

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700609

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損傷と回復に与える影響について

研究課題名（英文） The effects of early exercise on brain damage and recovery 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、脳血管障害後、早期からの運動療法介入（本研究ではトレッドミル運動）が梗塞巣や梗塞周辺部（通称ペナンプラ領域）、身体活動全体に及ぼす影響を検討することを目的とした。脳梗塞は、一般的に広く国際的に使われている塞栓糸を使用した左中大脳動脈閉塞・再開通モデルを使用した。作成翌日に、無作為にトレッドミル運動群・非運動群と分け、運動群は毎日20分間トレッドミル運動を行った。また、術後毎日運動機能評価と神経学的評価を実施した。運動開始一週間後より運動群の方が非運動群よりも身体機能の改善が良好にみられ、28日後有意に改善した。梗塞巣周辺部でも運動群の方が非運動群に比べて有意に神経栄養因子ミッドカイン増加した。そのため、ミッドカインと神経修復の関与を検討するために、ミッドカインのノックアウトマウスを使用し、脳梗塞（開頭し末梢中大脳動脈を電気メスで凝固閉塞した）を作成したところ、ミッドカインノックアウトマウスは野生型マウスと比較して、脳梗塞巣体積に関しては、有意差がみられなかったが、反応生アストロサイトや活性型ミクログリアの発現が少ない傾向にあった。前述したラットの梗塞作成後運動を行った群では有意にミッドカインの発現が早期に増加しており、梗塞周辺部の修復にミッドカインの関与が示唆された。しかし、ミッドカインの発現機序や発現作用は、未だ不明な点が多く、今後ミッドカインノックアウトマウスを使用しての更なる解明が必要である。また、何故早期からの運動介入により神経栄養因子が増加するのか、また他の神経栄養因子との関与も含めて更なる検討が必要である。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was investigate that the effect of early exercise (this study used the treadmill exercise) after cerebral infarction in the rat. 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. Over time motor coordination and neurological deficits improved more in the exercised group than in the non-exercised group. The cellular expression levels of MK were significantly increased in the peri-infarct area of the exercised rats. Therefore The purpose is to confirm the effect of MK gene knockout on cerebral infarction in mouse and the relation of MK with the regeneration. The ratios of infarct volume to cerebral hemisphere were not different between KO and wild type mice at 3 days and 7days. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was more and more expressed in periinfarct area after insult. GFAP staining areas in astrocytes (calculated as a ratio of stained areas to hemisphere) were significantly decreased in parietal lobe of KO mice compared with that in wild type mice at 3 days, however, it was not significantly different at 7 days. Since MK has a role as a chemotaxis of microglia and macrophages, the Ibal expression was studied with immunostaining, which showed no significant difference. The results were suggestive that in KO mice the expression of

GFAP was delayed compared with in wild type mice. MK participates in the development of the reactive astrocytes after cerebral infarction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：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が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る。

また、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) および神経成長因子 nerve growth factor (NGF) 発現に関して研究してきた。また、運動群では、早期に MK の発現量が有意に増加(業績 2, 10, 14, 16)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、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 0.2~0.3 mm長

さ約 5 mm の糸付き塞栓糸 (全長 16 mm) 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した。その後、塞栓糸を引き抜き再開通した。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°C に保つように thermostat 付ブランケットを用いた。

まず、ラットで上記の方法で脳梗塞を作成し、術後 1, 3, 5, 7, 14 日に棒上を歩かせることで運動機能を評価する運動機能評価と神経学的評価、術によるまたトレッドミル運動によるストレスを評価するために体重計測を行った。また、同時に無作為に運動群と非運動群の 2 群に分け、運動群は、トレッドミル運動機器を用いて一日 20 分、週 5 回運動を行った。その後、それぞれのタイムポイントで脳を摘出し、

2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) 染色し、梗塞巣の確認を行った。4% パラホルムアルデヒドで浸漬固定し、パラフィン包埋し、5 μm の連続横断パラフィン切片を作成し、ミッドカイン抗体を用いて梗塞周辺部のミッドカインを定量するとともに、他の神経栄養因子についても検討した。

また、ミッドカインの脳梗塞後の働き、影響を調べるために、ミッドカインノックアウトマウスを用いて実験的脳梗塞を作成し、野生型との梗塞巣周辺部の違いについて検討した。

マウスの実験的脳梗塞は、ブレグマより 2mm 左後方の頭蓋骨を削り、左中大脳動脈を露出し、その後、左中大脳動脈を電気メスで凝固し、脳梗塞を作成した。脳梗塞作成後、3, 7 日後に脳を摘出し、ラットと同様に連続横断パラフィン切片を作成し、反応性アストロサイトや活性型ミクログリアの免疫組織染色を行い、ノックアウトマウスと野生型の脳梗塞周囲のそれぞれの因子の発現量や発現動態について検討した。

#### 4. 研究成果

ラットの実験的脳梗塞の実験では、トレッドミル運動開始一週間後より、トレッドミル運動群の方が非運動群よりも運動機能評価、神経学的評価ともに身体機能の改善が良好にみられ、28 日後有意に改善した。両群の体重の変化は、梗塞作成後に一時的な体重減少が両群ともにみられたが、その後経時的に体重は増加し、どのタイムポイントでも両群に有意差はみられなかった。そのため、今回のトレッドミル運動はラットにとって身体的負担は大きくなく、適度な運動であったと考える。TTC 染色の結果、トレッドミル運動群が非運動群と比較して、運動開始 1 週間後より小さい傾向にあり、術 28 日後に有意にトレッドミル運動群が非運動群と比較して小さかった。また、免疫組織化学染色の結果で

は、トレッドミル運動群、非運動群ともに術 1 日後より神経栄養因子ミッドカインの発現がみられ、術 3 日後にピークをむかえ、術 7 日まで発現がみられたが、術 14 日後、術 28 日後は、発現は確認できなかった。また、梗塞巣周辺部で運動群の方が非運動群に比べて有意に神経栄養因子ミッドカイン増加した。

脳梗塞周辺部でのミッドカインの発現が認められたことで、ミッドカインが脳梗塞巣回復になんらかの役割を担っているのではないかと考え、ミッドカインノックアウトマウスを用いて、脳梗塞を作成した。

ミッドカインノックアウトマウスは、脳梗塞作成後どのタイムポイントでもミッドカインの発現は認められなかった。しかし、野生型はラット脳梗塞と同様に、術 1 日後より発現が認められ、3 日後に発現のピークを迎え、術 7 日まで認められた。

反応性アストロサイトや活性型ミクログリアは、野生型に比較しミッドカインノックアウトマウスで少ない傾向にあったが、どのタイムポイントでも脳梗塞巣体積に有意差はみられなかった。

今回の研究で、神経栄養因子ミッドカインが脳梗塞発症早期に発現し、神経修復と何かしらの関係をもっている可能性が示唆された。しかし、その分子メカニズム解明にはまだまだ多くの検討が必要である。

今後、神経栄養因子ミッドカインの働きを探るとともに、トレッドミル運動により神経栄養因子ミッドカインの発現が増加したことで、運動介入効果と合わせて検討していきたい。

#### 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 3 件)

1. Kikuchi K, Kawahara KI, Uchikado H, Miyagi N, Kuramoto T, Miyagi T, Morimoto Y, Ito T, Tancharoen S, Miura N, Takenouchi K, Oyama Y, Shrestha B, Matsuda F, Yoshida Y, Arimura S, Mera K, Tada KI, Yoshinaga N, Maenosono R, Ohno Y, Hashiguchi T, Maruyama I, Shigemori M. Potential of edaravone for neuroprotection in neurologic diseases that do not involve cerebral infarction. *Exp Ther Med*. 2011 Sep;2(5):771-775. (査読あり)

2. 菊池清志, 川原幸一, 松田史代, 伊藤隆史, 森元陽子, TancharoenSalunya, 三浦直樹, 竹重暢之, 折戸公彦, 山下伸, 内門久明, 宮城尚久, 塩見直人, 倉本晃一, 徳富

孝志, 重森稔, 坂本六大, 菊池千恵美, 飯田成美, 吉田義弘, 橋口照人, 丸山征郎, 森岡基浩, 田中永一郎. 虚血条件下での神経様細胞におけるエダラボンのHMGB1に対する効果(解説). 神経外傷(0389-5610)34巻2号 Page225-227(2011.12) (査読あり)

[学会発表] (計5件)

1. 生友聖子, 榊間春利, 松田史代, 甲斐千尋, 吉田義弘. 成長因子ミッドカイン (MK) の欠損がマウス骨格筋損傷病態に与える影響. 第35回日本神経科学学会 名古屋市, 2012.9.18

2. 福田祐子, 松田史代, 榊間春利, 吉田義弘, 米和徳, 三宅智. 中大脳動脈閉塞血流再開の有無による梗塞巣周囲の組織学的変化について. 第47回日本理学療法学会 神戸市, 2012.5.26

3. 吉田義弘, 生友聖子, 宮崎晋宏, 山崎芳樹, 沢田浩暢, 木下香菜, 園知佐子, 用皆正文, 榊間春利, 松田史代: 神経栄養因子ミッドカイン遺伝子の欠損がマウス実験的脳梗塞の病態に与える影響について. 第34回日本神経科学大会. 横浜, 2011.9.13

4. Fumiyo Matsuda, Harutoshi Sakakima, Kazunori Yone, Yoshihiro Yoshida: The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. WCPT, Amsterdam, 2011.6.21

5. Megumi Sakasegawa, Fumiyo Matsuda, Ai Irie, Keiko Ikeda, Harutoshi Sakakima, Kazunori Yone, Yoshihiro Yoshida. The effects of early low-intensity exercise on rat soleus after focal cerebral infarction in rats. WCPT, Amsterdam, 2011.6.21

## 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