

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500590

研究課題名(和文)脳梗塞後の運動療法による神経保護メカニズムに関する研究

研究課題名(英文)Neurorepair and functional recovery by motor exercise in rats after ischemia reperfusion

研究代表者

榊間 春利(Harutoshi, Sakakima)

鹿児島大学・医学部・准教授

研究者番号：10325780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後の早期理学療法は機能回復を促進する。動物実験において、脳梗塞後の運動は神経保護機能を高め、神経修復を刺激し機能回復を促進することが報告されている。脳梗塞ラットを作成後、定期的運動を脳梗塞後14日まで行った。運動群の脳梗塞巣の大きさは非運動群と比べ縮小した。機能評価は運動群において、有意な改善を認めた。BDNFやTrkB陽性細胞は運動群で有意に増加していた。また、治療群のTUNEL陽性細胞やCaspase3陽性細胞数は減少していた。PI3/AKT経路抑制剤投与により機能改善が認められなかった。運動療法群は機能改善が早期より見られ、PI3/AKT経路を介した神経保護作用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined whether exercise reduces brain infarctions, decreases neuronal apoptotic cell death, and improves neurobehavioral functions via the PI3K/Akt dependent pathway using rat middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. Motor exercise provided neuroprotection, reduced neuronal cell death, maintained tissue structure, and aided functional recovery by stimulating the expression of neurorepair mediators BDNF/pTrkB via activating Akt2). Because the benefit of exercise in neurorepair has been linked with the activation of the PI3 kinase/Akt pathway, we used a selective PI3 kinase inhibitor LY to confirm this mechanism in our study.

Exercise improved neurobehavioral functions, indicating that the reduced deficits are related with the exercise-mediated decreased neuronal apoptotic cell death. Early motor exercise aid functional recovery by stimulating neurorepair mechanisms after stroke.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医学工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション 脳神経保護作用 運動療法 神経栄養因子

### 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、脳卒中片麻痺は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。規則的な運動は脳血管障害のリスクを軽減する。脳梗塞モデル動物において、脳梗塞前の規則的なトレッドミル運動による神経保護作用や脳梗塞縮小効果が示唆されている。そのメカニズムには血管形成、神経栄養因子の発現、アポトーシス抑制などが関与している。

また、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。動物モデルにおいて、脳梗塞後早期からの適度な運動は、脳梗塞巣縮小効果、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の増加を促進することが報告されている。

研究代表者らは、脳梗塞後早期からの低強度のトレッドミル運動はラット脳梗塞巣を縮小し、その要因には血管形成やアポトーシス抑制、神経栄養因子ミッドカイン (MK) や NGF の発現が関与していることを発表した (Matsuda F, Sakakima H, 他., Acta Physiol, 2011)。しかしながら、脳梗塞発症前・後の運動刺激による神経保護作用のメカニズムに関してはよく分かっていない。また、運動刺激による神経保護作用を生じる適切な運動強度や頻度、運動量などは解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳梗塞モデルラットを作製し、脳梗塞後の運動刺激が梗塞巣を縮小するメカニズムを解明することである。具体的には、運動刺激による機能回復促進効果、神経栄養因子の発現や血管形成、細胞内シグナル伝達系の活性化について組織学的、免疫組織学的、分子生物学的に以下の観点から脳梗塞後の定期的な運動による神経栄養因子の発

現、神経保護作用、運動機能改善や脳梗塞巣の縮小効果に及ぼす影響を明らかにする。神経保護のメカニズムを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

脳梗塞モデルは虚血再灌流により、成熟ラットの左内頸動脈から塞栓子を挿入、結紮・固定し、60分後に再開通して中大脳動脈領域に脳梗塞を作成した(図1)。脳梗塞作製後にロータロッドによる運動トレーニングを行い、14日後に組織観察を行った。神経栄養因子やその受容体 (BDNF、TrkB など) の発現動態を免疫組織学的、分子生物学的に観察した。また、脳は2mm 間隔の前額断を作成し、TTC染色した切片を写真撮影して、脳梗塞巣の大きさを測定した。運動群にPI3/AKT 経路抑制剤 (LY294002) を投与し、7日後に運動機能評価を行い、非運動群と比較検討した。

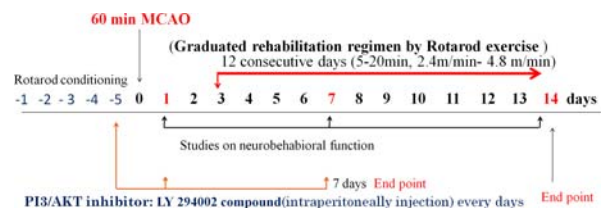


図1. 実験プロトコール

### 4. 研究成果

脳梗塞ラットを作成後、ロータロッド運動を脳梗塞後3日から12日間行った。運動負荷は徐々に増加していった (5-20min、2.4-4.8 m/min)。機能評価には神経学的所見、棒上歩行テスト、ロータロッド運動テストを行い、脳梗塞1, 7, 14日後に評価した。

運動群の脳梗塞巣の大きさは非運動群と比較して減少していた。機能評価は運動群において、非運動群と比べて有意な改善を認めた(図2)。BDNFやTrkB陽性細胞は運動群で有意に増加していた(図3)。また、治療群のTUNEL陽性細胞やCaspase3陽性細胞数は減少していた。運動群のMidkineの発現は14日後において非運動群と有意差は認められな

かったが 3 日後で発現量が増加していた。PI3/AKT 経路抑制剤である LY294002 投与ラットは非運動群と比較して機能改善が認められなかった。

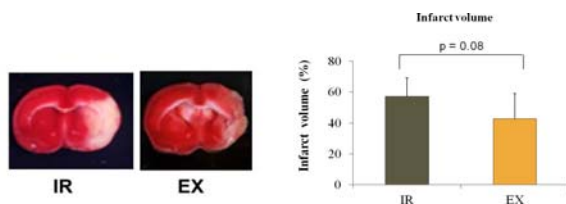


図 2. 脳梗塞巣の大きさ

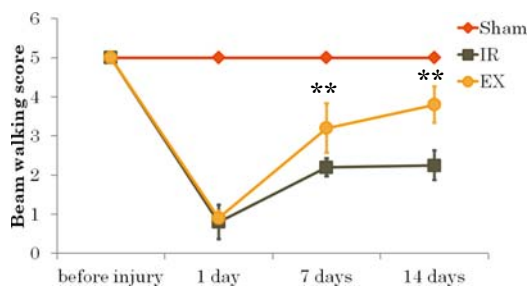
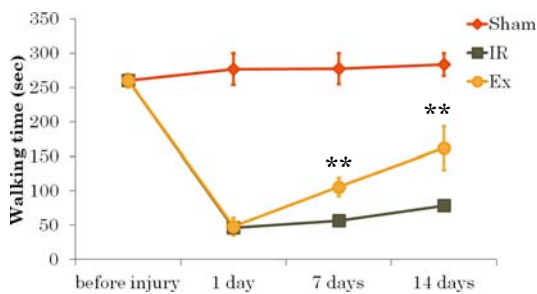


図 3. 運動機能の経時的変化 (\*\* p < 0.01 vs. IR)

脳保護には Glia Neurovascular Unit が相互に影響し合っており、そのメカニズムの一つは神経栄養因子やサイトカインなどの分子によって機能されている。今回、運動負荷により、有意な脳梗塞縮小効果、BDNF の発現増加、アポトーシス抑制が観察され(図 4, 5)、運動療法を併用することにより運動機能の改善が早期より見られた。また、PI3/AKT 経路抑制剤の投与により機能回復が認められなかったことは、運動による治療が PI3/AKT 経路を介して神経保護や神経栄養因子の発現、機能回復に関与していることを示唆した。

Effect of inhibition of PI3 kinase/Akt pathway on neurological score following IR.

	1st day	7th days
Sham	0	0
IR	2.4 ± 0.3	2.1 ± 0.4
EX	2.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2***
EX+LY	3 ± 0.0	2 ± 0.0

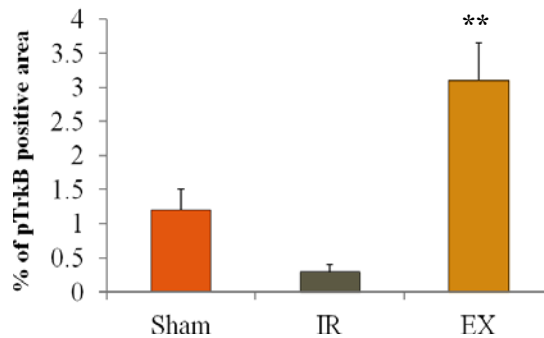
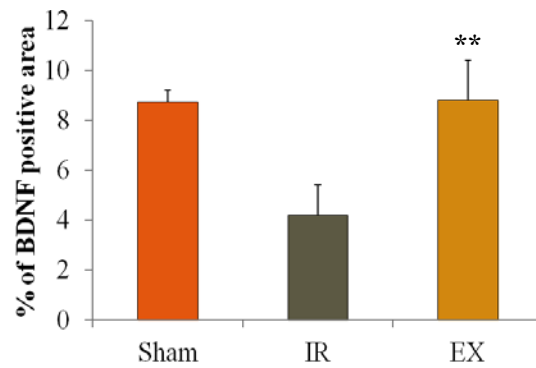


図 4. BDNF と pTrkB の発現動態 (\*\* p < 0.01 vs. IR)

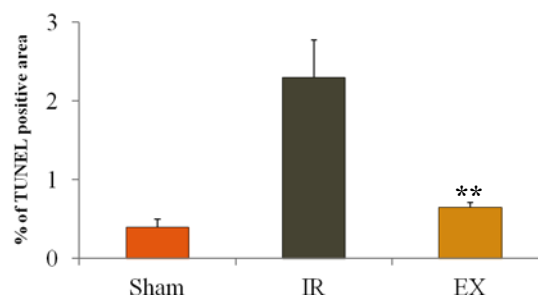
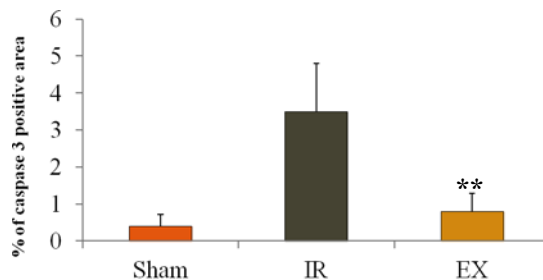


図 5. Caspase 3, TUNEL 陽性細胞の変化 (\*\* p < 0.01 vs. IR)

### 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 3 件)

1. Yoshida Y, Sakakima H, Matsuda F, Ikutomo M, Midkine in repair of the injured nervous system. Br J Pharmacol. 2014 ;171(4): 924-30. (査読有り)
2. Khan M, Dhammu TS, Sakakima H,

Shunmugavel A, Anne G Gilg, Singh AK, Singh I. The inhibitory effects of S-nitrosoglutathione on blood-brain barrier disruption and peroxynitrite formation in a rat model of experimental stroke. J Neurochem 2012 123(Suppl. 2), 86-97. (査読有り)

3. Sakakima H, Khan M, Dhammu TS, Shunmugavel A, Yoshida Y, Singh I, Singh AK. Stimulation of functional recovery via the mechanisms of neurorepair by S-nitrosoglutathione and motor exercise in a rat model of transient cerebral ischemia and reperfusion. Restor Neurol Neurosci. 2012 30(5):383-96. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

1. Sakakima H, Yoshida Y, Matsuda F, Yone K. Neurorepair and Functional Recovery by Motor Exercise in Rats After Ischemia Reperfusion, ACRM Annual Conference, Orlando (USA), 2013. 11.15
2. Sakakima H. Stimulation of functional recovery via neurorepair mechanisms by motor exercise in rat stroke model, WCPT-AWP & ACPT Congress, Taiwan, 2013. 9.7
3. Sakakima H, Khan M, Yoshida Y, Matsuda E, Singh I. Neurorepair and functional recovery by S-nitrosoglutathione and motor exercise in rats after ischemia reperfusion. Neuro 2013, Kyoto, 2013. 6.21
4. 榎間春利. 薬物治療と運動トレーニングの併用が脳梗塞モデルラットの機能

回復に与える影響. 第 47 回日本理学療法学術大会 神戸市、2012. 5.26

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<https://sites.google.com/site/kadaikisoken/home/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎間 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

吉田 義弘 (Yoshida Yoshihiro)

鹿児島大学・名誉教授

研究者番号：10107906

松田 史代 (Matsuda Fumiyo)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：70437953

井尻 幸成 (Ijiri Kosei)

鹿児島大学・医歯研・客員研究員

研究者番号：00315417

### (3) 連携研究者

なし