

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：34309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350853

研究課題名(和文) 加齢による末梢神経および毛細血管の退行に関する縦断的検証と高齢期運動介入の効果

研究課題名(英文) Age-related histological regression of myelinated fibers and capillary of tibial nerves, and effects of the aerobic exercise to aged tibial nerve and capillary

研究代表者

崎田 正博 (Sakita, Masahiro)

京都橘大学・健康科学部・准教授

研究者番号：10582190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：加齢による末梢神経および毛細血管の退行を検証し、また高齢期の末梢神経・毛細血管退行に対する低強度運動の効果を検証した。若年期と高齢期ラットの脛骨神経では高齢群の著明な有髄線維と毛細血管数の萎縮と減少が認められた。2週間の低強度運動を実施した運動群とコントロール群の神経組織と血清におけるBDNF(末梢神経線維の修復・生存維持促進因子)とVEGF(血管新生促進因子)の発現量では、運動群の組織BDNFの増加と血清BDNFの減少がみられ、また運動群の組織VEGFの減少と血清VEGFの増加がみられた。つまり、末梢神経と毛細血管は相互補完的作用により双方の生存・再生を可能することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the age-related regression of the tibial nerve and capillary, and the effects of the aerobic exercise to aged tibial nerve and capillary. The myelinated fibers and capillaries in the tibial nerves of elderly group significantly atrophied and decreased in comparison with those of young rats. The tissue and serum BDNF (promoting factor of repair and survival of myelinated fiber) of aerobic exercise (Ex) group (2 weeks) significantly increased and decreased in comparison with those of control (Con) group, respectively. In contrast, the tissue and serum VEGF (promoting factor of angiogenesis) of Ex group significantly decreased and increased in comparison with those of Con group, respectively. According to the above results, it has been revealed that both the peripheral nerve and capillary are able to survive and regenerate with complementary relation.

研究分野：応用健康科学

キーワード：加齢 末梢神経 有髄線維退行 毛細血管退行 低強度運動介入 有髄線維構造改善 毛細血管再構築

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国では高齢者人口の増加に伴う大腿骨頸部骨折者が年間 14 万人に上り、その 1/5 が寝たきりになるとされ、社会的問題になっている (厚生労働省保険局調査課, 2008)。大腿骨頸部骨折は、そのほとんどが単純な転倒により発生する。転倒因子には、筋力低下、バランス能力低下および歩行能力低下が報告されている (Lord SR, et al. Age Ageing 1994)。特に筋力低下に関して、その原因となる加齢性筋肉減弱症 (サルコペニア) が注目されているが (Lexell J, J Neurol Sci 1992)、そのメカニズムは未だ解明されていない。一方、近年末梢神経の萎縮が高齢期に進行し、転倒を引き起こす要因と考えられ始めている (Nardone A, et al. Clin Neurophysiol 2007; Nardone A, et al. Clin Neurophysiol 2004; 崎田ら, 健康科学 2010)。近年の知見では、加齢によりサルコペニアに先行して末梢神経の萎縮が生じることが明らかにされており (Liu J, et al. Cell Metab 2013)、高齢者の転倒原因を根本的に覆す可能性がある。生理学的研究では、末梢神経機能低下が筋力低下よりもバランス能を顕著に悪化させることが明らかにされている (Sakita M, et al. J Phys Ther Sci 2012)。しかし、加齢性の末梢神経萎縮が高齢者の転倒要因であることは社会的にほとんど注目されておらず、その原因解明と改善策が急務であろう。

末梢神経に関する先行研究では、60 歳以降急激に有髄線維数の減少と髄鞘 (シュワン細胞により形成され、軸索に巻き付く絶縁体の役割をもつ) 厚の減少・脱落が生じるとされ (Verdú E, et al. J Peripher Nerv Sys 2000)、さらに末梢神経遠位部で萎縮が著明であること (Kishi M, et al. Diabetes 2002) が明らかになっている。この髄鞘の特異的な萎縮と脱落は、シュワン細胞内の慢性的酸化ストレスの増加や酸素不足によるミトコンドリア機能不全が髄鞘のアポトーシスシグナルを活性化させることで生じるとされる (Kuramoto T, et al. PLoS Genet 2011)。このアポトーシスシグナルを活性化させるシグナル経路の上流では、細胞外から供給される神経栄養因子やその受容体の減少が想定されている (Mousavi K, et al. J Neurosci 2006; Padelli LA, et al. Cell Mol Life Sci, 2010)。以上の知見から、神経栄養因子や酸素供給の低下または活性酸素の増加は、これらの供給源である毛細血管が退行することで生じると推察される。しかし、加齢による末梢神経と毛細血管の状態は、組織・生化学的に前向き縦断的検証で明らかになっていなかった。

そこで、研究代表者らはラットの長期間飼育から、末梢神経の毛細血管構築を縦断的に検討した。その結果、加齢に伴い末梢神経毛細血管数の減少、残存毛細血管径と断面積の縮小を明らかにした (Sakita M, Memoirs of

Kyoto Tachibana University 2014)。さらに、高齢ラットに対して低強度運動介入を実施した結果、自然加齢群よりも有意に運動介入群の毛細血管数は増加し、また毛細血管径や断面積も有意に増加することを明らかにした (Sakita M, et al. J Phys Ther Sci 2014)。

毛細血管の退行は、神経退行よりも先行するとの報告 (van Dijk EJ, et al. stroke 2008; Brown WR, et al. J Neurol Sci 2009) もあるため、毛細血管退行の予防こそが有髄線維髄鞘の機能や構造の維持・改善に必須の要素であると予想される。そこで、研究代表者はこれまで実証してきた加齢による毛細血管構築の縦断的知見に加え、生化学的・分子生物学的に自然加齢による有髄線維髄鞘と毛細血管の退行を検証し、また高齢期の長期間運動によるそれらの予防効果を検証する必要があると考えた。

2. 研究の目的

自然加齢による有髄線維髄鞘と毛細血管の退行を前向き縦断的かつ組織学的に検証した。また、高齢期の継続運動による末梢神経有髄線維の髄鞘および末梢神経毛細血管の加齢性退行に予防効果があるか検証する。具体的には、末梢神経組織と血清の双方から神経栄養因子、血管増殖因子等の発現量を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA 法) を用いて測定し、さらに有髄線維と毛細血管の組織解析を行い髄鞘と神経毛細血管の相互補完作用と組織構造の改善を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 末梢神経の加齢による組織学的退行の検証

本研究では、Wistar 系雄ラットを用いた。ラットは、10 週齢から飼育を開始 (自由飼育) し、20 週齢 (若年群 (Young) : n=6) と 90 週齢 (高齢群 (Elderly) : n=6) の時点で先ず①各群 3 匹から両側脛骨神経 (計 12 検体) を採取した。さらに、②残りの各群 3 匹において腹大動脈から蛍光剤 (10% glucose, 1% fluorescent material (PUSR80; Mitsubishi Pencil, Tokyo, Japan)) を灌流し、その後両側脛骨神経 (計 12 検体) を採取した。各検体は、採取後直ちに -80°C で凍結保存した。

①の検体は、遠位端から 3 mm 切離し、4% パラホルムアルデヒド溶液に組織を浸漬させた。その後、検体サンプルを Tissue Tek OCT コンパウンドで包埋し、液体窒素で凍結した。凍結後に 5 μm 厚で薄切した。薄切切片は、1% トルイジンブルー溶液で髄鞘染色した。髄鞘染色後の切片は、明視野顕微鏡に取り付けた CMOS カメラ (Moticam 3; Shimadzu, Kyoto, Japan) から 1 検体サンプルにつき 3 枚から 4 枚の画像をパーソナルコンピューター (PC) に取り込んだ。1 画像からランダムに 10 個の有髄線維を選択し、有髄線維径、ミエリン鞘径、軸索径、G-ratio (軸索径/線維径) を若

年群と高齢群で比較した。

②の検体からは、凍結脛骨神経を数 mm 切断後、4%パラホルムアルデヒドで組織固定・乾風し、共焦点レーザー顕微鏡(TCS-SP; Leica Instruments, Germany)を用いて毛細血管の3次元構築像を観察した。毛細血管像は、1切片につき1 μm厚の画像を深さ50 μm(計50切片)までスキャンした3次元像をPCに取り込んだ。構築画像からランダムに10箇所の毛細血管部位を選択し、血管径を算出した。

また、毛細血管の分枝(吻合)数をカウントした。毛細血管径と分枝(吻合)数を2群間で比較した。

(2) 高齢期の運動介入による末梢神経有髄線維の加齢性退行に対する改善効果の検証

10週齢から継続飼育した93週齢Wistar系雄ラットをランダムにコントロール群(Elderly: n=5)と運動群(Ex: n=5)に割り付けた。運動介入群には、有酸素的持久運動を実施し、高齢期でも可能な運動強度(トレッドミル使用:7m/min, 傾斜角0°, 1hour)で2週間(6times/wk)実施した。運動後の血中乳酸値は2.0mmol/L以下であった。

運動介入による2週間経過後、コントロール群と運動群の各5匹から一側脛骨神経と血清を採取し(各々10検体)、凍結保存した。

①生化学的組織解析

採取した検体および血清からELISA法により神経線維の修復・伸張の促進因子である脳由来神経栄養因子(BDNF)と毛細血管の新生促進因子である血管内皮増殖因子(VEGF)の発現量を検量した。

②組織解析

採取した検体を2重組織固定後(4%パラホルムアルデヒドおよび2%四酸化オスミウム溶液への浸漬)に脱水、パラフィン包埋を行い、2 μm厚の切片を作成した。作成した切片は、脱パラフィン後に0.5% Sudan Black B溶液にて髄鞘を染色し、明視野顕微鏡観察を行い、線維径、ミエリン鞘径、軸索径、G-ratioを計測した。

4. 研究成果

(1) 若年期と高齢期の脛骨神経の組織解析

若年群と高齢群の有髄線維径の度数分布において、若年群の度数分布よりも高齢群の度数分布が有意に左に移動しており、細径有髄線維が増加していた($P < 0.01$) (図1)。さらに、脛骨神経薄切片のトルイジンブルー染色像においても高齢群の有髄線維は萎縮が認められ、細径化していた(図2)。

高齢群の有髄線維径、ミエリン鞘径、軸索径、G-ratioは、若年群と比較してG-ratioを除き有意に減少した(図3)。

高齢群と若年群の脛骨神経内毛細血管構築像の解析から、高齢群の毛細血管径と分枝(吻合)数は若年群よりも有意に減少した

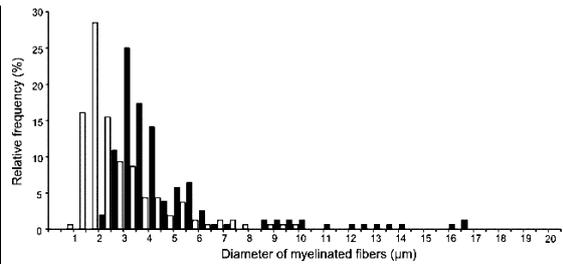


図1. 若年群と高齢群における有髄線維径の度数分布
黒: 若年群, 白: 高齢群

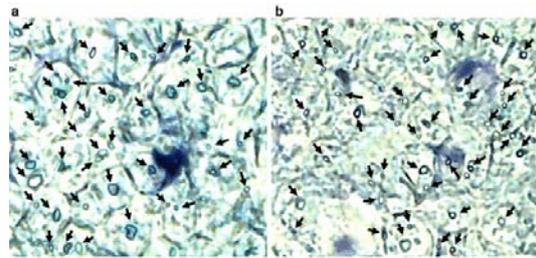


図2. 若年群と高齢群の有髄線維染色像
a: 若年群, b: 高齢群, 黒矢印: 有髄線維
Scale bar=10μm

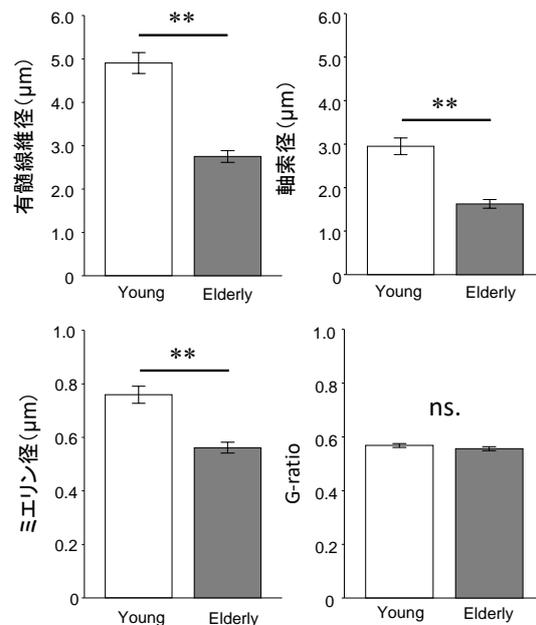


図3. 高齢群と若年群の有髄線維の各項目比較
Young: 若年群, Elderly: 高齢群, **: $P < 0.01$

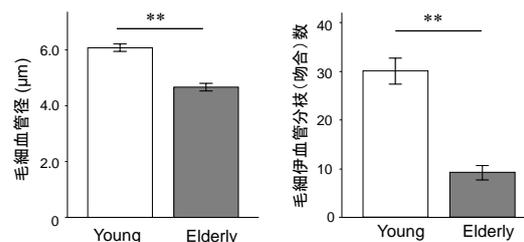


図4. 高齢群と若年群の脛骨神経内毛細血管径と分枝(吻合)数の比較
Young: 若年群, Elderly: 高齢群, **: $P < 0.01$

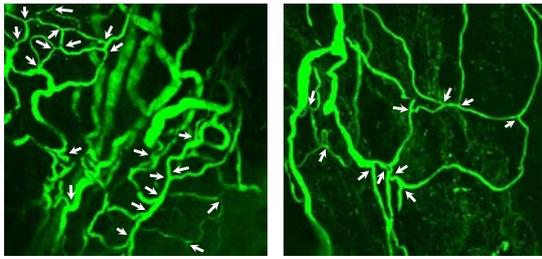


図 5. 高齢群と若年群の毛細血管 3次元構築像
右画像: 若年群, 左画像: 高齢群, 白矢印: 分枝 (吻合) 部 Scale bar=100μm

($P < 0.01$) (図 4)。共焦点レーザー顕微鏡から得られた毛細血管 3次元構築像の観察においても明確に高齢群の毛細血管分枝 (吻合) 数の減少が認められた (図 5)。

以上 (1) の結果から、加齢による脛骨神経内の有髄線維は髄鞘と軸索が同比率で萎縮していくことが明らかとなった。また、有髄線維のみならず毛細血管の退行も生じていることを明らかにした。つまり、一般に高齢期の筋萎縮が報告されるが、同時に末梢神経と毛細血管の退行も生じていることが考えられた。

(2) 末梢神経線維の修復・伸張を促進させる因子である BDNF と血管新生の促進因子である VEGF の発現量を高齢期における 2 週間の低強度運動後に脛骨神経組織と血清で測定 (ELISA 法) した。高齢期運動群の神経組織の BDNF 発現量は、コントロール群と比較して有意な増加 ($P < 0.01$) を、VEGF では有意な減少 ($P < 0.01$) を示した (図 6)。

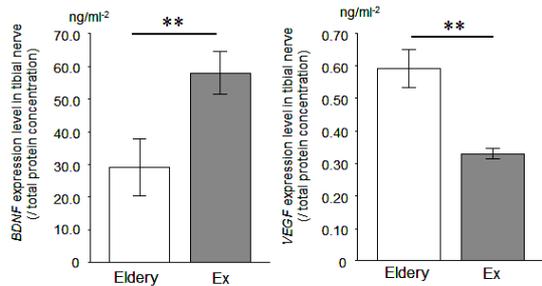


図 6. 高齢期の運動介入群とコントロール群の脛骨神経における BDNF と VEGF の発現量比較
左図: BDNF 発現量, 右図: VEGF 発現量, Elderly: コントロール群, Ex: 運動群, **: $P < 0.01$

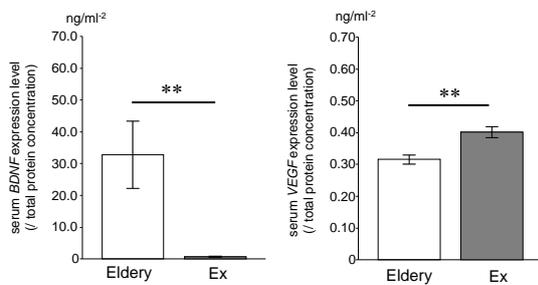


図 7. 高齢期の運動群とコントロール群の血清における BDNF と VEGF の発現量比較
左図: BDNF 発現量, 右図: VEGF 発現量, Elderly: コントロール群, Ex: 運動群, **: $P < 0.01$

さらに、高齢期運動群の血清 BDNF の発現量は、コントロール群と比較して有意に減少 ($P < 0.01$) し、逆に血清 VEGF の発現量では有意に増加した ($P < 0.01$) (図 7)。

脛骨神経の Sudan Black B 染色像においては、運動群の密性がコントロール群よりも明確に高く、また有髄線維の肥大が観察から認められた (図 8)。

運動群の有髄線維径、ミエリン鞘径、軸索径、G-ratio は、コントロール群と比較して G-ratio を除き有意に増加した ($P < 0.01$) (図 9)。

以上 (2) の結果から、高齢期の低強度運動により血清に存在する BDNF は脛骨神経へ輸送され、有髄線維の修復と再生に寄与し、また脛骨神経から発現した VEGF は血液に輸送され、毛細血管の新生に寄与することが考えられた。つまり、末梢神経有髄線維と毛細血管は相互補完的作用により双方の生存・維持を可能にしていることが考えられた。

運動群とコントロール群の G-ratio に違いが認められなかったことから、BDNF が髄鞘と軸索の両者に対して同程度に修復と再生を促進させる因子と考えられる。また、高齢期の低強度運動により末梢神経の修復・再生、毛細血管の新生を促進させることを明らかにした。

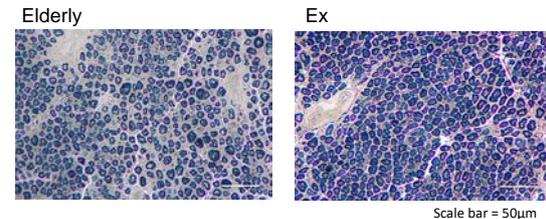


図 8. 運動群とコントロール群における脛骨神経切片染色像
Elderly: コントロール群, Ex: 運動群

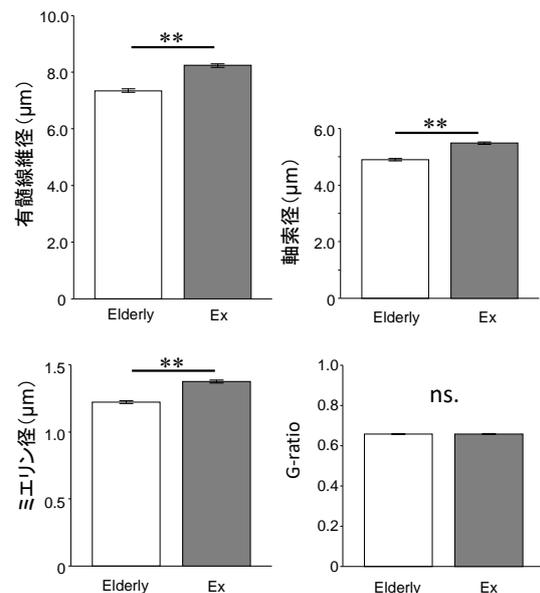


図 9. 高齢群と若年群の有髄線維の各項目比較
Elderly: コントロール群, Ex: 運動群, **: $P < 0.01$

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) 齋藤貴文, 崎田正博, 熊谷秋三. 高齢者における運動器慢性疼痛の身体活動疫学. 査読無, Vol.39, 2016, 19-39.
- (2) Tanaka M, Tanaka K, Tategaki J, Fujino H. Preventive effects of kilohertz frequency electrical stimulation on sepsis-induced muscle atrophy. J Musculoskelet Neuronal Interact. 査読有, Vol.16, 2016, 152-160.
- (3) Masahiro Sakita, Shinichiro Murakami, Hidemi Fujino. Age-related morphological regression of myelinated fibers and capillary architecture of distal peripheral nerves in rats. BMC Neuroscience, 査読有, Vol.17, 2016.
- (4) Tanaka M, Nakanishi R, Murakami S, Fujita N, Kondo H, Ishihara A, Roy RR, Fujino H. Effectiveness of daily eccentric contractions induced via kilohertz frequency transcutaneous electrical stimulation on muscle atrophy. Acta Histochem, 査読有, Vol.118, 2016, 56-62.
DOI: 10.1186/s12868-016-0277-4.
- (5) Uchida K, Tanaka M, Kondo H, Ishihara A, Fujino H. L-arginine supplementation attenuates capillary regression without increasing integrated succinate dehydrogenase activity and VEGF expression in skeletal muscle during hindlimb unloading. Gen Physiol Biophys. 査読有, 2016.
DOI: 10.4149/gpb_2016
DOI: doi.org/10.9759/hppt.4.161.
- (6) Masahiro Sakita, Shinichiro Murakami, Takafumi Saito, Shuzo Kumagai. Falls and Fall Prevention in Elderly People: Summary of Recent Reviews, Japanese Journal of Health Promotion and Physical Therapy, 査読有, Vol.4, 2015, 161-169.
- (7) 熊谷秋三, 崎田正博. 転倒危険因子の予防プログラム, 日本臨牀, 査読無, 72, 2014, 1813-1820.

[学会発表] (計 13 件)

- (1) Takafumi Saito, Masahiro Sakita, Shuzo Kumagai. Combination risk to sleep disturbance of physical activity and sedentary behavior by difference between community-dwelling elderly Japanese people with and without musculoskeletal pain. 16th World

Congress on Pain, Yokohama Japan, 2016 9.

- (2) Murakami S, Sakita M, Ming H, Maruyama H, Kondo H, Fujino H. Observation of Muscle Capillary Construction of Kidney Disease Rat. 18th International Meeting of Physical Therapy Science in Beijing, Beijing, 2016 9.
- (3) Murakami S, Sakita M, Huo M, Kondo H, Kanazashi M, Tanaka M, Fujino H. Capillary Architecture in Skeletal Muscle on Chronic Kidney Disease Rats. Experimental Biology 2016, San Diego, 2016 4.
- (4) Sakita M, Murakami S, Huo M, Saito T, Fujino H. Regression of the Myelinated Fibers and Capillaries in the Tibial Nerve Associated with Aging in Rats. Experimental Biology 2016, San Diego, 2016 4.
- (5) Sakita M, Murakami S, Saito T, Kumagai S, Fujino H. Age-related morphological degeneration of the myelin sheaths and capillaries in the distal tibial nerves with aging of rats. 20th annual congress of the ECSS, Malmö, 2015 6.
- (6) Saito T, Sakita M, Kumagai S. Association of physical activities and sedentary behaviors with sleep disturbance by difference between community-dwelling elderly with and without musculoskeletal pain. 20th annual congress of the ECSS, Malmö, 2015 6.
- (7) Murakami S, Sakita M, Ming H, Maruyama H, Kondo H, Fujino H. Long-term effects of aerobic exercise to skeletal muscle in elderly rat extensor digitorum longus. The 10th Beijing International Forum on Rehabilitation, Beijing, 2015 9.
- (8) Murakami S, Kondo H, Ming H, Sakita M, Kanazashi M, Tanaka M, Tanaka M, Goto C, Teramoto H, Fujino H. Differences in the rat extensor digitorum longus about mitochondrial activity by aerobic or anaerobic exercise. 15th International Meeting of Phys Ther Sci in Beijing, Beijing, 2015 5.
- (9) 崎田正博, 村上慎一郎, 齋藤貴文, 熊谷秋三, 藤野英巳. 加齢による脛骨神経遠位部有髄線維および毛細血管構築の退行 - ラットによる縦断的・組織学的解析 -. 第16回日本健康支援学会, 福岡県福岡市, 2015 3.
- (10) 齋藤貴文, 崎田正博, 本田貴紀, 熊谷秋三. 歩行活動と座位行動の腰痛に対する組み合わせリスクについて - 地域在住自立高齢者を対象として -. 第7回日本運動器疼痛学会, 山口県宇部市, 2014 10.

- (11) Murakami S, Sakita M, Mizuno T, Kanazashi M, Tanaka M, Tanaka M, Fujino H. Relation of aerobic exercise training about blood sugar level and muscle capillaries in type 2 diabetes mellitus rat. The 9th Beijing International Forum on Rehabilitation, Beijing, 2014 9.
- (12) Effects of aerobic exercise on capillary architecture of extensor digitorum longus in rat. Murakami S, Sakita M, Kondo H, Kanazashi M, Tanaka M, Tanaka M, Ohtuka A, Momota R, Fujino H. San Diego, 2014 4.
- (13) Sakita M, Murakami S, Fujino H. Difference between spontaneous aging and aerobic exercise during aging on the capillary architecture in the tibial nerve in rats. Experimental Biology 2014, San Diego, 2014 4.

[その他]

ホームページ等

http://www.tachibana-u.ac.jp/faculty/health_science/

テレビ朝日放送：番組名「中居正広のミになる図書館」にて 40 代以降の転倒の解説で出演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崎田 正博 (SAKITA MASAHIRO)
京都橘大学・健康科学部・准教授
研究者番号：10582190

(2) 研究分担者

村上 慎一郎 (MURAKAMI SHINICHIRO)
姫路獨協大学・医療保険顎部・教授
研究者番号：30454763
藤野 英己 (FUJINO HIDE MI)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：20278998