

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01879

研究課題名(和文) 加齢と身体不活動に伴う末梢神経退行の縦断的検証と高齢期熱ストレス治療法の開発

研究課題名(英文) Longitudinal study of peripheral nerve regression with both aging and physical inactivity, and development of treatment for heat stress in old age

研究代表者

崎田 正博 (Sakita, Masahiro)

京都橘大学・健康科学部・教授

研究者番号：10582190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Wistar系ラットを用いて、脛骨神経と毛細血管の加齢性退行を検証し、さらに高齢期の熱ストレスにおける脛骨神経と毛細血管の修復・新生効果を検証した。高齢期の有髄線維の線維径、軸索径および髄鞘厚は中齢・若齢群と比較して有意に低下した。毛細血管において、毛細血管径は3群の加齢進行に伴い有意に低下した。一方、中齢・高齢期の毛細血管分枝数は2群間に違いはなかったが、これら2群は若齢群と比較して有意に低下した。脛骨神経有髄線維は、中齢期以降に退行が進行する一方、毛細血管は中齢期以前から退行し始めることを示した。高齢期の熱ストレスに対する有髄線維と毛細血管の修復作用の生化学的解析は現在進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は加齢による末梢神経退行に着目した。Wistar系ラットを用いて、若齢期・中齢期・高齢期の縦断的な組織学的形態の変化を観察・比較した。また、高齢期の熱ストレス介入を実施し、末梢神経の修復・保存の促進作用を生化学的に検証した。末梢神経の縦断的組織解析の結果では、末梢神経有髄線維は中齢期以降に退行する一方、毛細血管は中齢期以前から退行することを明らかにした。つまり、中齢期以前から毛細血管の退行を予防することが有髄線維の退行を遅延させると示唆される。熱ストレス介入実験は、退行促進タンパク質と修復促進タンパク質の解析を進行中である。

研究成果の概要(英文)：Using Wistar rats, the age-related morphological regression of the tibial nerves and capillaries was investigated, and the effects of recovery and preservation of tibial nerves and capillaries in heat stress during old age were also investigated. The fiber diameter, axon diameter, and myelin thickness of myelinated fibers (MFs) in the elderly group significantly decreased compared with those in the middle-aged and young groups. Regarding the capillaries, capillary diameter was significantly reduced with aging of three groups. In contrast, the number of capillary branches in the middle-aged and old-aged groups did not differ between the two groups, but the branch number of those two groups were significantly lower than that in the young group. The MFs of tibial nerve showed that the regression progressed after the middle age, while the capillaries degenerate before the middle age. Biochemical analyzes of both MF and capillary recovery on heat stress in old age are currently in progress.

研究分野：応用健康科学

キーワード：末梢神経 毛細血管 退行 有髄線維 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の形態学および機能的退行は老化に関連する(Tamaki et al. 2014, Pannerec et al. 2016, Sakita et al. 2016)。加齢に伴う神経機能障害は、ニューロンとその周辺組織の構造的、生化学的、分子生物学的変化によって引き起こされる(Takagishi et al. 2016, Shen et al. 2011, Shokouhi et al. Krause Neto et al. 2017)。高齢者のバランス能力の低下と転倒は、骨格筋量と萎縮(サルコペニア)に関連している(Cruz-Jentoft et al. 2010, Landi et al. 2012)。先行研究では、加齢に伴うサルコペニアが有髄線維(MF)の退行を伴うことを明らかにしている(Verdu et al. 2000)。

末梢神経の形態学および組織学的エビデンスでは、近位(坐骨神経)(Ceballos et al. 1999)および遠位(脛骨または腓腹神経)(Sakita et al. 2016, Jeronimo et al. 2005) MFにおいて加齢に伴う進行性変性および機能不全退行が示されている。この知見は、げっ歯類およびヒトの脊髄および後根神経節における MF の数、サイズ、および密度が加齢とともに減少することを示している(Bergman and Ulfhake. 1998, Fogarty et al., 2018)。さらに、近年の動物実験成果により、加齢中、末梢神経の退行がサルコペニアの発症に先行することが明らかされている(Liu et al. 2013)。これらの知見から、バランスの不安定性と高齢者の転倒は、サルコペニアのみならず、末梢神経系の加齢に伴う MF 退行によっても影響されることを示唆している。

MF と同様に、末梢神経毛細血管も加齢とともに退行する(Sakita et al., 2016)。この毛細血管の退行は、毛細血管直径および微小血管分岐数の両方の減少といった形態学的変化を特徴とする(Sakita et al. 2016, Sakita et al. 2014)。エネルギー代謝のためにグルコースと酸素を MF に供給する毛細血管の形態学および構造的変化は、神経変性を引き起こす可能性がある(Verdu et al. 2000, Girach and Vignati. 2006)。さらに、脳の微小血管系の減少または異常は、加齢に伴う神経の退行に先行することが報告されている(Brown et al. 2009)。したがって、毛細血管の構造と機能を維持することで、加齢に伴う MF 退行を抑制できる可能性が示唆される。ラットの先行研究において、必要な神経の酸化的解糖のために微小血管から提供されるグルコースと酸素のレベルの加齢に伴う減少は、末梢神経内の血流減少によって引き起こされることが明らかにされている(Low et al. 1986)。したがって、末梢神経では、毛細血管の減少が加齢に伴う MF 退行に先行する可能性が推察される。

MF の加齢に伴う退行と末梢神経の毛細血管の減少を同時に調査した研究はほとんど報告されていない。先行研究では、老齢ラットの脛骨神経における MF の線維径、ミエリン厚、軸索径(Sakita et al. 2016)および毛細血管径と微小血管分岐数(Sakita et al. 2016, Sakita et al. 2014) は、若齢ラットに比べて有意な減少を認めた。ただし、これらの研究では若齢と老齢のラットのみが比較されたため、末梢神経内毛細血管の加齢に伴う減少が MF の減少に先行するかどうかは不明なままである。毛細血管が MF よりもより早期に退行すると、形態学的兆候が中間の時点で現れる可能性がある。そこで、研究代表者はラットの継続飼育から若齢、中齢、および老齢ラットの末梢神経における MF および毛細血管の加齢に関連した形態学および組織学的変化を検証する着想に至った。この研究により、毛細血管が減少するか、MF が早期に後退するかを特定できる。

さらに、低強度運動により、末梢神経と毛細血管間の相互作用の改善が明らかにされている(Sakita et al. 2016)。しかし、高齢者の中には運動の奨励が困難な場合も多い。そこで、加齢による末梢神経と毛細血管退行に対して、極超短波照射による熱ストレス刺激を与え、細胞保護因子の発現・誘導促進による退行予防の有用性を検証し、運動介入以外の新たな予防方法を開発する。

2. 研究の目的

研究 1: 加齢と身体不活動に伴う脛骨神経・毛細血管の生存・分化因子と退行因子の両面の均衡バランス動態を縦断的に検証し、退行現象の全体像を明らかにする。

研究 2: 高齢期脛骨神経に極超短波を照射し、熱耐性タンパク質(熱ショックタンパク質: HSPs)の役割を利用して脛骨神経と毛細血管双方の細胞保護(酸化・低酸素ストレスの耐性)と相互作用を促進させ、脛骨神経と毛細血管の構造維持・改善の効果を検証することである。

3. 研究の方法

(1)脛骨神経および毛細血管の加齢による組織学的退行の検証

Wistar 系雄ラット 21 匹を 10 週齢から継続飼育し、20 週齢(若齢群)、70 週齢(中齢群)および 97 週齢(高齢群)の時点で 7 匹をランダムに選択した。各群の右側脛骨神経(各群 7 検体;計 21 検体)を採取した。その後、各群の腹大動脈から 37 の蛍光剤(10% glucose, 8% gelatin, 1% fluorescent material (PUSR80; Mitsubishi Pencil, Tokyo, Japan))を灌流し、左側脛骨神経(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。

凍結保存の検体は、脛骨神経遠位端から 3mm 切離し、4%パラホルムアルデヒド溶液に 3 時間組織を浸漬させた。その後、検体サンプルを 2%四酸化オスミウム溶液に 2 時間浸漬し、その後エタノールを用いて脱水処理し、60 で一晚パラフィン包埋した。パラフィン包埋後、検体サンプルを 1.5- μm 厚で横断薄切した。薄切切片は、0.5% Sudan Black B 溶液(70%エタノール)に浸漬し、その後エタノール濃度を徐々に下げながら切片を浸漬させ、MF の髄鞘を明瞭に分別させた。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(EOS kiss X7i; Canon, Tokyo, Japan)から 1 検体サンプルにつき数枚の連続切片を撮影し($\times 200$ 画像)、1 検体から約 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約 50 個の MF を選択し、MF

径、ミエリン鞘厚、軸索径、G-ratio (軸索径/線維径)を計測および算出した。

蛍光剤還流後の検体では、凍結脛骨神経を数 mm 切離後、4 % パラホルムアルデヒドで組織固定・風乾し、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、積層化による3次元像を1検体につき約4画像をPCに取り込んだ。3次元構築画像からランダムに30から60箇所の毛細血管部位を選択し、毛細血管内腔径を算出した。さらに、血管分枝数をカウントした。研究代表者は、これらの定量解析手法を確立しており、ImageJ software (version 1.48; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて解析した。

(2) 末梢神経・毛細血管への高温暴露の効果検証

高齢 Wistar 系雄ラット(105 週齢)をランダムに高温暴露群・低強度運動群・身体不活動群(コントロール群)に割り付け、4 週間介入後の生存・修復因子および退行因子を生化学的に解析し、高温暴露による予防・改善効果を比較検証した。

低強度運動群は、週3回の頻度で分速7m/sのトレッドミル走行を30分間実施した。高温暴露群は、42°Cの恒温庫内の暴露を週3回・60分間を4週間実施した。4週間の介入後、右側脛骨神経を採取し、組織溶解バッファに浸漬した。浸漬した検体をホモジナイズ後、4°Cで20分間、15,000 $\times g$ で遠心分離し、上清を採取した。採取した上清は、BCA法により総タンパク質量をアッセイされ、各サンプルの総タンパク質濃度を統一させた。その後、2倍濃度のサンプルバッファとサンプル溶液を1:1で混合し、希釈したサンプル溶液を作成した。希釈後のサンプル溶液は、アルミブロック恒温槽にて95°C・5分間煮沸し、タンパク質を変性させ、-20°Cで保存した。

その後の電気泳動、膜転写(プロットイング)、標的タンパク質の抗原抗体反応、標的タンパク質の発光・撮影の工程は、現在進行中である。

4. 研究成果

(1) 若齢群(20週齢)、中齢群(70週齢)および高齢群(97週齢)の脛骨神経の有髄線維解析

若齢群、中齢群および高齢群それぞれのMF径における相対頻度の度数分布では、中央値および歪度が9.44と0.03、8.85と0.04、および7.58と0.33であり、中齢群から急激にMF径が低下を示した(図1)。若齢群、中齢群および高齢群間のミエリン鞘厚および軸索径の比較では、高齢群が若齢群($P<0.01$)と中齢群($P<0.01$)よりも有意に低下した。若齢群、中齢群および高齢群間のG-ratioの比較では、3群間に違いは認められなかった(図2)。

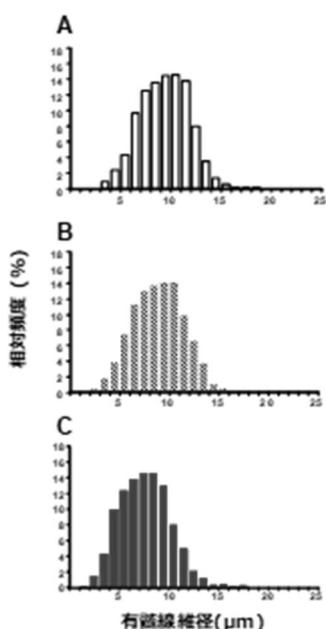


図1. 若齢群、中齢群および高齢群における有髄線維径の度数分布
A: 若齢群, B: 中齢群, C: 高齢群

脛骨神経の Sudan Black B 染色像において、若齢ラットと中齢ラットのMFは変性のない均質な形態を保持していた。一方、高齢ラットのMFは密性が明らかに低下し、変性による不均質な形態のMFが多く観察され、また軸索変性も観察された(図3)。

以上の結果から、自然加齢による脛骨神経の組織学的解析では中齢期まではMFのミエリン鞘と軸索の形態は温存されるが、それ以降は急激に両者の退行が進行すると考えられた。

コントロール群、中齢群および高齢群間にG-ratioの有意差が認められなかった点において、加齢により軸索と髄鞘の両者が同程度に萎縮することを示している。先行研究では、有髄線維の加齢性退行は軸索の変性が先行し、その後髄鞘の変性が生じるとされていること、また加齢に伴

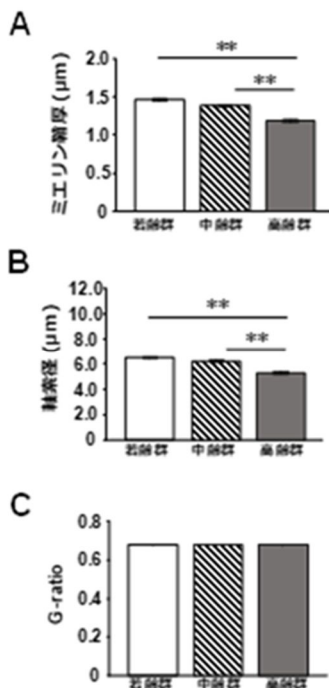


図2. 若齢群、中齢群および高齢群におけるミエリン鞘厚、軸索径およびG-ratioの比較結果
A: ミエリン鞘厚, B: 軸索径, C: G-ratio, **: P<0.01

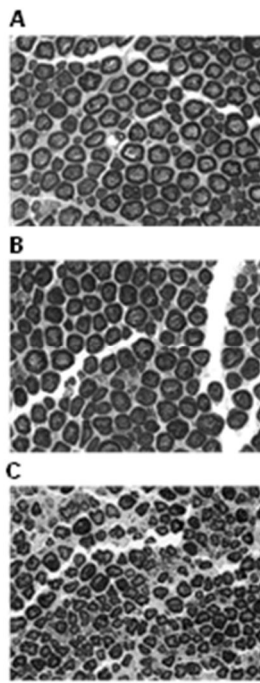


図3. 若齢群、中齢群および高齢群における脛骨神経有髄線維の染色像
A: 若齢ラット, B: 中齢ラット, C: 高齢ラット, Black scale bar = 40 μm

う軸索輸送の遅延が報告されている。軸索輸送に要するエネルギー供給(フルコースの取り込みとアデノシン三リン酸の生合成)の低下が中齢期以降、急速に進行することが示唆される。

毛細血管の蛍光 3 次元構築像の観察において、中齢および高齢ラットの毛細血管が明確に減少し、また血管分枝においても明確な減少が認められた(図 4)。

さらに、毛細血管内腔径および血管分枝数の 3 群間比較では、中齢期で既に毛細血管の狭小化と分枝数の減少が有意に生じた(図 5)。この結果から、毛細血管は若齢期から中齢期の間で既に退行を始めていることが推察される。慢性的な身体不活動の場合、特に脳内においては神経退行に先行して血管退行の生じることが報告されており、末梢神経においても類似した退行様相を示すことが示唆される。

以上から、脛骨神経の身体不活動に伴う自然加齢において、有髄線維に先行して毛細血管が中齢期以前に退行が始まり、その後有髄線維の退行が遅延して生じることが明らかとなった。

現在、新型コロナウイルスの感染収束対策に伴い、その後の実験が計画通りに進行し難い状況となっている。そのため、脛骨神経・毛細血管の高温暴露実験では、最終段階の生化学的解析の

みを残しているが、現在進行中である。この生化学的実験により、有髄線維と毛細血管両者の相互補完作用が標的タンパク質の活性化や発現量解析により明らかにできると考えている。また、有髄線維と毛細血管両者の退行には、両者の相互補完作用の破綻が関与し、酸化ストレスに伴うミトコンドリアや小胞体応答の悪化が退行を誘導する方向に進めると想定している。

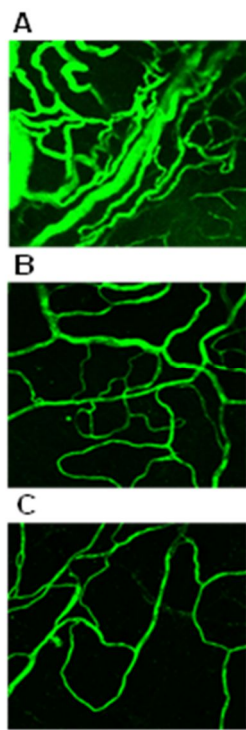


図 4. 若齢群、中齢群および高齢群における脛骨神経内毛細血管の3次元構築像
A: 若齢ラット, B: 中齢ラット, C: 高齢ラット, Black scale bar = 100 μ m

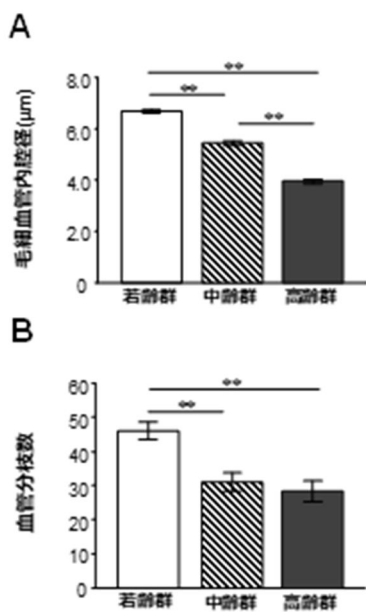


図 5. 若齢群、中齢群および高齢群における脛骨神経内毛細血管の内腔径と血管分枝数の比較
A: 毛細血管内腔径, B: 血管分枝数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Chen T, Honda T, Chen S, Narazaki K, Kumagai S	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Dose-Response Association Between Accelerometer-Assessed Physical Activity and Incidence of Functional Disability in Older Japanese Adults: A 6-Year Prospective Study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 glaa046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/gerona/glaa046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen S, Chen T, Kishimoto H, Yatsugi H, Kumagai S	4. 巻 19
2. 論文標題 Associations of Objectively Measured Patterns of Sedentary Behavior and Physical Activity with Frailty Status Screened by The Frail Scale in Japanese Community-Dwelling Older Adults.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Sports Science & Medicine	6. 最初と最後の頁 166-174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masahiro Sakita, Shinichiro Murakami, Koji Nonaka, Ryuji Sakamoto, Takafumi Saito, Wataru Isobe, Shuzo Kumagai	4. 巻 [Epub ahead of print]
2. 論文標題 Different patterns in age-related morphometric regression of myelinated fibers and capillaries of the tibial nerve: a longitudinal study in normal rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 no page
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1111/joa.13168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masahiro Sakita, Shinichiro Murakami, Hidemi Fujino, Satoshi Hayashi, Kazuyoshi Kameyama, Takafumi Saito, Shuzo Kumagai	4. 巻 125
2. 論文標題 Remodeling of myelinated fibers and internal capillaries in distal peripheral nerves following aerobic exercise in aged rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 1051-1061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/jappphysiol.00257.2018.	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 -

1. 著者名 Koji Nonaka, Yutaka Ozaki, Kenichi Ito, Masahiro Sakita, Satsuki Une, Junichi Akiyama	4. 巻 69
2. 論文標題 Endurance exercise increases the protein levels of PGC-1 and respiratory chain complexes in mouse skeletal muscle during atorvastatin administration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 327-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-0649-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Darren M. Lipnicki, John D. Crawford, Rajib Dutta, omitted in transit, Shuzo Kumagai, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Age-related cognitive decline and associations with sex, education and apolipoprotein E genotype across ethnocultural groups and geographic regions: a collaborative cohort study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS Medicine	6. 最初と最後の頁 e1002261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002261	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 該当する

1. 著者名 Belaya Irina, Suwa Masataka, Chen Tao, Giniatullin Rashid, Kanninen Katja M., Atalay Mustafa, Kumagai Shuzo	4. 巻 2018
2. 論文標題 Long-Term Exercise Protects against Cellular Stresses in Aged Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1155/2018/2894247	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村上慎一郎, 霍明, 崎田正博, 藤野英己
2. 発表標題 慢性腎不全ラットの有酸素運動によるアルブミンクレアチン比の変化と筋観察
3. 学会等名 第103回理学療法科学学会
4. 発表年 2019年~2020年

1. 発表者名 崎田正博, 村上慎一郎, 霍明, 坂本竜司, 磯部航, 齊藤貴文, 熊谷秋三
2. 発表標題 加齢に伴う末梢神経内毛細血管構築の縦断的観察 - ラット脛骨神経の毛細血管3次元構築像による検討 -
3. 学会等名 第103回理学療法科学学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 崎田正博, 村上慎一郎, 村田 伸, 野中紘士, 栗山みちる, 小山梨穂, 齊藤彩夏, 中田明里, 齊藤貴文, 磯部 航, 熊谷秋三.
2. 発表標題 ラット高齢期低強度運動による末梢神経の修復・再生に対する促進効果～血清と末梢神経 組織の脳由来神経栄養因子 (BDNF)・BDNF受容体 (NTRK2) 発現量解析に着目して～
3. 学会等名 第19回日本健康支援学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 崎田正博
2. 発表標題 大会テーマ：運動による超高齢化社会における健康課題のソリューション、第2セッション；高齢者の運動による健康支援：高齢者のトレーニング可能性 講演演題： - 骨格筋と末梢神経 -
3. 学会等名 第9回九州大学リサーチコア主催公開講演会（招待講演）
4. 発表年 2018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
研究 分担 者	村上 慎一郎 (Murakami Shinichiro) (30454763)	姫路獨協大学・医療保健学部・教授 (34521)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤野 英己 (Fujino Hidemi) (20278998)	神戸大学・保健学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	熊谷 秋三 (Kumagai Shuzo) (80145193)	九州大学・キャンパスライフ・健康支援センター・教授 (17102)	