

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350597

研究課題名(和文) 運動が及ぼす加齢ラット脳外傷後の神経再生促進効果及び脳機能改善効果に関する研究

研究課題名(英文) Exercise inhibits neural apoptosis and improves cerebral function following aged rat traumatic brain injury

研究代表者

伊藤 龍生 (ITO, Tatsuki)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40330245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：加齢(生後2年)ラット脳外傷モデルを用いて運動による神経保護作用を調べた。脳外傷後の早期に損傷部位周囲で運動群において非運動群に比較し、アポトーシスの有意な減少が見られた。非運動群では多数のアポトーシスが見られた。外傷後の慢性期において非運動群に比較し、運動群では大型の神経細胞数の有意な増加が見られた。非運動群では、小型の障害を受けた神経細胞が少数見られた。外傷後の脳機能評価において運動群で有意な改善が認められた。加齢ラットの脳外傷後の運動は、神経保護作用を示すばかりか、脳外傷後に起こる脳機能不全を改善することが示された。高齢者の脳外傷後のリハビリテーションは有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigate the effect of exercise on morphology and cerebral function following traumatic brain injury(TBI) in aged (two years old) rats. Aged wistar rats received TBI by a pneumatic controlled injury device and were randomly divided into two groups :1)non-exercise group and 2) exercise group.The exercise group ran on a treadmill.Immunohistochemical and behavioral studies were performed following TBI. The number of apoptosis cells early after TBI was significantly reduced in the aged exercise group. Furthermore, most apoptosis cells in the non-exercise group indicated neuronal cells. However, in the exercise group, few apoptosis cells were shown. In addition, there was a significant improvement in cerebral dysfunction after TBI in the exercise group. These results indicate that aged person exercise following TBI inhibits neuronal apoptotic neuronal cell death, which results in an improvement of cerebral dysfunction.

研究分野：神経病理学

キーワード：高齢者 リハビリテーション 神経再生 脳外傷 高次脳機能改善

### 1. 研究開始当初の背景

脳外傷は全米の疫学的調査によれば毎年150万人が受傷し、米国人口の約2%、530万人が脳外傷を原因とした障害を持って生活しているとされている[1]。日本では交通事故や不慮の事故による脳外傷による死亡は年3.9万人であり死亡総数の4.1%を占める[1]。さらに受傷者の2/3以上は高齢者である。高齢者の受傷者では救命はされたものの高度な認知症、言語障害、運動障害などの高度高次脳機能障害を発症する症例が死亡者数よりはるかに多く、死亡者数の約10倍以上の外傷後遺症を有する高齢者患者が存在すると推測されている<sup>3)</sup>。このように高齢者の脳外傷は社会的影響の極めて大きい傷害であり、高齢者の高度な高次脳機能障害の軽減を目指す臨床的アプローチの開発は非常に重要な課題である。

### 2. 研究の目的

申請者らは加齢ラット脳外傷モデルで外傷後の外傷局所で神経幹細胞の出現と高度な高次脳機能障害を発症することを明らかにした[1]。脳外傷後に高次脳機能障害を発症する加齢ラット脳外傷モデルにおいて外傷後の運動が脳外傷後に出現する神経幹細胞数の増加や神経幹細胞から成熟神経細胞への分化・生存・維持を促進し、脳外傷後に起こる高次脳機能障害を改善するであろうと考えた。本研究は加齢ラットを用いて運動が及ぼす脳外傷部局所の神経再生運動による高次脳機能障害の改善効果運動による神経再生と高次脳機能障害の改善効果の機序を組織学的、生化学的、生理学および運動学的手法を用いて解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデル動物の作製

Pneumatic control injury device を用いて Wistar ラット (生後2年) に脳外傷を与え、加齢脳外傷ラットを作製した。脳外傷を与えない模擬手術群を sham 群とした。

#### (2) 運動方法

脳外傷ラットを任意に非運動群及び運動群の二群に分ける。運動群のラットには1日、1回(1回/15分)速度15m/分の強制運動(トレッドミル)を7日間連続で行った。

#### (3) 記憶学習の回復効果

トレッドミル終了後(損傷後7日後)に非運動群及び運動群について water maze 試験を行った。

#### (4) 免疫組織染色

損傷後1,3,7日後(トレッドミル終了後)に非運動群および運動群のラットを4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、脳を取り出し、損傷最大径の部分より20 $\mu$ mの連続

切片を作製した。連続切片3枚ずつを脳外傷部位の大きさを測定した。更にアポトーシス及び神経細胞の免疫染色を行い、顕微鏡下で倍率200倍、任意の5カ所にて計数を行った。

#### (5) 神経細胞のアポトーシスに関する二重染色

損傷後3日の運動群及び非運動群の切片を用いてアポトーシスと神経細胞の蛍光二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察及び写真撮影を行い、運動群及び非運動群の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 加齢ラット運動による記憶学習改善

到達時間において非運動群と比較し sham 群及び運動群で有意に減少した(P<0.05, 図1)。運動群と sham 群において有意な差は見られなかった(図-1A)。泳いだ距離においては sham 群及び運動群と比較し非運動群で有意に増加した(P<0.05, 図-1B)。しかしながら sham 群と運動群間では差は見られなかった。泳ぐ速度ではどの群間においても差は見られなかった(図-1C)。記憶試験では非運動群と比較し sham 群及び運動群記憶が保持されていた (P<0.01, 図-1D)。

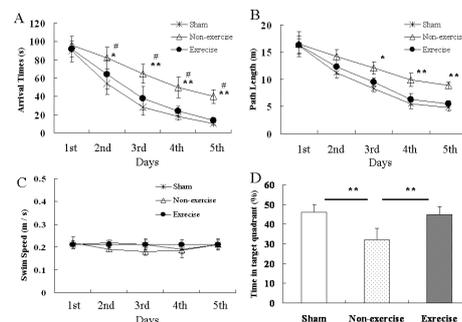


図-1 加齢ラット脳外傷後の運動による記憶・学習改善効果

#### (2) 加齢ラット運動による脳外傷部位の変化

加齢ラットの運動後における損傷後7日の損傷部位を図-2に示した。HE像を比較すると非運動群(図-2A)と比較し、運動群では損傷部位の縮小が見られた(図-2B)。非運動群と比較し、運動群の有意な損傷面積の減少が見られた(P<0.001, 図-2C)。

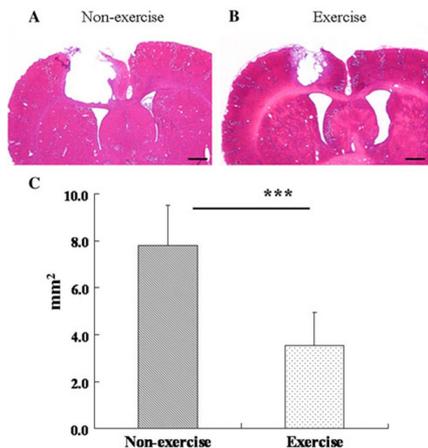


図-2 加齢ラットの運動による脳外傷部位効果

(3)加齢ラット運動による脳外傷周囲組織のアポトーシス抑制効果

損傷後3日において非運動群ではアポトーシスを起こしている大型の神経細胞が損傷部位周囲組織に多数見られた(図-3A)。しかしながら運動群ではアポトーシス陽性細胞はほとんど見られなかった(図-2B)。損傷後1,3,7日において運動群で非運動群と比較しアポトーシスを起こしている細胞の有意な減少が認められた( $P < 0.05$ , 図-3C)。損傷後、3日後では顕著であった( $P < 0.001$ , 図-3C)。

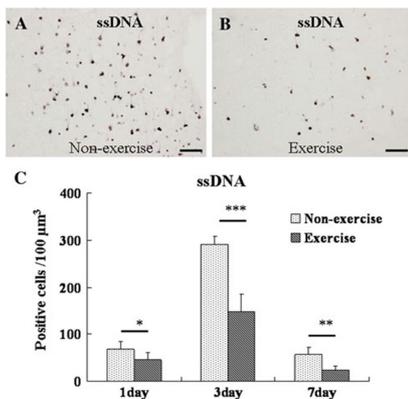


図-3 運動後の損傷周囲におけるアポトーシスの発現

(4) 加齢ラット運動における脳外傷後の神経細胞数の変化

損傷後7日において非運動群では損傷の具合により大小様々な神経細胞が損傷部位周囲組織に認められた(図-4A)。しかしながら運動群では一部に小型の障害を受けた神経細胞が散見されたが、ほとんどが大型の神経細胞が多数認められた(図-4B)。損傷後7日において運動群と比較し、非運動群では神経細胞数の有意な減少が認められた( $P < 0.001$ , 図-4C)。

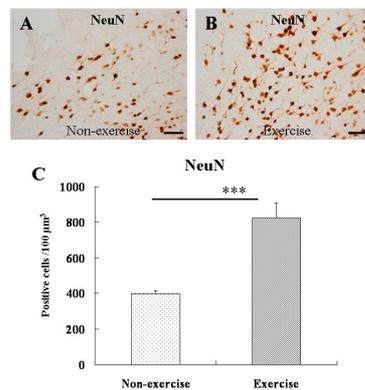


図-4 加齢ラット運動による神経保護作用

(5)加齢ラット運動による損傷周囲組織の神経細胞のアポトーシス抑制効果

非運動群では損傷周囲組織で多数の神経細胞のアポトーシスが見られた(図-5C)。しかしながら運動群では神経細胞のアポトーシスが抑制されていた(図-5F)。

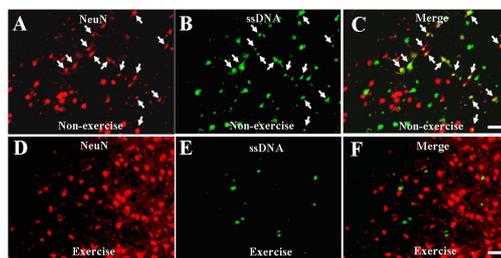


図-5 脳外傷周囲組織の加齢ラット運動による神経細胞のアポトーシス抑制効果(損傷7日後)

(6) 考察

脳外傷後早期から損傷部位周においてアポトーシス陽性細胞数が加齢ラット運動群で加齢非運動群に比較して有意に減少した。さらに非運動群のアポトーシス陽性細胞のほとんどは神経細胞で有り、運動群ではその数は、減少していた。加えて、損傷後7日で運動群は非運動群に比較し神経細胞が有意に増加していた。脳損傷後の神経細胞は損傷早期にカスパー3の活性化が見られ、アポトーシスが引き起こされると報告されている[2]。さらに、最近の報告により我々は脳外傷後の損傷早期において損傷周囲部位の神経細胞はアポトーシスにより神経細胞死を起こすこと報告した[1]。また、脳虚血実験において脳虚血後、海馬の神経細胞やグリア細胞のミトコンドリアが活性化され、ミトコンドリアからのシトクロム C 放出によりカスパー3の活性化が見られ、アポトーシスが引き起こされると報告されている[3]。

脳虚実験において basic fibroblast growth factor (bFGF)、NGF、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、insulin-like growth factor 1(IGF1)や Growth hormone

(GH) [4]は海馬や大脳皮質神経細胞やグリア細胞質内のカスパー3やカスパー9の活性化を有意に阻害することによりアポトーシスによる神経細胞やグリア細胞の細胞死を抑制することが知られている。また、NGFやBDNFは、それぞれの受容体 TrkAや TrkB を介して MAPK のファミリーの一つである anti-apoptosis シグナルの the phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/Akt pathway を活性化し神経細胞のアポトーシスを抑制することが報告されている[5]。

一方、Bcl-2 は神経細胞のミトコンドリアのシトクロム C の放出抑制やカスパー3依存性アポトーシスカスケード抑制をすることによりアンチアポトーシス因子として知られている[6]。Bcl-2 の過剰発現は Bcl-2 ノックアウトマウスの虚血実験から神経保護作用を有することが報告されている[7, 8]。さらに運動はラットの脳虚血実験で Bcl-2 の発現を有意に増加させ、アポトーシスを誘導する Bax の発現を抑制し、神経細胞やグリア細胞のアポトーシスを減少させ、神経保護作用を有することが報告された[9]。

さらに運動は脳障害モデルを用いた実験で脳内において脳障害後に発生した水酸化ラジカル hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )やスーパーオキシド super oxide ( $\text{O}_2\cdot^-$ )が引き起こす酸化ストレスを減少させ、神経細胞死を抑制し記憶改善効果を有することが報告されている[10]。我々は最近の報告で脳外傷後に発生する( $\cdot\text{OH}$ )やスーパーオキシド super oxide ( $\text{O}_2\cdot^-$ )が神経細胞のアポトーシスを引き起こし、ラジカルスカベンジャーが神経細胞死の保護作用をすることを報告した[10]。このことから運動が脳外傷後に発生する( $\cdot\text{OH}$ )やスーパーオキシド super oxide ( $\text{O}_2\cdot^-$ )を減少させることにより神経細胞の障害が軽減され、NeuN 陽性細胞が増加したかも知れない。これらのことからまた運動が損傷後に起こる神経細胞のアポトーシスによる細胞死を阻害することにより、運動群で神経細胞数が増加したと考えられた。本実験においても運動が脳外傷後の神経細胞死に対し神経保護作用を有することが示された。

本実験においてプラットフォームへの到着時間が運動群で非運動群に比較して、有意に短縮し、sham 群の到着時間と非運動群の到着時間の中間値を示した。本実験では運動群が脳外傷後に起こる神経細胞の細胞死やアポトーシスを抑制し、神経細胞が多数生存することを示した。運動は海馬の神経細胞のアポトーシスを阻害し、記憶改善効果が報告されている[11]。運動は NGF や BDNF 及び TrkA、TrkB の発現を促進し、海馬の neurogenesis を促進し、神経細胞のアポトーシスを阻害し、記憶学習機能を改善することが報告されている[12]。これらのことから運動は脳外傷後に起こる脳機能不全を改善することが示唆された。

本実験において、高齢者において脳外傷後

の早期の運動は脳外傷後に起こされる損傷周囲組織の神経細胞アポトーシスを抑制することにより神経保護作用を示し、脳外傷後に出現する脳機能不全を改善させると考えられた。脳外傷後の運動は非常に有効な治療方法の一つであると考えられた。

#### (7)まとめ

損傷早期に運動を行うことは脳外傷後に起こる脳機能不全を改善するために運動治療(リハビリテーション)はとっても重要であると考えられた。

#### (8)参考文献

- . Itoh, T., et al., Edaravone protects against apoptotic neuronal cell death and improves cerebral function after traumatic brain injury in rats. *Neurochem Res*, 2010. 35(2): 348-55.
- . Wang, X., et al., Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia. *Biol Neonate*, 2001. 79(3-4): 172-9.
- . Yasuoka, N., et al., Neuroprotection of edaravone on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004. 151(1-2): 129-39.
- . Shin, D.H., et al., Protective effect of growth hormone on neuronal apoptosis after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett*, 2004. 354(1): 64-8.
- . Nguyen, T.L., et al., Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7 cells. *Exp Mol Med*, 2010. 42(8): 583-95.
- . Hockenbery, D., et al., Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 1990. 348(6299): 334-6.
- . Martinou, J.C., et al., Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, 1994. 13(4): 1017-30.
- . Hata, R., et al., Targeted disruption of the bcl-2 gene in mice exacerbates focal ischemic brain injury. *Metab Brain Dis*, 1999. 14(2): 117-24.
- . Liebelt, B., et al., Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. *Neuroscience*, 2010. 166(4): 1091-100.
- . Radak, Z., et al., Regular exercise

improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int*, 2001. 38(1): 17-23.

. Uysal, N., et al., The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett*, 2005. 383(3): 241-5.

. Chae, C.H. and H.T. Kim, Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochem Int*, 2009. 55(4): 208-13.

## 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)

- . Heat Shock Protein 27 Plays a Pivotal Role in Myofibroblast Differentiation and in the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis, Park AM, Kanai K, Itoh T, Sato T, Tsukui T, Inagaki Y, Selman M, Matsushima K, Yoshie O, *Plos One*, 査読有,11, e0148998, 2016, DOI:10.1371/journal.pone.0148998
- . Statins inhibited the MIP-1 expression via inhibition of Ras/ERK and Ras/Akt pathways in myeloma cells, Tsubaki M, Mashimo K, Takeda T, Kino T, Fujita A, Itoh T, Imano M, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S, *Biomed Pharmacother*, 査読有,78, 23-29, 2016, DOI: 10.1016/j.biopha.2015.12.017
- . RANK-RANKL interactions are involved in cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma cell lines, Tsubaki M, Takeda T, Yoshizumi M, Ueda E, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S, *Tumour Biol*, 査読有,37, 9099-9110, 2016, DOI: 10.1007/s13277-015-4761-8
- . Resveratrol Partially Suppresses Inflammatory Events but Does not Affect Stroke Onset in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats, Chiba T, Yokotani K, Suzuki S, Itoh T, Umegaki K, *J Atheroscler Thromb*, 査読有,22, 958-970, 2015, DOI: 10.5551/jat.27789
- . Human papilloma virus-infected genital warts in a girl with Costello syndrome, Oiso N, Okamoto N, Akiduki-Yachi M, Tatebayashi M, Itoh T, Satou T, Kawada, *Eur J Dermatol*, 査読有,25, 184-185, 2015, DOI: 10.1684/ejd.2014.2486
- . Bisphosphonates and statins inhibit

expression and secretion of MIP-1 via suppression of Ras/MEK/ERK/AML-1A and Ras/PI3K/Akt/AML-1A pathways. Tsubaki M, Takeda T, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Mashimo K, Fujiwara D, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S, *Am J cancer res*, 査読有, 5, 168-179, 2014, DOI:aj.cr/0003190

[学会発表](計 5 件)

- . 吉田原規、伊藤龍生、橋本重夫、土手健作、佐藤隆夫、運動による脳外傷後の脳機能改善効果の検討、第 106 回日本病理学会総会,2017 年 4 月, 27~29 日,京王プラザホテル(東京都、新宿区)
- . 藪口友暉,小倉あづき,蒲尚子,藤原隆史,福田麻美,金田雅大,水口信行,田淵正樹,佐藤隆夫,伊藤龍生、妊娠高血圧がラット胎仔神経幹細胞の発達・分化に及ぼす影響、第 55 回日本栄養食糧学会,2016 年 10 月, 22 日,帝塚山学院大学泉ヶ丘キャンパス(大阪府、堺市)
- . 藤原隆史,吉田大亮,福田麻美,藪口友暉,金田雅大,森万優加,小倉あづき,足立夏実,水口信行,佐藤隆夫,伊藤龍生、妊娠期高血糖曝露差がラット胎仔神経幹細胞分化に及ぼす影響、第 55 回日本栄養食糧学会,2016 年 10 月, 22 日,帝塚山学院大学泉ヶ丘キャンパス(大阪府、堺市)
- . 佐藤隆夫,伊藤龍生,土手健作,橋本重夫、外傷的脳損傷の損傷局所に及ぼす運動の影響について、第 104 回日本病理学会総会,2015 年 4 月 30~5 月 2 日,名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)
- . 伊藤龍生、橋本重夫、佐藤隆夫、運動による実験的脳外傷後に出現する神経幹細胞への影響、第 104 回日本病理学会総会,2015 年 4 月 30~5 月 2 日,名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市)

[その他]

ホームページ等

<http://researchmap.jp/dragon-igakubu-2-20/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 龍生 ( ITOH ,Tatsuki )  
 近畿大学・農学部・教授  
 研究者番号： 4 0 3 3 0 2 4 5

### (2)研究分担者

佐藤 隆夫 ( SATOU ,Takao )  
 近畿大学・医学部附属病院・教授  
 研究者番号： 7 0 1 6 2 4 4 3

井上 敬夫 ( INOUE ,Takao )  
 近畿大学・医学部・助教  
 研究者番号： 0 0 4 4 1 0 0 6