in male Wistar rats. *Mech Age Dev* 113, 23-35 (2000)
4. Yoshida Y, Ichikawa M, Ohta M, Kanai S, Kobayashi M, Ichimaru Y, Shimazoe T, Watanabe S, Funakoshi A, Miyasaka K. A PPAR γ agonist influenced daily profile of energy expenditure in genetically obese diabetic rats. *Jpn J Pharm* 88: 279-184 (2002)
5. Funakoshi A, Miyasaka K, Kanai S, Masuda M, Yasunami Y, Nagai T, Ikeda S, Jimi A, Kawanami T, and Kono A: Pancreatic endocrine dysfunction in rats not expressing the cholecystokinin-A receptor. *Pancreas* 12, 230-236 (1996)
6. Ichikawa M, Miyasaka K, Fujita Y, Shimazoe T, and Funakoshi A: Disappearance of diurnal rhythm of energy expenditure in genetically diabetic obese rats. *Jpn J Physiol* 48, 211-214 (1998)
7. Ichikawa M, Kanai S, Ichimaru Y, Funakoshi A, and Miyasaka K: The diurnal rhythm of energy expenditure differs between obese and glucose-intolerant rats and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 130, 2562-2567 (2000)
8. Spiegelman BM, and Flier JS: Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87, 377-389 (1996)
9. Funakoshi A, Miyasaka K, Shinozaki H, Masuda M, Kawanami T, Takata Y, and Kono A: An animal model of congenital defect of gene expression of cholecystokinin (CCK)-A receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 210, 787-796 (1995)
10. Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A, Miyasaka K, Kataoka K, Goto T, and Kono A: Disrupted cholecystokinin type-A receptor (CCK-AR) gene in OLETF rats. *Gene* 197, 169-175 (1997)
11. Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, Kawanami T, Kono A, and Funakoshi A: Lack of satiety effect of cholecystokinin (CCK) in a new rat model not expressing the CCK-A receptor gene. *Neurosci Lett* 180, 143-146 (1994)
12. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umosono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the changes of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* 101, 1354-1361 (1998)

Effects of different concentrations of dietary salt on beneficial effect of light, long-term exercise and food restriction in genetically diabetic rats with a disrupted cholecystokinin A receptor gene

Kyoko Miyasaka, Mineko Ichikawa
Department of Clinical Physiology, Department of
Nutrition, Tokyo Metropolitan Institute of
Gerontology

Summary

OETF rats were developed as a model of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) with mild obesity. The daily profiles of energy expenditure associated with two peaks (one between 05:00 and 08:00, the other between 20:00 and 22:00) were observed at 8 weeks of age (without NIDDM), while these two peaks disappeared at 24 weeks of age with NIDDM. Laboratory rats are normally confined to cages that markedly restrict their physical activity. In these rats, the resting energy expenditure accounts for 90 % of the total daily energy expenditure, while the daily physical activity in humans consumes 30% of the total daily energy expenditure. We loaded light exercise, which consumed energy equivalent to physical activity, and examined whether this light exercise improved age-related decline in energy metabolism and glucose intolerance in OETF rats. The effect of 60% food restriction was also determined. These treatments improved pathological findings in OETF rats. Then, we examined the different concentrations of dietary salt on blood pressure in these rats. When the body weights were similar, the higher salt intake resulted in the higher blood pressure. However, obesity itself, regardless salt concentrations in the diet, increased blood pressure. The possible mechanisms of high blood pressure induced by obesity might be due to increased plasma levels of adipocytokines, such as leptin, TNF-alpha, and IL-6. The size of fat cells and the plasma concentrations of cytokines will be measured in the future.