

令和 6 年 4 月 19 日現在

機関番号：17701
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20H04039
研究課題名（和文）脳梗塞前後のコンディショニングによる神経保護機序の解明と脳卒中リハビリへの応用

研究課題名（英文）Adaptation of the neuroprotective mechanism by conditioning after cerebral ischemia and its application to stroke rehabilitation

研究代表者
榊間 春利（Sakakima, Harutoshi）

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：10325780
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題により、プレコンディショニング運動（PE）や遠隔虚血コンディショニング（RIC）による脳神経保護メカニズムについて検討した。PEによる神経保護効果は、運動中止するとPEを実施した期間より早期に消失することを示した。RICの介入は、再還流の時間が脳保護効果に影響している可能性が示唆された。脳梗塞後の運動療法と人参養栄湯の併用は、脳内のNGF/TrkA、BDNF/TrkB経路の活性化を介して、運動機能回復を促進することが示唆された。認知症発症初期からのPEは、海馬の神経細胞の脱落抑制、抗神経炎症作用により認知機能だけでなく活動性や運動機能改善に効果が期待できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
脳梗塞発症前・後のPE、RIC、運動療法による脳神経保護メカニズムや認知・機能回復促進効果、リハビリテーション処方に重要である効果的な負荷量、頻度、時間などに関しては十分解明されていない。また、運動習慣の有無による脳保護効果、認知機能に及ぼす影響、運動機能改善効果、RICとPEの併用効果、薬剤と運動療法の併用効果などにも十分解明されていない。従って、本研究成果の学術的意義や社会的意義は、運動や遠隔虚血コンディショニングによる神経保護メカニズムを解明し、脳卒中リハビリテーションや認知症に対する予防リハビリテーションの科学的根拠を確立したことである。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we investigated the mechanisms of neuroprotection by pre-conditioning exercise (PE) and remote ischemic conditioning (RIC). Preconditioning exercise-induced neuroprotective potential may be lost shortly after exercise cessation. The duration of reperfusion may affect the brain protective effect. Notably, RPerC with a reperfusion time of approximately 10 min exerts its neuroprotective effects via an anti-apoptotic mechanism. Ninjin'yoeito (NYT) in combination with exercise provides neuroprotective effects and improves sensorimotor function by stimulating NGF/TrkA and BDNF/TrkB, and by activating the Akt pathway in ischemic stroke of rats. Low-intensity motor balance and coordination exercise prevented age-related cognitive decline in the early stage of AD progression, possibly through the suppression of hippocampal A β deposition, neuronal loss, oxidative stress, and neuroinflammation, including reduced M1 and A1 phenotypes microglia and astrocytes.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：運動 遠隔虚血コンディショニング 脳神経保護 リハビリテーション 機能回復 神経炎症 漢方薬 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

虚血性神経障害や脳卒中などは中高年で発症頻度が増加する。このため脳血管障害の予防や治療はリハビリテーション医学において重要な課題である。しかしながら、脳虚血による神経障害は多数の因子が相互に作用し進展するため、治療対象として単独のタンパクやシグナル伝達系の調節を行う事ではその効果に限界があり、複数の因子を一度に調節する治療が有効であると考えられる。これが可能な方法として遠隔虚血コンディショニング(Remote ischemic conditioning: RIC)による脳虚血耐性の獲得がある。さらにリハビリテーション領域では発症前の有酸素運動 (Pre-conditioning Exercise : PE) により脳神経保護効果が期待できることも報告されている。

細胞内には内在性保護因子が多数存在し、脳虚血などの病態から細胞を保護するために活性化される。リハビリテーションは運動トレーニングによって生来の内在性保護因子を活性化させ、神経保護、機能改善、運動学習、可塑性を発揮させる事が重要になる。コンディショニングは多くの内因性の保護因子を上方調整し、脳血管性障害や認知症に対してニューロンやアストロサイトに耐性を与え神経保護、運動機能や認知機能の改善効果を得ることができる。しかし、PE や RIC による脳神経保護メカニズムや効果的な負荷量、頻度、時間などに関しては十分解明されていない。

我々は以下の(1)～(4)の観点から、PE や RIC による脳神経保護メカニズムや効果的な負荷量、頻度、時間を明らかにした。ここでは、今回の研究助成による研究成果について報告する。

- (1) PE 中止後の時間経過が脳保護効果に及ぼす影響について
- (2) RIC の駆血と再還流時間の違いが脳保護効果に及ぼす影響について
- (3) 脳梗塞後の漢方薬 (人參養榮湯) と運動療法の併用が脳保護効果に及ぼす影響について
- (4) 加齢に伴う認知機能低下に対する PE の脳保護効果について

2. 研究の目的

本研究の目的は、PE と RIC による脳梗塞および Alzheimer 病に対する脳保護効果や認知機能改善効果、さらに脳卒中後の運動療法による機能改善効果とそのメカニズムを明らかにし、脳保護を考慮したリハビリテーションへの新規の治療戦略を開発することである。

3. 研究の方法

(1) PE 中止後の時間経過が脳保護効果に及ぼす影響について

7週齢の Sprague-Dawley (SD) ラットを用いて、3週間の PE を実施後、運動を中止し、運動中止3日後、1週後、2週後、3週後に左中大脳動脈領域の脳梗塞を作製した。脳梗塞は頸部を正中切開し、内頸動脈からフィラメントを挿入して、中大脳動脈起始部を60分間虚血した。その後フィラメントを抜去して再還流を行い、虚血再還流モデルを作製した。運動中止期間の影響を調べるために、脳梗塞体積、神経学的所見、行動学的評価 (tape removal task, beam walking score, rotarod walking time) を実施した。さらに脳梗塞周辺における BDNF、Bax、Caspase-3、HIF-1 α 、GFAP、P2X7R の発現を免疫組織化学的およびウエスタンブロット法により調べた。

(2) RIC の駆血と再還流時間の違いが脳保護効果に及ぼす影響について

RIC は RIp_{re}C、RIp_{er}C、RIp_{ost}C 3つのカテゴリーに分類される。今回、脳虚血中に実施される RIp_{er}C における駆血再還流時間の違いが急性期脳梗塞後の脳保護効果に及ぼす影響について検討した。7週齢の SD ラットを用いて、上記の方法で60分間の虚血と再還流により左中大脳動脈における脳梗塞を作製した。RIC は脳虚血中に両側後肢の大腿部にカフを巻いて、180-200mmHg の圧をかけ駆血を行い、その後圧を除去して再還流を行った。この操作を合計3回行った。RIC の方法は 10分間の駆血と5分間の再還流 (p-10/5群)、10分間の駆血と10分間の再還流 (p-10/10群)、5分間の駆血と10分間の再還流 (p-5/10群) の3群に分け、脳梗塞巣の縮小効果、感覚・運動機能、BDNF、Bcl-2、Bax、Caspase-3、の発現を免疫組織化学的およびウエスタンブロット法により調べた。さらに、アポトーシス細胞を調べるために TUNEL 染色を行った。RIp_{er}C を実施せずに脳梗塞を作製した群 (No-per 群) と比較した。

(3) 脳梗塞後の漢方薬 (人參養榮湯) と PE の併用が脳保護効果に及ぼす影響について

成熟ラットを用いて、60分間の虚血再還流による脳梗塞モデルを作製した。脳梗塞1日後より通常飼料に人參養榮湯エキス末1% (NYT; TJ-108; 株式会社ツムラ) を混餌投与した。運動療法との併用を検討するため、脳梗塞3日後より20分/日、8~15m/分、5日/週のトレッドミル運動を4週間実施した。脳梗塞群 (IR 群)、人參養榮湯群 (NYT 群)、運動群 (Ex 群)、人參養榮湯 + 運動群 (NYT + Ex 群)、正常群 (Control 群) の5群に分けて比較検討した。飼料の摂取量は一

匹あたり 16~24g/日であり、実験期間内の総摂取量に統計学的な群間差は認めなかった。4 週後に感覚・運動機能を beam walking score、rotarod walking time、tape removal task で評価した。脳梗塞体積は非損傷側半球に対する割合で算出した。また運動野における神経栄養因子の発現を調べた。

(4) 加齢に伴う認知機能低下に対する PE の脳保護効果について

老化促進マウス (SAMP8) はアルツハイマー病モデルマウスとしても知られ、加齢に伴い認知機能低下や活動性の低下を生じる。そこで、認知症発症初期である 7 ヶ月齢から 10 週間 PE 介入 (25rpm) を行い 9 ヶ月齢において認知機能に及ぼす影響を調べた。ロータロッドを用いた協調的な運動を週 5 回 2 ヶ月間行い、運動機能評価、海馬における A β 発現、免疫応答 (Iba-1, GFAP)、NeuN、BDNF、炎症性マーカー、酸化ストレスの発現を免疫組織化学的およびウエスタンブロット法により調べた。さらに、SAMP8 は 7 ヶ月齢から認知機能低下を認めたので、認知症発症前の 3 ヶ月齢から 2 ヶ月間ロータロッドによる同様の運動を行い、その後 4 ヶ月間運動を中止する群 (4M-detraining 群) 5 ヶ月齢から 2 ヶ月間運動を行い、その後 2 ヶ月間運動を中止する群 (2M-detraining 群) 3 ヶ月齢から 9 ヶ月齢までの 6 ヶ月間、長期間運動を行う群 (LT-Ex 群) 実験期間中運動介入を行わない群 (No-Ex 群) 正常老化を示す SAMR1 (Control 群) の 5 群に分類し、認知機能や海馬における変化を観察した。

4. 研究成果

(1) PE 中止後の時間経過が脳保護効果に及ぼす影響について

3 週間の PE は有意に脳梗塞巣の体積や感覚・運動機能を改善した。これらの有益な効果は運動中止 2 週間まで観察されたが、3 週間には観察されなかった (図 1)。虚血脳における BDNF の発現は運動中止後 3 日まで有意に増加していた。一方、運動中止後 2 週まで HIF-1 α 、GFAP、P2X7R の発現の有意な増加や Caspase-3 の発現の減少が観察された (図 2)。これらの内因性保護因子の発現増加は、運動中止 3 週間には消失しており、抗アポトーシス効果は運動中止 3 週間には観察されなかった。今回の結果は PE によって生じた神経保護効果は、運動中止すると、PE を実施した期間より早期に消失することを示した。

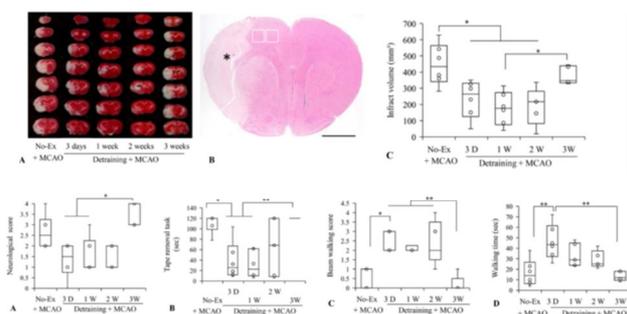


図1.上段：脳梗塞体積の変化 下段：感覚運動機能の変化

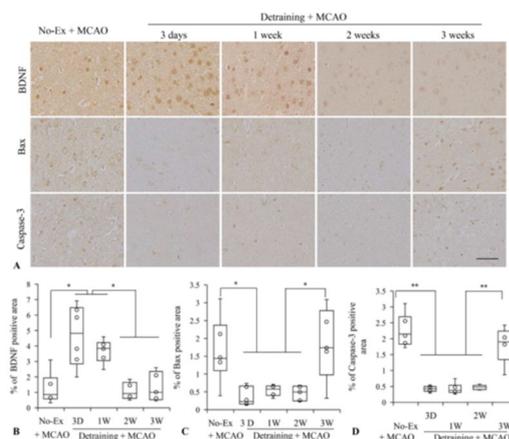


図2. 脳梗塞周囲における BDNF、Bax、Caspase-3 の発現

(2) RIC の駆血と再還流時間の違いが脳保護効果に及ぼす影響について

No-per 群と比較して、p-10/10 群と p-5/10 群は脳梗塞巣の大きさが有意に縮小し、感覚・運動機能の改善、Bax や Caspase-3 の発現が減少した。さらに、TUNEL 陽性細胞も減少した (図 3, 4)。一方、BDNF や Bcl-2 の発現は、p-10/10 群と p-5/10 群で増加した。今回の結果は、再還流の時間が脳保護効果に影響している可能性を示唆した。特に、約 10 分間の再還流時間による RIperC が抗アポトーシスメカニズムを介した神経保護効果を発揮していることが示唆された。

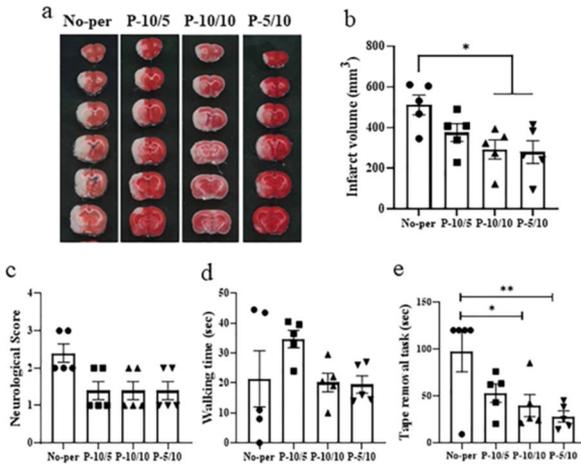


図3. 脳梗塞巣の体積と感覚運動機能の変化

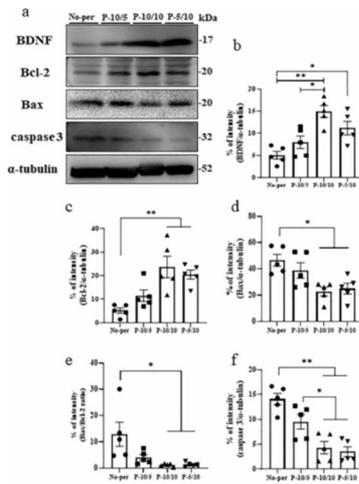


図4. BDNF/Bcl-2/Bax/Caspase-3経路のRlperCの影響

(3) 脳梗塞後の漢方薬（人參養栄湯）とPEの併用が脳保護効果に及ぼす影響について

脳梗塞後に感覚・運動機能の低下を認めたが、人參養栄湯（NYT）群や運動（Ex）群で改善を示した。一元配置分散分析による脳梗塞体積の検定ではNYT単独投与では統計学的な有意差は認められなかったが、NYTとExの併用群で有意な脳梗塞縮小効果が認められた（図5）。脳内におけるNGFやBDNF、そのレセプターであるTrkAとTrkBのタンパク発現をウエスタンブロット法にて観察すると、NYT群の脳内NGF発現量は増加していた。さらにExとの併用でNGFとBDNF、そのレセプターの発現は有意に増加し、同時にpAkt/Aktの割合もNYTとExの併用群で有意に増加していた（図6）。これらの結果は、脳梗塞後の運動機能低下に対する運動療法とNYTの投与は運動機能回復を促進し、その作用メカニズムには脳内のNGF/TrkA、BDNF/TrkBとその下流にあるPI3/Aktシグナル伝達経路の活性化が関与していることを示唆した。

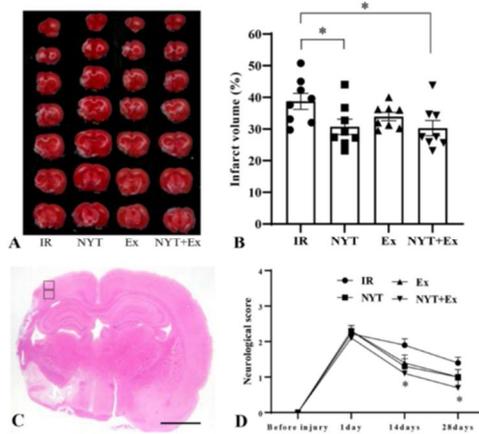


図5. 人參養栄湯と運動が脳梗塞体積や神経学的所見に及ぼす影響

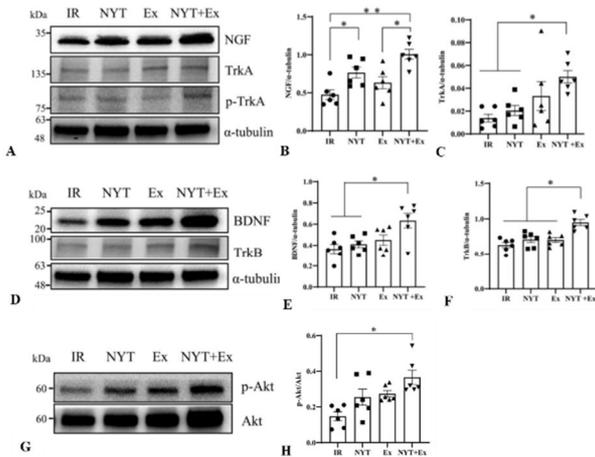


図6. 人參養栄湯と運動によるNGF, BDNF, TrkA, TrkB, pAkt/Aktの発現

(4) 加齢に伴う認知機能低下に対するPEの脳保護効果について

非運動群と比較して運動群は、有意に認知機能低下が予防でき、同時に活動性や運動機能の改善も認めた。海馬における変化を観察すると、海馬におけるアミロイド陽性細胞は運動群で有意に減少していた（図7）。さらにNeuN陽性細胞数やBDNFの発現が運動群で有意に増加していた。Iba1やGFAPは運動群で有意に減少しており、これは、運動が海馬における神経炎症を軽減させたことを示唆している。また、ミクログリアの表現型には、炎症を促進するM1型と抗炎症性に作用するM2型に大別でき、M1型マーカーであるTNFやiNOSは運動によって有意に減少した（図8）。さらに、認知症発症前からの長期間の運動は海馬の神経細胞の脱落抑制、BDNF発現増加、神経炎症や酸化ストレスの軽減を介して認知機能低下を予防した（図9）。しかし、運動を中止すると認知機能改善効果は時間依存的に減少した（図10）。また、海馬における抗炎症作用は時間依存的に消失していった。

これらの研究結果は、認知症発症初期からの運動療法は認知機能だけでなく活動性や運動機能改善に効果が期待でき、その脳内メカニズムとして、海馬のアミロイドの集積抑制、神経細胞の脱落抑制、抗神経炎症作用、酸化ストレス軽減、M1型ミクログリアの分極化が関与してい

ること示唆した。しかし、たとえ発症前から運動習慣を持っていたとしても、運動を中止してしまうと運動の有益な効果は時間依存的に消失し、同時に認知機能低下の予防効果も減少することが示された。

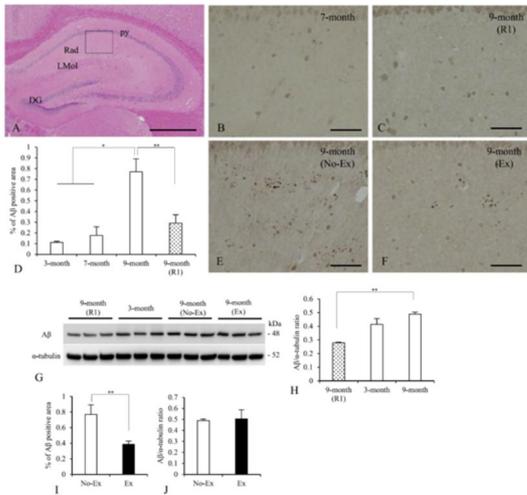


図7. SAMP8の海馬におけるAβの集積と運動による影響

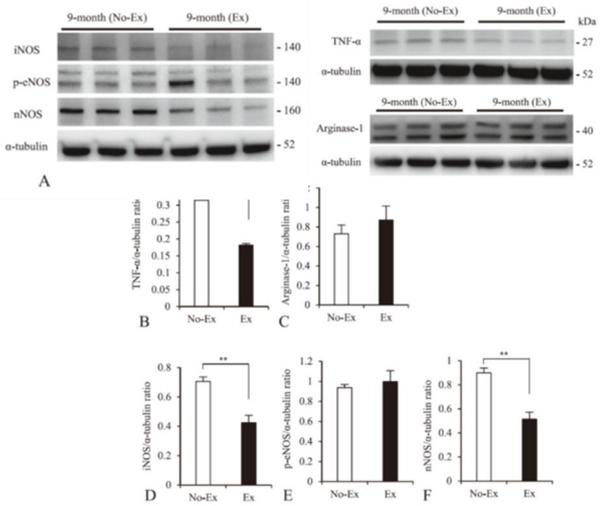


図8. SAMP8の海馬における炎症性因子、酸化ストレスの変化

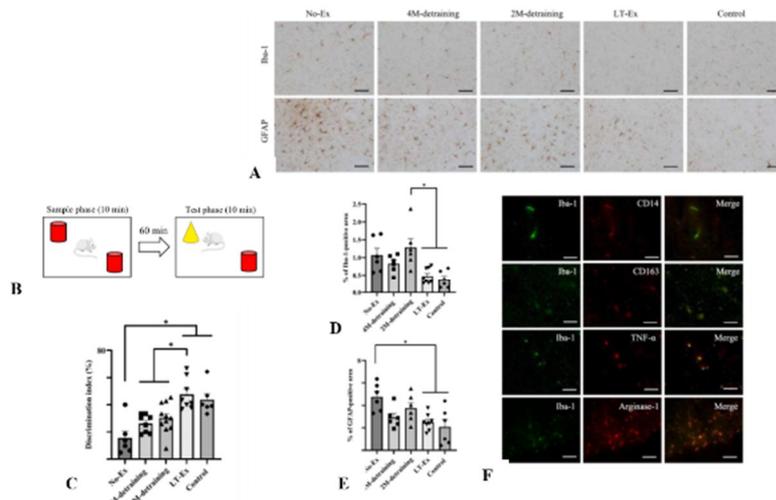


図9. 運動中止がSAMP8のSAMP8の認知機能やIba1やGFAP発現に及ぼす影響

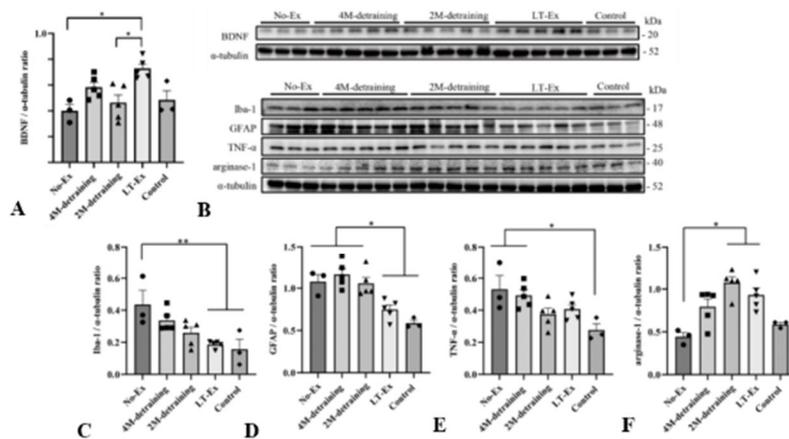


図10. 運動中止がSAMP8の海馬におけるBDNF、Iba-1、GFAP、TNF-α、Arginase-1の発現に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Tani A, Sakakima H, Otsuka S, Mizuno K, Nakanishi K, Norimatsu K, Takada S, Matsuoka T, Matsuzaki R, Nakakogawa T, Maruyama I. | 4. 巻 302 |
| 2. 論文標題 Stimulation of functional recovery via neurorepair mechanisms by the traditional Japanese Kampo medicine, Ninjin'yoeito, and physical exercise in a rat ischemic stroke model | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Ethnopharmacology | 6. 最初と最後の頁 115927 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jep.2022.115927. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Otsuka S, Itashiki Y, Tani A, Matsuoka T, Takada S, Matsuzaki R, Nakanishi K, Norimatsu K, Tachibe Y, Kitazato R, Nojima N, Kakimoto S, Kikuchi K, Maruyama I, Sakakima H. | 4. 巻 13(1) |
| 2. 論文標題 Effects of different remote ischemia preconditioning methods on cerebral infarct volume and neurological impairment in rats | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Scientific reports | 6. 最初と最後の頁 2158 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29475-2 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Otsuka S, Sakakima H, Tani A, Nakanishi K, Takada S, Norimatsu K, Maejima H, Maruyama I. | 4. 巻 226 (7) |
| 2. 論文標題 Effects of detraining on preconditioning exercise-induced neuroprotective potential after ischemic stroke in rats | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Brain structure and function | 6. 最初と最後の頁 2169-2180 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00429-021-02317-5. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Otsuka S, Setoyama K, Takada S, Nakanishi K, Terashi T, Norimatsu K, Tani A, Sakakima H, Maruyama I, Tancharoen S, Tanaka E, Kikuchi K. | 4. 巻 58 (11) |
| 2. 論文標題 Preconditioning exercise in rats attenuates early brain injury resulting from subarachnoid hemorrhage by reducing oxidative stress, inflammation, and neuronal apoptosis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular neurobiology | 6. 最初と最後の頁 5602-5617 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-021-02506-7. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Nakanishi K, Sakakima H, Norimatsu K, Otsuka S, Takada S, Tani A, Kikuchi K. | 4. 巻 337 |
| 2. 論文標題 Effect of low-intensity motor balance and coordination exercise on cognitive functions, hippocampal A β deposition, neuronal loss, neuroinflammation, and oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Exp Neurol. | 6. 最初と最後の頁 113590 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Nakanishi Kazuki, Norimatsu Kosuke, Tani Akira, Matsuoka Teruki, Matsuzaki Ryoma, Kakimoto Shogo, Nojima Nao, Tachibe Yuta, Kato Yuki, Inadome Masaki, Kitazato Riho, Otsuka Shotaro, Takada Seiya, Sumizono Megumi, Sakakima Harutoshi | 4. 巻 808 |
| 2. 論文標題 Effects of early exercise intervention and exercise cessation on neuronal loss and neuroinflammation in a senescence-accelerated mouse prone 8 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience Letters | 6. 最初と最後の頁 137297 ~ 137297 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2023.137297 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 大塚 章太郎, 松岡輝樹, 松崎凌真, 中小川智美, 谷明, 則松貢輔, 高田聖也, 中西和毅, 丸山征郎, 榎間春利, 菊池清志 |
| 2. 発表標題 Preconditioning exercise in rats attenuates early brain injury resulting from subarachnoid hemorrhage by reducing oxidative stress, inflammation, and neuronal apoptosis. |
| 3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tani A, Nakanishi K, Otsuka S, Norimatsu K, Takada S, Matsuoka T, Sakakima H |
| 2. 発表標題 Stimulation of functional recovery via the mechanisms of neurorepair by Japanese herbal medicine, Ninjinyoeito, and physical exercise in a rat ischemic stroke model. |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nakanishi K, Norimatsu K, Otsuka S, Takada S, Tani A, Sakakima H. |
| 2. 発表標題 Effects of low-intensity balance and coordination exercise on cognitive function, hippocampal Aβ deposition, neuronal loss, neuroinflammation, and oxidative stress in SAMP8. |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shotaro Otsuka, Akira Tani, Yuki Itashiki, Kosuke Norimatsu, Seiya Takada, Kazuki Nakanishi, Maruyama Ikuro, Harutoshi Sakakima. |
| 2. 発表標題 Effects of detraining on neuroprotective effects due to preconditioning exercise-induced brain tolerance after ischemic stroke of rat. |
| 3. 学会等名 第43回日本神経科学学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akira Tani, Yuki Itashiki, Shotaro Ohtsuka, Seiya Tankada, Kazuki Nakanishi, Kosuke Norimatsu, Harutoshi Sakakima. |
| 2. 発表標題 The neuroprotective effects of remote ischemic per-conditioning on focal brain ischemia of rats. |
| 3. 学会等名 第43回日本神経科学学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 丸山 征郎 (Maruyama Ikuro) (20082282) | 鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授 (17701) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 前島 洋 (maejima Hiroshi) (60314746) | 北海道大学・保健科学研究所・教授 (10101) | |
| 研究分担者 | 菊池 清志 (Kikuchi Kiyoshi) (60404539) | 久留米大学・医学部・准教授 (37104) | |
| 研究分担者 | 大塚 章太郎 (Otsuka shotaro) (80849901) | 鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教 (17701) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |