

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 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：23500629

研究課題名(和文)脳外傷後の長期間運動による神経再生促進効果の研究

研究課題名(英文)Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury

研究代表者

伊藤 龍生 (ITO, Tatsuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40330245

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)：ラット脳外傷モデルを用いて運動による神経保護作用を調べた。脳外傷後の早期に損傷部位周囲でssDNA陽性細胞数は運動群では非運動群に比較し有意な減少を認めた。非運動群では多数のssDNAとNeuNの二重染色陽性細胞が多数であったが運動群では少数であった。外傷後の慢性期において運動群で非運動群に比較しNeuN陽性細胞数で有意な増加を認めた。外傷後の脳機能評価において運動群で有意な改善効果が認められた。運動は脳外傷後に神経保護作用を有することが示された。加えて、脳外傷後に起こる脳機能不全を運動は有意に改善する。脳外傷における脳機能不全の治療においても運動は非常に有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：we investigate the effect of exercise on morphology and cerebral function following TBI in rats. Wistar rats received TBI by a pneumatic controlled injury device and were randomly divided into two groups: 1) non-exercise group and 2) exercise group. The exercise group ran on a treadmill. Immunohistochemical and behavioral studies were performed following TBI. The number of ssDNA-positive cells early after TBI was significantly reduced in the exercise group. Furthermore, most ssDNA-positive cells in the non-exercise group co-localized with neuronal cells. However, in the exercise group, few ssDNA-positive cells co-localized. In addition, there was a significant increase in neuronal cell number and improvement in cerebral dysfunction after TBI in the exercise group. These results indicate that exercise following TBI inhibits neuronal apoptotic cell death, which results in an improvement of cerebral dysfunction.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学

キーワード：リハビリテーション 神経再生 運動 脳外傷 高次脳機能改善

1. 研究開始当初の背景

脳外傷は全米の疫学的調査によれば毎年150万人が受傷し、米国人口の約2%、530万人が脳外傷を原因とした障害を持って生活しているとされている[1]。日本では交通事故や不慮の事故による脳外傷による死亡は年3.9万人であり死亡総数の4.1%を占める[1]。さらに頭部外傷は近年の治療の進歩により、救命はされたものの障害や後遺症を有する症例が死亡者数よりはるかに多く、死亡者数の2~10倍以上の外傷後遺症を有する患者が存在すると推測されている。このように脳外傷は社会的影響の極めて大きい傷害であり、脳外傷後の脳障害や神経障害の軽減を目指す臨床的アプローチの開発は非常に重要な課題である。

2. 研究の目的

申請者らは脳外傷後の早期の運動が外傷局所で神経幹細胞数を増加させることを明らかにした。さらに外傷後、早期から長期にわたる運動が脳外傷後に出現する神経幹細胞から成熟神経細胞への分化・生存・維持を促進し、脳外傷後に起こる脳障害や記憶障害を改善するであろうと考えた。本研究では長期にわたる運動が及ぼす脳外傷部局所の神経再生を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作製

Pneumatic control injury device を用いて Wistar ラット (10 週齢) に脳外傷を与え、脳外傷ラットを作製した。

(2) 運動方法

脳外傷ラットを任意に非運動群及び運動群の二群に分ける。運動群のラットには1日、1回 (1回/15分)、速度 15m/分の強制運動 (トレッドミル) を7日間連続で行った。

(3) 記憶学習の回復効果

トレッドミル終了後 (損傷後7日後) に非運動群及び運動群について water maze 試験を行った。

(4) 免疫組織染色

損傷後1,3,7日後 (トレッドミル終了後) に非運動群および運動群のラットを4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、脳を取り出し、損傷最大径の部分より20 μ mの連続切片を作製した。連続切片3枚ずつをssDNA及びNeuN抗体で免疫染色し、損傷周囲に発現しているそれぞれの陽性細胞数を対物20倍の顕微鏡下で計数した。

(5) ssDNA と NeuN に関する二重染色

損傷後3日の運動群及び非運動群の切片を用いてssDNAとNeuNの蛍光二重染色を行った。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察及び写真撮影を行い、運動群及び非運動

群の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 運動による記憶学習回復効果

プラットホームへの到達時間は sham 群及び運動群に比較し非運動群で有意に増加した ($P < 0.05$, 図1)。しかしながら sham 群と運動群では差は見られなかった (図1A)。さらにスイム距離においても sham 群及び運動群に比較し非運動群で有意に増加した ($P < 0.05$, 図1B) が sham 群及び運動群では差は見られなかった。スイム速度では群間に差は見られなかった (図-1C)。クワドランド試験では sham 群及び運動群に比較し非運動群で有意に減少した ($P < 0.01$, 図-1C)。

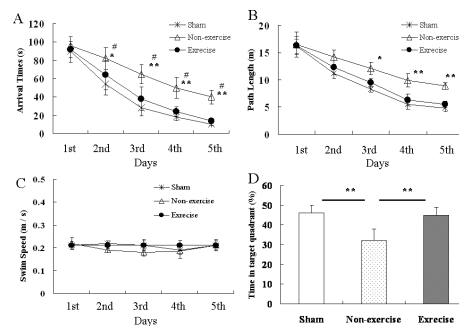


図-1 The water maze 試験

(2) ssDNA 陽性細胞数の変化

損傷後1,3,7日において非運動群では大型の神経細胞と思われる多数のssDNA陽性細胞が損傷部位周囲組織に認められた (図-2A)。しかしながら運動群では陽性細胞は少数であった (図-2B)。損傷後1,3,7日において非運動群に比較し運動群ではssDNA陽性細胞数の有意な減少が認められた ($P < 0.05$, 図-2C)。

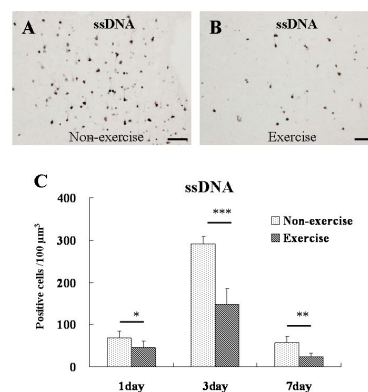


図-2 損傷後の損傷周囲における ssDNA 陽性細胞の発現

(3) NeuN 陽性細胞数の変化

損傷後 7 日において非運動群では大型から小型の NeuN 陽性細胞が損傷部位周囲組織に認められた(図-3A)。しかしながら運動群では大型の NeuN 陽性細胞が多数認められた(図-3B)。損傷後 7 日において非運動群に比較し運動群では NeuN 陽性細胞数の有意な増加が認められた($P < 0.001$, 図-3C)。

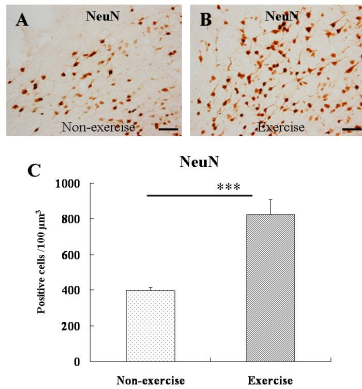


図-3 損傷後 7 日の損傷周囲における NeuN 陽性細胞の発現

(4) ssDNA と NeuN の蛍光二重染色

非運動群では多数の ssDNA 及び NeuN 陽性細胞の二重陽性細胞が認められた(図-4C)。しかしながら運動群では二重陽性細胞は少数であった(図-4F)。

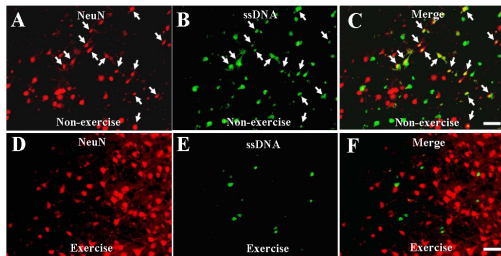


図-4 損傷後 3 日の損傷周囲における ssDNA 及び NeuN 陽性細胞の発現

(5) 考察

脳外傷後早期に損傷部位周で発現しているアポトーシスのマーカーである ssDNA 陽性細胞数が運動群で非運動群に比較して有意に減少した。さらに運動群の ssDNA と NeuN 二重染色陽性細胞が非運動群に比較し、減少していた。加えて、損傷後 7 日で運動群は非運動群に比較し NeuN 陽性細胞が有意に増加していた。脳損傷後の神経細胞は損傷早期にカスパー 3 の活性化が見られ、アポトーシスが引き起こされると報告されている[2]。さらに、最近の報告により我々は脳外傷後の損傷早期において損傷周囲部位の神経細胞はアポトーシスにより神経細胞死を起こすこと報告した[1]。また、脳虚血実験において脳虚血後、海馬の神経細胞やグリア細胞のミトコンドリアが活性化され、ミトコンドリア

からのシトクロム C 放出によりカスパー 3 の活性化が見られ、アポトーシスが引き起こされると報告されている[3]。

脳虚実験において basic fibroblast growth factor (bFGF)、NGF、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、insulin-like growth factor 1(IGF1)や Growth hormone (GH) [4]は海馬や大脳皮質神経細胞やグリア細胞質内のカスパー 9 やカスパー 3 の活性化を有意に阻害することによりアポトーシスによる神経細胞やグリア細胞の細胞死を抑制することが知られている。また、NGF や BDNF は、それぞれの受容体 TrkA や TrkB を介して MAPK のファミリーの一つである anti-apoptosis シグナルの the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt pathway を活性化し神経細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている[5]。

一方、Bcl-2 は神経細胞のミトコンドリアのシトクロム C の放出抑制やカスパー依存性アポトーシスカスケード抑制をすることによりアンチアポトーシス因子として知られている[6]。Bcl-2 の過剰発現は Bcl-2 ノックアウトマウスの虚血実験から神経保護作用を有することが報告されている[7, 8]。さらに運動はラットの脳虚血実験で Bcl-2 の発現を有意に増加させ、アポトーシスを誘導する Bax の発現を抑制し、神経細胞やグリア細胞のアポトーシスを減少させ、神経保護作用を有することが報告された[9]。

さらに運動は脳障害モデルを用いた実験で脳内において脳障害後に発生した水酸化ラジカル hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)やスーパーオキシド super oxide (O_2^-)が引き起こす酸化ストレスを減少させ、神経細胞死を抑制し記憶改善効果を有することが報告されている[10]。我々は最近の報告で脳外傷後に発生する ($\cdot\text{OH}$) やスーパーオキシド super oxide (O_2^-)が神経細胞のアポトーシスを引き起こし、ラジカルスカベンジャーが神経細胞死の保護作用をすることを報告した[10]。このことから運動が脳外傷後に発生する ($\cdot\text{OH}$) やスーパーオキシド super oxide (O_2^-)を減少させることにより神経細胞の障害が軽減され、NeuN 陽性細胞が増加したかも知れない。これらのことからまた運動が損傷後に起こる神経細胞のアポトーシスによる細胞死を阻害することにより、運動群で神経細胞数が増加したと考えられた。本実験においても運動が脳外傷後の神経細胞死に対し神経保護作用を有することが示された。

本実験においてプラットフォームへの到着時間が運動群で非運動群に比較して、有意に短縮し、sham 群の到着時間と非運動群の到着時間の中間値を示した。本実験では運動群が脳外傷後に起こる神経細胞の細胞死やアポトーシスを抑制し、神経細胞が多数生存することを示した。運動は海馬の神経細胞のアポトーシスを阻害し、記憶改善効果が報告されている[11]。運動は NGF や BDNF 及び

TrkA、TrkB の発現を促進し、海馬の neurogenesis を促進し、神経細胞のアポトーシスを阻害し、記憶学習機能を改善することが報告されている[12]。これらのことから運動は脳外傷後に起こる脳機能不全を改善することが示唆された。

本実験において、脳外傷後の早期の運動は脳外傷後に起こされる損傷周囲組織の神経細胞アポトーシスを抑制することにより神経保護作用を示し、脳外傷後に出現する脳機能不全を改善させると考えられた。脳外傷後の運動は非常に有効な治療方法の一つであると考えられた。

(6)まとめ

損傷早期に運動を行うことは脳外傷後に起こる脳機能不全を改善するために運動治療(リハビリテーション)はとっても重要であると考えられた。

(7)参考文献

- . Itoh, T., et al., Edaravone protects against apoptotic neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats. *Neurochem Res*, 2010. 35(2): 348-55.
- . Wang, X., et al., Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate*, 2001. 79(3-4): 172-9.
- . Yasuoka, N., et al., Neuroprotection of edaravone on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004. 151(1-2): 129-39.
- . Shin, D.H., et al., Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett*, 2004. 354(1): 64-8.
- . Nguyen, T.L., et al., Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7 cells. *Exp Mol Med*, 2010. 42(8): 583-95.
- . Hockenbery, D., et al., Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990. 348(6299): 334-6.
- . Martinou, J.C., et al., Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 1994. 13(4): 1017-30.
- . Hata, R., et al., Targeted disruption of the bcl-2 gene in mice exacerbates focal ischemic brain injury. *Metab Brain Dis*, 1999. 14(2): 117-24.
- . Liebelt, B., et al., Exercise preconditioning reduces neuronal

apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. *Neuroscience*, 2010. 166(4): 1091-100.

- . Radak, Z., et al., Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int*, 2001. 38(1): 17-23.
- . Uysal, N., et al., The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett*, 2005. 383(3): 241-5.
- . Chae, C.H. and H.T. Kim, Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochem Int*, 2009. 55(4): 208-13.

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11件)

- . High expression of epithelial cellular adhesion molecule in peritoneal metastasis of gastric cancer, Imano M, Itoh T, Satou T, Furukawa H, Okuno K, Shiozaki H, *Target Oncol*, (査読有り), 8, 231-235, 2013
- . Establishment of a novel peritoneal model of carcinomatosis of peritoneal extension type, Imano M, Itoh T, Satou T, Furukawa H, Okuno K, Shiozaki H, *Anticancer Res*, (査読有り), 33, 1439-1446, 2013
- . Interleukin-1beta accelerates the onset of stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, Chiba T, Itoh T, Tabuchi M, Nakazawa T, Satou T, *Mediat Inflamm*, (査読有り), 2012, ID; 701976 1-11, 2013
- . Neuroprotective effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate in rats when administered pre- or post-traumatic brain injury, Itoh T, Imano M, Tsubaki M, Ito A, Munakata H, Satou T, *J Neural Transm*, (査読有り), 120, 767-783, 2013
- . Appearance of neural stem cells around the damaged area following traumatic brain injury in aged rats, Itoh T, Imano M, Tabuchi M, Munakata H, Hashimoto S, Ito A, Satou T, *J Neural Transm*, (査

- 読有り), 120, 361-374, 2013
- ・ Increased apoptotic neuronal cell death And cerebral dysfunction after traumatic brain injury in aged rats, Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Mizuguchi N, Hashimoto S, Ito A, Satou T, *Brain Struct Funct*, (査読有り), 218, 209-220, 2013
 - ・ (-)-Epigallocatechin-3-gallate increases the number of neural stem cells around the damaged area after rat traumatic brain injury, Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Mizuguchi N, Hashimoto S, Ito A, Satou T, *J Neural Transm*, (査読有り), 119, 877-890, 2013
 - ・ A preliminary study of single intraperitoneal administration of paclitaxel followed by sequential systemic chemotherapy with S-1 plus paclitaxel for advanced gastric cancer with peritoneal metastasis, Imano M, Peng YF, Itoh T, Nishikawa M, Satou T, Shiozaki H, *Anticancer Res*, (査読有り), 32, 4071-4075, 2012
 - ・ Delay of stroke onset by milk proteins in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, Chiba T, Itoh T, Tabuchi M, Oshima K, Satou T, Ezaki O, *Stroke*, (査読有り), 43, 470-477, 2012
 - ・ Bisphosphonate- and statin-induced enhancement of OPG expression and inhibition of CD9, M-CSF, and RANKL expressions via inhibition of the Ras/MEK/ERK pathway and activation of p38MAPK in mouse bone marrow stromal cell line ST2, Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Yanae M, Kato C, Takagoshi R, Komai M, Nishida S, *Mol Cell Endocrinol*, (査読有り), 361, 219-231, 2012
 - ・ Overexpression of MDR1 and survivin, and decreased Bim expression mediate multidrug-resistance in multiple myeloma cells, Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Komai M, Nishinobo M, Yamashita M, Yanae M, Yamazoe Y, Nishida S, *Leuk Res*, (査読有り), 36, 1315-1322, 2011

〔学会発表〕(計7件)

- ・ 伊藤龍生、橋本重夫、伊藤彰彦、佐藤隆夫、緑茶飲料による脳外傷後の神経保護作用及び脳機能の改善効果の検討, 第102回日本病理学会総会 2013年6月6~8日, 札幌
- ・ 伊藤龍生、橋本重夫、伊藤彰彦、佐藤隆夫、緑茶飲料による脳外傷後の脳機能の改善効果の検討, 第67回日本栄養・食糧学会大会, 2013年5月24~26日, 名古屋

屋

- ・ 佐藤隆夫、伊藤龍生、橋本重夫、伊藤彰彦、外傷的脳損傷局所への basic FGF 直接投与がもたらす脳損傷部への影響について, 第101回日本病理学会総会, 2012年4月26~28日, 東京
- ・ 伊藤龍生、橋本重夫、伊藤彰彦、佐藤隆夫、緑茶飲料による脳外傷後の神経細胞死抑制効果の検討, 第101回日本病理学会総会, 2012年4月26~28日, 東京
- ・ 佐藤隆夫、伊藤龍生、橋本重夫、伊藤彰彦、ラット脳損傷モデルへの抗アミロイド前駆蛋白質抗体投与による脳機能および組織学的変化の検討, 第52回日本神経病理学会総会, 2011年6月2~4日, 京都
- ・ 佐藤隆夫、伊藤龍生、橋本重夫、伊藤彰彦、ラット脳損傷局所への抗アミロイド前駆体蛋白質抗体投与による脳組織への影響, 第100回日本病理学会総会, 2011年4月28~30日, 横浜
- ・ 伊藤龍生、竹森久美子、橋本重夫、伊藤浩行、伊藤彰彦、佐藤隆夫、脳卒中発症後の神経幹細胞の出現への SDF-1a/CXCR4 系の関与に関する検討, 第100回日本病理学会総会, 2011年4月28~30日, 横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/dragon-igakubu-2-20/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 龍生 (ITOH ,Tatsuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40330245

(2) 研究分担者

佐藤 隆夫 (SATOU ,Takao)

近畿大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70162443

井上 敬夫 (INOUE ,Takao)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：00441006