

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350918

研究課題名(和文)運動習慣による傷害脳再生起点の延長

研究課題名(英文)Exercise promotes homeostatic control and post-injury regeneration by altering stem cell niche

研究代表者

丹羽 淳子(NIWA, Atsuko)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60122082

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)：第3脳室を囲む視床下部は細分化された核の神経活動を介して全身の生理的恒常性維持と組織再生に関わる。継続的な運動を脳卒中発症ラットにさせると脳傷害後の神経再生に重要な側脳室下帯の神経新生・分化・成熟に加え、第3脳室神経幹細胞候補のtanycyteの自己複製と神経新生・成熟の活性化を認めた。また脳室域のFGF-2とEGF産生が増加した。

脳組織再生には傷害部の骨髄由来血管系幹細胞による血管網の構築が重要である。骨髄幹細胞は骨髄の間葉系細胞と血管内皮細胞やSDF-1などにより維持されるが、脳血管障害時にはこれらの細胞極性と増殖因子の産生が低下した。運動は幹細胞の微小環境を改善し脳傷害の改善に参与する。

研究成果の概要(英文)：Beneficial effects of exercise (EX) in the hypothalamus and bone marrow (BM) were examined for homeostasis and regeneration. A neural progenitor cell, tanycytes, proliferated, differentiated, and matured to NeuN+ neuron in the hypothalamus of adult SHRSP. EX activated tanycytes and promoted cell turn over. Neurogenesis may require FGF-2 and EGF production in adult hypothalamus, and restore physiological and neural functions effectively after stroke in EX SHRSP. Myeloid cell ratio was increased with progression of cerebrovascular disease and that was normalized by EX. Stroke injury induced dynamic fluctuation in SDF-1 distribution that correlated with variations in niche occupation of CD34+/c-kit+ angiogenic stem/progenitor cells. Stem cell niches (SDF-1) in EX responded to injury-related cues that mobilized CD34+ cells from endosteal niche after stroke to sinusoidal vascular niche, which promoted the progenitor proliferation. EX improves the mobilization and activation of BM stem cells.

研究分野：薬理学

キーワード：脳血管障害 運動 血管内皮前駆細胞 神経新生 第3脳室(視床下部) 骨髄 微小環境(ニッチ) 恒常性

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患は死因の第3位を占め、その後の神経学的後遺症の軽減を含めて効果的な治療法の確立は急務の課題である。一方、日常の活動量や運動習慣は、生涯を通じて生体の恒常性維持に有益であることは周知の事実であり、脳卒中や神経障害後の急性期治療薬と併用して早期の運動介入(リハビリテーション)が臨床現場で積極的に取り入れられ、有効性が確立してきている。またこれらの基盤にある組織再生メカニズムの研究から、生理的恒常性維持や傷害後の組織再生には、各組織内に存在する組織幹細胞の分化増殖が関与すること、またこれらを取り巻く細胞同士(液性因子を含む)の相互作用(微小環境)が必須であることが明らかになってきた。特に高次機能をもつ脳神経組織では、神経細胞単一の保護ではなく血管系やグリア系細胞の機能的ネットワークを再構築すること、さらに臓器・組織間の相互連関を含めた総合的治療法が必要とされている。運動介入は、我々が内在性にもつ恒常性維持機構を活性化し、予後の改善に貢献すると推定されるがその分子機構は明らかでない。運動療法とは両極にある再生医療からも外因性の幹細胞治療との併用療法が期待されてきている。

2. 研究の目的

我々は、ヒト本態性高血圧患者と相同の原因遺伝子を多数もち、重篤な高血圧症と脳卒中を自然発症するラット(SHRSP)に自発的な運動をさせて、人の脳血管疾患と同様に全身性の軽度の慢性炎症を基盤とする脳傷害再生実験モデル系を確立している。運動介入による脳傷害部の速やかな血管新生と神経新生は、運動による全身性の刺激が神経細胞・血管系細胞・グリア細胞と液性因子の再生機転を活性化していることを示す。組織幹細胞とこれらを支持する微小環境(ニッチ)の関係性を明らかにすることは、予後を左右している急性期治療介入のゴールデンタイムを延長できる可能性がある。内在性の再生分子機構を明らかにし、再生機転を促進させる治療法の開発を目的とする。

本課題では(1)全身性の生理的恒常性機能や組織再生に関与する視床下部の機能領域(核)の神経新生とその微小環境についてと(2)すべての血球細胞産生や組織修復に関与する骨髓由来幹細胞の制御について脳傷害回復の観点から検討した。

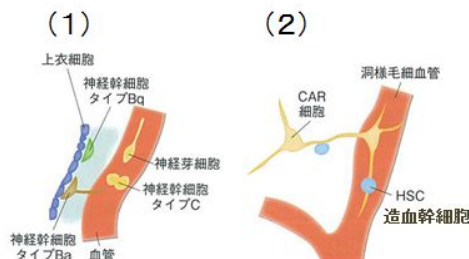


図1.(1)脳と(2)骨髓の組織幹細胞と

血管性ニッチ (長澤丘司、細胞工学 29 巻 11 号 1084 頁より改変)

3. 研究の方法

脳卒中自然発症高血圧症疾患モデルとして、雄性の Stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP)と対照として正常血圧の Wistar Kyoto rat (WKY) または wistar 系ラットを用いた。5 週齢より 1 週 1 m の回転輪のついたケージ内で voluntary exercise (自発運動) を継続して行わせた。SHRSP は、ヒト本態性高血圧症患者と同様に加齢に伴い血圧上昇がおこり、全身の血管内皮細胞傷害や血管平滑筋の肥大と硬化、炎症性サイトカインの上昇、活性酸素種の上昇、また脳卒中の発作がおこる以前から、脳・腎・肺などの微小血管に血栓を認めた。我々が確立したこの運動負荷の方法は、これまでの研究から、血漿中のストレスマーカーや乳酸値には影響を与えず、発症後も継続的な運動負荷が可能である。運動負荷により血圧上昇にはほとんど影響を与えないが、先に述べた種々の血管炎症の抑制、脳卒中発症の遅延(発症抑制)と延命効果が認められる。

(1) 視床下部の神経新生と第3脳室周囲域微小環境

組織学的検討: 常法により 4%パラホルムアルデヒド灌流固定後、第3脳室周囲部のパラフィン連続切片を作製し、vimentin, nestin, GFAP, BrdU, CD31, Notch, FGF-2, EGF に対する免疫染色を行った。共焦点顕微鏡で観察し陽性細胞数を計測した。TUNEL 法によりアポトーシス細胞を検出した。

生化学的検討: 麻醉下で脳を摘出し第3脳室周囲部生組織を顕微鏡下で採取した後、NP40 添加 PBS 中で組織ホモジネート上清を作り ELISA 法により増殖因子産生量を測定した。

血圧、体重、摂食量、摂水量、運動量、神経機能などを継続的に測定した。

(2) 骨髓由来幹細胞と骨髓微小環境

組織学的検討: 4%パラホルムアルデヒド灌流固定後大腿骨と脛骨を摘出し、凍結切片を川本法により作成した。CD34, c-kit, Leptin 受容体, PDGF 受容体, SDF-1, SCF, PDGF-BB, ki67 に対する抗体を使って免疫染色し、骨内膜側ニッチ(骨内膜から 100um まで)とそれより中央側のジヌソイド(同様毛細血管)側ニッチ(骨内膜から 100um-200um)の陽性細胞数を計測した。

生化学的検討: 大腿骨と脛骨より骨髓細胞を採取した後 FicolI を使って単核骨髓細胞を単離した。骨髓細胞ホモジネート上清と血清中の増殖因子産生量を ELISA 法により測定した。

フローサイトメトリー: 上記方法で単核骨髓細胞を単離した後、CD34+ VEGFR2+細胞を血管内皮前駆細胞として発症前後の細胞数変化と CXCR4 (SDF-1 受容体)を測定した。

メディエーター解析：SDF-1 組換え体蛋白質と Deprotin A(SDF-1 分解抑制薬)を投与し組織学的検討と神経機能実験をおこなった。

#### 4. 研究成果

(1) 視床下部の神経新生と第3脳室周囲部微小環境(ニッチ)

神経幹細胞は胎生期以降ほとんど消失するが、一部成体の側脳室周囲の脳室下帯などに存在し脳傷害時の神経再生に寄与する。tanycyteもこの幹細胞の一つとされ、幼若期には神経細胞やグリア細胞に分化することが証明されている。また第3脳室には側脳室同様に脳室直下の上衣細胞、幹細胞と並んでGFAP陽性グリア系細胞、血管系から成るニッチ様構造が認められている。

我々は脳卒中を発症したSHRSPにおいて、nestin陽性GFAP陽性の神経幼若細胞の増殖分化とニッチ細胞の増殖、さらにこれらが運動により増強されることを明らかにした。

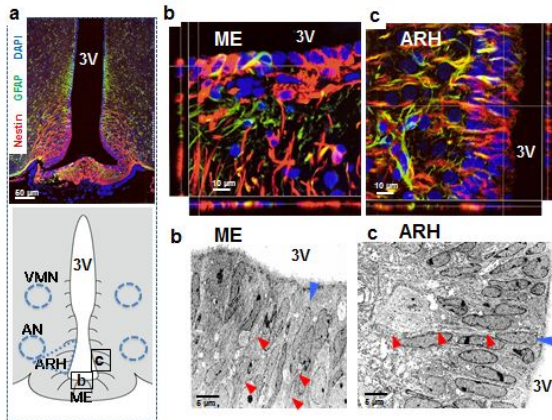


図1. 第3脳室(3V)周囲に存在する神経幹細胞

細胞本体から長い尾状をもつ発生期の radial glia 構造を示す tanycyte(青:細胞体、赤:尾部)が成体第3脳室周囲に存在する。VMN: 視床下部腹内側核、AN: 弓状核、ME: 視床下部正中隆起、

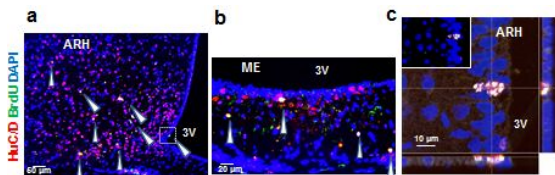


図2. 神経幹細胞は分化増殖して成熟する  
BrdUを核内に取り込んだ神経幹細胞は増殖しHuc/Dを発現した成熟神経細胞になる。

視床下部は解剖学および機能学的にいくつかの領域(核)に細分化されていて、全身の生理学恒常性維持、神経新生、認知機能、老化・寿命制御にも関わっている。我々の結果は、tanycyteが発生学的増殖期をすぎた後にも、脳卒中発症後の神経新生や運動負荷によって活性化し、神経細胞に成熟した後、生理学的変化に対応して恒常性維持に関与

していることを示唆した。

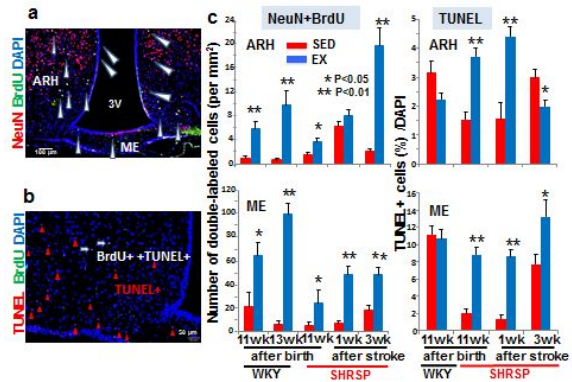


図3. 運動負荷は神経幹細胞から成熟神経細胞へ分化増殖を活性化するとともにアポトーシスも促進し、神経細胞のturn over(若返り)を促進する(SED:非運動群、EX:運動群)

BrdUを取り込んだ成熟神経細胞(NeuN)は運動負荷により増殖した。一方、アポトーシス陽性細胞(TUNEL法陽性細胞)も運動負荷により増加した。運動は神経細胞の若返りを促進し、生理学的変化に有効に対応できる体制を維持することを示唆する。

次にこれらの神経幹細胞の活性化を支持する脳室周囲微小環境を検討した。

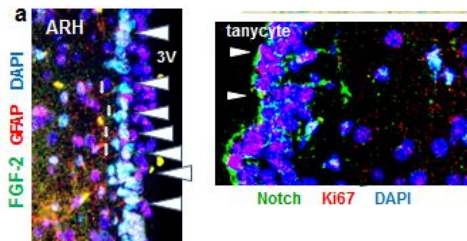


図4. tanycyte( )を囲む微小環境にはFGF-2とNotchシグナルが認められる

中枢神経系発生時の幹細胞局所のNotchおよびFGFシグナルはradial gliaの増殖と神経新生速度の調節に関与することが知られており、成体脳における神経新生においても同様のシグナルが認められた。また特にME(正中隆起部)ではEGFの産生が検出された。運動負荷でこれらは著明に増加した。

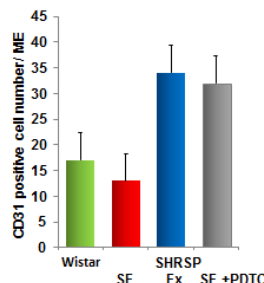


図5. 正中隆起部(ME)における血管数  
ME部の血管数は運動負荷により増加し、またNF-kB活性化阻害薬(PDTC)を経口投与して炎症を抑制したSHRSPの血管数は増



加した。

視床下部正中隆起部 (ME) は視床下部 - 脳下垂体 - 副腎皮質系ホルモンの血中分泌の通路となるため ME の血管には血液脳関門が存在しない。ME の血管数は運動 SHRSP で増加し、全身性の炎症を抑制した SHRSP でも増加した。加齢に伴い NF- $\kappa$ B が活性化するとこの部のホルモンの遺伝子転写活性が低下し、神経新生、筋肉強化、認知機能などが低下することが報告されている。我々はすでに運動により SHRSP の NF- $\kappa$ B 活性が抑制されることを明らかにしており、運動による視床下部内分泌制御も神経新生を促進していることが考えられる。

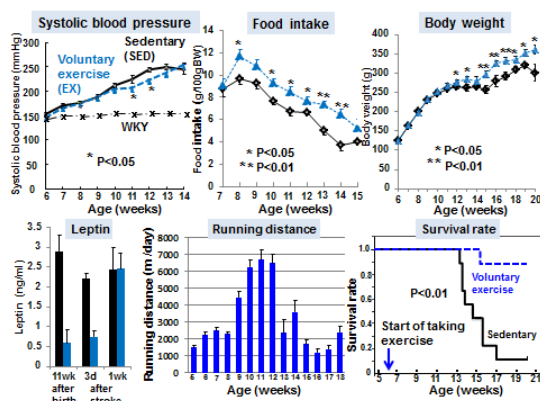


図6. 運動による生理学的機能と神経学的機能 (運動能力) の向上と生存の延長 (黒: 非運動 SHRSP、青: 運動 SHRSP)

運動ラットでは血圧低下、摂食と体重の増加、運動能の維持 (神経学的機能としてこれ以外に認知能、平衡機能も発症後に早期に回復し維持された) そして顕著な生存率の延長が認められた。

疾患原因やメカニズムの分子的解析また幹細胞研究や再生医療が進む中、生物の個別の構成要素を時空間横断的な相互作用として再構造化し理解することの重要性が明らかになってきた。視床下部は全臓器の生体恒常性維持の上位中枢であり、また身体運動が全身的な作用をもたらすことは周知の事実である。成体中枢神経系における神経新生活性は極めて限局的であるが、運動により視床下部の核の神経新生が促進され、かつ細胞の若返りが促進される事実は、生理的变化に対応した恒常性維持とともに組織障害における再生の基盤となると考えられる。また本課題研究において、運動による神経幹細胞の活性化には、幹細胞を取り囲んで上層細胞、グリア系細胞、血管からなるニッチ構造の増殖と、それらによって産生される FGF-2, EGF などの増殖因子の必要性を明らかにできた。

(2) 脳傷害部修復と骨髄由来幹細胞・骨髄微小環境

脳血管疾患は、全身性の慢性炎症が基盤病

態となっており、循環血液中の炎症細胞の増加や内皮細胞の機能障害、修復過程に重要な組織幹細胞の機能不全が恒常性の破綻につながると考えられている。(1) に述べた視床下部とともに、骨髄は生理的变化に対応して免疫系、内分泌系、神経系の入力を受け、幹細胞からすべての血球や血管内皮前駆細胞を産生して、全身の恒常性維持や組織再生に関わる。以前から白血病治療や骨髄移植が行われていたのに反し、骨髄幹細胞の基礎的知見は乏しかった。この数年の造血幹細胞の同定とその微小環境 (因子) の重要性について新規の研究成果は目覚ましい。しかしながら疾患発症や組織修復における骨髄細胞の動態や機能について知見はほとんどない。

SHRSP においても病態の進展と一致して、炎症性サイトカインの増加や血管内皮細胞傷害、微小血栓形成を認め、末梢血中では、骨髄球 (単球・好中球) の比率の増加や未熟な大型血小板の増加を認めた。また骨髄由来血管内皮前駆細胞数の減少と遊走活性の低下が認められ、修復骨髄細胞の機能低下が明らかになった。これに対して運動負荷は炎症性細胞の減少と修復系細胞の活性化を生じ、これらの障害性変化を回復した。

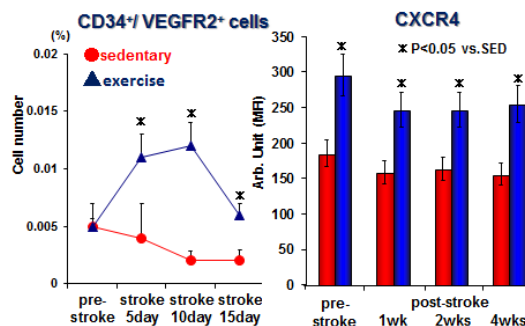


図1. 脳卒中発症前と発症後の循環血液中の CD34+, VEGFR2+ 細胞 (骨髄由来血管内皮前駆細胞) とそれらに発現する SDF-1 受容体 (CXCR4) の変化

循環骨髄由来血管内皮前駆細胞は運動により増加した。傷害部で産生される SDF-1 に反応して傷害部に移動し、傷害部の血管新生に関与する。CXCR4 SDF-1 受容体発現も運動により増加した。

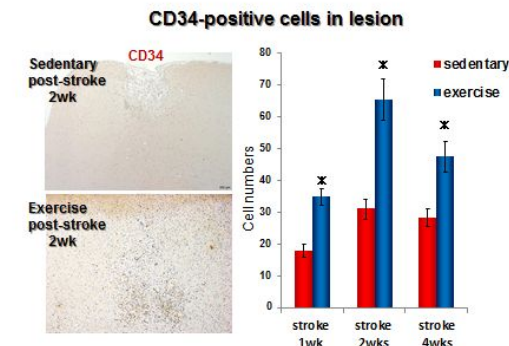


図2. 脳病変部の CD34+細胞数  
脳病変部に集積した CD34+細胞は運動によって著明に増加し、神経新生を促進した。

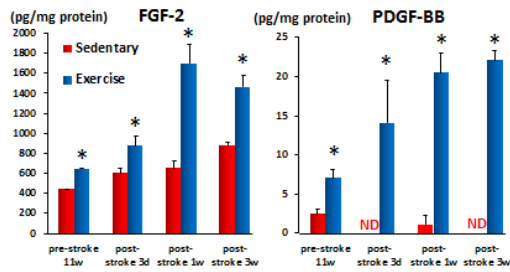


図3. 病変部の増殖因子の産生量

FGF-2 や PDGF-BB は、上皮細胞、血管内皮細胞、また血管新生に関与する M2 マクロファージにより産生される。これらの増殖因子は病変部の神経新生や血管新生における重要なニッチ因子と考えられる。

現在まで脳血管疾患発症を骨髄幹細胞の動態から検討された知見はない。これらの事実は高血圧症の進展とともに骨髄組織の恒常性維持機能に変化が起きていること、運動はこれらを正常化する可能性を示唆した。

骨髄幹細胞ニッチ細胞について未だ確定には至っていないが、SDF-1 や SCF を豊富に発現している間葉系細胞とジヌソイドを形成する血管内皮細胞、巨核球の役割が重要であると報告されている。また骨髄幹細胞を生涯にわたって維持し、かつ分化して血球数を一定に維持するメカニズムについても解明されていない。しかしながら SDF-1 や SCF がニッチ因子として必須であることについては現時点で一定の見解が得られている。

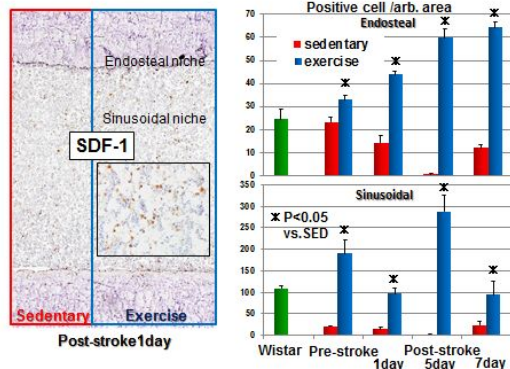


図4. 発症直後の骨髄組織と骨髄 SDF-1 陽性細胞の分布と細胞数の変化

対照 wistar ラットでは SDF-1, SCF 陽性細胞 (ニッチ細胞) は骨内膜側とジヌソイド側両ニッチに広がっていた。これに対し非運動 SHRSP では、発症前発症後とも両ニッチ側陽性細胞数の顕著な減少を認めた。一方、運動により SDF-1, SCF 陽性細胞数は有意な増加を示した。また発症直後骨内膜近位に集積し、その後血管網が豊富な中央部側 (ジヌソイド側) に移動して、毛細血管に近接して増加した。ジヌソイド側ニッチは骨内膜側に比し、酸素濃度が高く、増殖期の幹細胞/前駆細胞の多いことが報告されている。また間葉系細胞

と巨核球に PDGF-BB 産生増加を認めた。骨髄に占める SHRSP 毛細血管網の面積および周囲長は、対照の wistar 系ラットに比し有意に少なかった。運動は SHRSP 血管系を増加させ、幹細胞/前駆細胞が機能する血管系ニッチ環境を供給していると考えられる。

血管修復系細胞 CD34 陽性細胞は、ニッチ因子 SDF-1 と SCF の分布と発現量にほぼ一致して変化した。非運動 SHRSP では、発症前後とも CD34 陽性細胞数は少なかった。これに対して運動 SHRSP ではニッチ因子の時間的空間的動態に一致して、発症直後は骨内膜側で多く、その後はジヌソイド側でより増殖し、増加した。これは、循環 CD34+VEGFR2+血管内皮前駆細胞の動態と一致した。SHRSP では対照 wistar に比し、発症前から SDF-1 や特に SCF 産生量の低下と CD34 陽性細胞数の減少があり、これらは SHRSP の血管修復系細胞の機能低下と関連する可能性がある。

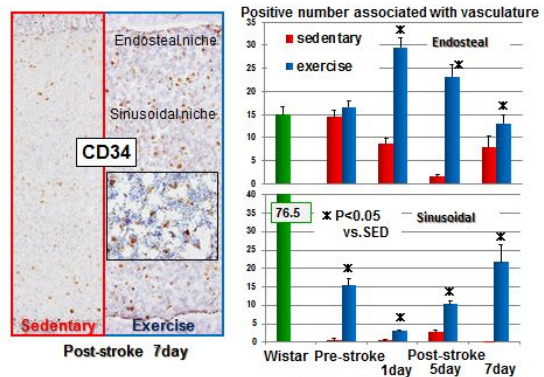


図5. 発症直後の骨髄組織と骨髄 CD34 陽性細胞の分布と細胞数の変化

次に SDF-1 ニッチ因子の CD34/c-kit 血管系幹細胞/前駆細胞に対する直接的な効果を調べるため、SDF-1 組換え体蛋白質と SDF-1 の分解阻害薬 Diprotin A を発症後 2 日目から 5 日目まで投与し、最終投与後 24 時間後 (発症後 6 日目: S+D 6 day) と 16 日後 (S+D 16 day) の骨髄変化を検討した。また発症後 2 日目から自発運動を行わせ発症後 16 日目 (SED to EX 16 day) の骨髄変化を検討した。

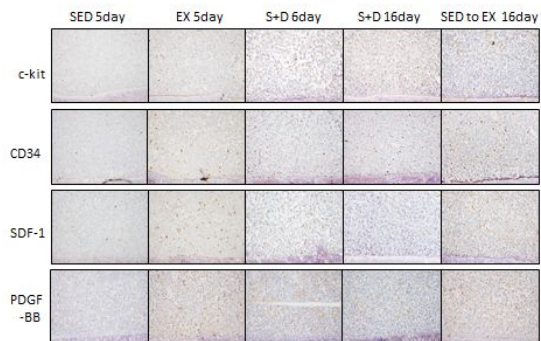


図6. SDF-1 組換え体蛋白質と Diprotin A の投与および発症後運動の骨髄変化

SDF-1+Diprotin A の投与 6 日目には骨髄中の SDF-1 陽性細胞と CD34 陽性細胞が増加し



た。また巨核球数も増加した。しかしながら16日目の骨髄には変化を認めなかった。一方、発症後運動させた SHRSP の骨髄は、非運動ラットと比べ、6日後は変化がなかったが、16日目になると SDF-1 と CD34 陽性細胞の増加を認めた。また運動 SHRSP(5 週齢より運動)の発症後5日目骨髄と同様に骨内膜側での細胞増多が観察された。同時に毛細血管面積の増加と PDGF-BB の産生増加を認めた。

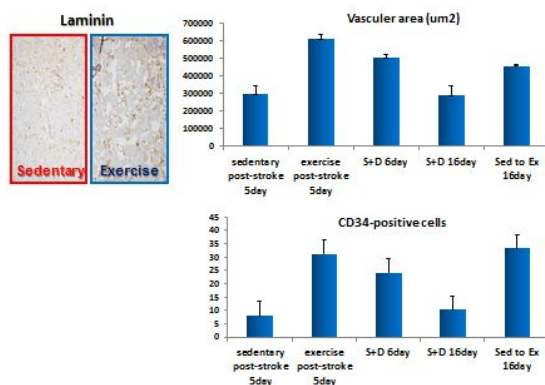


図7 . SDF-1 組換え体蛋白質と Diprotin A の投与および発症後運動 SHRSP 骨髄の毛細血管面積と CD34 陽性細胞数

今回の骨髄の成績から脳血管障害進展のメカニズムには CD34 陽性骨髄幹細胞/前駆細胞の修復系細胞の減少とそのニッチ細胞およびニッチ因子 (SDF-1, SCF) の減少が関与することが示唆された。運動はこの機能低下に対し、SDF-1 産生増加をもたらす微小環境の正常化を促進した。また PDGF-BB 産生と骨髄血管網の形成は微小環境として重要な役割をもつ可能性がある。運動は脳卒中の発作に対して、骨内膜側と毛細血管側のニッチを維持し CD34 陽性細胞の極性を保って増殖を促進した。

今日 ips 細胞再生医療においても治療時期の適応拡大に運動療法の併用が著効を示すという知見が集まってきている。外因性の幹細胞を定着、増殖させるためにも運動介入によって内在性の微小環境を支持することが有効性を高めるのかもしれない。

#### 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)

Niwa A, Nishibori M, Hamasaki S, Kobori T, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Takahashi H, Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle, Brain Structure and Function (査読有) Vol. 221, 2016, pp. 1653-1666 DOI:10.1007/s00429-015-0995-x

〔学会発表〕(計 3 件)

丹羽淳子(代表)、西中崇、赤星保光、小堀宅郎、高橋英夫  
運動介入は骨髄微小環境を改善し血管系前駆細胞による脳卒中回復を促進する  
日本薬理学会  
2017年3月15日~2017年3月17日  
ブリックホール(長崎県・長崎市)

丹羽淳子(代表)、赤星保光、堀内喜高、濱崎真一、小堀宅郎、西堀正洋、高橋英夫  
自発運動は視床下部神経新生を促進し、脳卒中後の恒常性維持に寄与する  
日本薬理学会  
2015年3月18日~2015年3月20日  
名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

丹羽淳子(代表)、赤星保光、堀内喜高、濱崎真一、小堀宅郎、西堀正洋、高橋英夫  
自発運動は脳卒中後の視床下部神経再生を促進する  
日本薬理学会  
2014年6月20日  
コンベンションホール(岡山県・岡山市)

〔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

近畿大学医学部薬理学教室

<http://www.med.kindai.ac.jp/pharma/>

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

丹羽 淳子(NIWA, Atsuko)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 60122082

##### (2)研究分担者

高橋 英夫(TAKAHASHI, Hideo)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 60335627

濱崎 真一(HAMASAKI, Shinichi)

近畿大学・医学部付属病院・助教

研究者番号: 60642890

小堀 宅郎(KOBORI, Takuro)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 60734697

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし