

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500787

研究課題名(和文) 運動トレーニングによる内皮依存血管弛緩機能向上のメカニズム

研究課題名(英文) The mechanism of the blood vessel relaxation function improvement dependent endothelium after the exercise training

研究代表者

古川 覚 (Furukawa, Satoshi)

東洋大学・ライフデザイン学部・教授

研究者番号：50307675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、自然発症高血圧ラット(SHR)をモデルに、運動トレーニングによる安静時血圧改善のメカニズムを組織のニトロ化タンパク質に着目した生化学的な側面および血管の弛緩能力の測定による組織学的側面から検討しようとするものである。SHRに10週間の自発運動トレーニングを行わせ、組織のニトロ化タンパク質および血管の弛緩能力を検討した。懸濁液のP2分画においては3-ニトロチロシン濃度の減少傾向が認められたが、優位なレベルには至っておらず、再検討が必要であると思われる。胸部大動脈の物理的弾性要素は、運動トレーニングで向上する傾向が認められたが、血管弛緩機能などのさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify mechanisms of the resting systolic blood pressure improvement by the exercise training in the spontaneous hypertensive rats (SHR), from the histologic side attention to the nitration protein of the organization and the biochemical side attention to the relaxation ability of the thoracic aorta. I let SHR perform 10-week voluntary exercise training, and examined the relaxation ability of the thoracic aorta and the amount of nitration protein of the organization. A tendency to decrease of the 3-nitrotyrosine contents was recognized in the P2 fractions, but it does not lead to a significant level, and it is thought that reexamination is necessary. As for the physical elasticity element of the thoracic aorta, a tendency to improve by exercise training was recognized, but needs the further examination such as thoracic aorta relaxation functions.

研究分野：スポーツ科学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：安静時収縮期血圧 3-ニトロチロシン 血管弾性要素 血管弛緩機能 SOD NOS

1. 研究開始当初の背景

高血圧症は日常診療の場で最も多くみられる疾患の一つで、人口の約 20% が罹患しているとされている。高血圧症は脳、心、血管および腎臓などの様々な臓器障害を引き起こす大きな要因である。そのうえ、「サイレントキラー」と呼ばれるように、自覚症状なく発症するために発見が遅れることも罹患者を増加させる理由の一つでもある。少子高齢化社会に向かう我が国においては QOL の観点からも見逃すことのできない疾患である。

高血圧全体の 90% を占めると言われている本態性高血圧症の治療には、薬物療法に加え運動療法が取り入れられている。しかしながら、運動トレーニングにより安静時血圧に改善が観られたという報告がある一方で、改善が観られなかったという報告もあり、運動トレーニングの種類および量、その他の生活習慣などにより効果が様々であると言わざるを得ない。また、運動トレーニングにより安静時血圧の改善が観られた報告においても、改善の具体的なメカニズムについては未だ不明な点も多い。血圧は、神経や化学物質によって非常に複雑に調節されており、血圧変動の要因も「血液量(血液性状)」、「心拍出量(心拍出力)」、「末梢抵抗」および「血管弾性」など多岐にわたるため、多くの研究者たちが様々なアプローチによって運動トレーニングによる安静時血圧改善のメカニズムの究明を行っている。

私はこれまで、自然発症高血圧ラット(SHR)に自発走運動トレーニングを課すことによって組織の活性酸素消去能力がどのように変化するかに着目してきた。その結果、運動トレーニングによって、下肢骨格筋および心臓において活性酸素消去酵素である SOD (super oxide dismutase) 活性の向上が認められ、運動トレーニングの効果として活性酸素の定常濃度が低下することにより一酸化窒素(NO)の効果的な血管弛緩作用が可能になり、血圧上昇が抑制されるというメカニズムが示唆された。さらに、安静時血圧が高い非運動群は活性酸素の定常濃度が比較的高いと仮定すると、一酸化窒素と活性酸素との反応性窒素酸化物であるパーオキシナイトライト(ONOO-)が産生されている筈であるという仮説が導き出される。この仮説に基づき、ONOO-のバイオマーカーとして知られるニトロ化タンパク質の一つであるニトロチロシンに着目し、組織のニトロチロシン量を測定してきた。ウェスタンブロット法による定性試験においては、SHR の週齢がすすみ高血圧が亢進するにつれ、心臓のニトロチロシン量が増加している傾向が示唆された。

本研究は、運動トレーニングによる安静時血圧の改善をニトロ化タンパク質に着目した生化学的な側面と、血管の弛緩能力の測定による組織学的な側面から大動脈を検討しようとする点でオリジナリティがある。ヒトを対象にした研究は勿論のこと高血圧モデ

ルを用いた研究においても類似の研究は皆無であり、運動トレーニングによって導かれる安静時血圧改善のメカニズムを究明する上で非常に重要な知見となり得るものと考えられる。とりわけ、活性酸素による動脈の変性と、運動トレーニングがその変性を阻止する可能性を示すことは、本研究の学術的な特色でもある。

また、本研究による結果は、今後の高血圧運動療法に大きく貢献すると同時に、高血圧予防のための運動トレーニングにも様々な示唆を与えるものと思われる。さらには、少子高齢化社会を迎える我が国において、高齢者の医療費増加は国家の大きな負担となっていることが問題視されているが、高血圧予防のための運動トレーニングの系統化はこの問題を軽減する一つの方法となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、自然発症高血圧ラットをモデルに、運動トレーニングによる安静時血圧改善のメカニズムを組織のニトロ化タンパク質に着目した生化学的な側面および血管の弛緩能力の測定による組織学的な側面から検討しようとするものである。

様々なアプローチにより運動トレーニングによる安静時血圧改善のメカニズムが究明されようとしているなかで、本研究は自然発症高血圧ラットの大動脈においてニトロチロシン量および SOD 量をウェスタンブロット法により定量する。組織量の少ない大動脈においてこれらの調査を行うためには高感度の分析技術が求められるが、高血圧の予防・改善を検討する場合に大動脈の解析は必要である。これまでの心臓および骨格筋における分析と合わせて検討することにより、運動トレーニングによる安静時血圧改善のメカニズムを解明することが可能となる。

さらに、本態性高血圧のヒトおよび SHR は正常血圧のコントロールと比較して最大内皮依存性血管弛緩能力が低下し機能障害をもっていることが示唆されている。そこで本研究は、生化学的分析に加え運動トレーニングにより安静時血圧の改善が認められた胸部大動脈を切除し、Spier らの方法に従って *in vitro* 条件下で内皮依存血管弛緩機能を物理的に測定することにより、内皮依存血管弛緩要素を定量する。

3. 研究の方法

研究方法における(1)対象および飼育、(2)実験手順およびサンプリングは、2007年順天堂大学さくらキャンパス実験動物委員会の承認を得て行ったものである。本研究は、凍結保存された試料の提供を受け実施した。

(1) 対象および飼育

SHR 等疾患モデル共同研究会(京都)が維

持管理する4週齢の自然発症高血圧ラット (SHR/Izm・以下SHR)雄10匹および14週齢の雄SHR30匹を用いた。飼育は一匹ずつ個別に行った。飼料は標準的な固形飼料(CE2:日本クレア,東京)を与え、水道水とともに24時間自由に摂取させた。飼育環境は室温 22 ± 1 、相対湿度 $50 \pm 5\%$ 、12時間点灯-12時間消灯のサイクルに保った。

(2) 実験手順およびサンプリング

1週間の予備飼育を行った後、SHRの体重およびtail-cuff法による安静時収縮期血圧(BP98A:ソフトロン,東京)を測定した。5週齢SHR(5wk群)および15週齢SHR(15wk群)各10匹にペントバルビタールナトリウムを体重1kgあたり50mg腹腔内投与して麻酔し、血液、心臓および足底筋を採取した。他の15週齢SHRは無作為にコントロール群(25wk Cont群)および持久的運動トレーニング群(25wk Ex群)に10匹ずつ分けた。持久的運動トレーニング群の飼育ケージには一周1mのカウンター付き回転ホイールが取り付けられており24時間自由に運動することができた。持久的運動トレーニング期間は10週間とした。走行距離は2日毎に記録した。トレーニング期間終了後、25wk Cont群およびEx群のSHRを麻酔し、血液、心臓、胸部大動脈および足底筋を採取した。血液サンプルは $3,000 \times g$ で10分間遠心し血漿を -80 で保存した。心臓、胸部大動脈および足底筋は液体窒素で急速凍結した後 -80 で保存され、順天堂大学より提供された。

(3) ウェスタンブロット分析

凍結保存した組織を1mMのDTT、1mMのEDTAおよび1mMのPefabloc(Roche Diagnostics GmbH,ドイツ)を含む50mMのTris-HCl緩衝液(pH7.4)で懸濁した。懸濁液をまず $1,000 \times g$ で30分間遠心して細胞破片と核を取り除き、その上清を $100,000 \times g$ で30分間遠心した。この上清がサイトゾル、細胞小器官を含む細胞質画分である。次に、沈殿部分をCHAPS(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonic acid)緩衝液(1mM DTT, 1mM EDTA, 1mM Pefabloc, 20mM CHAPS 含む50mM Tris-HCl 緩衝液:pH7.4)で溶解し、 $100,000 \times g$ で60分間遠心した。この上清が膜画分となる。細胞質画分を10%のSDS-PAGEで電気泳動しPVDFメンブレンに転写し、5%スキムミルクでブロッキングした後、メンブレンをマンガン-SOD抗体(1:3000, Stressgen Bioreagents, USA)銅・亜鉛SOD(Cu,Zn-SOD)抗体(1:1200, Stressgen Bioreagents, USA)および誘導型NOS(iNOS)抗体(mouse monoclonal anti-iNOS antibody:1:1600, BD Biosciences, USA)に4に一晚インキュベートした。膜画分はeNOS抗体(1:1000, BD Biosciences, USA)によるeNOS検出に用いた。メンブレンはアルカリフォスファターゼ標識の二次抗体

(1:10000, Promega, USA)でインキュベートした。なお、ポジティブコントロールにはヒトMn-SOD(26)およびヒトCu,Zn-SOD、ヒト内皮細胞懸濁液(BD Biosciences, USA)を用いた。発色にはImmun-Star AP Chemiluminescence Kits(Bio-Rad, USA)を用いた。発色の分析にはフリーソフトウェア-Image J ver.1.37(National Institute of Health, USA)を用いた。

(4) 3-ニトロチロシン(3-NT)濃度の測定
採取した心臓はYoshidaら(1996)によって述べられた方法で懸濁後分画した。この分画により、核を含む $1,000 \times g$ 顆粒(P1)、ミトコンドリア、小胞体および原形質膜を含む $100,000 \times g$ 顆粒(P2)、サイトゾルを含む $100,000 \times g$ 上清(S)が得られた。各画分について時間分解蛍光イムノアッセイ法を用いて3-NTレベルを定量した。時間分解蛍光イムノアッセイはNT-BSA(牛血清アルブミン)結合体(nano Tools Antikörpertechnik GmbH & Co.ドイツ)をビオチンで標識する競合法により測定を行った。NT-BSA結合体は0.1M炭酸緩衝液(pH9.6)で $1.3 \mu g/0.1ml$ に希釈し、蛍光マイクロプレートに投入した(Fluoro Nunc module plate, Nalge Nunc International, デンマーク)。これらのプレートは5で一晚インキュベートした後、0.05%のTween20を含むTris-HCl緩衝液(pH7.8)で2回洗い、Tris-HCl緩衝液で1回洗った。ビオチン標識3-NT抗体(Academy Bio-Medical Company, Inc., USA)は0.2%のBSAを含むTris-HCl緩衝液で $2.7 \mu g/ml$ に希釈した。同様に希釈したNTスタンダードまたはサンプル溶液を混和し、5で一晚インキュベートした。50 μl の混合液を各ウェルに加え5で14時間インキュベートした。0.05%のTween20を含むTris-HCl緩衝液(pH7.8)で2回洗い、Tris-HCl緩衝液で1回洗ったのち、{2,2',2'',2'''-[4'-(aminobiphenyl-4-yl)-2,2':6',2''-terpyridine-6,6''-diyl]bis(methylenenitrilo)} tetrakis(acetate)europium³⁺(DTBTA-Eu³⁺)溶液25)50 μl を加え、37で1時間インキュベートした。最後に、ウェルを0.05%のTween20を含む0.05MのTris-HCl緩衝液(pH9.1)で洗い、マルチラベルカウンターArvo SX(PerkinElmer Life Sciences, USA)において340nm照射時の615nmの蛍光度を測定した。

(5) 胸部大動脈内皮依存血管弛緩機能分析
15週齢の自然発症高血圧ラット10匹に10週間の運動トレーニング(自発走運動)を行わせたのち、胸部大動脈を摘出し内皮依存血管弛緩機能、および物理的弾性を血管・運動測定MYOグラフシステム(DANISH MYO TECHNOLOGY社製,ポーランド)を用いて調査した。摘出した胸部大動脈からSpierら(1999)によって述べられたように2mmのり

ングを作成し固定装置にマウントした。その後胸部大動脈を Graham と Rush (2004) によって示されたように、-10、-8、-6、-4log mol/l のアセチルコリンに暴露し、血管弛緩作用を対照群と比較した。また同様の暴露を、NO 合成酵素阻害薬である NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 存在下、および、直接血管平滑筋を弛緩させ昇圧効果を発揮する sodium nitroprusside (SNP) 存在下においてもを行い、対照群と比較検討し内皮依存血管弛緩機能を検討した。

(6) その他の分析方法

SOD 活性は、キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系を O₂-生成系としテトラゾリウム塩の還元反応を利用した SOD Assay Kit (同仁化学研究所, 熊本) を用いて製造マニュアルに従い比色法により定量した。サンプルの 450nm 波長の吸光度はマイクロプレートリーダー (Multiscan JX; Thermo Fisher Scientific, USA) を用いて測定した。各サンプルに 5mM KCN を加え銅・亜鉛-SOD 活性を完全に阻害し、マンガン-SOD 活性を測定した。その際、精製したヒト Cu,Zn-SOD を SOD 活性のスタンダードとして用いた。総 NOS 活性を高感度比色 NOS 活性測定キット (Oxford Biomedical Research, USA) を用いて定量した。足底筋クエン酸合成酵素 (CS) 活性を Srere の方法に従って測定した。各サンプルのタンパク質濃度はピシニコニン酸 (BCA) を発色試薬とした BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA) で定量した。全ての化学薬品は可能な限り高品質の物を入手した。

4. 研究成果

(1) ウェスタンブロット分析

心臓、胸部大動脈および足底筋による懸濁液によるマンガン-SOD、銅・亜鉛-SOD、誘導型 NOS のウェスタンブロット分析では、5wk 群、15wk 群、25wk Cont 群、25wk Ex 群の間で明らかな差異を認めることはできなかった。これは発色法にける検出限界を超えていると認めざるを得ない。このため、ウェスタンブロット分析方法自体を検討する必要がある。まずは発光法の導入である。これには、ルミノメータが必要となるが、外部研究施設の協力を得て、導入を試みたい。さらに、ブロッキング剤、一次抗体、二次抗体などの試薬の見直し、転写方法の検討も必要になると思われる。加えて、ハウスキーピングプロテインとして、アクチンなどの分析も同時に行うことにより、分析の信憑性を高めたい。

(2) 3-NT 濃度の測定

3-NT 濃度の測定については、測定以前の懸濁液分画方法の改良を行っている。Yoshida ら (1996) によって述べられた懸濁後分画方法で 3-NT 濃度を測定した結果、P2 分画において運動トレーニングによる 3-NT 濃度の低下傾向が認められた。しかしながら、有意な

レベルには至っていなかった。その他の分画においては、群間の差異を同定できなかっただけで無く、測定結果の再現性に疑問が残るものとなった。今後は、分画方法の改良と、インキュベーションの条件設定を検討したい。

(3) 胸部大動脈内皮依存血管弛緩機能分析

胸部大動脈の内皮依存血管弛緩機能および物理的弾性を検討した結果、物理的弾性要素は、25wk Cont 群よりも 25wk Ex 群で高い傾向が認められた。しかしながら、胸部大動脈の部位による差がバイアスとなっていることも考えられることから、さらに分析精度を高める必要がある。また、リング作成の再現性も検討する必要と思われる。

(4) その他の分析方法

トレーニング効果の指標として分析した足底筋クエン酸合成酵素 (CS) 活性は、25wk Cont 群と比較して 25wk Ex 群で高い傾向が観察された。持久的運動トレーニングとして 25wk Ex 群が 10 週間行った自発運動トレーニングは、自発的なものであったが、トレーニング効果は認められると考えられる。

以上の様に、当初予定していた分析を研究期間中に十分遂行することができなかった。現段階では、研究の成果としては不十分であることを認識しつつ、今後も引き続き試料の分析を進めてゆきたい。

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 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等
<http://ris.toyo.ac.jp/profile/ja.cuIBA3.k6xN83EJrKDdoJg=.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 覚 (FURUKAWA, Satoshi)
東洋大学ライフデザイン学部・教授
研究者番号: 50307675

(2) 研究分担者 (0)

(3) 連携研究者 (0)