

機関番号：34419

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500636

研究課題名 (和文) 運動習慣は自己修復細胞を活性化しうるか—脳卒中発症遅延と延命効果

研究課題名 (英文) Long-term voluntary exercise improves the efficacy of cerebral angiogenesis and neurogenesis in stroke-prone genetically hypertensive rats

研究代表者

丹羽 淳子 (NIWA ATSUKO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60122082

研究成果の概要 (和文)：運動療法の予防・治療効果の一因として造血幹細胞や血管内皮前駆細胞 (EPC)、神経幹細胞の増加を予想し、ヒト本態性高血圧症病態モデル SHRSP を用いて検討した。運動群では発症前および発症後速やかに骨髄・末梢血中の EPC や造血幹細胞が増加し、脳病変部周囲の微小血管や神経幹細胞数も増加した。また EPC の誘導、移動に必須の CXCL12 や VEGF、神経新生に関与する BDNF とそのシグナル分子 ERK や CREB の活性化が認められた。

研究成果の概要 (英文)：Beneficial effects of long-term exercise (EX) may relate to increase endothelial and hematopoietic progenitors, and neuronal stem cells. In EX SHRSP, the number and activity of EPC and hematopoietic cells in bone marrow and peripheral blood cells were increased before and after stroke. The numbers of microvessels and neuronal stem cells around cerebral lesion were increased in EX, coincident with the appearance of EPC. Furthermore, levels of CXCL12, VEGF, and BDNF were higher in the plasma and cerebral homogenates of EX rats than sedentary rats and the signaling molecules, ERK and CREB, were also up-regulated in EX rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：総合領域

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：運動処方と運動療法・脳血管障害・血管内皮前駆細胞・血管新生・神経新生

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来の血管内皮前駆細胞 (EPC) が成体の末梢血液中に存在し、虚血部位などの血管新生の際の新規血管に取り込まれて血管構築に関わるという事実が明らかにされた (Asahara T. et al. Science, 27:964;1977)。また血管形成を間接的に誘導する細胞とし

て、マクロファージや造血幹細胞など血液細胞の血管新生の役割も解明されてきている。これらは、今日までの成体でおこる血管新生は、既存の血管内皮細胞の遊走や増殖のみであるという概念をかえるものであった。以来、EPC の治療応用の有用性が示唆される一方で、高血圧症、糖尿病、高脂血症などの基礎疾患

や喫煙などの生活習慣の危険因子によって、EPC 数およびその機能低下が明らかにされるようになった (Vasa M. et al. *Circ. Res.*, 89:E1;2001)。また動脈硬化性の虚血性心疾患や脳血管障害患者では、NO 産生低下、炎症性反応亢進に加え、血管新生能低下を伴っていることが知られている。これら臨床成績は、組織修復過程における EPC や造血幹細胞の機能不全が心血管イベントリスクを増加させている可能性があることを示している。

今回我々が用いた高血圧症病態モデル、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) は、遺伝性的高血圧症と脳卒中易発症性を呈し、ヒト本態性高血圧症患者の原因遺伝子と相同性のある遺伝子を多数もつ。我々は今までに、習慣性の運動療法の早期介入が、遺伝的素因をもちながら脳卒中抑制の極めて有効な非薬物的治療であることを証明した。これまでの多くの疫学調査からも、身体活動の活発さや軽～中程度の習慣的な運動は、心血管障害の減少と関係していることが明らかにされている (Hambrecht R. et al. *Circulation*, 107:3152;2001)。

また最近の知見では、いくつかの既存の高血圧症治療薬や高脂血症治療薬が EPC の内皮機能活性を上昇させたり (Thum T. et al. *Cardiovasc. Res.*, 70:50;2006)、EPC 自体が新生血管の構成体になるだけでなく、造血幹細胞とともに様々なサイトカインを分泌して (Ii M. et al. *Circulation*, 111: 1114; 2005) 血管内皮の修復や血管新生を促進させる可能性が報告されている。

2. 研究の目的

これらの知見から、高血圧症などの状態においては EPC など自己修復細胞の生理的機能が抑制され、血管病の病態を促進している可能性が考えられる。運動療法による脳卒中発症抑制および延命効果の一因として、EPC や組織幹細胞の増加を予想し検討する。また、血管内皮細胞由来遊走因子が神経新生においてガイダンス的機能を有する (Schmidt N. O. et al. *Brain Res.*, 1268:24;2009) ことも判明してきていることから、脳卒中発症後の血管—神経新生連関について検討をおこなう。

(1) 運動介入による EPC の数や形質変化を明らかにする。(2) 血管新生に重要とされる制御因子産生量やそれらの受容体について検討する。(3) 脳の血管および組織修復について、血管新生、神経新生、神経学的行動試験を調べ、脳卒中発症遅延および神経症状の改善、延命効果の点から運動療法の作用点を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物および運動負荷実験
雄性脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット

(SHRSP) および正常血圧の Wistar Kyoto ラット (WKY) 6 週齢から 18 週齢を用いた。動物は大学実験動物共同研究室で系統維持され、室温、湿度、明暗時間を厳密に調節された実験室で飼育された。飲水および飼料は自由摂取させた。

軽度から中程度運動を長期間継続させるために、運動負荷は 1 周 1 m の回転輪がついたケージ内で飼育し、8 週間以上自由に運動させた。毎日の運動量測定とともに、一定時間をおいて血中乳酸値を測定し、運動負荷量を確認した。また飼育期間中、体重、血圧、心拍数、神経症状を毎日または毎週測定した。非運動群は回転輪のない同等の広さのケージ内で飼育して比較した。運動負荷実験終了後に、経過観察および行動試験と並行して、以下に述べる項目について、動物をペントバルビタール麻酔下で実験材料を摘出し実験に用いた。すべての動物実験は本学動物実験倫理規定に基づいて行われた。

(2) 血管内皮前駆細胞 (EPC) の分離と解析
脳卒中発症前 (11 週齢から 13 週齢) および発症後 3 日、5 日、10 日、15 日の末梢血と大腿骨および腓骨から骨髓細胞を採取し、実験材料として用いた。フィコールを用いて単核球を分取したあと、EPC のマーカーとして用いられている (Taura D. et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29:1;2009) CD34 と vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) または VE-cadherin に対する抗体を用いて (抗体入手先: Santa Cruz Biotechnology, Abcam Co., BD Pharmingen, Beckman Coulter) EPC 数と VEGFR2 の発現量の時間変化をフローサイトメーター (FACS Calibur, FACS Vantage) により解析した。

また、EPC や神経幹細胞の誘導、増殖に必須の CXCR4 (BioVision) の発現量は、上記抗体により EPC を分画した後、フローサイトメーターにより解析した。

(3) 脳組織における EPC および神経幹細胞、造血幹細胞
発症後の脳組織修復に係わる前駆細胞、幹細胞の分布をリアルタイム PCR 法と免疫染色により確認した。

脳病変部より RNA を抽出したあと (TRIZOL Reagent; Invitrogen)、造血幹細胞は Abcg2、神経幹細胞は Bmi-1、EPC は VEGFR2 の mRNA レベルを SYBR Green 法 (SYBR Premix Ex Taq; TAKARA Bio Inc) により測定した (ABI PRISM 7900HT)。

免疫染色は 4% パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液で灌流固定した後、定法によりパラフィン切片を作成した。抗原賦活化を行った後、以下の抗体を用いてそれぞれの細胞抗原を染色し (ヒストファイン; ニチレイバイオサイエンス)、発色は DAB Chromogen

(DAKO)とVIP(Vector Laboratories)を用いた。EPCと血管内皮細胞は抗VEGFR2抗体(Abcam)と抗CD34抗体(R&D Systems)、神経幹細胞は抗Nestin抗体(Chemicon)、神経幼弱細胞は抗Doublecortin(DCX)抗体(Abcam)、成熟神経細胞は抗NeuN抗体(Chemicon)を用いた。細胞増殖は、抗Bromodeoxyuridine抗体(Roche)と抗Ki-67抗体(DAKO)を用いた。

(4) 病理組織学的検討

発症前、発症後3日、1、2、3、4週目に上記と同様の方法により脳および骨髄、頸動脈を摘出し、定法によりパラフィン切片を作成してHE染色を行い、病変部および海馬領域の病理組織学的検討を行った。また発症後2日目から5日間、腹腔内にBromodeoxyuridine(BrdU)50 mg/kg/day投与し、発症後1、2、3、4週目に同様の方法でラットから脳を摘出し、病変部および神経組織幹細胞が存在する海馬領域(SGZ)と側脳室領域(SVZ)について連続冠状切片を作成し、抗BrdU抗体および上記の血管内皮細胞抗原と神経細胞抗原に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

発症前(11週齢)、発症後(13~14週齢と16~18週齢)のラット脳組織の血管透過性は、0.4%トリパンプルー/生理食塩水液を灌流した後脳を摘出し、その後48時間ホルムアミドに浸漬して組織中の色素を抽出し、吸光度を測定した。脳浮腫は70°Cオーブン中で48時間乾燥させ、水分量を測定した。脳病変部の体積は、脳全体を1.5 mmの厚さの冠状切片にし、2% triphenyltetrazolium chloride (TTC)液に浸けて37°C 20分保温したあと、TTC染色部(正常部)と非染色部(障害部)の大きさを測定して体積を計算した。

(5) 血管新生(再生)および神経新生(再生)因子と炎症性サイトカイン

発症前、発症後の時間をおいて、血漿中および脳組織(発症病変部とSGZとSVZ)ホモジネート上清のCXCL12(R&D Systems)、brain-derived neurotrophic factor(BDNF)(Promega)、VEGF(American Research Products)、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)(Endogen)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)(R&D Systems)についてELISA法により測定した。

(6) 血管新生(再生)および神経新生(再生)因子のシグナル伝達分子

リン酸化(p)-ERK、p-Akt、p-CREB(いずれもCell Signaling)、HIF-1 α (R&D Systems)について、ウェスタン・ブロット法により検討した。発症前と発症後7日目の病変部およびSGZとSVZのホモジネート蛋白溶解液をSDS電気泳動(SDS-PAGE)し、PVDF膜(Immobilon-P; Millipore)に転写した後、化学発光法(ECL Plus; GE Healthcare)でタンパク量を検出した(ImageQuant LAS4000/4010; GE Healthcare)。

(7) 神経学的行動試験

全てのラットについて8週齢から18週齢まで、週1回、傾斜板を用いて運動協調性、平衡感覚、筋力を評価した。

また試験本番の前々日と前日に約1 m四方のオープンフィールド内で慣らした後、同じ2本のピンをフィールド内に置いて5分間探索させ、ピンに触れた回数と時間を記録した後、15分または1時間後、片方のピンを新奇のものに変えて5分間探索させ、同様に物体に触れた回数と時間を記録して比較し、記憶認識能を評価した(新奇認識試験)。

(8) 統計処理

実験値は平均値±標準誤差として表した。統計処理は、2群間の比較はt検定により、3群間以上の比較はPost hoc ANOVAとScheffeの方法で多重比較検定を行った。危険率5%以下を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 運動習慣による脳卒中発症抑制および発症遅延と延命効果

脳卒中発症までの、体重、収縮期血圧、心拍数は、いずれも運動群と非運動群間に有意差を認めなかった。これに対して、発症するまでの日数を比較すると、非運動群(sedentary)の全ラットが120日齢までに発症したのに対し、運動群(exercise)では40%しか発症せず、有意な発症遅延および発症抑制効果を示した。また生存率も非運動群が202日齢までに全ラットが死亡したのに対し、運動群ではまだ50%が生存し、有意な生存率の延長を認めた。50%生存日数は非運動群が166日で運動群が210日であった(図1)。

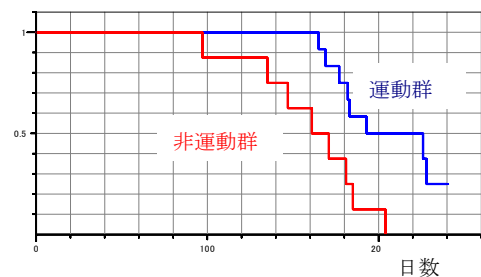


図1 生存率の比較

2) 骨髄および末梢血における血管内皮前駆細胞(EPC)および造血幹細胞の変化

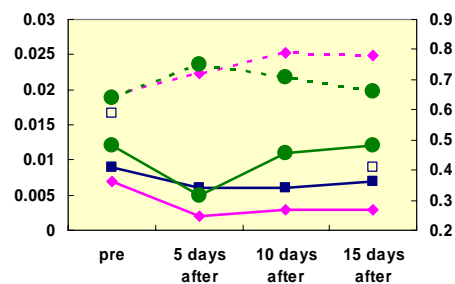


図2 骨髄 EPC (CD34+, VEGFR2+) の発症前と発症後の数の変化 (%)
 緑●は運動群 SHRSP、桃◆は非運動群 SHRSP、青■は WKY を示す。点線は脳浮腫の程度 (脳水分量) を示した。

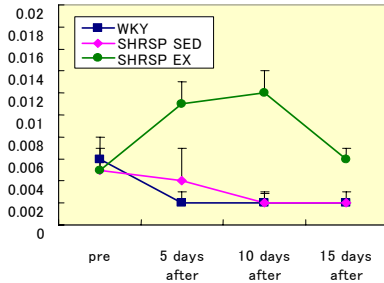


図3 末梢血 EPC の発症前と発症後の数の変化 (%)

運動群 SHRSP の骨髄中および末梢血中 EPC (CD34+, VEGFR2+ または CD34+, VE-cadherin+) と造血幹細胞マーカーの CD34+ 細胞は、発症前から非運動群に比し有意な増加を示し、発症後も速やかに増加した (図 2, 3)。

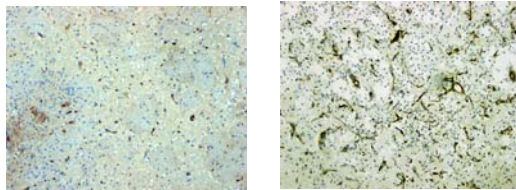


図4 脳卒中病変部周囲の CD34+細胞微小血管 (発症後 10 日目) 左: 非運動群、右: 運動群

末梢血および骨髄 EPC の増加に一致して、脳病変部の CD34 陽性微小血管数は運動群で有意に増加した (図 4、図 6)。また Nestin 陽性神経幹細胞細胞や DCX 陽性神経幼弱細胞も病変部周囲に増加した (図 5、図 7)。mRNA レベルにおいても運動群では非運動群に比し、VEGFR2 は約 4 倍、Bmi-1 (神経幹細胞) は約 3 倍に増加した。

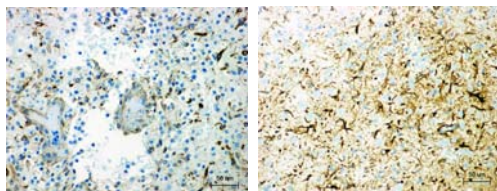


図5 発症部周囲の Nestin 陽性神経幹細胞 (発症後 10 日目) 左: 非運動群、右: 運動群

さらに EPC や CD34+細胞および神経新生細胞の増加の時間経過は脳浮腫の軽減 (図 2) や炎症性サイトカインである MCP-1、TNF- α 産生量の抑制と一致した (data not shown)。

発症部 CD34+ cells and microvessels

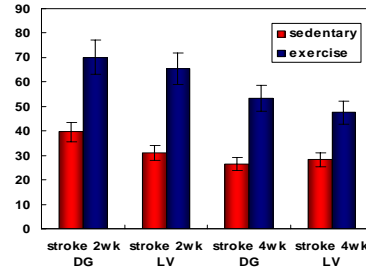


図6 脳病変部 CD34+細胞微小血管数の時間変化

DG DCX (5sections)

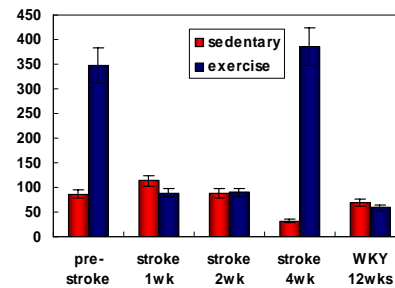


図7 海馬歯状回における DCX+陽性神経幼弱細胞数の時間変化

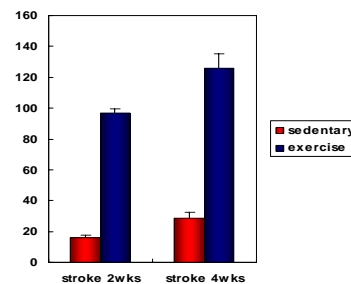


図8 海馬領域における NeuN+神経新生の時間変化

また運動群では、神経新生が行われる海馬領域において Nestin+幹細胞に続いて、DCX+幼弱細胞、NeuN+成熟細胞が増加し (図 8)、時間と共に神経新生が活発に進行した。

(3) 血管新生および神経新生に関与する液性因子の変化

運動群では、発症前から CD34+細胞や EPC が増加し、発症後速やかに末梢血や病変部に移行して、病変部の修復や神経新生に関与す

ることが示唆された。そこで、これら細胞の誘導や移動過程に必須である VEGF、CXCL12、BDNF とその受容体の発現変化を検討した。

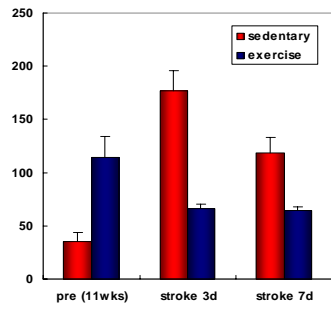


図9 血漿中 VEGF レベルの変化

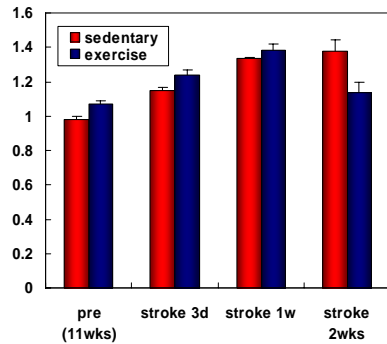


図10 血漿中 CXCL12 レベルの変化

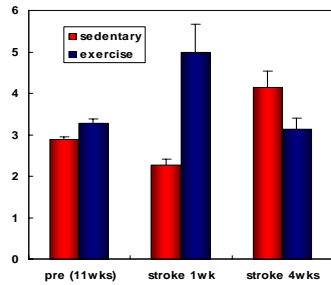


図11 海馬領域の BDNF レベルの変化

血漿中および脳組織の VEGF は、運動群で非運動群に比し、発症前に有意に高値であったが、非運動群が発症後も増加するのに対して運動群では減少した(図9)。一方、運動群末梢血と骨髄 EPC の VEGFR2 の発現量は、発症後非運動群の約3倍に達した(図12)。血漿中および脳組織の CXCL12 レベルは発症前、発症後ともに運動群で有意に高値を示し(図10)、その受容体の末梢血 EPC の CXCR4 も運動群で高値であった(図13)。海馬神経新生領域 BDNF レベルは、運動群で発症後早期に上昇し(図11)、これら液性因子の時間変化は EPC や神経新生細胞の動態に一致するものであった。さらに BDNF 産生に關与する ERK と CREB のリン酸化レベルも発症後運動群で

有意に上昇していた(図14、図15)。

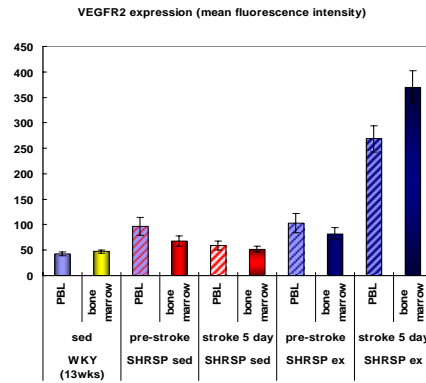


図12 末梢血および骨髄 EPC の VEGFR2 の発現量の変化

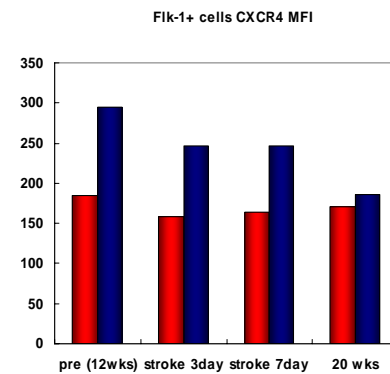


図13 末梢血 EPC の CXCR4 発現量の変化

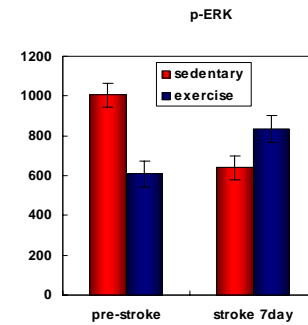


図14 海馬領域のリン酸化 ERK レベル

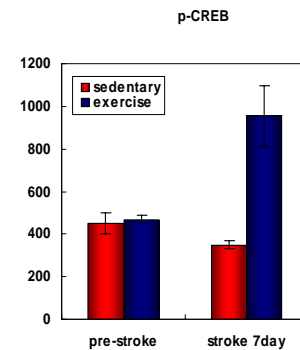


図15 海馬領域のリン酸化 CREB レベル

(4) 脳障害および神経学的行動試験

脳卒中による脳組織障害を TTC 染色と色素透過性によって検討した。

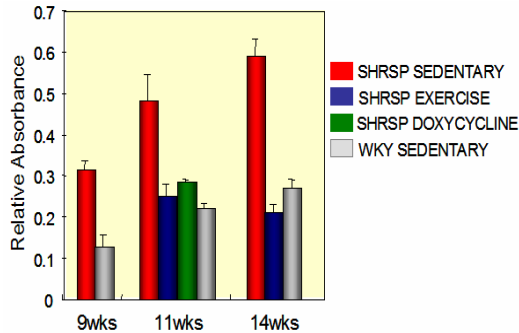


図 16 脳血管トリパンブルー色素透過性

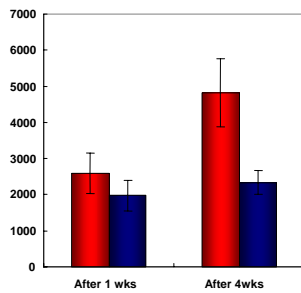


図 17 TTC 染色による脳障害部の大きさ
赤カラム：非運動群、青カラム：運動群

非運動群では発症前から血管透過性が亢進し、発症後 2 週間を経ても透過性の亢進は改善されなかった (図 16)。一方、運動群では正常血圧の WKY とほぼ同等の Blood Brain Barrier 構造が維持されていた (図 16)。これは、発症後の TTC 染色の検討によっても同様の結果が得られ、運動群では組織の修復機構が活性化されていることを示した (図 17)。四肢の運動協調性と記憶・認識能の 2 種類の神経学的行動試験について時間経過をおって検討した。両試験ともに、運動群では発症前から非運動群に比し良好な成績を示し、発症後も速やかな回復を示した (図 18、図 19)。

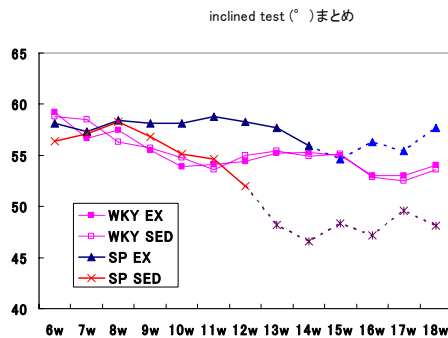


図 18 運動協調性試験 (傾斜板試験)
破線は発症後の結果を示す。

新奇物体認識試験 (15 分) 1, 2, 3 回まとめ

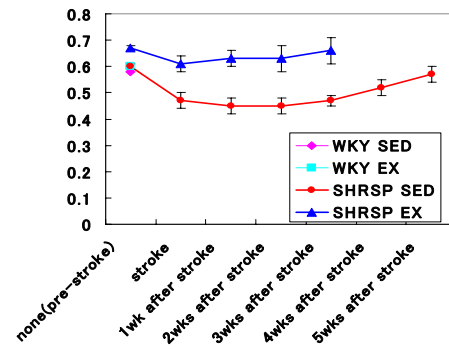


図 19 記憶・認識能試験 (新奇物体認識試験)

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 淳子 (NIWA ATSUKO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60122082

(2) 研究分担者

東野 英明 (HIGASHINO HIDEAKI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：40122098

中村 恭子 (NAKAMURA KYOKO)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：10512197

阪上 浩 (SAKAUE HIROSHI)

徳島大学大学院・

ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60372645

大島 佳奈 (OOSHIMA KANA)

近畿大学・医学部・助手

研究者番号：60278653

(3) 連携研究者 なし