

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01751

研究課題名(和文) 運動療法による血管幹細胞活性化の基礎的検討

研究課題名(英文) A basic study of activation of vascular endothelial progenitor cells by physical training

研究代表者

南條 博(Nanjo, Hiroshi)

秋田大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70250892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血障害に対する運動療法の効果をマウス脳虚血モデルで検討した。コントロールと比較し、虚血障害脳にHIF-1 α の発現亢進、運動療法によるeNOS活性の上昇を認めた。網羅的遺伝子発現解析で、運動療法群で381遺伝子の発現亢進、265遺伝子の発現低下を、脳虚血障害+運動療法群で416遺伝子の発現亢進、266遺伝子の発現低下を認めた。両群はRT-qPCRでNR4A3、APOA5、WNT8B遺伝子のmRNA発現量の増加を認めた。NR4A3免疫組織化学染色でも発現の亢進を認めた。脳虚血障害に対する運動療法は、血管内皮幹細胞の活性化、血流量の回復(毛細血管新生)に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では高コレステロール血症や高血圧がなくとも、動脈硬化症が進行している患者が多く存在するが、その本態は不明である。また、動脈硬化症を防ぐ方法として運動療法(トレーニング)が推奨されているが、そのメカニズムに対する明確な答えはいまだない。今回、我々が遂行した基礎的研究は、脳虚血障害に対する運動療法が血管内皮幹細胞の活性化、血流量の回復(毛細血管新生)に関与している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：A basic study of physical training for cerebral ischemic injury was performed in a brain ischemia mice model with treadmill exercise therapy. Compared with the control, the expression of HIF-1 α was increased in the ischemic brain, and eNOS activity was increased by exercise therapy. Comprehensive gene expression analysis showed that 381 genes were upregulated, compared with the control. 416 genes were upregulated in the cerebral ischemia + exercise therapy group, compared with the control. In both groups, the mRNA expression levels of NR4A3, APOA5, and WNT8B genes were increased by RT-qPCR, compared with the control. NR4A3 overexpression was observed by immunohistochemical staining. Exercise therapy for cerebral ischemic injury may be associated with vascular endothelial progenitor cell activation and restoration of blood flow.

研究分野：実験病理学

キーワード：脳血管 内皮幹細胞 内皮細胞 運動療法 活性化

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞、脳出血、心筋梗塞など、循環器系致命的疾患の主因とされる動脈硬化症や動脈瘤の本態についてはいまだ不明である。欧米諸国を中心に研究されてきた脂質代謝異常、特に高コレステロール血症が粥状動脈硬化の主因とされ、様々な抗コレステロール薬投与による治療が臨床の場で広く行われ、最近ではメタボリックシンドロームという概念が浸透してきている。しかし、少なくとも日本では高コレステロール血症や高血圧がなくても、動脈硬化症が進行している患者が多く存在する。また、最近では抗コレステロール薬投与により逆に脳梗塞の発症率を高める場合があることが判明し、高コレステロール血症の基準値が修正されるなど、高コレステロール血症の概念、病態、治療そのものの信頼性が揺らいでいる。早急に動脈硬化症や動脈瘤の本態を明らかにする必要がある。さらに、動脈硬化症を防ぐ方法として運動療法（トレーニング）が推奨されているが、そのメカニズムに対する明確な答えはいまだない。

成体には幹細胞が存在し、血管内皮前駆細胞が血液中に存在することが判明し（Asahara T, et al. *Science* 275: 964-967, 1997）、胚における血球発生において内皮細胞からBリンパ球が生じることが証明され（Nishikawa S, et al. *Immunol. rev.* 175: 112-119, 2000）、内皮幹細胞のより多元的あるいは祖先的な能力が注目されている。我々は血管内皮細胞の血流感知機能、血流に対するリモデリング機能を明らかにし（Nanjo H, Sho E, et al. *Exp Mol Pathol.* 80:38-45, 2006. Sho E, Nanjo H, et al. *J Vasc Surg.* 41: 844-852, 2005. Sho E, Nanjo H, et al. *J Vasc Surg.* 39: 601-612, 2004. Sho E, Nanjo H, et al. *Exp Mol Pathol.* 75: 1-11, 2003, Ebina T, Nanjo H, et al: *Pathol Int* 52: 702-712, 2002）、大動脈瘤モデルにおいてCD34陽性血管幹細胞の局在と分化が血流制御に密接に関連することを証明してきた（Sho E, Nanjo H, et al. *J Vasc Surg* 41(5): 844-852, 2005. Sho E, Nanjo H, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20: 1916-1921, 2004）。そこで今回我々は、脳梗塞を念頭においた虚血脳障害組織の回復を目的とし、運動療法により脳内の血管に存在する内皮幹細胞を活性化させ、内皮細胞、周皮細胞、樹状細胞への分化、増殖を促進し、脳虚血障害改善効果を明らかにする基礎的研究を遂行したいという着想に至った。

2. 研究の目的

脳虚血障害後の回復を目的とし、運動療法により脳内の血管に存在する血管幹細胞を活性化させ、脳血流回復効果を成体で明らかにする。具体的にはマウスの内頸動脈閉塞による脳虚血障害モデルを用いる。障害後に運動療法を行い、脳内の血管に存在する血管幹細胞を活性化させ、内皮細胞、周皮細胞、樹

状細胞への分化、増殖を促進し、虚血障害脳組織の修復の主役となることを、形態学および分子病理学的解析により解明する。

3. 研究の方法

1) 脳虚血モデルの作製：10週齢のマウスを用い、三種混合麻酔下、手術用顕微鏡下に片側総頸動脈を露出し結紮閉塞させ、脳虚血障害モデルを作製した。

2) トレッドミル運動負荷モデルの作製：脳虚血障害モデル作製翌日からトレッドミル運動負荷を開始した。運動は比較的軽めとし、5 m/分の速度で10分間の予備運動後10分間休憩させ、20m/分の速度で1日30分間運動をさせる。負荷は2週間とし、脳虚血障害+運動療法群とした。また、トレッドミル運動を2週間負荷した運動療法群、脳虚血手術および運動療法を施さないコントロール群を設定した。

3) 組織標本作製：マウスは三種混合麻酔薬の過量投与で屠殺し、4%パラホルムアルデヒド液で大動脈灌流固定後、脳を摘出し、凍結およびパラフィン組織ブロックを作製した。パラフィン組織ブロックでHE染色、EM染色、LFB染色標本作製した。

4) 免疫組織学的検討: CD34、HIF-1a、NR4A3に対する抗体を用い、発現パターンを検討した。

5) 内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)活性の測定

6) 網羅的遺伝子発現解析(cDNAマイクロアレイ解析)

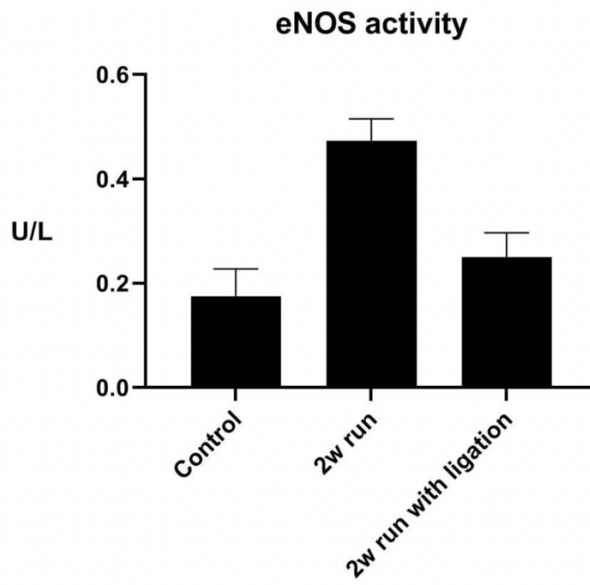
7) リアルタイム PCR(RT-qPCR)

4. 研究成果

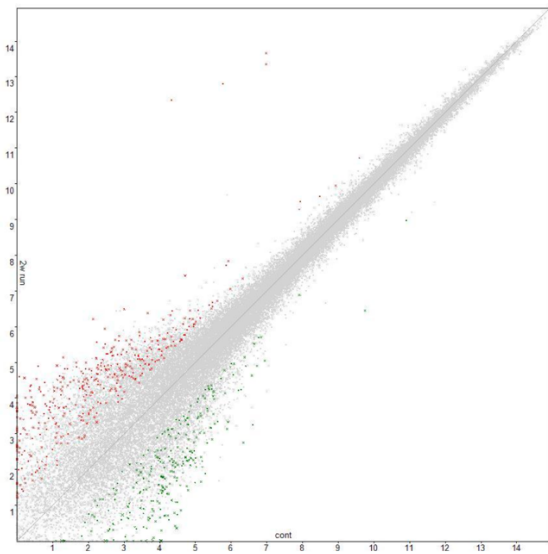
得られた主な知見は以下の通りである。

コントロールと比較し、虚血障害脳にHIF-1aの発現亢進、運動療法による内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)活性の上昇を認めた。網羅的遺伝子発現解析(cDNAマイクロアレイ解析)で、コントロールと比較し、運動療法群で381遺伝子の発現亢進、265遺伝子の発現低下を、脳虚血障害+運動療法群で416遺伝子の発現亢進、266遺伝子の発現低下を認めた。さらに、運動療法群および脳虚血障害+運動療法群で発現亢進が見られたNR4A3遺伝子、APOA5遺伝子、WNT8B遺伝子は、RT-qPCRでmRNA発現量が増加していた。NR4A3の免疫組織化学染色でも発現の亢進を認めた。以上、脳虚血障害に対する運動療法は、血管内皮幹細胞の活性化、血流量の回復(毛細血管新生)に関与している可能性がある。

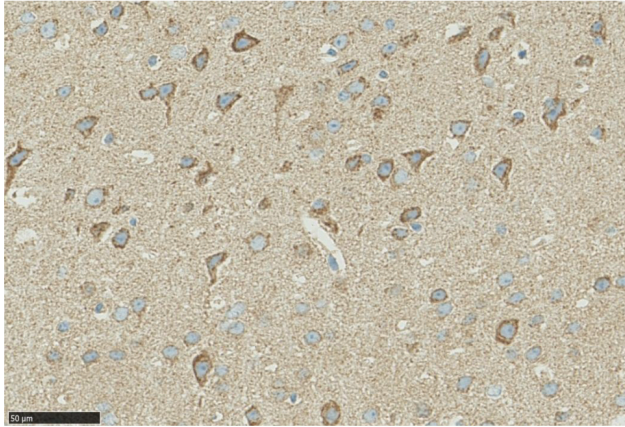
内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)活性



網羅的遺伝子発現解析(cDNA マイクロアレイ解析)



運動負荷群の NR4A3 免疫染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Yukinobu, Yoshida Makoto, Maeda Daichi, Takahashi Masato, Nanjo Hiroshi, Masuda Hirotake, Goto Akiteru	4. 巻 8
2. 論文標題 Neovasculature can be induced by patching an arterial graft into a vein: A novel in vivo model of spontaneous arteriovenous fistula formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/S41598-018-21535-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤行信, 南條博, 吉田誠, 工藤-浅部幸継, 馬越通信, 鈴木貴, 後藤明 輝
2. 発表標題 運動による血管内皮機能の活性化とNR4A3遺伝子発現の亢進
3. 学会等名 第27回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----