

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500772

研究課題名(和文)脳虚血障害後の運動療法による内皮幹細胞活性化の基礎的検討

研究課題名(英文)A basic study of mobilization of endothelial progenitor cells of bone marrow origin by physical training state after cerebral ischemia

研究代表者

南條 博(NANJO, Hiroshi)

秋田大学・医学部・准教授

研究者番号：70250892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：脳虚血障害の早期回復を目的として、運動療法による内皮幹細胞の動態を骨髄キメラマウス脳虚血障害モデルで検討し、以下の知見を得た。1)血液脳関門に骨髄由来血管内皮細胞および樹状細胞が動員されている。2)狭窄部近傍頸動脈に骨髄由来血管内皮細胞、樹状細胞、平滑筋細胞が動員されている。3)上行大動脈起始部と大動脈弁に骨髄由来血管内皮細胞を、大動脈全体に骨髄由来樹状細胞を認める。以上、骨髄由来内皮幹細胞と循環動態との密接な関連が示唆されたが、運動療法による確たる脳虚血障害改善効果を証明するには至らなかった。脳内に元来存在する内皮幹細胞の動態の解析が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：A correlation between mobilization of endothelial progenitor cells of bone marrow origin and physical training state after cerebral ischemia were studied using bone-marrow-transplanted chimeric mice. The results were as follows. 1) Endothelial and dendritic cells of bone marrow origin were seen at the blood-brain barrier. 2) Endothelial, dendritic, and smooth muscle cells of bone marrow origin were seen at the stenotic carotid artery. 3) Endothelial cell of bone marrow origin was seen at the orifice of the ascending aorta and aortic valve. Many dendritic cells of bone marrow origin were seen at the aorta. But, a distinct mobilization of endothelial progenitor cells of bone marrow origin by physical training state after cerebral ischemia could not be clearly confirmed in this study.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ科学

キーワード：内皮細胞 内皮幹細胞 樹状細胞 脳虚血障害 運動療法 骨髄キメラ 脳血液脳関門 血管新生

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞、脳出血、心筋梗塞等、循環器系致死疾患の主因となる動脈硬化症や動脈瘤の本態についてはいまだ不明である。欧米諸国を中心に研究されてきた脂質代謝異常、特に高コレステロール血症が粥状動脈硬化の主因であるとされ、様々な抗コレステロール薬投与による治療が臨床の場で広く行われている。最近ではメタボリックシンドロームという概念が浸透してきている。しかし、特に日本では高コレステロール血症や高血圧がなくとも動脈硬化症が進行している多くの患者が存在する。さらに、抗コレステロール薬投与により逆に脳梗塞の発症率を高める場合があることが判明、最近では高血圧や高コレステロール血症の基準値が修正されるなど、高血圧、高コレステロール血症の概念、病態、治療そのものの信頼性が揺らいでおり、早急に動脈硬化症の本態を明らかにする必要がある。さらに、動脈硬化症を防ぐ方法として適度な運動(トレーニング)が推奨されているが、そのメカニズムに対する明確な答えはいまだない。

成体には幹細胞が存在し、血管内皮前駆細胞が血液中に存在することが判明し(Asahara T, et al., Science 275: 964-967, 1997)、胚における血球発生において内皮細胞からBリンパ球が生じることが証明され(Nishikawa S, et al., Immunol. rev.175:112-119,2000)、内皮幹細胞のより多能的あるいは祖先的な能力が注目されている。我々は血管内皮細胞の血流感知機能、血流に対するリモデリング機能を明らかにし(Nanjo H, Sho E, et al., Exp Mol Pathol. 80:38-45,2006. Sho E, Nanjo H, Masuda H, et al., J Vasc Surg. 41: 844-852,2005. Sho E, Nanjo H, et al., J Vasc Surg. 39:601-612,2004. Sho E, Nanjo H, et al., Exp Mol Pathol.75:1-11, 2003, Ebina T, Nanjo H, et al., Pathol Int 52: 702-712,2002)、大動脈瘤モデルにおいてCD34陽性細胞の局在と分化が血流制御に密接に関連することを証明してきた(Sho E, Nanjo H, et al., J Vasc Surg 41(5): 844-852, 2005. Sho E, Nanjo H, et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20:1916-1921, 2004)。さらに骨髄キメラマウスで全身諸臓器の血管に骨髄由来内皮幹細胞が動員されることを確認し、最近の研究で骨髄由来内皮幹細胞とともに骨髄由来樹状突起細胞が脳血液関門および脳実質に動員されるという事象を捉えつつある。

そこで今回我々は脳梗塞を念頭においた脳虚血障害の早期回復を目的とし、適度な運動療法による内皮幹細胞の活性化と脳内毛細血管および脳実質への動員を証明し、脳虚血障害改善効果を明らかにする基礎的研究を遂行したいという着想に至った。本研究はいままで国内外でほとんど行われていない、これからの血管生物学、脳血管学、リハビリテーション学の目指す方向性を融合した、独創的なものである。脳虚血障害の改善に有効

とされている適度な運動負荷の基盤的な意義を、内皮幹細胞の動員と脳内の毛細血管の活性化という視点から明らかにし、新しい治療法、リハビリテーション法の開発研究に寄与したいと考えた。

### 2. 研究の目的

脳虚血障害後の早期回復を目的とし、運動負荷により血管幹細胞を活性化させ、脳内の毛細血管に多量に動員し、脳血流改善効果を成体で明らかにする基礎的な研究を着想した。具体的には成体の骨髄キメラマウスを用い、片側内頸動脈を閉塞させる脳虚血障害モデルを用いる。障害後に早期から適度な運動を負荷し、活性化された血管幹細胞が血液脳関門に多量に動員され、これらが脳血管壁で内皮細胞、周皮細胞、樹状細胞に分化、増殖し、脳の毛細血管を活性化し、脳虚血障害改善の主役であることを、病理形態学的解析により解明することを意図した。

### 3. 研究の方法

骨髄キメラマウスを作製し、移植後12ヶ月のマウスを用いた脳虚血障害モデルを作製、およびトレッドミルによる運動負荷モデルを作製した。

1) 骨髄キメラマウスの作製: ドナーとしてC57BL/6J-Tg(CAG-EGFP)トランスジェニックマウス(GFPマウス)(Okabe M. et al.: FEBS Lett. 407,313-319.1997)を、レシピエントとしてC57BL/6Jワイルドタイプマウスを用いた。レシピエントである5-6週齢の雄C57BL/6Jマウスに900radのX線照射を施し(X線照射装置:M-100WE, SOFTEX, JAPAN、銅フィルター0.1mm、10mA、100kVp、53分間照射)、6時間以内にネフタール過量投与で屠殺したトナーの雄GFPマウスの左右の大腿骨から骨髄細胞を採取した。回収した骨髄細胞をレシピエントマウスの尾静脈から移入し(1.5x10<sup>7</sup>個/0.3ml RPMI1640 medium)、骨髄キメラマウスを90匹作製した。

2) 脳虚血モデルの作製: 片側内頸動脈を閉塞させ作製した。移植後12ヶ月の骨髄キメラマウスをネフタールで麻酔し、手術用顕微鏡下において片側内頸動脈を露出、結紮系で閉塞させ、脳虚血障害モデルを作製した。

3) トレッドミル運動負荷モデルの作製: 脳虚血障害モデル作製翌日に、マウスの健康状態を確認してからトレッドミル運動負荷を開始、運動負荷は比較的軽めとした。5m/分の速度で10分間の予備運動後10分間休憩させ、20m/分の速度で1日30分間運動をさせた。負荷は1週間とし、トレッドミル運動負荷直後に屠殺し、負荷を課さない脳虚血モデルを手術コントロール群とした。また、脳虚血手術を施さないものを非手術コントロール群としたが、これまでの研究ですでに作製済みであるのでそれを使用して解析した。

4) 組織標本作製: マウスは屠殺1時間前に、BrdU(プロモデオキシウリジン:0.05mg/g の

生理食塩溶液)を腹腔内に投与し、ネンブタール過量投与で屠殺する。4%パラホルムアルデヒド液で大動脈灌流固定後、脳、心臓、大動脈、頸動脈、諸臓器を摘出し、凍結およびパラフィン組織ブロックを作製した。パラフィン組織標本はヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

5) 免疫組織学的検討: CD34、CD11c、およびGFPに対する抗体を用いて骨髄由来の内皮細胞、樹状突起細胞の出現パターンおよび出現率を検討した。また、BrdU(S期の細胞核マーカー)に対する抗体を用い、細胞活性化の度合いを検討した。なお凍結切片は蛍光免疫染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

得られた主な知見は以下の通りである。

1) 血液脳関門に骨髄由来血管内皮細胞と骨髄由来血管樹状細胞が動員されている。

2) 狭窄部頸動脈に骨髄由来血管内皮細胞、骨髄由来血管樹状細胞、骨髄由来平滑筋細胞が動員されている。

3) 上行大動脈起始部と大動脈弁に骨髄由来血管内皮細胞を認める。大動脈全体に多数の骨髄由来血管樹状細胞を認め、特に肋間動脈分岐部周囲に多い。

以上、骨髄由来内皮幹細胞と全身諸臓器の循環動態との密接な関連が示唆された。しかし、今回、運動療法による骨髄由来内皮幹細胞の確たる脳虚血障害改善効果を証明するには至らなかった。原因のひとつとして、脳内の血管に元来存在する内皮幹細胞の動態にも着目する必要性が考えられ、今後研究を進める予定である。

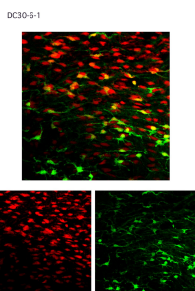


図1 骨髄由来血管樹状細胞

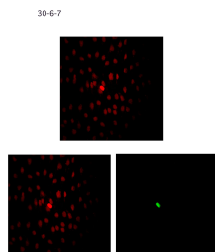


図2 骨髄由来血管内皮細胞

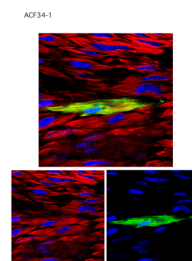


図3 骨髄由来血管平滑筋細胞

#### 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)

吉田誠, 南條博, 庄永傑, 川村公一, 後藤明輝, 増田弘毅, 電子顕微鏡から読み解く心血管リモデリング, 病理と臨床, 査読有, Vol. 32, No. 1, 2014, pp85-90, <http://www.medicalonline.jp/>

〔学会発表〕(計 5 件)

伊藤行信, 吉田誠, 高橋正人, 南條博, 川村公一, 後藤明輝. 静脈への動脈パッチ移植することにより発生した新生血管の研究, 第102回日本病理学会総会, 2013年6月6日~8日, 札幌

高橋正人, 吉田誠, 伊藤行信, 川村公一, 南條博, 増田弘毅, 後藤明輝. 動静脈吻合後の静脈狭窄に関する実験病理学的検討, 第102回日本病理学会総会, 2013年6月6日~8日, 札幌

南條博, 小林実貴夫, 吉成由樹, 廣嶋優子, 高橋正人, 川村公一, 吉田誠, 後藤明輝, 増田弘毅. Mobilization of endothelial cells and vascular dendritic cells of bone marrow origin in the organs, 第101回日本病理学会総会, 2012年4月26日~28日, 東京

南條博, 小林実貴夫, 吉成由樹, 高橋正人, 廣嶋優子, 川村公一, 増田弘毅. Distribution of vascular dendritic cells of bone marrow origin at the non-atherosclerotic aorta in mice, 第100回日本病理学会総会, 2011年4月28日~30日, 横浜

高橋正人, 小林実貴夫, 廣嶋優子, 川村公一, 南條博, 杉山達朗, 増田弘毅. 大動脈内皮細胞のターンオーバーは、一過性増殖によって行われている, 第100回日本病理学会総会, 2011年4月28日~30日, 横浜

〔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

南條 博 (NANJO, Hiroshi)  
秋田大学・医学部・准教授  
研究者番号：70250892

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：