

2型糖尿病の不安障害併発機序の解明と多様な運動療法が及ぼす影響の基礎的検証

越智亮介 (PT)¹⁾, 藤田直人 (PT)¹⁾, 久恒一義¹⁾,
Nguyen Tien Son (MD)¹⁾²⁾, 浦川 将 (PT)¹⁾

¹⁾ 広島大学大学院医系科学研究科運動器機能医科学

²⁾ Department of Rheumatology and Endocrinology,
103 Military Hospital, Vietnam Military Medical
University

キーワード：2型糖尿病, 情動行動, 運動

はじめに

糖尿病患者は不安障害を合併しやすいことがメタアナリシスで示されているが¹⁾, その発症機序は十分明らかにされていない。現在, 不安障害に対する治療では, おもにセロトニン再取り込み阻害薬や認知行動療法が行われているが, 治療反応性は60%に限られており, 不安障害には様々な生物学的, 心理社会的要因が複雑にかかわっていると考えられている²⁾。神経ペプチドのひとつであるコレシストキニン (以下, CCK) は, おもに大脳辺縁系に局在しており³⁾, 不安の調節に重要であることが示され⁴⁾, 不安障害にかかわる要因として注目されている。

運動は2型糖尿病患者の不安症状を軽減することが報告されている⁵⁾。しかし, 運動が2型糖尿病に合併した不安障害を改善する機序は調べられておらず, その介入効果の科学的根拠は十分に検証されていない。

我々はこれまでの研究で, 過食により2型糖尿病を自然発症するOtsuka Long-Evans Tokushima fatty (以下, OLETF) ラットの不安様行動が亢進しており, 扁桃体基底外側核のCCK陽性細胞の増加が関与する可能性を明らかにしたが, これらの変化が2型糖尿病の病態に伴うものであるかは明らかにされていなかった。そこで, 本研究は, OLETF ラットの情動行動と関連する神経病態の変化が耐糖能低下に伴うものであるか, および, 運動がこれらの変化を改善するかを明らかにすることを目的とし, 食餌量制限や運動が情動行動とCCK陽性細胞に及ぼす影響を検証した。

対象および方法

1. 実験動物と実験群

本研究では, 雄性OLETFラットと, 対照の非糖尿病モデルであるLong-Evans Tokushima Otsuka (以下, LETO) ラットを用いた。すべての実験は, 広島大学動物実験委員会の承認を得て実施された。実験群は, LETOラットを通常飼育する群 (LE群: n = 6), OLETFラットを通常飼育する群 (OL-SE群: n = 6),

OLETFラットの食餌量をLETOラットと同量に制限する群 (OL-FR群: n = 6), OLETFラットを週5日, 暗期の12時間, 1匹ずつそれぞれ回し車を設置したケージに暴露する群 (OL-WH群: n = 8) に分けた。各ケージ暗期12時間における回し車の回転距離を計測し, 各ラットの走行距離とした。

2. 経口ブドウ糖負荷試験

8週齢時点で, 耐糖能を評価するために経口ブドウ糖負荷試験を行った。12時間の絶食後, 体重 (kg) あたり2gのグルコースを経口投与した。糖負荷直前, 糖負荷後30分, 60分, 120分に, 外側尾静脈から採血し, キノプロテイングルコースデヒドロゲナーゼ酵素電極法により, 血糖値を計測した (ACCU-CHEK ST meter, Roche, 東京)。

3. オープンフィールド試験

経口ブドウ糖負荷試験の1日または2日後, 活動量を評価するためにオープンフィールド試験を行った。10分間の自発行動をAnimalTracker (<http://animaltracker.elte.hu>) により解析し⁶⁾, フィールド全体の総移動距離を算出した。

4. 高架式十字迷路試験

オープンフィールド試験の1日後, 不安様行動を評価するために高架式十字迷路試験を行った。10分間の自発行動を撮影し, 全アームへの総進入回数に対するオープンアーム進入回数率を計測した。

5. ホットプレート試験

高架式十字迷路試験の1日後から2日間, 熱刺激に対する反応性を評価するためにホットプレート試験を行った。1日目に, 加温していないプレート上で10分間馴化させた。2日目に, ラットをホットプレート (50 ± 2.5 °C) 上に置き, 逃避反応 (後肢を引っ込める, 後肢をなめる, ジャンプする) を示すまでの潜時を計測した。1回の試行は60秒をカットオフ値とし, 3試行の逃避反応潜時の平均値を算出した。

6. 組織学的解析

ホットプレート試験の2日または3日後に, すべてのラットを生理食塩水で灌流脱血し, 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。その後, 脳を摘出し, 同溶液で24時間後固定した。30 μm厚の凍結切片を作製し, CCKの免疫組織化学染色を行った。CCK陽性細胞は細胞体の直径が10 μmよりも大きいものを大型, 小さいものを小型として分類し, 扁桃体基底外側核における陽性細胞密度を計測した。

7. 統計学的解析

すべての測定値は平均±標準誤差で示した。血糖値および行動学的指標は、各群の比較のため、一元配置分散分析を行い、主効果を認めた場合に Bonferroni 法による多重比較を行った。CCK 陽性細胞密度は、実験群の要因と細胞体の大きさの要因の二元配置分散分析を行い、主効果または交互作用を認めた場合、Bonferroni 法による多重比較を行った。有意水準は 5% とした。

結 果

1. 血糖値

経口ブドウ糖負荷試験における血糖値は、LE 群と比較して、OL-SE 群のみ有意に高値を示し、OL-SE 群と比較して、OL-FR 群および OL-WH 群は有意に低値を示した (LE 群: $16,867.5 \pm 411.7$ mg/dL \times min, OL-SE 群: $24,042.5 \pm 1,000.9$ mg/dL \times min, OL-FR 群: $17,970 \pm 884.0$ mg/dL \times min, OL-WH 群: $16,638.8 \pm 535.0$ mg/dL \times min)。

2. 走行距離

OL-WH 群の暗期 12 時間あたりの走行距離の平均は、 4.9 ± 1.1 km だった。

3. オープンフィールド試験

総移動距離は、LE 群と比較して、OL-SE 群、OL-WH 群は有意に低値を示したが、OLETF ラットの 3 群間に有意差を認めなかった (LE 群: 33.8 ± 3.9 km, OL-SE 群: 16.3 ± 3.1 km, OL-FR 群: 25.7 ± 4.6 km, OL-WH 群: 9.3 ± 2.1 km)。

4. 高架式十字迷路試験

オープンアーム進入回数率は、LE 群と比較して、OLETF ラットの 3 群がすべて有意に低値を示したが、OLETF ラットの 3 群間に有意差を認めなかった (LE 群: $24.5 \pm 4.0\%$, OL-SE 群: $3.0 \pm 3.0\%$, OL-FR 群: $4.5 \pm 3.2\%$, OL-WH 群: $1.4 \pm 1.4\%$)。

5. ホットプレート試験

逃避反応潜時は、LE 群と比較して、OLETF ラットの 3 群がすべて有意に高値を示し、OL-SE 群と比較して OL-WH 群が有意に高値を示した (LE 群: 5.0 ± 0.7 秒, OL-SE 群: 19.9 ± 2.6 秒, OL-FR 群: 25.5 ± 2.3 秒, OL-WH 群: 31.2 ± 3.0 秒)。

6. CCK 陽性細胞密度

扁桃体基底外側核における CCK 陽性細胞密度は、実験群の有意な主効果、実験群と細胞体の大きさの有意な交互作用を認めた。多重比較の結果、細胞体が小さい CCK 陽性細胞密度のみ、LE 群と比較して、OLETF ラットの 3 群がすべて有意に高値を示した (図 1)。

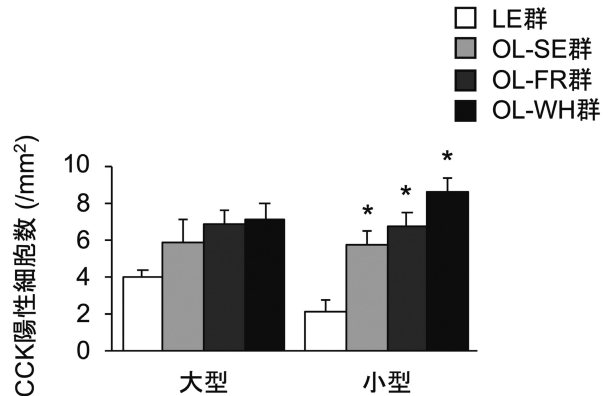


図 1 扁桃体基底外側核の CCK 陽性細胞密度
CCK 陽性細胞を細胞体の直径が $10 \mu\text{m}$ より大きいものを大型、小さいものを小型に分類し、扁桃体基底外側核における CCK 陽性細胞密度を計測した。CCK: コレシストキニン、LE 群: LETO ラットを通常飼育する群、OL-SE 群: OLETF ラットを通常飼育する群、OL-FR 群: OLETF ラットの食餌量を制限する群、OL-WH 群: OLETF ラットを回し車を設置したケージに暴露する群。*は LE 群に対する有意差を示す ($p < 0.05$)。

考 察

本研究で、8 週齢時点の OLETF ラットは耐糖能が低下しており、オープンフィールド試験の総移動距離から活動量低下、高架式十字迷路のオープンアーム進入回数率から不安様行動亢進、ホットプレート試験の逃避反応潜時から熱刺激に対する反応性低下を示すことが明らかになった。これらの OLETF ラットの情動行動の変化は、先行研究の結果と一致している⁷⁾⁸⁾。慢性ストレスによる抑うつモデル動物は、熱刺激や機械刺激に対する反応性が低下すると報告されており⁹⁾、OLETF ラットの熱刺激への反応性低下はうつ様行動の一端を示している可能性がある。

また、本研究の食餌量制限は、OLETF ラットの耐糖能低下および活動量低下を抑制したが、不安様行動、熱刺激に対する反応性は変化させなかった。これらの結果から、OLETF ラットは耐糖能の違いにかかわらず不安様行動、うつ様行動が亢進していることが示唆された。

運動は不安様行動やうつ様行動を減少させると考えられている¹⁰⁾。一方、本研究の回し車運動は、OLETF ラットの耐糖能低下を抑制したが、情動行動の変化を抑制しなかった。先行研究では、本研究より短時間の回し車運動やトレッドミル運動が、不安様行動やうつ様行動を抑制したと報告されている¹¹⁾¹²⁾。今後は、情動行動へ影響し得る、回し車を設置したケージへの暴露時間および期間を検討する必要がある。

本研究で、OLETF ラットは耐糖能の違いにかかわらず扁桃体基底外側核の CCK 陽性細胞が増加していた。扁桃体への CCK 投与は不安様行動を亢進させ¹³⁾、基底外側核における CCK の選択的ノックダウンは不安様行動やうつ様行動を減少させる⁴⁾。これらの結果から、

OLETF ラットの不安様行動やうつ様行動の亢進に扁桃体基底外側核の CCK 陽性細胞増加が関与していることが示唆された。

結 論

OLETF ラットは耐糖能の違いにかかわらず不安様行動、うつ様行動が亢進しており、これらの変化には扁桃体基底外側核における CCK 陽性細胞の増加が関与していることが示唆された。運動による不安様行動、うつ様行動の抑制効果は認めなかった。

文 献

- 1) Smith KJ, Béland M, *et al.*: Association of diabetes with anxiety: A systematic review and meta-analysis. *J Psychosom Res.* 2013; 74(2): 89-99.
- 2) Bystritsky A: Treatment-resistant anxiety disorders. *Mol Psychiatry.* 2006; 11(9): 805-814.
- 3) Vanderhaeghen JJ, Mey JDE, *et al.*: Immunohistochemical localization of cholecystokinin- and gastrin- like peptides in the brain and hypophysis of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980; 77(2): 1190-1194.
- 4) Del Boca C, Lutz PE, *et al.*: Cholecystokinin knock-down in the basolateral amygdala has anxiolytic and antidepressant-like effects in mice. *Neuroscience.* 2012; 218: 185-195.
- 5) Ligtenberg PC, Godaert GL, *et al.*: Influence of a physical training program on psychological well-being in elderly type 2 diabetes patients. *Diabetes Care.* 1998; 21(12): 2196-2197.
- 6) Gulyás M, Bencsik N, *et al.*: AnimalTracker: An ImageJ-Based Tracking API to Create a Customized Behaviour Analyser Program. *Neuroinformatics.* 2016; 14(4): 479-481.
- 7) Yamamoto Y, Akiyoshi J, *et al.*: Increased anxiety behavior in OLETF rats without cholecystokinin-A receptor. *Brain Res Bull.* 2000; 53(6): 789-792.
- 8) Li XL, Aou S, *et al.*: Spatial memory deficit and emotional abnormality in OLETF rats. *Physiol Behav.* 2002; 75(1-2): 15-23.
- 9) Shi M, Qi W, *et al.*: Increased thermal and mechanical nociceptive thresholds in rats with depressive-like behaviors. *Brain Res.* 2010; 1353: 225-233.
- 10) Alkadhi KA: Exercise as a Positive Modulator of Brain Function. *Mol Neurobiol.* 2018; 55(4): 3112-3130.
- 11) Patki G, Li L, *et al.*: Moderate treadmill exercise rescues anxiety and depression-like behavior as well as memory impairment in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav.* 2014; 130: 47-53.
- 12) Lynch CA, Porter B, *et al.*: Access to voluntary running wheel exercise: Prevention of anxiety-like behavior in chronically stressed rats, but potentiation of ethanol intake/preference. *Physiol Behav.* 2019; 206: 118-124.
- 13) Belcheva I, Belcheva S, *et al.*: Asymmetry in behavioral responses to cholecystokinin microinjected into rat nucleus accumbens and amygdala. *Neuropharmacology.* 1994; 33(8): 995-1002.