

平成21年 5月14日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700434
 研究課題名（和文） 脳梗塞後の運動療法による麻痺回復と神経栄養因子に関する研究
 研究課題名（英文） The study of paralysis recovery and neurotrophic factor by exercise after cerebral infarction
 研究代表者
 榊間 春利（SAKAKIMA HARUTOSHI）
 鹿児島大学・医学部・准教授
 研究者番号：10325780

研究成果の概要：

実験①脳梗塞発症前の運動刺激がラット脳梗塞巣に及ぼす影響を調べることを目的に脳梗塞作成前のトレッドミル運動や豊かな環境での飼育を4週間行い、脳梗塞作成後の神経栄養因子ミッドカイン（MK）の発現を組織学的、免疫組織化学的に観察した。また、脳梗塞巣の大きさを画像解析装置を用いて調べた。脳梗塞作成後梗塞巣周辺にMKの発現が観察され、脳梗塞発症前の豊かな環境での飼育は脳梗塞巣の大きさを縮小させることが示唆された。

実験②MK欠損マウスを使用し、末梢神経損傷後の神経栄養因子MKの働きを調べた。MK欠損マウスは野生型マウスと比べて、脱髄や軸索変性が軽度であり、多くの神経線維は脱髄所見が観察されず、変性が遅れていた。再生軸索数は野生型マウスと比べて少なかった。これらの結果より、MK欠損マウスはワラー変性が野生型マウスと比べて遅れることが示唆された。それに随伴して神経再生が遅延することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：理学療法

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、脳血管障害は罹患率が増加し、片麻痺など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。リハビリテーション医学では脳卒中後の運動機能障害の機能回復を得るために、様々な治療アプローチが行われている。脳には可塑性があり、脳卒中により一部の脳細胞は死んでしまうが、非損傷部位からの神経活動により新たな神経突起を伸ばし、機能回復につながる。脳梗塞周囲のペナンプラ領域には反応性アストロサイトが発現し、種々の神経栄養因子を産生し、神経保護作用があることが報告されている。運動刺激は、種々の脳神経疾患において回復促進のための介入手段として用いられ、可塑性の促進も含め、脳機能に有益な影響をもたらす。動物モデルでは、脳梗塞後早期からの適度な運動により、脳梗塞巣の縮小、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増加が報告されている。さらに、豊かな環境における飼育では、運動機能の回復や神経栄養因子の発現が増加することが示されている。

我々はレチノイン酸応答遺伝子産物として発見された分子量 13kDa のヘパリン結合性成長因子である Midkine (MK) の神経損傷後の発現、組織の修復、再生について免疫組織学的に検討してきた。MK は組織障害直後から、速やかに障害部周囲に発現し、組織修復に関与している。特に、中枢神経系障害ではアストロサイトが産生し、神経突起伸張作用を有すると報告されている。しかしながら、中枢神経障害後の運動負荷による MK の発現動態に関しては、十分に検証されていない。

2. 研究の目的

- ①本研究の目的は運動刺激方法の違いが脳細胞へ及ぼす影響を免疫組織学的に解明すること：運動負荷によって、脳細胞で生じている組織学的変化を調べ、まだ明らかとなっていない効果的な運動負荷の方法や最適な運動量を調べることである。
- ②神経栄養因子 MK の発現と運動機能の改善の関係を解明すること：近年、脳梗塞後の運動負荷と神経栄養因子の発現量増加が示されているが、神経損傷後の MK の働きに関しては不明な点が多く解明の余地が多数ある。また、末梢神経系における神経栄養因子ミッドカイン (MK) の役割について MK 遺伝子欠損マウスを用いて調べること。

3. 研究の方法

実験①

脳梗塞モデルラットを作成し、運動療法による機能回復促進の効果、アストログリア細胞の変化、神経栄養因子 MK の発現や血管増生などについて、組織学的、免疫組織学的、分子生物学的に観察した。

さらに、脳梗塞作成前のトレッドミル運動（トレッドミル Rat Runner 強制運動装置 (RR-1200 型、阿川機械工業有限会社、島根) を使用した。速度 7.2~13.1m/min、頻度は 1 日 30 分、1 週間に 5 日間行った）や豊かな環境での飼育（餌が高い位置にあり、はしごや車輪がついた刺激のある大きなケージ 550 × 450 × 400 での飼育群を豊かな環境群）、そしてコントロール群として一般的な小さな

ケージ 235×300×180 (横×縦×高さ: 単位 mm) での飼育群を比較した。

脳梗塞モデルの作成は、4%の抱水クロラール (10ml/kg) を腹腔内に投与して麻酔後、直腸温を 37°C に保つように thermostat を装備した blanket 上に、ラットを背臥位で固定した。頸部正中切開を加え、左迷走神経の保存に留意しつつ、左総頸動脈分岐部に達した。左総頸動脈分岐部を中心に、左総頸動脈および左外頸動脈を周囲結合組織より剥離し、それぞれ 4-0 絹糸にて結紮し、さらに左内頸動脈起始部に糸をかけて塞栓挿入後の結紮・固定に備えた。次いで、左総頸動脈を切開し、同部より塞栓を左内頸動脈に向けて挿入、塞栓のナイロン糸近位端を前述の絹糸で左内頸動脈に結紮・固定した。以上の操作より、塞栓の先端は左中大脳動脈分岐部を越えて、左前大脳動脈内に約 1~2mm 入り、塞栓の体部で中大脳動脈入口を閉塞した。90 分後、塞栓を抜き再開通を行った。

脳梗塞作成 48 時間後に、体重測定した後、4%抱水クロラールにて麻酔後、ヘパリン加生理食塩水により脱血灌流し、断頭にて脳を摘出し、厚さ 2mm の連続冠状断脳切片を 6 切片作製した。その後、37°C に設定したインキュベーターにて 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色を行い、冠状断スライド切片を一晩 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (pH: 7.4) で浸漬固定し、脳梗塞巣を測定するため、写真撮影後、パラフィン包埋器にてパラフィンブロックを作製した。そのパラフィンブロックをマイクロトーム (にて厚さ 4 μm の連続切片 (冠状断) を作製した。これらの切片に対し、免疫組織化学染色 (immunohistochemistry) を行った。また、ヒラメ筋、腓腹筋、長指伸筋の筋湿重量を測定した。

TTC 染色をした写真を Scion Image に取

り込み、反対側との比から梗塞巣の体積を算出した。

実験②

MK 欠損マウスを使用して末梢神経損傷モデルを作成し、MK の末梢神経神経系での作用を電子顕微鏡的や電気生理学的に観察した。

液体窒素で冷却した葉さじをマウスのヒラメ筋進入部から約 10mm の部位で凍結と融解を繰り返し損傷した。MK 欠損マウスと野生型マウスから経時的に 5 週まで坐骨神経とヒラメ筋を採取して、組織学的に観察した。また、坐骨神経の機能的回復を観察するために損傷近位部に電気刺激を行い、誘発筋電図を計測した。

坐骨神経はエポン包埋して光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した。ヒラメ筋は電子顕微鏡で神経筋接合部を観察し、再生程度を評価した。経時的にヒラメ筋重量を測定した。

誘発筋電図の波形の振幅や、ヒラメ筋重量の変化は統計学的に処理した。

4. 研究成果

実験①

ヒラメ筋において、豊かな環境群の方がコントロール群と比べ、有意に大きかった。腓腹筋、長指伸筋において、両群間に有意差はみられなかった。TTC 染色により、正常組織は赤く、脳梗塞巣は白く染まる。今回、大脳全体の体積に占める脳梗塞の割合を算出して比較した。両群間の脳梗塞の大きさに有意差はなかったが、豊かな環境群は脳梗塞巣が縮小する傾向にあった。抗 MK 染色では、梗塞部周辺にミッドカインの発現がみられた。抗 NGF 染色では、ミッドカインの発現と同様に梗塞部周辺に発現していた。コントロー

ル群は、損傷部周辺に限局して NGF の発現がみられた。豊かな環境群、運動群では全体的に発現がみられた。抗 PECAM 染色では、豊かな環境群に新生血管が多くみられた。

脳梗塞モデルラットを作製し、神経栄養因子ミッドカイン (MK) の発現動態を免疫組織化学的に観察し、定量化した。また、運動療法 (トレッドミル走行) による神経栄養因子の発現量、脳梗塞巣の大きさ、機能回復の関係を明らかにした。また、運動刺激の多い豊かな環境での飼育は脳梗塞の体積を減少させる傾向にあった。MK や NGF の発現が梗塞巣周囲に観察された。これらの結果より、脳梗塞発症前の豊かな環境での飼育は脳梗塞巣の大きさを縮小させるかもしれないことが示唆された。

実験②

MK 欠損マウス (Mdk^{-/-}) を使用した研究では、野生型マウス (Mdk^{+/+}) と比較して末梢神経損傷の再生が遅れた。マウスの坐骨神経を凍結損傷して、損傷遠位部の坐骨神経を組織学的に観察すると、損傷1週後の野生型マウスは脱髄と軸索変性がみられ、2週後には再生軸索が観察されたが、MK 欠損マウスでは脱髄や軸索変性が軽度であり、多くの線維は脱髄所見が観察されず、変性が遅れていた。3-4週後に再生軸索が観察されたが、野生型マウスと比較すると数が少なかった。坐骨神経損傷後のヒラメ筋湿重量を測定すると野生型マウスは損傷1週後に急激に減少し、2週後から増加したが、MK 欠損マウスは重量の減少が緩やかで、3-4週後から増加を認めた。ヒラメ筋におけるシナプス小胞をもった神経終末の数を観察すると、MK 欠損マウスは野生型マウスと比較して再生が遅れていた。さらに損傷近位部電気刺激による誘発筋電図では野生型マウスと比較して MK

欠損マウスの筋電波形が遅れて観察された。これらの結果より、MK 欠損マウスではワラー変性が緩やかに進行しそれに伴って神経再生が遅れることが示唆された。

これらの結果より、MK 欠損マウスを使用した末梢神経障害モデルにおいて、MK はワラー変性を遅延させることによって神経再生を遅延させることが示唆された。

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)

①Harutoshi Sakakima, Yoshihiro Yoshida, Yoshiki Yamazaki¹, Fumiyo Matsuda, Masako Ikutomo, Kosei Ijiri, Hisako Muramatsu, Takashi Muramatsu, Kenji Kadomatsu. Disruption of the midkine gene (Mdk) delays degeneration and regeneration in injured peripheral nerve. J NeuroSci Res 2009 (In press) (査読有り)

②Yoshida Y, Ikematsu S, Muramatsu H, Sakakima H, Mizuma N, Matsuda F, Sonoda K, Umehara F, Ohkubo R, Matsuura E, Goto M, Osame M, Muramatsu T. Expression of the heparin-binding growth factor midkine in the cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. Intern Med 47, 83-89, 2008 (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

①Fumiyo Matsuda, Ai Irie, Harutoshi Sakakima, Masako Ikutomo, Yoshihiro Yoshida. The effects of treadmill training

in different period groups following middle cerebral artery occlusion in rats. 10th International Congress of the Asian Confederation for Physical Therapy (ACPT). 2008. 8. 30 千葉

②松田史代、榊間春利、吉田義弘. 脳梗塞後のトレッドミル運動は神経栄養因子の発現を増加させる. 第 31 回日本神経科学大会, 2008. 7. 10 東京

③ Fumiyo Matsuda, Kiyoshi Kikuchi, Ko-ichi Kawahara, Harutoshi Sakakima, Ikuro Maruyama, Yoshihiro Yoshida. 実験的脳梗塞ラット急性期における HMGB1 の発現について. 第 30 回日本神経科学大会. 2007. 9. 12 横浜市

④ Fumiyo Matsuda, Yoshihiro Yoshida, Harutoshi Sakakima. EXERCISE IMPROVES THE NEUROLOGICAL DEFICIT AND INCREASES MIDKINE EXPRESSION IN THE SURROUNDING ZONE OF INFARCT IN RAT BRAIN. World Confederation for Physical Therapy 2007. 6. 6 バンクーバー

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊間 春利 (SAKAKIMA HARUTOSHI)

鹿児島大学・医学部・准教授

研究者番号：10325780

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし