

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560268

研究課題名(和文)小脳変性マウスにリハビリ運動訓練型環境エンリッチ飼育と脳栄養成分投与介入試験の研究

研究課題名(英文)The study and assessment of the exercise of cerebral ataxia Mouse in an enriched breeding environment fed with brain nourishing ingredients

研究代表者

別府 英博(別府秀彦)(BEPPU, HIDEHIRO)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・准教授

研究者番号：30142582

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):環境エンリッチメント(EE)の概念を、小脳変性マウスの運動歩行改善に応用する。単一の強制運動でなくEE概念である多彩な行動環境の中で模擬リハビリ訓練をさせながら育養させる。また脳の栄養成分としてD型セリンを併用し、EE運動、強制歩行運動および脳栄養介入が、歩行失調、振戦、小脳プルキンエ細胞の変性脱落の軽減などを評価した。その結果、強制運動より運動改善は明瞭ではないが、非運動群より改善路した。一方D型セリンの経口投与およびEE運動は、強制運動と同等の結果を得た。

研究成果の概要(英文):The application of EE concept to the gait exercise improvement of Cerebral Ataxia Mouse. At the same time, the effect of using D type Serine together with EE exercise, forced gait exercise and brain nourishing feeding on the amelioration of the lack of gait harmony, and reduction of tremor, cerebral Purkinje cells were investigated. As a result, clear exercise improvement can't be seen, but improvement compared to forced training group is obvious. For oral administration of D type Serine and EE exercise, equal results to forced exercise were obtained.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：小脳失調マウス 強制運動 環境エンリッチメント D型セリン 運動歩行改善 プルキンエ細胞変性 運動失調 脳栄養

1. 研究開始当初の背景

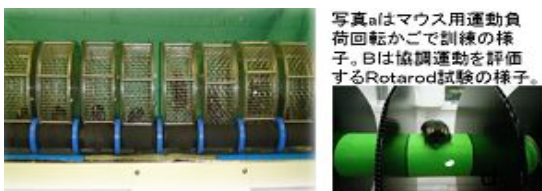
1) 脊髄小脳失調症 (SCD) は臨床的には、運動失調を呈し、小脳そのもの、小脳とつながる経路に変性性病変をもつ神経変性疾患である。本研究モデルマウスは、共同研究者の高橋が、C57BL/6J cpk の系統維持中、酪酐様歩行を示すマウスを発見し B6-wob/t として育種しているものである。2) 生後4週齢目からの特徴は、A)行動解析検査から 酪酐様歩行 間歇歩行 筋力低下 筋協調運動低下 平行感覚低下を示し、B)解剖学的所見から 小脳萎縮 小脳プルキンエ細胞の変性・脱落、C)プロテオーム解析から 筋アクチン・タンパクの減少 小脳内カルペンディンの減少などである。3) このように B6-wob/t は小脳プルキンエ細胞の変性による運動失調を呈する SCD 疾患モデルの有用な動物と考えられる。

2. 研究の目的

この SCD 疾患モデルマウスを患者では行えない様々な運動負荷を導入し、運動能力を評価あるいはその過程で変化する筋肉・小脳内遺伝子産物や遊離アミノ酸の変動を評価する目的の研究である。

我々は、先行研究で、回転かご歩行運動訓練装置を用いて、強制的に歩行運動を行った。その結果、ロータ・ロッド試験で歩行運動能力の評価を行ったところ、運動量に関してロータ・ロッド試験の上達度は示された。一方運動負荷を始める週齢を幼獣期、成獣期、老獣期に開始した場合の、改善度が週齢によって異なる結果を得た。

成獣期が最も歩行運動に順応し、老獣期、幼獣期は、個体差が大きく表れた。その原因として、成獣期の運動量を幼獣・老獣期に直接同じ運動負荷量で行うと、協調運動能力を逸脱すると考えた。



写真aはマウス用運動負荷回転かごで訓練の様子。Bは協調運動を評価するRotarod試験の様子。

そこで、自発的な運動負荷運動として、環境エンリッチメント (Enriched Environment; EE) の概念を、SCD 疾患モデルマウス (小脳変性マウス) に応用し、未だ治療薬のない SCD 患者の代替として当該マウスに脳の栄養成分や薬物投与試験を並行して行い、単一な強制運動でなく EE 概念である多彩な行動環境の中で模擬り八訓練をさせながら育養させる。その過程において、歩行失調、振戦、小脳プルキンエ細胞の変性脱落の軽減など、運動機能・体幹の評価、病態生化学的・病理組織学的な変化を観察することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 最近 EE の概念が動物実験領域の論文で散見される。すなわち実験 (外科手術後・薬物投与中・疾患モデル・発がん・妊娠出産中など) 中の動物を通常の飼育ケージで育養するのではなく、いわゆる遊び場を設けた飼育箱で生活させることである。EE の先行研究に、M.J.Curing らのガンの抑制(2010)、A.M.Matter らの外傷性脳損傷マウスの機能改善 (2011) がある。飼育空間は、床敷チップだけの平坦な区間と異なり立体的な構造物により、夜間における餌や水探しの行動時に歩行訓練を負荷させることがねらいである。



2) この方法により、当該マウスに短時間の強制歩行訓練を行う場合と、24時間餌探しやグルーミング行動がリハ歩行訓練となる場合とさらに脳栄養成分投与による相乗作用の比較実験である。

第1段階: 実験群のマウスの運動失調評価が均一であるように運動評価を行い層別を行った。ついで飼育箱を全群同じ規格を用意し、その中に EE の構造物を同じように組み立てた。**第2段階:** 脳と栄養に関する最新の実験報告からつぎの脳機能改善の機能性栄養成分を用意した。1群: D型セリン 2群: 遊離脂肪酸 (長鎖多価不飽和脂肪酸) えごま油などを複合あるいは単品で経口投与させた。投与開始から2週間毎に行動・運動改善の測定: EE群と投与群の行動の比較をおこない解析する。効果が優れたマウスにおいては、層別し小脳の組織標本を作製し精査した。**第4段階:** 臨床にフィードバックし実験から得られた機能回復 (あるいは副作用) 評価と有効性とヒトへの応用を考える

4. 研究成果

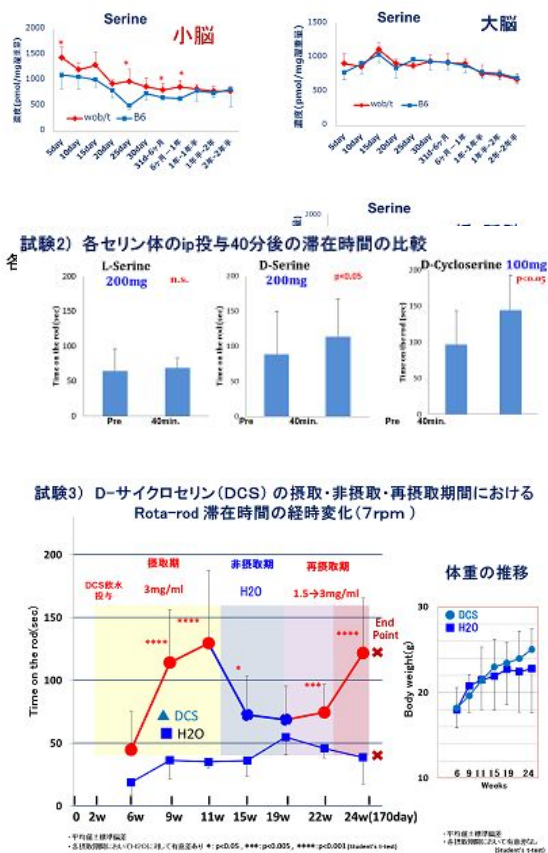
実験報告 1

先行研究の腹腔内投与実験で、L型セリンは、Rota-rod 試験における協調運動失調の改善を示さなかった。D型セリンは 200mg/Kg 体重で投与前より投与40分後に、rod上での滞在時間の延長が見られ、運動失調の改善が見られた。D型セリンの誘導体である D-サイクロセリンは 100mg/Kg 体重で効果が見られた。

実験報告 2

D-サイクロセリンを、3mg/ml 飲料水に溶解した自由給水を生後2週目から与えた群と。水のみを与えた群に分け、生後6週、9週、11週まで与えた。ついで、15週、

19 週まで、D-サイクロセリンの投与中止を行い再度、22 週目で 1.5mg/ml、24 週まで 3mg/ml と増量し経口摂取させた。22 週目の運動能力評価後直ちに安楽死させ脳内 L 型、D 型セリン濃度を測定した。



実験報告 3

脳を摘出後、主要臓器、筋肉を摘出し、病理学的観察、重量および一部を病理組織標本用に処理をし、組織学的観察、免疫組織標本作製を行った。現在その標本の作製評価の準備を進めている。

まとめ

運動失調の表現型の改善と、解剖後の小脳プルキンエ細胞を病理学的に観察し、関連性を探った。最近の研究で、小脳プルキンエ細胞の形成にはアストロサイトからの D 型セリンの供給が必須であることが報告されていることから、本研究の結果は D 型セリンが、残存するプルキンエ細胞の運動機能改善に影響をしたことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計: 17 件)

1. Mizutani K, Sonoda S, Wakita H, Shimpo K: Protein kinase C activator, bryostatin-1, promotes exercise-dependent functional recovery in rats with cerebral infarction. *Am J Phys Med Rehabil.* 査読有, 2015 Mar;94(3):239-43. doi: 10.1097/PHM.0000000000000227. PMID:25299527
2. Chihara T, Shimpo K, Kaneko T, Beppu H, Higashiguchi

T, Sonoda S, Tanaka M, Yamada M, Abe F; Dietary *Aloe vera* gel powder and extract inhibit azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci in mice fed a high-fat diet. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 査読有, 2015, 16, 683-687.

3. Chihara T, Shimpo K, Beppu H, Kaneko T, Higashiguchi T, Sonoda S, Tanaka M, Yamada M, Abe F. Dietary administration of *Aloe vera* gel extract inhibits intestinal polyp formation in Min fed a high-fat diet. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 査読有, 2015, 6, 340.

4. Chihara T, Shimpo K, Beppu H, Yamamoto N, Kaneko T, Wakamatsu K, Sonoda S. Effects of Aloe-emodin and Emodin on proliferation of the human gastric cancer cell line MKN45. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 査読有, 2015, 16, 3887-3891.

5. Kaneko T, Chihara T, Shimpo K, Beppu H, Higashiguchi T, Sonoda S. Inhibition of azoxymethane-induced colorectal aberrant crypt foci in mice fed a high-fat diet by *Pleurotus eryngii* (Eringi) and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 査読有, 2015, 16, 3881-3885.

6. Beppu H, Takayanagi N, Tomita Y, Mizutani K, Orand A, Tamai I, Takahashi H, Sonoda S; Improvement of gait and coordinated movement by forced gait training in cerebellar ataxic B6-wob/t mice. *Jpn J Compr Rehabil Sci*, 査読有, 2015, 6, 64-70.

7. Okazaki H, Beppu H, Mizutani K, Okamoto S, Sonoda S. Changes in Serum Growth Factors in Stroke Rehabilitation Patients and Their Relation to Hemiparesis Improvement. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 査読有, 2014 Jul;23(6):1703-8. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis. 2014.01.015. MID:24768137

8. Mizutani K, Sonoda S, Wakita H, Katoh Y, Shimpo K. Functional recovery and alterations in the expression and localization of protein kinase C following voluntary exercise in rat with cerebral infarction. *Neurol Sci*. 2014 Jan;35(1):53-9. doi: 10.1007/s10072-013-1477-7. Epub 2013 Jun 22.

9. Shimpo K, Chihara T, Kaneko T, Beppu H, Wakamatsu K, Shinzato M, Yukitake J, Sonoda S. Inhibitory effects of low-dose Aloe-emodin on the development of colorectal tumors in Min mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 査読有, 2014, 15, 5587-5592.

10. Okazaki H, Beppu H, Mizutani K, Sonoda S. Changes muscle and plasma hepatocyte growth factor levels under casting immobilization. *Jpn J Compr Rehabil Sci*. 査読有, 2013;4:84-87

11. Takayanagi N, Beppu H, Mizutani K, Tomita Y, Nagao S, Suzuki S, Orand A, Takahashi H, Sonoda S. Body axis-based gait analysis for ataxic mice. *J Neurosci Methods*. 査読有, 2013;219(1):162-168.

12. Mizutani K, Sonoda S, Karasawa N, Yamada K, Shimpo K, Chihara T, Takeuchi T, Hasegawa Y, Kubo KY. Effects of exercise after focal cerebral cortex infarction on basal ganglion. *Neurol Sci.* 査読有, 2013 Jun;34(6):861-7. doi: 10.1007/s10072-012-1137-3. Epub 2012 Jun 21. PMID:22718437

13. Chihara T, Shimpo K, Kaneko T, Tomatsu A, Beppu H, Higashiguchi T, Sonoda S. The effect of preparatory conditions of high temperature- and pressure-treated garlic on 5-hydroxymethyl-2-furfural and S-allylcysteine formation. *Journal of Analytical Bio-Science*, 査読有, 2013, 36, 186-192.

14. Chihara T, Shimpo K, Beppu H, Tomatsu A, Kaneko T, Tanaka M, Yamada M, Abe F, Sonoda S. Reduction of intestinal polyp formation in Min mice fed a high-fat diet with *Aloe vera* gel extract. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 査読有, 2013, 14, 4435-4440.

15. Futamura A, Higashiguchi T, Ito A, Kodama Y, Chihara T, Kaneko T, Tomatsu A, Shimpo K. Experimental research on stimulation of wound healing by n-3 fatty acids. *Wounds*, 査読有, 2013, 25, 186-187.

16. Shinzato M, Beppu H, Mizutani K, Sonoda S, Katafuchi T, Ifuku M, Hanada M, Naoki Takayanagi N, Yamaguchi K, Nakagawa H, Watanabe Y, Takahashi H. New breed of mouse with cerebellar degeneration: Analysis of changes in motor ataxia and cerebellum tissue of the B6-wob/t mouse. *Structure and Function*, 査読有, 2013, Vol.12(1).10-18

17. Beppu H, Mizutani K, Takayanagi N, Shinzato M, Sonoda S, Takahashi H. Characterization of ataxia shown by an abnormal behavior mouse derived from the C57BL/6-cpk mouse with infantile cystic kidney disease. *Structure and Function*, 査読有, 2013, 11(2);92-101.

[学会発表](計 12件)

1. 運動失調マウスの骨盤軸基準歩行解析法の検討および種々の歩行失調マウスへの応用
高柳尚貴、別府秀彦、水谷謙明、富田 豊、長尾静子、鈴木昇一、Orando Abbas、高橋久英、園田茂 第45回藤田医学会、2013年10月4日~5日、愛知。

2. 小脳失調マウスへの強制歩行運動および環境エンリッチメント(Enriched Environment: EE)飼養が自発的活動量におよぼす影響
別府秀彦、水谷謙明、新里昌功、富田 豊、Abbas Orand、高柳 尚貴、新保 寛、園田 茂
第5回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、2014年2月15日、東京。

3. 脳梗塞ラットへの訓練・薬剤併用療法による脳内分子の変化
水谷 謙明、園田 茂、別府 秀彦、高柳 尚貴
第5回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、2014年2月15日、東京。

4. 回復期リハビリテーション患者の入院および退院時

FIM運動評価に関連する血中遊離アミノ酸の検索
別府秀彦、岡崎英人、玉井育子、水谷謙明、尾関保則、井谷功典、富田 豊、宮坂裕之、谷野元一、Orand Abbas、千原 猛、新保 寛、園田 茂
第24回生物試料分析化学学会年次学術集会、2014年3月1日~2日、三重。

5. 新奇小脳変性マウス B6-wob/t (wob/t) の育養環境エンリッチメント(EE)法による出産効率の検討および新生仔から高齢成獣までの血液・病理学的観察
別府秀彦、新里昌功、水谷謙明、玉井育子、千原 猛、新保 寛、園田 茂、高橋久英
形態機能学会 第13回学術集会、2014年9月20日、北九州。

6. 小脳変性マウスの血液検査および脳内遊離アミノ酸の経時変化の検討
別府秀彦、水谷謙明、玉井育子、千原 猛、新保 寛、園田 茂、高橋久英
第25回生物試料分析化学学会年次学術集会、2015年2月14日~15日、東京。

7. 回復期リハビリテーション患者の入院および退院時に関連する血中遊離アミノ酸の検索の試み
別府秀彦、岡崎英人、玉井育子、水谷謙明、宮坂裕之、谷野元一、新保 寛、園田 茂
第6回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、2015年2月21日、秋田。

8. 脳梗塞ラットへの訓練・薬剤併用療法がモノアミン態に与える影響
水谷 謙明、園田 茂、別府 秀彦
第6回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会、2015年2月21日、秋田。

9. 運動失調マウス B6-wob/t(wob/t)への腹腔内投与セリンが Rota-rod 試験に及ぼす影響
別府秀彦、水谷謙明、新里昌功、玉井育子、千原 猛、新保 寛、園田 茂、高橋久英
形態機能学会 第14回学術集会、2015年9月26日、埼玉。

10. 運動失調マウス B6-wob/t への腹腔内投与セリンが Rota-rod 試験に及ぼす影響(2)
別府秀彦、水谷謙明、新里昌功、玉井育子、千原 猛、新保 寛、高橋久英、園田 茂
第13回日本機能性食品医学会、2015年12月12日~13日、福岡。

11. 小脳失調マウスに対するD型・L型セリンの抗運動失調作用の検討
別府秀彦、水谷謙明、新里昌功、玉井育子、千原 猛、新保 寛、高橋久英、園田 茂
第26回生物試料分析化学学会年次学術集会、2016年2月20日~21日、沖縄。

12. 脳梗塞後の麻痺回復におけるモノアミンの役割
水谷 謙明、園田 茂、別府 秀彦
第121回日本解剖学会、2016年3月30日、福島。

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

[その他]

別府秀彦；運動失調マウスの歩行失調および重心動揺を評価する装置の開発(2014)

中部産学連携シーズ発表会：平成 26 年度中部地区
医療・バイオ系シーズ発表会、愛知、
12 月 10 日
公益財団法人 名古屋産業科学研究所中部
TLO;CTLO TODAY(2014)No.15February 2015
p.15 に掲載

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/FMIP/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

別府 英博(秀彦) (BEPPU

HIDEHIRO(HUDEHIKO))

藤田保健衛生大学・藤田記七栗研究所

准教授

研究者番号: 30142582

(2)研究分担者

新里 昌功 (SINZATO MASANORI)

藤田保健衛生大学・医療科学部

准教授

研究者番号：80148288

(3)連携研究者

水谷 謙明 (MIZUTANI KENMEI)

藤田保健衛生大学・藤田記七栗研究所

講師

研究者番号：30351068

園田 茂 (SONODA SHIGERU)

藤田保健衛生大学・医学部

教授

研究者番号：10197022

新保 寛 (SIMPO KAN)

藤田保健衛生大学・藤田記七栗研究所

教授

研究者番号：10142580