

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700539

研究課題名（和文）脳血管障害後の早期運動療法介入が脳の可塑性に与える影響について

研究課題名（英文）The effects of early exercise on brain plasticity after focal cerebral infarction in rats.

研究代表者

松田 史代 (MATSUDA FUMIYO)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：70437953

研究成果の概要（和文）：

本研究では、リハビリテーションの視点から、リハビリテーション介入が脳血管障害後の脳の可塑性を促せるのか、脳血管障害後の神経栄養因子 MK の働きについて検討するとともに、神経栄養因子が神経細胞死や神経修復にどのように働いているのか検討することを目的とする。経時的に脳梗塞モデルを作成し、術 1 日後よりトレッドミル運動介入を行い、トレッドミル介入群と非介入群における脳梗塞体積測定後、パラフィン切片作成し、免疫組織化学染色にて観察した。その結果、免疫組織化学染色結果より、家兔 MK 免疫組織化学染色にて、トレッドミル介入群が非介入群に比べて 3 日後で有意に発現面積が増加していた。また、神経学的機能では運動群が非運動群よりも回復が早く、運動機能（棒上歩行機能評価）でも運動群で非運動群と比較し、良好な運動機能回復がみられた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to investigate the effects of early treadmill training after cerebral infarction in rats. This study might provide a basic evidence of rehabilitation medicine. Fifty-four 8-week old male Wistar rats weighing 200-300g were used in this study. The filament (4-0 nylon suture with blunted tip) was inserted into the left common carotid artery by an arteriotomy. It was then passed up through the lumen of the internal carotid artery and lodged in the narrow proximal anterior cerebral artery, blocking the MCA at its origin. Reperfusion was established by withdrawal of the filament by 90 min. Next day after surgery, stroke rats were randomly assigned to two groups: treadmill-exercised group or non-exercised controls. After ischemia, the rats were received to run on a treadmill for 20 min once a day. All rats were observed the absence of motor coordination and neurological deficits after surgery. The improvement of the motor behavioral and the neurological score in the exercised groups was better than those in non-exercised groups. Particularly, the score in the exercised groups was significantly improved compared with those in non-exercised groups at 14 days after surgery ( $P<0.05$ ). The runner had the increased expression of midkine (MK) over the non-runner with or without MCA occlusion for 3 days.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：リハビリテーション

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：実験的脳梗塞ラットモデル 早期運動療法 神経栄養因子 理学療法学 MidKine

### 1. 研究開始当初の背景

近年、脳血管障害発症後、早期リハビリテーションを行うことで廃用症候群の予防や身体機能回復などの効果が期待でき、診療報酬面でも発症早期に手厚い体制を整えている。臨床現場では、発症直後よりリハビリテーションが行われるようになってきたが、そのことが本当に効果的であるのか、急性期の身体状態が落ち着かない時期にその程度の負荷であれば増悪を引き起こさないのかといった基本的なところの検証がなされていない状態で臨床現場のセラピストたちはリハビリテーションを施行しているのが現状である。

リハビリテーションの必要性が重要視されているが、リハビリテーションの効果に関するエビデンスはあまりにも少ない。ヒトを対象とした脳血管障害後のリハビリテーション効果を検証する実験研究は、個体差や合併症の有無、発症部位、発症後経過期間などケーススタディが困難であるため、治療法・治療手技は従来臨床経験に基づいて行われてきた領域が多くみられ、全般的にエビデンスの面からは妥当性が十分とは言えない。また、動物を用いた実験的脳血管障害モデル作製も緻密な作業を強いられ、技術獲得が困難であることや成功率の低さなどを理由に敬遠する研究者が多いのも事実であり、リハビリテーションを絡めた動物実験的基礎的研究は、リハビリテーション効果の科学的理論的根拠づけがあまりされておらず、全体的に不明な点が多く、また行う研究者も多くない。これまで、脳血管障害後のリハビリテーション介入と運動機能や神経学的所見の回復を検討した報告(Ding Y ら, 2004)、リハビリテーション介入と神経栄養因子の発現を検討した報告(Ding Y ら, 2003 : Ang ET ら, 2003 : Kim MW ら, 2005)などリハビリテーション介入による一因子の効果・結果を検討した研究はあるが、リハビリテーション介入と神経栄養因子の発現・運動機能や神経学的所見の回復・脳梗塞体積など複数因子を絡めて検討した研究はない。

### 2. 研究の目的

我々は、これまでラットを用いた実験的脳梗塞モデルを作製し、早期リハビリテーションの効果と神経栄養因子 midkine (MK) 発現に関して研究してきた。

平成 19-20 年度科学研究費により、脳梗塞作成 1 日後よりトレッドミル運動を開始した運動群は、通常飼育の非運動群で有意に 28 日後、運動機能・神経学的所見の回復がみられ、また梗塞巣体積も小さくなっていった。また、運動群では、早期に MK の発現量が有意に増加しており、運動が神経栄養因子 MK の発現を促進し、その結果、運動機能・神経学的所見の回復と関係していることが示唆された。MK は近年発見されたレチノイン酸応答遺伝子産物として発見された分子量 13kDa のヘパリン結合性種々の機能を持った成長因子である。末梢神経損傷後に MK は神経変性、再生に関与していることが証明され、筋損傷においても MK が筋変性、再生に関与していることが証明された。

しかし、脳梗塞後早期に発現が観察され、*In vitro* では神経細胞脱落を抑制することがわかったが、*In vivo* における MK の働きは未だ不明な点が多く、また、他の栄養因子との働きも不明な点が多い。そのため、運動の介入が梗塞巣や梗塞巣周辺へ及ぼす影響は、未だ解明されていないことが多い。

本研究では、リハビリテーションの視点から、リハビリテーション介入が脳血管障害後の脳の可塑性を促せるのか、運動により何故、栄養因子の発現が促進され、梗塞巣修復にどのように関係しているのかを検討する。また、脳血管障害後の MK の機能および神経脱落に対する神経栄養因子 MK の働きについて検討するとともに、他の神経栄養因子との相互関係を検証し、神経栄養因子が神経細胞死や神経修復にどのように働いているのか検討する。

### 3. 研究の方法

実験的脳梗塞を作製する場合、臨床病態に近く動物への負担が少ないことが最良である。Longa ら(1989)の中大脳動脈閉塞・再開通モデルは、手術的侵襲が少なく、再現性がよく、臨床病態と同じ血流が再開通するモデルであることから、国内外で多くの研究者が実験的脳梗塞を作製する際に用いている方法である。この方法により、ラットの左中大脳動脈から左内頸動脈へ直径 0.2~0.3mm 長さ約 5mm の糸付き塞栓糸(全長 16mm)を挿入し、90 分間塞栓糸を留置し中大脳動脈領域を虚血状態にする。その後、塞栓糸を引き抜き再開通する。術中は低体温による脳保護作用の影

響を避ける為、直腸温度を37℃に保つように thermostat 付ブランケットを用いる。術後1, 3, 5, 7, 14, 28日に脳を摘出して以下の項目を観察する。

1. 経時的に摘出した脳を

2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) 染色し、梗塞巣の確認を行う。一晚4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (pH7.4) で浸漬固定しデジタルカメラで撮影した脳の標本写真を scion image software を用いて脳梗塞巣体積を計測する。

2. パラフィン包埋した脳切片を免疫組織学染色により神経栄養因子の発現有無、発現部位や発現時期を観察し、それぞれの神経栄養因子の発現動態を検証する。

3. アポトーシスマーカーである caspase-3 との2重染色を行い、神経栄養因子が神経細胞死・神経保護にどのような作用をもたらしているか検証する。

4. 研究成果

本研究では、リハビリテーションの視点から、リハビリテーション介入が脳血管障害後の脳の可塑性を促せるのか、脳血管障害後の Midkine (MK) の機能および神経脱落に対する神経栄養因子 MK の働きについて検討するとともに、他の神経栄養因子との相互関係を検証し、神経栄養因子が神経細胞死や神経修復にどのように働いているのか検討することを目的とする。経時的に脳梗塞モデルを作成し、術1日後よりトレッドミル運動介入を行い、トレッドミル介入群と非介入群における脳梗塞体積測定後、パラフィン切片作成し、HE 染色・免疫組織化学染色にて観察した。その結果、免疫組織化学染色結果より、家兎 MK 免疫組織化学染色にて、トレッドミル介入群が非介入群に比べて3日後で有意に発現面積が増加していた。また、神経学的機能では運動群が非運動群よりも回復が早く、運動機能(棒上歩行機能評価)でも運動群で非運動群と比較し、良好な運動機能回復がみられた。トレッドミル運動は、四肢の交互運動を促通するので、その結果、良好な身体機能回復がみられたことが示唆された(前年度、報告済)。その後、MK 陽性細胞がどの細胞に発現しているか蛍光二重染色で検討したが、満足する結果を得ることはできなかった。染色条件などを現在、再検討し、なぜ MK が運動により発現が増強するのか、運動することによって脳梗塞周辺部でどのような影響を与えているのか、免疫組織化学染色・分子生物学的観点から検討していきたい。

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. Kikuchi K, Kawahara K, Miyagi N, Uchikado H, Kuramoto T, Morimoto Y, Tancharoen S, Miura N, Takenouchi K, Oyama Y, Shrestha B, Matsuda F, Yoshida Y, Arimura S, Mera K, Tada K, Yoshinaga N, Maenosono R, Ohno Y, Hashiguchi T, Maruyama I, Shigemori M. Edaravone: a new therapeutic approach for the treatment of acute stroke. *Med Hypotheses*. 2010 Dec;75(6):583-5. Epub 2010 Aug 21. (査読有)

2. Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 Aug 17. (査読有)

3. Sakakima H, Yoshida Y, Yamazaki Y, Matsuda F, Ikutomo M, Ijiri K, Muramatsu H, Muramatsu T, Kadomatsu K. Disruption of the midkine gene (Mdk) delays degeneration and regeneration in injured peripheral nerve. *J Neurosci Res*. 2009 Oct;87(13):2908-15. (査読有)

4. Kikuchi K, Tancharoen S, Matsuda F, Biswas KK, Ito T, Morimoto Y, Oyama Y, Takenouchi K, Miura N, Arimura N, Nawa Y, Meng X, Shrestha B, Arimura S, Iwata M, Mera K, Sameshima H, Ohno Y, Maenosono R, Tajima Y, Uchikado H, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Yoshida Y, Hashiguchi T, Maruyama I, Kawahara K. Edaravone attenuates cerebral ischemic injury by suppressing aquaporin-4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 25;390(4):1121-5. Epub 2009 Sep 6. (査読有)

5. Kikuchi K, Kawahara K, Tancharoen S, Matsuda F, Morimoto Y, Ito T, Biswas KK, Takenouchi K, Miura N, Oyama Y, Nawa Y, Arimura N, Iwata M, Tajima Y, Kuramoto T, Nakayama K, Shigemori M, Yoshida Y, Hashiguchi T, Maruyama I. The free radical scavenger edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-mobility group box-1 in neuronal cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Jun;329(3):865-74. Epub 2009 Mar 17. (査読有)

6. 吉田義弘, 榊間春利, 松田史代  
ミッドカイン 機能解析から臨床応用へ  
神経系におけるミッドカインの働き 神経  
疾患の治療に寄与できるかどうかの検討  
医学のあゆみ 2009 230 巻 4 号  
Page261-265. (査読有)

[学会発表] (計5件)

1. 榊間春利, 重あいら, 松田史代, 生友聖子,  
吉田義弘. ラットにおける脳梗塞前の飼育環  
境やトレッドミル運動が梗塞巣に及ぼす影  
響 日本理学療法士学会大会 (岐阜) 2010.  
5. 27

2. 沢田浩暢, 松田史代, 入江愛, 渡嘉敷春乃,  
榊間春利, 吉田義弘, 米和徳. トレッドミル  
運動介入が老化促進マウスの脊髄前角細胞  
に及ぼす影響について 日本理学療法士  
学会大会 (岐阜) 2010. 5. 27

3. Fumiyo Matsuda, Harutoshi Sakakima,  
MASAKO IKUTMO, Yoshihiro Yoshida  
The effects of early exercise on brain  
damage and recovery after focal cerebral  
infarction in rats.  
日本神経科学学会 (名古屋) 2009. 9. 16

4. 榊間春利, 松田史代, 生友聖子, 入江愛,  
嶋田博文, 吉田義弘, 米和徳, 井尻幸成  
トレッドミル運動が加齢マウスの関節軟骨  
に与える影響  
日本理学療法士学会大会 (東京) 2009. 5.  
30

5. 松田史代, 入江愛, 榊間春利, 生友聖子,  
米和徳, 吉田義弘  
脳梗塞ラットにおける早期運動療法介入が  
脳梗塞巣周辺へ及ぼす効果  
日本理学療法士学会大会 (東京) 2009. 5.  
29

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 史代 (MATSUDA FUMIYO)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号：70437953