

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350571

研究課題名(和文)脳梗塞後の運動療法による神経保護と脳内生理活性物質の変化に関する研究

研究課題名(英文) Study of change in neuroprotective effect and brain physiologically active substance on physical therapy after brain ischemia

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：3週間のトレッドミル運動後にラット脳梗塞を作成し、脳梗塞発症前の定期的な運動による脳梗塞後の神経保護作用機序について調べた。運動群の脳梗塞体積は非運動群と比較し有意に縮小し、機能改善も認められた。反応性アストロサイトのマーカーであるGFAPや毛細血管のマーカーであるPECAM-1の発現、BDNFやMKの発現がペナンプラ領域で有意に増加していた。神経細胞死に關与するCaspase 3とフリーラジカル組織傷害のマーカーであるNitrotyrosineの変化を確認した結果、運動群の発現量が有意に減少しており、神経栄養因子の発現増加がアポトーシスや酸化障害を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and the expression levels of the midkine (MK) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after brain ischemia. After the 3 weeks exercise program, stroke was induced. The infarct volume, neurological deficits and motor function in the Ex group were significantly improved compared to that of the No-Ex group. The expression levels of MK, BDNF, GFAP, and PECAM-1 were enhanced in the Ex group compared to the expression levels in the No-Ex group after brain ischemia, while the expression levels of activated caspase 3 and NT were reduced in the area surrounding the necrotic lesion. Our findings suggest that preconditioning exercise reduced the infarct volume and ameliorated motor function, enhanced expression levels of MK and BDNF, increased astrocyte proliferation, increased angiogenesis, and reduced neuronal apoptosis and oxidative stress.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：リハビリテーション 運動 脳梗塞 神経保護効果 神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、脳血管障害の罹患率は増加し、身体運動機能障害などの原因として大きな問題となっている。近年、心臓や脳に対して致死的とならないストレス(軽い虚血など)を負荷させるとその後の強いストレス(虚血、酸化ストレスなど)による細胞障害が軽減されることが報告されており、この現象はプレコンディショニングとして知られている。脳梗塞発症前運動も脳虚血耐性を引き起こし中枢神経傷害時の神経保護効果を高め、運動機能改善に繋がることが報告されている。脳梗塞モデル動物において、脳梗塞前の規則的なトレッドミル運動による神経保護作用や脳梗塞縮小効果が示唆されており、そのメカニズムには血管形成、神経栄養因子の発現、アポトーシス抑制などが関与している。人を対象とした後方視的な研究や前向き研究でも脳卒中発症前の身体活動が脳卒中程度の機能的帰結に影響を及ぼすことが報告されている。

リハビリテーション医学では脳卒中後の機能回復を得るために、様々な運動・治療アプローチが行われている。動物モデルにおいて、脳梗塞後早期からの適度な運動は、脳梗塞巣縮小効果、神経機能の改善、brain derived neurotrophic factor(BDNF)、nerve growth factor(NGF)などの神経栄養因子の発現量の増加を促進することが報告されている。しかしながら、脳梗塞発症前・後の運動療法による神経保護作用のメカニズムや神経保護作用を生じる適切な運動強度や頻度、運動量などは十分に解明されていない。また、薬物治療と運動療法の併用効果に関しては明らかになっていない。

これまで、研究代表者らは、脳梗塞モデルラットを使用して脳梗塞後の早期運動療法が成長因子の発現と機能回復に及ぼす影響や、脳梗塞後の早期運動療法と神経血管保護薬による併用治療が脳組織保護と運動機能の回復に及ぼす影響を明らかにしてきた。研究代表者らのリハビリテーションの視点に立った脳血管障害後の運動療法による脳神経保護と機能回復に関する研究報告により、運動療法による細胞内への影響が明らかとなってきているが、予防的運動トレーニングや運動療法による脳梗塞後の神経保護メカニズムに関してはまだ完全に解明されていない。

そこで、本研究では、脳梗塞前定期的な運動トレーニングが脳梗塞後の脳梗塞巣に及ぼす影響を組織学的に観察し、アポトーシス抑制や神経保護のメカニズムを分子生物学的に調べ、予防的運動トレーニングの科学的根拠を検討した。

2. 研究の目的

脳梗塞前の定期的な運動トレーニングが脳梗塞巣に及ぼす影響を組織学的に観察し、アポトーシス抑制や神経保護のメカニズム

を分子生物学的に検討することである。

3. 研究の方法

実験動物には7週齢のSprague-Dawley(SD)系雄性ラットを用いた。3週間のトレッドミル運動後に脳梗塞を作成した運動群(Ex groups, n=11)、3週間のトレッドミル運動だけ行い脳梗塞を作成しない運動のみの群(Ex only groups, n=6)、3週間のケージ内での自由飼育後に脳梗塞を作成した非運動群(No-ex groups, n=11)、3週間のケージ内での自由飼育のみの正常群(Control groups, n=6)に分けた。運動群は25m/minに設定してトレッドミル運動(30分/日、5回/週)を3週間行った。非運動群は飼育ケージ内で3週間自由飼育した。3週間後、小泉の方法に準じてラット左内頸動脈から糸を挿入し、60分間の虚血と再灌流により中大脳動脈領域の脳梗塞モデルを作製した。今回の運動がラットにとってどの程度のストレスになっているかを知るために、定期的に体重を測定した結果、3週間の運動負荷による体重減少は認められなかった。

脳梗塞作成2日後に、神経学的評価としてNeurological Score(NS)、運動-感覚機能評価として、歩行時のバランス能力を評価するBeam Walking test(BW)、バランスと耐久性を見るRota Rod(RR)テスト、前肢の感覚運動機能評価として麻痺側と非麻痺側でテープテストを行った。評価終了後に脳を採取して、2mm間隔の前額断を作成しTTC染色を行った。TTC染色切片をコンピューターに取り込みScion Image Softwareを使用して脳梗塞巣の体積を測定した(Fig 1A)。また、組織学的な評価としてHE染色を行った。神経栄養因子であるBDNFとMK、反応性アストロサイトのマーカーであるGFAP、毛細血管のマーカーであるPECAM-1、酸化障害のバイオマーカーであるNitrotyrosine(NT)、アポトーシスのマーカーであるCaspase 3の免疫組織化学染色を行い、各群の皮質ペナンプラ領域における陽性面積を定量化した(Fig1A,B)。

さらに運動群、非運動群(各4匹)を用いてウエスタンブロッティング法によるBDNF、MK、GFAP、PECAM-1、NT、Caspase 3タンパクの発現量を調べた。

4. 研究成果

脳梗塞巣の体積は非運動群と比べて運動群が有意に縮小していた(Fig 1A, C)。HE所見より大脳皮質や線条体に壊死像が観察された(Fig 1B)。

Fig 2に神経学的評価、運動-感覚機能評価の結果を示す。神経学的評価(Fig 2A)や運動-感覚機能評価(Fig 2B-D)は正常群と比較して有意に低下した。NS(Fig 2A)やRR(Fig 2D)は運動群と非運動群に有意な違いは見られなかった。運動群のBW(Fig 2C)テストは非運動群と比較して有意に高値であったが、運動群間による違いは見られなかつ

た。テープテスト (Fig 2B) は、右前肢の反応時間が左前肢より有意に長く、反応が鈍くなっていた。また、非運動群と比較して両運動群の反応時間が短かった。

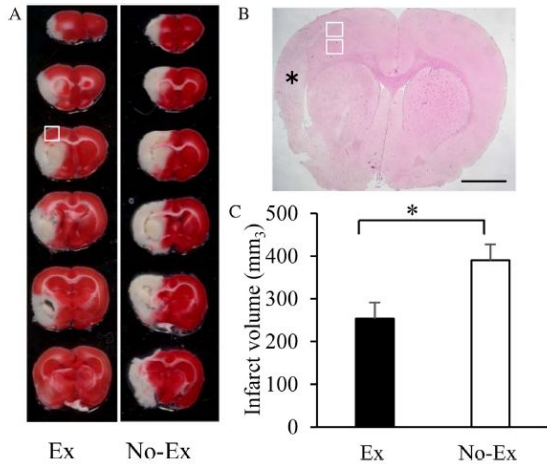


Fig 1. Representative TTC stained cerebral sections of the Ex and No-Ex groups (A), HE stained cerebral sections of the Ex group (B) and the infarction volume (A) 48 h after MCAO. The infarction volume in the Ex group was significantly decreased compared to the No-Ex group. Two rectangle areas (B) in the motor cortex of ischemic penumbra surrounding the necrotic lesions (*) of the rectangle areas (A; #3 out of 6 consecutive TTC sections from the cranial to the caudate region) were used for the quantitative analysis of immunolabelled areas. Data are presented as mean \pm SE. *

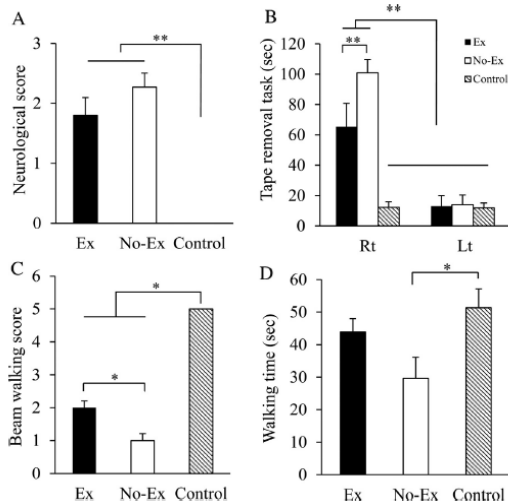


Fig 2. Neurological assessment and sensorimotor function after MCAO. The neurological scores (A), the sticky tape removal test (B), the beam walking scores (C), and rotarod walking times (D) are shown. After MCAO, the rats were observed for any neurological deficits and sensorimotor dysfunction. The rats in the Ex group had improved performance in the sticky tape-removal test and beam walking score compared to the No-Ex group. However, the neurological scores and walking times (rotarod) were not significantly different between the Ex and No-Ex

groups. We showed the values of control groups in all neurobehavioral test, because the neurobehavioral score of Ex-only and Control groups were similar. Data are presented as mean \pm SE. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

運動群の BDNF 発現量は非運動群と比べて有意に増加していた (Fig 3A,C)。正常群の脳では MK の発現は観察されなかったが、運動群、非運動群ともに脳梗塞周辺部に発現が観察された。非運動群と比較して運動群では MK の発現量が増加していた (Fig 3A,B)。

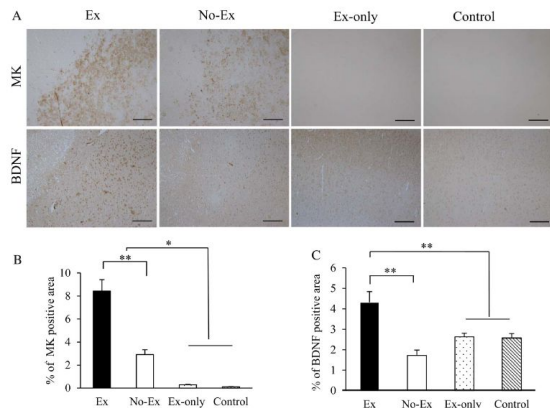


Fig 3. Photomicrographs of MK and BDNF immunoreactivities (A), graphs of the areas of MK (B), and BDNF (C) positive cells. MK immunoreactivity was not detected in the normal intact brain. After MCAO, MK expression was observed in the sensorimotor areas surrounding the necrotic lesions. The MK expression levels in the Ex group were significantly increased compared to the No-Ex group. BDNF expression was significantly increased in the Ex group and Ex-only groups compared to the No-Ex group. The left side of the photomicrographs in the Ex and No-Ex groups show the necrotic lesions. Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; scale bar in all panels = 50 μ m

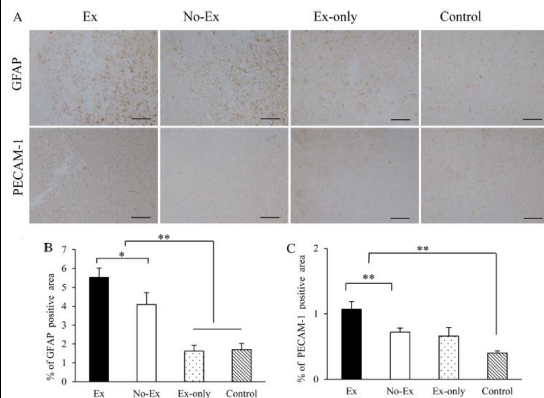


Fig 4. Photomicrographs of GFAP and PECAM-1 immunoreactivities (A); graphs of the areas of GFAP (B) and PECAM-1 (C) positive cells. After MCAO, GFAP expression in the Ex group was significantly increased compared to the No-Ex and Control groups. PECAM-1 expression in the Ex group was significantly increased compared to the No-Ex group. The left side of the photomicrographs in the Ex and No-Ex groups

show the necrotic lesions. Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; scale bar in all panels = 50 μ m

運動群における GFAP (Fig 4A,B)、PECAM-1 (Fig 4A,C) の陽性細胞は有意に増加していた。反対に Caspase 3 (Fig 5A,B)、NT (Fig 5A,C) 陽性細胞は非運動群と比較して運動群で有意に低下していた。二重染色の結果、Caspase 3、NT の発現は神経細胞で観察された (Fig 5D)

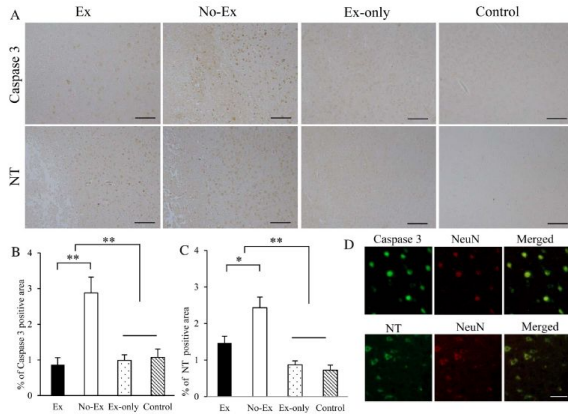


Fig 5. Photomicrographs of caspase-3 and 3-NT immunoreactivities (A); graphs of the areas of caspase-3 (B) and 3-NT (C) positive cells. After MCAO, caspase 3 and 3-NT expression levels in the Ex and No-Ex groups were significantly increased compared to the Control or Ex-only groups. The Ex group had a significantly reduced number of Caspase-3 and 3-NT positive cells compared to the No-Ex group. Caspase-3 and 3-NT immunoreactive cells were co-localized with the neuronal marker NeuN in the brain cortex (D). The left side of the photomicrographs in the Ex and No-Ex groups show the necrotic lesions. Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; scale bar in all panels of A = 50 μ m, Scale bar in all panels of D = 25 μ m

ウエスタンブロット法により運動群、非運動群のタンパク発現量を観察した結果、GFAP の発現量以外は免疫組織化学の結果と同様であった (Fig 6)

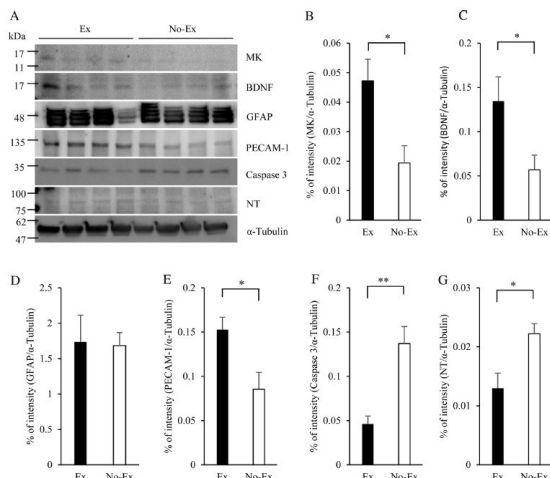


Fig 6. Expression profiles by western blot analysis in ipsilateral hemisphere (A). Western blot analysis revealed that the protein levels of MK (B), BDNF (C), and PECAM-1(E) were significantly higher in the EX group than in the No-Ex group. The protein levels of Caspase 3 (F) and NT (G) were significantly lower in the EX group than in the No-Ex group. However, result of the western blot analysis of GFAP (D) did not indicate clear difference between the Ex and No-Ex groups. Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

今回の研究より、脳梗塞前の規則的な運動トレーニングには脳梗塞縮小効果や機能回復促進が期待できることが示唆された。そのメカニズムとして神経栄養因子 MK、BDNF の発現量増加、アストロサイトの増殖、血管増生の増加、神経細胞死や酸化ストレスの減少が関与していることが示された。

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 2 件)

- Otsuka S, Sakakima H, Sumizono M, Takada S, Terashi T, Yoshida Y. The neuroprotective effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors after focal brain ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2016 303:9-18. (査読有り)
- Shimada H, Otero M, Tsuchimochi K, Yamasaki S, Sakakima H, Matsuda F, Sakasegawa M, Setoguchi T, Xu L, Goldring MB, Tanimoto A, Komiya S, Ijiri K. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) regulates the transcription of growth arrest and DNA damage-inducible protein 45 (GADD45) in articular chondrocytes. *Pathol Res Pract* 2016 212:302-9. (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

- Otsuka S, Sumizono M, Takada S, Terashi T, Yoshida Y, Sakakima H: Effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factors in a rat model of transient cerebral ischemia and reperfusion, 第39回日本神経科学学会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2016.7.20
- Sumizono M, Otsuka S, Matsuda F, Yoshida Y, Higuchi I, Sakakima H: Effect of regular treadmill running on neuropathic pain induced by chronic constriction nerve injury in rats, *Neuroscience* 2015, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) City, 2015. 6.28

3. 大塚章太郎、角園恵、松田史代、吉田義弘、榊間春利：脳梗塞発症前トレッドミル運動による神経保護作用と神経栄養因子の発現、第 50 回日本理学療法学会大会、東京国際会フォーラム（東京都千代田区）2015.6.5-7
4. 角園恵、大塚章太郎、用皆正文、榊間春利：神経因性疼痛モデルラットに対する定期的な走運動が疼痛緩和に及ぼす影響、第 50 回日本理学療法学会大会、東京国際会フォーラム（東京都千代田区）2015.6.5-7
5. Ikutomo M, Sakakima H, Matsuda F, Yoshida Y: Skeletal muscle regeneration is delayed in midkine-deficient mice, The 50th Anniversary Congress of Japanese Physical Therapy Association, 東京国際会フォーラム（東京都千代田区）, 2015.6.5-7
6. Otsuka S, Sumizono M, Matsuda F, Yoshida Y, Sakakima H: Effects of preconditioning exercise on brain damage and neurotrophic factor expression after focal brain ischemia in rats. World Confederation for Physical Therapy Congress (WCPT), Singapore Convention & Exhibition Centre (Singapore), 2015.5.3

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし

〔図書〕(計 1 件)

1. 榊間春利、上肢の運動が脳可塑性に与える影響、上肢の理学療法 局所機能と全身運動を結びつけるインタラクティブ・アプローチ 地上裕史、斉藤秀之編 pp165, 179, 三輪書店 2016.6.1

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/kadaikisoken/home/>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

米 和徳 (Yone Kazunori)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：40182844

松田 史代 (Matsuda Fumiyo)
鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：70437953