

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01486

研究課題名(和文) 運動開始日の違いが及ぼすラット脳外傷後の脳機能改善効果に関する研究

研究課題名(英文) Exercise increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury

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：40330245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：外傷的脳損傷での運動が及ぼす外傷的脳損傷後に出現する神経再生や神経幹細胞に対する影響を今回実験的に検討した。特に損傷周囲に出現する神経幹細胞に注目し免疫組織化学的ex vivo的方法により検討した。脳外傷後の早期に行う運動は脳外傷により引き起こされる損傷周囲組織に出現する増殖能を有する神経幹細胞を含むnestin陽性細胞数を増加させると考えられた。損傷早期に運動を行うことは神経再生を視野に入れた運動治療(リハビリテーション)にとっても重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳外傷後早期から運動(リハビリテーション)をすることは脳損傷後における損傷部位での神経幹細胞の増殖能力を高め、神経再生を誘導し、神経再生治療に有効であり、早期からの運動が社会復帰を早める可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：From our current study, we propose that the exercise in the early following traumatic brain injury increases the number of nestin-positive cells-including NSCs- with the potential to differentiate into neurons and glia around the area damaged by TBI, and enhanced proliferation activity of neural stem cells (NSCs) around damaged area after traumatic brain injury (TBI). Therefore, the exercise therapy (rehabilitation) in the early phase following TBI is very important for recuperation of induced cerebral dysfunction following TBI.

研究分野：神経化学

キーワード：脳外傷 運動 神経再生 リハビリテーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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、その 8 割が死亡し、残り 2 割が後遺症を有し、米国人口の約 2% である 530 万人以上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]。さらに頭部外傷は近年の治療の進歩により、救命はされたものの障害や後遺症を有する症例が死亡者数よりはるかに多く、死亡者数の 2~10 倍以上の外傷後遺症を有する患者が存在すると推測されている。このように脳外傷は社会的影響の極めて大きい傷害であり、脳外傷後の脳障害や神経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

申請者らは脳外傷後の早期の運動が外傷局所で神経幹細胞数を増加させることを明らかにした。さらに外傷後、早期から長期にわたる運動が脳外傷後に出現する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、脳外傷後に起こる脳障害や記憶障害を改善するであろうと考えた。本研究では長期にわたる運動が及ぼす脳外傷部局所の神経再生を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデル動物の作製及び運動方法

Pneumatic control injury device を用いて Wistar ラット (10 週齢) に脳外傷を与え、脳外傷ラットを作製した。その後、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。

#### (2) 神経幹細胞の単離

脳外傷後、1、3、7 日に非運動群及び運動群のラット脳の損傷部位を中心に径 2mm の大きさで大脳皮質部分のみを実体顕微鏡下で取り出し、培養した。さらに培養 4 日目に培養皿に接着した細胞を回収し、無処理培養皿に再び細胞を蒔き、10-14 日培養し、sphere を得た。培養皿一枚ずつ当たりの sphere の数を測定した。

#### (3) 免疫組織染色

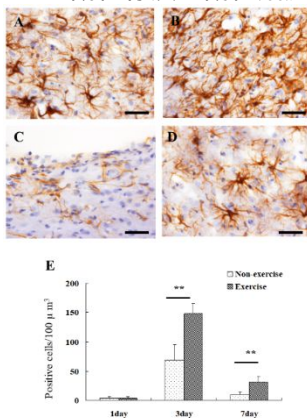
損傷後 1,3,7 日後 (トレッドミル終了後) に非運動群および運動群のラットを 4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、脳を取り出し、損傷最大径の部分より 20 $\mu$ m の連続切片を作製した。連続切片 3 枚ずつを nestin 及び Ki67 抗体で免疫染色し、損傷周囲に発現しているそれぞれの陽性細胞数を対物 20 倍の顕微鏡下で計数した。

#### (4) Ki67 陽性細胞数と単離 sphere 数の相関

運動群及び非運動群の Ki67 陽性細胞数とそこから単離された sphere の数との相関を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) Nestin 陽性像及び陽性細胞数



損傷部位周囲の nestin 陽性像を Fig. 1 に示した。損傷後 1 日では非運動群および運動群において損傷周囲で nestin 陽性の小型の細胞が極少数認められた。損傷後 3 日では非運動群及び運動群で大型で細胞質及び突起に nestin 陽性像を示す大型の細胞が多数認められたが運動群ではより顕著であった (Fig. 1A&B)。損傷後 7 日では非運動群では損傷部位周囲に細線維状の nestin 陽性像が少数認められた (Fig. 1C)。しかしながら運動群では大型で細胞質及び突起に nestin 陽性像を認める大型の細胞が多数認められた (Fig. 1D)。

Nestin 陽性細胞数の計数結果を (Fig. 1E) に示した。損傷後 1 日で非運動群と比較し運動群で陽性細胞数の増加は認められなかった。しかしながら損傷後 3、7 日でそれぞれ運動群で非運動群と比較し各で有意な陽性細胞数の増加が認められた ( $p < 0.01$ )。

図-1 損傷後の損傷周囲における nestin 陽性細胞の発現

#### (2) Ki67 陽性像及び陽性細胞数

損傷部位周囲の ki67 陽性像を Fig. 2 に示した。損傷後 1 日では非運動群および運動群において損傷周囲で Ki67 陽性の細胞が極少数認められた (Fig. 2A)。損傷後 3 日では非運動群および運動群において損傷周囲で Ki67 陽性の細胞が多数認められた (Fig. 2B)。損傷後 7 日では非運動群では損傷部位周囲に Ki67 陽性細胞は極少数認められたが、運動群では多数認められた。

Ki67 陽性細胞数の計数結果を(Fig. 2C)に示した。損傷後 1 日で非運動群と比較し運動群で陽性細胞数の増加は認められなかった。しかしながら損傷後 3、7 日でそれぞれ運動群で非運動群と比較し各で有意な陽性細胞数の増加が認められた( $p < 0.01$ )。

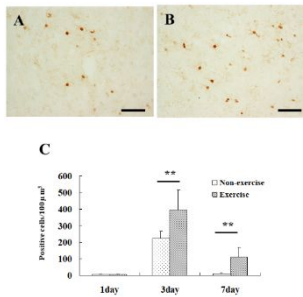


図-2 損傷後の損傷周囲における Ki67 陽性細胞の発現

### (3) nestin と Ki67 蛍光二重染色

損傷後 3、7 日後の損傷部位周囲の nestin と Ki67 蛍光二重染色陽性像を Fig. 3 に示した。損傷後 3 日において非運動群(Fig.3A-C)及び運動群(Fig.3D-F)では多数の nestin 陽性細胞が Ki67 陽性を示した(Fig.3A-F)。損傷後 7 日において非運動群では極少数の nestin 陽性細胞が Ki67 陽性を示した(Fig.3G-I)。しかしながら運動群では多数の nestin 陽性細胞が認められ、そのほとんどが Ki67 陽性を示した(Fig. 3J-L)。

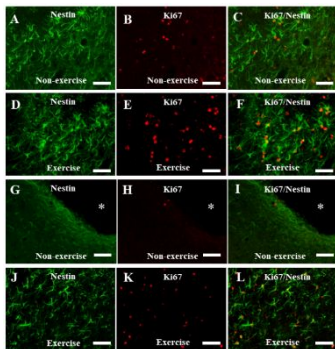


図-3 損傷後 3 日の損傷周囲における ssDNA 及び NeuN 陽性細胞の発現

### (4) 神経幹細胞の分離及び免疫染色

損傷後 1 日の非運動群及び運動群の損傷周囲の組織からでは sphere の分離ができなかった (Fig. 4A)。しかしながら、非運動群及び運動群で損傷後 3 日からえた損傷周囲組織から sphere の分離・培養ができた(Fig. 4B)。さらに運動群では損傷後 7 日の組織からも sphere の分離ができた(Fig. 4D)。分離された sphere の数は運動群で非運動群と比較し有意な増加が認められた(Fig. 4D,  $p < 0.01$ )。

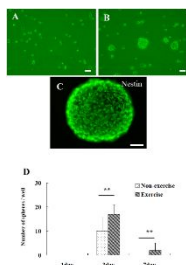
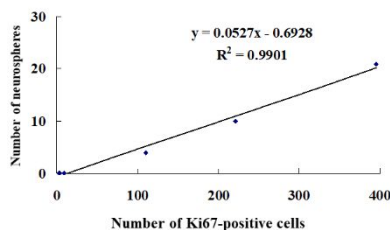


図-4 損傷周囲より経時的に単離した神経幹細胞及び sphere 数の変化



### (5) Ki67 陽性細胞数と単離 sphere 数の相関

図-4 に Ki67 陽性細胞数と単離 sphere 数の相関を示した。 $y = 0.0527x - 0.6928$ 、相関係数  $R^2 = 0.9901$  で Ki67 陽性細胞数と単離 sphere 数間に有意な相関を認めた(図-5,  $P < 0.01$ )。

図-5 Ki67 陽性細胞数と単離 sphere 数の相関

### (6) 考察

ラット脳外傷モデルでは非運動群及び運動群で損傷後 1 日より 7 日まで nestin の陽性細胞が認められ、nestin 陽性細胞数が損傷後 3 日で最大になった。この結果は以前我々の報告した結果と一致した[1,2]。さらに Changjong Moon ら[3]が行った cryoinjury では大脳皮質の損傷周囲で nestin 陽性細胞が損傷後 24 時間から増加し始め 4 日まで増加し、次いで減少することを報告している。さらに A.G.Douen ら[4]が行った ablation injury 実験では nestin の陽性細胞は大脳皮質の損傷周囲で損傷後 3 日で最大になることを報告している。また S.Chen ら[3]による CCI

モデル実験でも損傷後 24 時間から 7 日で nestin 陽性像が見られ 4 日で陽性数が最大になることを報告している。これらのことから損傷周囲では損傷後 3,4 日後に nestin の発現のピークをむかえたと考えられた。

運動群で非運動群に比較し損傷早期で Ki67 陽性細胞が有意に増加し、Ki67 陽性を示す nestin 陽性細胞が多く認められた。bFGF は神経幹細胞に作用し神経幹細胞分裂を促進させることが知られている[4]。このことから運動群が非運動群に比べて損傷早期で Ki67 陽性細胞が増加し、運動群で nestin 陽性細胞が Ki67 陽性を示す細胞が増加したと考えられる。

損傷後 1 日、3 日、7 日の損傷周囲の大脳皮質部分のみを実体顕微鏡下で分離し nestin 陽性細胞の単離を試みた。3 日後では非運動群及び運動群では nestin 陽性の sphere を単離することが出来たが sphere 数において運動群では有意な増加が見られた。また、7 日では非運動群では sphere の単離ができなかったが運動群において nestin 陽性 sphere の単離ができた。損傷周囲で免疫組織学的に見られる Ki67 陽性細胞の数と損傷周囲部位から単離した sphere 数は相関しており、損傷周囲の Ki67 陽性細胞数と神経幹細胞数は相関するものと考えられた。

脳組織損傷周囲における nestin 陽性細胞及び Ki67 陽性細胞数においても損傷後 3 日と 7 日において運動群で非運動群に比較し有意な増加を認めた。これは運動が脳外傷後に損傷周囲組織における nestin 陽性細胞に含まれる神経幹細胞の増殖能を高めていると考えられた。これらのことから脳外傷後の Ki67 陽性細胞に増殖期の神経幹細胞が含まれており、重要であると考えられた。

#### (7) まとめ

脳外傷後の早期に行う運動は脳外傷により引き起こされる損傷周囲組織に出現する増殖能を有する神経幹細胞を含む nestin 陽性細胞数を増加させると考えられた。損傷早期に運動を行うことは神経再生を視野に入れた運動治療(リハビリテーション)にとっても重要であると考えられた。

#### < 引用文献 >

- . Itoh T, Satou T, Hashimoto S, Ito H (2005) Isolation of neural stem cells from damaged rat cerebral cortex after TBI. Neuroreport 16: 1687-1691.
- . Itoh T, Satou T, Hashimoto S, Ito H (2007) Immature and mature neurons coexist among glial scars after rat traumatic brain injury. Neurol Res 29: 734-742.
- . Chen S, Pickard JD, Harris NG (2003) Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. Exp Neurol 182: 87-102.
- . Douen AG, Dong L, Vanance S, Munger R, Hogan MJ, Thompson CS, Hakim AM (2004) Regulation of nestin expression after cortical ablation in adult rat brain. Brain Res 1008: 139-146.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Tsubaki Masanobu, Takeda Tomoya, Tomonari Yoshika, Kawashima Keishi, Itoh Tatsuki, Imano Motohiro, Satou Takao, Nishida Shozo  | 4. 巻<br>233               |
| 2. 論文標題<br>Pioglitazone inhibits cancer cell growth through STAT3 inhibition and enhanced AIF expression via a PPAR -independent pathway | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Cellular Physiology   | 6. 最初と最後の頁<br>3638 ~ 3647 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/jcp.26225  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Tsubaki Masanobu, Takeda Tomoya, Asano Ryo-ta, Matsuda Tomoyuki, Fujimoto Shin-ichiro, Itoh Tatsuki, Imano Motohiro, Satou Takao, Nishida Shozo       | 4. 巻<br>46              |
| 2. 論文標題<br>Rebamipide suppresses 5-fluorouracil-induced cell death via the activation of Akt/mTOR pathway and regulates the expression of Bcl-2 family proteins | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Toxicology in Vitro   | 6. 最初と最後の頁<br>284 ~ 293 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.tiv.2017.10.019   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>木内葵、蒲尚子、藪口友暉、熊野雅洋、末永麻里、水口信行、江川賢太郎、田淵正樹、佐藤隆夫、伊藤龍生 |
| 2. 発表標題<br>高齢出産における妊娠高血圧が及ぼす発達障害の発症機序の解明                    |
| 3. 学会等名<br>第72回日本栄養・食糧学会大会                                  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>熊野雅洋、木内葵、蒲尚子、水口信行、江川賢太郎、末永麻里、佐藤隆夫、伊藤龍生 |
| 2. 発表標題<br>母胎高血糖由来のラット胎仔神経幹細胞分化異常に対するカテキンの改善効果    |
| 3. 学会等名<br>第72回日本栄養・食糧学会大会                        |
| 4. 発表年<br>2018年                                   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)           | 備考 |
|-----------|--|---------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 井上 敬夫<br><br>(Inoue Takao)<br><br>(00441006) | 近畿大学・医学部・助教<br><br><br>(34419)  |    |
| 研究<br>分担者 | 佐藤 隆夫<br><br>(Satou Takao)<br><br>(70162443) | 近畿大学・大学病院・教授<br><br><br>(34419) |    |