

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：22401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350623

研究課題名(和文) 虚血モデルマウスにおける血管新生や酸化ストレスから見た運動やビタミンC摂取の影響

研究課題名(英文) Influences of Exercise after Arterial Ligation on Oxidative Stress and Pro-angiogenic Factors - Using a Mouse Model of Lower limb Ischemia -

研究代表者

丸岡 弘 (Maruoka, Hiroshi)

埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授

研究者番号：80325985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は右大腿動脈結紮(結紮)により、運動やビタミンC(VC)が血管新生因子などにおよぼす影響を検討した。対象は野生型とVCノックアウトマウスを用い、無作為に区分した(結紮と運動の有無など)。結果、酸化ストレス度は1 week(1W)と3 weeks(3W)で結紮+運動有群がSham群と比較して有意な高値を認めた。PGC-1 とIL-6は結紮+運動有群がSham群と比較して有意な高値、endostatinでは有意な低値を認めた。このことから、酸化ストレス度の変化は1Wより認められ、HIF-1 では3Wにおいて高値になることが示された。また促進因子と抑制因子とのバランスが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study examined the influences of exercise after right femoral arterial ligation on pro-angiogenic factors. Wild-type or Vitamin C knock-out mice were randomized groups (based on the presence/absence of ligation). The oxidative stress level was significantly higher at 1 W and 3 W in the <ligation with exercise> compared to Sham group. HIF-1 values were significantly higher at 3 W in the <ligation with exercise> and <ligation without exercise> compared to Sham group. The values representing the pro-angiogenic factors PGC-1 and IL-6 were significantly higher and those representing the anti-angiogenic factor endostatin were markedly lower in the <ligation with exercise> compared to Sham group. In a mice model of lower-limb ischemia, changes in the oxidative stress level were observed from 1 W. An increased HIF-1 level was also observed at 3 W. In this study, the balance between pro- and anti-angiogenic factors was clarified during a 6-weeks exercise program.

研究分野：理学療法学

キーワード：血管新生因子 運動 虚血モデルマウス

### 1. 研究開始当初の背景

閉塞性動脈硬化症 (PAD) は予後不良の疾患であり、動脈硬化のリスク低減が推奨されている。特に、動脈硬化進展リスクの推測に重要である酸化ストレスは、動脈硬化を生じる誘因と動脈病変を結びつける共通のメカニズムとなっている。一般的に運動療法の効果は、骨格筋組織の酸素不足や虚血が誘因となり、毛細血管網の増生により虚血領域に血流が改善し、最大歩行距離の延長が認められる。しかし、運動療法による運動能力改善のメカニズムは立証されていない。そのため、血管新生に影響する運動刺激や酸化ストレスについては、虚血下肢モデルマウスを用い、多面的な機能連関の中で考える必要がある。一方、PAD に対する治療には、自家骨髄細胞移植による血管新生療法が実施されている。血管新生療法の際には、抗酸化作用のあるビタミン C (VC) や E などの摂取において発芽型の血管新生を抑制することが報告されている。また、高濃度 VC 摂取は VEGF を制御する HIF-1 の発現を抑制、結果的に血管新生を阻害することが報告されている。ヒトやサルは VC 合成の最後に位置する酵素 (GLO) に遺伝子変異があるため、体内で VC を合成できない。しかし、野生型マウスでは GLO に変異がないため、体内で VC の合成が可能である。そのため、野生型マウスを用いた検討では、VC が血管新生や酸化ストレスに影響をおよぼす可能性が考えられる。そこで、ヒトと同様、生体内で VC の生成ができない VC ノックアウトマウスを用い、虚血下肢モデルマウスによる血管新生などを検討する必要がある。

以上のことから、生体には酸素不足や虚血に反応して血管を新生させる反応が元来内在し、運動刺激や酸化ストレス、VC などの関与が考えられる。本研究では、この生理的反応を増強させうる運動療法の可能性について明らかにする。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究背景を踏まえ、虚血下肢モデルマウスに運動刺激やビタミン C 摂取を行うことにより、酸化ストレスと血管新生促進因子などの経時的な変化を明らかにすることを目的とした。特に、以下の点に関して検討を行った。

研究 : 動脈結紮後の運動刺激により酸化ストレスと血管新生因子などの経時的な変化に関する検討

研究 : 動脈結紮後の運動刺激とビタミン C 摂取の相互作用が酸化ストレスと血管新生因子などの経時的な変化におよぼす影響に関する検討

### 3. 研究の方法

研究 : 対象は野生型マウス (C57BL) 82 匹を用い、無作為に 9 群に区分した (結紮と運動の有無、運動期間の違いにより区分)。全群は 12 週齢から開始し、と殺を運動期間 1week (1W) : 13 週齢、3week (3W) : 15 週齢、6week (6W) : 18 週齢で実施した。運動は外科的処置 (処置) 2 日後より開始した。皮膚温はサーモグラフィーを用い、処置後 1 週間毎に測定した。血管新生因子はリアルタイム PCR 法により mRNA 発現量 (VEGF-a や HIF-1 など) の分析を行った。酸化ストレス度 (d-ROMs test) や 8-OHdG などは、フリーラジカル自動分析装置などにより分析を行った。

研究 : 対象は野生型マウス (C57BL) 21 匹と VC 合成不全マウス (SMP30/GNL) 23 匹を用い、運動や VC 摂取有無により区分した。全群は 12 週齢の時点で外科的処置 (右大腿動脈結紮) または切開のみ (Sham 群) を実施した。運動は処置 2 日後より開始し (期間 6 週間, 5 回/週)、と殺は 18 週齢の時点で行い腓腹筋外側頭内側を採取した。血管新生はリアルタイム PCR 法により mRNA 発現量 (VEGF, HIF1- $\beta$ , PGC1- $\alpha$ , IL6, FGF など) を分析した。

#### 4. 研究成果

研究 :

(1) 運動期間の違いによる影響 皮膚温は結紮により継時的に有意な低下を認めた。HIF-1 は3Wで結紮+運動有群、結紮+運動無群が Sham 群と比較して有意な高値を認めたが、VEGF-aなどは有意差を認めなかった。酸化ストレス度は1Wと3Wで結紮+運動有群が Sham 群と比較して有意な高値を認めたが、8-OHdGでは有意差を認めなかった。

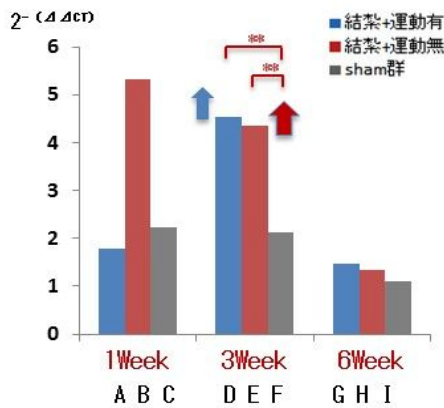


図 HIF-1 の変化

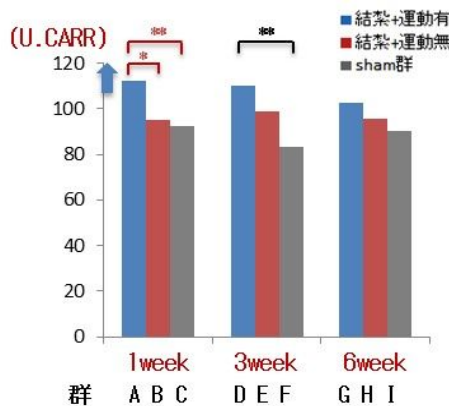


図 酸化ストレス度の変化

(2) 6Wにおける血管新生の検討 促進因子の PGC-1 と IL-6 は、結紮+運動有群が Sham 群と比較して有意な高値に対して、抑制因子の endostatin では有意な低値を認めた。

以上のことから、マウス下肢虚血モデルにおいては、酸化ストレス度の変化が1Wより認められ、HIF-1では3Wにおいて高値になることが示された。また、6Wの運動により毛細血管の促進因子と抑制因子とのバランスが明らかになった。

(3) 血管新生因子の pathway PGC は6W 結紮+運動有群が Sham 群と比較し、IL6では3W 結紮+運動有群が Sham 群と比較して有意な高値を認めた(遺伝子発現は2.6倍、4.3倍)。VC値は3W 結紮+運動有群と6W 結紮+運動有群が Sham 群と比較して有意な高値を認めた。Fis1等のミトコンドリアの fusion や fission などの因子は有意差を認めなかった。以上のことから、一般的に運動はPGCやIL6などの血管新生促進に影響することが報告されており、虚血モデルマウスにおいても同様な結果となった。また、運動によりVC値に高値を認めたが、PGCを介したミトコンドリアに関する pathway などに影響をおよぼさないことが示された。

研究 : 野生型: 結紮+運動有群は Sham 群と比較して PGC1 と IL6 が有意な高値を示した。VC合成不全: 結紮+運動有+VC 摂取有群は Sham 群と比較して IL6 と HIF1 が有意な低値、また結紮+運動無+VC 摂取無群と比較して FGF が有意な低値を示した。

以上のことから、一般的に運動は PGC1 や IL6 などの血管新生促進、VC 摂取では抑制に影響することが報告されている。今回、野生型は PGC1 などを介した血管新生に関するシグナル伝達の賦活化が考えられた。VC合成不全はVC 摂取により、PGC1 や FGF などの促進因子に影響をおよぼした可能性が考えられた。

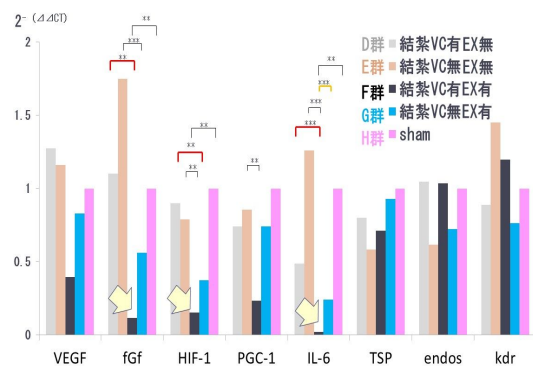


図 mRNA 発現量の違い (VC合成不全 Mice)

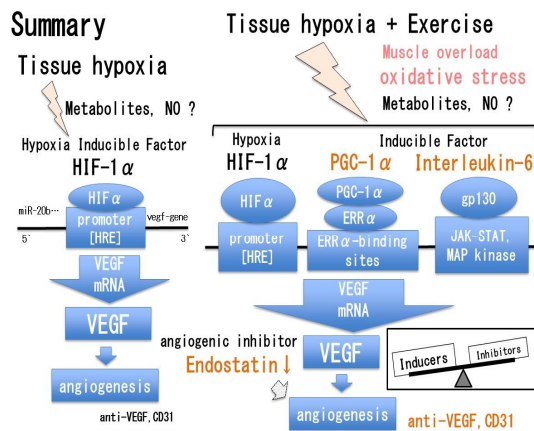


Fig. Influence of exercise on VEGF expression and angiogenesis.

## 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 1 件)

1) 松本純一, 金村尚彦, 村田健児, 石神昭人, 丸岡弘. マウス下肢虚血モデル作製が酸化ストレス防御系に及ぼす影響. 理学療法 - 臨床・教育・研究 (2015); 22:16-20

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 丸岡弘. 理学療法における酸化ストレスの有用性. 第 13 回酸化ストレス・抗酸化セミナー, 東京, 2015

2) 丸岡弘, 金村尚彦, 木戸聡史, 井上和久, 松本純一, 石神昭人, 関貴之, 金子幸輝. 虚血モデルマウスにおけるビタミン C 摂取が血管新生や酸化ストレスにおよぼす影響, 第 50 回日本理学療法学会大会, 2015

3) 丸岡弘, 金村尚彦, 国分貴徳, 田中健一, 村田健児, 松本純一, 善田聡史, 石神昭人. 虚血モデルマウスにおける血管新生から見た運動やビタミン C 摂取の影響. 第 22 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会, 2016

4) 丸岡弘, 金村尚彦, 田中健一, 林弘之, 善田聡史, 小川明宏, 石神昭人. 虚血モデルマウスにおける血管新生やミトコンドリアから見た運動の影響. 第 23 回日本心臓リハビリテーション学会学術集会, 2017

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸岡 弘 (Hiroshi Maruoka)  
 埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授  
 研究者番号 : 80325985

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石神 昭人 (Akihito Ishigami)  
 東京都健康長寿医療センター研究所・老化制御研究チーム分子老化制御・研究副部長  
 研究者番号 : 50270658

金村 尚彦 (Naohiko Kanemura)  
 埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授  
 研究者番号 : 20379895

田中 健一 (Kenichi Tanaka)  
 埼玉県立大学・保健医療福祉学部・准教授  
 研究者番号 : 20281313

(4) 研究協力者

松本純一 (Jyunichi Matumoto)  
 春日部中央総合病院  
 研究者番号 : -