

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500866

研究課題名(和文) 運動習慣による脳血管再生環境の構築

研究課題名(英文) Induction of neurogenesis from endogenous neural precursors in the adult brain after stroke by long-term voluntary exercise

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：成体脳の神経幹細胞分化の条件は極めて難しい。運動療法(習慣)の有効性を受け、それを決定する要因として(1)神経幹(前駆)細胞自体の生存と活性、(2)幹(前駆)細胞の成長や分化に關与する炎症性分子や神経栄養因子などの脳内微小環境、(3)傷害後の時間的因子を考え、重症高血圧と脳卒中自然発症性のラットに長期の自発運動をさせ検討した。生存率の延長、神経機能改善は発症後2日目から運動を開始したラットにも認められた。運動により骨髄細胞老化が抑制され、内在性神経幹(前駆)細胞の増加と成長分化が促進された。全身性及び脳局所の炎症反応が抑制され、血管内皮細胞由来NO産生と傷害後早期に神経栄養因子が誘導された。

研究成果の概要(英文)：Long-term voluntary exercise (EX) decreased stroke events in stroke-prone genetically hypertensive rats (SHRSP). Volume of cerebral lesion was also reduced and neural defects were improved, resulting in prolonged life span in post-stroke EX rats. Possible strategies for regenerating damaged central nervous system: (1) activation of endogenous neural stem (progenitor) cells (NSC) (2) modification of microenvironment surrounding stroke lesion for their development and differentiation (3) enhanced migration of endothelial progenitor cells (EPC) and NSC. We found that EX increased the number of NSC and EPC, and enhanced their differentiation in lateral ventricle and cerebral lesion. Cell senescence in bone marrow was suppressed by EX. Production of inflammatory factors in plasma, CSF and lesion was also decreased in EX rats. The improvement may depend on NO production. Nerve growth factors and chemokine including BDNF, FGF, EGF, IGF-1 and CXCL12 were produced in early phase after stroke in EX.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：脳血管障害 神経新生 血管新生 運動 神経幹細胞 骨髄細胞 再生環境 炎症

1. 研究開始当初の背景

脳卒中を含む脳血管疾患は、我が国の第2位の死因となる疾患である。また脳血管疾患、脳・脊髄の外傷などにより、いったん損なわれた中枢神経系の機能は、十分には回復せず、有効な治療法はいまだ存在しない。この結果、傷害後の予後の負担は、医療行政上からも急務の課題である。

一方、近年の多くの研究により、成体哺乳類においても中枢神経組織に神経幹細胞あるいは神経前駆細胞が存在し、海馬歯状回顆粒下層や側脳室下帯など成体脳内の一部の領域では、内在性の神経幹細胞から神経の新生が生涯続いていることが明らかとなった (Pincus DW, et al., 1988)。これらの知見をうけて、神経幹細胞移植や内在性の神経幹細胞を活性化する方法について、あるいは神経軸索伸長阻害因子の抑制分子など、神経再生に向けて様々な研究や治験が始まっている (Okano H, 2002)。しかしながら、神経幹細胞や前駆細胞を分化誘導し機能回復に到達する条件は、極めて難しい。現在、唯一神経回復に有効性が確立しているのは障害後のリハビリテーション/運動療法である (Beatty JA, et al., 2005)。また多くの疫学研究からも、障害前からの日常の運動習慣や身体活動度が予後を左右することが報告されている (Shibata H., 1992)。しかし、その詳細な機序については明らかではない。これらの神経新生の分子機構の解明は、脳血管疾患や難治性の神経系疾患の新たな治療法に貢献しうる。

今回我々が用いた脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット Stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) は、ヒト本態性高血圧症患者の原因遺伝子と相同性のある遺伝子を多数もつ (Nagaoka A., et al., 1976)。加齢にともなって高血圧症を発症し、血管を含む全身性の炎症反応が亢進して、収縮期血圧(最高血圧)が 220mmHg ~ 250mmHg に達したところに脳卒中(脳出血と脳梗塞)を発症する。したがって、従来多くの脳梗塞組織傷害モデルとして用いられている中脳大動脈閉塞(MCAO)による急性の虚血脳傷害モデル(Tamura A, et al., 1981)に比し、慢性的な動脈硬化によって長期の炎症反応を伴って生じるヒトの脳卒中脳傷害病変を再現するのに適していると考えられる。

2. 研究の目的

我々は、前課題(課題番号:23500866)において、運動習慣による脳卒中後の機能回復と血管新生の重要性について検討し、骨髄中の血管内皮前駆細胞の増加と遊走能の促進、そして CXCL12 など遊走活性化因子の産生増加に伴って脳組織傷害部で血管新生が傷害後早期に起こることが、神経機能の改善とその後の生存率上昇に重要な要因であることを明らかにした。

本課題では、この研究成果をうけて、内在

性神経幹細胞と幹細胞から分化してできる神経前駆細胞について、血管新生ならびに神経新生を左右する脳組織環境について検討することを目的とした。神経機能回復に必要な条件として、(1) 内在性神経幹細胞の生存と活性化、(2) 傷害部での神経幹細胞・神経前駆細胞の成長および分化を誘導する神経成長因子産生と炎症性サイトカインなど抑制因子産生、(3) 血管新生を含む微小循環、(4) 時間的な因子を考え、検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物および運動負荷実験・神経学的機能試験

雄性の6週齢から18週齢、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) および対照として正常血圧の Wistar Kyoto ラット (WKY) と Wistar ラットを用いた。SHRSP および WKY は、大学内実験動物共同研究室で系統維持され、室温、湿度、明暗時間を厳密に調整された実験室内で飼育された。飲水および飼料は、L-アルギニンの投与実験を除いて、自由に摂取された。またすべての実験計画は、近畿大学動物実験規程に基づいて、動物愛護および管理、実験動物の飼育、保管ならびに苦痛の軽減に関する基準の審査と承認を受け実施された。

今までの知見より (Niwa A., et al., 2008, Soya H., et al., 2007)、軽度から中程度運動を長期継続させるために、運動負荷は1周1mの回転輪がついたケージ内で飼育し、8週間以上自由に運動させた。毎日体重と運動量を測定し、血圧と心拍数の測定、神経学的症状の観察など生理学的検討を行った。脳卒中発症日は既報の測定基準に基づいて (Nagaoka A., et al., 1976) 決定した。非運動(運動をさせない)ラットは、回転輪のない同等の面積のケージ内で飼育して比較した。

空間認知能・短期記憶能の検討のために、新奇物体認識試験 (Buccafusco JJ., 2000) と Y 字迷路試験 (Huang SM., et al., 2006) を行った。行動試験と並行して、以下の実験については、発症後の一定の時間経過を追って、動物をペントバルビタール麻酔下で、血液、尿、脳脊髄液 (CSF)、脳、大腿骨と腓骨を採取し、病理組織学および生化学的実験に用いた。

(2) L-アルギニン投与実験

低濃度の NO は、血管内皮細胞の保護作用および抗炎症作用があることが知られている (Moncada S. & Higgs A., 1993)。NO 合成酵素の基質となる L-アルギニンを投与して内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) 由来の NO 産生を増加させた。投与量は以前我々からの実験系で確立した方法に基づいて、8週齢(発症前)より 1.51% L-アルギニンを飲水投与した。また発症後の効果を検討するため、発症日より 1.51% L-アルギニンを飲水投与した。

ラット脳組織の血管透過性は、0.4%トリパ

ンブルー/生理食塩水液を灌流した後、脳を摘出し、その後 48 時間ホルムアミドに浸漬して組織中の色素を抽出し、吸光度を測定した。脳浮腫は 70 オープン中で 48 時間乾燥させ、水分量を測定した。

(3) 脳組織における神経幹細胞、神経前駆細胞、血管、グリア細胞の組織学的検討

神経幹細胞域の海馬歯状回(SGZ)と側脳室下帯(SVZ)における神経幹細胞とその前駆細胞、成熟神経細胞への分化を免疫組織化学法により検討した。視床下部を含む第 3 脳室周囲組織と病変部についても同様に検討した。発症前、発症後 3 日、1、2、3、4 週目に、ラットを麻酔下のもとに生理食塩水で灌流した後、4% パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液で灌流固定した。脳と骨を摘出し、定法によりパラフィン切片を作成した。免疫染色は、抗原賦活化を行った後、以下の抗体を用いて、4 overnight でそれぞれの細胞抗原を染色し、2 次抗体としてヒストファイン(Nichirei Bioscience)、発色は DAB Chromogen (DAKO)と VIP (Vector Laboratories)を用いた。血管内皮前駆細胞は抗 VEGFR2 抗体(Abcam)と抗 CD34 抗体(R&D Systems)、神経幹細胞は抗 Nestin 抗体 (Chemicon)、神経幼弱細胞は抗 doublecortin (DCX)抗体(Abcam)、成熟神経細胞は抗 NeuN 抗体(Chemicon)を用いた。アストロサイトは抗 glial fibrillary astrocytic protein (GFAP)抗体(DAKO)を用いた。

また発症後 2 日目から 5 日間、腹腔内に Bromodeoxyuridine (BrdU) 50 mg/kg/day 投与し、発症後 1、2、3、4 週目に同様の方法でラットから脳を摘出し、病変部および神経組織幹細胞領域について連続冠状切片を作成した。細胞増殖は、抗 BrdU 抗体(Roche)と抗 Ki-67 抗体(DAKO)を用いて免疫染色を行った。

(4) 血管新生(再生)および神経新生(再生)因子と炎症性サイトカイン

発症前、発症後の時間をおって、血漿中および脳組織(発症病変部と SGZ と SVZ)ホモジネート上清、また CSF 中の CXCL12 (R&D Systems)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Promega)、VEGF(American Research Products)、epidermal growth factor (EGF) (Assay Biotechnology)、insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (R&D Systems)、fibroblast growth factor basic (FGF-basic FGF-2) (R&D Systems)、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (Endogen)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) (R&D Systems)について ELISA 法により測定した。

(5) 脳組織酸化ストレスと NO 産生

酸化ストレスの指標として活性酸素種産生酵素 NADPH oxidase 活性をルシゲニンを使った化学発光法で測定した。NO 産生量は NO の安定化物 Nitrate/Nitrite を測定した(Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay kit; Cayman Chemical)。

(6) 骨髄細胞の細胞老化

骨髄の凍結切片を作成し、細胞老化に関連して発現する β -galactosidase 活性を組織学的に検討した (Dimri GP, et al., 1995) (BioVision)。

(7) 統計学的検討

実験値は平均値 \pm 標準誤差として表した。統計処理は、2 群間の比較は Student's *t* 検定により行った。危険率 5%以下を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) 運動負荷実験と神経学的機能試験

非運動 SHRSP は、生後約 70 日から 80 日目頃に脳卒中を発症し、150 日目頃にはほぼ全個体が死亡した。一方、6 週齢から自発運動を行うと、脳卒中の発症が有意に遅延し、生存率も著明に改善した。運動開始の時期を変えて、運動の有効性を生存率と神経学的機能試験によって検討したところ、発症後に運動を開始した実験群においても、発症後 2 日目までは、発症前 6 週齢から運動させた実験群と有意な差を認めず、非運動群に比し生存率の有意な延長を認めた(図 1)。

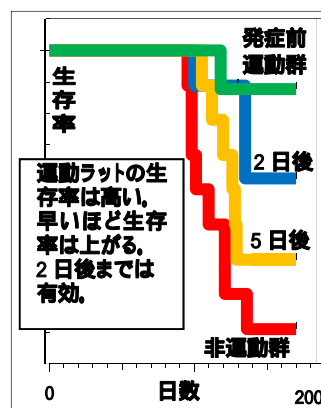


図 1 . 運動開始時期と生存率延長効果

次に、これらの実験群の神経学的機能試験を新奇物体認識試験と Y 字迷路試験によって評価した(図 2、図 3)。生存率に対する運動効果の成績と同様に、発症後 2 日目運動開始群においても運動期間の長さと同様に神経学的機能は改善を認めた。

病理学的検討をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色と神経幹細胞分化マーカーに対する抗体を用いて免疫化学染色を行い検討した。運動ラットでは、脳傷害部は活性化アストロサイトによるグリア瘢痕が形成される発症後 2 週目までに、抗 NeuN 抗体陽性の新

生神経細胞でほぼ完全に修復されているのが観察された（図4、図5）。また、従来の多くの脳傷害後の神経新生の報告は、MCAOモデルや側脳室下脳室内にEGFやFGF-2を投与することにより、側脳室下帯の幹細胞域から線条体や海馬で神経幹細胞の活性化とそれに引き続く成熟神経細胞への分化（Arvissaaon A., et al., 2002; Nakatomi H., et al., 2002）に関するもので、大脳皮質における神経新生は一定の見解が得られていない。

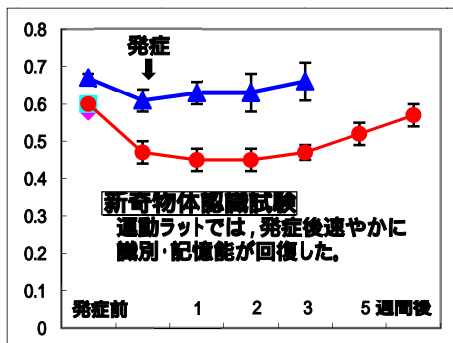


図2．新奇物体認識試験（短期記憶能）

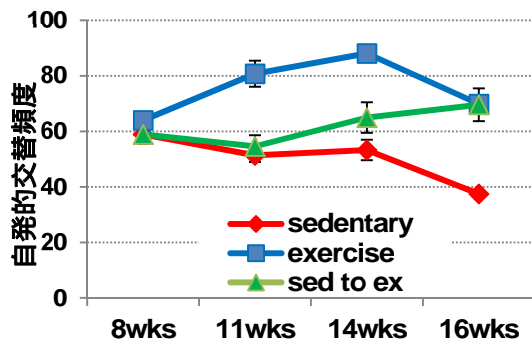


図3．Y字迷路試験(空間認知・短期記憶能)

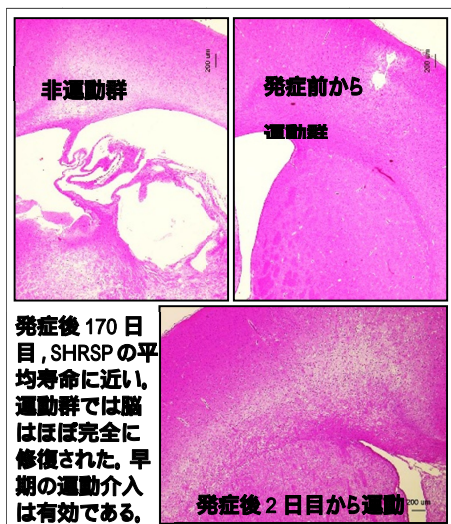


図4．発症後170日目の脳病変部のHE所見
一方、我々のSHRSP脳傷害後の自発運動に

よる神経新生は、慢性的な全身性および血管炎症によって脳卒中が生じたものであり、大脳皮質においても成熟神経細胞への分化が認められた。さらに神経新生の時間に一致して神経学的機能の改善も認められた。

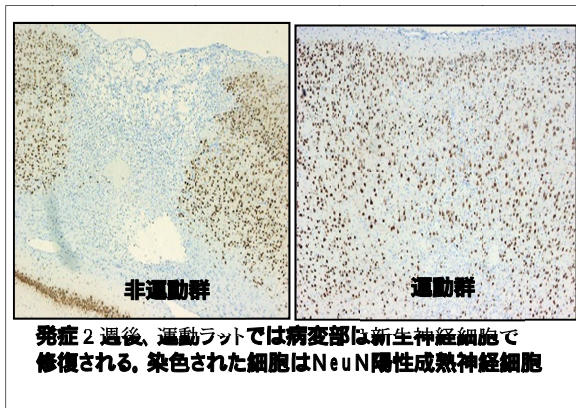


図5．発症2週後の大脳皮質における抗NeuN抗体陽性成熟神経細胞の増殖

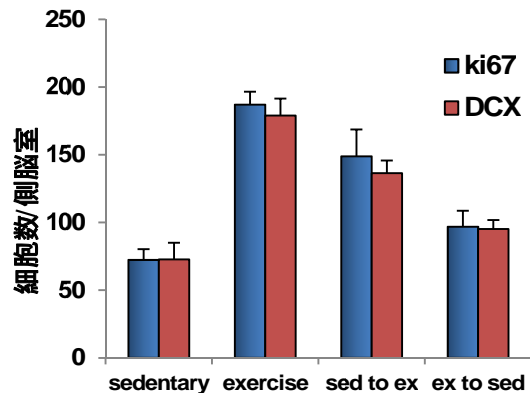


図6．発症2週後の側脳室下帯神経幹細胞域の神経前駆細胞の増殖と分化

成体脳神経幹細胞域の側脳室下帯の神経幹細胞の増殖(抗ki67抗体)と神経前駆細胞(抗DCX抗体)への分化を1側脳室あたりの免疫組織染色の陽性細胞を数えて解析した。発症2日後の実験群においても、発症前運動群よりは少ないものの非運動群に比し、有意な増殖と分化活性が認められた。

また、側脳室周囲に加え、成体正常脳ではほとんど検出できない第3脳室周囲の上皮細胞下に胎生期および幼若期に認められるGFAP陽性の神経幹細胞様の細胞増加も確認され、運動により脳卒中後の神経新生の修復機構が活性化していることが示唆された。

(2) 神経成長因子の産生

神経幹細胞の増殖に關与するEGF、FGF-2、IGF-1、幹細胞や前駆細胞の生存や成長また骨髄からの血管系幹細胞と間葉系細胞の遊走因子であるCXCL12、神経前駆細胞の生存や分化に重要とされるBDNFについて、血漿中、脳脊髄液(CSF)および脳組織の幹細胞

域と傷害部の組織上清で産生量を測定した。

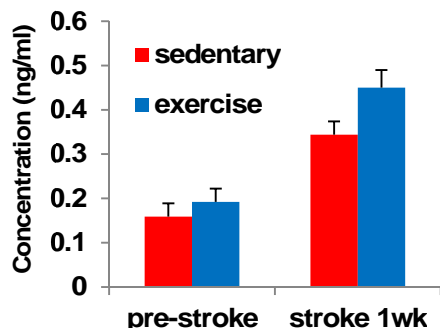


図7 . CSF 中の CXCL12 産生量

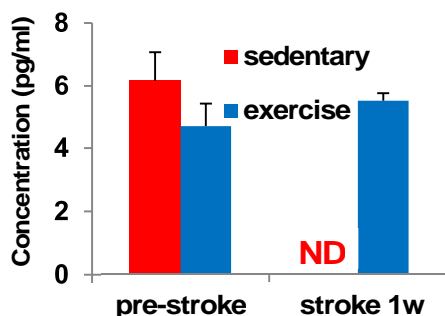


図8 . CSF 中の FGF-2 産生量

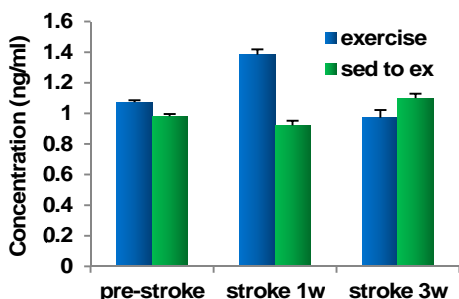


図9 . 発症後運動群の血漿中 CXCL12 産生量

図7、図8、図9はCXCL12とFGF-2産生量の成績である。運動ラットでは発症後1週目までに成長因子の産生増加が認められた。また発症後運動群においても運動期間の長さとともに産生が増加した。脳組織の幹細胞域や傷害部組織ホモジネート上清においても同様の傾向が認められた。EGFやIGF-1、BDNFについてもCSF、血漿または脳組織中で、運動群において神経成長因子の発症後早期の産生増加を認めた。

(3) 炎症性サイトカインとNO産生

発症後2週目の脳皮質組織ホモジネートの活性酸素種産生量を測定した。非運動群では約120 counts/min/mg proteinの産生量に対し、運動群では約40 counts/min/mg proteinの産生量であった。また脳病変部の炎症性サ

イトカインのMCP-1産生量は、発症1週目で、非運動ラットは1100 pg/mg proteinに対し、運動ラットでは400 pg/mg proteinに低下した。TNF- α 産生量は、非運動ラットが2 pg/mg proteinであったのに対して、運動ラットでは1.2 pg/mg proteinと著明に抑制されていた。

また、炎症所見を示す色素を用いた血管透過性の検討および脳組織水分含量の検討結果(図10)も運動による炎症反応の改善効果を支持した。

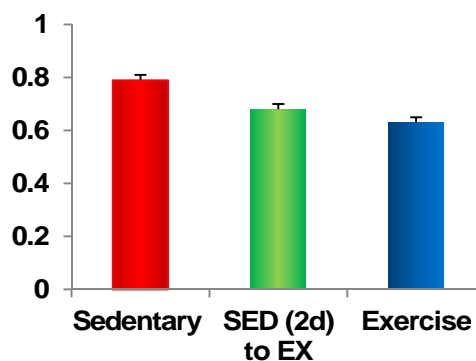


図10 . 発症4週後の脳組織の水分含量

血管内皮細胞由来NOは、血管拡張作用や抗炎症作用、細胞保護作用をもつことはよく知られている。我々は脳皮質組織から微小血管を集め、内皮型NO合成酵素の発現ならびにリン酸化が、運動ラットで有意に増加することを発表している。今回L-アルギニンを投与してNO産生量を増加させたラットは、発症前投与群、発症後投与群の両実験群において、非運動群より有意な生存率の上昇を認めた。

またアルギニン投与によって、側脳室下帯における脳卒中発症後の神経幹細胞/前駆細胞の増殖と分化が、非運動ラットに比し有意に増加し、病変部のnestin陽性神経幹細胞およびCD34陽性の血管新生も増加した(図11)。血管新生および神経新生においてNO産生増加が、脳内微小循環障害を改善して細胞保護作用に参与している可能性がある。

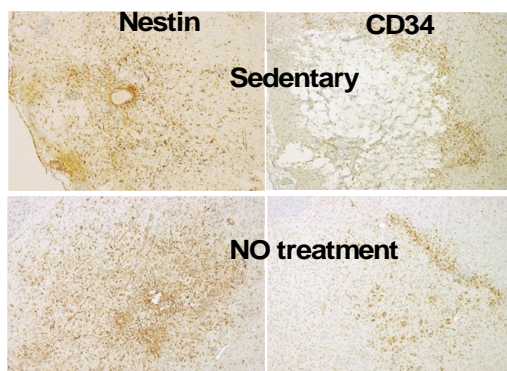


図11 . 発症後3週目の病変部

これらの成績から脳内組織の炎症反応の抑制が神経新生の重要な因子であると考えられた。

(4) 骨髄細胞の細胞老化

骨髄細胞の細胞老化を β -galactosidase 染色で検討した。非運動ラットでは、発症前から骨髄細胞中に β -galactosidase 陽性細胞が増加していた。一方、運動ラットの骨髄細胞には陽性細胞はほとんど検出されなかった。臨床的にも末梢血管系幹細胞の減少が脳血管系疾患の増加と関連しているということが報告されている(Nakano-Doi A., et al., 2010)。運動による骨髄由来血管系幹細胞(あるいは間葉系細胞)の細胞若返りは脳微小循環や内在性神経修復機構の活性化に重要な因子の一つであると考えられる。

神経栄養因子は脳傷害後、2日目から1週目頃に上昇し、この増加にほぼ一致して神経幹細胞、前駆細胞の増殖と分化・成長が認められた。運動は全身性の炎症反応を抑制し、神経細胞 - 血管系細胞 - グリア細胞連関における時間的な要因を調整できる可能性がある。

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)

Hayasaka N, Nagai N, Kawao N, Niwa A, Yoshioka Y, Mori Y, Shigeta H, Kashiwagi N, Miyazawa M, Satou T, Higashino H, Matsuo O, Murakami T. *In vivo* diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke, PLoS One. 2012; 7(2); e32342. DOI: 10.1371/journal.pone.0032342 査読有

[学会発表](計 3 件)

丹羽淳子、Voluntary exercise enhances neurogenesis in hypothalamus after stroke、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 21 日、仙台

丹羽淳子、Intervention with L-arginine promotes angiogenesis and neuroblast proliferation with stroke recovery、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡

丹羽淳子、Long-term voluntary exercise improves the efficacy of cerebral angiogenesis and neurogenesis in stroke-prone genetically hypertensive rats、第 85 回日本薬理学会年会、2012 年 3 月 15 日、京都

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

(3) 連携研究者

早坂 直人 (HAYASAKA, Naoto)
山口大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：80368290