

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：33802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500483

研究課題名（和文） 実験的脳梗塞の神経発生と血管新生に与える運動負荷の効果

研究課題名（英文） Effects of exercises on neurogenesis and angiogenesis in the experimental brain infarction

研究代表者

筒井 祥博 (TSUTSUI YOSHIHIRO)

浜松大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50073135

研究成果の概要（和文）：実験的脳梗塞において新生ニューロンが、脳室上衣下層(SVZ)から梗塞巣に向かって移動し、傷害された神経ネットワークを修復する可能性が示唆されている。本研究では、SVZ から梗塞巣に移動する SOX2 陽性細胞数が、梗塞後 1 日 30 分間 6 日トレッドミル運動によって増加したことから、SVZ で生まれた新生ニューロンの梗塞巣への移動が促進される可能性が示された。さらに、海馬歯状回顆粒細胞層 (SGZ) の SOX2 陽性細胞数が梗塞側において減少し、トレッドミル運動することによって回復する傾向を示した。従って、運動負荷が梗塞巣側の新生ニューロンの産生と移動を促進する可能性を示した。如何なる機構でこの促進が起こり、神経機能の回復につながるかは今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：It is known that new neurons constantly generate in subventricular zone (SVZ) and subgranular zone of the dentate gyrus (SGZ) in the adult brains. In the experimental stroke, it has been shown that new neurons migrate toward the infarct lesion. In this study, we made brain infarction by surgical operation for occlusion of the left median cerebral artery. After the stroke, SD rats were given exercise load by treadmill for 30 min 6 days and then the brains were examined by immunohistochemically using the antibody to Sox2. There was the tendency that the amount of the Sox2-positive neural cells migrating toward the infarction was increased by treadmill exercise. Moreover, the amount of new neurons in the SGZ, which was decreased by the infarction, was also increased by treadmill exercise.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：脳・神経、発生・分化、神経科学、リハビリテーション、医療・福祉

### 1. 研究開始当初の背景

近年脳卒中患者の中で、脳梗塞患者の割合が増加し、脳卒中患者の4分の3を占めるようになった。脳梗塞病巣の修復に関する神経細胞学的機序はまだ十分に明らかではない。一度損傷を受けた神経細胞は再生しないと長い間考えられてきたが、1990年代になって、成体脳においても神経発生が生ずることが明らかにされた。神経細胞は生涯にわたって生まれて供給され続けるという、今までの常識の転換は、神経疾患の病理発生の解明や治療法を確立していく上で大きな影響を与えている。成体脳においては、海馬歯状回の顆粒神経細胞の発生する部分 (SGZ) と、脳室壁上衣細胞下領域 (SVZ) の一部から嗅脳へ移動分化する新生ニューロンの発生が注目されてきた。実験的梗塞巣の修復に際して、SVZ で生じた新生ニューロンが梗塞巣向かって移動し、既存の神経回路に組み込まれる可能性が示唆されている。梗塞巣からある種のシグナルが出て新生ニューロンの発生と誘導が行われている可能性が考えられる。さらに、この新生ニューロンが動員される過程で、血管新生を伴うことが観察されている。脳梗塞に対するリハビリテーションが行われ、一定の効果を上げていくが、そのメカニズムに関する神経細胞学的基盤はまだ十分明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳梗塞の動物実験モデルを用いて、運動負荷が脳梗塞の回復に如何に作用するか、梗塞脳における神経発生および血管新生の誘導に着目して、神経細胞学的な解析によって明らかにすることである。また梗塞巣の病変の特徴と対応する運動機能との関係を明らかにする。梗塞脳における神経細胞学的な病態が運動負荷によって如何に変化するかが明らかになれば、より有効なリハビリテーションプログラムの基礎になると考える。

### 3. 研究の方法

雄SDラット (7週齢) を用いた。脳梗塞モデルの作成：ハロセンによる吸入麻酔下 (導入4%, 維持1.5%) で、左眼窩上部から皮膚切開を入れ、側頭筋を一部切断し分け、側頭窩下の頭蓋底を直視下におく。手術用ドリルで頭蓋骨に、直径約4mmの楕円形の窓を作製し、中大脳動脈を露出した。緑

色光 (波長540nm) を中大脳動脈に照射し、その後、大腿動脈からローズベンガルを投与した。照射は10min間で終了し、その後手術創を閉じた。

運動負荷：脳梗塞モデルの手術をする前に、トレッドミル運動に慣れさせるため、全てのラットに対して、1日30分間、8 m/min の速度で、トレッドミル運動を7日間行った。脳梗塞モデル作成翌日から、1日30分間 8 m/min の速度でトレッドミル運動を6日間行った。対照群はトレッドミル運動を行わず自然飼育をした。

脳の摘出と病理標本の作製：ネブタールで麻酔後、心臓から4%パラフォルムアルデヒド (PFA) で灌流固定後、脳を取り出し、大脳を前額断で6個のスライスを作成し、さらに24時間固定後、パラフィン切片を作成した。未分化神経系細胞の染色：BrdU免疫染色、Nestin染色、Sox2染色 (未分化な胎生期細胞の染色)。

血管の免疫染色：von Willebrand factor (vWF) を行った。

### 4. 研究成果

1) 梗塞巣の組織学的な検出：左側大脳半球の中大脳動脈支配域の皮質と線条体に、H.E. 染色で無染色な領域として認められた。乳頭体を通る全割切片で梗塞巣の非梗塞領域に対する面積の割合を算出したところ、運動負荷群と対照群で有意な差はなかった。

2) 未分化神経系細胞の脳室上皮下層 (SVZ) から梗塞巣周辺への移動：幼弱神経系細胞を検出する nestin, Sox2, BrdU などで免疫染色したが、Nestin は検出感度が低く、BrdU は幅広い細胞が標識され、Sox2 が未分化神経系細胞の動きを最もよく表出していた。Sox2 陽性細胞は、新生ニューロンが出現するとされている脳室壁の SVZ から梗塞巣に向かって移動し、梗塞周囲層に集積する傾向が認められた。非梗塞半球では Sox2 陽性細胞は SVZ に集積しており、白質、皮質では、対照群を同じく非特異的にわずかに分布するのみであった。

3) 未分化神経系細胞 Sox2 陽性細胞はトレッドミル運動負荷群において、梗塞巣への移動が促進される傾向を示したが、統計学的に有意な差として示すには到らなかったが、今後の重要な課題である。

4) アダルト脳の新生ニューロン派生部位として、脳室壁の SVZ 以外に海馬歯状回の顆

粒細胞層 (SGZ)が知られているが、梗塞側では非梗塞側と比較して、Sox2 陽性細胞は有意に低下し、運動負荷群でこの減少が回復する傾向を示した。

5) 梗塞巣における血管新生：血管を染めるvWF染色においては、梗塞巣の周辺および内部に特異的にvWF陽性の血管が染色されたが、定量化することが困難であった。従って、運動負荷群と対照群の定量的差異を示すことができず、今後の課題である。

#### 考察

実験的脳梗塞において、SVZで生まれた新生ニューロンが、梗塞巣へ向かって移動し、傷害された神経ネットワークを修復する可能性が示唆されている。

本研究はパラフィン切片で、全前額断切片を観察し、Sox2染色によってこの現象を細胞レベルで解析しうる実験系を確立した。Sox2陽性あるいはBrdU陽性細胞が脳室壁のSVZから梗塞巣へ向かって移動する細胞は神経系細胞の移動と考えられるが、個々の細胞の性質、特に新生ニューロンであるか新生グリア細胞であるかの判別は今後の検討が必要である。トレッドミルによる運動負荷によって神経系細胞の発生、移動が促進される傾向を示したが、有意の差を示すにはさらに検討が必要である。運動負荷によって梗塞巣側の海馬歯状回果粒層の新生ニューロンが減少するのは、梗塞巣において脳室壁SVZの細胞が移動へと消費されるため減少することと一致しており、運動負荷によってこの細胞が回復することは興味ある現象と考える。

一般に脳梗塞後できるだけ早く運動することが、梗塞による運動麻痺の回復を早めることが知られている。運動による脳血流の増加、BDNF (brain-derived neurotrophic factor)などの神経増殖因子の増加、梗塞巣周辺の神経細胞の活性化、梗塞病巣の反対側半球からの抑制の解除など幾つかの要因が考えられる。さらに、運動負荷が新生ニューロンの発生、移動を促進する可能性を示したことは興味ある現象である。新生ニューロンが脳梗塞からの回復に如何なる役割をするかまだ不明であり、運動負荷が新生ニューロンの発生、移動、神経ネットワークへ組み込み等の過程を如何に促進するかは今後の課題である。

#### 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6件)

- ① 筒井祥博、脳傷害の回復における成体脳神経発生の意義、浜松大学保健医療学部

紀要、査読有、1巻、2010、21-29

- ② 筒井祥博、実験病理学の楽しみ：ウイルス性脳障害—サイトメガロウイルスに着目して—、病理と臨床、査読有、29巻、2011、643-650
- ③ Kawasaki H, Kosugi I, Arai H, Iwashita T, Tsutsui Y、Mouse embryonic stem cell inhibit murine cytomegalovirus infection through a multi-step process、PlosOne、査読有、6巻3号、2011、1-19
- ④ 筒井祥博、神経変性疾患における神経細胞死に関する最近の知見—特に筋萎縮側索硬化症を中心に—、浜松大学保健医療学部紀要、査読有、第3巻1号、2012、1-6
- ⑤ Arai Y, Tsuchida T, Kosugi K, Kawasaki H, Meguro S, Kinoshita M, Baba B, Maeda, Shinmura Y, Tsutsui Y, Iwashita T、Effect of intrapulmonary viral tropism and cytokine expression on histological patterns of cytomegalovirus infection、Pathology International、査読有、62巻、2012、628-639
- ⑥ 筒井祥博、懸信秀、運動が脳障害の回復に与える神経可塑性の意義：特に虚血性脳梗塞に着目して、浜松大学保健医療学部紀要、査読有、第4巻1号、2013、1-10

[学会発表] (計6件)

- ① 筒井祥博、脳発達傷害とサイトメガロウイルスの間をさまよって30年、第25回ヘルペスウイルス研究会、2010、浜松
- ② 新井義文、小杉伊三夫、河崎秀陽、岩下寿秀、筒井祥博、Bacterial artificial chromosomeを用いた組織標本のウイルスゲノム同定法、第99回日本病理学会総会、2010、東京
- ③ 小杉伊三夫、河崎秀陽、新井義文、岩下寿秀、筒井祥博、発育脳新生細胞におけるサイトメガロウイルスの感染と脳発達障害：感染神経細胞における樹状突起の解析、第99回日本病理学会総会、2010、東京
- ④ 懸信秀、笹井宣昌、清島大資、宮津真寿美、早川公英、河上敬介、除神経による機械刺激の減少がコスタメア構造に及ぼす影響、第18回日本物理療法学会学術大会、2010、東京
- ⑤ 懸信秀、外村和也、梅村和夫、筒井祥博、実験的脳梗塞における海馬歯状回と脳室壁上衣下領域のSOX2陽性細胞への運動の影響、コ・メディカル形態機能学会第11回学術集会、2012、東京
- ⑥ 懸信秀、外村和也、梅村和夫、筒井祥博、運動負荷が実験的脳梗塞の脳室壁上衣細胞下領域と海馬歯状回顆粒層における

Sox2 陽性細胞数に与える影響、第 118  
回日本解剖学会全国学術集会、2013、香  
川

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 祥博 (TSUTSUI YOSHIHIRO)  
浜松大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：50073135

(2) 研究分担者

梅村 和夫 (UMEMURA KAZUO)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40232912  
縣 信秀 (AGATA NOBUHIDE)  
浜松大学・保健医療学部・助教  
研究者番号：00549313

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：