

博士論文

多発性嚢胞腎モデルラットの肝病変に対する長期的運動とメトホルミンの効果

東北大学大学院医学系研究科障害科学専攻

機能医科学講座内部障害学分野

佐藤 陽一

目次

I.	要約	1
II.	背景	3
III.	方法	10
	1) 多発性肝嚢胞モデル動物	
	2) 実験グループ	
	【プロトコール1：メトホルミンの効果の検討】	
	【プロトコール2：長期的運動の効果の検討】	
	3) 収縮時血圧の測定と安楽死，血漿サンプルの採取および生化学検査	
	4) 組織の処理	
	5) 肝嚢胞と肝線維化の評価	
	6) 免疫染色法	
	7) イムノブロット解析	
	8) 統計学的検定	
IV.	結果	16
	【プロトコール1】	
	1) 体重，生化学検査に対するメトホルミンの影響	
	2) 肝重量と肝嚢胞，肝線維化	
	3) 細胞増殖の調整蛋白発現	
	4) 嚢胞液分泌と線維化の調整蛋白発現	
	【プロトコール2】	
	1) 体重と血圧，生化学検査に対する長期的運動の影響	

2)	運動耐容能に対する長期的運動の影響	
3)	肝重量	
4)	肝嚢胞と肝線維化, 細胞増殖	
5)	細胞増殖の調整蛋白発現	
6)	嚢胞液分泌と線維化の調整蛋白発現	
V.	考察	21
VI.	結論	31
VII.	謝辞	32
VIII.	文献	33
IX.	図表の説明	41
X.	図表	48

図 1. PLD における病態形成の Signaling cascades

図 2. 各プロトコールの時間経過

図 3. メトホルミンによる体重や食餌摂取量, 水分摂取量への影響

図 4. メトホルミンによる肝嚢胞への影響

図 5. メトホルミンによる肝線維化と細胞増殖マーカーへの影響

図 6. メトホルミンによる細胞増殖の調整蛋白発現への影響

図 7. メトホルミンによる線維化の調整蛋白発現への影響

図 8. 長期的運動の体重や食餌摂取量, 水分摂取量への影響

図 9. 長期的運動の運動耐容能への影響

図 10. 長期的運動による肝嚢胞への影響

図 11. 長期的運動による肝線維化と細胞増殖マーカーへの影響

図 12. 長期的運動による細胞増殖の調整蛋白発現への影響

図 13. 長期的運動による線維化の調整蛋白発現への影響

図 14. 長期的運動とメトホルミンが PLD の Signaling cascades に及ぼす影響

表 1. PLD の分類

表 2. PLD に対する薬物療法

表 3. 肝臓疾患患者に対する長期的運動の効果

表 4. 肝疾患モデル動物に対する長期的運動の効果

表 5. メトホルミンによる各種パラメーターの影響

表 6. 長期的運動による各種パラメーターの影響

1 I. 要約

2 背景

3 多発性肝嚢胞 (polycystic liver disease : PLD) は肝臓に嚢胞と線維化を来す遺伝
4 性疾患であり, 現在のところ有効な治療法は確立していない. AMP-activated pro-
5 tein kinase (AMPK) を活性化する作用のあるメトホルミンは腎嚢胞に対して抑制
6 効果があり, 肝嚢胞に対しても抑制効果がある可能性がある. 同様に AMPK を活性
7 化する長期的運動は, 様々な内部障害モデルにおいて臓器保護効果がある. 肝疾患
8 モデルにおいても長期的運動の抗炎症効果や抗線維化効果が報告されているが,
9 PLD に対する効果の報告はない. そこで, 腎嚢胞とともに肝嚢胞を形成する poly-
10 cystic kidney (PCK) ラットにおいて, AMPK 活性化薬であるメトホルミンと長期
11 的運動の効果を検討した.

12 方法

13 5 週齢の雄性 PCK ラットをメトホルミン群 (n = 7) と対照群 (n = 6) に分け,
14 メトホルミン群にはメトホルミン (300 mg/kg/day) を 12 週間経口投与し, 介入終
15 了後に肝組織像と細胞増殖・嚢胞液分泌・線維化の調節因子を検討した. また, 同
16 週齢の雄性 PCK ラットを運動群と安静群に無作為に分け, 同週齢の雄性 Sprague-
17 Dawley (SD) ラットを対照群 (各群 n = 10) とした. 運動群には中強度のトレッ
18 ドミル運動 (傾斜角度 0°, 速度 28 m/分, 60 分間/日, 5 日/週) を 12 週間実施し
19 た. 介入前後で心肺運動負荷試験を実施し, 介入終了後に肝組織像と細胞増殖・嚢
20 胞液分泌・線維化の調節因子を検討した.

21 結果

1 嚢胞指数，線維化指数，嚢胞周囲の Ki-67 陽性細胞数は，対照群と比べてメトホルミン群で有意に減少した． AMPK リン酸化は，対照群と比べてメトホルミン群で
2 有意に増加した．細胞増殖を調節する mammalian target of rapamycin (mTOR)
3 と extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化，嚢胞液分泌を調節する
4 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) と aquaporin 1
5 (AQP1) の蛋白発現は，対照群と比べてメトホルミン群で有意に減少した．線維化
6 を調節する transforming growth factor - β (TGF - β) と Type 1 collagen
7 (COL1) の蛋白発現は，対照群と比べてメトホルミン群で有意に減少した．

8 長期的運動の介入前では， SD ラットと比べて PCK ラットで運動耐容能の低下を認めた． 12 週間の介入後の運動耐容能は，安静群と比べて運動群で有意に高かった． 肝重量や嚢胞指数，線維化指数， Ki-67 陽性細胞数は，安静群と比べて運動群で有意に減少した． AMPK リン酸化は，安静群と比べて運動群で有意に増加し，
9 mTOR と ERK のリン酸化， CFTR， AQP1， TGF - β ， COL1 の蛋白発現は，安静
10 群と比べて運動群で有意に減少した．

15 結論

16 PCK ラットにおいて，長期的運動とメトホルミンは共に AMPK をリン酸化し、
17 胆管上皮細胞の過剰増殖の抑制，嚢胞液異常分泌や線維化調節因子の低下を伴って、肝嚢胞増大や肝線維化を抑制する．長期的運動の PLD 進行抑制には，AMPK
18 活性化が関与することが示唆される．
19

1 II. 背景

2 多発性肝嚢胞の概要

3 多発性肝嚢胞（polycystic liver disease : PLD）は，肝内胆管の形成異常により発
4 症する遺伝性肝疾患である．肝嚢胞は思春期以降に明らかになり，成人期早期～中期
5 において徐々に増大する¹⁾．日本における総患者数は不明だが，3万～5万人程度と
6 推測されている¹⁾．多発性肝嚢胞診療ガイドライン¹⁾では，PLDは（1）常染色体優
7 性多嚢胞性肝疾患（autosomal dominant polycystic liver disease : ADPLD）と（2）
8 常染色体優性多発性嚢胞腎（autosomal dominant polycystic kidney disease :
9 ADPKD）に大きく分類される（表1）．さらに，ADPKDは常染色体劣性多発性嚢胞
10 腎（autosomal recessive polycystic kidney disease : ARPKD）とともに肝線維性多
11 嚢胞性疾患に分類され，肝嚢胞に加えて肝線維化も重要な病態となる¹⁾．肝嚢胞自体
12 は死に至る病態ではなく，嚢胞が増大するまでは無症状の患者も多いが，約3%には
13 重篤な症状を認める¹⁾．肝嚢胞による腹腔内臓器の機械的圧迫が，腹部不快感や背部
14 痛，胃食道逆流，呼吸困難といった症状を惹起し，生活の質（Quality of Life : QOL）
15 の低下につながる^{2,3)}．大きくなった肝嚢胞は体幹前傾を制限することから，日常生
16 活動作（Activity of Daily Living : ADL）の制限にもつながることが報告されている
17 ³⁾．また，ADPKDは日本における新規透析導入原疾患の第5位で，85%以上が肝嚢
18 胞を合併する¹⁾．PKD患者の透析導入後は，肝嚢胞が増大を続けてQOLを損なう他，
19 嚢胞感染が致死的経過をとるなど，本疾患で末期腎不全に至った場合に特有の問題が
20 生じる⁴⁾．そのため，PKDにおいて，肝嚢胞に対する何らかの対策を講じる必要があ
21 る．

22

1 嚢胞形成の機序と遺伝的背景

2 PLD は ciliopathy の一つで、肝内胆管上皮における一次繊毛の異常に起因すると
3 考えられている¹⁾。一次繊毛は胆汁の流れを感知し、細胞内の cyclic AMP (cAMP)
4 や Ca^{2+} 濃度を調整する⁵⁾。肝嚢胞のみを呈する ADPLD では第 19 染色体上にある
5 protein kinase C substrate 80K-H (PRKCSH) 遺伝子や SEC63 遺伝子に変異が生
6 じていることが明らかになっているが、遺伝子変異と嚢胞形成の機序がどのように関
7 連するかは不明である¹⁾。しかしながら、胆管上皮細胞における signaling cascade の
8 変化については報告されており、過剰な細胞増殖や嚢胞内液の分泌異常が肝嚢胞の形
9 成・増大につながると報告されている⁶⁾。過剰な細胞増殖は mitogen-activated protein
10 kinase (MAPK) 経路の一つである extracellular signal-regulated kinase (ERK)
11 や phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /Akt 経路を介した mammalian target of ra-
12 pamycin (mTOR) のリン酸化が関係する⁷⁾。嚢胞内液の分泌異常は、胆管上皮細胞
13 の管腔側表面に発現している Cl 輸送体である cystic fibrosis transmembrane con-
14 ductance regulator (CFTR) や Cl/HCO_3^- 交換輸送体である anion exchanger 2 (AE2),
15 水チャネルである aquaporin 1 (AQP1) の過剰な発現を介して行われる⁸⁾。まず過剰
16 に発現した CFTR が、Cl を管腔側へ分泌する。その後、AE2 が Cl を利用して、 HCO_3^-
17 を管腔側への能動輸送する。この輸送によって生じたわずかな浸透圧勾配によって、
18 水が AQP1 を介して嚢胞内へ分泌される⁸⁾。また、尿細管上皮細胞由来の細胞株であ
19 る Madin-Darby canine kidney 細胞を使用した ADPKD モデルでは、AMP-activated
20 protein kinase (AMPK) が mTOR や CFTR に対して抑制する作用が報告されてい
21 る⁹⁾。しかしながら、ADPKD モデルである Han:SPRD ラットでは、腎臓のホモジ
22 ネットサンプル中の AMPK リン酸化を、嚢胞を持たない野生型と比較すると発現が

1 低下していた¹⁰⁾。このことから、PLDの肝嚢胞においてはAMPKが不活性化されて
2 いる可能性がある(図1)。これらの肝嚢胞が進展する機序は、原因遺伝子は異なるが
3 ADPLDとADPKDに共通である。

4

5 肝病変に対する治療法

6 PLDに対する治療法として、内科的治療法には嚢胞内容穿刺吸引・硬化療法、肝動
7 脈塞栓術があり、外科的治療法には嚢胞開窓術、肝部分切除術がある。嚢胞内容穿刺
8 吸引・硬化療法はCTガイド下に嚢胞を穿刺し、内容液を吸引・排液した後、硬化剤
9 を注入する治療法である。一時的に症状緩和しやすいが、21-75%以上に再発を認め、
10 21-52.9%に発熱や腹痛などの合併症を生じると報告されている¹⁾。肝動脈塞栓術は、
11 嚢胞に分布する動脈を塞栓することで、嚢胞の縮小を図る治療法である。全身状態不
12 良例や手術が困難な症例にも施行可能という特徴がある。しかし実施した症例数が少
13 なく、再発例の詳細なデータはない。合併症は54.5%に生じることが報告されている
14 ¹⁾。嚢胞開窓術は、外科的治療の中で最も侵襲が少なく、肝臓の表面に嚢胞が位置す
15 る際に適応がある。再発率は20-72%、合併症の発生率は33-69%と報告されてい
16 る。合併症には腹水や出血、胆汁漏などがある¹⁾。肝部分切除術は、嚢胞が存在する
17 部分を切除する治療法だが、脈管の変位や肝線維化により、手術難易度が高い。再発
18 率は3-34%で、合併症の発症率は20-83%と報告されている。合併症には、嚢胞開
19 窓術と同様、腹水や出血の他、創部感染や胸水などがある¹⁾。以上のように、いずれ
20 の治療法も症状を一時的に緩和するが、再発や合併症の可能性が高い¹⁾。唯一の根治
21 療法である肝移植術も、免疫抑制剤による腎不全の発症や移植後死亡率が15.4%であ
22 る点に注意が必要である¹⁻³⁾。また、PLDに対して様々な薬物療法の効果も報告され

1 ている (表 2)。Hogan らは、PLD 患者に対して、ソマトスタチンのアナログ製剤オ
2 クトレオチドを 1 年間使用し、肝容積の $4.95 \pm 6.77\%$ の減少と、QOL の改善を報告
3 した¹¹⁾。しかし静注部痛や下痢などの副作用があり¹¹⁾、投薬中断後には肝容積が再
4 び増大することが報告された¹²⁾。ADPKD では、腎嚢胞に対してバソプレシン V2 受
5 容体拮抗薬であるトルバプタンが保険認可され、本邦でも使用されている。肝嚢胞に
6 対しては、トルバプタンの著効した ADPKD 症例が報告されているが¹³⁾、大規模研
7 究では明らかな効果は認められていない¹⁴⁾。その理由として、胆管上皮細胞にはバソ
8 プレシン V2 受容体が存在しないためと考えられている⁷⁾。以上のことから、PLD に
9 対する新たな治療法の確立が急務となっている。

10

11 メトホルミンの作用機序

12 メトホルミンはビグアナイド系薬剤の一つで、2 型糖尿病の第一選択薬として一般
13 に使用されている薬剤である。ミトコンドリア内膜上にある呼吸鎖複合体 I の活性を
14 阻害して、adenosine triphosphate (ATP) 生成を抑制することによって AMP/ATP
15 比を増加させ、細胞の代謝ストレスセンサーである AMPK を活性化する^{15,16)}。この
16 メトホルミンは、腎嚢胞に対しては抑制効果を持つことが報告されている。Takiar ら
17 は C57BL/6 マウスの腎臓を、嚢胞形成させるために 8-Br-cAMP とともに培養した
18 ADPKD モデルの腎臓を使用して、メトホルミンが腎嚢胞を抑制することを報告した
19 ⁹⁾。これまでにメトホルミンが肝嚢胞に与える効果は検討されていないが、AMPK 活
20 性化が嚢胞抑制に効果的である可能性がある。

21

22 肝疾患に対する運動療法の効果

23 肝疾患において長期的運動が様々な効果を示すことが近年報告されている (表 3-

1 4). 非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD) 患者
2 では, 3 回/週, 40 分/日の 60% Peak $\dot{V}O_2$ のエルゴメーターを 12 週間実施すること
3 で, 運動前と比較して肝脂肪蓄積が 14.3%減少したと報告されている¹⁷⁾. 代償性肝硬
4 変患者では, 3 回/週, 40 分/日, 60-80% Peak $\dot{V}O_2$ のエルゴメーターを 8 週間実施
5 し, 非運動群と比較して, Peak $\dot{V}O_2$ の増加 (5.3mL/kg/min) と QOL の向上を認め
6 た¹⁸⁾. 非代償性肝硬変では, 肝移植待機者において, エルゴメーターとレジスタンス
7 トレーニングの複合運動を 12 週間実施すると, 運動前と比較して Peak $\dot{V}O_2$
8 (1.7mL/kg/min), 6 分間歩行距離 (40m), 膝伸展筋力 (7 kg) が改善することが報
9 告されている¹⁹⁾. 肝細胞癌患者における運動療法の効果に関する大規模な検討は現在
10 までにはないが, 健常者を対象とした 9.1±2.9 年のコホート研究では, 高強度の運動を
11 週に 5 日以上行くと, 肝細胞癌の相対リスクが 44%低下することが報告されている
12 ²⁰⁾. 基礎研究では, 高脂肪食・高コレステロール食の摂取によって脂肪肝と肝線維化
13 を呈する NAFLD モデルラットにおいて 12 週間, 5 日/週, 20m/min (傾斜角度 15
14 度), 60 分/日のトレッドミル運動は, 肝臓全体における Type 1 collagen (COL1)
15 mRNA 発現を減少し, 線維化スコアを改善した²¹⁾. 高濃度のエタノールを経口投与
16 することで, 急性アルコール性肝障害を発症させたモデルマウスにおいて, 事前に 4
17 週間, 5 日/週, 25m/min, 60 分/日のトレッドミル運動を実施することで, アルコー
18 ル投与後のトランスアミラーゼの上昇を抑制した²²⁾. がん抑制遺伝子である
19 Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) が欠損す
20 ることで, 肝細胞癌を発症するモデルマウスにおいては, 32 週間, 5 日/週, 12.5m/min,
21 60 分/日のトレッドミル運動は, 癌細胞増殖を抑制することで, 発癌を予防した²³⁾.
22 この先行研究では, 肝臓全体を使用したイムノブロット解析をしており, 肝臓内の

1 AMPK リン酸化の増加と mTOR 経路の一つである S6 リン酸化の減少を認めている
2 ²³⁾. このことから, PLD においても運動による肝臓内 AMPK リン酸化が mTOR 経
3 路を抑制する可能性がある.

4

5 Polycystic kidney ラットを用いた先行研究

6 Polycystic kidney (PCK) ラットは Sprague-Dawley (SD) ラットのコロニーから
7 発見された突然変異であり, ARPKD を呈する. PCK ラットは腎嚢胞に加え, 全例で
8 肝嚢胞も呈するため, 先行研究では自然発症 PLD モデルとして用いられている ^{24,25)}.
9 この PCK ラットを用いて, これまでに PLD に対して様々な薬物療法が報告されて
10 きた (表 2). mTOR 阻害薬である NVP-BEZ235 の 4 週間の投与は, 胆管上皮細胞
11 増殖と肝嚢胞増大を抑制した ²⁶⁾. ウルソデオキシコール酸の 5 か月間の投与も胆管
12 上皮細胞増殖と肝嚢胞増大を抑制した. このメカニズムとして, ウルソデオキシコー
13 ル酸による胆管上皮細胞の ERK 不活性化が考えられている ²⁷⁾. また, アンジオテン
14 シン II 1 型受容体拮抗薬であるテルミサルタンの 17 週間の投与は, 肝嚢胞増大抑制
15 に加え, 胆管上皮細胞の transforming growth factor- β (TGF- β) 発現を低下させ,
16 肝線維化を抑制した ²⁸⁾. 同様に, Peroxisome proliferator-activated receptor γ
17 (PPAR- γ) 活性化薬であるピオグリタゾンの 17 週間の投与も, 胆管上皮細胞の
18 TGF- β 発現や ERK リン酸化を低下させ, 肝嚢胞増大と肝線維化を抑制した ²⁹⁾. こ
19 のように, PCK ラットの肝嚢胞増大や肝線維化に対して様々な薬物療法が試みられ
20 ているが, 運動療法の報告はこれまでにない.

21

22 仮説と目的

23 AMPK を活性化するメトホルミンが腎嚢胞に対して抑制的に働くという先行研究

1 9)を基に、同様に肝臓全体の AMPK を活性化する運動療法（トレッドミル）^{23,30)}も、
2 胆管上皮細胞の過剰増殖を抑制するという仮説を立てた。本研究では、PLD の肝嚢胞
3 増大や肝線維化に対する長期的運動の効果とその効果の機序を明らかにすることを
4 目的に、PCK ラットにおける AMPK 活性化薬であるメトホルミンとトレッドミル運
5 動の効果を検討した。

6

7

1 III. 方法

2 1) 多発性肝嚢胞モデル動物

3 5 週齢の雄性 SD ラットと PCK ラットを日本チャールズリバー（横浜，日本）か
4 ら入手し，東北大学大学院医学系研究科付属動物実験施設で飼育した．ラットは温度
5 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)，湿度 ($55\pm 10\%$) と明暗時間（12 時間サイクル）を一定にした環境下
6 で飼育し，食餌および水を自由に摂取させた．ADPKD モデルとして Han:SPRD-Cy
7 ラットがあるが，このモデルは肝嚢胞がほとんど形成されないため，今回の研究では
8 使用しなかった．

9 本研究のプロトコールは医学生理学的研究に関する国際指針の勧告の趣旨に沿っ
10 たものであり，東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を得た（2018 医
11 動-020）．

12 本研究は，運動負荷の強度や持続時間，メトホルミンの投与量の検討を検討するた
13 め，プロトコール 1 を 1 回，プロトコール 2 を 2 回の合計 3 回の予備実験を実施し，
14 再現性を確認している．

15

16 2) 実験グループ

17 【プロトコール 1：メトホルミンの効果の検討】（図 2A）

18 1 週間の順化飼育後，PCK ラットを 1) 対照（Control：Con-PCK）群（ $n=6$ ）と
19 2) メトホルミン（Metformin：Met-PCK）群（ $n=7$ ）に無作為に分け，12 週間飼育
20 した．メトホルミン（Metformin Hydrochloride, FUJIFILM Wako Pure Chemical,
21 大阪，日本）は飲水に溶解して経口投与し，先行研究³¹⁾を基に 150mg/kg/日 で 1 週間
22 投与した後， 300mg/kg/日 で 11 週間投与した．定期的に代謝ケージで飼育し，24 時

1 間の飲水量を測定することで、飲水中の薬物濃度を適宜補正した。

2 各個体の体重を毎週測定し、メトホルミンに伴う体調不良や副作用がないかを評価
3 した。

4 **【プロトコール 2：長期的運動の効果の検討】（図 2B）**

5 1 週間の順化飼育後、SD ラットを 1) 対照 (Control : Con-SD) 群 (n = 10) とし、
6 PCK ラットを 2) 非運動 (Sedentary : Sed-PCK) 群 (n = 10) と 3) 運動 (Exercise :
7 Ex-PCK) 群 (n = 10) に無作為に分け、12 週間飼育した。PCK ラットは SD ラット
8 のコロニーから発見されたモデルであること、先行研究^{28,29)}で使用されていることから、
9 本研究においても対照群として、SD ラットを使用した。Ex-PCK 群にはラット
10 用トレッドミル装置 (KN-73, 夏目製作所, 東京, 日本) を用いた走行を行った。ト
11 レッドミル運動は 5 日/週、傾斜角度 0 度、20 m/分、10 分間/日で開始した。その後
12 1 週間かけて 5 日/週、傾斜角度 0 度、28 m/分、60 分間/日まで増加させた。この運
13 動プロトコールは我々が行った先行研究³²⁾を基に設定した。なお、本研究で用いた速
14 度は、最大運動負荷の 65%程度の中強度に相当することを先行研究³²⁾と本研究で確
15 認した。

16 運動介入前後となる 5, 17 週齢の非運動日に、先行研究²⁹⁾と同様に心肺運動負荷
17 試験 (cardio pulmonary exercise test : CPX) を酸素—二酸化炭素代謝測定システム
18 (Model MK-5000, 室町機械, 東京, 日本) を用いて実施した。CPX は、初速を 15
19 m/min とし、3 分ごとに 5 m/min ずつ漸増するプロトコールで実施し、ラットが走
20 行不能になるまで走行距離と $\dot{V}O_2$ を計測し、総走行距離と最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2max}$)
21 を算出した³³⁾。全ての個体を 1 回ずつ計測した。

22 各個体の体重を毎週測定し、運動に伴う体調不良やストレスがないかを評価した。

1 3) 収縮時血圧の測定と安楽死, 血漿サンプルの採取および生化学検査

2 SBP は 17 週齢時にラット用尾動脈非観血的血圧測定装置 (CODA High-Through-
3 put System Ver.4.1, Kent Scientific, Torrington, 米国) を用いた tail-cuff 法にて,
4 無麻酔下で覚醒中の一定時刻 (13-15 時) に測定した. 運動の急性効果を最小にする
5 ため, Ex-PCK 群は非運動日に測定を行った. 測定は各個体 1 回ずつ行った. 最終の
6 運動介入から 5 日後に, ペントバルビタールナトリウム (100mg/kg) (Barbital So-
7 dium Salt, FUJIFILM Wako Pure Chemical, 大阪, 日本) の腹腔内投与により安
8 楽死させた. Met-PCK 群も同様に, 12 週間のメトホルミン投与後に, ペントバルビ
9 タールナトリウム (100mg/kg) の腹腔内投与により安楽死させた. その後, 速やかに
10 腹部大動脈から採血し, 4°C, 3000 回転/分で 15 分間遠心し, 得られた上清を解析ま
11 で-80°Cで保存した. 血漿グルコース, トリグリセライド, 総コレステロール, 遊離脂
12 肪酸, 総ビリルビン, Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase
13 (ALT) は標準的な自動解析法により, 各個体 1 回ずつ測定した (エスアールエル,
14 東京, 日本).

15

16 4) 組織の処理

17 肝臓はラットの屠殺後, 直ちに摘出し, 重量を計測した. イムノブロット解析のた
18 め, 30%グリセロール, 1 mmol/l dithiothreitol, 0.1 mmol/l phenylmethylsulfonyl
19 fluoride を含む 100 mmol/l リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.25) でホモジネートした.
20 サンプルの蛋白濃度は, bovine γ globulin をスタンダードとした Bradford 法により
21 分光光度計 (SPECTRONIC 20+, Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本) を用いて
22 測定した³⁴⁾. ホモジネートサンプルはイムノブロット解析まで-80°Cで保存した. 組

1 織学的解析のため、肝臓の一部を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、パラフィン包
2 埋した。

3

4 5) 肝嚢胞と肝線維化の評価

5 肝嚢胞と肝線維化の評価は、プロトコール 1 では各群 6 匹、プロトコール 2 では各
6 群 10 匹を評価した。パラフィン包埋した肝サンプルから、2 μ m 厚の切片を各個体 5
7 枚ずつ作成し、そのうち 2 枚にそれぞれ Hematoxylin Eosin (HE) 染色, Picro-sirius
8 Red (PSR) 染色を行った。残りの 3 枚は以下の免疫染色法に使用した。その後、先
9 行研究²⁹⁾の方法に基づき、嚢胞指数と線維化指数を求めた。すなわち、肝嚢胞の解析
10 では HE 染色切片を、肝線維化の解析では PSR 染色切片を光学顕微鏡で観察し (×
11 100 倍)、ランダムに各個体 5 か所ずつ撮影した後、ImageJ ソフト (National Insti-
12 tutes of Health, Bethesda, 米国) を用いて、それぞれの面積を算出した。得られた
13 嚢胞部分の面積と線維化の部分の面積をそれぞれ視野面積で除した割合を嚢胞指数、
14 線維化指数とした。また、嚢胞指数を算出した HE 染色の画像を使用し、嚢胞数を数
15 えた。嚢胞指数同様、各個体 5 か所ずつ計測し、平均した値を各群間で比較した。

16

17 6) 免疫染色法

18 免疫染色法は、プロトコール 1 では各群 6 匹、プロトコール 2 では各群 10 匹を評
19 価した。細胞周期に入っている細胞を染色するため、細胞増殖マーカーである Ki-67
20 陽性細胞を検討した。また、細胞増殖に関連するリン酸化 (phosphorylated : p-) ERK
21 と mTOR も同様に肝嚢胞周囲での発現を検討した。パラフィン包埋した肝サンプル
22 を脱パラフィン化し、内因性ペルオキシダーゼ活性を 0.3% H₂O₂ メタノールで 5 分
23 間ブロッキングした。染色には Ki-67 抗体 (ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本),

1 p-ERK 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, 米国), p-mTOR 抗体 (Santa
2 Cruz, Dallas, 米国), ヒストファイン シンプルステイン Max PO キット (ニチ
3 レイバイオサイエンス, 東京, 日本) を用い, ジアミノベンチジン法により発光させ
4 た後, ヘマトキシリンで核染色を行った. いずれの抗体も 1:1000 で使用した. Ki-67
5 抗体で染色した切片を光学顕微鏡で観察し (×100 倍), 1 個体当たりランダムに 5 か
6 所ずつ撮影した. 1 個体当たり 500 個の細胞を観察し, Ki-67 陽性細胞数 (Ki-67 la-
7 beling index) を算出した²⁶⁾. なお, HE 染色と PSR 染色, Ki-67 の免疫染色は連
8 続する切片で作成した. 同様に, p-ERK と p-mTOR の免疫染色は連続切片で作成し
9 た.

10

11 7) イムノブロット解析

12 ERK, p-ERK, mTOR, p-mTOR, AMPK, p-AMPK, S6, p-S6, CFTR, AQP1, COL1,
13 TGF- β , 内部標準である β -actin の蛋白発現をイムノブロット法により検討した. 肝
14 ホモジネートサンプルの蛋白 (1 well 当たり 25 μ g) は sodium dodecyl sulfate ポリ
15 アクリルアミドゲルを使用した電気泳動 (130V, 70 分) により分離させた. ゲルの
16 濃度は, mTOR と p-mTOR は 4%, CFTR と COL1 は 6%, ERK と p-ERK, AMPK
17 と p-AMPK, β -actin は 10%, S6 と p-S6 は 15%, TGF- β は 20%とした. 分離した
18 蛋白を 25 mmol/L Tris-HCl, 192 mmol/L glycine, 20% methanol で構成される trans-
19 fer buffer により, ニトロセルロース膜に転写させた (100V, 60 分). その後, 蛋白
20 が転写されたニトロセルロース膜を 5% skim milk (Becton, Dickinson and Company,
21 Franklin Lakes, 米国) により, 一晩ブロッキングした.

22 翌日, 蛋白が転写されたニトロセルロース膜を ERK, p-ERK, mTOR, p-mTOR,
23 AMPK, p-AMPK, S6, p-S6, CFTR (Cell signaling Technology, Danvers, 米国), AQP1

1 (Sigma, St. Louis, 米国), COL1 (コスモ・バイオ, 東京, 日本), TGF- β , β -actin (Santa
2 Cruz, Dallas, 米国)のそれぞれの一次抗体と 2 時間インキュベートした. mTOR と
3 p-mTOR, COL1 は一次抗体を 1:100 で使用し, その他の抗体は 1:1000 で使用した.
4 その後, ニトロセルロース膜を TBST-20 buffer で洗浄し (10 分 3 セット), 対応す
5 る二次抗体 (Santa Cruz, Dallas, 米国) と 1 時間インキュベートした (1:10000).
6 再度, TBST-20 buffer で 10 分 3 セット洗浄した後, Super Signal (Thermo Fisher
7 Scientific, 東京, 日本) を 1mL 使用して発光させ, 冷却 CCD カメラ (LAS-1000,
8 富士フイルム, 東京, 日本) を用いて記録した. ERK と p-ERK は 44/42kDa, mTOR
9 と p-mTOR は 289kDa, AMPK と p-AMPK は 63kDa, S6 と p-S6 は 32kDa, CFTR
10 は 165kDa, AQP1 は 28kDa, COL1 は 130kDa, TGF- β は 13kDa, β -actin は 42kDa
11 のバンドをそれぞれ解析した. 各蛋白とリン酸化蛋白のバンド濃度は, ImageJ ソフ
12 トを用いて数値化し, β -actin もしくは total protein のバンド濃度により補正した.
13 これらの蛋白発現とリン酸化は Con-PCK 群もしくは Con-SD 群のバンド濃度を 1 と
14 した値で群間比較した. プロトコール 1, 2 ともに各群 6 匹ずつでイムノブロットを
15 実施した. 標的蛋白ごとにイムノブロットを 2 回ずつ実施し, 再現性を確認した.

16

17 8) 統計学的検定

18 結果は平均±標準偏差で示した. 3 群間の比較では一元配置分散分析もしくは二元
19 配置分散分析後に Tukey 検定を, 2 群間の比較ではスチューデントの t 検定 (Student's
20 t test) を行った. すべての統計処理は SPSS (Ver 21.0, IBM, 東京, 日本) で行い,
21 いずれも $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した.

22

1 IV. 結果

2 【プロトコール 1】

3 1) 体重, 生化学検査に対するメトホルミンの影響 (図 3, 表 5)

4 介入開始時の体重は 2 群間で有意差を認めなかった. その後, いずれの週齢にお
5 いても, 2 群間で体重の有意差は認めなかった. 食餌摂取量や水分摂取量も同様に
6 有意差は認めなかった. 生化学検査では, 総ビリルビンと ALT は Con-PCK 群と比
7 べて Met-PCK 群で有意に低かった ($p<0.05$, $p<0.01$). その他の生化学検査の結果
8 において, 2 群間で有意差は認めなかった.

9 2) 肝重量と肝嚢胞, 肝線維化 (図 4-5, 表 5)

10 肝重量は両群間で有意差を認めなかった. PCK ラットの肝嚢胞は肉眼的にも観察
11 でき, 肝全体にびまん性に形成されていた. 嚢胞内は水分で満たされていて, 切開
12 すると漿液性の液体が流出した. 一部の肝嚢胞は肝表面にも認めた. 嚢胞指数は,
13 Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群では 21.8%減少していた ($p<0.05$) (Con-PCK
14 群: 26.1 ± 3.7 , Met-PCK 群: $20.5 \pm 3.9\%$) (図 4B). 嚢胞数は Con-PCK 群と比べて
15 Met-PCK 群で 55.0%減少していた ($p<0.05$) (Con-PCK 群: 29.1 ± 3.4 , Met-PCK
16 群: 13.1 ± 3.3 個) (図 4C).

17 PSR 染色で染まる組織はコラーゲン線維であり, 胆管上皮細胞の周囲が染色され
18 ていた (図 5A). 肝実質では, 線維化した部分はほぼ認めなかった. 線維化指数
19 は, Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群では 14.7%減少していた ($p<0.05$) (Con-
20 PCK 群: 18.3 ± 2.2 , Met-PCK 群: $15.6 \pm 1.7\%$) (図 5B).

21 Ki-67 陽性細胞も, 肝嚢胞周囲の胆管上皮細胞で多く認められ, Con-PCK 群と比
22 べて Met-PCK 群で減少していた (図 5A). Ki-67 labeling index を算出すると,

1 Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群では 19.7%減少していた ($p<0.05$) (Con-PCK
2 群, 19.9 ± 1.3 ; Met-PCK 群, $16.0\pm 3.8\%$) (図 5C).

3) 細胞増殖の調整蛋白発現 (図 6)

4 免疫染色の結果, p-ERK や p-mTOR は, 肝嚢胞周囲の胆管上皮細胞で多く発現
5 しており, Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群で減少していた (図 6A). p-ERK と
6 p-mTOR は同じ胆管上皮細胞が陽性となることがあったが, 必ずしも両者ともに一
7 致するものではなかった. イムノブロット法により, 各蛋白発現を定量化すると,
8 p-ERK は, Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群で有意に減少していた ($p<0.01$) (図
9 6B). p-mTOR は, Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群で有意に減少していた
10 ($p<0.01$) (図 6C). 同様に, p-S6 も Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群で有意に減
11 少していた ($p<0.05$) (図 6D). 一方で, p-AMPK は Con-PCK 群と比べて Met-
12 PCK 群で有意に増加していた ($p<0.01$) (図 6E).

4) 嚢胞液分泌と線維化の調節蛋白発現 (図 7)

14 イムノブロット法により, 嚢胞液分泌と肝線維化に関わる蛋白発現を定量化する
15 と, CFTR は Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群で有意に減少していた ($p<0.05$)
16 (図 7A). AQP1 は Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群で有意に減少していた
17 ($p<0.05$) (図 7B). TGF- β は Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群で有意に減少して
18 いた ($p<0.05$) (図 7C). COL1 は Con-PCK 群と比べて Met-PCK 群で有意に減少
19 していた ($p<0.05$) (図 7D).

20

21 【プロトコール 2】

22 1) 体重と血圧, 生化学検査に対する長期的運動の影響 (図 8, 表 6)

1 介入開始時の体重は各群間で有意差を認めなかった。その後、8週齢から Ex-
2 PCK 群が Con-SD 群よりも有意に体重が低下し始めた ($p<0.05$)。10週齢からは
3 Sed-PCK 群が Con-SD 群よりも有意に体重が減少し始めた ($p<0.05$)。さらに同じ
4 10週齢からは、Ex-PCK 群は Sed-PCK 群よりも有意に体重が減少し始めた
5 ($p<0.05$)。食餌摂取量や水分摂取量は、いずれの週齢においても有意差は認めな
6 かった。SBP は各群間で有意差は認めなかった。総コレステロール、AST、ALT は、
7 Con-SD 群に比べて Sed-PCK 群で有意に高かった ($p<0.01$)。トリグリセライドと
8 総コレステロールは、Sed-PCK 群に比べて Ex-PCK 群で有意に低かった
9 ($p<0.05$, $p<0.01$)。AST と ALT は、Sed-PCK 群と Ex-PCK 群間で有意差はな
10 く、遊離脂肪酸と総ビリルビンは 3 群間で有意差は認めなかった。

11 2) 運動耐容能に対する長期的運動の影響

12 運動負荷試験の結果を図 9 に示す。介入開始時の総走行距離は SD ラットと比べ
13 て PCK ラットで有意に低かった ($p<0.01$) (Con-SD 群: 569.0 ± 104.5 , Sed-PCK 群:
14 134.8 ± 28.8 , Ex-PCK 群: 158.2 ± 38.5 m)。介入後の総走行距離は Ex-PCK 群で有意
15 に増加し ($p<0.01$)、他の 2 群よりも Ex-PCK 群で有意に高かった ($p<0.01$) (Con-
16 SD 群: 462.3 ± 61.1 , Sed-PCK 群: 145.7 ± 46.1 , Ex-PCK 群: 713.0 ± 69.5 m)。

17 総走行距離と同様に、介入開始前の $\dot{V}O_{2max}$ は SD ラットと比べて PCK ラットで
18 有意に低かった ($p<0.01$) (Con-SD 群: 92.0 ± 9.0 , Sed-PCK 群: 71.0 ± 9.7 , Ex-PCK
19 群: 70.7 ± 6.0 mL/kg/min)。介入後の $\dot{V}O_{2max}$ は Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群で
20 有意に低かったが ($p<0.01$)、Con-SD 群と Ex-PCK 群間では有意差を認めなかった
21 (Con-SD 群: 75.4 ± 8.2 , Sed-PCK 群: 60.1 ± 5.6 , Ex-PCK 群: $78.8 \pm$
22 5.3 mL/kg/min)。

1 3) 肝重量 (表 6)

2 肝重量は Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群 ($p<0.01$) と Ex-PCK 群 ($p<0.05$) は
3 有意に増加しており, Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群は有意に減少していた
4 ($p<0.01$).

5 4) 肝嚢胞と肝線維化, 細胞増殖 (図 10-11)

6 嚢胞内は水分で満たされていたため, 切開すると漿液性の液体が流出した. 一部
7 の肝嚢胞は肝表面にも認められた. 嚢胞指数は Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群では
8 30.8%低かった ($p<0.01$) (Sed-PCK 群: 24.6 ± 5.2 , Ex-PCK 群: 17.0 ± 3.1) (図
9 10B). 嚢胞数は Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で 51.1%減少していた ($p<0.01$)
10 (Sed-PCK 群: 29.7 ± 6.0 , Ex-PCK 群: 14.5 ± 2.8 個) (図 10C).

11 肝線維化は嚢胞の周囲に多く認められ, 肝実質にはほとんど認めなかった (図
12 11A). 線維化指数は Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で 42.3%減少していた
13 ($p<0.01$) (Sed-PCK 群: 17.0 ± 2.4 , Ex-PCK 群: 9.8 ± 2.7) (図 11B).

14 Ki-67 陽性細胞は, SD ラットと比べて PCK ラットの肝嚢胞周囲に多く発現して
15 おり, Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で減少していた (図 11A). Ki-67 labeling
16 index は, Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で 32.2%減少していた ($p<0.01$) (Sed
17 群: 20.1 ± 4.9 , Ex 群: 13.7 ± 5.1) (図 11C).

18 5) 細胞増殖の調整蛋白発現 (図 12)

19 免疫染色の結果から, p-ERK や p-mTOR は, PCK ラットの肝嚢胞周囲で高く発
20 現しており, Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で低下していた (図 12A). イムノブ
21 ロット法により, 各蛋白発現を定量化すると, p-ERK は Con-SD 群と比べて Sed-
22 PCK 群で有意に増加しており ($p<0.05$), Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で有意に

1 減少していた ($p < 0.05$) (図 12B). p-mTOR は Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群で
2 有意に増加しており ($p < 0.05$), Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で有意に減少して
3 いた ($p < 0.01$) (図 12C). 同様に p-S6 も Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群で有意に
4 増加しており ($p < 0.01$), Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で有意に減少していた
5 ($p < 0.05$) (図 12D). p-AMPK は Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群で有意に減少し
6 ており ($p < 0.05$), Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で有意に増加していた
7 ($p < 0.01$) (図 12E).

8 6) 囊胞液分泌と線維化の調節蛋白発現 (図 13)

9 イムノブロット法により, 囊胞液分泌と肝線維化に関わる調整蛋白の発現を定量
10 化した. CFTR は, Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群で有意に増加しており
11 ($p < 0.05$), Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で有意に減少していた ($p < 0.05$) (図
12 13A). AQP1 も同様に, Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群で有意に増加しており
13 ($p < 0.05$), Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群で有意に減少していた ($p < 0.05$) (図
14 13B). TGF- β は, Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群では有意に増加しており
15 ($p < 0.05$), Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群では有意に減少していた ($p < 0.05$)
16 (図 13C). COL1 も, Con-SD 群と比べて Sed-PCK 群では有意に増加しており
17 ($p < 0.05$), Sed-PCK 群と比べて Ex-PCK 群では有意に減少していた ($p < 0.05$)
18 (図 13D).

19

20

21

1 V. 考察

2 PLD に対する長期的運動やメトホルミンの効果はこれまで報告がなく，本研究が
3 最初の研究である．腎嚢胞とともに肝嚢胞も形成する PCK ラットにおいて，AMPK
4 活性化薬であるメトホルミンの効果を検討したところ，肝内胆管上皮の細胞増殖を
5 抑制し，肝嚢胞増大と肝線維化を改善することが明らかになった．さらに 12 週間，
6 5 日/週，中強度のトレッドミル運動の効果を検討したところ，メトホルミンと同様
7 に，肝内胆管上皮の細胞増殖を抑制し，肝嚢胞増大と肝線維化を改善することが明
8 らかになった (図 14)．メトホルミンと長期的運動はともに，肝臓全体の AMPK を
9 活性化する働きがあることから，長期的運動の PLD の進行抑制には AMPK が関与
10 している可能性がある．

11 PLD は，肝嚢胞の増大により呼吸困難感や背部痛などの症状を伴う．増大した肝
12 嚢胞は体幹前屈動作などを制限し，生活範囲を狭小化させることから，ADL・QOL
13 低下につながる^{35,36)}．そのため，PLD の治療は肝容積の減少や QOL 改善が目標と
14 なる³⁵⁾．現在のところ，嚢胞内容穿刺吸引・硬化療法をはじめとする内科的治療や
15 嚢胞開窓術などの外科的治療などが PLD に対して実施されている．しかしながら，
16 いずれの治療法も再発率の高さや合併症の発生があり，PLD の病態改善に対する有
17 効な治療法は確立していない．肝疾患に対しては，内科・外科的治療に加え，運動
18 療法も治療法の一つとなっているが (表 3-4)，PLD に対する運動療法の効果は不明
19 である．一方で，PLD の一病型である ADPKD 患者においては，30 分/日，5 日/週
20 の有酸素運動が推奨されているが³⁷⁾，これは肥満予防が目的であり，肝嚢胞や腎嚢
21 胞の増大に対する治療的意義は明らかではない．また運動時間や頻度の設定理由，
22 運動の種類など不明な点も多く存在する．多発性肝嚢胞診療ガイドライン¹⁾におい

1 ても、運動療法に関する記述はない。肝嚢胞を伴わない自然発症の ADPKD モデル
2 である Han:SPRD-Cy ラットでは、14 m/min, 30 分/日, 3 日/週のトレッドミル運
3 動を 6 週間行い、腎重量や骨塩量、肝重量に変化はなかった³⁸⁾。この報告では組織
4 学的検討はされておらず、肝組織への効果については明らかではない。一方で、本
5 研究では肝嚢胞を持つ PCK ラットに対して、最大運動負荷の 65%に相当する中強
6 度のトレッドミル運動を 60 分/日, 5 日/週, 12 週間実施した。その結果、肝嚢胞増
7 大を 30.8%, 肝線維化を 42.3%減少させた。先行研究³⁸⁾とはモデルが異なるが、肝
8 嚢胞を持つ PCK ラットでは、運動療法が有効である可能性がある。我々は以前、
9 PCK ラットに対して、運動強度は変えずに介入期間を 8 週間にした実験をした。そ
10 の結果、肝嚢胞増大は 23.1%, 肝線維化は 32.2%減少した³²⁾。今回、介入期間を延
11 ばして実施したところ、肝嚢胞や線維化に対する運動療法の抑制効果は、用量依存
12 性がある可能性が示唆された。

13 メトホルミンはミトコンドリア内での ATP 合成を抑制し、AMP レベルを高める
14 ことで、肝臓の AMPK をリン酸化させる。AMPK はエネルギー恒常性に関与し、
15 細胞内 ATP レベルが低い時には、エネルギー消費を抑えるために、細胞増殖を抑制
16 する⁹⁾。この AMPK の活性化は、CFTR を直接的に、mTOR を tuberous sclerosis
17 protein 2 (TSC2) を介して抑制することが報告されている⁹⁾。メトホルミンは 2
18 型糖尿病の第一選択薬として使用される薬剤で、近年では乳癌に対する癌細胞の増
19 殖抑制効果も報告されている³⁹⁾。この癌細胞の増殖抑制効果は、AMPK による
20 mTOR 系の不活化が関与する⁴⁰⁾。C57BL/6 マウスの腎臓を、嚢胞形成させるため
21 に 8-Br-cAMP とともに培養した ADPKD モデルの腎臓や ADPKD 患者において、
22 メトホルミンの腎嚢胞増大抑制効果や腎保護効果が既に報告されている^{9,41)}。さら

1 に、ADPKD 患者を対象としたメトホルミンの第 2 相試験が開始されている⁴²⁾。一
2 方で、肝嚢胞に対するメトホルミンの効果はこれまでに報告されていない。そこ
3 で、本研究では PCK ラットに対する AMPK 活性化薬であるメトホルミンの効果を
4 検討した。投与量は先行研究³¹⁾を参考に設定し、投与期間は長期的運動と同様の 12
5 週間とした。その結果、メトホルミンは肝臓全体の p-AMPK を増加、p-mTOR と
6 CFTR 発現を減少させ、胆管上皮細胞増殖や肝嚢胞増大を抑制した。メトホルミン
7 の腎嚢胞に対する効果^{9,41)}と、プロトコール 1 で認めた肝嚢胞への効果を踏まえる
8 と、同様に細胞内 AMPK を活性化させる運動療法は、肝嚢胞に対して有効である可
9 能性がある。

10 プロトコール 2 では、運動療法による肝臓全体の AMPK リン酸化の増加が認めら
11 れた。先行研究では、Wistar ラットにおいて、12 週間、5 日/週、15m/min、30 分/
12 日のトレッドミル運動を行うと、肝臓全体のホモジネートサンプルを使用したイム
13 ノブロット解析において、p-AMPK が増加したと報告されている⁴³⁾。PTEN 欠損マ
14 ウスでは 32 週間、5 日/週、12.5m/min、60 分/日のトレッドミル運動によって、肝
15 臓全体における p-AMPK の増加と mTOR 系の抑制、肝細胞癌の細胞増殖の抑制を
16 認めた²³⁾。このように運動療法によって肝臓全体での AMPK が活性化した報告は
17 あるが、肝実質細胞のみや胆管上皮細胞のみを単離し、AMPK を検討した報告はな
18 い。肝実質細胞は毛細胆管から細胆管の形成につながるため、胆管上皮細胞と近縁
19 の細胞である。運動療法でどの細胞の AMPK が活性化するかは明らかではないが、
20 これらの先行研究^{23,43)}で認められた肝臓全体の AMPK 活性化に、胆管上皮細胞は何
21 らかの関与がある可能性がある。PCK ラットにおいても、長期的運動は肝臓全体の
22 p-AMPK を増加、p-mTOR と CFTR 発現を減少させ、胆管上皮細胞の増殖や肝嚢胞

1 増大を抑制した。この効果はメトホルミンの効果と一致していることから、AMPK
2 のリン酸化が長期的運動の肝嚢胞増大を抑制した機序である可能性が考えられる。
3 また、今回のメトホルミンの投与量は高容量であり、ヒトには投与ができない。そ
4 のため、将来的には低用量での投与に運動療法を組み合わせた介入で、肝嚢胞増大
5 を抑制することができれば、実際の臨床場面につながる可能性がある。

6 肝嚢胞増大の主なメカニズムとして、胆管上皮細胞の過剰な細胞増殖が想定され
7 ている²⁷⁾。先行研究では、MAPK と mTOR 系が PCK ラットの胆管上皮細胞の過
8 剰増殖に関与すると報告されている^{26,44)}。PCK ラットに PPAR- γ アゴニストであ
9 るピオグリタゾン²⁸⁾を 17 週間投与すると、胆管上皮細胞の p-ERK や肝嚢胞増大が抑
10 制された²⁹⁾。同様に、PCK ラットに mTOR 阻害薬であるエベロリムスを 12 週間
11 投与すると、肝臓全体における p-S6 や肝嚢胞増大が抑制された⁴⁵⁾。本研究では、
12 長期的運動は胆管上皮細胞周囲の p-ERK や p-mTOR の発現、肝嚢胞増大を抑制し
13 た。その際、細胞増殖マーカーである Ki-67 陽性細胞を減少させたことから、長期
14 的運動は胆管上皮細胞の過剰な細胞増殖を抑制した可能性がある。本研究の結果と
15 同様に、肥満モデルマウスにおいて 8 週間、5 日/週、60 分/日の水泳は肝臓全体の
16 p-ERK を抑制したことが報告されている⁴⁶⁾。このモデルは、運動を開始する 8 週間
17 前より、高脂肪食を摂取させることでインスリン抵抗性・肥満・脂肪肝を示す。こ
18 の研究では、細胞増殖への効果については検討していないが、免疫染色の結果、肝
19 実質細胞の p-ERK 発現が減少した。今回のトレッドミル運動と水泳は同じ運動様式
20 ではないが、ともに有酸素運動に分類される。Gao らは、12 週間の高脂肪食摂取に
21 より、肥満・脂肪肝を呈する NAFLD モデルラットに対して、高脂肪食摂取終了後
22 より 8 週間、5 日/週、20m/min、60 分/日の中強度のトレッドミル運動と食事療法

1 (通常の脂肪含有量の食事) を実施し、肝臓全体における p-mTOR の抑制を報告し
2 た⁴⁷⁾。これらの結果から、運動様式やモデル動物は異なるが、長期的運動によって
3 肝臓全体の p-ERK や p-mTOR に変化が生じる可能性がある。本研究では免疫染色
4 の結果から、長期的運動による胆管上皮細胞の p-ERK や p-mTOR 発現の減少が認
5 められた。PCK ラットでは肝嚢胞増大に胆管上皮細胞の ERK や mTOR が関係する
6 ことや、長期的運動によって胆管上皮細胞の p-ERK や p-mTOR 発現が減少するこ
7 とを考慮すると、本研究における長期的運動の肝嚢胞増大抑制効果は、胆管上皮細
8 胞の過剰増殖の抑制が関与している可能性がある。これは p-ERK や p-mTOR の免
9 疫染色と Ki-67 の免疫染色を連続切片で評価することで、より正確に評価できると
10 考えられる。

11 肝嚢胞増大には、嚢胞内への水分分泌異常も原因の一つとして想定されている
12 ⁴⁸⁾。水分分泌には、胆管上皮細胞の管腔側に発現する CFTR と AQP1 が関与し、
13 PLD 患者の胆管上皮細胞では AQP1 発現が増加していることが報告されている
14 ⁴⁹⁾。これは Cl⁻輸送体である CFTR が過剰に発現することで、嚢胞内への Cl⁻を分泌
15 と、それに伴う Cl⁻/HCO₃⁻交換輸送体である AE2 を介した嚢胞内への HCO₃⁻の能動
16 輸送、そして浸透圧勾配によって水チャネルである AQP1 から嚢胞への水分が過剰
17 に分泌されるという一連の過程による⁸⁾。嚢胞内への水分分泌による胆管上皮細胞
18 の伸長は、様々なサイトカインを分泌させ、さらなる嚢胞拡大を促す⁵⁰⁾。本研究の
19 結果と一致して、PCK ラットの胆管上皮細胞では CFTR と AQP1 の過剰発現が報
20 告されている⁴⁸⁾。つまり、細胞当たりの CFTR や AQP1 の発現量が増加している。
21 これまでに、CFTR や AQP1 に対する運動療法の効果を報告したものはなく、本研
22 究が初めての報告となる。PCK ラットの肝臓全体を使用したイムノブロット解析に

1 おいて、長期的運動は CFTR と AQP1 発現を減少させた結果から、長期的運動は囊
2 胞内への水分分泌も抑制した可能性がある。

3 今回、メトホルミンと長期的運動の肝嚢胞抑制の機序として AMPK 活性化を想定
4 した。しかしながら、これまでに嚢胞増大に関わる AQP1 や ERK に対する AMPK
5 の効果は明らかではない。そのため、これらの cascade に対する AMPK 非依存性の
6 機序も検討しなければならない。先行研究では PCK ラットの胆管上皮細胞における
7 cAMP 濃度が上昇することで AQP1 発現が増加することが報告されている⁴⁸⁾。さら
8 に、ADPKD 患者の腎嚢胞上皮細胞では、cAMP 濃度が上昇することで p-ERK 発現
9 も同様に増加することが報告されている⁵¹⁾。AMPK 非依存性の機序として、胆管上
10 皮細胞内の cAMP 濃度に長期的運動やメトホルミンが影響した可能性があるが、本
11 研究では cAMP の濃度を測定していないため、不明である。また、長期的運動の肝
12 嚢胞抑制の機序が胆管上皮細胞の AMPK 活性化のみであると仮定すると、その活性
13 化薬であるメトホルミンの投与によって、肝嚢胞は著明に減少すると考えられる。
14 しかし、本研究における嚢胞や線維化の抑制は、長期的運動を行うことでより高い
15 効果が認められた。この結果からも、長期的運動の AMPK 非依存性の機序が関与し
16 ている可能性が考えられる。運動療法は全身に作用するため、筋肉や血管内皮機能
17 にも影響を与える。そのため他臓器との相互作用によって、PLD の病態改善につな
18 がった可能性は否定できない。特に筋肉から放出されるマイオカインは、心筋細胞
19 などに対して保護的に作用することが報告されているため⁵²⁾、今後の検討課題であ
20 る。

21 ADPKD と ARP KD は肝線維性多嚢胞性疾患に分類され、肝嚢胞に加えて肝線維
22 化も重要な病態となる。線維化によって、胆汁のうっ滞や門脈圧の亢進などを認め

1 ることもある¹⁾。本研究でも、SD ラットと比べて PCK ラットの肝臓では線維化が
2 亢進していた。PLD における肝線維化のメカニズムは、完全には明らかになってい
3 ない。NAFLD で認められる肝線維化は肝実質に多いが²⁾、PLD で認める肝線維化
4 は胆管上皮細胞周囲、つまり嚢胞の周囲で認めることが多い。そのため、一般的な
5 肝線維化と PLD の肝線維化では病態が異なる可能性がある。ウイルス性肝炎をはじめ
6 めとする肝線維化を示す疾患では、 α -smooth muscle actin (α -SMA)陽性となる活
7 性化肝星細胞が肝実質内でコラーゲンを産生している⁵³⁾。しかし PCK ラットの肝
8 臓全体では α -SMA 発現は少なく、肝線維化に対する肝星細胞の影響は低いと考え
9 られている⁵⁴⁾。また、ARPKD では先天性肝線維症が線維化の主体であり、PCK ラ
10 ットも同様の病態を呈することが報告されている⁵⁵⁾。この病態では胆管上皮細胞が
11 線維化の主体となるが^{28,29)}、本研究の PSR 染色の結果からも、胆管上皮細胞の周囲
12 でコラーゲン線維が蓄積されていることが明らかになった。現在までに PCK ラット
13 の肝線維化に関わる因子として明らかになっているのは胆管上皮細胞が産生する
14 TGF- β ²⁹⁾のみであり、胆管上皮細胞の TGF- β の増加とともに肝臓全体のコラーゲ
15 ン蓄積が増加している^{29,54)}。先行研究では、17 週間のテルミサルタン投与により、
16 PCK ラットの胆管上皮細胞における TGF- β 発現が減少し、肝線維化も抑制された
17 ²⁸⁾。本研究においても、長期的運動とメトホルミン投与により肝臓全体の TGF- β 発
18 現が減少し、肝線維化もそれぞれ 42.3%と 14.7%抑制された。この結果と一致し
19 て、高脂肪食・高フルクトース水摂取によって脂肪肝を呈する NAFLD モデルマウ
20 スでは、16 週間、5 日/週、20m/min、60 分/日のトレッドミル運動が肝臓全体の
21 TGF- β と COL1 mRNA 発現を減少させた⁵⁶⁾。したがって、長期的運動とメトホル
22 ミンによる肝線維化の抑制には、肝臓全体の TGF- β 発現減少が関与し、胆管上皮細

1 胞レベルでも変化している可能性がある。しかしながら、AMPKがTGF- β に与え
2 る効果はこれまでに報告が無く、肝線維化に対する長期的運動やメトホルミンの効
3 果は、AMPK非依存的である可能性がある。四塩化炭素を使用した肝硬変モデルラ
4 ットにメトホルミン300mg/kg/日を1週間投与した研究では、肝臓全体のAMPK活
5 性化には変化がなかったが、類洞内皮細胞のフリーラジカルの減少と活性酸素を分
6 解する酵素であるスーパーオキシドディスムターゼの増加が確認され、肝線維化が
7 減少した⁵⁷⁾。Fischerラットに高脂肪食を摂取させた肥満モデルラットでは、6週
8 間、5日/週、60分/日の水泳運動を実施すると、肝臓全体の還元型グルタチオンやマ
9 ロンジアルデヒド、カルボニル化タンパク質などの酸化ストレスの指標が減少した
10 ことが報告されている⁵⁸⁾。このことから、肝線維化の病態には肝臓内の酸化ストレ
11 スも関与し、メトホルミンや長期的運動の抗酸化作用がTGF- β や肝線維化に影響を
12 与えた可能性がある。

13 CPXの結果から、PCKラットにおいて長期的運動は運動耐容能も改善した。肝疾
14 患患者においては、運動耐容能の低下と生命予後不良とが密接に関係する^{59,60)}。移
15 植前の $\dot{V}O_{2max}$ が予測値の60%以上の場合と比べて、60%未満の肝移植患者では移植
16 100日後の生存率が有意に低かったと報告されている⁵⁹⁾。同様に肝移植患者に6分
17 間歩行を行った研究では、250m未満であった患者は死亡率が有意に高かった⁶⁰⁾。
18 Tandonらのレビューでは、肝硬変患者において、4日/週以上(150分/週)の中強
19 度(Borgスケールで5-6程度)の有酸素運動は運動耐容能を改善するため、推奨さ
20 れている⁶¹⁾。これまでに、PLD患者の運動耐容能を大規模で評価した研究はまだな
21 いが、ADPKD患者では、同年代の健常人と比べて運動耐容能が低下していると報
22 告されている⁶²⁾。本研究においても、SDラットと比べてPCKラットでは運動耐容

1 能低下していた。PCK ラットの運動耐容能低下している原因として、先行研究
2 では PCK ラットの身体活動量の低下が報告されている²⁷⁾。また、本研究の結果か
3 ら肝臓全体の AMPK 活性化が低下していたため、ATP の産生に伴うエネルギー代
4 謝が低下している可能性も考えられる。しかし骨格筋内の AMPK や ATP は測定し
5 ていないため、エネルギー代謝がどの程度低下しているかは不明である。ADPKD
6 患者では血管内皮機能が低下し、運動後の血中一酸化炭素濃度が上昇しにくいこと
7 も報告されている⁶²⁾。つまり、骨格筋をはじめとする運動時に血流が増加するべき
8 臓器が、低血流になっている可能性が考えられる。さらに PLD 患者では筋肉量が低
9 下しやすいことも報告されている⁶³⁾ため、筋性の要因も運動耐容能低下に関わって
10 いる可能性がある。肝嚢胞の増大によって生じる呼吸困難感や背部痛などの症状
11 が、身体活動を制限する可能性はあるが、因果関係は不明である。本研究では、
12 PCK ラットにおいて、12 週間、5 日/週、60 分/日の中強度のトレッドミル運動は運
13 動耐容能を改善した。CPX の結果から、総走行距離と比較して、運動群の介入後の
14 $\dot{V}O_{2max}$ には大きな変化は見られなかった。“ $\dot{V}O_{2max} = \text{心拍出量} \times \text{動静脈酸素較}$
15 差 ” という Fick の原理⁶⁴⁾を基にすると、 $\dot{V}O_{2max}$ は心機能の影響を強く受けるた
16 め、総走行距離よりも明らかな変化を認めにくいと考えられる。今回は単一の運動
17 プロトコールでの実施であったため、PLD 患者にとって、より適切な頻度
18 (Frequency)・強度 (Intensity)・持続時間 (Time)・種類 (Type) の運動につい
19 て、さらなる検討が必要である。

20 本研究の限界として、嚢胞形成に関わる cascade を遮断する実験は行っておら
21 ず、長期的運動の肝嚢胞増大抑制効果の因果関係を示すことができなかった。さら
22 に今回の結果から、長期的運動の AMPK 非依存性の機序の可能性も考えられた。こ

1 れは AMPK の inhibitor を使用した実験を行うことで、因果関係や非依存性の機序
2 を示すことができると考えられるため、今後の課題としたい。また、肝嚢胞は胆管
3 上皮細胞の変化で増大するが、本研究では免疫ブロット解析を肝臓全体を使用し
4 たホモジネートサンプルで行った。そのため胆管上皮細胞だけの蛋白発現は検討で
5 きていない。本研究で変化を認めた p-ERK や p-mTOR は、免疫組織学的検討の結
6 果から嚢胞周囲に多く発現していることが確認できた。しかし p-AMPK や AQP1 の
7 発現部位は確認できていない。長期的運動やメトホルミンの肝嚢胞増大抑制効果の
8 機序の詳細を明らかにするためには、これらの免疫組織学的検討や胆管上皮細胞を
9 分離した実験が必要である。さらに、今回のプロトコールでは、コントロールであ
10 る SD ラットに対して長期的運動を行った群を設けていない。先行研究では、SD ラ
11 ットに 12 週間、5 日/週、20m/min、60 分/日のトレッドミル運動を行い、総コレス
12 テロールや遊離脂肪酸は安静群と有意差が認められなかったと報告している⁶⁵⁾。し
13 かし、SD ラットが運動した際の胆管上皮細胞もしくは肝実質細胞の AMPK や
14 mTOR、CFTR などに対する影響は報告がない。今回の結果では、PCK ラットが運
15 動をすることで総コレステロールは減少した。この結果のみでは、PCK ラットに対
16 する長期的運動の効果が、遺伝的素因の影響か運動自体の影響かは明らかにはでき
17 なかった。SD ラットの運動群を設定し、肝臓に対する効果を検討する必要がある。
18

1 VI. 結論

2 PCK ラットにおいて、長期的運動とメトホルミンは共に AMPK をリン酸化し、
3 胆管上皮細胞の過剰増殖の抑制、嚢胞液分泌や線維化を調節する因子の低下を伴っ
4 て、肝嚢胞増大や肝線維化を抑制する。メトホルミンが腎嚢胞を抑制するという先
5 行研究や、本研究のメトホルミンが肝嚢胞を抑制した結果を踏まえると、長期的運
6 動の PLD 進行抑制には AMPK 活性化が関与することが示唆される。本研究の結果
7 を直接ヒトに当てはめることはできないが、長期的運動は PLD 患者においても有効
8 な治療法となる可能性がある。

9

1 VII. 謝辞

2 本研究をご指導いただいた東北大学大学院医学系研究科障害科学専攻機能医科学
3 講座内部障害学分野 上月正博教授，東北医科薬科大学医学部リハビリテーション
4 学 伊藤修教授に深謝申し上げます。また本研究の遂行にあたり，実験手技のご教
5 示にてご協力を賜りました東北大学大学院医学系研究科医科学専攻機能医科学講座
6 内部障害学分野 三浦平寛先生，仇嘉禾さんに深く感謝申し上げます。

7

1 XI. 文献

- 2 1. 大河内信弘,福永潔,野口雅之,他. (2013) 多発性肝嚢胞診療ガイドライン. 厚生労
3 働省, 13-28.
- 4 2. Cnossen WR, Drenth JP. (2014) Polycystic liver disease: an overview of patho-
5 genesis, clinical manifestations and management. *Orphanet J Rare Dis*, **9**, 1-
6 13.
- 7 3. Khan S, Dennison A, Garcea G. (2016) Medical therapy for polycystic liver dis-
8 ease. *Ann R Coll Surg Engl*, **98**, 18-23.
- 9 4. 丸山彰一, 成田一衛, 岡田浩一, 他. (2017) エビデンスに基づく多発性嚢胞腎
10 (PKD) 診療ガイドライン 2017, 東京医学社, 26-58.
- 11 5. Nichols MT, Gidey E, Matzakos T, et al. (2004) Secretion of cytokines and
12 growth factors into autosomal dominant polycystic kidney disease liver cyst
13 fluid. *Hepatology*, **40**, 836-46.
- 14 6. Temmerman F, Missiaen L, Bammens B, et al. (2011) Systematic review: the
15 pathophysiology and management of polycystic liver disease. *Aliment Pharma-*
16 *col Ther*, **34**, 702-13.
- 17 7. Perugorria MJ, Masyuk TV, Marin JJ, et al. (2014) Polycystic liver diseases:
18 advanced insights into the molecular mechanisms. *Nat Rev Gastroenterol*
19 *Hepatol*, **11**, 750-61.
- 20 8. Strazzabosco M, Somlo S. (2011) Polycystic liver diseases: congenital disorders
21 of cholangiocyte signaling. *Gastroenterology*, **140**, 1855-9.
- 22 9. Takiar V, Nishio S, Seo-Mayer P, et al. (2011) Activating AMP-activated protein
23 kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 2462-
24 7.

- 1 10. Meliana R, Sarika K, Daniel R, et al. (2016) Inhibition of Aerobic Glycolysis
2 Attenuates Disease Progression in Polycystic Kidney Disease. *PLoS One*, **11**, 1-
3 17.
- 4 11. Hogan MC, Masyuk TV, Page LJ, et al. (2010) Randomized clinical trial of long-
5 acting somatostatin for autosomal dominant polycystic kidney and liver disease.
6 *J Am Soc Nephrol*, **21**, 1052-61.
- 7 12. Hogan MC, Masyuk T, Bergstralh E, et al. (2015) Efficacy of 4 years of oc-
8 treotide long-acting release therapy in patients with severe polycystic liver dis-
9 ease. *Mayo Clin Proc*, **90**, 1030-7.
- 10 13. Mizuno H, Hoshino J, Suwabe T, et al. (2017) Tolvaptan for the Treatment of
11 Enlarged Polycystic Liver Disease. *Case Rep Nephrol Dial*, **7**, 108-111.
- 12 14. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, et al. (2012) Tolvaptan in patients with
13 autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*, **367**, 2407-18.
- 14 15. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in
15 mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, **108**, 1167-74.
- 16 16. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, et al. (2014) Metformin: from mechanisms of
17 action to therapies. *Cell Metab*, **20**, 953-66.
- 18 17. Oh S, So R, Shida T. et al. (2017) High-Intensity Aerobic Exercise Improves
19 Both Hepatic Fat Content and Stiffness in Sedentary Obese Men with Nonal-
20 coholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep*, **22**, 1-12.
- 21 18. Zenith L, Meena N, Ramadi A, et al. (2014) Eight weeks of exercise training
22 increases aerobic capacity and muscle mass and reduces fatigue in patients
23 with cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **12**, 1920-1926.
- 24 19. Debette-Gratien M, Tabouret T, Antonini MT, et al. (2015) Personalized

- 1 adapted physical activity before liver transplantation: acceptability and results.
2 *Transplantation*, **99**, 145-150.
- 3 20. Behrens G, Matthews CE, Moore SC, et al. (2013) The association between fre-
4 quency of vigorous physical activity and hepatobiliary cancers in the NIH-
5 AARP Diet and Health Study. *Eur J Epidemiol*, **28**, 55-66.
- 6 21. Linden MA, Sheldon RD, Meers GM, et al. (2016) Aerobic exercise training in
7 the treatment of non-alcoholic fatty liver disease related fibrosis. *J Physiol*, **594**,
8 5271-84.
- 9 22. Mikami T, Sumida S, Ishibashi Y, et al. (2004) Endurance exercise training in-
10 hibits activity of plasma GOT and liver caspase-3 of mice [correction of rats]
11 exposed to stress by induction of heat shock protein 70. *J Appl Physiol*, **96**, 1776-
12 1781.
- 13 23. Piguet AC, Saran U, Simillion C, et al. (2015) Regular exercise decreases liver
14 tumors development in hepatocyte-specific PTEN-deficient mice independently
15 of steatosis. *J Hepatol*, **62**, 1296-303.
- 16 24. Shimomura Y, Brock WJ, Ito Y, et al. (2015) Age-Related Alterations in Blood
17 Biochemical Characterization of Hepatorenal Function in the PCK Rat: A
18 Model of Polycystic Kidney Disease. *Int J Toxicol*, **34**, 479-90.
- 19 25. Masyuk TV, Huang BQ, Masyuk AI, et al. (2004) Biliary dysgenesis in the
20 PCK rat, an orthologous model of autosomal recessive polycystic kidney dis-
21 ease. *Am J Pathol*, **165**, 1719-30.
- 22 26. Ren XS, Sato Y, Harada K, et al. (2014) Activation of the PI3K/mTOR pathway
23 is involved in cystic proliferation of cholangiocytes of the PCK rat. *PLoS One*,
24 **9**, 1-14.

- 1 27. Munoz-Garrido P, Marin JJ, Perugorria MJ, et al. (2015) Ursodeoxycholic acid
2 inhibits hepatic cystogenesis in experimental models of polycystic liver disease.
3 *J Hepatol*, **63**, 952-61.
- 4 28. Yoshihara D, Kugita M, Sasaki M, et al. (2013) Telmisartan ameliorates fibro-
5 cystic liver disease in an orthologous rat model of human autosomal recessive
6 polycystic kidney disease. *PLoS One*, **8**, 1-8.
- 7 29. Yoshihara D, Kurahashi H, Morita M, et al. (2011) PPAR-gamma agonist ame-
8 liorates kidney and liver disease in an orthologous rat model of human autoso-
9 mal recessive polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, **300**, 465-
10 74.
- 11 30. Carlson CL, Winder WW. (1999) Liver AMP-activated protein kinase and ace-
12 tyl-CoA carboxylase during and after exercise. *J Appl Physiol*, **86**, 669-74.
- 13 31. Linden MA, Fletcher JA, Morris EM, et al. (2014) Combining metformin and
14 aerobic exercise training in the treatment of type 2 diabetes and NAFLD in
15 OLETF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **306**, 300-10.
- 16 32. 佐藤陽一, 三浦平寛, 仇嘉禾, 他. (2017) 多発性肝嚢胞モデルラットの肝病変に対
17 する長期的運動の効果. *運動器リハビリテーション*, **28**, 421-427.
- 18 33. Ito D, Cao P, Kakihana T. et al. (2015) Chronic Running Exercise Alleviates
19 Early Progression of Nephropathy with Upregulation of Nitric Oxide Synthases
20 and Suppression of Glycation in Zucker Diabetic Rats. *PLoS One*, **10**, 1-21.
- 21 34. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of mi-
22 crogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
23 *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- 24 35. Chandok N. (2012) Polycystic liver disease: a clinical review. *Ann Hepatol*, **11**,

- 1 819-26.
- 2 36. Khan S, Dennison A, Garcea G. (2016) Medical therapy for polycystic liver dis-
3 ease. *Ann R Coll Surg Engl*, **98**, 18-23.
- 4 37. Grantham JJ. (2015) Rationale for early treatment of polycystic kidney disease.
5 *Pediatr Nephrol*, **30**, 1053-62.
- 6 38. Darnley MJ, DiMarco NM, Aukema HM. (2000) Safety of chronic exercise in a
7 rat model of kidney disease. *Med Sci Sports Exerc*, **32**, 576-80.
- 8 39. Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, et al. (2009) Metformin and pathologic
9 complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with
10 breast cancer. *J Clin Oncol*, **27**, 3297-302.
- 11 40. Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F. (2010) Metformin: a therapeutic op-
12 portunity in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **16**, 1695-700.
- 13 41. Pisani A, Riccio E, Bruzzese D, et al. (2018) Metformin in autosomal dominant
14 polycystic kidney disease: experimental hypothesis or clinical fact?. *BMC Neph-*
15 *rol*, **19**, 1-5.
- 16 42. Seliger SL, Abebe KZ, Hallows KR, et al. (2018) A Randomized Clinical Trial of
17 Metformin to Treat Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J*
18 *Nephrol*, **47**, 352-60.
- 19 43. Takekoshi K, Fukuhara M, Quin Z, et al. (2006) Long-term exercise stimulates
20 adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and subunit ex-
21 pression in rat visceral adipose tissue and liver. *Metabolism*, **55**, 1122-8.
- 22 44. Nakanuma Y, Harada K, Sato Y, et al. (2010) Recent progress in the etiopatho-
23 genesis of pediatric biliary disease, particularly Caroli's disease with congenital
24 hepatic fibrosis and biliary atresia. *Histol Histopathol*, **25**, 223-35.

- 1 45. Temmerman F, Chen F, Libbrecht L, et al. (2017) Everolimus halts hepatic cysto-
2 togenesis in a rodent model of polycystic-liver-disease. *World J Gastroenterol*,
3 **23**, 5499-507.
- 4 46. Souza Pauli LS, Ropelle EC, de Souza CT, et al. (2014) Exercise training de-
5 creases mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 expression and sup-
6 presses hepatic gluconeogenesis in obese mice. *J Physiol*, **592**, 1325-40.
- 7 47. Gao Y, Zhang W, Zeng LQ, et al. (2020) Exercise and dietary intervention ame-
8 liorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy. *Re-*
9 *dox Biol*, **36**, 1-14.
- 10 48. Banales JM, Masyuk TV, Bogert PS, et al. (2008) Hepatic cystogenesis is asso-
11 ciated with abnormal expression and location of ion transporters and water
12 channels in an animal model of autosomal recessive polycystic kidney disease.
13 *Am J Pathol*, **173**, 1637-46.
- 14 49. Li D, Shi X, Zhao L, et al. (2016) Overexpression of Aquaporin 1 on cysts of
15 patients with polycystic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig*, **108**, 71-8.
- 16 50. Lee SO, Masyuk T, Splinter P, et al. (2008) MicroRNA15a modulates expression
17 of the cell-cycle regulator Cdc25A and affects hepatic cystogenesis in a rat
18 model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest*, **118**, 3714-24.
- 19 51. Yamaguchi T, Nagao S, Darren PW, et al. (2003) Cyclic AMP activates B-Raf
20 and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys.
21 *Kidney Int*, **63**, 1983-94.
- 22 52. Yu Q, Kou W, Xu X, et al. (2019) FNDC5/Irisin inhibits pathological cardiac
23 hypertrophy. *Clin Sci (Lond)*, **133**, 611-27.

- 1 53. Roehlen N, Crouchet E, Baumert TF. (2020) Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, **9**, 1-43.
- 2
- 3 54. Sato Y, Harada K, Ozaki S, et al. (2007) Cholangiocytes with mesenchymal features contribute to progressive hepatic fibrosis of the polycystic kidney rat. *Am J Pathol*, **171**, 1859-71.
- 4
- 5
- 6 55. 佐藤 保則. (2013) Caroli 病と先天性肝線維症の病態解析 : 動物モデル PCK ラットから得られた新たな知見. *金沢大学十全医学会雑誌*, **122**, 24-8.
- 7
- 8 56. Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, et al. (2012) Exercise training attenuates hepatic inflammation, fibrosis and macrophage infiltration during diet induced-obesity in mice. *Brain Behav Immun*, **26**, 931-41.
- 9
- 10
- 11 57. Tripathi DM, Erice E, Lafoz E, et al. (2015) Metformin reduces hepatic resistance and portal pressure in cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **309**, 301-9.
- 12
- 13
- 14 58. Zacarias AC, Barbosa MA, Guerra-Sá R, et al. (2017) Swimming training induces liver adaptations to oxidative stress and insulin sensitivity in rats submitted to high-fat diet. *Redox Rep*, **22**, 515-23.
- 15
- 16
- 17 59. Lemyze M, Dharancy S, Wallaert B. (2013) Response to exercise in patients with liver cirrhosis: implications for liver transplantation. *Dig Liver Dis*, **45**, 362-6.
- 18
- 19
- 20 60. Carey EJ, Steidley DE, Aqel BA, et al. (2010) Six-minute walk distance predicts mortality in liver transplant candidates. *Liver Transpl*, **16**, 1373-8.
- 21
- 22 61. Tandon P, Ismond KP, Riess K, et al. (2018) Exercise in cirrhosis: Translating evidence and experience to practice. *J Hepatol*, **69**, 1164-77.
- 23

- 1 62. Reinecke NL, Cunha TM, Heilberg IP, et al. (2014) Exercise capacity in poly-
2 cystic kidney disease. *Am J Kidney Dis*, **64**, 239-46.
- 3 63. Temmerman F, Ho TA, Vanslebrouck R, et al. (2015) Lanreotide Reduces
4 Liver Volume, But Might Not Improve Muscle Wasting or Weight Loss, in Pa-
5 tients With Symptomatic Polycystic Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*,
6 **13**, 2353-9.
- 7 64. 上月正博, 伊藤修, 小川美歌, 他. (2009) 内部障害のリハビリテーション, 医歯薬
8 出版株式会社, 東京, 32-3.
- 9 65. Hu G, Xu L, Ma Y, et al. (2020) Chronic exercise provides renal-protective ef-
10 fects with upregulation of fatty acid oxidation in the kidney of high fructose-fed
11 rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, **318**, 826-34.
- 12

1 IX. 図表の説明

2 図 1. PLD における病態形成の Signaling cascades

3 PC-1; polycystin-1, PC-2; polycystin-2, AC; adenylyate cyclase, cAMP;cyclic adeno-
4 sine monophosphate, PKA;protein kinase, MEK;mitogen-activated protein kinase
5 kinase, ERK;extracellular signal regulated kinase, CFTR; cystic fibrosis trans-
6 membrane conductance regulator, AE2; anion exchanger 2, AQP1; aquaporin 1,
7 mTOR; mammalian target of rapamycin, AMPK; AMP-activated protein kinase,
8 TGF- β ;transforming growth factor- β

9

10 図 2. 各プロトコールの時間経過

11 A : プロトコール 1

12 B : プロトコール 2

13 各プロトコールでは 1 週間の順化飼育後に介入を開始した。

14 解剖時に臓器と血液を採取した。

15

16 図 3. メトホルミンによる体重や食餌摂取量, 水分摂取量への影響

17 A : 体重 (g)

18 B : 食餌摂取量 (g)

19 C : 水分摂取量 (mL)

20 青 : Con-PCK 群, 緑 : Met-PCK 群

21 Con-PCK 群は 6 匹, Met-PCK 群は 7 匹の結果を示した。

22 データは平均±標準偏差で示した。

23

1 図 4. メトホルミンによる肝嚢胞への影響

2 A : HE 染色を行った代表的な肝組織像

3 上 : $\times 1$, Bar ; 2mm

4 下 : $\times 100$, Bar ; 20 μm

5 B : 嚢胞指数 (%)

6 C : 嚢胞数 (個)

7 青 : Con-PCK 群, 緑 : Met-PCK 群

8 * $p < 0.05$ vs. Con-PCK 群

9 1 匹当たり 5 枚の組織像で算出し, 各群 6 匹ずつを比較した.

10 データは平均土標準偏差で示した.

11

12 図 5. メトホルミンによる肝線維化と細胞増殖マーカーへの影響

13 A :

14 上 : Picro-sirius Red (PSR) 染色を行った代表的な肝組織像

15 下 : Ki-67 抗体による免疫染色を行った代表的な肝組織像

16 免疫染色の倍率 上段 : $\times 100$, Bar ; 20 μm , 下段 : $\times 400$, Bar ; 5 μm

17 B : 線維化指数 (%)

18 C : Ki-67 labeling index (%)

19 青 : Con-PCK 群, 緑 : Met-PCK 群

20 * $p < 0.05$ vs. Con-PCK 群

21 1 匹当たり 5 枚の組織像で算出し, 各群 6 匹ずつを比較した.

22 データは平均土標準偏差で示した.

1

2 **図 6. メトホルミンによる細胞増殖の調整蛋白発現への影響**

3 A :

4 上 : p-ERK 抗体による免疫染色を行った代表的な肝組織像

5 下 : p-mTOR 抗体による免疫染色を行った代表的な肝組織像

6 免疫染色の倍率 $\times 400$, Bar ; 5 μm

7 B : ERK, C : mTOR, D : S6, E : AMPK

8 各蛋白のバンド濃度は Total protein により補正した.

9 青 : Con-PCK 群, 緑 : Met-PCK 群

10 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Con-PCK 群

11 各群 6 匹ずつによる検討で, 図には各群の代表的な 2 個体のサンプルより得られた

12 バンドを表示した.

13 データは平均土標準偏差で示した.

14

15 **図 7. メトホルミンによる線維化の調整蛋白発現への影響**

16 A : CFTR, B : AQP1, C : TGF- β , D : COL1

17 各蛋白のバンド濃度は β -actin により補正した.

18 青 : Con-PCK 群, 緑 : Met-PCK 群

19 * $p < 0.05$ vs. Con-PCK 群

20 各群 6 匹ずつによる検討で, 図には各群の代表的な 2 個体のサンプルより得られた

21 バンドを表示した.

22 データは平均土標準偏差で示した.

23

1

2 図 8. 長期的運動の体重や食餌摂取量, 水分摂取量への影響

3 A : 体重 (g)

4 B : 食餌摂取量 (g)

5 C : 水分摂取量 (mL)

6 黒 : Con-SD 群, 青 : Sed-PCK 群, 赤 : Ex-PCK 群

7 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Con-SD 群, † $p < 0.05$ vs. Sed-PCK 群

8 各群 10 匹ずつ測定した.

9 データは平均±標準偏差で示した.

10

11 図 9. 長期的運動の運動耐容能への影響

12 A : 総走行距離 (m)

13 B : $\dot{V}O_{2max}$ (mL/kg/min)

14 黒 : Con-SD 群, 青 : Sed-PCK 群, 赤 : Ex-PCK 群

15 ** $p < 0.01$ vs. Con-SD 群, †† $p < 0.01$ vs. Sed-PCK 群

16 総走行距離は心肺運動負荷試験時の走行距離を示す.

17 各群 10 匹ずつ検討した.

18 データは平均±標準偏差で示した.

19

20 図 10. 長期的運動による肝嚢胞への影響

21 A : HE 染色を行った代表的な肝組織像

22 上 : $\times 1$, Bar ; 2mm

23 下 : $\times 100$, Bar ; 20 μm

- 1 B : 嚢胞指数 (%)
- 2 C : 嚢胞数 (個)
- 3 黒 : Con-SD 群, 青 : Sed-PCK 群, 赤 : Ex-PCK 群
- 4 ** $p < 0.01$ vs. Con-SD 群, †† $p < 0.01$ vs. Sed-PCK 群
- 5 1 匹当たり 5 枚の組織像で算出し, 各群 10 匹ずつを比較した.
- 6 データは平均±標準偏差で示した.
- 7

8 図 11. 長期的運動による肝線維化と細胞増殖マーカーへの影響

- 9 A :
- 10 上 : Picro-sirius Red (PSR) 染色を行った代表的な肝組織像
- 11 下 : Ki-67 抗体による免疫染色を行った代表的な肝組織像
- 12 免疫染色の倍率 上段 : $\times 100$, Bar ; 20 μm , 下段 : $\times 400$, Bar ; 5 μm

- 13 B : 線維化指数 (%)
- 14 C : Ki-67 labeling index (%)
- 15 黒 : Con-SD 群, 青 : Sed-PCK 群, 赤 : Ex-PCK 群
- 16 ** $p < 0.01$ vs. Con-SD 群, †† $p < 0.01$ vs. Sed-PCK 群
- 17 1 匹当たり 5 枚の組織像で算出し, 各群 10 匹ずつを比較した.
- 18 データは平均±標準偏差で示した.
- 19

20 図 12. 長期的運動による細胞増殖の調整蛋白発現への影響

- 21 A :
- 22 上 : p-ERK 抗体による免疫染色を行った代表的な肝組織像
- 23 下 : p-mTOR 抗体による免疫染色を行った代表的な肝組織像

1 免疫染色の倍率 ×400, Bar ; 5 μm

2 B : ERK, C : mTOR, D : S6, E : AMPK

3 各蛋白のバンド濃度は Total protein により補正した.

4 黒 : Con-SD 群, 青 : Sed-PCK 群, 赤 : Ex-PCK 群

5 * p<0.05, ** p<0.01 vs. Con-SD 群, † p<0.05, †† p<0.01 vs. Sed-PCK 群

6 各群 10 匹ずつによる検討で, 図には各群の代表的な 2 個体のサンプルより得られた

7 バンドを表示した.

8 データは平均±標準偏差で示した.

9

10 図 13. 長期的運動による線維化の調整蛋白発現への影響

11 A : CFTR, B : AQP1, C : TGF-β, D : COL1

12 各蛋白のバンド濃度は β-actin により補正した.

13 黒 : Con-SD 群, 青 : Sed-PCK 群, 赤 : Ex-PCK 群

14 * p<0.05 vs. Con-SD 群, † p<0.05 vs. Sed-PCK 群

15 各群 10 匹ずつによる検討で, 図には各群の代表的な 2 個体のサンプルより得られた

16 バンドを表示した.

17 データは平均±標準偏差で示した.

18

19 図 14. 長期的運動とメトホルミンが PLD の Signaling cascades に及ぼす影響

20 PC-1; polycystin-1, PC-2; polycystin-2, AC; adenylate cyclase, cAMP;cyclic adeno-

21 sine monophosphate, PKA;protein kinase, MEK;mitogen-activated protein kinase

22 kinase, ERK;extracellular signal regulated kinase, CFTR; cystic fibrosis trans-

23 membrane conductance regulator, AE2; anion exchanger 2, AQP1; aquaporin 1,

1 mTOR; mammalian target of rapamycin, AMPK; AMP-activated protein kinase,

2 TGF- β ;transforming growth factor- β

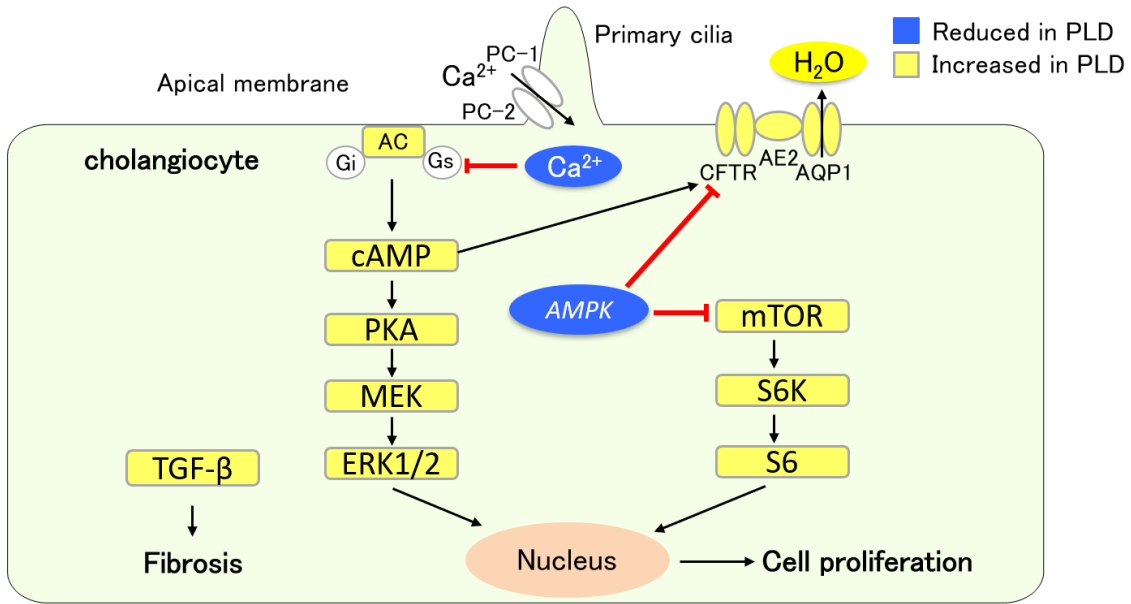
3 赤：長期的運動, 青：メトホルミン

4

5

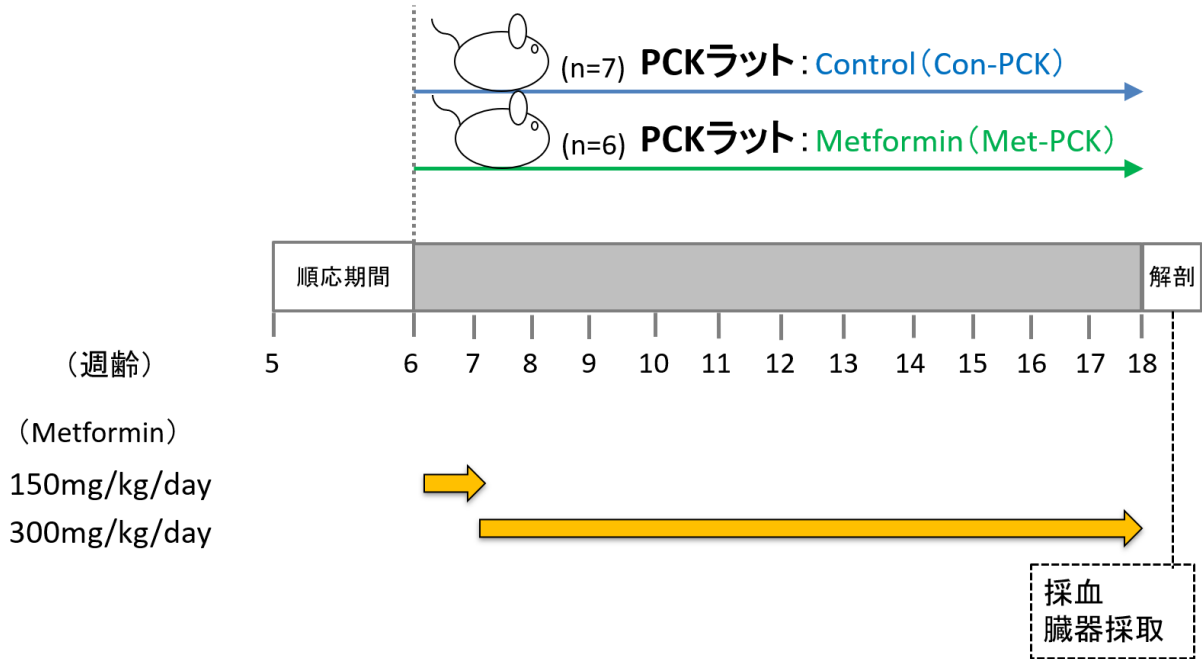
1 X. 図表

2 図 1

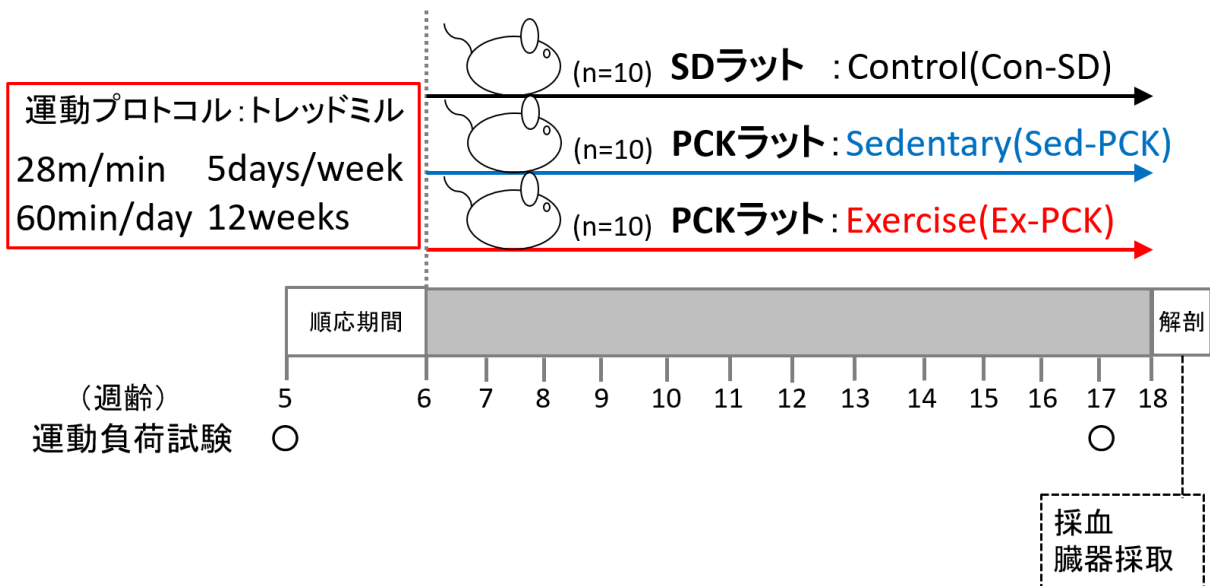


1 図 2

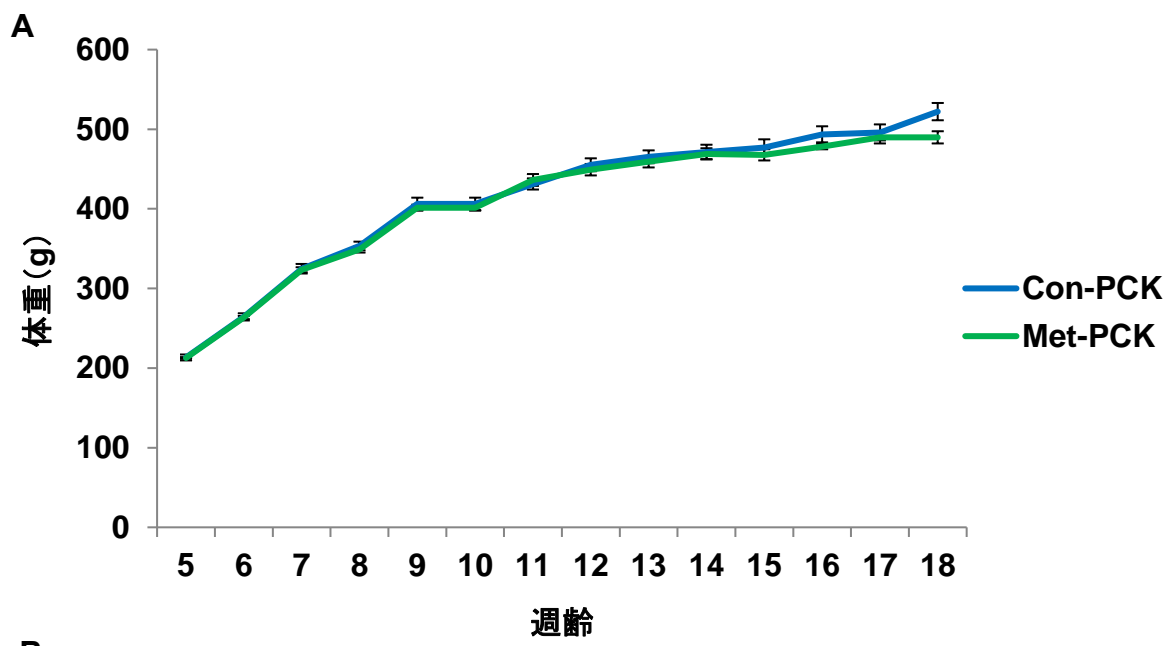
A



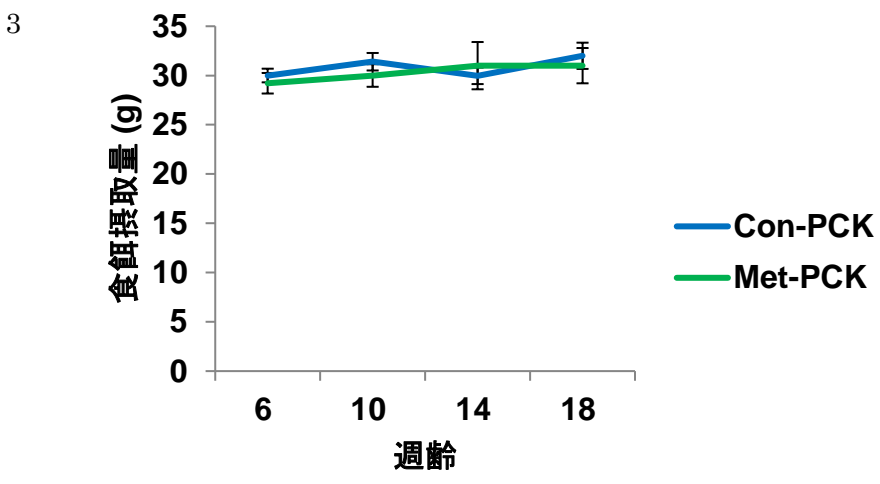
B



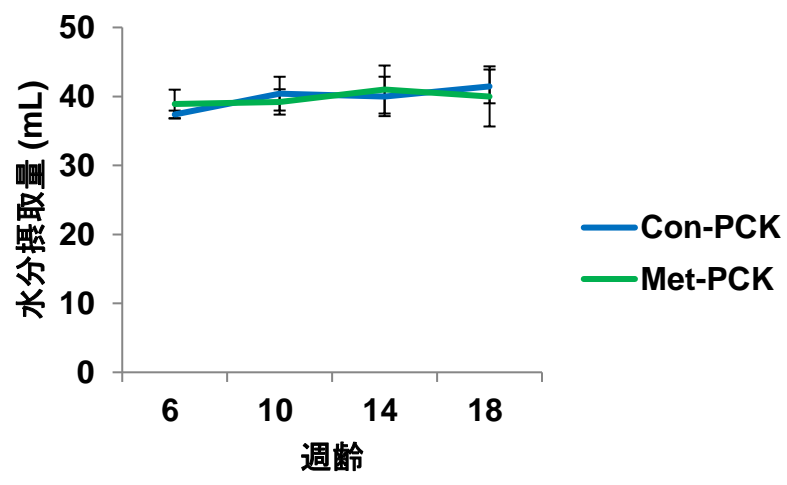
1 ☒ 3



2 **B**



3 **C**

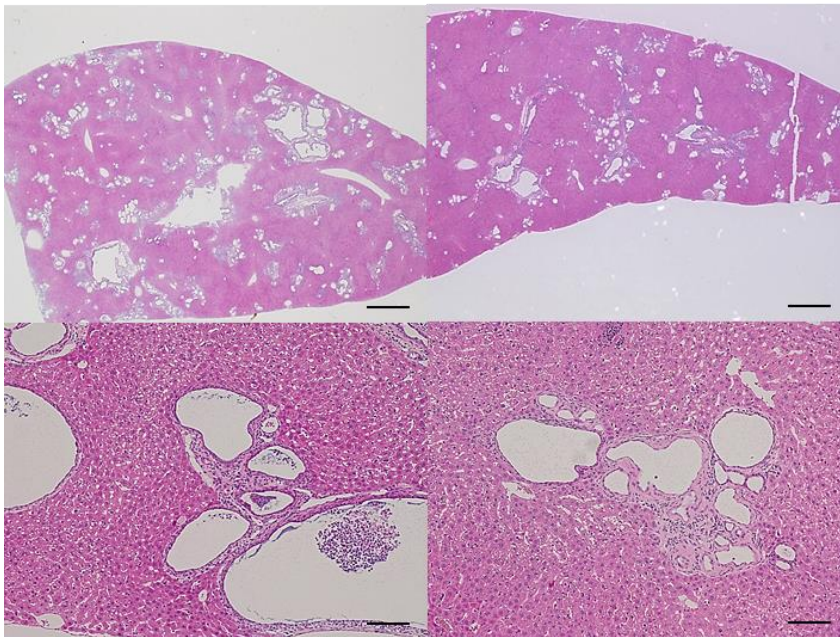


1 ☒ 4

2 **A**

3 **Con-PCK**

4 **Met-PCK**



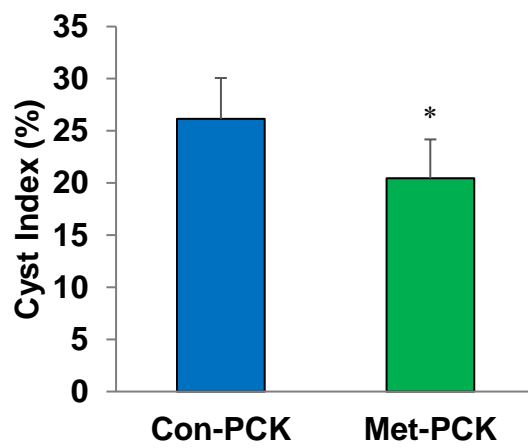
13

14

15

16

17 **B**

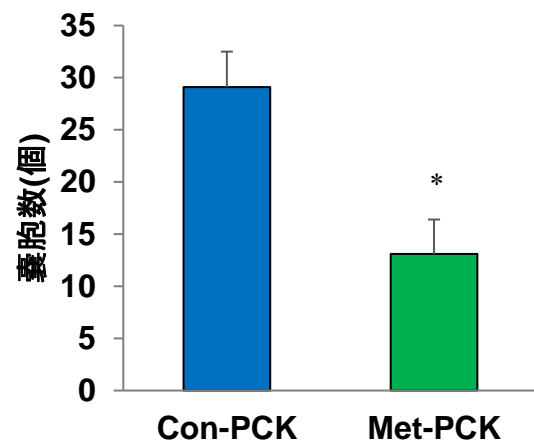


24

25

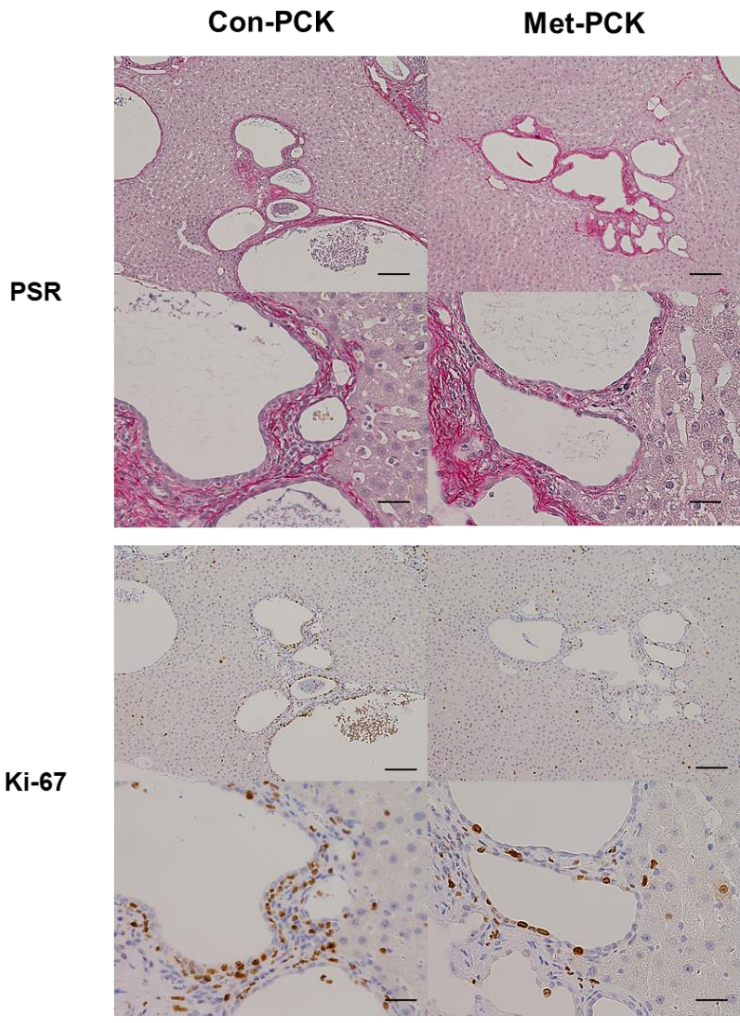
26

17 **C**

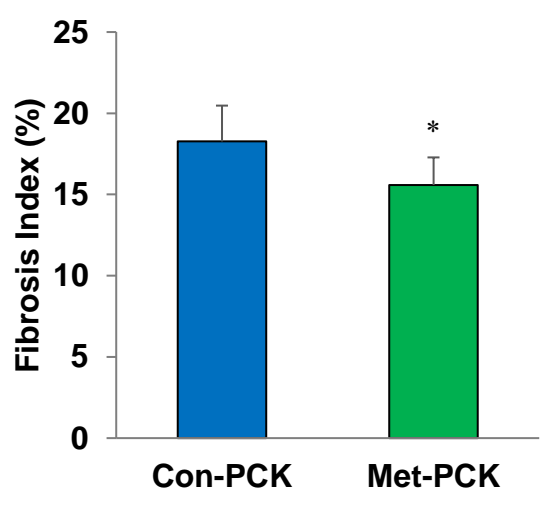


1 ☒ 5

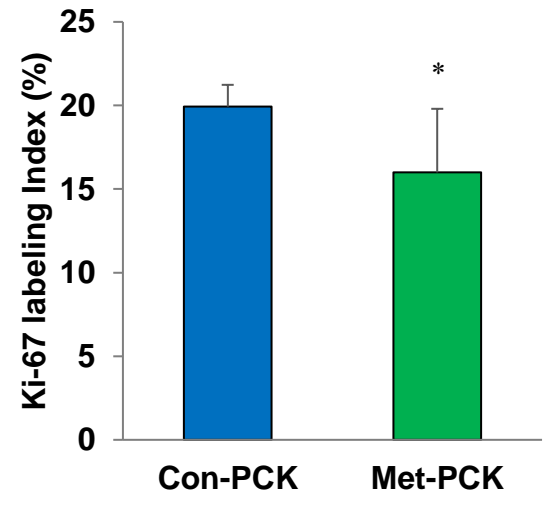
2 **A**



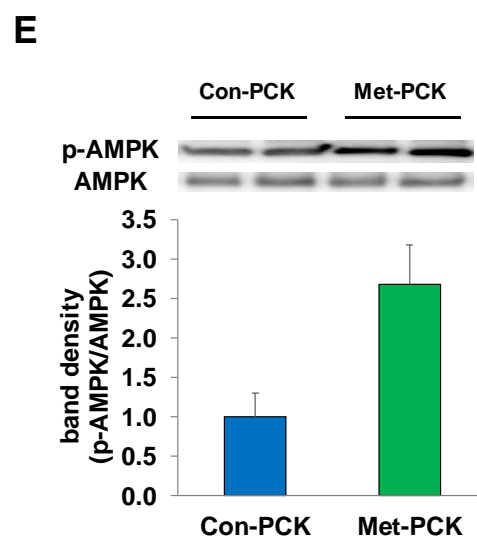
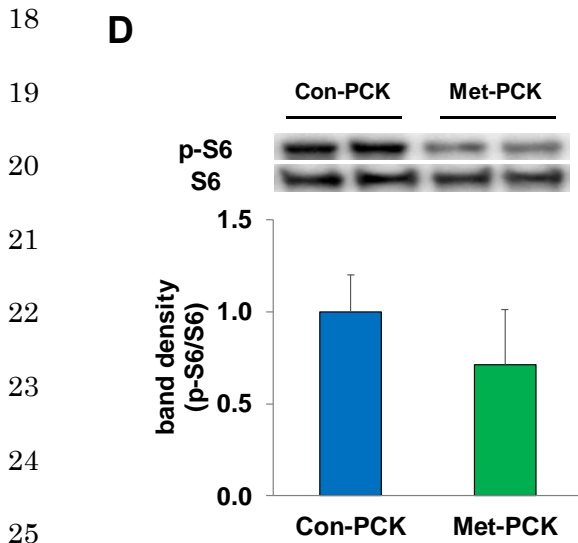
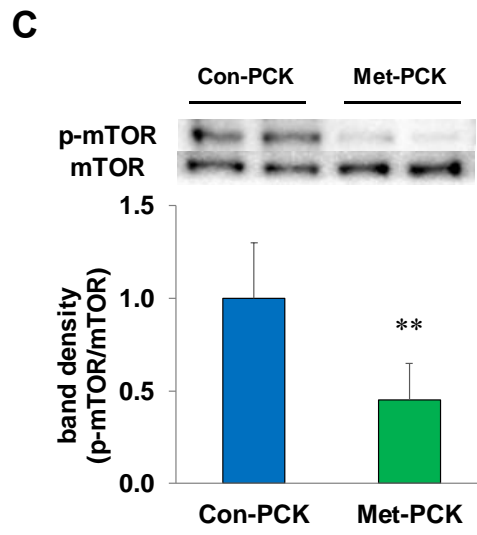
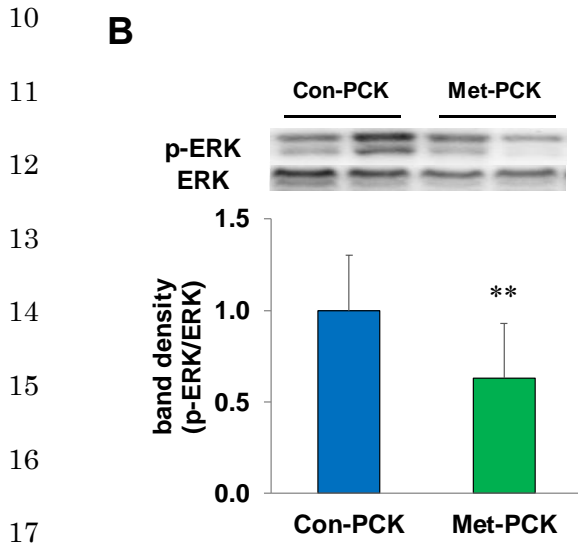
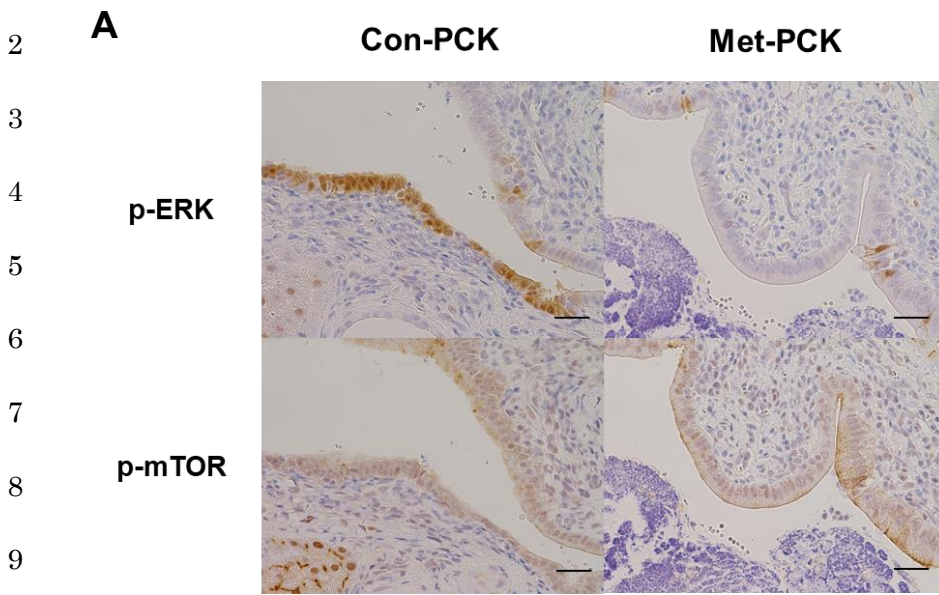
17 **B**



17 **C**

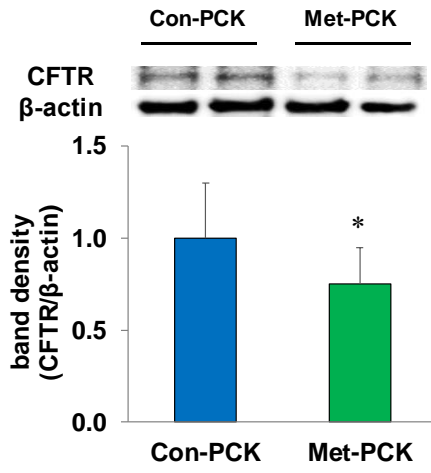


1 ☒ 6



2

A



3

4

5

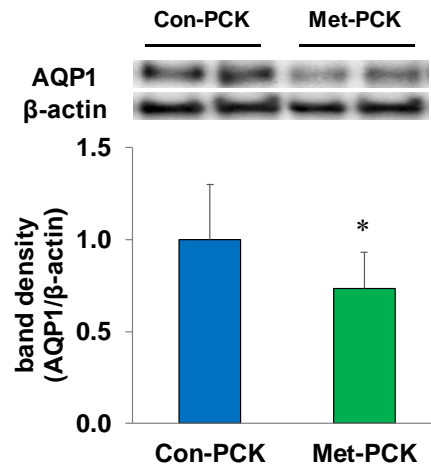
6

7

8

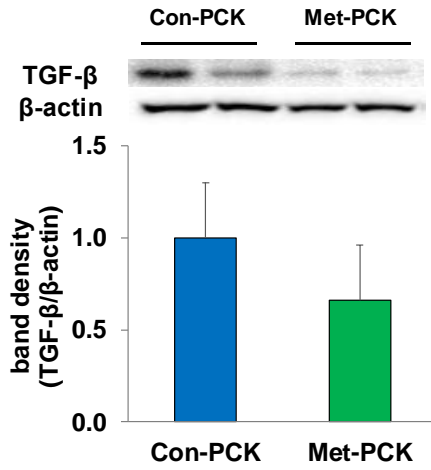
9

B



10

C



11

12

13

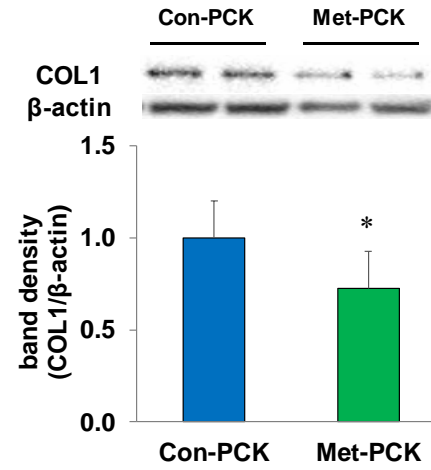
14

15

16

17

D



18

19

20

21

22

23

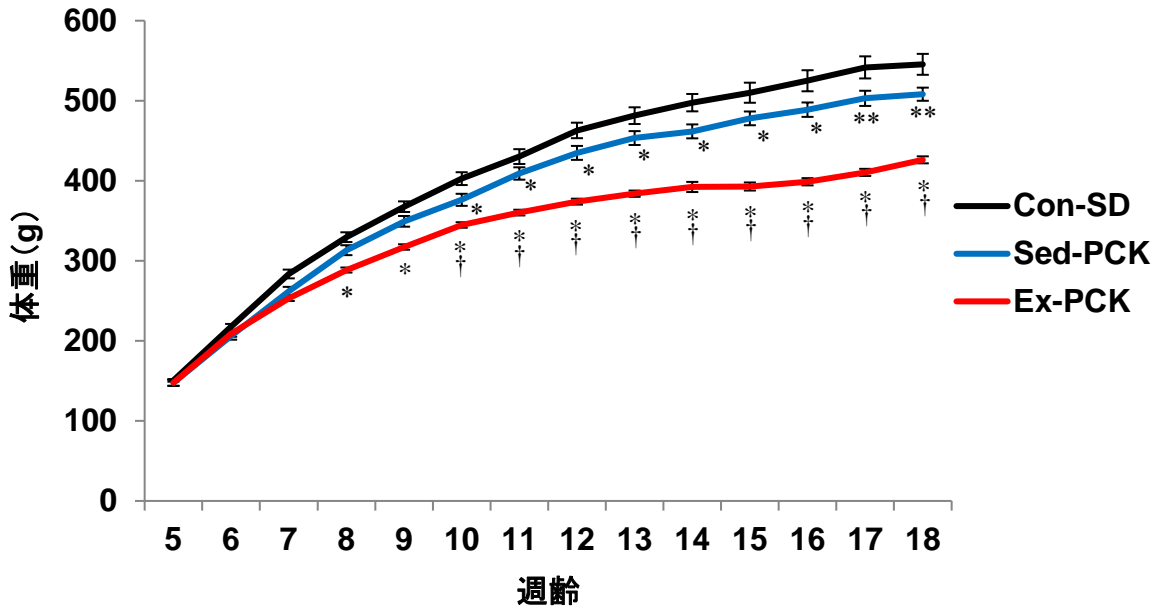
24

25

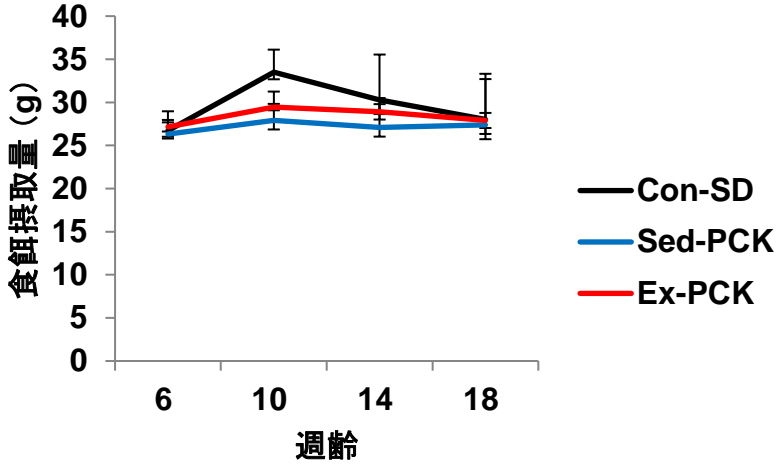
1 ☒ 8

2 A

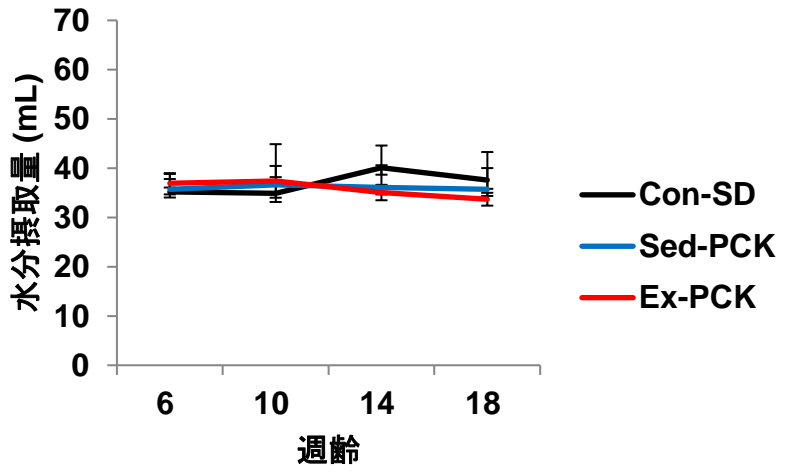
3



B

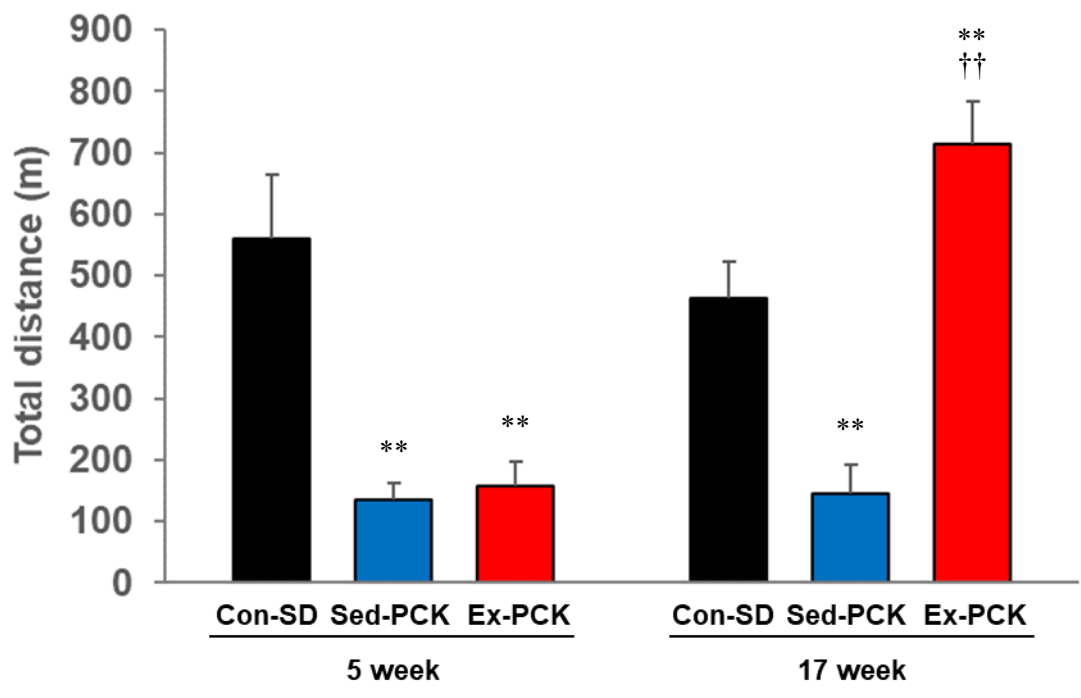


C

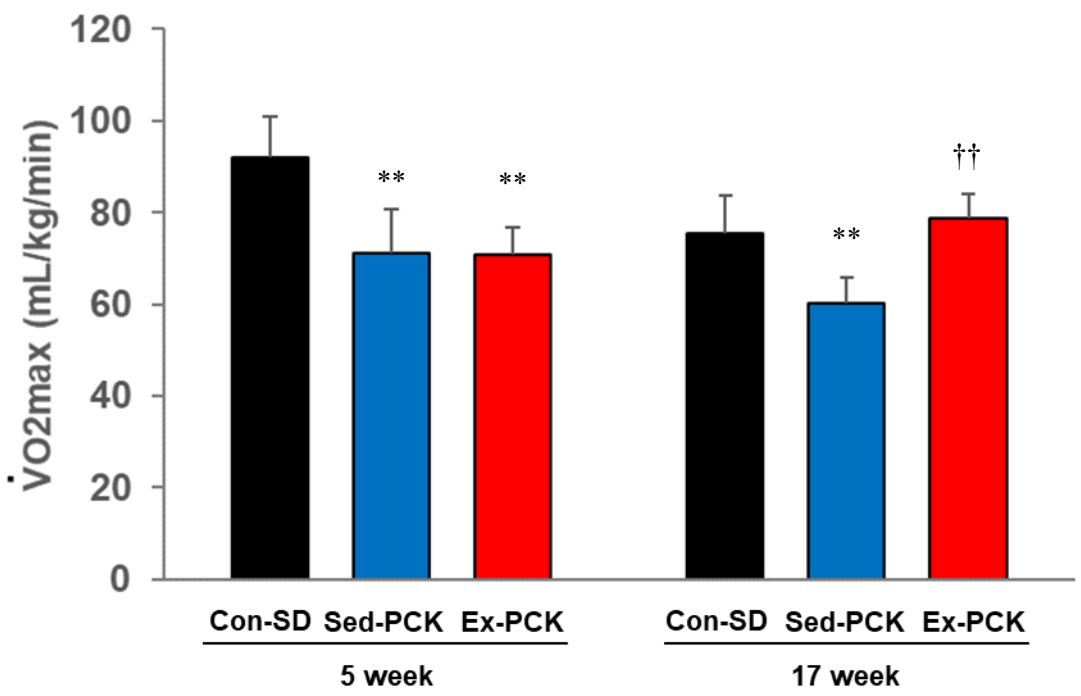


1 ☒ 9

2 **A**



12 **B**



24

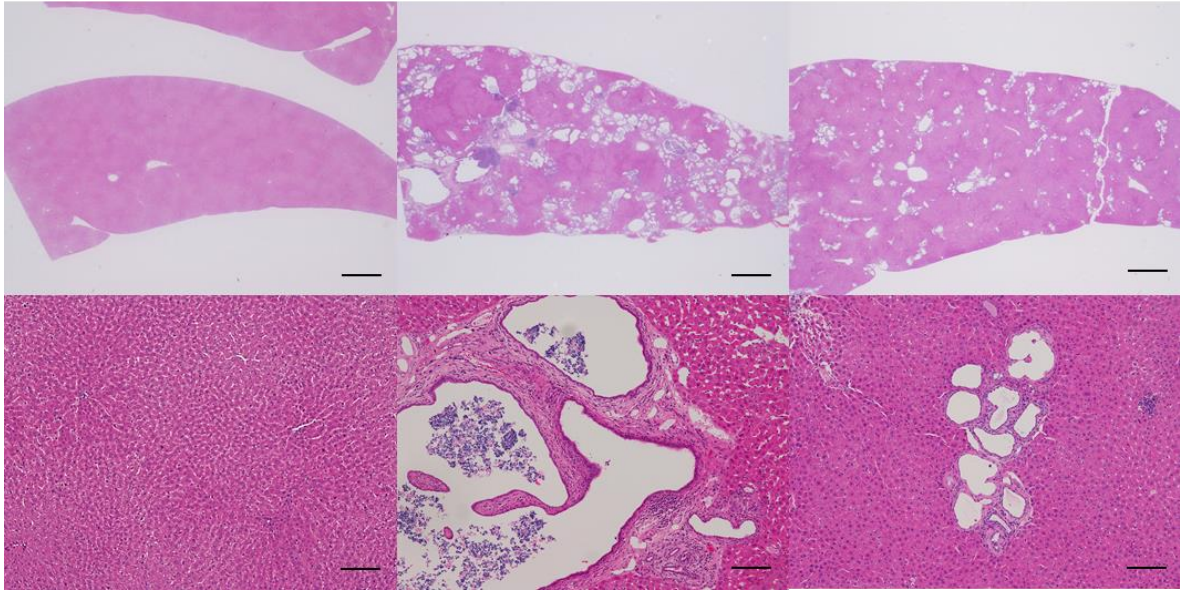
1 ☒ 10

2 **A**

Con-SD

Sed-PCK

Ex-PCK



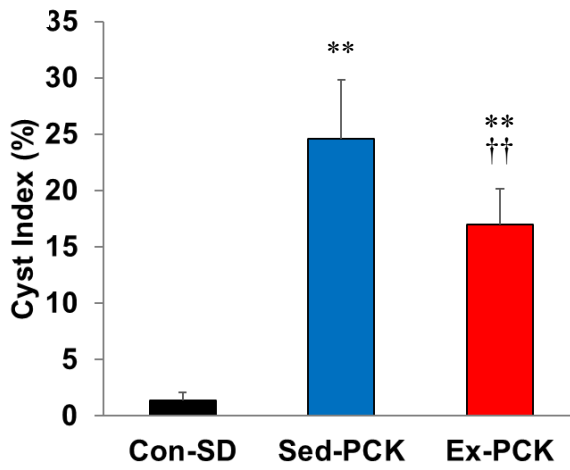
11

12

13

14

B



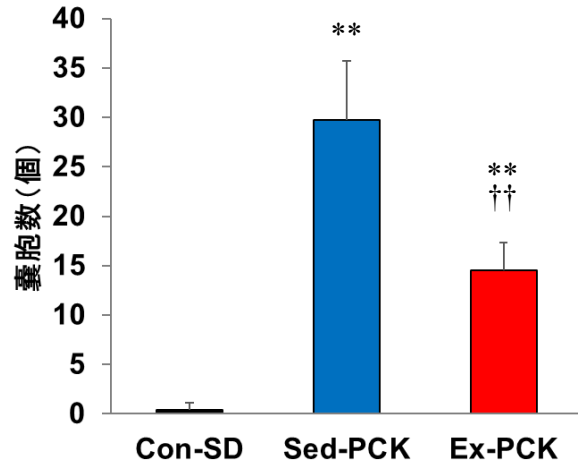
21

22

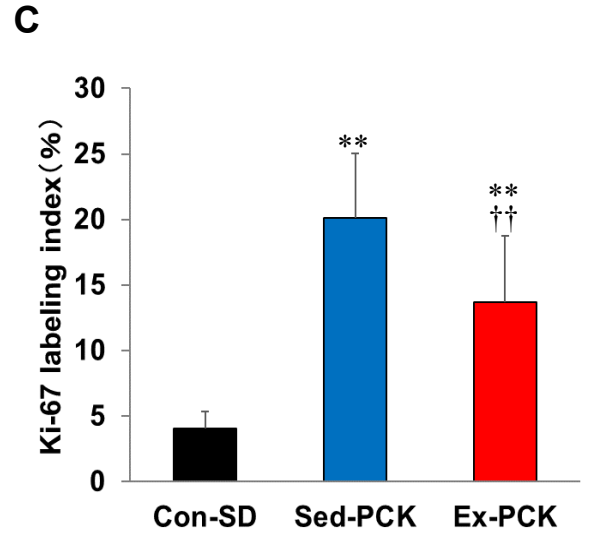
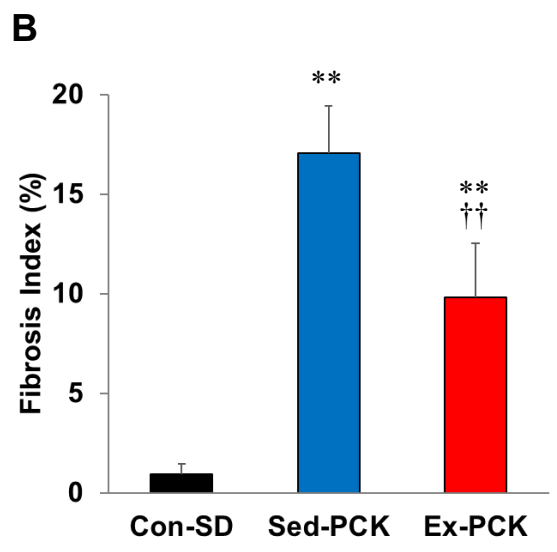
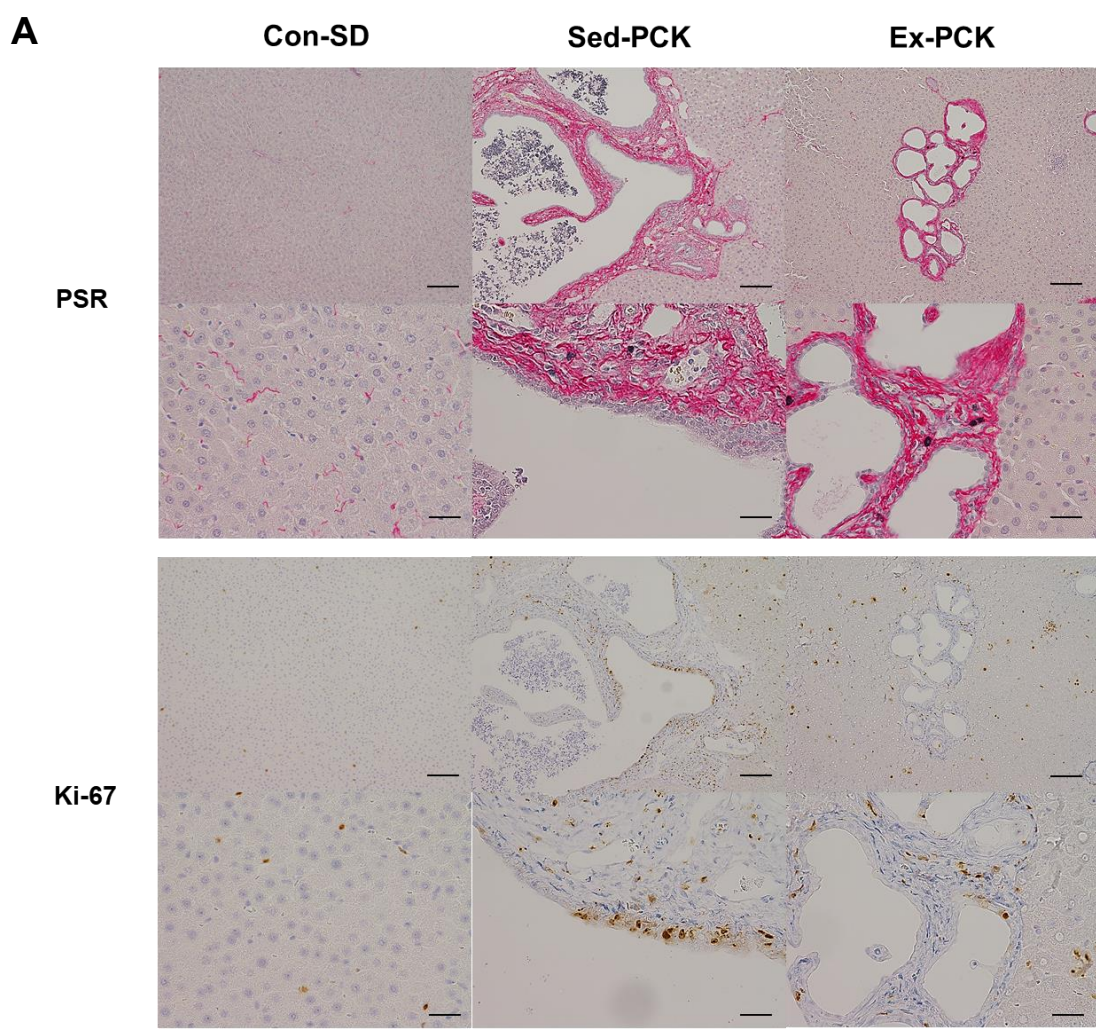
23

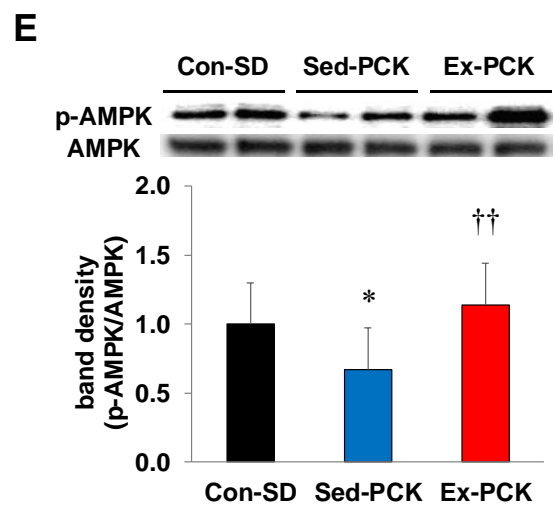
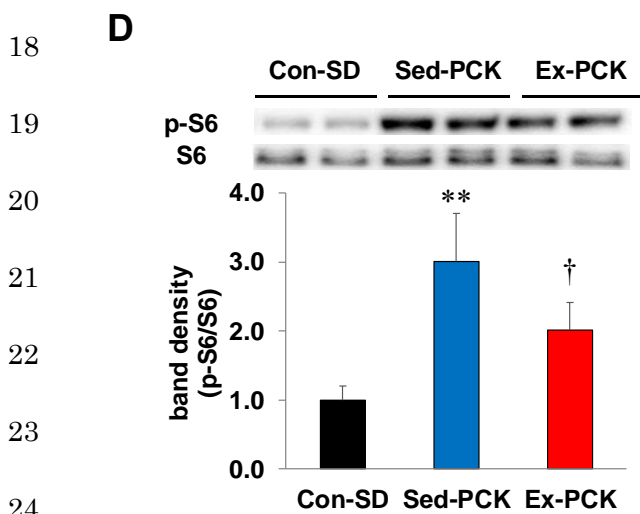
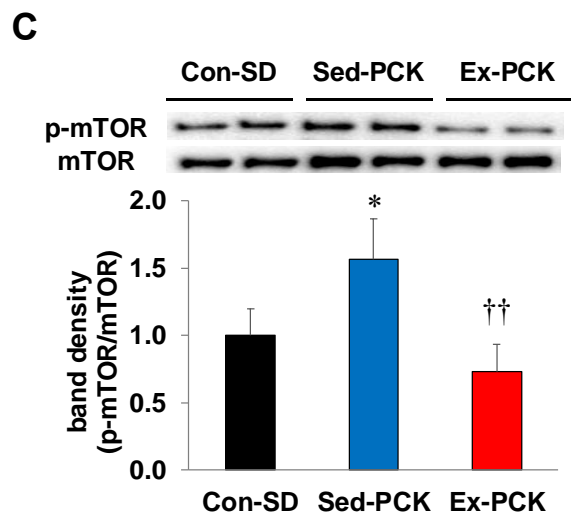
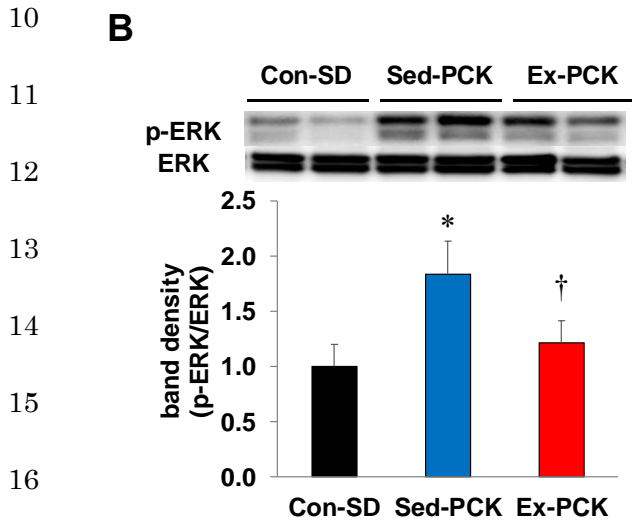
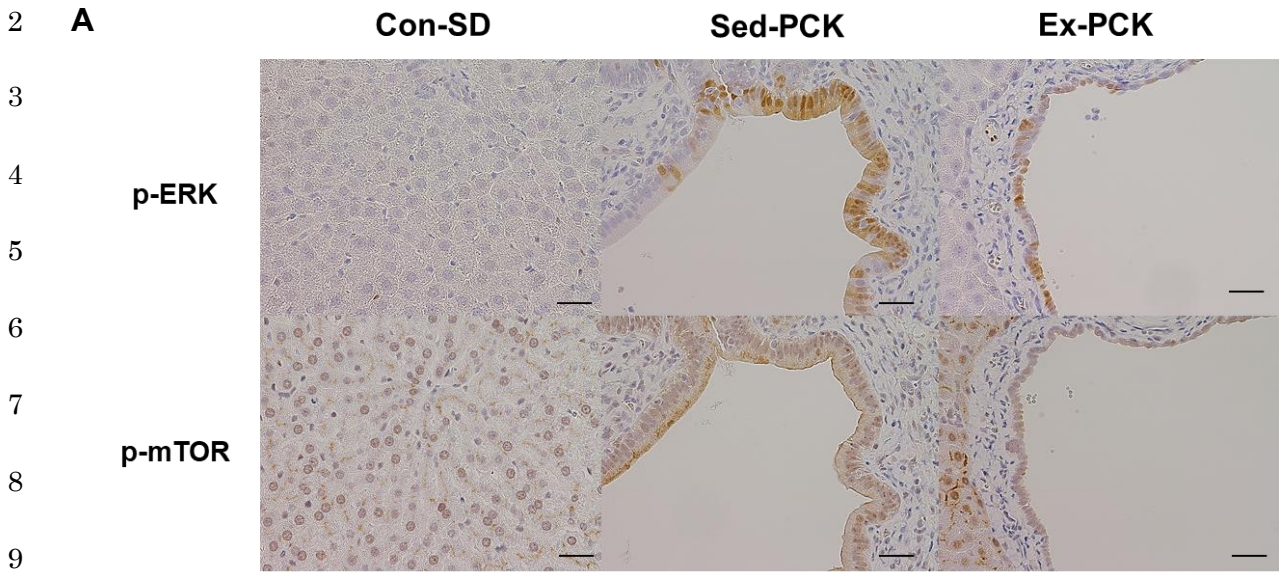
24

C



2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24





2

A

3

4

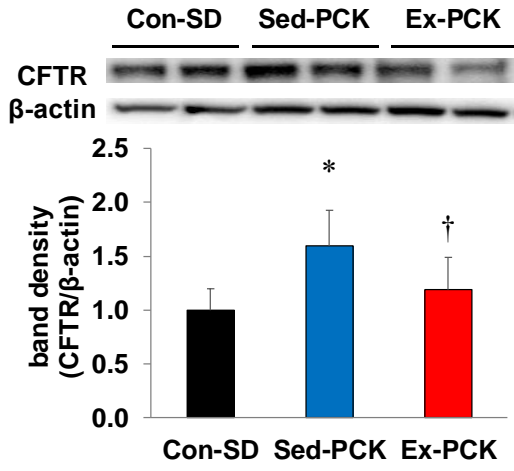
5

6

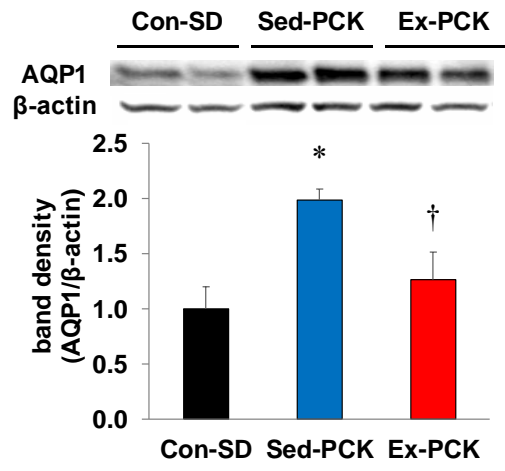
7

8

9



B



10

C

11

12

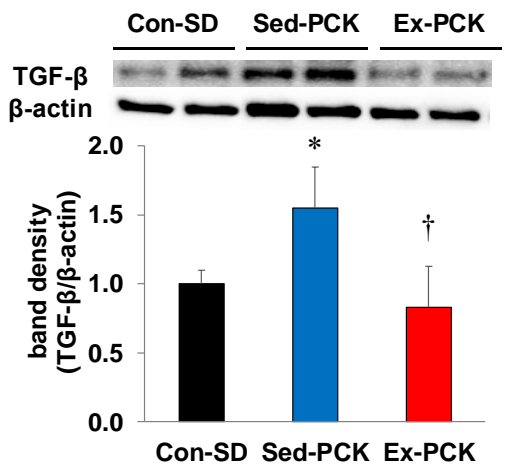
13

14

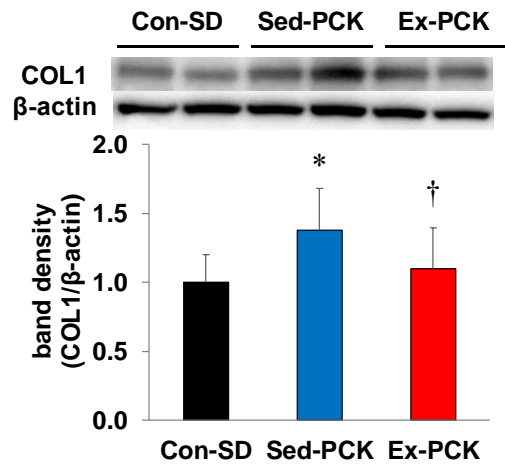
15

16

17



D



18

19

20

21

22

23

24

25

1 ☒ 14

2 **Exercise training Metformin**
Apical membrane

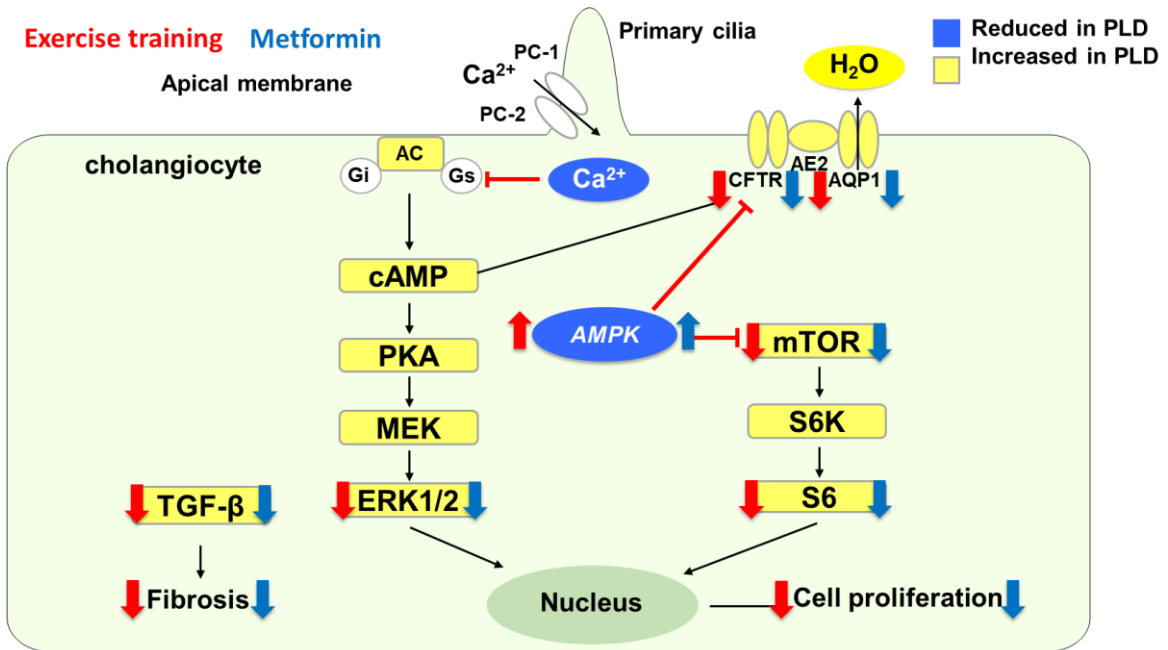


表 1. PLD の分類

	PLD		
	肝線維性多嚢胞性疾患		
	ADPLD (常染色体優性多嚢胞性肝疾患)	ADPKD (常染色体優性多発性嚢胞腎)	ARPKD (常染色体劣性多発性嚢胞腎)
遺伝形式	常染色体優性	常染色体優性	常染色体劣性
原因遺伝子	PRKCSH/SEC63	PKD1/PKD2	PKHD1
頻度	1 : 10000	1 : 1000	1 : 20000
肝病変	肝嚢胞	肝嚢胞	先天性肝線維症
腎嚢胞	なし	あり	あり
合併症	嚢胞内感染, 嚢胞捻転, 嚢胞破裂, 嚢胞内出血, 門脈圧亢進症, 脳動脈瘤, 僧帽弁逸脱, 大腸憩室		
モデル		Han:SPRD-Cy ラット	PCK ラット

表 2. PLD に対する薬物療法

	オクトレオチド ¹¹⁾	NVP-BEZ235 ²⁶⁾	ウルソデオキシコール酸 ²⁷⁾	テルミサルタン ²⁸⁾	ピオグリタゾン ²⁹⁾
作用	cAMP 生成阻害	mTOR 抑制	cAMP 生成阻害	TGF-β 発現抑制	PPAR-γ 刺激
対象	PLD 患者	PCK ラット	PCK ラット	PCK ラット	PCK ラット
結果	肝容積減少	胆管上皮細胞増殖抑制	胆管上皮細胞増殖抑制	肝線維化抑制	肝嚢胞増大抑制
	QOL 改善	肝嚢胞増大抑制	肝嚢胞増大抑制		肝線維化抑制

cAMP; cyclic AMP, mTOR; mammalian target of rapamycin, TGF-β; transforming growth factor-β,

PPAR-γ; peroxisome proliferator activated receptor-γ, PLD; polycystic liver disease, ADPKD; autosomal dominant polycystic kidney disease,

PCK; polycystic kidney, QOL; quality of life

表 3. 肝臓疾患患者に対する長期的運動の効果

対象	NAFLD 患者 ¹⁷⁾	代償性肝硬変患者 ¹⁸⁾	非代償性肝硬変患者 ¹⁹⁾
頻度	3 回/週	3 回/週	
強度	60% Peak $\dot{V}O_2$	60-80% Peak $\dot{V}O_2$	
時間	40 分/日	40 分/日	
種類	エルゴメーター	エルゴメーター	エルゴメーター レジスタンス運動
期間	12 週間	8 週間	12 週間
結果	肝脂肪蓄積減少	Peak $\dot{V}O_2$ 改善 QOL 改善	Peak $\dot{V}O_2$ 改善 6 分間歩行距離改善 膝伸展筋力改善

NAFLD; non-alcoholic fatty liver disease, $\dot{V}O_2$; oxygen consumption, QOL; quality of life

表 4. 肝疾患モデル動物に対する長期的運動の効果

対象	NAFLD モデルラット ²¹⁾	急性アルコール性肝障害モデルマウス ²²⁾	肝細胞癌モデルマウス ²³⁾
頻度	5 回/週	5 回/週	5 回/週
強度	20m/min (15°傾斜)	25m/min	12.5m/min
時間	60 分/日	60 分/日	60 分/日
種類	トレッドミル	トレッドミル	トレッドミル
期間	12 週間	4 週間	32 週間
結果	抗線維化効果 抗炎症効果	アルコール投与後の肝逸脱酵素上昇抑制	癌細胞増殖抑制 発癌予防

NAFLD; non-alcoholic fatty liver disease

表 5. メトホルミンによる各種パラメーターの影響

	Con-PCK (n=6)	Met-PCK (n=7)	p-value
Liver weight/BW (g/kg)	5.45 ± 0.18	4.89 ± 0.88	0.146
Plasma			
Glucose (mg/dL)	147.3 ± 18.8	150.0 ± 24.7	0.829
Total cholesterol (mg/dL)	162.7 ± 26.5	147.1 ± 38.6	0.412
Triglycerides (mg/dL)	69.0 ± 13.7	62.0 ± 19.7	0.469
Free fatty acids (mEq/L)	128.2 ± 18.9	128.3 ± 21.9	0.992
Total bilirubin (mg/dL)	0.08 ± 0.05	0.02 ± 0.01	0.026
AST (IU/L)	162.3 ± 45.0	170.9 ± 89.4	0.837
ALT (IU/L)	87.3 ± 9.2	64.4 ± 14.1	0.005

The data are presented as the mean ± SD.

Con-PCK; Control group, Met-PCK; Metformin group

BW; body weight, AST; Aspartate aminotransferase, ALT; Alanine transaminase

表 6. 長期的運動による各種パラメーターの影響

	Con-SD (n=10)	Sed-PCK (n=10)	Ex-PCK (n=10)	p-value		
				Con-SD vs Sed-PCK	Con-SD vs Ex-PCK	Sed-PCK vs Ex-PCK
Liver weight/BW (g/kg)	3.33 ± 0.09	5.73 ± 1.09	4.28 ± 0.97	p < 0.001	0.046	0.002
SBP (mmHg)	106 ± 21	104 ± 8	96 ± 13	0.931	0.292	0.481
Plasma						
Total cholesterol (mg/dL)	67.9 ± 16.2	148.2 ± 27.2	114.1 ± 24.1	p < 0.001	p < 0.001	0.007
Triglycerides (mg/dL)	59.7 ± 18.9	69.3 ± 16.9	49.8 ± 11.8	0.391	0.396	0.030
Free fatty acids (mEq/L)	177.6 ± 73.4	174.7 ± 35.0	153.8 ± 38.4	0.991	0.568	0.645
Total bilirubin (mg/dL)	0.04 ± 0.02	0.24 ± 0.15	0.41 ± 0.57	0.590	0.072	0.397
AST (IU/L)	99.5 ± 22.9	213.2 ± 74.8	186.8 ± 84.2	0.005	0.029	0.747
ALT (IU/L)	56.8 ± 12.4	92.8 ± 10.7	101.6 ± 11.0	p < 0.001	p < 0.001	0.410

The data are presented as the mean ± SD.

Con-SD; Control group, Sed-PCK; Sedentary group, Ex-PCK; Exercise group

BW; body weight, SBP; systolic blood pressure, AST; Aspartate aminotransferase, ALT; Alanine transaminase