

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591232

研究課題名(和文) 高血圧の中樞性機序における骨髄由来細胞の役割の検討

研究課題名(英文) Role of bone marrow-derived cells in the brain on neurogenic hypertension

研究代表者

山里 正演 (YAMAZATO, Masanobu)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90347138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：中樞性機序による高血圧のモデルとしてアンジオテンシンII (Ang II)持続投与ラットを用いた。骨髄由来細胞を脳室内自家移植し、血圧と交感神経活動を評価した。Ang II持続投与でラットの血圧は有意に上昇し、神経節遮断薬投与による血圧降下度は増大した。骨髄由来細胞の脳室内自家移植で、両変化は抑制された。さらにAng II持続投与による脳内AT1受容体とTGF- β の発現増加は骨髄由来細胞の脳室内自家移植で抑制された。以上より脳内骨髄由来細胞はAng IIによる脳内レニン-アンジオテンシン系の亢進と炎症をおさえ、交感神経活動亢進と血圧上昇を抑制する可能性を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Role of bone marrow-derived cells (BMCs) in the brain on development of neurogenic hypertension have not been elucidated. We hypothesized that BMCs in the brain would attenuate inflammation and modulate overactive renin-angiotensin system in the brain of Ang II initiated neurogenic hypertensive rats. Seven days following initiation of vehicle or Ang II infusions, rats received intracerebroventricular (icv) administration of either serum free medium or autologous BMCs. Ang II infusion significantly increased resting blood pressure and peak depressor responses and the both changes was significantly attenuated by icv administration of BMCs. Furthermore, icv administration of BMCs attenuated Ang II induced increase in AT1 receptor and TGF- β expression in the brain. These results suggested that BMCs in the brain may have protective role against sympathetic overactivation caused by chronic Ang II infusions through modulating AT1 receptor expression and inflammation.

研究分野：高血圧学

キーワード：高血圧 中樞性血圧調節 アンジオテンシンII持続投与高血圧 骨髄由来間葉系幹細胞 脳室内投与

1. 研究開始当初の背景

(1) 末梢血中の骨髄由来細胞数は心血管病患者で減少している

骨髄に組織修復能を有する細胞が存在する。骨髄由来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。骨髄由来内皮前駆細胞(EPC)はその一つである。心血管病患者では末梢血中の EPC 数が少ないことが報告されている。一方、重症虚血肢への自家骨髄由来細胞の移植は虚血の症状を長期にわたり改善させる。これらの報告は心血管病の発症・進展に骨髄由来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。

(2) 骨髄由来細胞は障害部位を認識し脳内へ移行する

骨髄由来細胞は脳内へ移行し、障害部位に主に分布することが報告されている。剖検例の検討において、異性間骨髄移植を受けた患者の脳内に、ドナー由来の神経細胞、星状細胞、ミクログリアを認めた。このことは、骨髄由来細胞が血液脳関門を通過することを示唆する。また、脳梗塞ラットへ骨髄由来細胞を静脈内投与した報告では、同細胞は脳の虚血側へ主に分布し、ラットの運動機能を改善させた。これらの報告は骨髄由来細胞が脳内修復に関与する可能性を示唆する。

(3) 高血圧の中枢性機序と脳内レニン-アンジオテンシン系(RAS)と酸化ストレスの亢進、脳内低灌流

高血圧自然発症ラット(SHR)の脳では毛細血管密度が低下していることが報告されている。すなわち SHR の脳内血圧調節領域における低灌流の存在が示唆されている。脳内 RAS 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す。また、RAS の亢進は酸化ストレスを増やす。一方、脳内の RAS の抑制因子の減少も高血圧の病態に関与している。高血圧動物の脳では RAS の抑制因子であるアンジオテンシン変換酵素 2(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。すなわち、高血圧の中枢性機序として脳内 RAS と酸化ストレスの亢進、内皮障害/低灌流、これらに伴う交感神経活動の亢進が重要である。

しかしながら、これら高血圧の中枢性機序における骨髄由来細胞の役割を明らかにした研究はいまだない。

我々のこれまでの検討では、脳卒中易発症高血圧自然発症ラットへの骨髄由来細胞の脳室内自家移植は血圧を変えなかった。しかしながら、骨髄由来細胞は RAS の抑制因子の ACE2 を多く発現し、移植した細胞が脳に長期にわたり生着することがわかった。骨髄由来細胞は生着局所の内皮の修復に加え、局所の RAS を調節しうる可能性が考えられ、以下の仮説を考えるに至った。

2. 研究の目的

「脳への骨髄由来細胞の分布不全が脳内 RAS および酸化ストレスの抑制不全を引き起こし中枢性機序として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) 培養骨髄由来細胞の性質：ラット骨髄液を採取し赤血球を除去後に 10% FBS を含む培養液(DMEM)で細胞培養を行った。初回の培養液交換時に浮遊細胞は除去し培養皿に接着した細胞を 3 週間培養した。培養期間に 3 回の継代を行った。10⁶ 個以上に増えた骨髄由来細胞を用い、免疫染色、フローサイトメトリー、BrdU 取り込み解析、Western blot を行った。

(2) 脳室内自家移植した骨髄由来細胞の脳内分布と形態：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。

(3) 脳室内自家移植実験：6 週齢の Sprague-Dawley ラットより骨髄液を採取し骨髄由来細胞を 3 週間培養した。8 週齢よりアンジオテンシン II (Ang II)または対照として生理食塩水を皮下に埋め込んだ浸透圧ミニポンプで持続投与を開始した。持続投与開始 1 週後に DiI 標識骨髄由来細胞または対照として血清を含まない培養液を脳室内へ投与した。持続投与開始 3 週間までは Tail cuff 法で収縮期血圧を測定した。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安静時の平均血圧(MAP)、心拍数(HR)を無麻酔・無拘束下で測定した。その測定の最後に神経節遮断薬のヘキサメソニウム(C6)を静注し、血圧降下度より交感神経活動を評価した。

(4) 脳内炎症関連蛋白および RAS 関連蛋白の発現：上記生理実験終了後にラットの脳を摘出し、Ang II 持続投与ラットの延髄および前脳ブロックにおける炎症関連サイトカイン(TGF- β 、IL-10)と AT1 受容体の蛋白発現を Western blot で解析し、脳脊髄液と脳組織中のアンジオテンシン 1-7(Ang 1-7)濃度を ELISA キット(Cusabio Biotech)で測定した。また、末梢 Ang II の脳へのアクセス部位である脳弓下器官(SFO)の AT1 受容体の免疫染色強度を評価した。

4. 研究成果

使用した骨髄由来細胞の特徴：培養骨髄由来細胞は紡錘状の形態をし、CD29 が陽性であった(図 1)。フローサイトメトリーでは CD29 陽性 CD34 陰性細胞の割合は 38%であった。

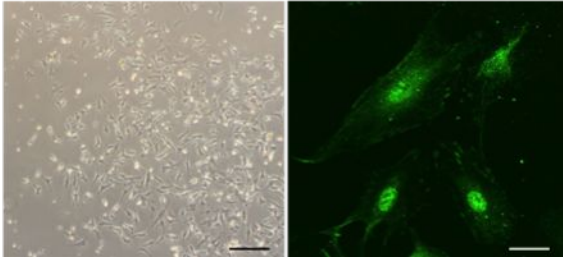


図 1

また骨髄由来細胞は培養内皮細胞に比べ ACE の発現は 87%少なく、アンジオテンシン変換酵素(ACE)2 の発現が 147%多かった(図 2)。

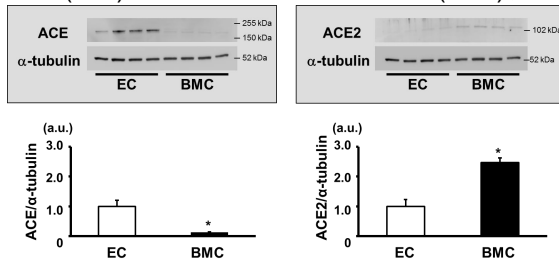


図 2

さらに骨髄由来細胞の培養上清は培養内皮細胞の BrdU の取り込みを 52%増やした(図 3)。

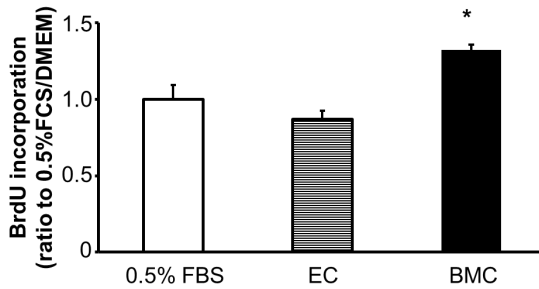


図 3

以上より使用した骨髄由来細胞は間葉系幹細胞を含み、傍分泌能を有し、RAS に対し抑制的に働く可能性が考えられた。

注入した細胞の局在と形態：DiI 陽性細胞は注入 4 週後でも確認できた。脳室内投与では脈絡叢、脳室周囲に DiI 陽性細胞を認めた(図 4)。DiI 陽性細胞は付着周囲の細胞と形態が異なり、小型、円形で核を有していた。

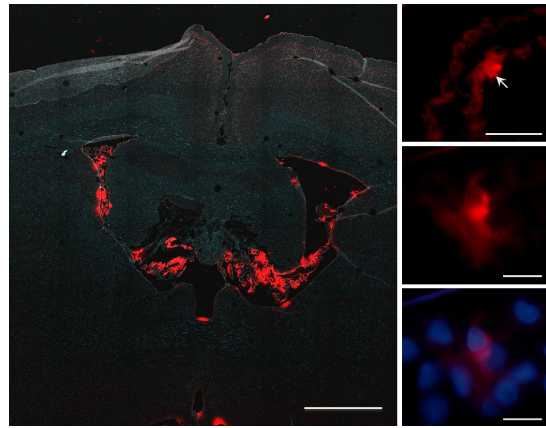


図 4

脳室内自家移植実験：Ang II 持続投与とラットの安静時の血圧は対照液の持続投与を受けたラットに比べ有意に高く、神経節遮断薬投与時の血圧降下度が増加した。これら Ang II による血圧上昇と節遮断薬投与時の血圧降下度の増大は、骨髄由来細胞の脳室内自家移植で有意に抑制された(図 5)。

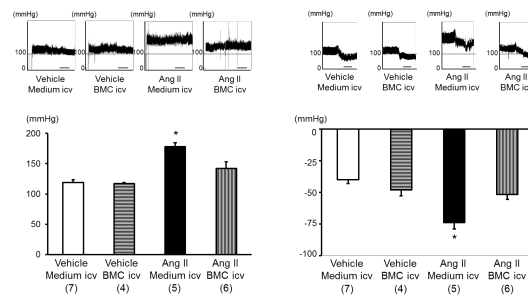


図 5

脳内炎症関連蛋白および RAS 関連蛋白の発現：

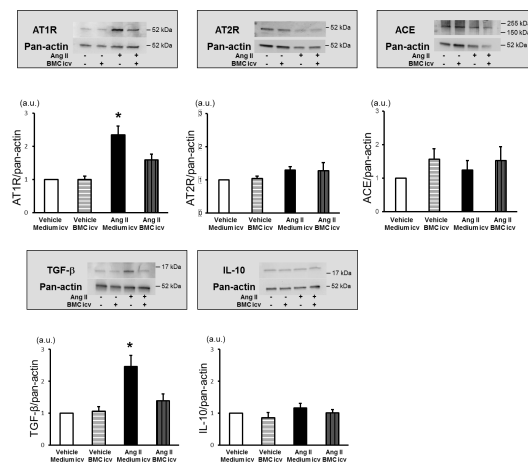


図 6

Ang II 持続投与ラットの延髄および前脳では、Ang II 持続投与で AT1 受容体および TGF-β の蛋白発現がそれぞれ 135%、146%増加し骨髄由来細胞の脳室内自家移植でその増加は 59%、39%へ抑制されていた(図 6)。IL-10

の蛋白発現の変化は認めなかった。骨髄由来細胞の培養上清および脳脊髄液、脳組織における Ang 1-7 の濃度測定を試みたが、いずれの検体においても検出感度(18.75 pg/ml)に達していなかった。

また、末梢の Ang II のシグナルを脳内へ伝える入り口とされる SFO において、AT1 受容体の発現強度を調べた。Ang II 持続投与で AT1 受容体の発現強度は増加し骨髄由来細胞の脳室内自家移植でその増加は抑制されていた(図 7)。

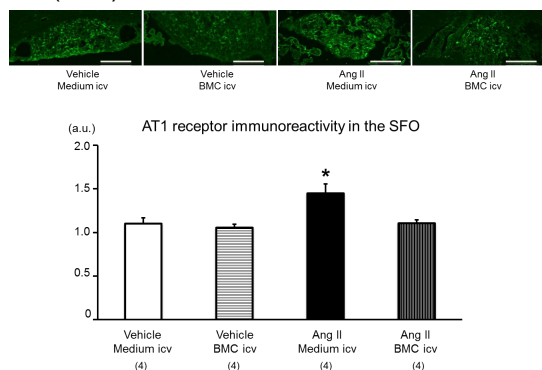


図 7

結論：以上より、脳内骨髄由来細胞は Ang II による AT1 受容体発現増加および脳内の炎症をおさえ、Ang II 持続投与に伴う交感神経活動亢進を抑制し、血圧上昇を抑制すると考えられた。

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 10 件)

1. 山里正演、中村卓人、石田明夫、山里代利子、大屋祐輔、骨髄由来細胞の脳室内自家移植はアンジオテンシン II 持続投与による脳内の炎症および AT1 受容体の発現増加を抑制する、第 37 回 日本高血圧学会総会、横浜、2014.10.17 パシフィコ横浜。

2. Yamazato M, Nakamura T, Ishida A, Yamazato Y, Ohya Y. Intracerebroventricular administration of autologous bone marrow-derived cells attenuate inflammation and increase in AT1 receptor in the brain of angiotensin II initiated hypertensive rats. AHA High Blood Pressure Research 2014 Scientific Sessions, San Francisco, CA.

3. Yamazato Y, Yamazato M, Ishida A, Fujita J, Ohya Y. Effectiveness of intratracheal delivery of autologous bone marrow-derived cells into the lungs of monocrotaline-induced pulmonary hypertension model rats. Joint meeting

ESH-ISH Hypertension Athens 2014, Athens.

4. Nakamura T, Yamazato M, Ishida A, Yamazato Y, Ohya Y, Intracerebroventricular administration of autologous bone marrow-derived cells attenuates cardiac perivascular fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Joint meeting ESH-ISH Hypertension Athens 2014, Athens.

5. 中村卓人、山里正演、石田明夫、山里代利子、大屋祐輔、脳室内への骨髄由来細胞自家移植は DOCA 食塩高血圧ラットの交感神経活動亢進を抑制する、第 36 回 日本高血圧学会総会、大阪、2013.10.24 大阪国際会議場。

6. Yamazato M, Nakamura T, Ishida A, et al. Intracerebroventricular administration of autologous bone marrow-derived cells attenuate the sympathetic hyperactivity in DOCA-salt hypertensive rats. AHA High Blood Pressure Research 2013 Scientific Sessions, New Orleans, LA.

7. 山里正演、石田明夫、山里代利子、崎間敦、大屋祐輔、骨髄由来細胞の脳室内自家移植はアンジオテンシン II 持続投与による血圧上昇を抑制する、第 35 回 日本高血圧学会総会、名古屋、2012.9.20-22 ウェスティンナゴヤキャッスル。

8. Yamazato Y, Ishida A, Yamazato M, Fujita J, Ohya Y, Intratracheal Delivery of Autologous Bone Marrow-derived Cells Attenuate Muscularization and Inflammation in Lungs of Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension Model Rats. AHA Scientific Sessions 2012, Best of AHA Speciality Conferences, Los angels, CA.

9. Yamazato M, Ishida A, Yamazato Y, Sakima A, Ohya Y. Intracerebroventricular administration of autologous bone marrow-derived cells attenuate slow pressor angiotensin II initiated hypertension in rats. AHA High Blood Pressure Research 2012 Scientific Sessions, Washington, DC.

10. Yamazato Y, Ishida A, Yamazato M, Fujita J, Ohya Y. Intratracheal Delivery of Autologous Bone Marrow-derived Cells Attenuate Muscularization and Inflammation in Lungs of Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension Model Rats. AHA High Blood Pressure Research 2012 Scientific Sessions, Washington, DC.

[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://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(系)研究科(研究院)・
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：