

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18700565  
 研究課題名(和文) 身体活動時の血行力学的応力が血管内皮細胞に及ぼす酸化ストレスと抗酸化物質の作用  
 研究課題名(英文) The action of oxidative stress and antioxidant on vascular endothelial cell in the hemodynamic stress induced by physical activity  
 研究代表者  
 木下幸文 (KINOSHITA SACHIFUMI)  
 兵庫大学・健康科学部・講師  
 研究者番号：50341029

## 研究成果の概要：

身体活動に伴う血管組織に対する直接的あるいは間接的な刺激は、血管機能の改善につながることを示唆されている。本研究では、身体活動によって生じた酸化ストレスが、抗動脈硬化機能を有する因子の産出を促している可能性について明らかにした。また、継続的な身体活動は、血管内皮細胞に対して血管収縮を防御する予測予防的な反応を誘発させている可能性を明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：運動生理学、健康科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 応用健康科学

キーワード：身体活動、酸化ストレス、活性酸素種、抗酸化物質、血管内皮細胞、血管トーン調節因子

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎える我が国において、心疾患や脳血管疾患などのいわゆる循環器系疾患への予防対策に対する身体活動や運動の役割について強い期待が寄せられている。身体活動や運動が、体力の増進や生活習慣病の予防に有用であることは周知の事実であ

るものの、生活習慣病予防につながる運動の独自の作用機序の解明が求められている。循環器系に及ぼす効果としては、身体活動に伴う血流の増加などによる刺激が血管内皮機能に加わり、その結果として動脈の伸展性が増大する可能性が示唆されている。身体活動が血管組織の機能を改善する機序を明ら

かにするため、身体活動時の血行力学的応力が血管内皮細胞に及ぼす酸化ストレスと抗酸化性物質の作用について検討する必要がある。

## 2. 研究の目的

近年の研究報告では、運動時に生じる血行力学的応力 (Shear stress) によって血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の機能調節に関与している一酸化窒素 (NO) などの血管拡張性物質が放出され、動脈硬化症の発症に対して抑制的に作用していることも知られている。一方で、最近の分子生物学的な知見から、活性酸素種の産出は血管障害に防衛的に作用する NO の産出低下や炎症性分子などの発現を誘導することも明らかにされている。その要因として、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞などの機能調節に関与している一酸化窒素合成酵素 (NOS) や血管内皮増殖因子など、抗動脈硬化因子で血管増殖作用を有する多くの重要な遺伝子発現が、活性酸素種によって調節を受けていることにある。血管における活性酸素種の産出については、細胞外からの作用だけではなく細胞の形質を変化させるような細胞内での作用についても考えなければならない。運動によるフリーラジカルの発生は、運動の種類、強度、時間に大きく依存すると考えられているが、運動時には、生体内への酸素流入量が増加することから、活性酸素種の産出が高まることは、多くの酸化ストレスのパラメータの結果から強く示唆されている。活性酸素のとらえ方として、生体の抗生物質を酸化傷害して変性させる攻撃性の高い分子種として考える場合と、細胞の機能を抑制する分子種として認識する必要がある。本研究は、身体活動時に血管組織において発生する酸化ストレスが血管内皮細胞に対する細胞応答と抗酸化性物質の

関連について包括的に検討することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 被験者は、喫煙習慣のない健康な成人男性 9 名 (年齢 20~22 歳 : 平均  $21.2 \pm 0.8$  歳) であった。全ての対象者に対しては、予め本研究の趣旨と内容を十分に説明し、研究参加の同意を得た後に研究に参加した。全ての被験者に 8 週間の筋力レジスタンストレーニングを実施した。トレーニング開始時に最大筋力 (RM) を測定し、80%1RM に相当する負荷で 1 セットの回数を 8 回として計 3 セット施行した。トレーニングは 1 週間に 3 回の頻度で行い、トレーニング期間中に 3 セット目の挙上回数が 10 回を越えた場合にはトレーニング強度を再設定した。

(2) 実験には、6 週齢の雄性アポ E 欠損自然発症高脂血症マウスを用いた。1 週間の予備飼育後、安静群 (Control 群) と運動負荷群 (Ex 群) に別けて 2 週間飼育した後、さらにそれぞれの群で apocynin 経口投与 (300mg/kg BW/day) する群 (Control+AP 群、EX+AP 群) を設け、2 週間飼育した。運動群には、実験動物用トレッドミルを用い、18m/分の速度で、一日 30 分間のトレッドミル運動を週 5 日、4 週間負荷した。食餌は脂質 10% とコレステロール 0.5% を添加した飼料を与えた。4 週間の実験期間終了後、麻酔下で採血した後、大動脈起始部から腸骨動脈までの組織を摘出して、組織中スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性、脂質過酸化物質質量、過酸化水素量、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 活性の測定を行った。

(3) 実験には、6 週齢の雄性アポ E 欠損自然発症高脂血症マウスを用いた。1 週間の予備飼育後、安静群と運動負荷群に別けて 2 週間飼育した後、それぞれの群で apocynin 経口投与する群を設け、2 週間飼育した。運動群

には、実験動物用トレッドミルを用い、25m/分の速度で、一日 30 分間のトレッドミル運動を週 5 日、4 週間負荷した。実験期間中は、非観血式血圧計を用いて収縮期血圧の測定を行った。実験期間終了後、大動脈起始部から腸骨動脈までの動脈組織を摘出し、各指標の測定に用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 実験期間中において被験者の体重、体格指数に有意な変動は認められなかった。トレーニング開始 1 週目、4 週目と 8 週目の週当たりの歩数と運動量は有意な変化を示しておらず、1 日当たりの運動量も個人による大きな変動はみられなかった。血液中の総コレステロール量など脂質関連物質にトレーニングによる変化は見られなかった。血中グルコース濃度はトレーニング開始前に比べトレーニング終了後に有意な低値を示した。血液中の NO 量はトレーニングの前後において変化は認められなかったが、エンドセリン-1 量はトレーニング前に比べてトレーニング終了後に有意な低値を示した。6-keto-PGF<sub>1α</sub>量はトレーニング前に比べトレーニング後に高値を示し、TXB<sub>2</sub>量はトレーニング前に比べトレーニング後に有意な高値を示した。健常な成人男性に対して 8 週間のレジスタンストレーニングを負荷し、血管のトーン調節に関わる物質に及ぼす影響について検討した。血管平滑筋弛緩物質である NO 濃度は、トレーニングによる有意な変化を示さなかった。一方、血管収縮作用のあるエンドセリン-1 濃度はトレーニング後に有意に減少した。しかし、同じく血管収縮作用のあるトロンボキサン濃度は増加した。

身体活動は、血管内皮細胞や血管平滑筋細胞への直接的または間接的な刺激となって、機能調節に関与している一酸化窒素などの

血管拡張性物質の放出を促し、循環器疾患の発症を抑制している。本研究において、8 週間の筋力レジスタンストレーニングによりエンドセリン-1 濃度はトレーニング終了後に有意な低値を示し、またプロスタサイクリンやトロンボキサンなどのアラキドン酸カスケード関連物質は筋交感神経活動により有意な高値を示すことを明らかにした。レジスタンストレーニングが血管に及ぼす作用には中枢性の調節因子も関与しているが、血管組織に対する局所的な調節因子については他因子との関係を含め、今後更なる検討を行う必要があることが示唆された。

(2) 体重や心臓湿重量は、いずれの群においても差は認められなかった。運動群の収縮期血圧は低値を示し、Control 群に比べ EX+AP 群で有意な低値を示した。動脈組織中の脂質過酸化物質量は運動群において増加し、Control 群に比べ EX+AP 群で有意な高値を示した。SOD 活性は運動群において減少する傾向を示し、Control 群に比べ EX+AP 群で有意に低い値を示した。NOS 活性は安静群に比べ運動群で減少したが、有意な差は認められなかった。血清亜硝酸/硝酸イオン濃度は、Ex 群において有意な低値を示したが、EX+AP 群に有意な変動は認められなかった。血清亜硝酸/硝酸イオン (NOX) 濃度は、Ex 群に比べ EX+AP 群で有意な低値を示した。運動による酸化ストレスの抑制に対して、apocynin が直接的な影響を示すことはないが、NADPH オキシダーゼ阻害剤の投与は運動時の NO 産出の促進させる可能性が示唆された。動物実験において血管細胞の活性酸素産出酵素活性を惹起させた状況において、自発的運動負荷が活性酸素種や脂質過酸化物の産出を抑制する効果について検討したが、動脈組織全体においては、自発的運動による脂質過酸化の抑制効果には影響を及ぼさない傾向にあると

ということが示唆された。また、血管内皮細胞においては、血管収縮を防御する予測予防的な反応が生じている可能性が示唆された。

(3)安静群の収縮期血圧に比べ apocynin 投与運動群の収縮期血圧は有意な低値を示した。このことから、運動時における NADPH オキシダーゼ阻害剤の投与は、活性酸素種の産生を抑制し、血圧を至適に保つことに寄与している可能性が示唆された。血管内皮細胞の活性酸素生成酵素である NADPH オキシダーゼは、血管組織において主要な活性酸素種の発生源となっている。血管に加わる刺激は、酸化ストレスの生成に大きな影響を及ぼしている。すなわち、運動などの身体活動によって生じる血流などの変化は、血管を構成している組織に対して活性酸素の産出を促進させている可能性がある。またその一方で、NADPH オキシダーゼの活性化によって発生した活性酸素種は、血管の細胞増殖や遊走、血管新生因子の調節など細胞内情報伝達に重要な役割を果たしていることも明らかにされている。本研究では、マウスに NADPH オキシダーゼを阻害する薬剤を投与したうえで継続的な運動を負荷し、血管組織に及ぼす酸化ストレスの影響について検討した。その結果、運動による酸化ストレスの抑制に対して、NADPH オキシダーゼ阻害剤が直接的な影響を示すことはないが、NADPH オキシダーゼ阻害剤の投与は運動時の NO 産出の促進させる可能性が示唆された。検討した活性酸素種についても血管の弛緩反応を亢進させている可能性があり、抗動脈硬化因子として血管増殖作用を有する多くの重要な遺伝子発現は、活性酸素種によって調節を受けていると推察される。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 木下 幸文、辻 悦子、NADPH オキシダーゼ阻害剤投与による運動が血管組織に及ぼす影響、第 63 回日本体力医学会大会、平成 20 年 9 月 20 日、大分
- ② 木下 幸文、辻 悦子、レジスタンストレーニングが血管のトーン調節因子に及ぼす影響、第 62 回日本体力医学会大会、平成 19 年 9 月 14 日、秋田

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木下幸文 (KINOSHITA SACHIFUMI)

兵庫大学・健康科学部・講師

研究者番号：50341029





(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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10件)
- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
  - ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
  - ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

- 〔学会発表〕(計5件)
- ①
  - ②
  - ③

- 〔図書〕(計2件)
- ①
  - ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

### (2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：