

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500472

研究課題名（和文） 脳外傷後の運動による神経再生促進効果の研究

研究課題名（英文） Exercise increases neurogenesis around the damaged area after traumatic brain injury

研究代表者

伊藤 龍生（ITO TATSUKI）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：40330245

研究成果の概要（和文）：運動は、ラット脳外傷後にトレッドミルにより強制運動を負荷した群と運動を行っていない非運動群を経時的に屠殺した。免疫組織学的な検討に加えて、損傷周囲組織からの神経幹細胞の単離を試みた。脳損傷後、非運動群において損傷周囲で1日、3日及び7日後で nestin（神経幹細胞のマーカー）及び Ki67（分裂細胞のマーカー）陽性細胞が認められた。特に運動群では多数の大型の nestin 陽性細胞と多数の Ki67 陽性細胞が見られ、nestin 陽性細胞は Ki67 陽性を示した。さらに非運動群に比較し運動群は損傷後3日及び7日で nestin 及び Ki67 陽性細胞数の有意な増加を示した。Ex vivo の実験において非運動群では損傷後3日の損傷周囲組織からのみ sphere の単離ができたが運動群では損傷後3日及び7日で sphere の単離ができた。単離された sphere 数は非運動群に比較し運動群で有意な増加が見られた。Sphere は神経細胞、アストロサイト及びオリゴデンドログリアへの分化を示す、neurosphere と考えられた。運動は損傷周囲では神経細胞やグリア細胞へ分化可能な神経幹細胞に対し、損傷後引き起こされる細胞障害や細胞死に保護的に働いていることが示された。脳外傷後に運動（リハビリテーション）をすることは脳損傷後における神経再生治療に有効である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： Wistar rats received traumatic brain injury (TBI) and were randomly divided into two groups: 1) non-exercise group and 2) exercise group. The exercise group ran on a treadmill for 30 min/day at 22 m/min for 7 consecutive days. Immunohistochemistry was used to monitor neural stem cell (NSC) proliferation around the damaged area and *ex vivo* techniques were used to isolate NSCs from the damaged region in both groups. The number of nestin as a marker of NSC- and Ki67 as a marker of proliferation cell-positive cells observed at 3 and 7 days after TBI was significantly greater in the exercise group than in the non-exercise group ($P<0.01$). Furthermore, most nestin-positive cells in the exercise group co-localized with Ki67-positive cells. In *ex vivo* studies, spheres could be isolated from injured brain tissue from the exercise group at 3 and 7 days following TBI, but at only 3 days in the non-exercise group. The number of spheres isolated from injured brain tissue was greater in the exercise group than in the non-exercise group. Spheres were immunopositive for nestin and comprised of NSCs that could differentiate into neurons and glia. Exercise increases the proliferation of NSCs around the damaged area following TBI. Therefore, exercise therapy (rehabilitation) in the early phase following TBI is important for recuperation from cerebral dysfunction induced by TBI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：神経化学、神経病理学

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：脳外傷、リハビリテーション、神経幹細胞、運動、神経再生

1. 研究開始当初の背景

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や神経障害の後遺症を有する患者が激増している。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

(1) 本研究では脳外傷部局所における神経再生と運動及び記憶学習との関係を組織学的、生化学的、生理学的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。

(2) 本研究の目的は脳外傷部局所における神経再生と運動との関係を明らかにすることである。本研究には10週齢Wistar ラット♂を用い、pneumatic control injury deviceで脳外傷を与えた後、強制運動のトレッドミルを負荷し、強制運動後の傷害部位周囲の神経再生を評価する。

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（10週齢♂）に脳外傷を与え、脳外傷ラットを作製した。

(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) 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 μ 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) nestin と Ki67 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nestinとKi67の蛍光二重染色を行った。その後、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。

(5) 神経幹細胞の単離

損傷後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、神経幹細胞の培養培地にて大脳皮質をピペティングにより分散させた。分散させた細胞を1脳当たりオルニチンおよびフィブロネクチン処理した培養皿（径6cm）一枚に蒔き、5% CO₂ 下にて3日間培養した。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、上記培地にて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。さらに細胞の分化を調べるためにsphereをオルニチン処理した丸形カバーガラスが入った24wellの培養プレートにて4日間培養した。

(6) 培養細胞の免疫染色

分離されたsphereが神経幹細胞であるか調べるために分化誘導実験を行った。sphereを上記カバーガラス上にて分化誘導用培地を用いて培養を行い、培養4日後に細胞を固定し、幼弱な神経細胞のマーカー；Tuj1, アストログリア細胞のマーカー；GFAP, オリゴデンドログリア細胞のマーカー；O4抗体を用いて免疫染色を行い、神経細胞やグリア細胞への分化を確認した。

4. 研究成果

(1) nestin 及び Ki67 陽性細胞数の変化

損傷後3, 7日において運動群では非運動群に比較して大型の細胞質を有するnestin陽性細胞が多数存在した（図1）。また7日後では非運動群では損傷周囲にnestin陽性の突起を多数認めたが、運動群では見られなかった（図1）。nestin陽性細胞数は非運動群に比較し、運動群で有意に増加した（ $P < 0.01$, 図1）。また損傷後3, 7日においてKi67陽性細胞数は非運動群に比較し運動群で有意に増加していた（ $P < 0.01$, 図2）。

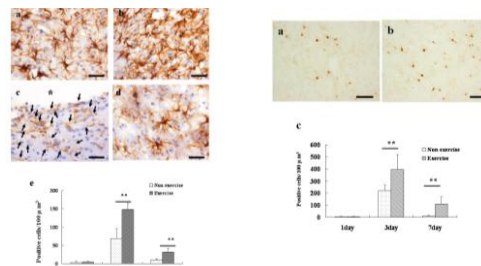


図-1. nestin の発現

図-2. Ki67 の発現

(2) nestin と Ki67 の蛍光二重染色

脳外傷後の損傷周囲組織による nestin 及び Ki67 蛍光二重染色像を図-3 に示した。

損傷後 3 日では運動群及び非運動群で nestin 陽性細胞が Ki67 陽性を示した。しかし、損傷後 7 日では運動群では nestin 陽性細胞が Ki67 陽性を示したが非運動群ではほとんどの nestin 陽性細胞が Ki67 陽性を示さなかった。

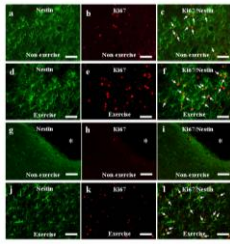


図-3. nestin 及び Ki67 蛍光二重染色

(3) 神経幹細胞の分離

損傷周囲組織から損傷後 1 日では非運動群及び運動群で neurosphere の分離はできなかった(図 4)。損傷後 3 日では非運動群及び運動群の組織から neurosphere の分離ができ、その数は非運動群に比較して運動群の損傷周囲組織から得られた neurosphere の数が有意に多く分離できた($P < 0.01$, 図 4)。しかしながら、損傷後 7 日では非運動群からは neurosphere の分離はできなかったが運動群

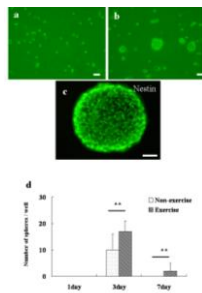
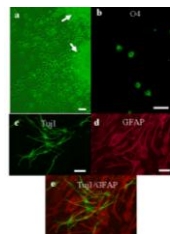


図-4. neurosphere の分離

(4) 神経幹細胞の分化誘導



分離された neurosphere は神経細胞、アストログリア細胞及びオリゴデンドログリア細胞へ分化した(図 5)。

図-5. 神経幹細胞の神経細胞及びグリア細胞への分化

(5) 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[5]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とと考えられた。

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[2, 6]。さらに運動は海馬や SVZ における bFGF の産生を増加させ、nestin 陽性の神経幹細胞の分裂を促進さ、neurogenesis を引き起こすが報告されている[7]。また、運動は海馬や SVZ において brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の産生増加や TrkB 受容体を増加させることにより分裂能を持つ神経幹細胞を増加させ neurogenesis を促進させることが報告されている[8]。さらに脳内で産生された insulin-like growth factor 1 (IGF1) [9]や Growth hormone (GH) [10]は海馬において神経幹細胞の分裂促進させることが報告されている。運動は IGF 1 や GH の産生を増加させ、海馬での神経幹細胞の増殖促進が報告されている[9, 10]。ラット脳虚血モデルを用いた実験においても脳虚血後の運動は海馬や SVZ での分裂能を有する神経幹細胞の増加や neurogenesis を促進させることが報告されている[11, 12]。これら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。このことから損傷早期において運動群では非運動群に比較し分裂能を有する神経幹細胞が多く存在すると考えられる。

さらに運動は脳虚血モデルを用いた実験で脳内において虚血後に発生した水酸化ラジカル hydroxyl radical ($\cdot OH$)やスーパーオキシド super oxide (O_2^-)が引き起こす酸化ストレスを減少させ、神経細胞死を抑制することが報告されている[13]。我々は最近の報告で脳外傷後に発生する($\cdot OH$)やスーパーオキシド super oxide (O_2^-)が神経幹細胞の細胞死を引き起こし、ラジカスカベンジャーが神経幹細胞死の保護作用をすることを報告した。このことから運動が脳外傷後に発生する($\cdot OH$)やスーパーオキシド super oxide

(O₂)を減少させることにより神経幹細胞の障害が軽減され、nestin 陽性細胞が増加したかも知れない。

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。Fig6 の様に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。

非運動群と運動群で単離された sphere の免疫染色では sphere 全体的に nestin 陽性を示し Tuj1、Vimentin には陰性であった。本実験で得られた sphere の培養液より bFGF および EGF を取り除き、更に4日後の免疫染色で Tuj1 と GFAP の陽性細胞が認められた。さらに O4 陽性細胞が認められた。我々は損傷早期の損傷周囲組織から neurosphere が得られ、神経細胞やグリア細胞への分化能を有することを報告した[1]。このことから本実験で単離培養された sphere は neurosphere であり神経細胞とグリア細胞への分化をすることが確認された。

神経幹細胞の由来に関して、損傷後、周囲のアストロサイトが反応性に幼若化し nestin を持つ神経前駆体となり新しい神経細胞に分化するということが報告されている[14,15]。さらに我々はラット培養 I 型アストロサイトが bFGF 存在下で幼若化し nestin 陽性神経幹細胞へと変化し、神経細胞やグリア細胞へ分化することを報告した[6]。また SVZ や SEZ に存在する神経幹細胞が障害部位に migration するという報告も見られる[16-18]。しかしながら現在の所、脳外傷後に出現する nestin 陽性細胞の起源は SVZ や SEZ から神経幹細胞が移動してきたのかアストロサイトが反応性に幼若化し nestin 陽性細胞が増加したのかは明確ではない。本実験でも明らかではなく今後の実験課題である。

(6) 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。

(7) 参考文献

1. 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.
2. 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.
3. Moon C, Ahn M, Kim S, Jin JK, Sim KB, Kim HM, Lee MY, Shin T (2004) Temporal patterns of the embryonic intermediate filaments nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury. *Brain Res* 1028: 238-242.
4. 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. Chen S, Pickard JD, Harris NG (2003) Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Exp Neurol* 182: 87-102.
6. Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H (2006) Cultured rat astrocytes give rise to neural stem cells. *Neurochem Res* 31: 1381-1387.
7. Wu CW, Chen YC, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Huang AM, Tsai HJ, Chang YT, Kuo YM (2007) Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory. *J Neurochem* 103: 2471-2481.
8. Wu CW, Chang YT, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Wu SY, Lo CP, Kuo YM (2008) Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J Appl Physiol* 105: 1585-1594.
9. Llorens-Martin M, Torres-Aleman I, Trejo JL (2010) Exercise modulates insulin-like growth factor 1-dependent and -independent effects on adult hippocampal neurogenesis and behaviour. *Mol Cell Neurosci* 44: 109-117.

10. Blackmore DG, Golmohammadi MG, Large B, Waters MJ, Rietze RL (2009) Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone-dependent manner, augmenting the regenerative response in aged mice. *Stem Cells* 27: 2044-2052.
11. Luo CX, Jiang J, Zhou QG, Zhu XJ, Wang W, Zhang ZJ, Han X, Zhu DY (2007) Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J Neurosci Res* 85: 1637-1646.
12. Komitova M, Zhao LR, Gido G, Johansson BB, Eriksson P (2005) Postischemic exercise attenuates whereas enriched environment has certain enhancing effects on lesion-induced subventricular zone activation in the adult rat. *Eur J Neurosci* 21: 2397-2405.
13. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsek J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (2001) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 38: 17-23.
14. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21: 7153-7160.
15. Picard-Riera N, Nait-Oumesmar B, Baron-Van EA (2004) Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* 76: 223-231.
16. Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145-1148.
17. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027-2033.
18. Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 3727-3738.

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 7 件)

- ① Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, Exercise inhibits neuronal apoptosis and improves cerebral function following rat traumatic brain injury, *J Neural Transm*, 査読有, inpress, 2011,

- ② 伊藤龍生, 脳の病態病理, 若さの栄養学雑誌, 査読有, 147 巻, 2011, 2-9
- ③ Itoh T, Imano M, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito A, Satou T, Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury, *J Neural Transm*, 査読有, 118 巻, 2011, 193-202
- ④ Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Imano M, Hashimoto S, Ito H, Edaravone protects against apoptotic neuronal cell death and improves cerebral dysfunction after traumatic brain injury in rats, *Neurochem Res*, 査読有, 35 巻, 2010, 348-355
- ⑤ Itoh T, Satou T, Takemori K, Hashimoto S, Ito H, Neural stem cells and new neurons in the cerebral cortex of stroke-prone spontaneously hypertensive rats after stroke, *J Mol, Neurosci*, 査読有, 41 巻, 2010, 55-65
- ⑥ Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito H, The novel free radical scavenger, edaravone, increases neural stem cell number around the area of damage following rat traumatic brain injury, *Neurotox Res*, 査読有, 16 巻, 2009, 378-389
- ⑦ Chiba T, Itoh T, Tabuchi M, Satou T, Ezaki O, Dietary protein, but not carbohydrate, is a primary determinant of the onset of stroke in hypertensive rats, *Stroke*, 査読有, 2009, 2828-2835

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 伊藤龍生, 脳の病態病理, 第 40 回栄養学連続講義, 2010 年 7 月 24 日発表 大阪市
- ② 伊藤龍生, 橋本重夫, 佐藤隆夫, ラット脳外傷後の Edaravone 投与における神経幹細胞の出現に関する研究, 第 53 回神経化学学会大会, 2010 年 9 月 4 日発表 神戸市
- ③ 佐藤隆夫, 伊藤龍生, 橋本重夫, 伊藤浩行, 実験的脳外傷モデルにおける損傷局所での未熟神経細胞出現に関する検討, 第 50 回日本神経病理学会総会, 2009 年 6 月 5 日発表 高松市
- ④ 伊藤龍生, 佐藤隆夫, 竹森久美子, 伊藤浩行, 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) 大脳における脳卒中発症後の神経再生に関する検討, 第 45 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2009 年 9 月 4 日発表 東京都千代田区
- ⑤ 佐藤隆夫, 伊藤龍生, 橋本重夫, 伊藤浩行, 脳外傷局所への SDF1a と CXCR4 アンタゴニスト投与による局所反応の変化に関する免疫組織学的検討, 第 98 回日本病理学会総会, 2009 年 5 月 1 日 京都市

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.kindai.ac.jp/patho/gyouseki2009.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 龍生 (ITOHI TATSUKI)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：40330245

(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：70162443

(3) 連携研究者

()

研究者番号：