

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591059

研究課題名（和文）骨髄由来単核球細胞と脳内レニン-アンジオテンシン系の関わりについての検討

研究課題名（英文）Role of bone marrow-derived mononuclear cells on modulation of brain renin-angiotensin system

研究代表者

山里 正演（YAMAZATO MASANOBU）

琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号：90347138

研究成果の概要（和文）：脳における骨髄由来細胞の分布または機能の異常が高血圧の病態に関与しているという仮説のもとに検討を行った。骨髄由来細胞の脳室内移植は高血圧ラットの血圧や心拍数へ明らかな影響を及ぼさなかった。しかしながら同細胞は内皮細胞に比べ ACE2 や Mn-SOD を多く発現しており、また、長期にわたり脳内に生着していた。脳内生着局所のレニン-アンジオテンシン系を調節しうる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that decreased number or function of bone marrow (BM)-derived cells in the brain is related to neurogenic hypertension. Intracerebroventricular (icv) administration of DiI labeled BM-derived cells revealed that a long term attachment of DiI positive cell in the brain. Although icv administration of BM-derived cells did not alter blood pressure in hypertensive rats, higher expression of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and Mn-SOD of the BM-derived cells and its ability to attach in the brain suggest that BM-derived cells may serve as a mobile renin-angiotensin system modulator in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：高血圧学・中枢性血圧調節

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨髄由来単核球細胞と心血管病

骨髄に組織修復能を有する細胞が存在することがわかってきた。骨髄由来単核球細胞は

骨髄から末梢血中に動員され、血行性に標的臓器を巡回し、損傷組織に分布しその組織を修復するとされる。心血管病患者では末梢血中の骨髄由来単核球細胞数が少ないことが報告されている。また、心血管病の危険因子が多いほどその数が減少し、機能も低下していることが報告された。これらの報告は心血管病の発症・進展に骨髄由来単核球細胞の分布不全に伴う修復不全があるという考えを支持する。一方、骨髄由来単核球細胞は細胞治療という側面でも注目されている。組織修復には同細胞の分化・接着能に加え IL-10 などの発現を介した抗炎症作用が関与していると考えられている。当教室でも重症虚血肢へ末梢血骨髄由来単核球細胞の自家移植を行い、同移植が長期にわたり虚血の症状を改善させたことを報告した。すなわち、骨髄由来単核球細胞の標的臓器への分布不全は心血管病の発症・進展に関係し、血行性もしくは非血行性による同細胞の障害臓器への再配分は心血管病の病態を改善させる。

本態性高血圧患者においても末梢血骨髄由来単核球細胞が減少しているという報告があり、同様の病態、すなわち血圧調節に重要な臓器への同細胞の分布不全が高血圧の発症・維持に関与しているという考えに至った。しかしながら、高血圧発症・維持の病態における骨髄由来単核球細胞の役割を検討した研究はいまだない。

(2) 脳内レニン-アンジオテンシン系および酸化ストレスの異常と高血圧

脳内にはレニン-アンジオテンシン系(RAS)の全ての構成要素が存在し、脳内 RAS の活動の亢進は交感神経活動の亢進および圧受容体反射機能低下を引き起こし高血圧の病因の一つとして重要である。また、RAS の亢進は酸化ストレスを増やす最大の要因である。一方、脳内の RAS の活動を抑制する因

子の減少も高血圧の病態に関与していることがわかってきた。アンジオテンシン変換酵素 2(ACE2)は 2000 年に発見された比較的新しい RAS のメンバーである。従来より知られているアンジオテンシン変換酵素とは異なり ACE2 はアンジオテンシン II をアンジオテンシン(1-7)へ変換する酵素である。すなわち局所のアンジオテンシン II による高血圧病態への悪影響を減らす RAS の抑制因子である。高血圧動物の脳では ACE2 の発現が減少しており、その過剰発現は高血圧の病態を改善させることを報告した。また、ACE2 の過剰発現は炎症性サイトカインの発現を減少させることがわかった。

我々の最近の検討で骨髄由来末梢血単核球細胞は臍帯静脈内皮細胞に比べ ACE2 および Mn-SOD が多く発現していることがわかり、以下の仮説を考えるに至った。

2. 研究の目的

「脳への骨髄由来単核球細胞の分布不全が脳内レニン-アンジオテンシン系および酸化ストレスの抑制不全をひきおこし高血圧の病態に関連している」という仮説をたて、その検証を行った。

3. 研究の方法

1)ラット骨髄液の細胞培養を行い、レニン-アンジオテンシン系の構成要素(AT1 受容体, AT2 受容体, ACE, ACE2), および Mn-SOD の発現を調べた。免疫染色で局在を調べ、Western blot で発現量を比べた。また、骨髄細胞の培養上清を採取し内皮細胞の増殖に及ぼす影響を BrdU の取り込みで評価した。2) ラット脳室内に DiI で標識した骨髄由来細胞を自家移植し移植 4 週後と 8 週後に脳を採取し、脳内における DiI 陽性細胞の分布を組織学的に調べた。また、高血圧ラットと正常血圧ラット

でその分布に違いがあるかを調べた。3)脳室内自家移植実験：高血圧発症期の8週齢の脳卒中易発症ラットをもちいた。DiI 標識骨髄由来細胞を脳室内へ自家移植し、移植4週間まではTail cuff法で収縮期血圧を測定したのち、大腿動静脈にカテーテルを留置する手術を行い、48時間の回復期ののち平均血圧(MAP)、心拍数(HR)を無麻酔・無拘束下で測定した。対照群には血清を含まない培養液を同じVolumeで脳室内投与した。3)脳室内他家移植実験：高血圧の完成した14週齢高血圧自然発症ラット(SHR)をもちいた。骨髄由来細胞は正常血圧対照ラットのWKYより採取し、SHRの脳室内に他家移植した。血圧は移植8週間まではTail cuff法で収縮期血圧を測定し、その後、大腿動静脈にカテーテルを留置する手術を行い、48時間の回復期をおき平均血圧(MAP)と心拍数(HR)を無麻酔・無拘束下で記録した。脳室内移植実験においては体重に及ぼす影響および実験終了時に採取した脳内のDiI陽性細胞の分布を調べた。

4. 研究成果

使用した骨髄由来細胞の特徴：約0.5mlの骨髄液を採取し3週間培養した。約6割の検体で細胞数は100万個以上に増殖した。免疫染色ではvWFが陽性で一部は α -SMアクチンも共陽性であった(図1)。

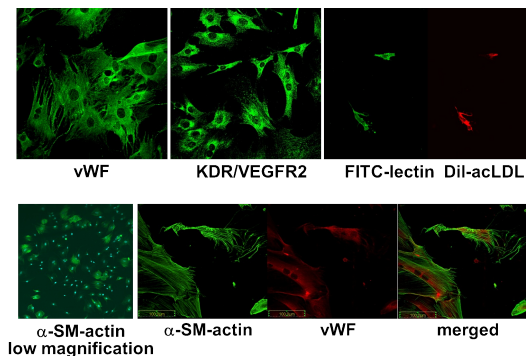


図1

アンジオテンシン変換酵素2(ACE2)とMn-SODの蛋白発現は骨髄由来細胞で内皮細胞に比べ多かった。アンジオテンシン II type 1(AT1)受容体およびAT2受容体の発現は内皮細胞と差はなかった(図2)。Mn-SODの発現は高血圧自然発症ラット(SHR)で対照の正常血圧ラット(WKY)に比べ多かった。骨髄由来細胞の培養上清は内皮細胞の培養上清に比べ内皮細胞におけるBrdUの取り込みを約2倍に増やした。

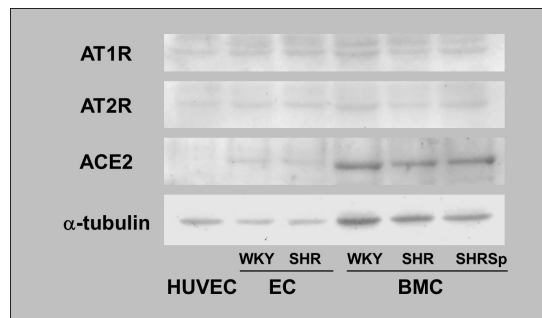


図2

注入した細胞の局在：DiI陽性細胞は注入8週間後も確認できた。脳室内投与では脈絡叢、脳室周囲、一部脳実質内にDiI陽性細胞を認めた(図3)。SHRとWKYでDiI陽性細胞の分布に明らかな違いはなかった。

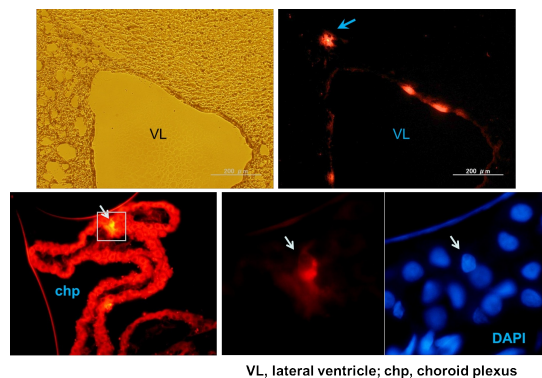


図3

体重・循環動態に及ぼす影響：

自家移植実験：8週齢の脳卒中易発症ラットへ培養液(n=6)または自家骨髄由来細胞(n=7)の脳室内投与を行った(図4)。

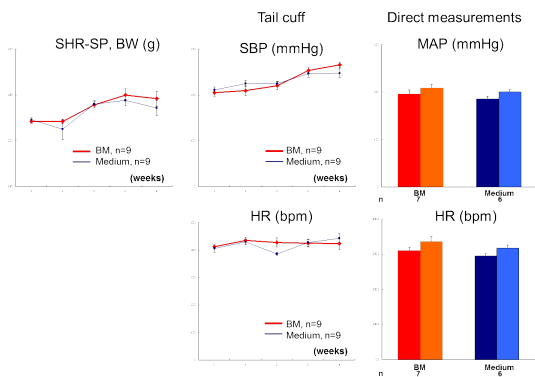


図 4

体重増加に差はなかった。5 週後の MAP はそれぞれ 201 ± 5 、 208 ± 8 mmHg、HR は 317 ± 9 、 335 ± 14 bpm であった。

他家移植実験：14 週齢の SHR へ培養液脳室内投与(n=6)または WKY 骨髄由来細胞の脳室内投与(n=9)を行った(図 5)。

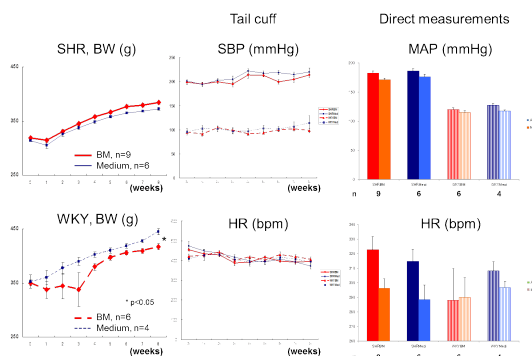


図 5

9 週後の MAP はそれぞれ 186 ± 4 、 183 ± 3 mmHg、HR は 315 ± 8 、 323 ± 9 bpm であった。WKY への SHR 骨髄由来細胞の脳室内投与も循環動態へ影響しなかったが、体重増加を鈍らせた。

結論および考察：骨髄由来細胞の脳室内投与は血圧や心拍数へ明らかな影響を及ぼさず高血圧の病態への関与は明らかでなかった。しかしながら同細胞は内皮細胞に比べ ACE2 や Mn-SOD を多く発現しており、また、長期にわたり DiI 陽性細胞を脳内で確認できたこ

とより、脳内生着局所のレニン-アンジオテンシン系を調節しうる可能性が考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

山里正演、石田明夫、山里代利子、崎間敦、安隆則、大屋祐輔、骨髄由来細胞のレニン-アンジオテンシン系構成要素発現の特徴と脳での循環動態に及ぼす影響、第 34 回 日本高血圧学会総会、2011 年 10 月 22 日、栃木県宇都宮市

Yamazato M, Ishida A, Yamazato Y, Sakima A, Yasu T, Ohya Y. Bone marrow derived cells express higher angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and its ability to attach in the brain of hypertensive rats. AHA High Blood Pressure Research 2011 Scientific Sessions, Sept 22, 2011, Orlando, FL.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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://www.hosp.u-ryukyu.ac.jp/med3/3naika/home.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山里 正演 (YAMAZATO MASANOBU)

琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号：90347138

(2)研究分担者

石田 明夫 (ISHIDA AKIO)

琉球大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10343378

(3)連携研究者

()

研究者番号：