

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01482

研究課題名（和文）脳梗塞モデル動物でのオリゴデンドロサイトの新生・分化に対する運動療法の役割

研究課題名（英文）The role of exercise on the oligodendrogenesis and recovery of motor functions in focal stroke model in rats

研究代表者

熊田 竜郎（KUMADA, Tatsuro）

常葉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00402339

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞後の運動療法は機能回復に関わるが、その神経学的な機序については良く分かっていない。我々は脳梗塞モデルラットを用いて、運動機能の回復と神経幹細胞からの細胞新生（特にオリゴデンドロサイト前駆細胞）を含む神経系の再構築における様々な運動処方の役割について検討した。術後の運動機能は二相性の回復経過を示し、各種運動処方の違いは後期に影響が強いことが分かった。また、BrdUを用いた標識実験により、この時期において、運動負荷法により神経細胞やオリゴデンドロサイトの前駆細胞の数を増加させる傾向があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、中枢神経系の損傷後に内在性の幹細胞が新たに増殖分化する事が機能の回復に関与する事が見出され、潜在的な可塑性を引き出す重要性が示唆されている。このような神経系の再構築とリハビリテーションの関わりに関する知見は未だ少ない。我々は局在性脳梗塞モデル動物に対する様々な運動処方が運動機能の回復とオリゴデンドロサイトの前駆細胞を含む細胞新生に対する影響について調べた。身体機能と脳内での変化に基づく運動処方の在り方を考える上でのエビデンスを示唆できたと考えている。

研究成果の概要（英文）：Exercise therapy significantly contributes to functional recovery after cerebral infarction. However, its neurological mechanism is not well understood. We developed a focal cerebral infarction model in rats to investigate the effect of various exercise training on the recovery of motor function and the reconstruction/reorganization of the nervous system. Here, we focused on the generation of oligodendrocyte progenitor cells as well as neurons from neural stem cells. Beam-walking test revealed that motor recovery was different in time-dependent manner, showing a biphasic recovery process after post-operation. There were apparent differences in the effect of various exercises in the later stages. In addition, BrdU labeling experiments revealed that low-intensity exercises which had most effective tended to increase the number of neurons and oligodendrocyte progenitor cells during this period.

研究分野：ニューロリハビリテーション

キーワード：stroke recovery exercise

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞を含む脳血管障害は死亡要因の上位であるばかりでなく、発症後に後遺症を残し日常生活に支障をきたす代表的な疾患である。このような中枢神経系疾患の治療法として幹細胞に着目した再生医療が注目されている。一般に脳梗塞患者の運動障害や高次脳機能障害などからの機能回復に運動療法を含むリハビリテーション介入が重要な役割を果たしているのは周知であるが、運動処方についても臨床(経験)的根拠に基づいて決められており、その神経学的な機序については分かっていない。再生医療後のリハビリテーションについては、脳内での幹細胞の分化や神経回路の再形成などへの影響など神経科学的な側面も考慮する必要が出てくると考えられる。そこで、我々は幹細胞の分裂や分化を伴う神経系の再構築におけるリハビリテーションの意義を解明するため、独自に確立した運動皮質梗塞モデル動物を用いて、運動負荷が神経系細胞の新生に与える影響について調べている。

神経系の障害後の再構築においては、一般には神経細胞に焦点が当てられ、神経細胞がどの程度既存の神経回路に取り込まれるのかが重要視されている。しかし、最近傷害後に新たに産生されるグリア細胞とその役割が注目されている(Liddelow & Barres, *Nature*, 2016, Lewis *Nat Rev Neurosci*, 2016 など)。例えば、脊髄損傷時においては内在性の神経幹細胞からアストロサイトを新生することが機能回復に重要である事が報告された(Benner et al, *Nature*, 2013)。また中枢神経系を自由に動くと考えられてきたアストロサイトも、実際には傷害時においてもアストロサイトの移動は隣接領域に限定されていることが判明してきており(Bardehel et al, *Nat Neurosci*, 2013) 傷害後には神経細胞ばかりでなく、特定の修復作用を持つグリア細胞も必要とする場合へと導く必要があるのかもしれない。このような新生グリア細胞の分化や移動に対する運動負荷(などのリハビリ)の効果についてはよく分かっていない。

オリゴデンドロサイトは、中枢神経系で髄鞘を形成するグリア細胞である。この細胞は、成体では発生期と異なる特定の幹細胞から生じるため、その産生や分化も制限される可能性が示唆されている。脳梗塞後には髄鞘を持つ有髄神経にも損傷を起こすが、その後の機能回復と再構築時におけるオリゴデンドロサイトの再生との関係性については良く分かっていない。

2. 研究の目的

前述の通り成体ラットの脳梗塞後の運動療法の脳神経系の再構築に関わる機序については良く分かっていない。本研究では、大脳皮質の運動野に対して局所性の脳梗塞を引き起こした実験モデル動物に様々な運動療法を課し、急性期から慢性期にかけて運動機能の回復にどのような影響を及ぼすのか詳細に調査し、その過程における神経系の再構築における細胞の新生、特にオリゴデンドロサイトの新生や分化に及ぼす影響を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験的脳梗塞モデル動物の作出：頭頂部に脳梗塞巣を持つモデル動物の作出

光増感法(Photochemically-induced thrombosis :PIT法)で運動皮質が存在する大脳皮質頭頂部のみ脳梗塞巣が生じるモデル動物を効率よく作出した。具体的には、深麻酔下で頭頂部の皮膚を切開後、頭蓋骨表面のプレグマから左外側 2.0mm、前方 2.0mm の位置にドリルで小穴を開け、光増感剤であるローズベンガルを静脈内投与した後、専用デザインした光ファイバーを用いて緑色光を中大脳動脈の支流に 10 分間照射することで血管内皮細胞障害性血栓生成を惹起し、中大脳動脈を血栓閉塞した。

(2) 脳梗塞モデル動物の運動機能の評価法の検討

神経学的評価

脳梗塞後の障害の程度を調べるため、Kawano et al., (2000) *J Cereb Blood Flow Metab* の方法に基づき、徒手的に以下の評価項目についての運動機能評価を行い、神経学的評点を得た。評価項目：1) 姿勢、2) 前肢の屈曲、3) 後肢の屈曲、4) 姿勢保持、5) 前肢運動機能

ビームウォーク試験による肢スリップ解析

動物を細い角棒の上を歩行させて、各四肢のスリップ度合いを評価するビームウォーク試験を行った。

三次元動作分析による歩行動作の解析

各種動物群に分けたラットを麻酔下で各関節部位にマーカーを装着した。動物をトレッドミル走行させ、その歩行動作を4方向に設置した動画撮像装置で撮像した。各動画を三次元動作分析ソフトウェアに取り込み、歩行周期解析などを含む動作分析を行った。

(3) 脳梗塞モデル動物に課す運動負荷の条件検討と血中乳酸値の測定

脳梗塞後の運動機能や神経系の再構築に係るより効果的な運動負荷法を調べるために、以下の運動負荷法を課した。トレッドミル走による強制走行、回転ケージを飼育ケージに設置することによる自発走の促進、対照群は特に運動負荷を課さなかった。

運動負荷時に随時採血し、ラクテート・プロ2を用いて血中乳酸値を測定した。

(4) 運動負荷がオリゴデンドロサイトの前駆細胞に及ぼす影響：蛍光免疫組織学的検討

脳梗塞後の運動負荷時における新生細胞について調べるために、分裂細胞を標識するBrdUラベリング実験を実施した。下記に示す免疫染色法によりBrdU陽性細胞と各種細胞系譜のマーカーとの共染色を行った。具体的には、麻酔後灌流固定したラットより大脳を取り出し、パラフィン包埋後、薄層切片を作製した。抗BrdU抗体とオリゴデンドロサイトの前駆細胞のマーカー分子である抗NG2抗体、抗Olig2抗体を用いて蛍光二重免疫染色を行った。

当初、発生・分化に対する機序の探求のため、培養系の実験系を立ち上げていたが、台風24号の長期停電被害に伴う損失により断念し、上記の研究に専念せざるを得なかった。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞モデル動物の運動機能の神経学的評価

我々はPIT法により大脳皮質運動野に局所的な脳梗塞を持つモデル動物を作出した。このモデル動物の運動障害の程度を調べるため、脳卒中モデル動物の運動評価で一般的に行われる徒手的评价による神経学的な評価を行った。術後の脳梗塞モデル動物においても、神経学的評点の中間値は1であり、モデル動物としては軽微な障害を示す動物である事が示唆され(Morishita et al., 2020)、さらなる運動評価法の確立を必要とした。

(2) 異なる運動処方と血中乳酸値の関係性について

運動負荷により体内の状況が酸素不足に陥ると嫌気性糖代謝が優位となり乳酸レベルが上昇することから、血中乳酸レベルで運動負荷量の強度を知ることができる。また、乳酸自体が中枢神経系の栄養源、特にオリゴデンドロサイトが神経細胞由来の線維である軸索に対して供給する栄養源である、ことが近年報告されている。そこで、様々な運動負荷(強度の異なるトレッドミル走、回転車での運動)を課した場合の血中乳酸レベルを調べた。トレッドミル走の走行速度を上昇させることで血中乳酸濃度が増加することが分かった。この血中乳酸レベルによる強負荷運動、低負荷運動に分類した。

(3) 脳梗塞モデル動物の運動機能の評価法の検討

ビームウォーク試験による運動障害とその後の運動処方による機能回復についてその過程を1年間にわたり詳細に解析した。非運動群の動物の術後の運動機能は、術後2週間以内に一過性に回復傾向を示すが、その後悪化し、慢性期には障害が残ること、すなわち、回復に二相性の変化がある事が明らかになった。運動負荷群は、後期の変化に対して、より強い効果を持つ傾向があることが分かった。

三次元動作分析法により脳梗塞術前・術後におけるトレッドミル走行時の後肢の動きについて運動学的な解析を行った。歩行周期に関わる一般的なパラメーター(立脚期時間・遊脚期時間など)上においては術前・術後に有意差はなかった。このことは神経学的な評価の結果を支持する。一方で、各関節部の軌跡においては違いが見られており、さらに解析中である。

(4) 運動負荷がオリゴデンドロサイトの前駆細胞に及ぼす影響

様々な運動処方(強度の異なるトレッドミル走、自発走)条件において、運動処方の違いによりBrdU陽性の総数には有意差はなかった。二重免疫染色法により、異なる運動負荷により生じた細胞の種類に違いが見られた(Morishita et al., 2020)。低負荷運動群においては、新生神経細胞に加えて、NG2陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞数が増加する傾向があった。グリア細胞の前駆細胞は分裂を継続している可能性が高く、BrdU標識実験では全体を捉えられていない可能性も考えられる。そこで、オリゴデンドロサイトの発生の最終形態である髄鞘を対象にする必要性が示唆され、新たな研究課題でこの目的を達成したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morishita Saho, Hokamura Kazuya, Yoshikawa Akira, Agata Nobuhide, Tsutsui Yoshihiro, Umemura Kazuo, Kumada Tatsuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Different exercises can modulate the differentiation/maturation of neural stem/progenitor cells after photochemically induced focal cerebral infarction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain and Behavior	6. 最初と最後の頁 1535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/brb3.1535	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 -
1. 著者名 Hashimoto Takuya, Mogami Hideo, Tsuruya Daisuke, Morita Hiroshi, Sasaki Shigekazu, Kumada Tatsuro, Suzuki Yuko, Urano Tetsumei, Oki Yutaka, Suda Takafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 G-protein-coupled receptor 40 agonist GW9508 potentiates glucose-stimulated insulin secretion through activation of protein kinase C and in INS-1 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0222179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0222179	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 -
1. 著者名 Inenaga C, Hokamura K, Nakano K, Nomura R, Naka S, Ohashi T, Ooshima T, Kuriyama N, Hamasaki T, Wada K, Umemura K, Tanaka T	4. 巻 113
2. 論文標題 A Potential New Risk Factor for Stroke: Streptococcus Mutans with Collagen-Binding Protein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Neurosurg	6. 最初と最後の頁 e77-e81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2018.01.158	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 Ohmori C, Sakai Y, Matano Y, Suzuki Y, Umemura k, Nagai N	4. 巻 67
2. 論文標題 Increase in blood-brain barrier permeability does not directly induce neuronal death but may accelerate ischemic neuronal damage.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Anim.	6. 最初と最後の頁 479-486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.18-0038	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 Watanabe K, Masaoka Y, Kawamura M, Yoshida M, Koiwa N, Yoshikawa A, Kubota S, Ida M, Ono K, Izumizaki M	4. 巻 9
2. 論文標題 Left Posterior Orbitofrontal Cortex Is Associated With Odor-Induced Autobiographical Memory: An fMRI Study. <i>Frontiers in Psychology</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 <i>Frontiers in Psychology</i>	6. 最初と最後の頁 687 -687
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpsyg.2018.00687	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 Umemura K, Ikeda Y, Matsushima N, and Kondo K	4. 巻 6
2. 論文標題 Platelet Aggregation Inhibitory Effects and Pharmacokinetics of Prasugrel Used in Combination With Aspirin in Healthy Japanese Subjects.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 <i>Clin Pharmacol Drug Dev</i>	6. 最初と最後の頁 398-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpdd.308	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 Furuta T, Sugimoto S, Kodaira C, Nishino M, Yamade M, Uotani T, Sahara S, Ichikawa H, Kagami T, Iwaizumi M, Hamaya Y, Osawa S, Sugimoto K, Umemura K	4. 巻 43
2. 論文標題 Influence of low-dose proton pump inhibitors administered concomitantly or separately on the anti-platelet function of clopidogrel	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 <i>J Thromb Thrombolysis</i>	6. 最初と最後の頁 333-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11239-016-1460-2.	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 Iwaki T, Nagahashi K, Takano K, Suzuki-Inoue K, Kanayama N, Umemura K, Urano T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Mutation in a highly conserved glycine residue in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 causes polymerisation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 <i>Thromb Haemost</i>	6. 最初と最後の頁 860-869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1160/TH16-07-0572.	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 Kagami T, Yamade M, Suzuki T, Uotani T, Hamaya Y, Iwaizumi M, Osawa S, Sugimoto K, Umemura K, Miyajima H, Furuta T.	4. 巻 103
2. 論文標題 Comparative Study of Effects of Vonoprazan and Esomeprazole on Antiplatelet Function of Clopidogrel or Prasugrel in Relation to CYP2C19 Genotype.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 906-913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpt.863	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 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 熊田竜郎, 吉川輝, 森下紗帆, 外村和也, 泉崎雅彦, 梅村和夫
2. 発表標題 Detection of motor defects in hindlimbs during locomotion in rats with focal cerebral infarction by 3D kinematical analysis
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshikawa, A., Morishita, S., Hokamura, K., Umemura, K., Izumizaki, M., and Kumada, T.
2. 発表標題 Three-dimensional kinematic evaluation of motor dysfunction in a rat model of photochemically induced focal stroke.
3. 学会等名 The 42st Annual Meeting, Society for Neuroscience, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kumada, T., Yoshikawa, A., Morishita, S., Hokamura, K., Izumizaki, M., Umemura, K
2. 発表標題 Three-dimensional kinematical gait analysis of hindlimbs in rats with focal cerebral infarction.
3. 学会等名 9th FAOPS (Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies) Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kumada T, Morishita S, Hokamura K, Yoshikawa A, Agata N, Tsutsui Y and Umemura K.
2. 発表標題 Effects of various exercises on motor recovery through gating and neuro/gliogenesis in motor cortex infarction in rats.
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting, Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森下紗帆, 外村和也, 吉川輝, 縣信秀, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎
2. 発表標題 Effect of different exercises on the differentiation of neural stem cells and motor recovery in rats with motor cortex infarction.
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Komuro, Y., Fahrion, J. F., Foote, K.D., Fenner K. B., Kumada, T., Ohno, N., and Komuro, H.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 1-33
3. 書名 Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders., Springer, Cham, Chapter 11	

1. 著者名 Kumada, T., and Fukuda, A.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 323-343
3. 書名 Multimodal GABAA receptor functions in the development of the central nervous system. "Synapse Development and Maturation" In: Comprehensive Developmental Neuroscience, (Rubenstein, J., Rakic, P., eds)	

〔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	梅村 和夫 (UMEMURA Kazuo) (40232912)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	吉川 輝 (YOSHIKAWA Akira) (90737355)	昭和大学・医学部・助教 (32622)	

	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
研究協力者	外村 和也 (HOKAMURA Kazuya)		
連携研究者	森下 紗帆 (MORISHITA Saho) (30614010)	常葉大学・健康プロデュース学部・助教 (33801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関