

運動習慣がもたらす新生血管—神経連関の解析

近畿大学医学部薬理学教室

講師 丹羽 淳子

(共同研究者)

近畿大学医学部薬理学教室 教授 東野 英明

近畿大学ライフサイエンス研究所 主任 藏下 伸治

同 係長 赤星 保光

同 技術員 山中 重明

近畿大学医学部薬理学教室 教授 高橋 英夫

はじめに

脳血管疾患は、我が国第3位の死亡原因で、かつ“寝たきり”など要介護の第1位の原因である。未だ有効な治療法（薬）が確立されておらず、重篤な後遺症の発生防止が困難なことから特に予防に対する期待は大きい。骨髄由来の血管内皮前駆細胞（Endothelial Progenitor Cell, EPC）は、生後の血管再生能をもつ細胞としてAsaharaらにより発見された。その後の研究からEPCは、骨髄や骨髄以外の末梢組織の特定場所に存在する幹細胞から循環前駆細胞に分化し、血管新生が活発におこっている場所で内皮細胞となって血管新生や組織血管リモデリングに関与すると考えられている。また近年、EPCは病変部の血管新生能のみならず、血管機能を維持する自己修復細胞としての特性をもつことも明らかとなってきた。また、このようなEPCの機能や循環細胞数が、加齢、高血圧症、糖尿病、高脂血症、肥満等のリスクファクターにより低下することが臨床的に報告されるようになり、血管病の病態進展との関連性が示唆されている。

一方、脳を構成する神経系においても、失われた神経細胞を補って神経回路を再生しようとする神経再生機構が成体脳にも存在することが明らかにされた。そして、神経再生は虚血ストレスや運動など病的あるいは生理的環境変化により促進されることが報告されている。また、血管内皮細胞由来の遊走因子が神経再生においてガイダンス的機能を有すること、内皮細胞由来のサイトカインが神経栄養や保護作用をもつことなどが示され、血管—神経連関の重要性が証明されつつある。

我々は、今までにヒト本態性高血圧症のモデル動物で、高血圧発症後早期に脳卒中発症をおこす脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（SHRSP）に自発的な運動を日常的に長期おこなわせ（1日あたり基礎代謝量の約1/5の運動量、ヒトに換算するとジョギング約1時間程度に相当）脳卒中発症の有意な抑制と延命効果、発症後の行動学的検討から、速やかな行動改善効果を明らかにしてきた。高血圧症や脳血管障害に対して、運動習慣が自己修復細胞を活性化できるか、血管新生と神経再生をどのような因子を介して高めているかを明らかにすることを目的とした。

研究方法

(1) 動物および運動負荷実験

雄性脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) および正常血圧のウィスター京都ラット (WKY) の6週齢から18週齢を用いた。軽度から中程度運動を長期間継続させるために、運動負荷は1周1mの回転輪がついたケージ内で6週齢より飼育した。非運動ラットは回転輪のない同等の広さのケージ内で飼育して比較した。

(2) 血管内皮前駆細胞 (EPC) の分離と解析

脳卒中発症前 (11週齢から13週齢) および発症後3日、5日、10日、15日の末梢血と大腿骨から骨髓細胞を採取し試料とした。EPCマーカーとして用いられているCD34とvascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) に対する抗体で染色した後、EPC数とVEGFR2の発現量の時間的変化をフローサイトメトリーで測定した。またEPCを分画した後CXCR4の発現量を測定した。

(3) 脳組織におけるEPCおよび神経前駆細胞の免疫組織学的検討

発症前、発症後3日、1、2、3、4週目に常法により脳の連続冠状切片を作成し、病変部、海馬歯状回、側脳室下帯の免疫染色をおこなった。また発症2日目から5日間、Bromodeoxyuridine (BrdU) を投与し、同様に脳組織切片を作成した。

免疫染色は抗CD34抗体、抗Nestin抗体、抗Doublecortin (DCX) 抗体、抗NeuN抗体、抗BrdU抗体、抗laminin抗体を用いた。

(4) 血管新生および神経再生因子

発症前と発症後の血漿中および脳組織ホモジネート上清のCXCL12、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、VEGFをELISA法で測定した。

(5) 神経学的行動試験

8週齢から18週齢まで、週1回、傾斜板を用いて運動協調性、平衡感覚、筋力を評価した。また新奇認識試験により短時間記憶認識能を評価した。

(6) 統計処理

実験値は平均値±標準誤差として表した。統計処理は2群間の比較はt検定により、3群間の比較はPost hoc ANOVAとScheffeの方法で多重比較検定を行った。危険率5%以下を有意差ありと判定した。

研究成果

(1) 運動習慣による脳卒中発症抑制および延命効果・神経学的行動試験

発症率を比較すると、すべての非運動ラットが120日齢までに発症したのに対して、運動ラットではそのうち40%しか発症せず、有意な発症遅延および発症抑制効果を認めた。また生存率も非運動群

が202日齢までにすべて死亡したのに対し、運動群ではその時50%が生存し、有意な生存率の延長を認めた。

四肢の運動協調性と記憶・認識能の2種類の神経学的行動試験を行った。運動群では、非運動群に比し、両試験ともに発症直前まで良好な成績を維持し、発症後も速やかな回復を示した。

(2) 骨髄および末梢血における血管内皮前駆細胞 (EPC) 数の変化

運動群 SHRSP の骨髄 (図1) および末梢血中 (図2) EPC (CD34 陽性かつ VEGFR2 陽性細胞) は、発症前から非運動 SHRSP に比し有意な増加を示し、発症後も速やかに増加した。骨髄および末梢血中 EPC 数の増加に一致して、脳病変部の CD34 陽性微小血管数は運動 SHRSP で有意に増加した (図3)。

図1 骨髄中 EPC 数の変化

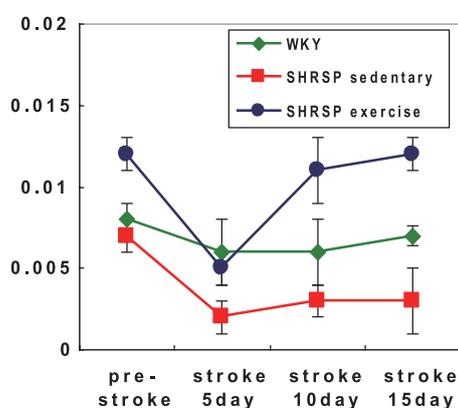
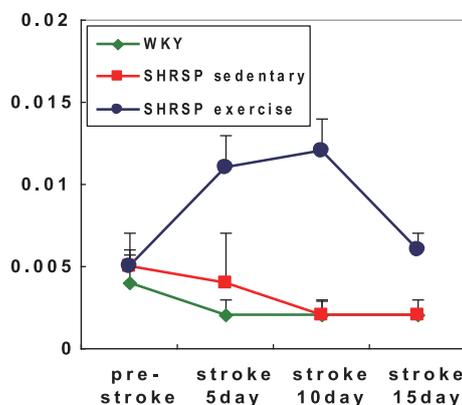


図2 末梢血中 EPC 数の変化



(3) 神経幹細胞および神経芽 (幼若) 細胞の発現変化

神経幹細胞を示す Nestin 陽性細胞や神経芽細胞を示す DCX 陽性細胞、成熟神経細胞を示す NeuN 陽性細胞は、病変部周囲組織で発症時間の経過と共に順に増加した。運動ラットでは多数の神経前駆細胞が病変部へ速やかに移動して (図4) 神経細胞へ成熟し、梗塞により脱落した病変部に生着していた。また成体神経新生が続いている側脳室下帯と海馬歯状回の神経細胞の増殖能を BrdU 陽性細胞数と DCX 陽性細胞数を数えて評価した。いずれも運動ラットで非運動ラットに比し有意に増加し、幼若神経細胞の増殖分化を認めた (図5)。

(4) 血管新生および神経新生に関する液性因子産生量の変化と EPC の液性因子受容体の発現変化

EPC と神経前駆細胞の増殖や移動過程に必須である VEGF、CXCL12、BDNF の産生量とその受容体の発現変化を検討した。血漿中および脳組織中の発症前 VEGF は、運動群で非運動群に比し有意に高値であった (図6)。また運動ラット骨髄および末梢血中 EPC の VEGFR2 発現量は、発症後で非運動ラットの約3倍に達した。血漿中 CXCL12 は発症前、発症後共に運動群で有意に高値を示し (図7)、その受容体 CXCR4 の発現も運動群 EPC で増加していた。海馬領域組織の BDNF 産生量も運動群で発症後早期に増加し高値を維持した (図8)。

図3 非運動ラット発症4週後と運動ラット発症2週後の脳病変部の血管新生 左：非運動ラット4週後 右：運動ラット2週後

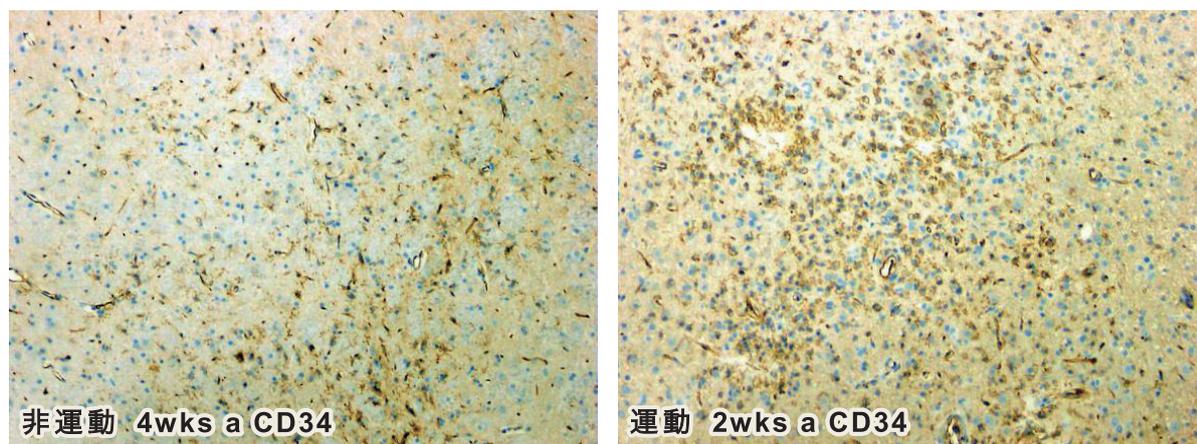


図4 非運動ラットと運動ラット発症2週後の病変部における神経前駆細胞

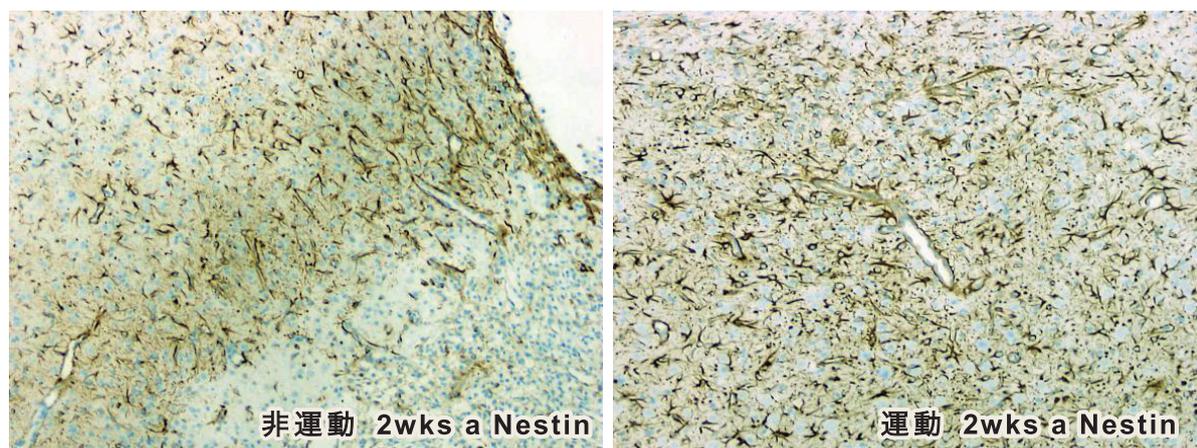


図5 側脳室下帯における発症2週後の神経前駆細胞の増殖 左：非運動ラット 右：運動ラット

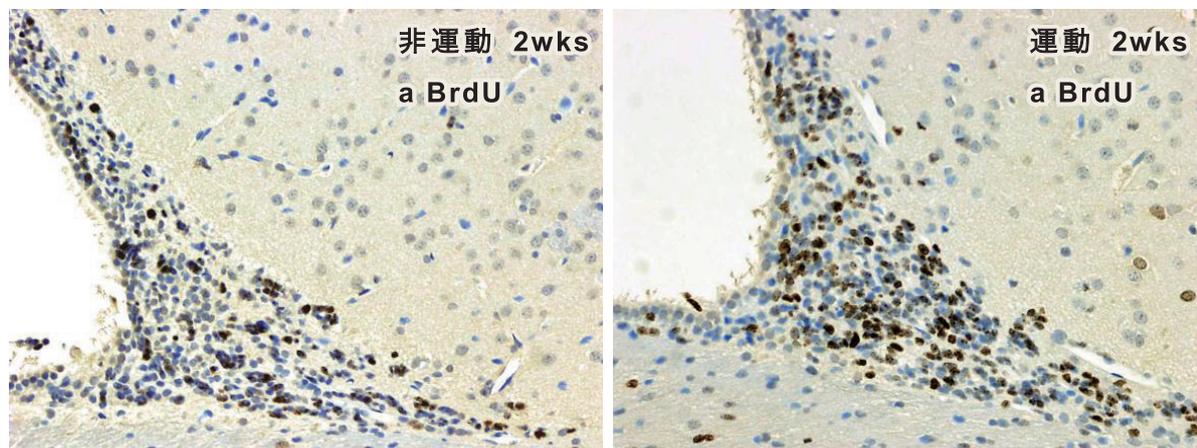


図6 脳組織 VEGF 産生量

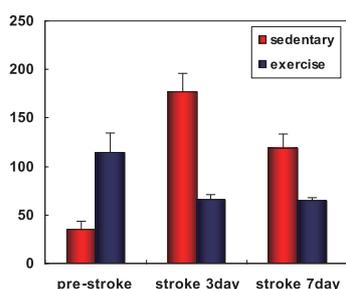


図7 血漿中 CXCL12 量

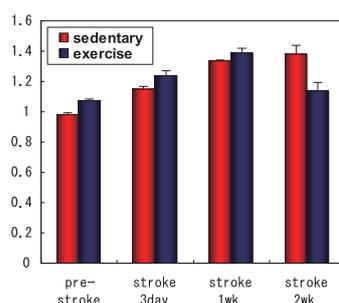
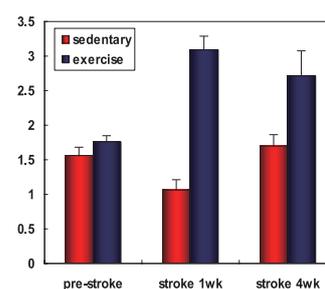


図8 脳組織 BDNF 産生量



考察

我々は今までに遺伝的高血圧症病態モデル動物実験において、習慣性の運動療法の早期介入が脳卒中発症の抑制や発症後の回復に極めて有効な非薬物的治療であることを証明してきた。これまでの多くの疫学調査からも、身体活動の活発さや軽～中程度の習慣的な運動は、心血管系傷害の減少と関連していることが明らかにされている。また最近の知見では、いくつかの既存の高血圧症治療薬や高脂血症治療薬が骨髄由来血管内皮前駆細胞の循環細胞数や機能活性を上昇させることが明らかになり、これら薬物の血管内皮自己修復能や血管新生に対する治療効果が期待されている。さらに血管新生は成体神経新生における微小環境構築に必須の要素であることを示す知見が報告されて、脳に内在する神経再生機構の血管—神経連関（因子）の研究が虚血性脳疾患・心疾患の再生医療をめざして行われ始めた。

一方、薬物治療や再生医療に対して、われわれがめざす運動療法などの生理学的刺激の介入は、本来生体内に内在するホメオスタシス機構を活性化するものであり、そのメカニズムや因子を特定することは、予防を含めたこれら疾患の病態改善に関わるより有効な新薬や活性化機構解明に重要であると考えられる。今回の研究より、習慣的運動は、（1）発症前から血管内皮前駆細胞ならびに脳神経前駆細胞を増加させた。（2）発症後の修復過程において血管内皮前駆細胞ならびに神経前駆細胞の速やかな病変部への移動と成熟・生着を促進させた。（3）これらの幹細胞の増殖や移動過程には VEGF、CXCL12、BDNF の栄養因子の産生増加とその受容体の発現増加が関係していることが示唆された。

要約

ヒト本態性高血圧症病態モデル動物 SHRSP を用いて、運動習慣と血管新生および神経再生について検討した。長期自発運動を行わせることにより、脳卒中発症遅延に加え、病変部の神経細胞脱落の縮小や発症後の神経症状が軽減し、生存率が有意に上昇した。これら運動習慣の予防・治療効果の一因として骨髄由来血管内皮前駆細胞と神経前駆細胞の活性化が明らかとなった。

文献

1. Asahara T, et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275: 964-7, 1997.

2. Hambrecht R, et al.: Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 107: 3152-8, 2003.
3. Ming GL, Song H: Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28: 223-250, 2005.
4. Schmidt NO, et al.: Vascular endothelial growth factor-stimulated cerebral microvascular endothelial cells mediate the recruitment of neural stem cells to the neurovascular niche. *Brain Res.*, 1268: 24-37, 2009.
5. Vasa M, et al.: Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res.*, 89: E1-7, 2001.