

機関番号：35303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20500588

研究課題名 (和文) 高血圧発症モデルにおける運動の脳神経系への影響に関する研究

研究課題名 (英文) The effects of exercise-induced stress on the brains of spontaneously hypertensive rats

研究代表者

宮本 修 (MIYAMOTO OSAMU)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00253287

研究成果の概要 (和文)：高血圧発症モデルラット (SHR) を用いて、高強度の運動が脳にどのような影響を与えるかについて検討した。3 週間の運動により海馬神経細胞にダークニューロンが出現した。これは脳内に酸化ストレスが生じたためと考えられた。ダークニューロンは正常血圧ラットでは出現せず、SHR はストレスに対して正常動物より脆弱であると思われた。この脳細胞障害は抗酸化作用をもつエイコサペンタエン酸の投与により予防することができた。

研究成果の概要 (英文)：The effects of hard exercise on the brains were investigated using spontaneously hypertensive rats (SHR). The dark neurons appeared in the hippocampus in SHR after 3-wk exercise, but not in normotensive rats. Protein carbonylation were observed in the SHR brains and the appearance of dark neurons was inhibited by administration of eicosapentaenoic acid. These results suggest that the exercise-induced oxidative stress damages brain and SHR is vulnerable to oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 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：神経生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：ダークニューロン、海馬、高血圧発症モデルラット、運動ストレス、酸化障害、エイコサペンタエン酸

1. 研究開始当初の背景

平成 12 年度より、21 世紀における国民健康づくり運動 (健康日本 21) が開始された。さらに健康日本 21 を基本理念として平成 16 年より健康フロンティア戦略が策定され、予防を重視した健康づくりが国民運動として展開されている。疾病予防・健康増進の大きな柱として栄養・食生活と共に身体活動・運動が挙げられており、生活習慣病やメタボリック症候群の低減が健康日本 21 の目標

となっている。しかしながら、運動は良い面だけではなく、その実施法によっては活性酸素の産生亢進に伴う組織障害の可能性が報告されている。一方、生活習慣病の一つである高血圧症は、外来受療率が単一疾患としては最も多く (平成 17 年統計 504 人/人口 10 万対)、また、脳血管障害や虚血性心疾患の最も重要なリスクファクターである。高血圧症の予防・治療法の中で、運動療法は最初に実施されるべき基本的な治療法として位置

づけられている。運動が循環器系や筋骨格系に及ぼす影響については多くの報告があるが、脳神経系にどのような影響を及ぼすかについてはほとんど報告されていない。以上のことから、高血圧症患者に長期間の運動を行わせた場合に、脳神経系にどのような影響が生じるかについては早急に明らかにすべき問題であると思われる。

2. 研究の目的

本研究は、高血圧発症モデル動物を用いて、長期間の激しい運動が高血圧脳にどのような障害を与えるかについて、組織学的、生理学的に検討し、その機序を明らかにして運動による脳障害の予防法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 運動による脳障害の組織学的検討

我々のこれまでの研究から、運動による脳障害は特に海馬で発生しやすいことから（日本生理学会誌，64巻，p152，2002）、海馬組織を中心に検討した。高血圧自然発症ラット（SHR，10週齢♂）とその対照ラット（WKY，10週齢，♂）を、それぞれ運動群と非運動群に分けた。運動群では高強度の運動を3週間継続した（30 m/min x 30 min/日）。但し、最初の1週間はラットを運動に慣らすために10 m/minの速さから徐々に速度を上げていき、5日目に所定の速度で運動させた。運動期間終了後、灌流固定して脳を取り出し、凍結切片を作製した。ヘマトキシリン(HE)染色や微小管関連タンパク質（MAP-2）に対する抗体による免疫染色などを行い、神経細胞や脳血管の障害について検討した。神経細胞死の有無については、TUNEL染色やFluoro-Jade B染色にて観察した。さらに、細胞新生の指標であるブロモデオキシウリジン（BrdU）を投与し（50mg/kg）、BrdU抗体による免疫染色を行った。加えて、機能をみるために、運動群と非運動群について4日間のモリス水迷路試験を行った。

(2) 機序の検討

基礎データとして、運動前後における体重、エサ摂取量、血中乳酸値、血中ACTH、コルチコステロン、アドレナリン、心拍数、血圧などの生理学的指標を測定した。さらに、脳内の酸化ストレスについての検討を行うために、上記と同様の条件で作製したラットの海馬を切片に対して、カルボニル化タンパク質の免疫染色（コスモバイオ）を行った。

(3) 脳障害の予防法の検討

SHRラットの運動群の中で、抗酸化作用を持つ薬剤であるエイコサペンタエン酸（EPA、160mg/kg、経口）を1日おきに投与した群を作製し、海馬神経細胞障害の有無について調べた。

4. 研究成果

(1) エサ摂取量、体重、血圧の変化

図1～3に各群のエサ摂取量、体重、血圧の変化を示す。なお血圧は尾動脈カフプローブ法により非観血的に測定した。エサ摂取量は運動期間中すべての群で1日当たり16～20gで推移し、有意な差は見られなかった。一方、体重はSHR群ではWKY群よりも30～50g少なかったが、各群とも運動群と非運動群とで有意な差はなかった。血圧についてもSHRはWKYよりも50 mmHg程度高いがそれぞれの群とも運動による差は生じなかった。

(2) 組織学的検討

図4にHE染色とカルボニル化タンパク質の免疫染色結果を示す。SHRの運動群においてその30%（10匹中3匹）に海馬のCA1やCA3領域に細胞体が萎縮変形した、いわゆるダークニューロンが出現していた（図4-b矢印）。このダークニューロンはTUNEL染色やFluoro-jade B染色では陽性に染色されなかったが、MAP-2の染色性が低下していた。一方、WKYラットについては運動、非運動群ともダークニューロンは見られなかった。また、カルボニル化タンパク質染色ではSHR、WKYとも運動群の染色性が非運動群よりも増加していた（図4-c, d）。さらに細胞新生の指標であるBrdUの陽性細胞の数に有意差は認められなかった。

(3) 乳酸、ストレスホルモン

運動前後の血中乳酸値を図5に示す。運動によって、SHRでは3倍に、WKYでは4倍程度それぞれ上昇した。図6は運動直後の血清ACTHを示している。SHR、WKYとも運動により2～3倍に増加していた。また、コルチゾールとアドレナリンも同様の傾向を示していた。以上のことは、乳酸閾値を超えるような激しい運動によって、SHRとWKYの両群が同様に強いストレスを受けていたと示している。

(4) 水迷路試験

水迷路試験結果を図7に示す。図の縦軸はプラットフォームへ逃れるまでの時間を示しており、この値が小さいほど学習機能が良いことを示している。ダークニューロンが出現したSHR運動群がむしろ良い傾向を示したが各群間において有意な差はなかった。

(5) EPA投与

運動期間中にEPAを投与したSHR運動群の海馬においては、ダークニューロンはまったく出現しなかった（n=5）。

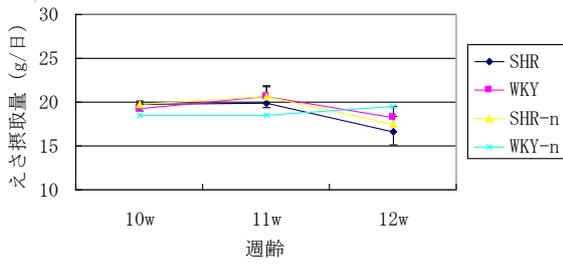


図1 エサ摂取量
SHR、WKY：運動群
SHR-n、WKY-n：非運動群

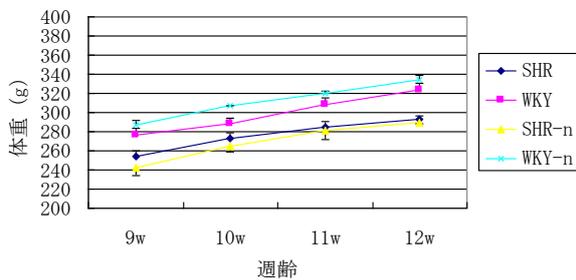


図2 体重

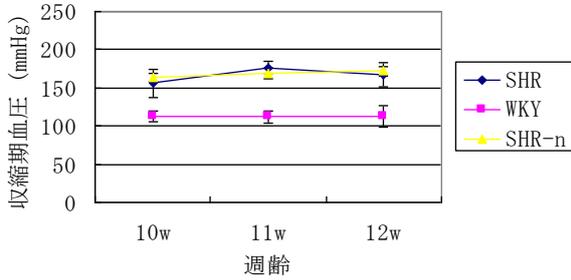


図3 血圧

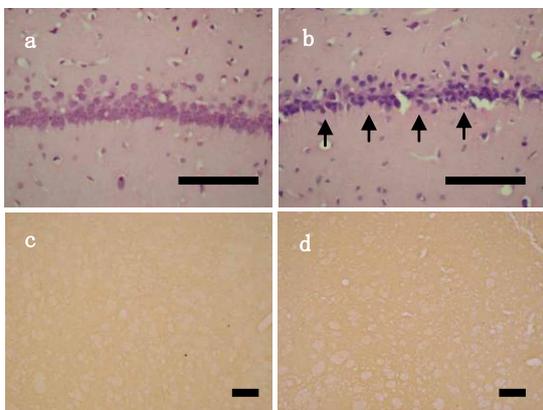


図4. HE (a, b、海馬 CA1) とカルボニル化タンパク染色 (c, d、線条体)、a, c:SHR 非運動群、

b, d: SHR 運動群、スケールバー：100 μ m

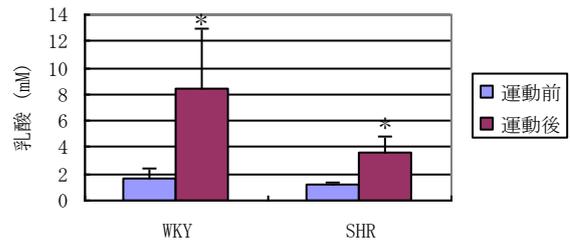


図5. 運動前後における乳酸値
*：運動前と有意差有り

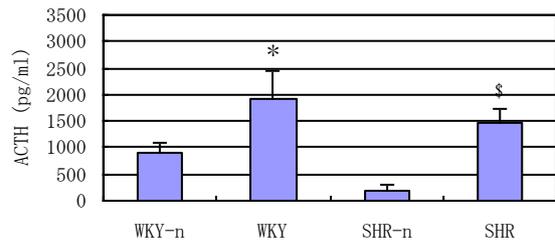


図6. ACTH

*：WKY-n と有意差有り
\$：SHR-n と有意差有り

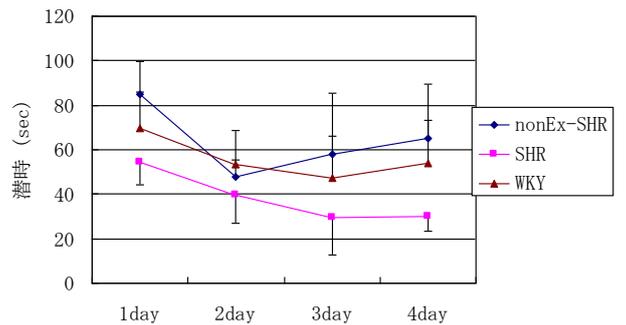


図7. 水迷路試験

5. 考察

乳酸閾値を超えるような激しい運動を長期間続けることによって、高血圧発症ラットの海馬神経細胞にダークニューロンが出現した。ダークニューロンは虚血や低血糖のような強いストレスを脳が受けた際に出現し、神経細胞のダメージを示すと考えられている。しかし、このダークニューロンは細胞死を示す TUNEL や Fluoro-Jade B 染色で陽性にならなかったことから、細胞死までは至っていないと考えられる。さらに、今回の運動ストレスは海馬細胞の新生に影響を与えていなかった。これらのことが、運動群において水迷路試験による学習機能の低下が見られなかった理由と思われる。ただ、MAP-2 染色性は低下しており、細胞レベルでの障害は起こっていると考えられ、さらに激しい長期の

運動ストレスを与えた場合は海馬神経細胞の死に至るのではないかと予想される。また、同程度のストレスを受けた正常血圧ラットにはダークニューロンの出現が見られなかったことから、高血圧発症ラットの脳はストレスに対してより脆弱であると考えられる。運動ストレスによる細胞障害の機序として酸化障害が考えられ、抗酸化作用をもつ EPA は運動療法中の高血圧症患者の脳細胞障害予防薬として有用であると思われる。

6. 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 4 件)

- ① Nakamura T, Tanaka S, Hirooka K, Toyoshima T, Kawai N, Tamiya T, Shiraga F, Tokuda M, Keep R, Itano T, Miyamoto O, Anti-oxidative effects of D-allose, a rare sugar, on ischemia-reperfusion damage following focal cerebral ischemia in rat, *Neurosci lett*, 査読有、Vol. 487, 2011, 103-106
- ② Tanaka S, Nakamura T, Sumitani K, Takahashi F, Konishi R, Itano T, Miyamoto O, Stage- and region-specific cyclooxygenase expression and effects of a selective COX-1 inhibitor in the mouse amygdala kindling model, *Neurosci Res*, 査読有、Vol. 65, 2009, 79-87
- ③ 宮本修、運動による脳虚血耐性獲得とその機序の解明、両備てい園記念財団試験研究論叢、査読無、Vol. 24、2009、115-121
- ④ Nakamura T, Miyamoto O, Toyoshima T, Hirooka K, Kawai N, Shiraga F, Tamiya T, Xi G, Keep R, Itano T, 3CB2, a marker of radial glia, expression after experimental intracerebral hemorrhage: role of thrombin, *Brain Res*, 査読有、Vol. 1226, 2008, 156-162

[学会発表] (計 7 件)

- ① 氷見直之、高橋尚、古我知成、丸山恵美、国安勝司、宮本修、脳梗塞後の短期間運動が認知機能の回復に及ぼす効果、第 65 回日本体力医学会、2010 年 9 月 16 日、市川市
- ② 板野俊文、中川利孝、田中眞司、中村丈洋、豊島哲彦、宮本修、キンドリングマウスにおける NG2 細胞の形態的变化について、第 87 回日本生理学会、2010 年 5 月 20 日、盛岡市
- ③ 氷見直之、高橋尚、中村恵美、国安勝司、成田和彦、古我知成、宮本修、マイクロスフェア注入による脳梗塞ラットに対する運動の初期効果、第 87 回日本生理学会、

2010 年 5 月 19 日、盛岡市

- ④ 高橋尚、氷見直之、国安勝司、宮本修、古我知成、マイクロスフェア注入による脳梗塞がトレッドミル走行時の乳酸性閾値に及ぼす影響、第 87 回日本生理学会、2010 年 5 月 19 日、盛岡市
- ⑤ Miyamoto O, Tanaka S, Nakamura T, Konishi R, Itano T, Stage- and region-specific cyclooxygenase expression and effects of a selective COX-1 inhibitor in the mouse amygdala kindling model, International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 8 月 1 日、kyoto
- ⑥ Nakamura T, Okabe N, Lu F, Kuroda Y, Tamiya T, Miyamoto O, Itano T, Delayed protease inhibitor treatment reduces brain damage after intracerebral hemorrhage in rat, International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 8 月 1 日、Kyoto
- ⑦ 住谷和則、中村丈洋、山神眞一、宮本賢作、宮本修、ラット脳出血モデルにおける運動によるプレコンディショニングの効果、第 63 回日本体力医学会、2008 年 9 月 18 日、別府市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 修 (MIYAMOTO OSAMU)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：00253287

(2) 研究分担者

住谷 和則 (SUMITANI KAZUNORI)
香川大学・医学部・教務職員
研究者番号：40294772