

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282164

研究課題名(和文) 実験的脳梗塞の神経組織学的再構築における運動負荷の役割

研究課題名(英文) Role of exercises on reorganization of the neuronal tissues in the experimental brain infarction

研究代表者

筒井 祥博 (TSUTSUI, Yoshihiro)

常葉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50073135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞に対する運動が効果を上げているが、その細胞学的基盤は明らかでない。本研究はラットを用いた中大脳動脈血栓法で梗塞形成後、BrdUを投与し、梗塞後1週(早期)、4週(中期)および8週(後期)に非運動群と運動群を比較した。その結果、脳室壁で新生する細胞が梗塞巣へ顕著で持続的に移動するのを確認したが、基本的な神経新生は両群で有意な差を認めなかった。しかし、梗塞巣と離れた大脳皮質でBrdU陽性細胞が運動群で有意に増加した。梗塞巣周辺に移動したBrdU陽性細胞は8週後にほとんど消失し、成熟ニューロンまで分化しない可能性が示唆された。梗塞巣周辺に集まる幼若神経系細胞の役割が今後の研究の課題である。

研究成果の概要(英文)：Although exercises enhance functional recovery from the strokes, it is not known about the cellular mechanisms. We made brain infarction by surgical occlusion of the left median cerebral artery. After the strokes, the rats were injected with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and then given exercise by treadmill and sacrificed 1 week (W), 4W and 8W. The brains were compared between exercised and non-exercised groups by immune-staining using antibodies against BrdU and Sox2 (immature neural marker). Lots of immature cells were moved from the subventricular zone (SVZ) to the peri-infarcted regions. We could not detect significant difference of the moves between the groups. However, BrdU-positive cells were significantly increased in the separated cortex from the infarcted lesions in the exercised group. The numbers of BrdU-positive cells were remarkably decreased by the 8W, suggesting that most of the BrdU-positive cells does not differentiate to matured neuron.

研究分野：病理学

キーワード：実験的脳梗塞 神経新生 運動負荷 神経系細胞分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 実験的脳梗塞後の幼若神経系細胞の産生と移動：脳梗塞によって失われる脳の形態と機能の回復が如何に起こるか十分に分かっていない。脳は成熟すると神経新生は起こらないと考えられていたが、近年、成体脳も脳室上衣下層(SVZ)や海馬歯状回果粒層(SGZ)から神経発生が生ずることが明らかになってきた。実験的脳梗塞において、SVZから新生ニューロンが梗塞巣へ向かって移動し、梗塞周囲巣に到達して神経組織の修復あるいは再構成に関与している可能性が示されてきた。

(2) 実験的脳梗塞において、運動負荷が神経系細胞の新生、移動、分化に影響を与える可能性が示唆されてきた。

2. 研究の目的

(1) 実験的梗塞後、初期(1週)・中期(4週)および後期(8週)において神経系細胞の新生、移動、分化が如何に進行するか時間的なフェーズの違いを組織・細胞学的視点から明らかにする。

(2) 実験的脳梗塞において、トレッドミルによる運動負荷が神経系細胞の新生・移動・分化に影響を与えるかを明らかにする。

3. 研究の方法

雄SDラット(8週)を用いた。脳梗塞モデルの作成：ハロセンによる吸入麻酔下で、左眼窩上部から皮膚切開し、側頭眼窩下の頭蓋底から手術用ドリルで頭蓋骨に穴をあけ、中大脳動脈を露出した。大動脈からローズベンガルを投与し、緑色光(波長540nm)を中大脳動脈に10分間照射して手術創を閉じた。運動負荷：脳梗塞手術前に、全てのラットに対して、1日30分間、8m/minの速度でトレッドミル運動を7日間行った。脳梗塞モデル作成翌日から、1日30分間、8m/minの速度で、トレッドミル運動を6日間行った。対照群はトレッドミル運動を行わず自然飼育した。

BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)の投与：全ての実験群のラットに術後6日間 BrdU (50mg/Kg)を腹腔内投与した。一部のラットには術後4週目に6回 BrdUを投与、あるいは術後8週目にBrdUを6回投与した。

脳の病理標本の作製：ネブタール麻酔後、心臓から4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で環流固定後、脳を取り出し、さらに24時間固定後、パラフィン切片を作成しHE染色した。脳梗塞領域の面積測定：HE染色像を撮影し、ImageJ 1.44pを用いて、脳梗塞領域の面積を測定した。

免疫染色：BrdU染色(複製DNAの標識)、Sox2染色(幼若神経系マーカー)を行った。さらに、はじめにミクログリアを検出する抗体iba-1、グリア細胞を検出するGFAP、神経細胞を検出するMAP2で染色後、BrdUの二重染色を行った。

ロータロッドテスト：運動機能の評価としてロータロッドテストを行った。プレトレーニング期間中は、1日5分、8rpmで運動を行った。梗塞後、はじめ4rpmで回転し、5分間で40rpmまで徐々に回転速度が増加するロッド上に乗せ、落下するまでの時間を測定した。このテストを週に1回行い、1回につき3回行った。

4. 研究成果

(1) 実験的脳梗塞後早期(1週)・中期(4週間)・後期(8週)の組織学的変化：

脳梗塞早期において左側大脳半球の中大脳動脈支配領域の線条体と皮質に広範な壊死巣(梗塞巣)が形成され、梗塞巣と脳実質の間に厚い梗塞周辺層が形成された。この部分はグリオーシスと血管の新生が目立った。脳梗塞早期に側脳室上角から幼若神経系細胞が梗塞巣周辺に移動集積する像が特にSox2陽性細胞として検出された。梗塞後4週間を経ても脳室壁から梗塞壁にSox2陽性細胞が連続的に認められた。脳室壁の脳室上位下層(SVZ)の細胞が増殖して内腔へ隆起

する像を認めた。そこには Sox2 陽性細胞が目立った。梗塞の壊死部分は脱落消失して広範に脳実質が欠損した。欠損部分の脳実質の周辺には種々な厚さのパナンプラ（梗塞巣周辺組織）が覆うのが認められた。梗塞後4週目で梗塞を免れた線条体の後部に海綿状変化と、時に石灰沈着を認めた。弱拡大で測定した梗塞巣側の脳実質残存面積の非梗塞側の脳実質の面積に対する割合は約50%で、梗塞後1週目、4週目、8週目でほとんど変わらなかった。梗塞後8週間になると梗塞壁のパナンプラはほとんど消失し梗塞辺縁の脳実質がスムーズになった。

(2) 幼若新生細胞の脳室壁から梗塞巣への移動と運動負荷による影響：梗塞後6日間毎日 BrdU を投与して4週目に BrdU 陽性細胞と Sox2 陽性細胞を免疫染色で検出した。多数の Sox2 陽性細胞と BrdU 陽性細胞が脳室から線条体の梗塞巣周囲へ移動する像を認めた。BrdU 陽性細胞は梗塞巣周囲を越えてパナンプラに目立ったが、Sox2 陽性細胞はパナンプラにはほとんど認めなかった。ラットを1回の実験ごとに運動群、非運動群、シャムオベ対照群に分け、Sox2 陽性細胞および BrdU 陽性細胞を、脳室壁近傍、線条体の梗塞壁、大脳皮質の梗塞壁で面積当たり数えたが、非運動群と運動群で有意な差が認められなかった。梗塞壁から離れた梗塞側大脳皮質に BrdU 陽性細胞が散在性に分布している像を認めた。この梗塞壁と離れた大脳皮質では BrdU 陽性細胞が非運動群より運動群が有意に高い値を示した。

(3) 幼若新生細胞産生の持続：梗塞後4週および8週目に BrdU を6日間投与すると、数は著しく減少したが、脳室壁近傍及び線条体の梗塞壁に BrdU 陽性細胞を認めた。この時期の Sox2 陽性細胞の分布と合わせて考えると梗塞後中期（4週）、後期（8週）を経ても神経新生が生じていることが示唆された。

(4) 幼若新生細胞の二重染色による解析：

BrdU と他の神経系細胞特異マーカーとの二重染色を試みた。ミクログリアのマーカーである iba-1 との二重染色では、どの部位においても BrdU と二重染色されなかった。グリア細胞のマーカーである GFAP との二重染色においては、大脳皮質において一部の細胞が二重染色された。脳室壁近傍やパナンプラ部分では二重染色されない BrdU 陽性細胞が多かった。神経細胞のマーカーである MAP2 との二重染色では大脳皮質において二重染色される細胞はほとんど認めなかった。脳室壁近傍およびパナンプラ部分では BrdU 陽性細胞はほとんど二重染色されなかった。

(5) 幼若新生細胞は成熟神経細胞へ分化しない：梗塞後8週目では BrdU 陽性細胞は脳室壁近傍に僅かに認めしたが、梗塞壁には BrdU 陽性細胞は殆ど認めなかった。このことは、ほとんどの幼若新生細胞は成熟神経細胞に分化しない可能性を示す。

(6) ロタロッドによる梗塞後の運動機能回復：梗塞後1週間ごと4週間ロタロッドによる歩行機能測定を行った。脳梗塞術直後（1週間以内）では障害の有無による運動機能の差を確認出来たが、検出感度の問題により回復していく過程の中では小さな差を捉えきれなかった。運動群と非運動群の間で有意な差はなかった。梗塞群ではシャムオベ群より最初は低い値を示したが、予想に反して、測定の最後では梗塞群とシャムオベ群との間に有意な差を認めなかった。

(7) 運動皮質脳梗塞モデルの開発と神経新生：今回用いた中大脳動脈梗塞モデルは、ヒトの脳梗塞に類似しているが、手術的侵襲が強く梗塞範囲が広く、実験結果にバラツキが大きい。脳梗塞の病態をヒトと比較して研究するにはよいモデルであるが、運動負荷による差を見るような微妙な差を定量的に比較することは困難であることが分かった。したがってこれと並行してラットの運動皮質運動野の梗塞モデルを確立した。このモデルの

特徴は、中大脳動脈梗塞モデルと比較して、梗塞後の死亡率が低く、梗塞の大きさのバラツキが少ない。従って、梗塞後の種々の運動の機能解析が可能であり、しかも運動野の特定の部位に梗塞を作り得ることも明らかになった。

考察

(1) 今回の一連の実験で、脳梗塞ができると Sox2 陽性細胞、BrdU 陽性細胞が脳室壁から梗塞巣へ顕著にかつ持続的に移動することが確認された。Sox2 陽性細胞は梗塞後期(8 週)でも脳室壁の SVZ に生じていることが明らかになった。

(2) 梗塞後 1 週目に投与した BrdU 陽性細胞は梗塞 4 週後に脳室壁近傍、梗塞壁に多く認められたが、現在までの解析では運動群と非運動群の間に有意な差を認めなかった。興味有ることに、梗塞後 4 週で、梗塞巣と離れた梗塞側の皮質に BrdU 陽性細胞を認め、運動群が非運動群より有意に増加していることが明らかとなった。しかし、これら BrdU 陽性細胞は GFAP と二重染色される細胞が目立ち、MAP2 と二重染色される細胞は僅かであった。またこの部分ではミクログリアのマーカーである iba-1 とも二重染色されないので炎症反応ではないと考えた。すなわち梗塞側皮質で BrdU 陽性細胞はグリア系細胞に分化し、グリオシスが誘導され、これを運動が促進する可能性が示唆された。これらの所見が梗塞側の大脳皮質の脳機能回復と関連するかどうか今後の課題である。

(3) 梗塞後期(8 週)になると、4 週目に目立った BrdU 陽性細胞がほとんど消失した。このことは、BrdU 陽性細胞は成熟した神経細胞として梗塞巣周辺の神経ネットワークに組み込まれない可能性が高いことを示す。梗塞によって誘導される幼若神経系細胞がどのような役割をするのか今後の課題である。

(4) 今回の我々の中大脳動脈梗塞モデルでは、脳室壁の SVZ からの梗塞巣への顕著な神経

新生と考えられる所見を認めたが、梗塞巣と離れた皮質を除いて、運動負荷によって有意に促進は明確でなかった。その要因はこのモデルは梗塞巣が大きくバラツキが強いため差異を検出し難いためと考えられる。今回私達は、運動野に限局した梗塞巣を作成することに成功している。この新たな系では梗塞による死亡率が少なくバラツキがすくないので、運動機能の解析が行いやすく運動負荷の影響をより詳細に解析できる可能性がある。(5) Sham 手術対照群と比較して、梗塞群は口タロットによる運動機能はほとんど差が無かったことは注目に値する。梗塞を起こすことによって梗塞側の大脳実質は 50%失われたにも関わらず運動機能が保たれた。このことは、非梗塞側および梗塞側に残されている大脳が何らかの代償作用をしていると考えられる。今回非梗塞側について解析してないが、梗塞側の皮質に BrdU 陽性細胞が出現し、運動によって増強したことは、この代償作用に関与している可能性が考えられ、今後の課題である。

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 10 件)

- (1) Kawasaki H, Kosugi I, Sakao-Suzuki M, Arai Y, Tsutsui Y, Iwashita Y. Cytomegalovirus initiates infection selectively from high-level integrin-expressing cells in the brain. American Journal of Pathology 185 (5): 1304-1323, 2015. 査読有
- (2) Makino H, Hokamura K, Natsume T, Kimura T, Kamio Y, Magata Y, Namba H, Katoh T, Sato S, Hashimoto T, Umemura K. Successful serial imaging of the mouse cerebral arteries using conventional 3-T magnetic resonance imaging. J Cereb Blood Flow Metab. 2015 35: 1523-7. 査読有
- (3) Inoue O, Hokamura K, Shirai T, Osada M, Tsukiji N, Hatakeyama K,

- Umemura K, Asada Y, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Vascular Smooth Muscle Cells Stimulate Platelets and Facilitate Thrombus Formation through Platelet CLEC-2: Implications in Atherothrombosis. PLoS One. 2015.10: e0139357. 査読有
- (4) Makiko Sakao-Suzuki Hideya Kawasaki Taisuke Akamatsu, Shiori Meguro, Hiroaki Miyajima, Toshihide Iwashita, Yoshihiro Tsutsui, Naoki Inoue & Isao Kosugi. Aberrant fetal macrophage/microglial reaction to cytomegalovirus infection. Annals of Clinical and Translational Neurology 570-588, 2014. 査読有
- (5) Mori T, Agata N, Itoh Y, Miyazu-Inoue M, Sokabe M, Taguchi T, Kawakami K. Stretch speed-dependent myofiber damage and functional deficits in rat skeletal muscle induced by lengthening contraction. Physiol Rep. 2014 Nov 20;2(11). pii: e12213. 査読有
- 〔学会発表〕(計 10 件)
- (1) 懸信秀, 外村和也, 森下紗帆, 熊田竜郎, 梅村和夫, 筒井祥博. 光増感 (PIT) 法による中大脳動脈血栓モデルラットにおける運動機能回復と神経新生. 第 121 回日本解剖学会全国学術集会, 郡山, 2016.3.30
- (2) 森下紗帆, 外村和也, 懸信秀, 吉川輝, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. 光増感 (PIT) 法で作出した運動皮質梗塞ラットにおける運動機能回復と神経新生に対する運動負荷の効果. 第 133 回日本薬理学会関東部会, 柏, 2015.10.10
- (3) 森下紗帆, 外村和也, 吉川輝, 懸信秀, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. 運動皮質梗塞ラットにおける運動機能回復および神経新生に対する走行運動の効果. Effect of exercise on the motor recovery and neurogenesis in rats with motor cortex infarct. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌, 2016.03.24
- (4) 森下紗帆, 懸信秀, 外村和也, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. 光増感 (PIT) 法で惹起した運動皮質梗塞ラットにおける運動機能回復と神経新生に対するトレッドミル運動の効果. 第 92 回日本生理学会, 神戸, 2015.03.22
- (5) 懸信秀, 外村和也, 梅村和夫, 筒井祥博. 実験的脳梗塞における海馬歯

状回と脳室壁上衣下領域の SOX2 陽性細胞への運動の影響. コメディカル形態機能学会第 11 回学術集会 東京, 2012.9

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 祥博 (TSUTSUI Yoshihiro)
常葉大学・保健医療学部・教授
研究者番号 : 5 0 0 7 3 1 3 5

(2) 研究分担者

懸 信秀 (AGATA, Nobuhide)
常葉大学・保健医療学部・講師
研究者番号 : 0 0 5 4 9 3 1 3

(3) 研究分担者

外村 和也 (HOKAMURA, Kazuya)
浜松医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 9 0 4 3 6 9 6 5

(4) 研究分担者

熊田 竜郎 (KUMADA, Tatsuro)
常葉大学・保健医療学部・講師
研究者番号 : 0 0 4 0 2 3 3 9

(5) 研究分担者

梅村 和夫 (MEMURA, Kazuo)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 4 0 2 3 2 9 1 2