

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19920

研究課題名(和文) リハビリテーションを用いた酸化ストレス改善による新たなパーキンソン病治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new Parkinson's disease treatment by improving oxidative stress using rehabilitation

研究代表者

大野 洋一 (OHNO, YOICHI)

高崎健康福祉大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：10709059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病の発症や進行の要因として、ミトコンドリアの酸化ストレスによる機能障害の関連性が報告されている。本研究は酸化ストレスの減少に有益とされている運動効果について、当初は患者への介入による検証を予定していたが、新型コロナウイルス感染症の影響により患者への介入が不可能となったため、動物を用いた検討を中心に実施した。

その結果、高負荷運動は身体における酸化ストレス動態に最も影響を与えるが、測定する指標や試料により影響は必ずしも関連しないことが示された。今回の動物実験で得られた結果は今後のパーキンソン病患者に対する運動介入における酸化ストレスの影響を検討する上での基礎情報になり得ると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動と酸化ストレスとの関係は多くの検討が行われているが、その効果は一定の見識が示されていない。本研究では運動強度の異なる高負荷運動と中等度負荷運動による介入が脳内活性酸素種および血中酸化ストレス、抗酸化力に与える影響を検証した。

その結果として、高負荷運動では脳内活性酸素種の低下、血中酸化ストレスの増加など様々な影響を示すに至った。このことは、パーキンソン病患者に対して酸化ストレスの改善効果を求めるためには、更なる運動方法等の検討の必要性を示すことが出来たものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dysfunction due to oxidative stress has been reported to be a factor in the onset and progression of Parkinson's disease. This study was initially planned to verify the beneficial effect of exercise in reducing oxidative stress by intervention in patients. However, due to the impact of COVID-19, it became impossible to intervene in patients, so we focused on studies using animals.

As a result, we found that high-intensity exercise had the greatest impact on oxidative stress dynamics in the body. On the other hand, it was shown that the effects are not necessarily related depending on the indicators and samples to be measured. We believe that the results obtained in this animal experiment can provide basic information for examining the effects of oxidative stress in exercise interventions for patients with Parkinson's disease in the future.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：パーキンソン病 酸化ストレス 運動効果 動物実験

1. 研究開始当初の背景

1. パーキンソン病 (PD) と酸化ストレス: PDは酸化ストレスの影響を受けやすく、それが症状を進行させる

PD患者ではミトコンドリアの機能障害が生じることが報告されており (Mizuno et al 1989)、剖検脳黒質ではミトコンドリアの酸化ストレスによる損傷の蓄積も確認されている (Korlipara et al 2002)。この原因として、酸化ストレスを除去するDJ-1という遺伝子がPDでは変異や欠失していることに起因している (Ariga et al 2013)。また、ドーパミン作動性ニューロンに含有するドーパミン自体も潜在的に酸化ストレスを有する (Jana 2011)。そのため、ドーパミンを産生している黒質では元々強い酸化ストレスを受けており、そのストレスをDJ-1により除去できず、ミトコンドリアの障害が生じることでPDの発症や病状の進行をもたらしている。一方、PDモデル動物の実験では、運動により酸化ストレスを有意に減少させ、ドーパミン作動性ニューロンを回復させることが報告されている (Toun et al 2012)。このように酸化ストレスに対する治療戦略が重要なことは示されているが、その検討は十分に行われていない。

2. 運動と酸化ストレス: 一定の見識が示されていない

これまで運動と酸化ストレスの関係として、運動に伴った生理的变化は活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) の発現の要因となることが知られている (Niess et al 1999)。また、その発現量が一定の基準以上となると細胞組織を損傷するが、一方で、運動に伴う筋損傷やその回復過程に関連することも報告されている (Nemes et al 2018) (Cheng et al 2016)。例えば、運動強度による影響として継続的な有酸素域以下の運動を行うことはROSやRNSに対する抗酸化酵素システムが向上し、酸化ストレスを抑制することが報告されている。また、無酸素域運動では血液中や筋組織、脳組織でRNSが増大するとした報告 (Wiecek et al 2017) がされている。一方、無酸素運動においても脳内での酸化ストレス状態は変わらない、逆に減少させるといった報告もあり一定の見識が得られていない。このように運動中におけるROSやRNS生産におけるメカニズムについては不明確な部分もあり、運動強度によって異なる可能性は示されているものの (Meo 2019)、はっきりとした結論は示されていない。

2. 研究の目的

当初、本研究ではPD患者において、最も酸化ストレスの改善効果を得ることができる適切な運動負荷量を短期介入により調査し、得られた結果をもとにPD患者に対して長期間の運動介入を実施し、酸化ストレスおよびPD症状と運動機能の経時的変化を調査することでPDの進行予防に効果的なりハビリテーション方法を確立する予定であった。しかし、新型コロナウイルス感染症による影響から予定していたPD患者への介入ができなくなったため、PDに対する酸化ストレスと運動効果の基礎情報の収集を目的とした運動が脳内および血中酸化ストレスに与える影響の調査を中心に動物実験を実施することにした。

3. 研究の方法

1) 対象

被験動物として8週齢のWistar系雄ラット (n=12) を用いた。すべての動物は2週間のトレッドミル運動の練習後、1週間の休息期間を設け、その後、ランダムに高負荷運動群 (n=4)、中等度負荷運動群 (n=4)、コントロール群 (n=4) に分類した。すべての被験動物は12時間の明暗サイクル内で飼育し、餌と水は自由摂取とした。

2) 運動方法

無酸素運動群、有酸素運動群に対して小動物用トレッドミルを用いた走行運動を週に5回、8週間の間継続して行わせた。運動時間は30分とした。走行速度は高負荷運動群は無酸素域の運動とし

て25m/min、中等度負荷群には有酸素域運動として15/minで行わせた。コントロール群は0m/minのトレッドミル内に30分間留置した。

3) 生化学検査

(1) 3-nitrotyrosine: 3-NT

過剰量の麻酔薬投与後、試料として前頭葉、海馬、線条体を採取し急速凍結させ測定まで-80で保存した。その後、各試料1mgに対してprotase inhibitorを加えた10 μ lのホモジナイズバッファー (CelLytic MT Cell Lysis Reagent) にて十分にホモジナイズし、遠心分離 (10 min, 12000g, 4) を行い上清を測定試料とした。測定にはOxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit (Cell Biolabs. Inc, USA) を使用した。

(2) d-ROMs testとBAP test

覚醒下、身体固定をして尾静脈より1回 0.3 mL 採血した。試料はd-ROMs testとBAP testともに血漿とし、フリーラジカル解析装置 (FREE Carrio Duo; WISMERLL Co., Ltd) を用いて測定した。

4) 統計解析

運動負荷の違いによる3-NTおよびd-ROMs testとBAP testの比較として、運動介入前 (Pre)、4週間目 (4w)、8週間目 (8w) における3群間の各値に対してそれぞれOne-way ANOVAを用い、Post-hoc比較としてTukey-Kramer法を用いた。すべての結果データは平均 \pm 標準偏差で表され、 $p < 0.05$ を統計的有意とみなした。

4. 研究成果

3-NTは海馬において高負荷群で、中等度負荷群とコントロール群に比べて有意に酸化ストレスが低かった (図1)。

d-ROMs testでは、8週後の高負荷群で、中等度負荷群とコントロール群に比べ有意に酸化ストレスが高かった (図2)。

BAP testにおいては、8週後に高負荷群で、有酸素群と対照群に比べ有意に抗酸化力が低かった (図3)。

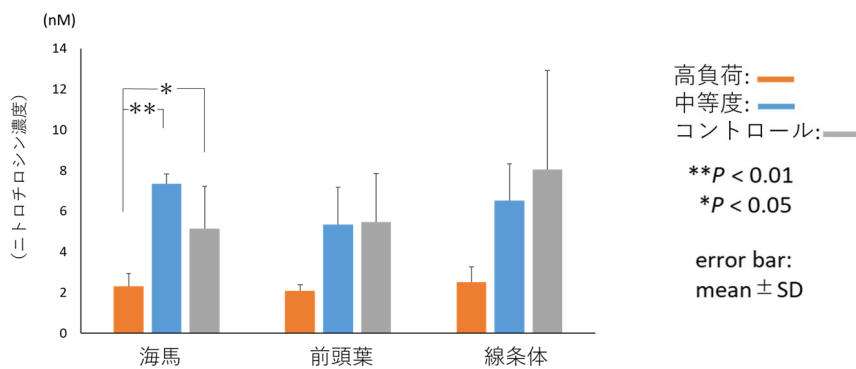


図1 3-NT 結果

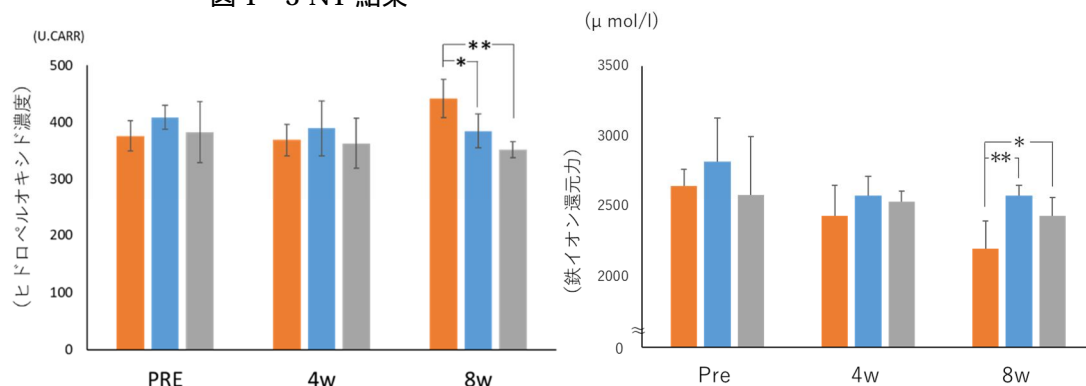


図2 d-ROMs test 結果

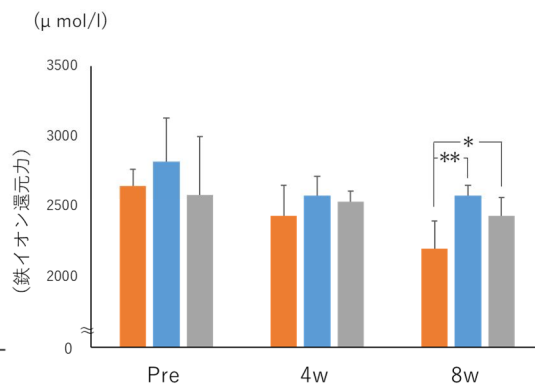


図3 BAP test 結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Manaka Youki, Ohno Yoichi, Horikoshi Akinori, Imamura Kazuyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 A parsimonious laboratory system for the evaluation of rat reaching task: recovery from the massive destruction of motor areas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Integrative Neuroscience	6. 最初と最後の頁 955 ~ 965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31083/j.jin2004096	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 Ohno Yoichi, Horikoshi Akinori, Imamura Kazuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Reaching Task in Rats: Quantitative Evaluation and Effects of 6-OHDA into the Striatum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Motor Behavior	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00222895.2022.2061410	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野洋一、下川哲昭、鯉淵典之
2. 発表標題 ラットに対する長期的な運動負荷が酸化ストレスおよび抗酸化力に与える影響の検証
3. 学会等名 第5回日本リハビリテーション医学会 秋季学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野洋一、下川哲昭、鯉淵典之
2. 発表標題 ラットに対する中等度運動負荷が酸化ストレスおよび抗酸化力に与える経時的変化の検証
3. 学会等名 第98回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野洋一, 高橋樹, 下川哲昭, 鯉淵典之
2. 発表標題 ラットに対する有酸素運動および無酸素運動による長期介入が脳内および血中酸化ストレス動態に与える影響
3. 学会等名 第75回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	今村 一之 (Imamura Kazuyuki)		
研究協力者	鯉淵 典之 (Koibuchi Noriyuki)		
研究協力者	下川 哲昭 (Shimokawa Noriaki)		
研究協力者	高橋 樹 (Takahashi Itsuki)		

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
---------	---------