

令和 2 年 4 月 26 日現在

機関番号：17701  
 研究種目：基盤研究(C)（一般）  
 研究期間：2017～2019  
 課題番号：17K01459  
 研究課題名（和文）脳梗塞発症前・後の運動療法による機能回復と神経保護メカニズム解明に関する研究

研究課題名（英文）Study of functional recovery and neuroprotective mechanisms due to pre-and post-conditioning exercise in a stroke.

研究代表者  
 榊間 春利（Harutoshi, Sakakima）  
 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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、脳梗塞発症前の3週間の定期的preconditioning運動による神経保護メカニズムを調べ、効果的な運動強度や頻度について検討を行った。preconditioning運動によってHIF-1及び14-3-3発現増加を介して脳虚血耐性を誘導することを示唆し、脳梗塞後のペナンプラ領域の神経細胞死を減少させる経路の一つとして14-3-3 /p- -catenin Ser37/Bax/caspase-3の抗アポトーシス経路の活性化を明らかにした。preconditioning運動による脳梗塞縮小効果には少なくとも週3回以上の運動習慣により脳神経保護効果が期待できることが示唆された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

日々の運動習慣は生活習慣病の予防に重要だけでなく脳卒中発症の予防効果が期待できることが知られている。近年、規則的な運動を行うことによって、たとえ脳梗塞が発症したとしても、脳梗塞巣の縮小効果や機能回復促進効果が期待できることが報告されている。本研究は、日々の規則的な運動習慣による脳神経保護効果の脳内メカニズムの解明を目指すものであり学術的意義が高い。さらに、予防リハビリテーション分野へ臨床応用するために、神経保護効果を期待できる適切な運動条件を明らかにする臨床へのトランスレーションを目的とした研究成果であり社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We firstly investigated the anti-apoptosis mechanism of enhanced 14-3-3 mediated by preconditioning exercise-induced brain ischemic tolerance after stroke. Secondly, we examined the neuroprotective effect of different frequency preconditioning exercise on neuronal apoptosis after cerebral ischemia in rats. Preconditioning exercise prior to ischemia induces neuron- and astrocyte-mediated brain ischemic tolerance through increased expression of HIF-1 and 14-3-3, which are intrinsic protective factors; the upregulated 14-3-3 induced by preconditioning exercise reduces ischemic neuronal cell death through the 14-3-3 /p- -catenin Ser37/Bax/caspase-3 anti-apoptotic pathway. Furthermore, three times or more per week of high-intensity preconditioning exercise exert neuroprotective effects through the downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activation after stroke.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：リハビリテーション 脳神経保護 プレコンディショニング運動 運動療法 脳梗塞 脳神経科学 可塑性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 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、運動機能障害などの原因として社会的な問題となっている。また、要介護者のうち約 24% が脳卒中で、寝たきり患者の約 4 割が脳卒中後遺症によると言われている。そのような中、健康管理や規則的な運動習慣により脳卒中の発症の予防効果が期待できることが報告されている。たとえ脳卒中になっても、リハビリテーションにより身体障害を軽減することは国民的課題と言える。脳梗塞モデル動物を用いた基礎研究において、脳梗塞前の規則的なトレッドミル運動 (preconditioning 運動) による神経保護作用や脳梗塞縮小効果が示されている。そのメカニズムには血管形成、神経栄養因子の発現増加、アポトーシス抑制、血液脳関門の破綻の軽減などが関与している。

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。有酸素運動は、BDNF、NGF などの神経栄養因子の発現量を増加させる。動物モデルにおいて、脳梗塞後の有酸素運動は、脳梗塞縮小効果、機能改善、BDNF、NGF の発現増加、神経可塑性の促進が報告されている。しかし、脳梗塞発症前・後の運動療法による神経保護メカニズムや神経保護を生じる適切な運動強度や頻度、開始時期、運動量などの運動条件に関しては完全に解明されていない。これは臨床へ応用するための重要な情報である。そこで、本研究課題では、実験として脳梗塞発症前の Preconditioning 運動による神経保護メカニズムを調べ、実験として Preconditioning 運動による効果的な運動強度や頻度について検討した。

### 2. 研究の目的

#### 実験

preconditioning 運動による脳梗塞縮小効果と神経保護メカニズムに関して、内因性保護因子 14-3-3 発現を介した抗アポトーシス経路を解明すること。

#### 実験

神経保護効果が期待できる preconditioning 運動の運動頻度を明らかにすること。

### 3. 研究の方法

#### 実験

実験動物には 7 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット 34 匹を用いた。ラットは、preconditioning 運動後に脳梗塞を作製した群 (Ex 群、n=11)、Preconditioning 運動をせずに脳梗塞を作製した群 (No-Ex 群、n=11)、Preconditioning 運動後に脳梗塞を作製しない群 (Ex-only 群、n=6)、preconditioning 運動をせず、脳梗塞も作製しない群 (control 群、n=6) の 4 つの群に無作為に分類された。preconditioning 運動のプロトコールは小動物用トレッドミルを用いて、週 5 日間、25m/分、30 分、3 週間行った。運動介入 3 週後にラットの左内頸動脈からフィラメントを挿入し、60 分間の虚血・再灌流により中大脳動脈領域の脳梗塞 (middle cerebral artery occlusion: MCAO) を作製した。

脳梗塞作製 48 時間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、Beam Walking (BW) test、Rota Rod (RR) 耐久性テスト、前肢での tape removal test を行った。評価後に脳を採取して、2mm 間隔の前額断を作成し 2,3,5-triphenylterazolium chloride (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。脳組織をパラフィン包埋後、低酸素誘導因子である HIF-1、内因性保護因子である 14-3-3、活性化アストロサイトのマーカーである GFAP、神経細胞のマーカーである NeuN、アポトーシスに関与する Bax と Caspase-3、イオンチャネル型 P2X7 受容体の発現を免疫組織化学染色で観察した。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。さらに損傷側半球における HIF-1、14-3-3、p-catenin Ser37、Bax、P2X7 受容体、Caspase-3 の発現を Western blotting 法 (各群 n=4) を用いて調べた。統計学的検定には student の t 検定あるいは Mann-Whitney U test を用い、有意水準は 5% とした。

#### 実験

実験動物には 240~280g の SD 系雄性ラット 52 匹を用いた。ラットは無作為に、5 回/週の preconditioning 運動後に脳梗塞を作製した群 (5/w-Ex 群 n=11)、3 回/週の preconditioning 運動後に脳梗塞を作製した群 (3/w-Ex 群 n=11)、1 回/週の preconditioning 運動後に脳梗塞を作製した群 (1/w-Ex 群 n=12)、preconditioning 運動なしで脳梗塞を作製した群 (No-Ex 群 n=12)、無処置の control 群 (n=6) の 5 群に分類した。preconditioning 運動のプロトコールは、小動物用トレッドミルを用いて、週 5 日間、25m/分、30 分、3 週間行った。運動介入 3 週後にラットの左内頸動脈からフィラメントを挿入し、60 分間の虚血・再灌流により MCAO を作製した。

脳梗塞作製 48 時間後に神経学的評価として、NS、運動感覚機能評価として BW test、前肢での tape removal test を行った。評価後に脳を採取して、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。脳組織をパラフィン包埋後、ミトコンドリアのアポトーシスの促進因子である Bax と抑制因子 Bcl2、アポトーシス最終決定因子である Caspase-3 の発現を免疫組織化学染色で観察した。さらに、アポトーシス細胞を dUTP nick and labeling (TUNEL) assay を用いて調べた。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。さらに損傷側半球における

Caspase-3 の発現を Western blotting 法を用いて調べた。統計学的検定には Kruskal-Wallis test あるいは一元配置分散分析を用い、有意水準は 5% とした。

#### 4. 研究成果

##### 実験

(1) 3 週間の preconditioning 運動による脳内生理活性物質の変化を検討した結果、control 群と比較して Ex-only 群の大脳皮質には HIF-1 や 14-3-3 タンパク発現が有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。免疫組織化学染色により大脳皮質ニューロンやアストロサイトに HIF-1 や 14-3-3 陽性細胞が観察された (図 1)。

これらの結果は、定期的な運動介入により脳内で虚血性変化が観察され、内因性保護因子の増加を生じさせることを明らかにした。つまり、preconditioning 運動は内因性保護因子の増加を介して脳虚血耐性を誘導することを示唆した。

(2) さらに、preconditioning 運動後に脳梗塞を作製した Ex 群は No-Ex 群と比較して脳梗塞巣の体積は有意に縮小しており ( $p < 0.05$ )、NS は Ex 群と No-Ex 群で有意差は認められなかったが、BW test、RR 耐久性 test、tape removal test は有意に Ex 群が改善していた (図 2、 $p < 0.05$ )。

(3) Ex 群のペナンプラ領域ではニューロンやアストロサイトに HIF-1 や 14-3-3 発現細胞が有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。反対に Bax、Caspase-3 の発現は有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。

さらに、Ex 群の 14-3-3 の増加と関連して p- $\beta$ -catenin Ser37 の増加も観察された (図 3)。これらの結果は、Preconditioning 運動は脳梗塞後に内因性保護因子である HIF-1 や 14-3-3 の発現増加を生じ、ペナンプラ領域のニューロンやアストロサイトのアポトーシスを減少させ、脳梗塞体積の縮小や感覚運動機能に影響していることが示唆した。さらに 14-3-3 / p- $\beta$ -catenin Ser37/Bax/Caspase-3 の抗アポトーシス経路の活性化が関与していることを明らかにした。

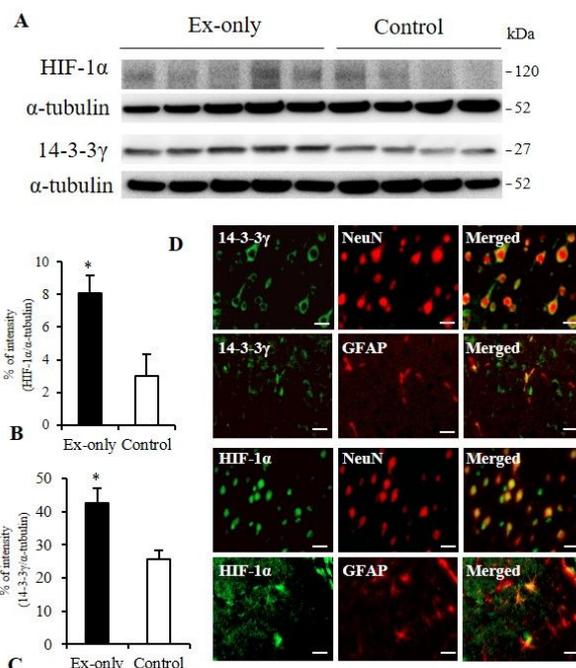


図1. Preconditioning exercise (PE)は脳内のHIF-1αや14-3-3γタンパク発現が有意に増加させた (A,B, and C)。大脳皮質のHIF-1αや14-3-3γ陽性細胞はNeuNやGFAP陽性のニューロンやアストロサイトに観察された (D)。\*  $p < 0.05$

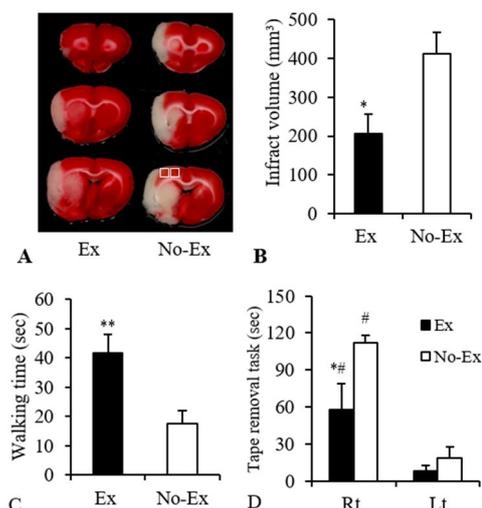


図2. Preconditioning exercise (PE)は脳梗塞巣を有意に縮小させ (A, B)、感覚運動機能の改善を認めた (C, D)。\*  $p < 0.05$ (Ex vs No-Ex) # $p < 0.05$ (Rt vs Lt)

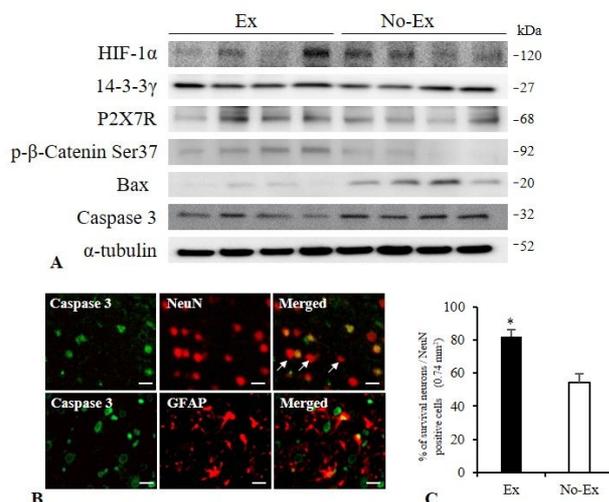


図3. Preconditioning exercise (PE)は脳梗塞後のHIF-1α、14-3-3γ、p2X7R、p $\beta$ -Catenin Ser37の発現を増加させ、Bax、Caspase 3の発現を減少させた (A)。Caspase 3陽性細胞はペナンプラ領域のニューロンやアストロサイトに観察された (B)。NeuN陽性でCaspase3非陽性細胞 (生存ニューロン) の割合はEx群で有意に多かった (C)。\*  $p < 0.05$ (Ex vs No-Ex)

実験

(4) preconditioning 運動の運動頻度による脳神経保護効果を検討した結果、3/w-Ex 群と 5/w-Ex 群は有意に脳梗塞巣の縮小効果を認めた (図 4)。

(5) control 群と比較して、3/w-Ex 群と 5/w-Ex 群の NS や tape removal test は有意に改善していた。免疫組織化学染色より、ペナンプラ領域における Bax/Bcl2 発現面積比は control 群と比較して 5/w-Ex 群と 3/w-Ex 群で有意に減少していた (図 5)。TUNEL 陽性細胞数は Control 群と比較して 5/w-Ex 群で有意に減少していた (図 5)。

(6) Western blotting 法により損傷側半球における Caspase-3 タンパクの発現は control 群と比較して 3/w-Ex 群と 5/w-Ex 群で有意に減少していた (図 6)。

これらの結果は、少なくとも週 3 回の preconditioning 運動の介入が脳梗塞後の神経保護効果を獲得するためには必要であることを示唆した。

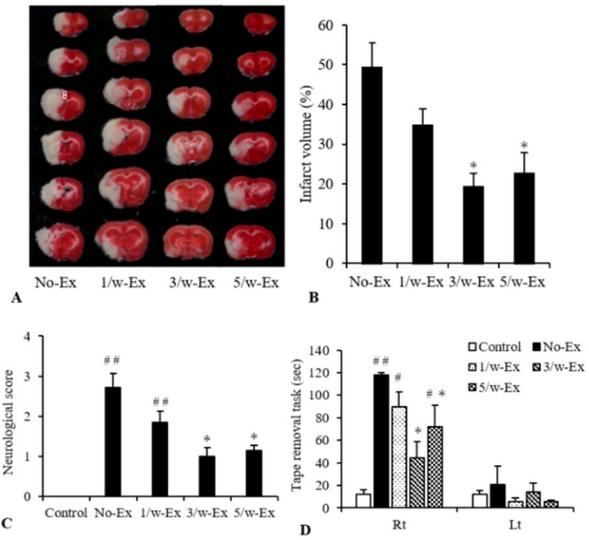


図4. 各群のTTC染色を示す (A)。3/w-Ex群と5/w-Ex群は有意に脳梗塞巣の縮小効果を認めた (A, B)。3/w-Ex群と5/w-Ex群のNSやtape removal testは有意に改善していた (C, D)。\* p<0.05 (Ex vs No-Ex), # p<0.05, ## p<0.01 (Rt vs Lt)

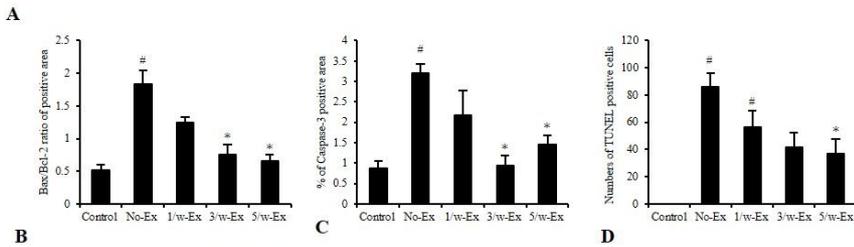
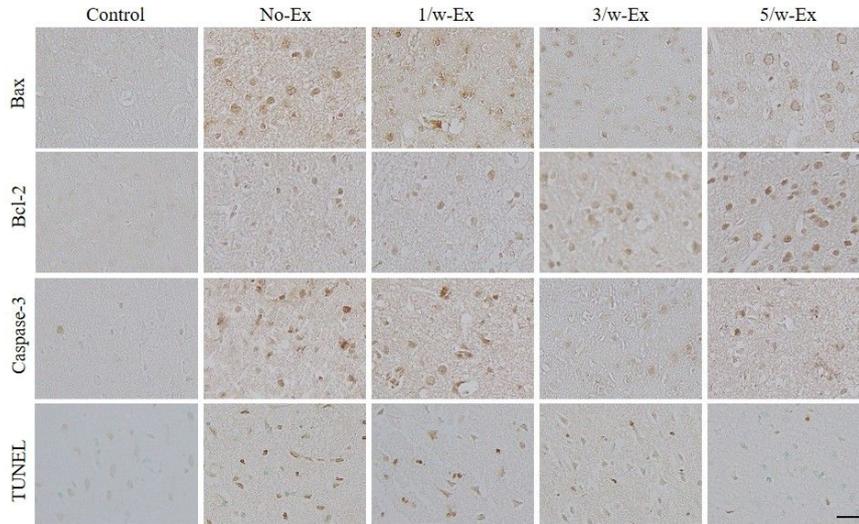


図5. 免疫組織化学染色 (A) はNo-Ex群でアポトーシス促進因子Baxの発現とCaspase3の発現が増加し、3/w-Ex群と5/w-Ex群で減少した。反対にアポトーシス抑制因子BCL-2の発現とは運動群で3/w-Ex群と5/w-Ex群で増加した (B, C)。TUNEL陽性細胞は運動頻度が大きくなるにつれて減少した (D) \* p<0.05 (Ex vs No-Ex)

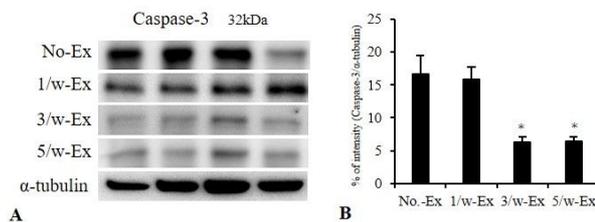


図6. Caspase3タンパクの発現をWestern blotting法で観察した結果、有意に3/w-Ex群と5/w-Ex群で減少した (A, B)。\* p<0.05 (Ex vs No-Ex)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Otsuka S, Sakakima H, Terashi T, Takada S, Nakanishi K, Kikuchi K.	4. 巻 224(2)
2. 論文標題 Preconditioning exercise reduces brain damage and neuronal apoptosis through enhanced endogenous 14-3-3 after focal brain ischemia in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Struct Funct	6. 最初と最後の頁 727-738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00429-018-1800-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terashi T, Otsuka S, Takada S, Nakanishi K, Ueda K, Sumizono M, Kikuchi K, Sakakima H.	4. 巻 41(6)
2. 論文標題 Neuroprotective effects of different frequency preconditioning exercise on neuronal apoptosis after focal brain ischemia in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurol Res	6. 最初と最後の頁 510-518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01616412.2019.1580458.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakakima H	4. 巻 22(2)
2. 論文標題 Endogenous neuroprotective potential due to preconditioning exercise in stroke.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phys Ther Res	6. 最初と最後の頁 45-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1298/ptr.R0006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takuto Terashi, Shotaro Otsuka, Seiya Takada, Kazuki Nakanishi, Koki Ueda, Megumi Sumizono, Harutoshi Sakakima.
2. 発表標題 Neuroprotective effect of different frequency preconditioning exercise on down-regulation of Bax/Bcl-2 confers apoptosis after cerebral infarction in rats.
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚章太郎、高田聖也、中西和毅、板敷裕喜、則松孝輔、谷明、榎間春利
2. 発表標題 脳梗塞発症前運動による脳虚血耐性の獲得と脳梗塞後の14-3-3 発現を介したアポトーシス抑制
3. 学会等名 第23回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎間春利
2. 発表標題 運動と脳神経保護
3. 学会等名 第3回基礎理学療法学術大会 夏の学校（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚章太郎、寺師拓斗、上田晃希、中西和毅、高田聖也、角園恵、榎間春利；
2. 発表標題 定期的なトレッドミル運動によるラット脳梗塞後の神経保護効果とその作用機序について
3. 学会等名 第16回コ・メディカル形態機能学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takuto Terashi, Shotaro Otsuka, Seiya Takada, Kazuki Nakanishi, Koki Ueda, Megumi Sumizono, Harutoshi Sakakima
2. 発表標題 Neuroprotective effect of different frequency preconditioning exercise on down-regulation of Bax/Bcl-2 confers apoptosis after cerebral infarction in rats
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚章太郎、高田聖也、中西和毅、板敷裕喜、則松孝輔、谷明、榊間春利
2. 発表標題 脳梗塞発症前予防運動による脳虚血耐性の獲得について
3. 学会等名 第17回コ・メディカル形態機能学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚 章太郎 、高田 聖也、中西和毅、榊間 春利
2. 発表標題 脳梗塞発症前運動は、ラットの局所脳虚血後、内在性14-3-3 の増強を介して脳損傷および神経細胞のアポトーシスを減少させる
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 板敷裕喜、大塚章太郎、谷明、高田聖也、中西和毅、則松貢輔、榊間春利
2. 発表標題 脳虚血中の遠隔虚血性コンディショニングが脳保護効果に及ぼす影響
3. 学会等名 第18回コ・メディカル形態機能学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	樋口 逸郎  (Higuchi Itsuro)  (80183573)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	