

平成 27 年度学位申請論文

線条体出血モデルラットに対するトレッドミル運動の  
運動機能回復促進効果ならびに作用機序の検討

名古屋大学大学院医学系研究科  
リハビリテーション療法学専攻  
(指導教員：石田 和人 准教授)

高松 泰行

## 目次

1. 緒言.....	2
2. 方法	
2.1. 実験動物.....	3
2.2. 実験プロトコール.....	3
2.3. 線条体出血モデル.....	3
2.4. トレッドミル走.....	3
2.5. 運動機能評価	
2.5.1. Motor deficit score.....	4
2.5.2. Beam-walking test.....	4
2.5.3. Cylinder test.....	4
2.6. 組織学および生化学的解析	
2.6.1. 神経細胞樹状突起の形態学的解析 (Golgi-Cox 染色) .....	5
2.6.2. タンパク発現量の解析 (ウエスタンブロット法) .....	5
2.7. 統計解析.....	6
3. 結果	
3.1. 線条体出血モデルラット.....	6
3.2. 運動機能評価	
3.2.1. Motor deficit score.....	6
3.2.2. Beam-walking test.....	6
3.2.3. Cylinder test.....	7
3.3. 神経細胞樹状突起の形態学的変化.....	7
3.4. タンパク発現量.....	7
4. 考察.....	8
5. 結論.....	11
6. 謝辞.....	11
7. 参考文献.....	11
図表.....	16

## 1. 緒言

脳出血 (intracerebral hemorrhage : 以下、ICH) は脳血管疾患の一つであり、神経学的な機能障害を引き起こし、罹患患者の日常生活活動 (activities of daily living : 以下、ADL) や生活の質 (quality of life : 以下、QOL) に影響を及ぼす[1]。リハビリテーションは脳卒中後の運動機能回復、ADL および QOL の改善に有益である事が報告されている[2]。

ヒトや動物を用いた研究で、脳卒中後の運動機能回復には損傷部の周辺領域や対側半球における神経活動依存的な可塑的变化が関与していることが報告されており、これらには神経細胞樹状突起やシナプスなどの変化も含まれる[3-4]。ICH モデル動物を用いた研究では、運動により運動機能が改善し、脳内で神経系の可塑的变化が促進されることが示されている[5-9]。我々は、線条体出血モデルラットに対するトレッドミル運動により運動機能回復が促進し、非損傷側線条体において神経細胞樹状突起の分枝数および長さの増加といった可塑的变化が生じることを報告した[6]。他の先行研究は、ICH モデルラットに対する豊かな環境下での飼育とリーチ運動を組み合わせたりハビリテーション的アプローチにより、運動機能が回復すること、また神経細胞樹状突起の分枝数や長さが増加していることを報告している [5]。さらに、脳虚血モデルラットに対する薬剤の効果を検証した研究では、スパイン密度の減少、すなわち樹状突起の退縮が抑制され、運動機能回復を促進することを示している[10]。これらの知見は、ICH 後の運動機能回復には神経細胞樹状突起の可塑的变化が関与していることを示している。しかしながら、運動療法により引き起こされる神経細胞樹状突起の可塑的变化のメカニズムについては不明な点が多い。

脳由来性神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : 以下、BDNF) は成長促進因子の一つであり、脳虚血モデルラットの運動機能回復に関与していることが報告されている[11]。加えて、*in vitro* の実験で、BDNF の過剰発現は神経細胞樹状突起の退縮を防ぐことが報告されている。一方、Nogo-A は成長抑制因子の一つで、中枢神経系において Rho-A および Rho 関連タンパクキナーゼ (Rho-associated protein kinase : 以下、ROCK) を介したシグナル伝達により、軸索や樹状突起の成長および再生を阻害する作用を有する [13-14]。脳虚血モデルラットを用いた研究で、抗 Nogo-A 療法は運動機能回復や神経細胞の可塑的变化を促進することが報告されている[15-16]。また、成長促進因子と成長抑制因子はともに中枢神経損傷後の運動機能回復に関与することが報告されている [17]。Zhang らは、脳虚血モデルラットに対する運動が成長促進因子および成長抑制因子の両方に作用することを報告している [18]。しかし、ICH モデルラットに対する運動が運動機能や神経細胞樹状突起の可塑的变化に及ぼす影響を成長促進因子と成長抑制因子の両者に着目して検証している研究はない。

本研究は、線条体出血モデルラットに対するトレッドミルが運動機能および樹状突起の可塑的变化に及ぼす影響を、成長促進因子および成長抑制因子の両方に着目して、検証することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 実験動物

実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット (250-300 g、日本エスエルシー株式会社) を用いた。ラットは 25 度に室温に保ち、12 時間の明暗サイクル下で、自由に摂食と摂水可能なケージにて 2~3 匹ずつ飼育した。なお、動物愛護の観点より、使用匹数を必要最小限にとどめるよう配慮し、全ての処置は名古屋大学医学部保健学科動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号: 027-A-03)。

### 2.2. 実験プロトコール

実験全体のプロトコールを図 1 に示す。全てのラットに対して、事前にトレッドミル走と棒上歩行を練習させた。実験には、偽手術群 (sham 群) と脳出血群 (ICH 群) を設け、それぞれトレッドミル走を実施する運動群 (Exercise: Ex 群) と実施しない対照群 (Control: Con 群) とに無作為に振り分けた。以上より、偽手術群で運動を実施しない群 (sham+Con: SC)、偽手術群で運動を実施する群 (sham+Ex: SE)、出血群で運動を実施しない群 (ICH+Con: IC)、出血群で運動を実施する群 (ICH+Ex: IE) の計 4 群で実験を行った。Ex 群 (SE、IE) には、モデル作成 4 日後から 14 日後まで速度 9 m/min のトレッドミル走を 1 日 30 分間毎日実施した。また、モデル作成 15 日後に脳組織を採取した。

### 2.3. 線条体出血モデル

左線条体 (ブレグマ縫合より前方 0.2 mm、左外側 3.0 mm、腹側 6.0 mm) に血管基底膜を破壊する酵素であるコラゲナーゼを注入し、線条体出血モデルを作成した [19-20]。硫酸アトロピン腹腔内投与 (10 mg/kg) による副交感神経ブロック後、ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与 (45 mg/kg) 麻酔下にて、ラットを脳定位固定器に固定した。頭部の皮膚を正中切開し、ドリルを用いて頭蓋骨 (ブレグマ縫合より前方 0.2 mm、左外側 3.0 mm) に小穴を開け、ポリエチレンチューブを介してマイクロシリンジ (Hamilton 社) と連結したステンレス製カニューレ (内径 = 0.17 mm) を骨表面から 6.4 mm の深さまで挿入し、0.4 mm 引き戻した。続いて、type IV コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich 社) 0.24 U を生理食塩水 1.2  $\mu$ l に溶解し、マイクロシリンジポンプ (Eicom 社) を用いて流速 0.2  $\mu$ l/min で 6 分間かけて注入した。注入後、溶液の逆流を防ぐため、カニューレを 7 分間留置した後、1 mm 引き上げ、さらに 2 分間留置し、ゆっくりと抜いた。なお、sham 群には同様の手順で 1.2  $\mu$ l の生理食塩水を注入した。

### 2.4. トレッドミル走

モデル作成前の 3 日間、全てのラットに対してトレッドミル走のプレトレーニングとして、1 日目は速度 5 m/min で 10 分間、2 日目は速度 5 m/min で 10 分間および速度 9 m/min で 10 分間の計 20 分間、3 日目は速度 9 m/min で 30 分間トレッドミル走を実施させた。Ex 群 (SE、IE) はモデル作成 4 日後から 14 日後までの 11 日

間、速度 9 m/min、1 日 30 分間毎日トレッドミル走を実施した。なお Con 群 (SC、IC) は 1 日 30 分間、トレッドミル装置内に暴露させるも走行はさせなかった。我々は、これと同様の運動プロトコールで、ICH 後の運動機能回復を促進すること示している [6]。

## 2.5. 運動機能評価

ICH 後の運動機能の評価するために、motor deficit score、beam-walking test、cylinder test を用いた (SC: n = 11、SE: n = 11、IC: n = 14、IE: n = 14)。

### 2.5.1. Motor deficit score

Motor deficit score は粗大な運動機能の評価する方法であり、手術の 1 日、3 日、7 日、10 日、15 日後に実施した。自発回転テスト、棒上歩行テスト、前肢把握テスト、後肢引き戻しテストの 4 つで構成され、それぞれ 0 点 (正常) ~ 3 点 (重度障害) で点数化した。本研究では、Altumbabic らの報告した段階付け (0, 1, 2, 3 点) に 0.5 点という段階を設けた [21]。各テストの詳細は表 1 に示す。4 つのテストの点数を合算して、運動機能障害の程度を評価した (最大 12 点)。合計点数が 7 点以下であった動物は本研究から除外した。

### 2.5.2. Beam-walking test

Beam-walking test は、ラットに直径 1 cm、長さ 80 cm の角材上を歩行させ、麻痺側後肢の運動障害を評価する方法であり、手術の 1 日、3 日、7 日、10 日、15 日後に実施した。Beam-walking test は 1 点 (重度障害) ~ 7 点 (正常) の 7 段階で構成されている [22]。評定基準の詳細を表 2 に示す。手術前の 3 日間でプレトレーニングを行い、全てのラットが角材を正常に渡りきれた事を確認した。

### 2.5.3. Cylinder test

Cylinder test は、前肢使用の非対称性を評価する方法で、手術前日、手術の 3 日、7 日、10 日、15 日後に実施した。直径 20 cm、高さ 35 cm のプレキシガラスのシリンダー内に 5 分間ラットを放置し、ビデオ撮影した。立ち上がり、壁を触る際に、一側前肢で触れる数と両前肢で触れる数を計測した。麻痺側前肢の使用率を以下の計算式により、算出した [23]。

麻痺側前肢の使用割合 (%)

= [ (麻痺側前肢の使用数 + 1/2 両前肢の使用数) / 総使用数 ] × 100。

## 2.6. 組織学および生化学的解析

### 2.6.1. 神経細胞樹状突起の形態学的解析 (Golgi-Cox 染色)

モデル作成 15 日後、ラット (各群、n = 6) をペントバルビタールナトリウム腹腔内投与 (45 mg/kg) により深麻酔状態にした後、生理食塩水を経心的に灌流し、脱

血した。脳を摘出した後、Golgi-Cox 溶液に浸し、暗所にて 4°C で 14 日間保存した。切片作成の 2 日前に 30% スクロース溶液に置き換えた。その後、ビブラトームを用いて 200  $\mu\text{m}$  厚の冠状切片を作成し、ゼラチンコートをしたスライドガラスにのせ、後の処理で切片が剥がれないよう密着させた。続いて、暗所にて蒸留水 (1 分間)、アンモニア水 (30 分間)、蒸留水 (1 分間)、写真用現像定着液 (Fuji Fix、30 分間)、蒸留水 (1 分間)、50% エタノール (1 分間)、70% エタノール (1 分間)、95% エタノール (1 分間)、100% エタノール (5 分 $\times$ 2 回)、クロロホルム/キシレン/100% エタノール混合液 (15 分間) の順に反応させ、エンテラン (Merck 社) で封入した [24]。

Golgi-Cox 染色を施した切片を用意し、ブレグマの前方 1.7 mm から 0 mm の範囲で、大脳皮質一次運動野の第 V 層錐体細胞 (基底樹状突起のみを解析の対象とする) をそれぞれ 6 個無作為に抽出した後、顕微鏡用デジタルカメラ (Leica 社) で 4 倍の拡大像にて撮影し、コンピュータに取り込んだ。抽出した神経細胞の樹状突起の形態を Sholl analysis により解析し、樹状突起の分枝数と長さを求めた [25, 26]。Sholl analysis は神経細胞体を中心に 20  $\mu\text{m}$  間隔の同心円を描き、各円と交差する樹状突起の分枝数を計測する方法であり、本研究では神経細胞体から 200  $\mu\text{m}$  までを解析した (図 2)。

### 2.6.2. タンパク発現量の解析 (ウエスタンブロット法)

モデル作成 15 日後、ラット (各群、 $n = 5$ ) をペントバルビタールナトリウム腹腔内投与 (45 mg/kg) により深麻酔状態にした後、PBS を経心的に灌流し、脱血した。脳を素早く取り出し、氷上で両半球の大脳皮質 (ブレグマ縫合から前方 3.0 mm、正中から外側 3.0 mm) を切り分けた。TNE lysis buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、2 mM EDTA、0.2% Triton X-100、0.2% NP40) と protease inhibitor (complete protein inhibitor cocktail tablets、Roche 社) の混合液で組織をホモジネートし、30 分間遠心分離 (4°C、15000 rpm) をした後、上清を抽出した。BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific 社) を用いて抽出液中のタンパク質濃度を測定した。

抽出液の 1/4 量となる sample buffer (0.25 mM Tris-HCl、8% SDS、40% Glycerol、BPB、20% 2-mercaptoethanol) を加え、100°C で 5 分間処理した。10% 濃度の SDS ポリアクリルアミドゲルの各レーンに 20  $\mu\text{g}$  のタンパク質を含む抽出液と分子量マーカーを注ぎ、50 分間電気泳動を行った (600 V、50 mA)。その後、PVDF メンブレンに 60 分間かけて転写した (600 V、100 mA)。転写終了後、TBST で 10 分間すすぎ、5% スキムミルクを含む TBST 溶液に室温で 1 時間インキュベートし、ブロッキングを行った。引き続き、一次抗体としてウサギ由来抗 Nogo-A 抗体 (1:1000、Santa Cruz 社)、ウサギ由来抗 ROCK2 抗体 (1:500、Santa Cruz 社)、ウサギ由来抗 tropomyosin-related kinase B (以下、TrkB) 抗体 (1:500、Santa Cruz 社)、ウサギ由来抗 BDNF 抗体 (1:200、Santa Cruz 社)、ウサギ由来抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:2000、MBL 社) を 4°C にて一晩反応させた。TBST で十分に洗浄した後、二次抗体として

HRP 標識ウサギ IgG 抗体 (1:1000、Cell signaling technology 社) に室温で 2 時間反応させた。発色は ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare 社) を用いて化学発光させ、X 線フィルムに感光し、各標的タンパク質のバンドを検出した。検出したバンドをコンピュータに取り込み、画像解析ソフトウェア (CS Analyzer、ATTO 株式会社) によりバンドの濃度を計測した。 $\beta$ -actin を内因性コントロールとして各サンプルの値タンパク発現量を  $\beta$ -actin の値で標準化した。

## 2.7. 統計解析

統計学的解析には SPSS ver. 22.0 を用いた。間隔尺度のデータ (motor deficit score、beam-walking test) は中央値 [四分位範囲] で示した。順序尺度のデータ (cylinder test、樹状突起の分枝数と長さ、スパインの密度、タンパク発現量) は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。各運動機能評価の時間経過に伴う変化の解析には、two-way repeated measures ANOVA、post hoc test として Scheffe's test を用いた。各時点における運動機能評価、樹状突起の分枝数と長さ、スパインの密度、タンパク発現量の解析には、one-way ANOVA、post hoc test として Tukey's test を用いた。有意水準は 5% とした。

## 3. 結果

### 3.1. 線条体出血モデルラット

本実験における ICH 後の死亡率は 3.8% であり、ほとんどの ICH モデルラットは実験を完遂できた。さらに、ICH 後に死亡しなかった全てのラットは motor deficit score の点数が 8 点以上で中等度から重度の機能障害を呈しており、取り込み基準を満たしていた。

### 3.2. 運動機能評価

#### 3.2.1. Motor deficit score

Motor deficit score は自発回転テスト、棒上歩行テスト、前肢把握テスト、後肢引き戻しテストの 4 つの項目で構成される。各項目に関して、IC と IE は SC と SE に比べて有意に点数が高値であり、機能障害が重度である事が示されたが、IC と IE の間には有意な差は認められなかった。Motor deficit score の合計点数において、手術の翌日から 15 日後まで IC と IE は SC と SE に比べて有意に点数が高値であり、機能障害が重度である事が示された ( $F(9.384, 143.892) = 123.945, p < 0.01$ 、図 3-A)。15 日後において、IE が IC に比べて有意に運動機能が回復している事が示された (IC: 4.75 [4.50-5.50]、IE: 3.00 [3.000-4.625]、 $F(3, 46) = 102.647, p < 0.05$ 、図 3-A)。

#### 3.2.2. Beam-walking test

手術の翌日から 15 日後まで IC と IE は SC と SE に比べて、有意に麻痺側後肢の機能障害が重度である事が示された ( $F(12, 184) = 4.774, p < 0.01$ 、図 3-B)。手術 10 日後 (IC: 2.00 [2.00-2.00]、IE: 4.50 [2.00-6.00]、 $F(3, 46) = 35.333, p < 0.01$ )

と 15 日後 (IC: 3.00 [2.00-4.25], IE: 6.00 [4.00-6.75],  $F(3, 46) = 26.550, p < 0.01$ ) において、IE は IC に比べて有意な機能回復を示した (図 3-B)。

### 3. 2. 3. Cylinder test

手術の 3 日後から 15 日後まで IC と IE は SC と SE に比べて、麻痺側前肢の使用率が有意に低値であった ( $F(12, 184) = 11.426, p < 0.01$ )。しかし、どの時点においても IE と IC の間に有意差は認められなかった (図 3-C)。

### 3. 3. 神経細胞樹状突起の形態学的変化

Golgi-Cox 染色により検出された大脳皮質運動野における錐体細胞を観察した結果、IC は SC と SE に比べて、樹状突起の分枝が少なく、長さが短かった。一方で、IE では、樹状突起の分枝や長さが SC や SE と同程度に保たれていた (図 4)。

損傷半球の大脳皮質運動野において、神経細胞体からの距離が 60  $\mu\text{m}$  (SC:  $9.2 \pm 1.23$ , SE:  $9.6 \pm 0.81$ , IC:  $5.9 \pm 0.44$ , IE:  $7.8 \pm 0.67$ ,  $F(3, 20) = 4.067, p < 0.05$ )、80  $\mu\text{m}$  (SC:  $8.2 \pm 1.24$ , SE:  $8.4 \pm 0.79$ , IC:  $3.0 \pm 0.44$ , IE:  $5.8 \pm 0.91$ ,  $F(3, 20) = 8.035, p < 0.01$ )、100  $\mu\text{m}$  (SC:  $6.5 \pm 1.23$ , SE:  $6.4 \pm 0.91$ , IC:  $1.9 \pm 0.45$ , IE:  $4.2 \pm 0.70$ ,  $F(3, 20) = 6.391, p < 0.01$ )、120  $\mu\text{m}$  (SC:  $4.6 \pm 1.10$ , SE:  $5.1 \pm 0.95$ , IC:  $1.0 \pm 0.27$ , IE:  $2.8 \pm 0.63$ ,  $F(3, 20) = 5.425, p < 0.01$ )、140  $\mu\text{m}$  (SC:  $3.2 \pm 0.62$ , SE:  $3.0 \pm 0.60$ , IC:  $0.8 \pm 0.22$ , IE:  $1.9 \pm 0.43$ ,  $F(3, 20) = 5.128, p < 0.01$ ) の地点において、IC は SC と SE に比べて、樹状突起の分枝数が有意に少なかった (図 5-A)。一方で、どの地点においても IE と他群との間に有意差は認められなかった。非損傷半球の大脳皮質において、神経細胞体からの距離が 140  $\mu\text{m}$  (SC:  $3.2 \pm 0.62$ , SE:  $3.2 \pm 0.69$ , IC:  $1.0 \pm 0.25$ , IE:  $2.0 \pm 0.47$ ,  $F(3, 20) = 3.891, p < 0.05$ )、160  $\mu\text{m}$  (SC:  $1.6 \pm 0.31$ , SE:  $1.9 \pm 0.31$ , IC:  $0.4 \pm 0.13$ , IE:  $1.0 \pm 0.28$ ,  $F(3, 20) = 8.035, p < 0.05$ ) の地点において、IC は SC と SE に比べて、樹状突起の分枝数が有意に少なかった (図 5-B)。一方で、どの地点においても IE と他群との間に有意差は認められなかった。

樹状突起の長さに関して、損傷半球の大脳皮質運動野において、IC は SC と SE に比べて有意に長さが短かった (SC:  $1051 \pm 105 \mu\text{m}$ , SE:  $1049 \pm 102 \mu\text{m}$ , IC:  $542 \pm 102 \mu\text{m}$ , IE:  $801 \pm 183 \mu\text{m}$ ,  $F(3, 20) = 8.164, p < 0.01$ , 図 6-A)。一方で、IE と他群の間には有意差は認められなかった。非損傷半球の大脳皮質運動野において、全ての群間に有意差は認められなかった (SC:  $1006 \pm 134 \mu\text{m}$ , SE:  $1019 \pm 102 \mu\text{m}$ , IC:  $726 \pm 36 \mu\text{m}$ , IE:  $834 \pm 53 \mu\text{m}$ ,  $F(3, 20) = 2.467, p > 0.05$ , 図 6-B)。

### 3. 4. タンパク発現量

各タンパク質の発現量は  $\beta$ -actin の発現量で標準化し、SC に対する割合で示した。損傷半球の大脳皮質運動野において、IC の TrkB 発現量が SE と IE に比べて有意に低値であった (SE: 1.35 倍/SC, IC: 0.75 倍/SC, IE: 1.30 倍/SC,  $F(3, 16) = 4.303, p < 0.05$ )。他のタンパク発現量に関しては、両半球においても群間に有意差は認められなかった (図 7)。

#### 4. 考察

本研究は線条体出血ラットに対するトレッドミル運動が運動機能回復と大脳皮質運動野における神経細胞樹状突起の形態学的変化に及ぼす影響を、成長促進因子および成長抑制因子に着目して検証した。その結果、線条体出血後のトレッドミル運動は運動機能回復を促進し、損傷側の大脳皮質運動野において神経細胞樹状突起の退縮を抑制することが示された。さらに、同領域において、成長抑制因子の発現に変化はなかったが、成長促進因子である **TrkB** の発現が高まることが示された。線条体出血後のトレッドミル運動は **TrkB** の発現増加を伴う神経細胞樹状突起の退縮抑制を有するという本研究の知見は、我々が知る限りこれまでに報告されていない。

#### 線条体出血後のトレッドミル運動が運動機能に及ぼす影響について

本研究では、3つの運動機能評価を用いて、ICH モデルラットの運動機能障害の程度を評価した。ICH 直後から2週間で運動機能の自然回復が認められたが、全ての運動機能評価において ICH モデルラットは著明な運動機能障害を認めた。ゆえに、これらの運動機能評価は ICH 後2週間の運動機能障害を検出する方法として有益であったと考えられる。本研究では、**motor deficit score** と **beam walking test** において、トレッドミル運動により ICH 後の運動機能回復が促進することが示された。我々は同じ運動プロトコールにより ICH 後の **motor deficit score** が減少し、粗大な運動機能が改善することを報告している[6]。しかし、本研究では **motor deficit score** に加えて、**beam walking test** の点数が増加しており、麻痺側後肢の運動機能が改善したことを示した。**Beam walking test** はラットが角材上を歩行する動作を観察する評価法であるが、このタスクは麻痺側後肢の機能のみならず、角材上を歩行する際の協調性やバランス能力が必要とされる [22, 27]。トレッドミル運動中の繰り返しのステップ運動により、協調性やバランス能力が改善したことにより、角材から麻痺側後肢が滑り落ちる数が減少し、結果として **beam walking test** の点数の増加に繋がったかもしれない。一方で、**cylinder test** による麻痺側前肢の使用率については、トレッドミル運動による効果は認められなかった。トレッドミル運動は両前肢の運動であり、ラットにとっては片側前肢に対する課題志向型運動ではない。そのため、前肢使用率の非対称性を評価する **cylinder test** では前肢の改善を示す事ができなかった可能性も考えられる。

#### 線条体出血後のトレッドミル運動が神経細胞樹状突起の形態学的変化に及ぼす影響について

本研究では、ICH モデルラットは **sham** 群と比較して、大脳皮質運動野の神経細胞樹状突起の分枝数や長さが減少すること、すなわち神経細胞樹状突起の退縮が観察された。神経細胞樹状突起の退縮については、高齢モデル [28-29]、アルツハイマー病モデル [30]、脳虚血モデル [10]などで報告されているが、ICH モデルでは報告されていない。本研究は ICH 後に大脳皮質運動野で神経細胞樹状突起の退縮が生じていることを示した初めての報告である。さらに、我々はトレッドミル運動により、損

傷側の大脳皮質運動野において、ICH 後の神経細胞樹状突起の退縮が抑制されることを示した。我々と同じ ICH モデルラットを用いた先行研究は、豊かな環境下での飼育とリーチ運動を組み合わせたリハビリテーション的アプローチにより、線条体や大脳皮質の神経細胞樹状突起の分枝数および長さが増加し、運動機能回復が生じることを報告している [5]。本研究結果は、運動が大脳皮質の神経細胞樹状突起の分枝数および長さに影響を与えたという点で先行研究と一致している。しかし、この先行研究では、sham 群を設けていないため、ICH 群と sham 群の比較はできていない。よって、本研究は ICH 後のトレッドミル運動により神経細胞樹状突起の退縮を抑制することを示した初めての報告である。神経細胞樹状突起の形態学的変化は脳損傷後 14 日から 18 日でピークに達すると報告されている [3]。本研究では、神経細胞樹状突起の変化がより生じやすい期間である ICH 後 4 日から 14 日目までトレッドミルを実施したことが、ICH 後の神経細胞樹状突起の変化に対して有益に作用したのかもしれない。脳損傷モデル動物の運動機能回復には神経細胞樹状突起の複雑さが関与しているとの報告されている [26, 31]。本研究では、ICH 後のトレッドミル運動により神経細胞樹状突起の退縮が抑制され、その複雑さが保たれたことが運動機能回復の促進に関与したかもしれない。

### 線条体出血後のトレッドミル運動が成長促進因子 (BDNF、TrkB) および成長抑制因子 (Nogo-A、ROCK2) に及ぼす影響について

本研究において、ICH 後のトレッドミル運動により、損傷半球の大脳皮質運動野における TrkB 発現量が有意に増加した。ICH モデルマウスを用いた先行研究で、ICH 後のトレッドミル運動が BDNF および TrkB の発現を活性化させることが報告されている [32]。また、BDNF や TrkB は神経細胞樹状突起やスパインの形態学的変化および維持に関わっていることが報告されている [33]。したがって、本研究において、トレッドミル運動により誘発された TrkB の発現増加は神経細胞樹状突起の形態維持をもたらし、ICH 後に生じる神経細胞樹状突起の退縮に対する抑制作用を示したのではないかと考えられる。しかし、本研究では、BDNF の発現量の変化は認められなかった。脳損傷モデル動物を用いた先行研究では、トレッドミル運動により大脳皮質で BDNF の発現量が増加すると報告されているが、我々が速度 9 m/min と設定したのに対して速度 15 m/min と、より強い運動強度で実施していた [32]。したがって、運動強度の違いが、BDNF の発現量について先行研究と異なる結果となった可能性が考えられる。他の先行研究では、ICH 後のリーチ運動により、海馬の BDNF 発現量が増加したと報告している [34]。トレッドミル運動とリーチ運動というタイプの違いが、BDNF 発現量の変化に重要な因子の一つであると考えられる。しかし、BDNF 発現量を解析している脳領域が、この先行研究では海馬であるのに対して、我々は脳皮質運動野を解析しているという違いがある。したがって、解析した脳領域の違いが、BDNF 発現量について先行研究と異なる結果となった可能性も考えられる。Neurotrophin 4 (以下、NT-4) は BDNF と同じく TrkB を受容体とする神経栄養因子の一つであり、脳虚血後のトレッドミル運動により NT-4 の発現量が

増加することが報告されている [35-36]。本研究では BDNF 発現量の有意な増加は示さなかったが、ICH 後 4 日から 14 日までのトレッドミル運動が BDNF のみならず NT-4 の発現も増加させたことにより、両者共通の受容体である TrkB の発現をもたらしたのかもしれない。今後、ICH モデルラットに対するトレッドミル運動が NT-4 に及ぼす影響について、解析をしていく必要がある。

一方で、本研究では、線条体出血後のトレッドミル運動は成長抑制因子である Nogo-A、ROCK2 に影響しないことが示された。Nogo-A は成長抑制因子の一つで、中枢神経系において Rho-A、ROCK を介したシグナル伝達により、軸索や樹状突起の成長および再生を阻害する作用を有することが報告されている [13-14]。脳虚血モデルラットを用いた先行研究で、トレッドミル運動やリーチ運動により、Nogo-A や ROCK2 の発現量が抑制されることが報告されている [18, 37]。これらの研究では、運動実施期間が 3 週間から 4 週間、組織採取を行う時期が脳虚血後 1 か月から 3 か月と長期間の実験を行っている。したがって、脳卒中のタイプ（虚血モデルと出血モデル）、運動期間、組織採取時期の違いにより、Nogo-A、ROCK2 について先行研究と異なる結果となったのかもしれない。他の先行研究で、成長抑制因子は脳虚血の数週間後に発現が上昇すると報告されている [17]。今後、ICH 後の成長抑制因子の発現動態について、より長期的なタイムコースで解析していく必要があると考えられる。

## 本研究の限界

本研究にはいくつかの限界点がある。1つ目は、トレッドミル運動が運動機能、神経細胞樹状突起の形態学的変化、TrkB の発現に対して有益であることを示すことができたが、それぞれの関連性にまでは言及できていない点である。今後、TrkB 拮抗薬を用いた実験系により、TrkB の作用を抑制した場合に、本研究でみられた線条体出血後のトレッドミル運動による運動機能回復促進効果や神経細胞樹状突起の退縮抑制作用が阻害されるのか否かを解析する必要がある。2つ目は、線条体出血後に直接損傷を受けた部位の異なる大脳皮質運動野において神経細胞樹状突起の退縮が生じた作用機序について、本研究では十分な説明が出来ていないことが挙げられる。先行研究で、Trk を介した cyclic adenosine monophosphate (cAMP)、cAMP-dependent protein kinase A (PKA) の活性化は、中枢神経系の成長抑制に拮抗する作用を有することが報告されている [13]。本研究では、線条体出血モデルラット TrkB の発現量が低値であり、神経細胞樹状突起の細胞骨格の維持作用が低下したことにより、樹状突起の退縮が引き起こされ可能性が考えられる。しかし、TrkB の下流には先に述べたような細胞内カスケードが存在しており、TrkB が低値であったことのみでは神経細胞樹状突起の退縮の作用機序について十分な説明が出来ていないと考えられる。今後、TrkB の発現増加が神経細胞樹状突起の退縮の作用機序を明らかにするためには、cAMP や PKA など TrkB の下流に存在する因子も加えた解析を進める必要があると考えられる。最後に、本研究では成長抑制因子として Nogo-A しか解析していない点が挙げられる。中枢神経系において、Nogo-A のみならず、Myelin-associated glycoprotein や oligodendrocyte-myelin glycoprotein も Rho-A/ROCK を介したシグ

ナル伝達により、軸索や神経細胞樹状突起の可塑的变化に対して抑制性の調整因子として働くことが報告されている[13]。加えて、chondroitin sulfate proteoglycan, ephrin A5, semaphorin 3A、neuropilin 1なども成長抑制や軸索伸長の制御に関与している成長抑制因子として知られている [17]。細胞骨格制御に抑制性の作用を有するこれらの因子が、本研究でみられた神経細胞樹状突起の形態学的変化に関与した可能性は否定出来ない。ゆえに、ICH 後の神経細胞樹状突起の退縮が生じた作用機序を解明するために、さらなる研究が必要であると考えられる。

## 本研究の成果と課題

本研究の新奇性は、線条体出血後に出血により直接損傷を受けた線条体とは離れた部位である大脳皮質運動野において神経細胞樹状突起の退縮が認められたが、トレッドミル運動により、TrkB の発現増加を伴って、神経細胞樹状突起の退縮が抑制されたことである。これらの知見は、線条体出血後の運動療法が脳組織に及ぼす保護作用およびその作用機序を示していると考えられる。今後、より最適な脳卒中後の運動療法を確立するために、詳細な作用機序の解明を進める必要がある。

## 5. 結論

本研究では、線条体出血後のトレッドミル運動が運動機能、神経可塑性、関連タンパク質に及ぼす影響を解析した。その結果、線条体出血後のトレッドミル運動が、(1) 運動機能回復を促進すること、(2) 神経細胞樹状突起の退縮を抑制すること、(3) TrkB発現量を増加させることを示した。本研究結果より、線条体出血後のトレッドミル運動は運動機能回復を促進させたが、それにはTrkBの発現増加による神経細胞樹状突起の退縮を抑制する作用が関与した可能性が示唆された。

## 6. 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご指導して頂いた石田和人准教授、および研究に協力して頂いた研究室の皆様に深く感謝申し上げます。

## 7. 参考文献

1. Morgenstern LB, Hemphill JC, Anderson C, Becker K, Broderick JP, Connolly ES, et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2010; 41: 2108-29.

2. Kwakkel G, Veerbeek JM, van Wegen EE, Wolf SL. Constraint-induced movement therapy after stroke. *Lancet Neurol* 2015; 14: 224-34.
3. Jones TA, Bury SD, Adkins-Muir DL, Luke LM, Allred RP, et al. Importance of behavioral manipulations and measures in rat models of brain damage and brain repair. *ILARJ* 2003; 44: 144-52.
4. Cramer SC: Repairing the human brain after stroke: Mechanisms of spontaneous recovery. *Ann Neurol* 2008; 63: 272-87.
5. Auriat AM, Wowk S, Colbourne F. Rehabilitation after intracerebral hemorrhage in rats improves recovery with enhanced dendritic complexity but no effect on cell proliferation. *Behav Brain Res* 2010; 214: 42-7.
6. Takamatsu Y, Ishida A, Hamakawa M, Tamakoshi K, Jung CG, Ishida, K. Treadmill running improves motor function and alters dendritic morphology in the striatum after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res* 2010; 1355: 165-73.
7. Ishida A, Tamakoshi K, Hamakawa M, Shimada H, Nakashima H, Masuda T, et al. Early onset of forced impaired forelimb use causes recovery of forelimb skilled motor function but no effect on gross sensory-motor function after capsular hemorrhage in rats. *Behav Brain Res* 2011; 225: 126-34.
8. Tamakoshi K, Ishida A, Takamatsu Y, Hamakawa M, Nakashima H, Shimada H, et al. Motor skills training promotes motor functional recovery and induces synaptogenesis in the motor cortex and striatum after intracerebral hemorrhage in rats. *Behav Brain Res* 2014; 260: 34-43.
9. Ishida A, Misumi A, Ueda Y, Shimizu Y, Jung CG, Tamakoshi K, et al. Early constraint-induced movement therapy promotes functional recovery and neuronal plasticity in a subcortical hemorrhage model rat. *Behav Brain Res* 2015; 284: 158-66.
10. Chen HY, Hung YC, Chen TY, Huang SY, Wang YH, Lee WT et al. Melatonin improves presynaptic protein, SNAP-25, expression and dendritic spine density and enhances functional and electrophysiological recovery following transient focal cerebral ischemia in rats. *J Pineal Res* 2009; 47: 260-70.
11. Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Doré JJ, Corbett D., 2009. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke* 2009; 40: 1490-5.

12. Larimore JL, Chapleau CA, Kudo S, Theibert A, Percy AK, Pozzo-Miller L. Bdnf overexpression in hippocampal neurons prevents dendritic atrophy caused by Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis* 2009; 34: 199-211.
13. Chaudhry N, Filbin MT. Myelin-associated inhibitory signaling and strategies to overcome inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27: 1096-107.
14. Pernet V, Schwab ME. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell Tissue Res* 2012; 349: 97-104.
15. Papadopoulos CM, Tsai SY, Cheatwood JL, Bollnow MR, Kolb BE, Schwab ME, et al. Dendritic plasticity in the adult rat following middle cerebral artery occlusion and Nogo-a neutralization. *Cereb Cortex* 2006; 16: 529-36.
16. Lindau NT, Bänninger BJ, Gullo M, Good NA, Bachmann LC, Starkey ML, et al. Rewiring of the corticospinal tract in the adult rat after unilateral stroke and anti-Nogo-A therapy. *Brain* 2014; 137: 739-56.
17. Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 861-72.
18. Zhang QW, Deng XX, Sun X, Xu JX, Sun FY. Exercise promotes axon regeneration of newborn striatonigral and corticonigral projection neurons in rats after ischemic stroke. *PLoS One* 2013; 8: e80139.
19. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 1990; 21: 801-7.
20. Del Bigio MR, Yan HJ, Buist R, Peeling J. Experimental intracerebral hemorrhage in rats. Magnetic resonance imaging and histopathological correlates. *Stroke* 1996; 27: 2312-20.
21. Altumbabic M, Peeling, Del Bigio M. Intracerebral hemorrhage in the rat: effects of hematoma aspiration. *Stroke* 1998; 29: 1917-23.
22. Goldstein LB, Davis JN. Beam-walking in rats: studies towards developing an animal model of functional recovery after brain injury. *J Neurosci Methods* 1990; 31: 101-7.
23. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2000; 39: 777-87.

24. Gibb R, Kolb B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods* 1998; 79: 1-4.
25. Sholl DA. The measurable parameters of the cerebral cortex and their significance in its organization. *Prog Neurobiol* 1956; 2: 324-33.
26. Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci* 2001; 21: 5272-80.
27. Soblosky JS, Matthews MA, Davidson JF, Tabor SL, Carey ME. Traumatic brain injury of the forelimb and hindlimb sensorimotor areas in the rat: physiological, histological and behavioral correlates. *Behav Brain Res* 1996; 79: 79-92.
28. Dering MA, Santer RM, Watson AH. Age-related changes in the morphology of preganglionic neurons projecting to the paracervical ganglion of nulliparous and multiparous rats. *Brain Res* 1998; 780: 245-52.
29. Moolman DL, Vitolo OV, Vonsattel JP, Shelanski ML. Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol* 2004; 33: 377-87.
30. Grill JD, Riddle DR. Age-related and laminar-specific dendritic changes in the medial frontal cortex of the rat. *Brain Res* 2002; 937: 8-21.
31. Johansson BB. Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture. *Stroke* 2000; 31: 223-30.
32. Chen J, Qin J, Su Q, Liu Z, Yang J. Treadmill rehabilitation treatment enhanced BDNF-TrkB but not NGF-TrkA signaling in a mouse intracerebral hemorrhage model. *Neurosci Lett* 2012; 529: 28-32.
33. Horch HW, Krüttgen A, Portbury SD, Katz LC. Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron* 1999; 23: 353-64.
34. Kim MH, Lee SM, Koo HM. Ipsilateral and contralateral skilled reach training contributes to the motor function and brain recovery after left haemorrhagic stroke of rats. *Brain Inj* 2012; 26: 1127-35.
35. Chung JY, Kim MW, Bang MS, Kim M. Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise. *PLoS One* 2013; 8: e52461.

36. Lan X, Zhang M, Yang W, Zheng Z, Wu Y, Zeng Q, et al. Effect of treadmill exercise on 5-HT, 5-HT1A receptor and brain derived neurotrophic factor in rats after permanent middle cerebral artery occlusion. *Neurol Sci* 2014; 35: 761-6.
37. Zhao S, Zhao M, Xiao T, Jolkkonen J, Zhao C. Constraint-induced movement therapy overcomes the intrinsic axonal growth-inhibitory signals in stroke rats. *Stroke* 2013; 44: 1698-1705.

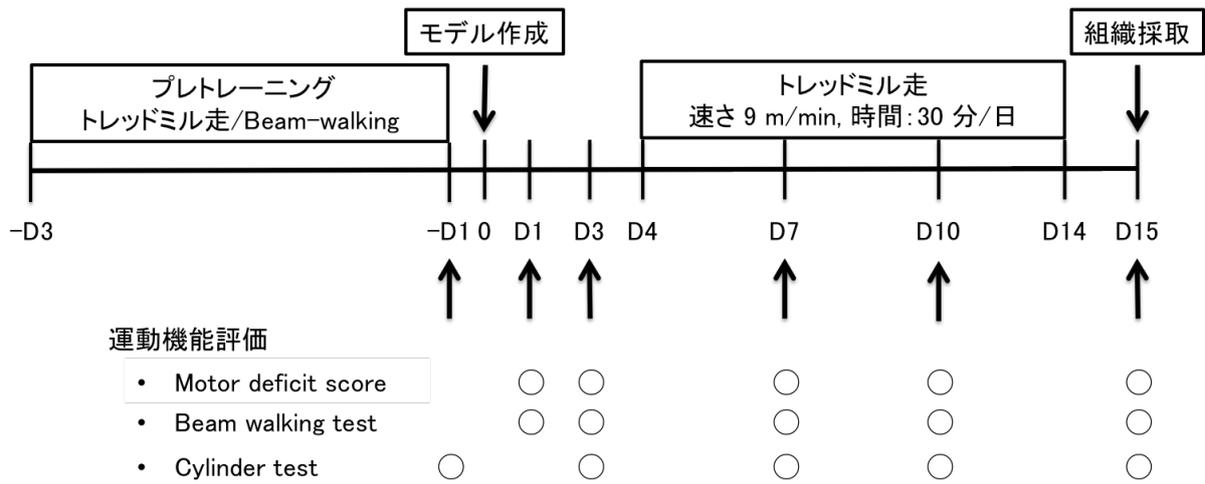


図 1. 実験プロトコール

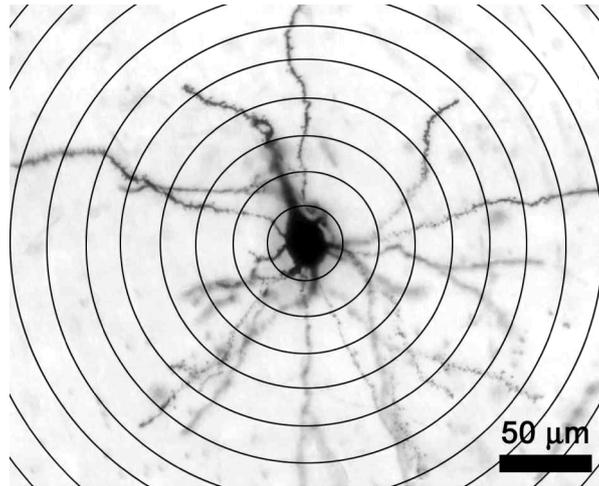
モデル作成の3日前よりトレッドミル走、beam-walkingのプレトレーニングを実施した。トレッドミル走はモデル作成の4日後から14日後まで速さ9 m/min、一日30分間毎日実施した。組織採取はモデル作成の15日後に実施した。運動機能評価を実施するタイミングを矢印と白抜き丸で示す。

表 1. Motor deficit score の評価項目および評定基準

点数	自発回転	棒上歩行	前肢把握	後肢引き戻し
0	左右対称に動く	棒上を正常に歩く	左右同時に、全手指で力強くスチールワイヤーを握る	後肢をずらした後、力強く元の位置に戻す
0.5		角材の側面をつかんで歩き、バランスが悪い	10/10回、全手指で握ることができるが、非麻痺肢より麻痺肢が遅れることや握る力が弱いことがある	20/20回、素早く元の位置に戻すことができるが、非麻痺肢より引き戻す力が弱い
1	時々出血側へ回転することがあり、出血側へ曲がりやすい	歩くことができるが、手足を踏み外す	握り方が不十分な場合や握る力が弱い場合も含め、8/10回以上握ることができる	16/20回以上、素早く元の位置に戻すことができる
2	非出血側へ向くこともあるが、主に出血側へ回転する	歩くことができない	スチールワイヤーに手を伸ばすが届かないことや触れるのみがあり、8/10未満しか握ることができない	16/20回未満しか素早く元の位置に戻すことができない
3	出血側へ回転し続ける	10秒以内に落下する	スチールワイヤーに手を伸ばして触れることが全くできない	素早く元の位置に戻すことが1回もできない

表 2. Beam-walking test の評定基準

点数	項目
1	角材上に麻痺側後肢を置く事ができない
2	角材上に麻痺側後肢を置く事はできるが、角材上を渡り切る事ができない
3	麻痺側後肢を引きずりながら角材を渡り切る事ができる
4	角材を渡り切れ、一度でも麻痺側後肢を角材の表面に乗せる事ができる
5	角材を渡り切れ、総ステップの半分以下しか麻痺側後肢を角材の表面に乗せる事ができない
6	総ステップの半分以上は麻痺側後肢を角材の表面に乗せる事ができる
7	麻痺側後肢の滑り落ちが2回以下で角材を渡り切る事ができる



## 図 2. Sholl analysis

Sholl analysis は神経細胞体を中心に  $20\ \mu\text{m}$  間隔の同心円を描き、各円と交差する神経細胞樹状突起の分枝数を計測する方法である。本研究では神経細胞体から  $20\sim 200\ \mu\text{m}$  までを解析した。

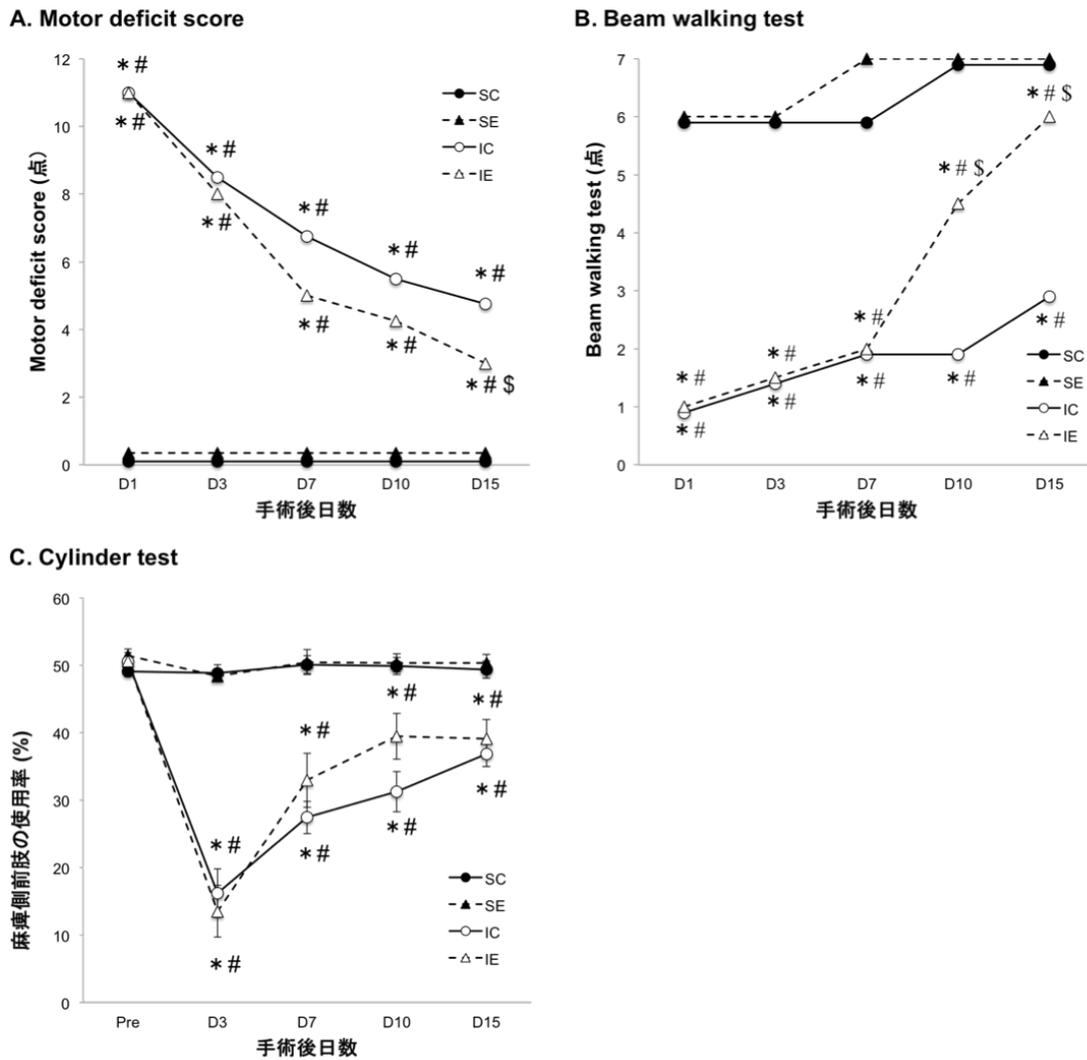


図 3. 運動機能評価

各グラフは、(A) motor deficit score、(B) beam-walking test、(C) cylinder test の結果を示している。(A) Motor deficit score : 手術後より2週間、ICH群 (IC、IE) はsham群 (SC、SE) に比べて点数が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。手術後15日目において、IEはICより点数が有意に低かった ( $p < 0.05$ )。(B) Beam-walking test : 手術後より2週間、ICH群 (IC、IE) はsham群 (SC、SE) に比べて点数が有意に低かった ( $p < 0.05$ )。手術後10日目、15日目において、IEはICより点数が有意に高かった ( $p < 0.05$ )。(C) Cylinder test : 手術後より2週間、ICH群 (IC、IE) はsham群 (SC、SE) に比べて麻痺側前肢の使用率が有意に低かった ( $p < 0.05$ )。しかし、どの時点においても、ICとIEの間には有意差は認められなかった。motor deficit scoresとbeam-walking testの点数は中央値で示し、cylinder testにおける麻痺側前肢の使用率は平均値±標準誤差で示した。\* $p < 0.05$  vs SC、#  $p < 0.05$  vs SE、\$  $p < 0.05$  vs IC。SC: sham対照群 (n = 11)、SE: sham運動群 (n = 11)、IC: ICH対照群 (n = 14)、IE: ICH運動群 (n = 14)。

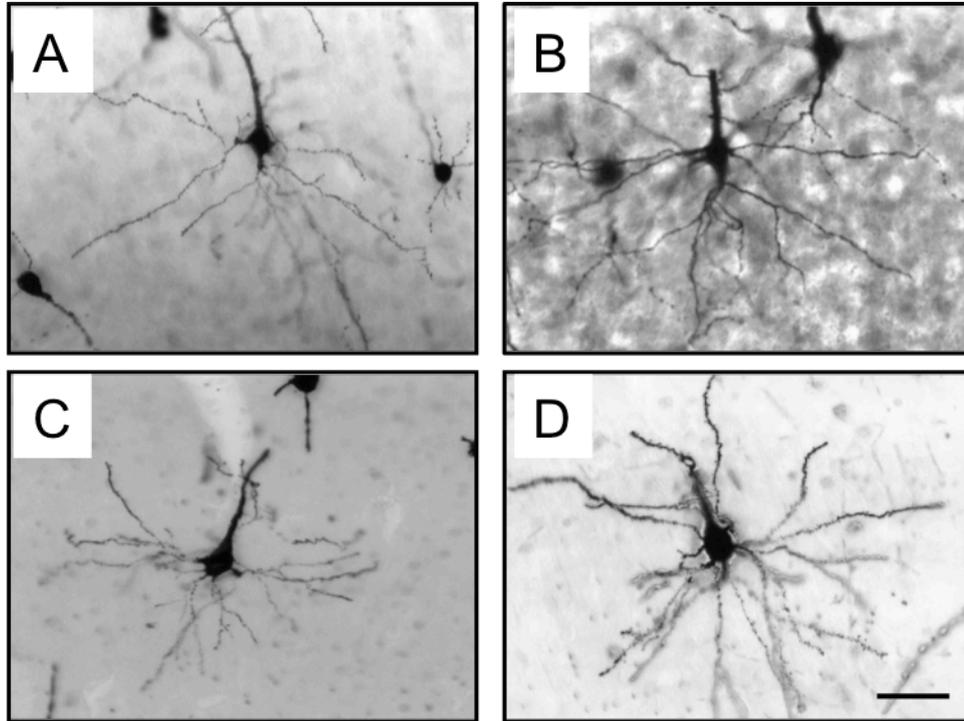
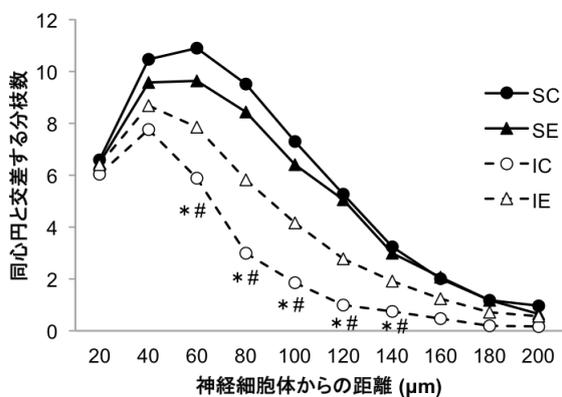


図4. 大脳皮質運動野で検出された神経細胞像（Golgi-Cox染色）

各写真は、(A) sham 対照群：SC、(B) sham 運動群：SE、(C) ICH 対照群：IC、(D) ICH 運動群：IE、の Golgi-Cox 染色により検出された代表的な神経細胞像である。IC は sham 群（SC、SE）に比べて、樹状突起の分枝数が少なく、長さが短かった。一方で、IE は樹状突起の分枝数や長さが sham 群（SC、SE）と同程度に保たれていた。スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

A. 損傷半球大脳皮質



B. 非損傷半球大脳皮質

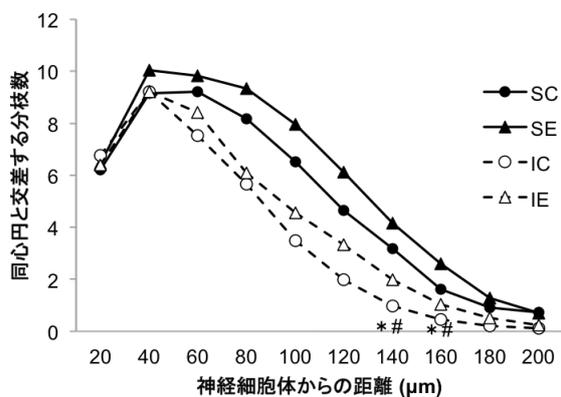
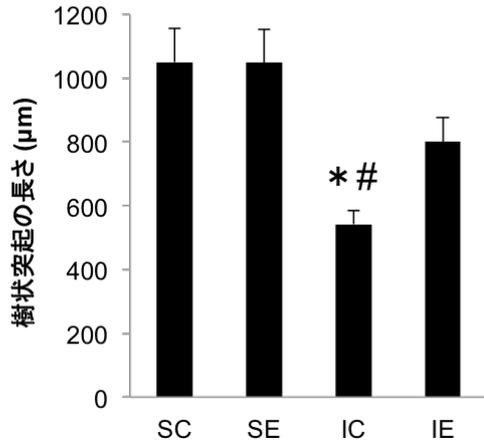


図5. 神経細胞樹状突起の形態学的解析（分枝数）

グラフは、損傷半球大脳皮質（A）および非損傷半球大脳皮質（B）における神経細胞樹状突起の分枝数をSholl analysisにより定量的に解析した結果を示している（平均値）。損傷半球大脳皮質では、神経細胞体からの距離が60、80、100、120、140 μmの地点において、ICの分枝数はsham群（SC、SE）に比べて有意に少なかった。一方で、IEの分枝数は他群と有意差は認められなかった（A）。非損傷半球では、神経細胞体からの距離が140、160 μmの地点において、ICの分枝数はsham群（SC、SE）に比べて有意に少なかった。一方で、IEの分枝数は他群と有意差は認められなかった（A）。\*  $p < 0.05$  vs SC、#  $p < 0.05$  vs SE、\$  $p < 0.05$  vs IC。各群  $n = 6$ 。

A. 損傷半球大脳皮質



B. 非損傷半球大脳皮質

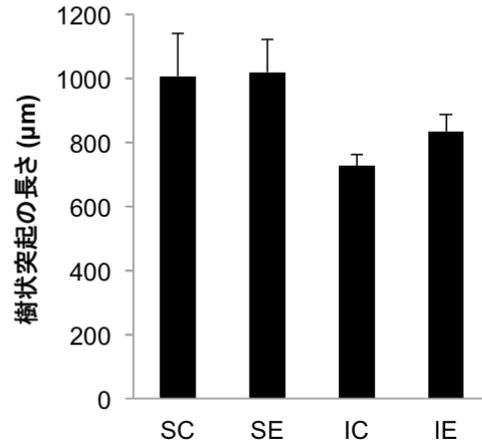
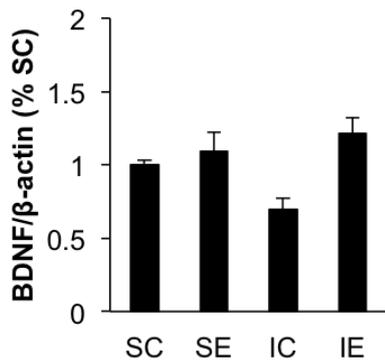
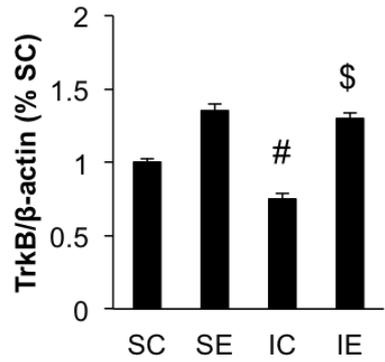
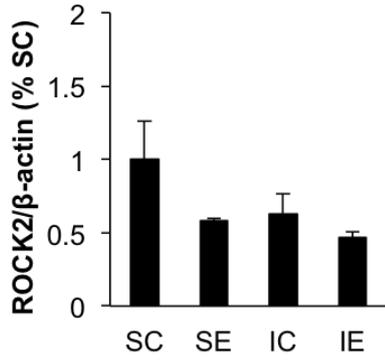
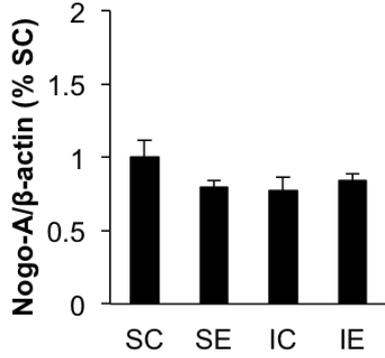
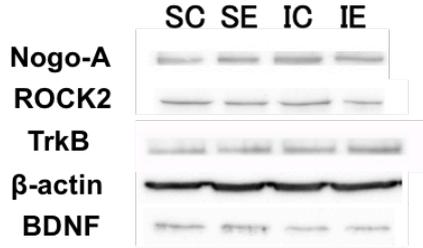


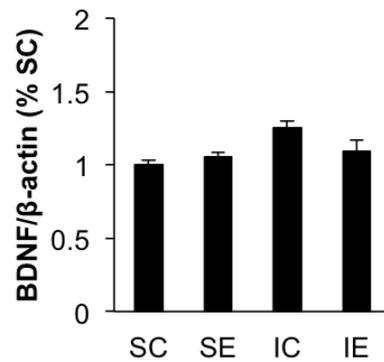
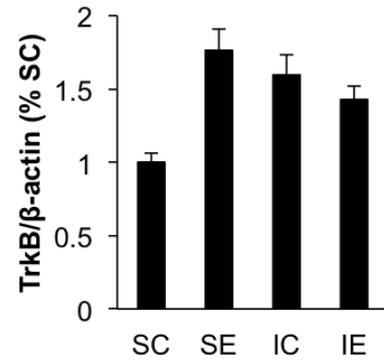
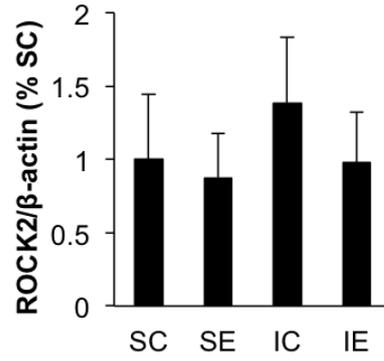
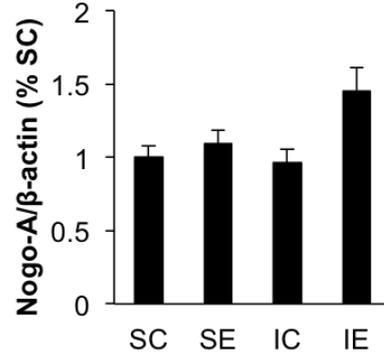
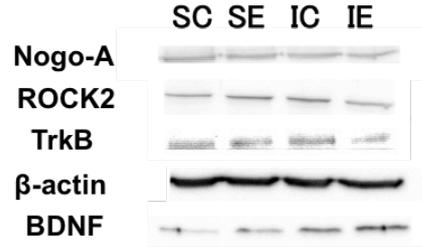
図6. 神経細胞樹状突起の形態学的解析（長さ）

グラフは、損傷半球大脳皮質（A）および非損傷半球大脳皮質（B）における神経細胞樹状突起の長さをSholl analysisにより定量的に解析した結果を示している（平均値±標準誤差）。損傷半球大脳皮質において、ICの神経細胞樹状突起の長さはsham群（SC、SE）に比べて、有意に短かった。一方で、IEと他群の間に有意差は認められなかった（A）。非損傷半球大脳皮質においては、各群の間に有意差は認められなかった（B）。\*  $p < 0.05$  vs. SC、#  $p < 0.05$  vs. SE、\$  $p < 0.05$  vs. IC。各群n = 6。

### A. 損傷半球大腦皮質



### B. 非損傷半球大腦皮質



## 図7. タンパク発現量

グラフは、損傷半球大脳皮質 (A) および非損傷半球大脳皮質 (B) における各タンパク発現量の結果を示している。各タンパク発現量は、内因性コントロールの $\beta$ -actin値で標準化し、SCの値で補正した比率を示している (平均値 $\pm$ 標準誤差)。損傷半球大脳皮質において、ICのTrkB発現量はSEに対して、有意に低値を示した。さらに、IEのTrkB発現量はICに比べて有意に高値を示した (A)。他のタンパク質においては、両半球ともに群間に有意差は認められなかった (A、B)。#  $p < 0.05$  vs. SE、\$  $p < 0.05$  vs IC。各群  $n = 5$ 。