

博士論文

脳梗塞後の機能回復機序に関する研究
(The mechanism of functional recovery after
focal cerebral ischemia)

2023年9月

立命館大学大学院生命科学研究科
生命科学専攻博士課程後期課程

山口 菜摘

立命館大学審査博士論文

脳梗塞後の機能回復機序に関する研究
(The mechanism of functional recovery after
focal cerebral ischemia)

2023年9月

September 2023

立命館大学大学院生命科学研究科
生命科学専攻博士課程後期課程

Doctoral Program in Advanced Life Sciences

Graduate School of Life Sciences

Ritsumeikan University

山口 菜摘

YAMAGUCHI Natsumi

研究指導教員：田中 秀和教授

Supervisor : Professor TANAKA Hidekazu

目次

略語	3
要旨	5
論文目録	6
第1章 序論.....	7
1.1 脳梗塞	7
1.2 神経可塑性.....	7
1.3 リハビリテーション研究と問題提起.....	9
1.4 研究目的.....	9
第2章 脳梗塞後の自発運動による機能回復と神経可塑性.....	10
2.1 実験方法.....	10
2.1.1 動物飼育.....	10
2.1.2 脳梗塞モデルマウス作製.....	11
2.1.3 リハビリテーション処置.....	11
2.1.4 行動評価.....	11
2.1.4.1 Grid walking test.....	11
2.1.4.2 Wire hang test.....	11
2.1.5 脳の大きさ測定.....	12
2.1.5.1 灌流固定.....	12
2.1.5.2 ニッスル染色.....	12
2.1.5.3 Magnetic resonance imaging.....	12
2.1.6 神経細胞数計測.....	12
2.1.7 神経細胞可視化.....	13
2.1.7.1 灌流固定.....	13
2.1.7.2 脳スライス作製.....	13
2.1.7.3 ガラス針の作製.....	13
2.1.7.4 マイクロインジェクションによるLY注入.....	14
2.1.7.5 脳スライス染色.....	14
2.1.7.6 樹状突起スパイン画像の取得並びに計測.....	14
2.1.8 脳梗塞巣周囲 c-Fos 陽性細胞数計測.....	15
2.1.9 脳梗塞巣周囲における血管の可視化及び画像の取得.....	15
2.1.10 CD31 陽性面積測定.....	15
2.1.11 統計.....	16
2.2 実験結果.....	16

2.2.1	脳梗塞後の自発運動は機能回復を促進した	16
2.2.2	脳梗塞後の運動は脳組織の大きさに影響を与えなかった	19
2.2.3	脳梗塞巣周囲の神経細胞数は運動によって変化しなかった	22
2.2.4	脳梗塞後の自発運動は脳梗塞によるスパイン数減少を緩和した	23
2.2.5	MCAO+運動群において c-Fos 陽性細胞数が増加傾向にあった	25
2.2.6	脳梗塞後の自発運動によって CD31 陽性面積が増加した	26
2.3	考察	28
第3章	脳梗塞後の自発運動によるグリア細胞への影響	31
3.1	実験方法	32
3.1.1	5-Bromo-2'-deoxyuridine 投与	32
3.1.2	免疫染色	32
3.1.3	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick 3'-end labeling (TUNEL) 評価	33
3.1.4	画像取得	33
3.1.5	Iba1 陽性面積測定	33
3.1.6	アストロサイト分画回収	33
3.1.7	マイクロアレイ	34
3.1.8	Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)	34
3.1.9	統計	35
3.2	実験結果	35
3.2.1	運動は新生アストロサイトの割合を POD15 において増加させた	35
3.2.2	運動は脳梗塞後初期のアストロサイト増殖を促進しなかった	40
3.2.3	運動は脳梗塞後のアストロサイト細胞死に影響を与えなかった	42
3.2.4	運動は脳梗塞後のアストロサイト Lcn2 発現を減少させた	44
3.3	考察	47
第4章	結論	51
	謝辞	52
	参考文献	53

略語

AP, action potential

ACSA-2, astrocyte cell surface antigen-2

ADL, activity of daily living

bAP, action potential backpropagation

BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine

C.B-17, C.B-17/Icr^{+/+}Jcl

DEG, differentially expressed gene

FBS, fetal bovine serum

FOV, field of view

GFAP, glial fibrillary acidic protein

GO, gene ontology

Gstp1, glutathione S-transferase, pi 1

Gstp2, glutathione S-transferase, pi 2

GST- π , glutathione S-transferase- π

Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1

Ig, immunoglobulin

Lcn2, lipocalin 2

LTP, long-term potentiation

LY, Lucifer Yellow CH dilithium salt

MCAO, middle cerebral artery occlusion

MRI, magnetic resonance imaging

PB, phosphate buffer

PBS, phosphate-buffered saline

PFA, 4% paraformaldehyde

POD, postoperative day

Po, posterior thalamic nucleus

S1, primary somatosensory cortex

S1FL, primary somatosensory cortex, forelimb region

S1HL, primary somatosensory cortex, hindlimb region

M2, secondary motor cortex

qPCR, quantitative polymerase chain reaction

S2, secondary somatosensory cortex

TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick 3'-end labeling

Vegfa, vascular endothelial growth factor A

VL, ventrolateral thalamic nucleus

VM, ventromedial thalamic nucleus

Vtn, vitronectin

要旨

脳梗塞などによって脳が傷害されると、運動、感覚、認知機能障害などが引き起こされる。リハビリテーションによって運動を促すとそれらの機能障害が改善するとされているが、その詳細な機序は明らかになっていない。その原因として、従来のモデル動物において作製される脳梗塞巣の再現性の低さや生存率の低さが挙げられる。本研究では、個体間で血管走行に差が小さい C.B-17/Icr-^{+/+}Jcl マウスを用いることにより極めて再現性の高い脳梗塞を誘導し、脳梗塞後の運動介入による機能回復や脳梗塞巣周囲における病態生理学的リモデリングを正確に評価することを可能とした。本モデルマウスに対して **running wheel** を設置した環境での飼育によって自発運動を促し、脳梗塞後の機能回復が促進されることを確認した。随意運動を担う大脳皮質運動野第 5 層に存在する錐体細胞に着目すると、運動を行わない群では、脳梗塞巣周囲において興奮性神経伝達情報の入力構造である樹状突起スパインの数が減少していた。自発運動を促した群では、脳梗塞巣の大きさや残存した皮質体積、脳梗塞巣周囲の神経細胞数は変化しなかったが、非脳梗塞マウス群と同程度のスパイン数が維持されていた。神経細胞形態は、周囲の環境変化に影響を受ける。グリア細胞は神経細胞周囲の環境を維持する重要な構成要素であり、脳梗塞後の運動はその表現型を変化させることが予想される。実際に、脳梗塞直後から 3 日目までに新生したアストロサイトが、脳梗塞後 15 日目の全アストロサイト中で占める割合が運動によって増加した。さらに、トランスクリプトーム解析により、運動群アストロサイトにおいて非運動群アストロサイトと比較して 10 遺伝子が発現上昇し、70 遺伝子が発現低下することが明らかになった。この遺伝子発現低下は、神経細胞形態に関わるものが **gene ontology** 解析によって示された。変動のあった遺伝子のうち、樹状突起スパイン減少作用が既に知られている **Lipocalin 2** に着目した。その結果、スパイン減少緩和がみられた大脳皮質運動野第 5 層において、**Lipocalin 2** を発現しているアストロサイトが運動によって有意に減少していた。本研究によって、脳梗塞後のリハビリテーションによる機能改善には自発運動による樹状突起スパイン減少抑制が重要であり、それにはアストロサイトの表現型変化が関わっていることが示された。

論文目録

本学位論文は下記の発表論文による。

1. Yamaguchi, N., Sawano, T., Fukumoto, K., Nakatani, J., Inoue, S., Doe, N., Yanagisawa, D., Tooyama, I., Nakagomi, T., Matsuyama, T., & Tanaka, H. (2021). Voluntary Running Exercise After Focal Cerebral Ischemia Ameliorates Dendritic Spine Loss and Promotes Functional Recovery. *Brain Research*, 1767 (January), 147542. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147542>

2. Yamaguchi, N., Sawano, T., Nakatani, J., Nakano-Doi, A., Nakagomi, T., Matsuyama, T., & Tanaka, H. (2023). Voluntary Running Exercise Modifies Astrocytic Population and Features in the Peri-Infarct Cortex. *IBRO Neuroscience Reports*, 14, 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.02.004>

第1章 序論

1.1 脳梗塞

厚生労働省「2021年人口動態統計」によると、脳血管疾患による死亡数は10万人を超え、全死因の第4位である。その大部分を占める脳梗塞は、脳の血管が詰まることで起こる。閉塞した先の血管に血液が送られず、栄養や酸素の供給が不十分になり、その血管が栄養していた領域の神経細胞が壊死に陥る。脳は領域ごとに固有の機能を有している

(Brodman, 1909)。神経細胞は再生能力に乏しいため、損傷を受けた領域に対応する機能不全は後遺症として長期に持続する。この機能障害の程度や種類は、壊死に陥った領域の大きさや場所に左右される。機能障害により、患者の多くは、食べる、歩く、書くなどの日常生活活動 (Activity of daily living: ADL) を行うために補助が必要になる。脳血管疾患は要介護原因の第2位 (16.1%) を占めており (厚生労働省ホームページ「2019年 国民生活基礎調査の概況」)、より効果的・効率的に患者の失われた機能を再建することが重要な課題であると言える。

1.2 神経可塑性

脳梗塞によって壊死に陥った領域は再生能力に乏しいが、脳梗塞巣に隣接した領域や反対側においては神経細胞に可塑性な変化が引き起こることが知られている。随意運動を担う皮質脊髄路の出発点は、大脳皮質運動野第5層に存在する錐体細胞と呼ばれる神経細胞である (Murray et al., 1981)。神経細胞は、他の神経細胞に情報を伝える1本の軸索と、他の細胞からの入力を受け取る複数の樹状突起を持つ (図 1-1)。錐体細胞の樹状突起においては、細胞体の頂点から脳表面に向かう1本の先端樹状突起と、細胞体の底辺から伸びる複数の基底樹状突起がある。大脳皮質第5層の錐体細胞では、1本の先端樹状突起が第1層まで伸び、複数の基底樹状突起は第5層にとどまる (Kawaguchi, 2017)。樹状突起は脳内の様々な領域から入力を受ける。大脳皮質運動野第5層への入力は一次体性感覚野

(Primary somatosensory cortex: S1)、二次体性感覚野 (Secondary somatosensory cortex: S2)、二次運動野 (Secondary motor cortex: M2)、運動性視床核 (Ventrolateral thalamic nucleus: VL、Ventromedial thalamic nucleus: VM)、感覚性視床核 (Posterior thalamic nucleus: Po) からの入力が主であるが、先端樹状突起には S1 の後肢領域 primary somatosensory cortex, hindlimb region (S1HL)、S1 の前肢領域 primary somatosensory cortex, forelimb region

(S1FL) の第2/3層から、基底樹状突起には M2 第5層からの入力が優先的である (Geng et al., 2022)。先端樹状突起は S1 からフィードバック信号を受け取り、基底樹状突起は M2 からフィードフォワード信号を受け取る (Geng et al., 2022)。これらの情報が統合され、随意運動が引き起こされる。M2 は、感覚情報などの前提条件を行動に対応させ、適切な運

動行動をとるために重要な領域である (Barthas & Kwan, 2017)。

樹状突起上には、スパインと呼ばれる突起が多数存在し、他の神経細胞の軸索末端とシナプスと呼ばれる構造を形成する (図 1-1)。神経細胞は、刺激などによって常に機能的・構造的な変化を起こしており、この性質を可塑性という。軸索終末から神経伝達物質であるグルタミン酸が放出されると、樹状突起スパインに存在するグルタミン酸受容体に結合し、情報伝達が行われる。この伝達効率の変化をシナプス可塑性といい、記憶や学習に役立っている (Paoletti et al., 2013)。

脳梗塞後においては、神経細胞形態が変化することが知られている。脳梗塞後 24 時間で脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第 5 層において樹状突起スパインが減少する (Brown et al., 2008)。脳梗塞後 2 週間頃の回復期では、脳梗塞巣周囲において樹状突起が脳梗塞巣と反対側に向かって伸長することや (Brown et al., 2010)、スパインの形成が増えることが分かっている (Brown et al., 2007)。脳梗塞巣と反対側の体性感覚野では、スパインの形成と消失が活発に起こる (Takatsuru et al., 2009)。このような神経細胞における形態的可塑性は、残存した領域で起こる神経回路の再構築を反映していると考えられる。また、脳梗塞後に行われるリハビリテーションは神経可塑性に働きかけ、機能回復を促進するとされている (Arya et al., 2011; Schaechter, 2004; Warraich & Kleim, 2010)。

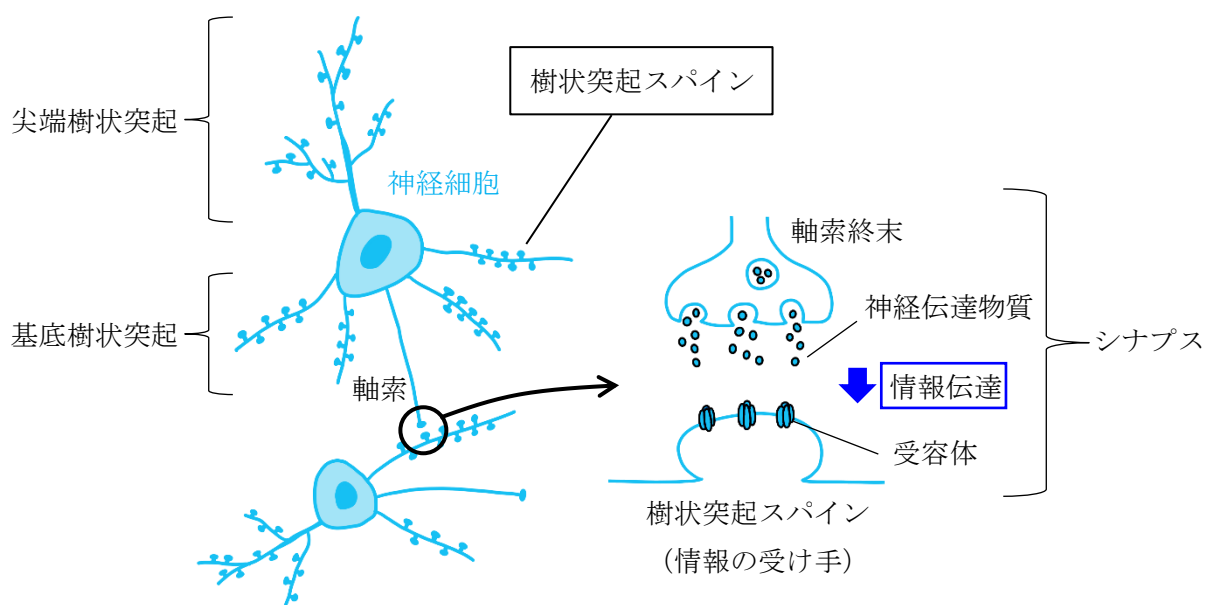


図 1-1. 神経細胞形態

神経細胞は、他の神経細胞に情報を伝える 1 本の軸索と、他の細胞からの入力を受け取る複数の樹状突起を持つ。樹状突起上には、多数の樹状突起スパインが存在し、軸索末端とシナプスを形成する。

1.3 リハビリテーション研究と問題提起

脳梗塞後のリハビリテーションは身体機能低下の防止や ADL 向上の為にされる。リハビリテーションは脳梗塞後残存した領域における神経可塑性に働きかけることで機能回復を促進するとされているが、その詳細な効果機序はいまだに明らかになっていないことが多い。

リハビリテーション研究において、実験動物を対象としてトレッドミルによる走行やケージ内におもちゃが設置されているエンリッチ環境での飼育などがリハビリテーションを模した介入として行われる。これらの介入によって機能回復が促進される際、脳梗塞単体積が減少すると言われている (Chen et al., 2019; Matsuda et al., 2011; Qian et al., 2018)。しかしながら、これらの研究は C57BL/6 マウスやラットを対象に行われたものである。C57BL/6 マウスでは、その豊富で可変的な側副血行路により、誘導される脳梗塞巣の大きさや場所に個体差が生じる (Taguchi et al., 2010)。ラットでは、10 日後の生存率が 50%以下である (Tao et al., 2013)。フィラメント挿入による中大脳動脈閉塞術 (Middle cerebral artery occlusion: MCAO) (Longa et al., 1989) は齧歯類に対して脳梗塞を誘導する一般的な方法である。しかしながら、この方法は網膜損傷を生じさせるため、行動実験によって機能回復を評価する際に視覚障害を考慮しなくてはならない (Steele et al., 2008)。以上の理由により、これらの動物モデルは脳梗塞後のリハビリテーション介入の効果を評価するには最適であると言えず、齧歯類、特にマウスを用いたこれまでの動物実験に基づく脳梗塞後のリハビリテーション効果に関する知見の多くは再検証される必要がある。

本研究では再現性の高い脳梗塞モデルマウスを使用し、基底樹状突起スパインに起こる微細な変化を検討した。

1.4 研究目的

Taguchi らは、C.B-17/Icr-^{+/+}Jcl (C.B-17) マウスの中大脳動脈を電氣的に凝固し永久閉塞させる MCAO により、皮質に局限した再現性の高い脳梗塞巣が誘導され、180 日以上長い生存期間を示すことを明らかにした (Taguchi et al., 2010)。本研究では、C.B-17 マウスを用いた再現性の高い脳梗塞モデルマウスを作製し、リハビリテーションの要素である運動による機能回復効果を個体差による影響を極力排除した条件下で正しく評価することを目指した。第 2 章では、脳梗塞後の自発運動によって機能回復が促進される際、脳梗塞巣に隣接した領域で起こる変化を明らかにすることを目指した。第 3 章では、神経細胞の機能や環境を支持するグリア細胞に着目し、運動がそれらに与える影響について検討した。これらの検討を個体差による影響を極力排除した条件下において正確に行い、脳梗塞後の自発運動が機能回復を促進する詳細な機序を明らかにすることを本研究の目的とした。

第2章 脳梗塞後の自発運動による機能回復と神経可塑性

脳梗塞は血液供給が不十分になることで起こり、脳組織が壊死に陥る。脳は領域ごとに機能が局在しているため (Brodmann, 1909)、脳梗塞巣の場所や大きさが機能障害の種類や程度に影響する。トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの登場以降、実験動物を用いた脳梗塞研究でもマウスを使用した研究が主流となってきた。特に近交系である C57BL/6 マウスが汎用されているが、C57BL/6 マウスでは脳血管走行の個体差や、豊富で可変的な側副血行路により、MCAO によって誘導される脳梗塞巣の大きさや場所に個体差が生じる (Taguchi et al., 2010)。この個体差による影響は微細な変化の抽出を困難にし、リハビリテーションによる機能回復促進機序の解明を妨げるばかりか、リハビリテーションが脳梗塞後の機能回復を本当に促進しているのかについての再検証も必要であることを示している。これまでの検討では、リハビリテーション及び運動が脳梗塞後の機能障害を緩和する機序として脳梗塞巣体積の縮小や (Chen et al., 2019; Shang et al., 2018)、神経回路網の再編成に伴う残存領域での機能的代償が提唱されてきた (Nudo et al., 1996; Okabe et al., 2016; Shiromoto et al., 2017)。運動による脳梗塞巣体積の縮小効果に関しては、形成される脳梗塞巣の再現性について従来の脳梗塞モデルマウスに問題があるため、適切な脳梗塞モデルマウスでの再検証が必須である。運動による神経回路網の再編成効果に関しては、従来の脳梗塞モデルマウスにおける再現性の低さが実験の解釈に与える影響は比較的限定的であると考えられるため、有力な機序であると考えられる。神経回路網の再編成の背景にはそれを構成する神経細胞形態の変化が存在する。実際に、前肢の使用を促すことで脳梗塞後の機能回復が促進される際、脳梗塞後に新しく形成された樹状突起スパインの維持が促進されることが報告されている (Clark et al., 2019)。また、トレッドミルによる運動は樹状突起の退縮を防ぎ、機能回復を促進するとされている (Takamatsu et al., 2016)。しかし、これらの研究の多くは先端樹状突起に着目したもので、基底樹状突起に関する情報は少ない。第1章に述べた通り、先端樹状突起はフィードバック信号を受け取るのに対し、基底樹状突起はフィードフォワード信号を受け取り随意運動行動の調節に関与する。従って基底樹状突起においても、脳梗塞後の運動による変化とその影響を評価することが求められる。本研究では、個体間で血管走行に差が小さい C.B-17 マウスを用いることによって、作製される脳梗塞巣の個体差の影響を最小化した。これらの脳梗塞モデルマウスに自発運動を促すことで、リハビリテーションの構成要素の1つである運動が脳梗塞後の機能回復に与える効果とそれをもたらす機序を正確に評価することを目指した。

2.1 実験方法

2.1.1 動物飼育

本研究は、立命館大学 BKC 動物実験委員会により承認を得て実施した。実験動物は、

温度 23 °C~25 °C、湿度 45%~65%、12 時間の明暗サイクル（8 時点灯、20 時消灯）という環境下で飼育した。C.B-17 マウス（オス）を日本クレア株式会社から購入し、実験に使用した。

2.1.2 脳梗塞モデルマウス作製

MCAO によって脳梗塞モデルマウスを作製した。7 週齢の C.B-17 マウスに三種混合麻酔を腹腔内投与し、顕微鏡下で半臥位にした。左眼と左耳の間の皮膚を切開し、頭蓋骨に穴を開け、中大脳動脈を露出させた。バイポーラ凝固器（MS-50; MERA, Tokyo, Japan）を用いて下方遠位部から嗅索に向かって徐々に血管を焼灼した。血流を完全に止め、中大脳動脈を切断した。抗生物質のセフメタゾン投与し、切開部分を縫合した。体温を回復させるために保温パッドにマウスをのせたあと、ケージに戻した。中大脳動脈を露出させるまで MCAO 群と同じ操作を行った群を偽 MCAO（Sham）群とした。

2.1.3 リハビリテーション処置

Running wheel（Shimizu Laboratory Supplies, Kyoto, Japan）を設置したケージでマウスを 24 時間飼育し自発運動を促すことをリハビリテーション処置とした。この処置を行う群を運動群と定義した。条件を揃えるため、全てのマウスに対して手術前の 1 週間、running wheel に対する馴化を行った。手術後、Sham+非運動群、Sham+運動群、MCAO+非運動群、MCAO+運動群を設定した。Running wheel を設置しないケージで飼育する群を非運動群とした。回転数を計測することができるカウンターを running wheel に取り付け（Kyoto L Giken, Shiga, Japan）、回転数を毎日計測した。1 回転を 35.168 cm とし、回転数を走行距離に換算した。

2.1.4 行動評価

2.1.4.1 Grid walking test

アクリルボックス（15.5 cm × 15.5 cm × 23 cm）の上に金網（ピッチ 1.2 cm × 1.2 cm、太さ 1 mm）を置き、その上にマウスをのせ、自由歩行する様子をビデオカメラで撮影した。踏み外しが顕著にみられた右前肢に着目し、解析を行った。最初の 30 歩を解析対象とし、踏み外した回数を計測した。

2.1.4.2 Wire hang test

アクリルボックス（35 cm × 35 cm × 60 cm）の上に設置した金網の上にマウスをのせ、10 秒間馴化させた。マウスが金網にしっかりとつかまっていることを確認しながら、ゆっくりと金網を反転させ、マウスが地面に落下するまでの時間を計測した。反転させた網が 90°になった時点から、マウスの四肢全てが網から離れた時点までを Fall latency として評価した。

2.1.5 脳の大きさ測定

2.1.5.1 灌流固定

マウスにイソフルランを吸入させ、痛み反応の完全な消失を確認した。開胸し、露出させた心臓の左心室に針（テルモ翼付静注針 D タイプ 27G 1/2”；TERUMO, Tokyo, Japan）を刺入した。SHARP INFUSION PUMP MP-25 を用い、FLOW CONTROL を FINE 10、COARSE 4 に設定した。ハサミで右心房に切り込みを入れ、左心室から 0.9% NaCl（約 2.75 mL）、次いで 4% PFA を 15 mL 流した。摘出した脳を 4% PFA 溶液で 48 時間後固定した。

2.1.5.2 ニッスル染色

Leica CM1860 Cryostat（Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany）を用いて 30 μm 厚の冠状切片を作製した。ニッスル染色には、bregma -1.70 mm から bregma -2.18 mm の切片を用いた。0.025w/v%になるようにチオニン酢酸塩を 0.1N 酢酸ナトリウム緩衝液に溶解し、25 $^{\circ}\text{C}$ で切片を染色した。反対側半球面積に対する梗塞側半球面積の比率を求めた。反対側半球の表面の長さ、梗塞側半球の頭頂領域、脳梗塞巣領域、脳底領域の表面の長さをそれぞれ計測し、反対側半球の表面の長さに対する比率を求めた。

2.1.5.3 Magnetic resonance imaging

内径 3.5 cm のボリュームコイルを用いて、7.0 T Unity Inova System（Agilent, Santa Clara, USA）で核磁気共鳴画像を取得した。3D fast spin echo 法で T2 強調画像を取得した。以下に詳細な設定を示す（表 2-1）。得られた画像から、脳梁の最吻側（bregma 1.34 mm）から海馬が見える直前（bregma -0.82 mm ）までの残存した皮質体積をソフトウェア Fiji（<http://fiji.sc/Fiji>）を用いて計測した。

表 2-1. 画像取得条件

設定項目	条件
Repetition time	4,000 ms
Effective echo time	20 ms
Echo train length	4
Echo space	10 ms
Field of view	24 mm \times 24 mm \times 16 mm
Acquisition matrix	256 \times 128 \times 96

2.1.6 神経細胞数計測

「2.1.5 脳の大きさ測定」と同様の方法で灌流固定および切片の作製を行った。Bregma -0.82 mm から bregma -0.94 mm の切片を用いた。3%過酸化水素に 1 時間 25 $^{\circ}\text{C}$ で反応さ

せることによって内在性のペルオキシダーゼ活性を抑制した。Blocking Buffer (5% goat serum/0.5% Triton X-100/0.05% sodium azide in phosphate-buffered saline) で1時間のブロッキング後、マウス抗 NeuN 抗体 (1:500, Merck, Darmstadt, Germany) に16時間4°Cで反応させた。本研究の免疫染色におけるブロッキング操作は、全てこの Blocking Buffer を用いた。3時間25°Cでビオチン標識抗マウス IgG (1:2,000, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) と反応させた。その後、アビジン-ビオチン標識 HRP 複合体 (VECSTATIN Elite ABC Standard Kit, Vector laboratories) と切片を90分25°Cで反応させた。結合した HRP は過酸化水素存在下で3,3-diaminobenzidine によって発色させた。VS-100 (OLYMPUS) を用いて、40倍対物レンズ (OLYMPUS UPlanSApo, NA=0.95) で撮影した。脳梗塞巣から128.75 µm 離れた489.25 µm × 489.25 µm の領域に存在する NeuN 陽性細胞数を計測した。

2.1.7 神経細胞可視化

2.1.7.1 灌流固定

マウスにイソフルランを吸入させ、痛み反応の完全な消失を確認した。開胸し、露出させた心臓の左心室に針 (21G、長さ9.0 mm、先端部を切断しやすりで削って加工したもの) を刺入した。ハサミで右心房に切り込みを入れたのち、1×PBS (約9.5 mL)、次いで4% PFA を流速約0.3 mL/min で流した。灌流する時間は、灌流固定の途中でマウスの尾が立ち上がりきった時点から約170秒~180秒 (約51 mL~54 mL) とした。

2.1.7.2 脳スライス作製

灌流固定後に摘出した脳を4% PFA 溶液で24時間後固定した。ブレインスライサーを用いて冠状断で二か所を切断した (大脳縦裂の最尾側、そこから吻側へ4 mm)。小脳側をマイクロスライサーDTK-1000 (DOSAKA EM, CO., Kyoto, Japan) の固定台に瞬間接着剤で貼り付け、嗅球側からスライスを作製した。脳は、梗塞側 (左半球) が手前に来るように、脳梁を水平面に45°傾けて貼り付けた。これにより、大脳皮質運動野第5層にマイクロインジェクションを行うことができる250 µm 厚の冠状脳スライスを得た。

2.1.7.3 ガラス針の作製

標準厚ボロシリケートガラス管 芯入り BF100-50-10 (外径1.00 mm、内径0.50 mm、長さ10 cm) (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) から電極プーラーPP-830 (NARISHIGE, Tokyo, JAPAN) を用いて、以下の設定にてガラス針を作製した (表2-2)。蛍光色素であるLucifer Yellow CH dilithium salt (Merck, Darmstadt, Germany) を8w/v%になるように0.05 M Tris-HCl (pH 8.4) に溶かしたものをLYと表記する。LYにガラス針の後端を浸けて静置し、毛細管現象を用いてガラス針の先端にLYを充填した。0.3 mm 径の銀線をやすりで磨き、塩素系漂白剤 (ハイター) に約1分間浸して銀-塩化銀コートを行った。LYを充填したガラス針に0.1 M LiCl 溶液をシリンジとローディングチップを用いて満たし、銀線を挿

入した。これを顕微鏡のマニピュレーター（NARISHIGE）に装着した。

表 2-2. ガラス針作製条件

設定項目	条件
加熱部分の目盛り	4 mm
重り側の目盛り	8 mm
1 度引き温度	75.1 °C
2 度引き温度	62.2 °C
重りの数	3 個

2.1.7.4 マイクロインジェクションによる LY 注入

脳スライスを 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) 溶液に 5 分間浸け、蛍光顕微鏡下でマイクロインジェクションする標的細胞核を可視化した。脳スライスをチャンバーに置き、メンブレンフィルターを脳スライスの上に載せ、脳スライスが動かないように固定した。メンブレンフィルターには、約 2 mm × 2 mm の穴を開け、穴の中央にマイクロインジェクションの対象である大脳皮質が位置するように調整した。脳スライスを載せたチャンバーを対物上下動式蛍光顕微鏡 ECLIPSE E600 (Nikon, Tokyo, Japan) にセットし、ガラス針側及びチャンバー側の銀線に導線を用いて定電流装置 Microiontophoresis Dual Current Generator 260 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) に接続した。チャンバーを 1 × PBS で満たし、40 倍の水浸対物レンズ (Nikon, V-2A, BA450 DM430 EX380-420) 下で大脳皮質運動野第 5 層の錐体細胞に LY を注入した。定電流装置の CURRENT LEVEL のつまみを調節して、電流 10 nA を 10 分間流し、更に 12 nA を 5 分間流した。

2.1.7.5 脳スライス染色

LY を注入した脳スライスを混合 0.1 M PB で 5 分間 3 回洗浄後、1.5 mg/mL 抗 Lucifer yellow 抗体 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 2 μL を混合 0.1 M PB 200 μL に加えた溶液に浸け、25 °C で 10 日間インキュベートした。その後、脳スライスを 0.1 M PB で 10 分間 3 回洗浄し、0.1 w/v% に調整した Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (Thermo Fisher Scientific) 2 μL、0.1 M PB 200 μL 中で遮光しながら 25 °C で 2 時間インキュベートした。0.1 M PB で 10 分間 3 回洗浄後、封入剤 Aqueous Mounting Medium, PermaFluor (Thermo Fisher Scientific) を用いて封入した。

2.1.7.6 樹状突起スパイン画像の取得並びに計測

共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000; OLYMPUS, Tokyo, Japan) で、対物レンズ 10 倍 (OLYMPUS UPlanApo 10x/0.4 ∞/0.17 Dry)、対物レンズ 60 倍 (OLYMPUS PlanApo

60x/1.40 ∞ /0.17 Oil) を用いて画像を取得した。マイクロインジェクションした領域を撮影する際は対物レンズ 10 倍を、細胞全体を撮影する際は対物レンズ 60 倍を用いた。このとき、Kalman 2、Scan Speed 8.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$ 、Z-step 1.0 $\mu\text{m}/\text{slice}$ とした。樹状突起スパインの撮影は、対物レンズ 60 倍に対して 7 倍のズームをかけて行い、Kalman 3、Scan Speed 8.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$ 、Z-step 0.5 $\mu\text{m}/\text{slice}$ とした。マウス 1 匹あたり 3 細胞以上から合計 9 本の樹状突起を撮影した。細胞体から 100 μm までに存在する樹状突起スパインを盲検化し計測した。

2.1.8 脳梗塞巣周囲 c-Fos 陽性細胞数計測

「2.1.5 脳の大きさ測定」と同様の方法で灌流固定および切片の作製を行った。Bregma 1.98 mm から bregma 1.70 mm の切片を用いた。内在性ペルオキシダーゼ活性抑制とブロッキング後、ラビット抗 c-Fos 抗体 (1.5:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) と 16 時間 4 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。3 時間 25 $^{\circ}\text{C}$ でビオチン標識抗ラビット IgG (1:2,000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) と反応後、アビジン-ビオチン標識 HRP 複合体と反応させ、上記と同様に HRP を発色させた。VS-100 (OLYMPUS) を用いて、20 倍対物レンズ (OLYMPUS UPlanSApo, NA=0.75) で撮影した。脳梗塞巣に隣接した 752.94 μm \times 358.82 μm の領域に存在する c-Fos 陽性細胞数を計測した。

2.1.9 脳梗塞巣周囲における血管の可視化及び画像の取得

「2.1.5 脳の大きさ測定」と同様の方法で灌流固定および切片の作製を行った。Bregma 0.14 mm から bregma -1.22 mm の切片を用いた。切片を Tris-EDTA buffer (10 mM Tris base, 1 mM EDTA solution, 0.05% Tween 20, pH 9.0) に浸け、700 W で数分間、電子レンジで徐々に温めた。切片を 25 $^{\circ}\text{C}$ の Tris-EDTA buffer に移した。ブロッキング後、ラビット抗 CD31 抗体 (1:50, Abcam, Cambridge, UK) と 2 時間 25 $^{\circ}\text{C}$ で反応後、16 時間 4 $^{\circ}\text{C}$ で反応させた。3 時間 25 $^{\circ}\text{C}$ で Alexa Fluor 488 標識抗ラビット IgG (1:2,000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と Propidium Iodide (PI, 1:1,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と反応させた。共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000) で、対物レンズ 60 倍を用いて撮影を行った。423 μm \times 423 μm の脳梗塞巣に隣接した領域を解析するため、脳梗塞巣の境界が画面の左端に一致するように調整し、1 視野 211.5 μm \times 211.5 μm の画像を 4 枚撮影した。

2.1.10 CD31 陽性面積測定

取得した画像は、Fiji を用いて解析した。CD31 を染色した画像を 8-bit に変換し、Default algorithm を用いて二値化した。画像を白黒に変換し、外れ値の除去を行った (Radius = 7 pixels, Threthold = 50, Which Outliers = Bright)。Fill holes 処理によって穴を埋めた後、血管面積を自動的に計測した。この画像を Skeletonize 処理することで血管の長さを測定した。血管の直径は、血管面積を血管の長さで割ることで算出した。

2.1.11 統計

統計学的な差は、Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いたウェルチの t 検定によって解析した。Grid walking test では、ウェルチの t 検定後、Holm 法で補正した。スパイン密度は、Excel (Microsoft) と R software, version 3.5.2 (The R Foundation for Statistical Computing) を用いて、two-way ANOVA の後、ウェルチの t 検定を行い、Holm 法で補正した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。CD31 の染色に関して、MCAO+非運動群と MCAO+運動群それぞれから 1 匹ずつを染色不良によりデータから除外した。また、MCAO+非運動群からさらに 1 匹を血管面積、長さ、直径のデータからスミルノフ・グラブス検定 ($p < 0.05$) を用いて除外した。

2.2 実験結果

2.2.1 脳梗塞後の自発運動は機能回復を促進した

これまでに、脳梗塞モデルマウスを使用して運動による機能改善効果を示した報告は多数存在する。しかし、従来の脳梗塞モデルマウスには脳血管走行の個体差に起因して、誘導される脳梗塞巣の位置やサイズが個体間で異なる。脳は領域ごとに機能局在するため、この個体差は脳梗塞後の機能改善効果を示す結果の信頼性に大きく影響する。そこで、個体間で血管走行に差が少ない C.B-17 マウスを用い、誘導される脳梗塞巣に個体差が生じない条件下で脳梗塞後の自発運動が機能回復に与える影響について評価した。脳梗塞後 14 日目 (Postoperative day 14: POD14) に grid walking test と wire hang test を行った (図 2-1)。Grid walking test では、マウスを金網の上に乗せ、自由歩行する様子を観察した。MCAO 群で踏み外しが顕著にみられた右前肢に着目し、歩き始めてから最初の 30 歩のうち、踏み外した回数を計測した。MCAO+非運動群では Sham+非運動群と比較して踏み外し回数が有意に増加していたが、MCAO+運動群の踏み外し回数は Sham+運動群と同程度であった (図 2-2A)。従って、脳梗塞によって増加した踏み外し回数が、運動によって改善されることが分かった。MCAO+運動群において、網を認識する感覚機能や適切な位置に向かって四肢を誘導するために必要な複数の筋を協調的に制御する機能が向上したことが考えられる。Wire hang test では、マウスを網につかまらせてから地面に落下するまでの時間を計測した。非運動群と比較して、運動群において地面に落下するまでの時間が有意に増加した (図 2-2B)。Wire hang test は四肢を使って身体を支えるため、地面に落下するまでの時間が体重に左右される可能性がある。しかしながら、群間で体重の差は見られなかった (図 2-2C)。このことから、運動群において地面に落下するまでの時間が延長したことに体重は関与しないことが分かった。Running wheel による走行量はマウスの意思によるため、運動量を統一することができない。このことから、走行量と機能回復の成績に相関があるか wire hang test において確認した。POD1 から POD15 の MCAO+運動群の総走行距離は 61.6 ± 27.7 km であり、wire hang test の成績との相関はなかった (図 2-2D)。最も走行

量の少ない個体の総走行距離は 31.7305 km であったが、この個体の wire hang test における落下までの時間は 68.402 秒であった。この成績は非運動群の平均値 (46.8±20.5 秒) を上回っているため、少なくとも脳梗塞後 2 週間で 30 km に達する自発走行には脳梗塞後の機能低下を緩和する効果が認められる。以上の結果より、誘導される脳梗塞巣に個体差の小さい脳梗塞モデルマウスにおいても運動が脳梗塞後の機能改善効果を示すことが示された。

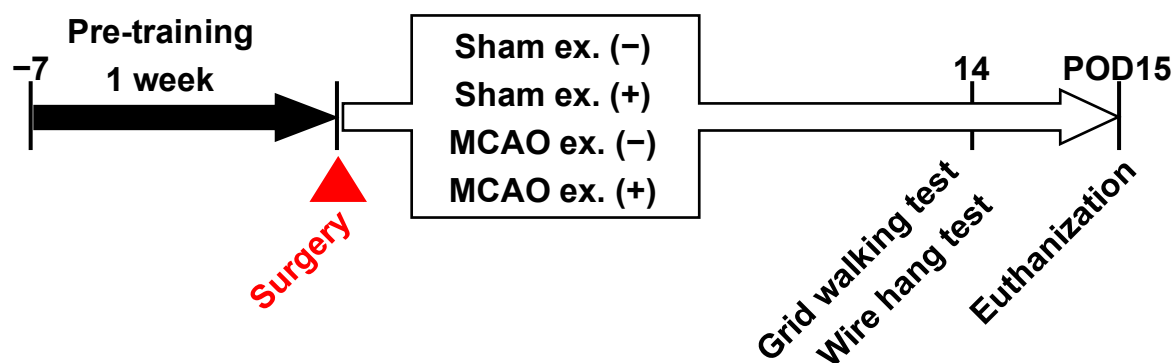


図 2-1. 実験デザイン

手術前の 1 週間、running wheel への馴化期間を設け、プレトレーニングとした。手術後、マウスを Sham+非運動群 {Sham ex. (-)}、Sham+運動群 {Sham ex. (+)}、MCAO+非運動群 {MCAO ex. (-)}、MCAO+運動群 {MCAO ex. (+)} の 4 群に分けた。POD14 に機能回復を評価するための行動実験を、POD15 に組織学的解析を行った。

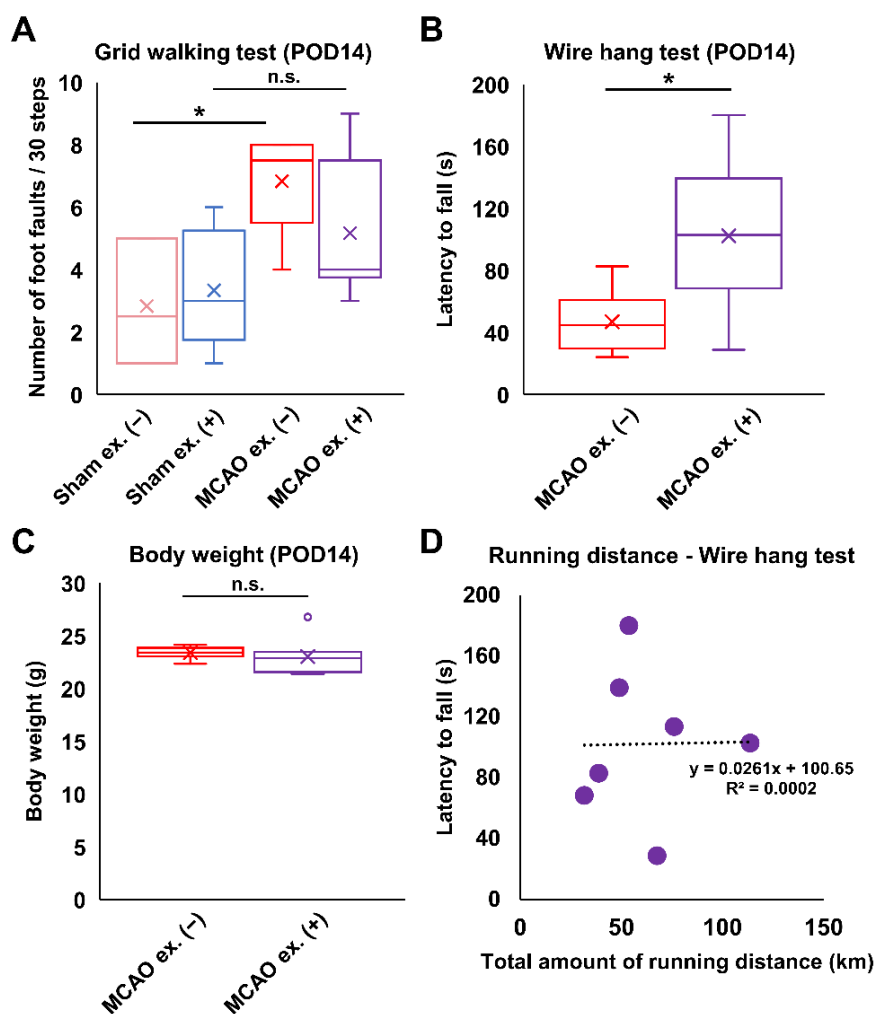


図 2-2. 脳梗塞後の自発運動による機能回復

(A) Grid walking test の結果。マウスに金網の上を自由歩行させ、右前肢に関して歩き始めてから最初の 30 歩のうち踏み外した回数を計測した。n = 6 マウス {Sham ex. (-)}、n = 6 マウス {Sham ex. (+)}、n = 6 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 6 マウス {MCAO ex. (+)}。

(B) Wire hang test の結果。マウスを網につかまらせてから地面に落下するまでの時間を計測した。n = 6 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 7 マウス {MCAO ex. (+)}。

(C) POD14 時点での体重。n = 6 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 7 マウス {MCAO ex. (+)}。

(D) POD15 までの総走行距離と wire hang test の成績との相関。n = 7 マウス {MCAO ex. (+)}。

箱ひげ図において、×は平均値、箱内の線は中央値、箱の両端は第三四分位数（上端）、第一四分位数（下端）、ひげは四分位範囲の 1.5 倍を上下限とした。プロットは外れ値。

* $p < 0.05$ 。

2.2.2 脳梗塞後の運動は脳組織の大きさに影響を与えなかった

これまでに脳梗塞後の運動が脳梗塞巣サイズを変化させることで機能回復がもたらされることが示唆されている (Chen et al., 2019; Matsuda et al., 2011)。そこで、高再現性脳梗塞モデルマウスを用いて運動が脳梗塞巣や残存した脳領域の大きさに与える影響について検討した。POD15において、ニッスル染色した切片を用い、反対側半球 (健常側) に対する梗塞側半球の面積比を算出したが、MCAO+非運動群と MCAO+運動群で差はなかった (図 2-3A, B)。次に、梗塞側半球の頭頂領域の表面の長さ、脳梗塞巣領域の表面の長さ、脳底領域の表面の長さをそれぞれ計測した (図 2-3A)。反対側半球の表面の長さに対するそれぞれの比率を求めたが、MCAO+非運動群と MCAO+運動群で差はなかった (図 2-3C, D, E)。このことから、脳梗塞後の運動によって脳梗塞巣の大きさは変化しないことが示唆された。次に、3次元解析を行うため、MRIを用いた。得られた11枚の画像それぞれにおいて、頭頂側の残存した皮質面積を測定した。1枚の画像が持つ厚みを掛けることで体積に変換した。MCAO+非運動群と MCAO+運動群で差はなかった (図 2-3F, G)。以上より、脳梗塞後の運動は脳組織の大きさに影響を与えないことが分かった。

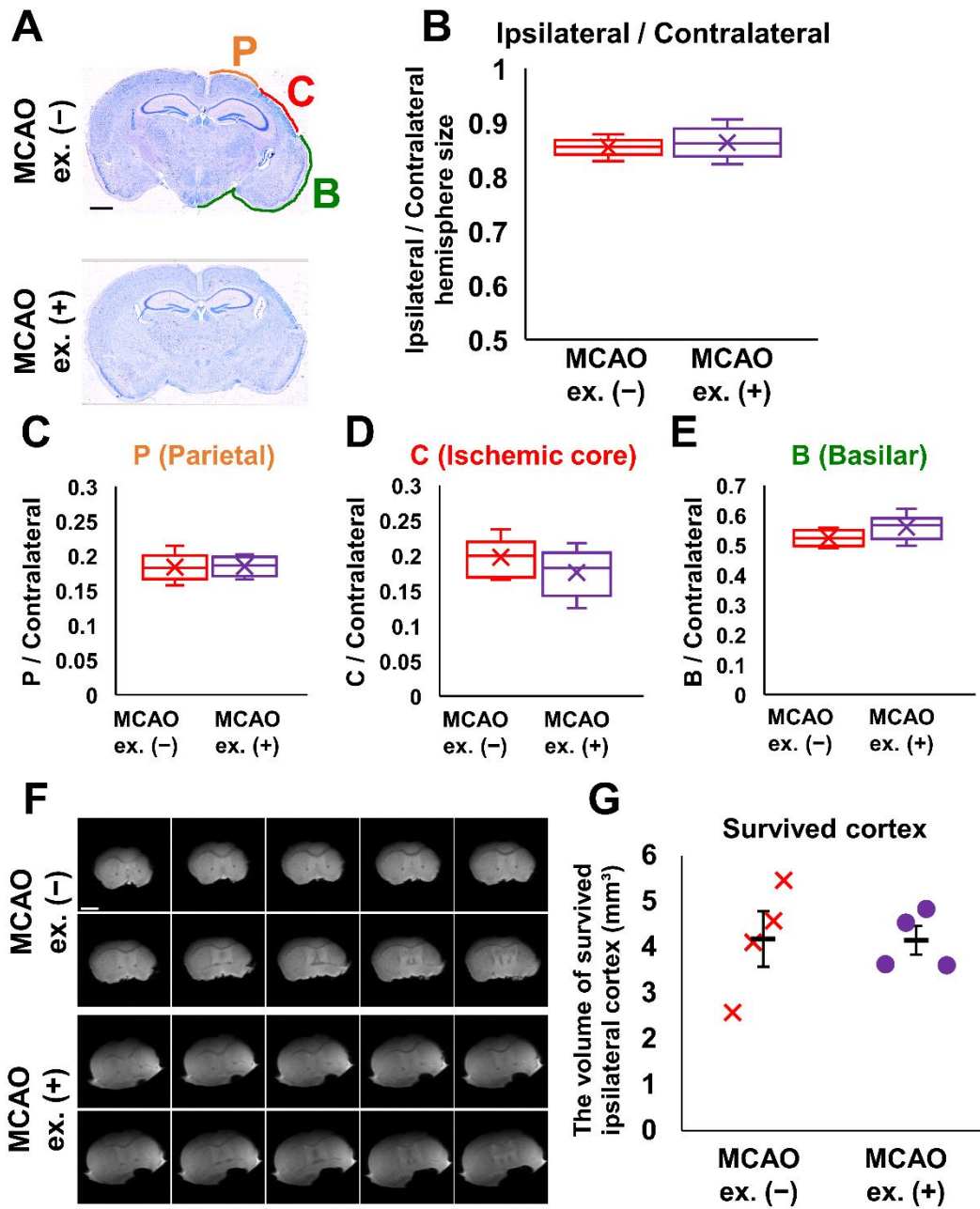


図 2-3. 脳梗塞後の自発運動は脳組織の大きさを変化させなかった

(A) POD15 のチオニン染色切片。“P”、“C”、“B”はそれぞれ parietal region、ischemic core、basilar region の脳表面の長さを表す。スケールバー：1 mm。

(B) 反対側半球面積に対する梗塞側半球面積の比。 n = 6 マウス {MCAO ex. (-)} 、 n = 6 マウス {MCAO ex. (+)} 。

(C, D, E) 反対側半球の表面の長さに対する P、C、B の比をそれぞれ算出した。 n = 6 マウス {MCAO ex. (-)} 、 n = 6 マウス {MCAO ex. (+)} 。

箱ひげ図において、×は平均値、箱内の線は中央値、箱の両端は第三四分位数（上端）、第一四分位数（下端）、ひげは四分位範囲の 1.5 倍を上下限とした。

(F) MRI によって得られた画像。スケールバー：2 mm。

(G) 得られた画像からそれぞれ残存皮質面積を計測し、残存皮質体積を算出した。 n = 4 マウス {MCAO ex. (-)} 、 n = 4 マウス {MCAO ex. (+)} 。

プロットは各個体を表す。バーは平均値±標準誤差。

2.2.3 脳梗塞巣周囲の神経細胞数は運動によって変化しなかった

次に、残存した組織における機能的な神経細胞数に運動が影響することで、脳梗塞後の機能改善にもたらす可能性を検討した。脳梗塞巣に隣接した領域の神経細胞を可視化するために神経細胞マーカーである NeuN を検出し、NeuN 陽性細胞数を計測した (図 2-4A)。MCAO+非運動群と MCAO+運動群の間で NeuN 陽性細胞数に違いは見られなかった (図 2-4B)。NeuN 陽性細胞数の形態や大きさに関しても違いは見られなかったことから、機能的な神経細胞数に関しても両群間に差は無いと考えられる。従って、脳梗塞後の運動は脳梗塞巣周囲の神経細胞数に影響を与えないことが分かった。

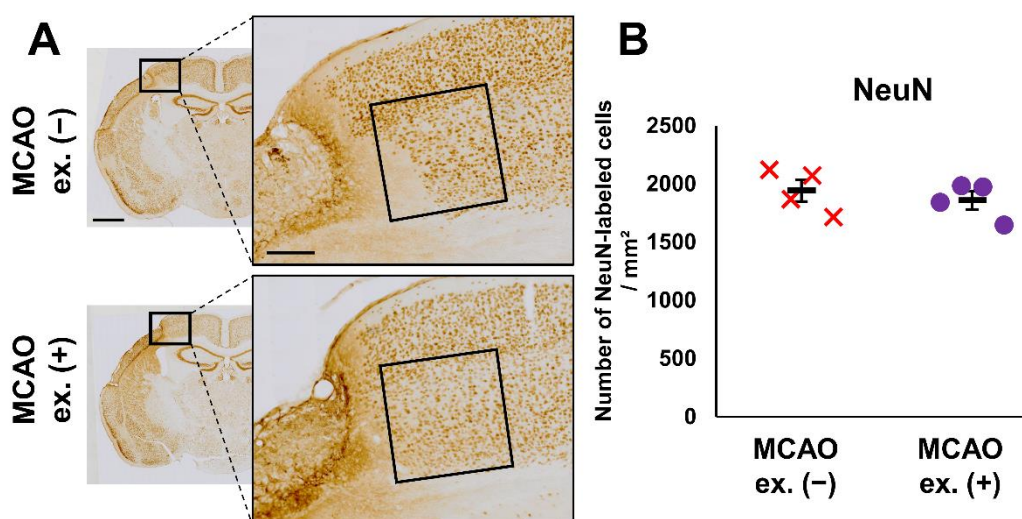


図 2-4. 脳梗塞後の自発運動は NeuN 陽性細胞数を変化させなかった

(A) NeuN 染色によって神経細胞を可視化した。スケールバー：1 mm (左)、200 μ m (右)。

(B) 脳梗塞巣周囲における NeuN 陽性細胞数を計測した。n = 4 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 4 マウス {MCAO ex. (+)}。

プロットは各個体を表す。バーは平均値 \pm 標準誤差。

2.2.4 脳梗塞後の自発運動は脳梗塞によるスパイン数減少を緩和した

脳梗塞後の運動による機能回復は、脳組織の大きさや神経細胞数が変化することによって起こるものではないということが分かった。これまでに、神経回路網の変化が脳梗塞後の重要な機能改善機序であると考えられている (Nudo et al., 1996; Okabe et al., 2016; Shiromoto et al., 2017)。神経回路網の変化は神経細胞形態の変化を伴い、実際に、脳梗塞後の運動によって神経間情報伝達の入力構造である樹状突起及び樹状突起スパインの数や形態の変化が示されている (Clark et al., 2019; Takamatsu et al., 2016)。しかし、これらの研究の多くは先端樹状突起を観察対象としていた。随意運動を担う皮質脊髓路の出発点は、大脳皮質運動野第5層に存在する錐体細胞であるが (Murray et al., 1981)、この神経細胞の基底樹状突起は先端樹状突起に比べてM2第5層からの入力を強く受けている (Geng et al., 2022)。従って、この入力は適切な随意運動行動の調節に重要な役割を果たしていると考えられるため、大脳皮質運動野第5層の錐体細胞における基底樹状突起スパイン数への運動の影響を検証した。比較のためにSham+非運動群、Sham+運動群、MCAO+非運動群、MCAO+運動群を設定し、細胞体から100 μm までの基底樹状突起上に存在するスパインをLYによって可視化し、計数した (図 2-5A, B)。全ての群において細胞体から40 μm にかけて徐々にスパイン数が増加した。しかし、この範囲において群による変化は見られなかった。細胞体から40 μm 以降の領域ではMCAO+非運動群のスパイン数は、Sham+非運動群と比較して少なかった (図 2-5C)。従って脳梗塞巣に隣接する大脳皮質運動野第5層において、脳梗塞はスパイン数を減少させることが分かった。その一方で、MCAO+運動群のスパイン数はSham+運動群と同程度であった。40 μm ~ 50 μm では、MCAO+運動群のスパイン数がMCAO+非運動群のスパイン数より有意に増加していた (図 2-5C)。以上より、脳梗塞後の運動によって、大脳皮質運動野第5層の錐体細胞基底樹状突起では脳梗塞によるスパイン数の減少が緩和されることが分かった。

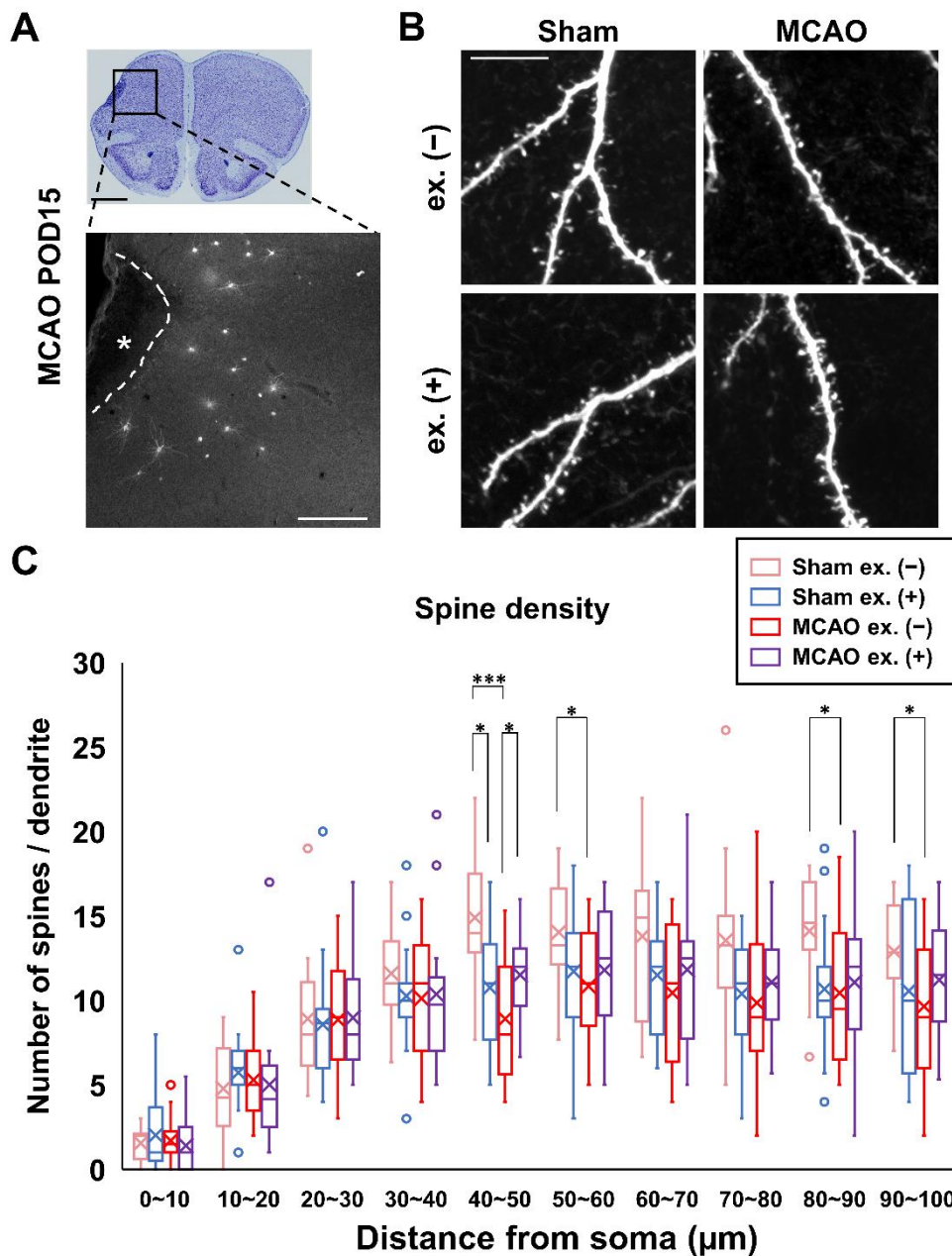


図 2-5. 脳梗塞後の自発運動は樹状突起スパイン減少を緩和させた

(A) POD15 において、LY を大脳皮質運動野第 5 層の錐体細胞にマイクロインジェクションした。*は脳梗塞巣。スケールバー：1 mm (黒)、300 μm (白)。

(B) 共焦点顕微鏡を用いて樹状突起スパインを撮影した。スケールバー：10 μm 。

(C) マウス 1 匹あたり 3 細胞以上から合計 9 本の樹状突起を撮影し、細胞体から 100 μm までの樹状突起上に存在するスパイン数を計測した。n = 14 細胞 {Sham ex. (-)}、n = 15 細胞 {Sham ex. (+)}、n = 21 細胞 {MCAO ex. (-)}、n = 14 細胞 {MCAO ex. (+)}。

* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$

箱ひげ図において、×は平均値、箱内の線は中央値、箱の両端は第三四分位数 (上端)、第一四分位数 (下端)、ひげは四分位範囲の 1.5 倍を上下限とした。プロットは外れ値。

2.2.5 MCAO+運動群において c-Fos 陽性細胞数が増加傾向にあった

脳梗塞巣に隣接する大脳皮質運動野第5層の錐体細胞において、神経伝達の受け手である樹状突起スパインの減少が運動によって緩和されていた。増加した入力構造がシナプスを形成して神経回路網の変化に寄与しているならば、脳梗塞後の運動によって活動的な神経細胞が増加することが予想される。そこで、末梢神経刺激や皮質に直接電気刺激を与えることによるシナプス活性によって発現し (Bullitt, 1990; Sagar et al., 1988)、神経活動マーカーとして用いられる c-Fos を可視化し、c-Fos 陽性細胞数を脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第5層において計測した (図 2-6A)。MCAO+運動群において、MCAO+非運動群と比較して c-Fos 陽性細胞が多く存在する傾向にあった ($p = 0.069$) (図 2-6B)。脳梗塞後の運動は、脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第5層において神経活動を亢進させることが分かった。

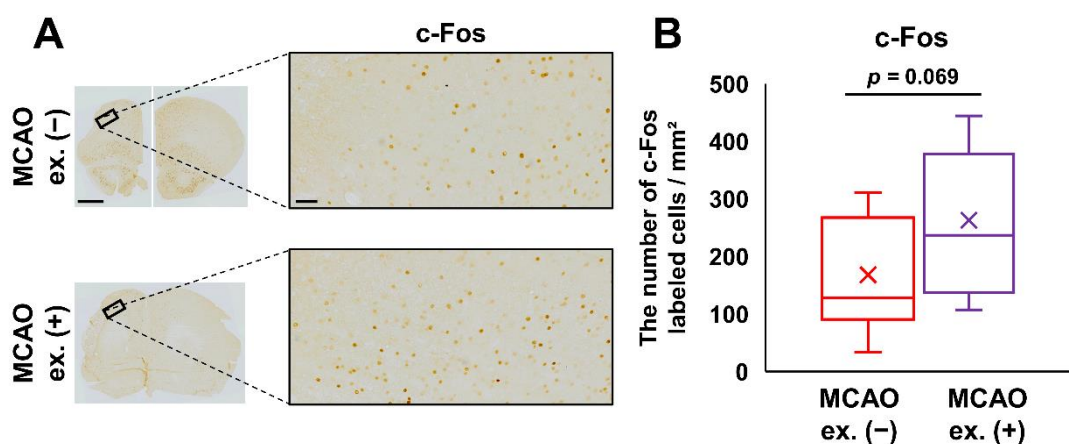


図 2-6. 脳梗塞後の自発運動によって c-Fos 陽性細胞数が増加傾向であった

(A) 神経活動マーカーである c-Fos を染色した切片。スケールバー：1 mm (左)、50 μm (右)。

(B) 脳梗塞巣に隣接した領域において、c-Fos 陽性細胞数を計測した。 $n = 10$ マウス {MCAO ex. (-)}、 $n = 10$ マウス {MCAO ex. (+)}。

箱ひげ図において、 \times は平均値、箱内の線は中央値、箱の両端は第三四分位数 (上端)、第一四分位数 (下端)、ひげは四分位範囲の 1.5 倍を上下限とした。

2.2.6 脳梗塞後の自発運動によって CD31 陽性面積が増加した

先行研究において、脳梗塞後のスパイン密度が健常マウスと同程度まで回復するとき、血管密度が増加することが報告されている (Brown et al., 2007)。本研究で脳梗塞後の運動によってスパイン数の減少が緩和されていた領域において、血管内皮細胞マーカーである CD31 を免疫染色した (図 2-7A)。CD31 陽性細胞数は運動で変化しなかった (図 2-7B)。その一方で、CD31 陽性面積は運動によって有意に増加した (図 2-7C)。さらに、血管の長さが運動によって増加していた (図 2-7D)。血管面積を血管の長さで割ることで血管の直径を算出したが、運動による変化はなかった (図 2-7E)。以上より、脳梗塞後の運動は、脳梗塞巣に隣接した大脳皮質運動野第 5 層において血管を伸長させることで血管面積を増加させることが分かった。

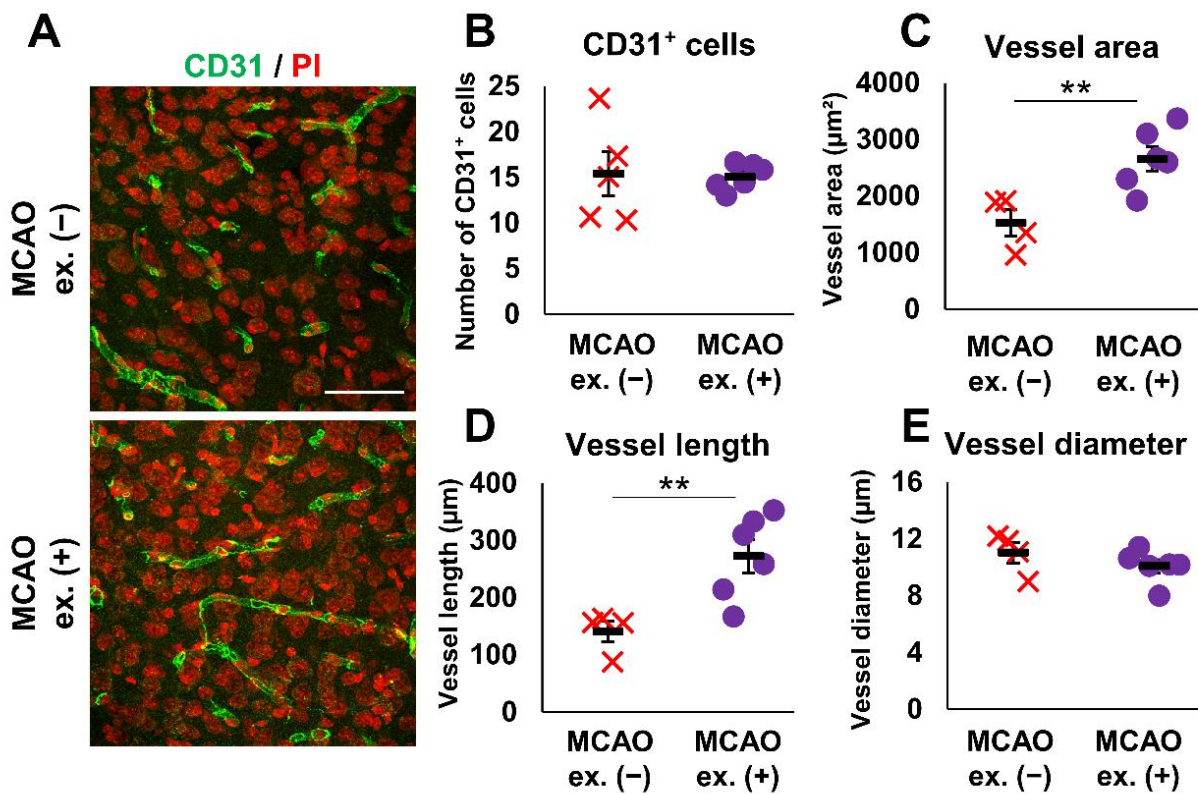


図 2-7. 脳梗塞後の自発運動によって血管の長さが増加した

(A) 血管内皮細胞を CD31 (緑)、細胞核を PI (赤) で染色した切片。脳梗塞巣の境界が画面の左端に一致するように調整し、1 視野 $211.5 \mu\text{m} \times 211.5 \mu\text{m}$ の画像を 4 枚撮影した。スケールバー : $50 \mu\text{m}$ 。

(B) 4 視野 $423 \mu\text{m} \times 423 \mu\text{m}$ に存在する CD31 陽性細胞数。n = 5 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 6 マウス {MCAO ex. (+)}。

(C) 取得した画像を Fiji によって二値化し、血管面積を自動的に測定した。n = 4 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 6 マウス {MCAO ex. (+)}。

(D) 二値化した画像を Fiji によって Skeletonize 処理し、血管の長さを算出した。n = 4 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 6 マウス {MCAO ex. (+)}。

(E) 血管面積を血管の長さで割ることで血管の直径を算出した。n = 4 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 6 マウス {MCAO ex. (+)}。

プロットは各個体を表す。バーは平均値±標準誤差。

** $p < 0.01$ 。

2.3 考察

脳梗塞後の自発運動によって機能回復が促進される際、脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第5層において樹状突起スパイン数の減少が緩和されていることが分かった（図2-2, 2-5）。このとき、自発運動は脳組織の大きさや残存した皮質体積、脳梗塞巣周囲の神経細胞数を変化させなかった（図2-3, 2-4）。これまで、C57BL/6マウスを用いた研究では、運動は脳梗塞巣体積を減少させ、機能障害を改善するとされていた（Chen et al., 2019; Shang et al., 2018）。しかしながら、MCAOによって誘導される脳梗塞巣の大きさは、血管走行の多様性によって個体差が生じる。この方法と比較して、Photothrombosisによって誘導される脳梗塞巣には再現性があるとされている。Photothrombosisでは光感受性色素を静注後、頭蓋骨上から脳に光を照射することで脳実質内の血管に血栓が形成されるが、脳は機能的な終動脈構造を呈するため、光を照射した範囲に脳梗塞巣が限定されるからである（Lee et al., 2007）。C57BL/6を用いたPhotothrombosisによる比較的再現性の高い脳梗塞モデルでは、梗塞側と反対側の皮質体積の差に関してリハビリテーション群と非リハビリテーション群で差はないとされている（Clark et al., 2019）。本研究においても、C.B-17マウスに再現性の高い脳梗塞を誘導し、反対側半球に対する梗塞側半球の大きさ、残存した皮質体積に自発運動が影響を与えないことを確認した（図2-3）。再現性の高い脳梗塞モデルを用いた検討の結果より、脳梗塞巣の大きさは脳梗塞後の運動によって変化せず、機能回復に寄与しないと考えられる。その一方で、脳梗塞後の自発運動は脳梗塞巣に隣接した大脳皮質運動野第5層において、脳梗塞による樹状突起スパイン減少を緩和した（図2-5）。これらのことから、脳梗塞後の運動は、脳の大きさや神経細胞数に影響を与えるのではなく、脳梗塞巣に隣接した随意運動を担う領域の神経細胞形態を変化させることで機能回復に寄与することが分かった。

MCAOによる樹状突起スパインの減少は、エネルギー供給源であるATPの枯渇や細胞膜脱分極、細胞内 Ca^{2+} 増加などのダメージによって起こる（Lipton, 1999）。実際に、脳梗塞後24時間で樹状突起スパインが減少することが報告されている（Brown et al., 2008）。本研究では、POD15においても細胞体から40 μ m以降の樹状突起において、Sham+非運動群と比較してMCAO+非運動群のスパイン数が減少していることを明らかにした（図2-5C）。一方で、運動群（MCAO+運動群、Sham+運動群）のスパイン数は同程度であった（図2-5C）。さらに、細胞体から40 μ m～50 μ mでは、MCAO+運動群のスパイン数はMCAO+非運動群と比較して有意に増加していた。これらのことから、自発運動は樹状突起スパインの減少を緩和することが分かった。軸索で生じたナトリウム活動電位（Sodium action potentials: APs）は樹状突起を逆伝播し、その振幅は細胞体から離れるにつれて減少する（Stuart & Sakmann, 1994; Tsay & Yuste, 2002）。また、樹状突起スパインのナトリウムチャンネルはAPsの遠位への逆伝播（Back-propagating action potentials: bAPs）をサポートする（Tsay & Yuste, 2002）。それゆえ、増加したスパイン密度によってMCAO+運動群の遠

位樹状突起における bAPs の振幅が増加することが考えられる。bAPs は長期増強 (long-term potentiation: LTP) を促進し (Magee & Johnston, 1997)、スパインを安定化させることから、MCAO+運動群の遠位部スパインは、脳梗塞後のスパイン減少に対して抵抗性を持つ可能性がある。

Sham 群においては、運動によって細胞体から 40 μm ~50 μm の樹状突起スパインが減少していた (図 2-5C)。グリア細胞の 1 つであるミクログリアはシナプス活性を感知し、活性の弱いシナプスを刈り込むことが知られている (Schafer et al., 2012)。運動には神経細胞による活動量の差を増大させる作用があり、それによってミクログリアのシナプス刈り込みを促進することが報告されている (Andoh et al., 2019)。本研究においても Sham+運動群ではシナプスの活性に強弱が生まれ、ミクログリアによって活性が弱いスパインの刈り込みが促進された可能性が高い。従って、Sham+運動群での樹状突起スパイン減少は脳梗塞の発症に伴う樹状突起スパイン減少とは異なった機序で生じていると考えられる。

神経細胞の形態変化は、神経細胞における機能変化を反映している可能性がある。c-Fos の発現は、神経細胞の活性化を表す (Bullitt, 1990; Sagar et al., 1988)。脳梗塞巣周囲において、運動は c-Fos 発現を上昇させる傾向にあった (図 2-6)。自発運動によって樹状突起スパイン減少が緩和された結果、増加した入力構造がシナプスを形成して神経回路の一部として機能していることを示唆している。運動によって c-Fos 発現が上昇していた大脳皮質運動野第 5 層は、運動性視床核から興奮性の入力を受ける (Hooks et al., 2013)。また、脳梗塞後にこの視床皮質回路を光遺伝学的に活性化すると、感覚運動機能が回復することが報告されている (Tennant et al., 2017)。さらに、c-Fos は神経活動時に、cell-cell adhesion、biological adhesion、cell-cell signaling、neuroactive ligand-receptor interaction、axon guidance に関わる c-Fos 依存的遺伝子の発現を上昇させることが知られている (Su et al., 2017)。これらのことから、脳梗塞後の運動による c-Fos 発現上昇は、スパイン減少緩和や神経細胞の機能回復に貢献すると考えられる。

これまでの研究で、脳梗塞後のスパイン密度が健常マウスと同程度まで回復するとき、血管密度が増加することが報告されている (Brown et al., 2007)。我々は、自発運動が脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第 5 層において血管面積を増加させることを明らかにした (図 2-7)。運動によって脳内の乳酸が増加し (Maddock et al., 2011)、乳酸受容体 HCAR1 の下流で血管新生が起こることが報告されている (Morland et al., 2017)。さらに、血管内皮細胞は虚血耐性をもつことが知られている (Hall et al., 2014; Tanaka et al., 2020)。これらのことから、脳梗塞後の自発運動は乳酸シグナリングを介して脳梗塞巣周囲の残存した血管内皮細胞を活性化させるという仮説を立てることができる。また、脳梗塞後の head-down positioning (90°、10 分) によってせん断応力を増加させると、血小板内皮細胞接着分子-1 の発現が上昇し、一酸化窒素産生による血管拡張によって毛細血管内皮細胞や神経細胞の損傷を抑えることができる (Gao et al., 2021)。脳梗塞後の運動は脳血流速度を増加させることから (Tian et al., 2013)、せん断応力を増加させ血管内皮細胞や神経細胞の保護に貢献

していると考えられる。また、一酸化窒素は、NMDA 型グルタミン酸受容体構成要素である GluN2B 発現を増加させ、シナプス活性を維持することが知られている (Ramos-Fernández et al., 2016)。以上のことから、本研究において、脳梗塞後の自発運動によって血管面積が増加することは樹状突起スパイン減少緩和と機能回復促進に貢献すると考えられる。

我々の研究において、神経細胞の形態観察を行うことができるのは単一の時点に限られる。脳梗塞後のスパイン減少が起こる時期や運動がスパイン減少を緩和する時期を特定できていないことから、時間経過に沿って神経細胞の状態を観察する必要性がある。

今回の研究で、C.B-17 マウスを用いた再現性の高い脳梗塞モデルマウスに自発運動を促すことで機能回復が促進されることを明らかにした。このとき、脳梗塞巣周囲の随意運動を担う大脳皮質運動野第 5 層においてスパイン減少が緩和され、神経活動が亢進していた。脳梗塞後の自発運動は脳梗塞巣周囲の神経細胞形態を変化させ、神経回路の再構築を行うことで機能回復に貢献すると考えられる。さらに、運動による血管面積の増加が脳梗塞によるスパイン減少の緩和と機能回復促進に関わっている可能性が示唆された。

第3章 脳梗塞後の自発運動によるグリア細胞への影響

第2章では、脳梗塞後の自発運動によって脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第5層において樹状突起スパイン数の減少が緩和されることを明らかにした。脳梗塞巣周囲の神経細胞は損傷されるため (Enright et al., 2007)、脳梗塞後の神経可塑性を促進するためにはそれを支持する環境が必要である。また、神経可塑性を下支えするシナプス構造の可塑的な変化は神経細胞周囲の環境に大きく影響される (Eroglu & Barres, 2010; Song & Dityatev, 2018)。この神経細胞周囲の環境を構成する重要な要素がグリア細胞 (アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト) である (図 3-1)。アストロサイトは、シナプスに接し、過剰な神経伝達物質の除去による神経伝達の制御や、血中から得たグルコースや酸素の神経細胞への供給を担う (Allen & Barres, 2009)。ミクログリアは中枢神経系の免疫細胞であり、不要な死細胞などを貪食することで脳の恒常性維持に貢献する (Allen & Barres, 2009)。オリゴデンドロサイトは神経細胞の軸索にミエリンを形成し、活動電位の伝達速度を速める (Allen & Barres, 2009)。

脳梗塞後には、これらのグリア細胞の増殖が促進され (Li et al., 2014; Sawano et al., 2015, 2019; Wada et al., 2016)、神経細胞周囲の環境変化をもたらす。特に脳梗塞後のアストロサイトやミクログリアはそれぞれ反応性アストロサイト、活性化ミクログリアなどと呼ばれ、健常時とは大きく機能を変化させる (Kreutzberg, 1996; Liddelow et al., 2017; Zamanian et al., 2012)。また、運動はグリア細胞の数や形態、機能に影響を及ぼすことが知られている (Andoh et al., 2019; Lundquist et al., 2019; Zheng et al., 2019)。しかし、特定のグリア細胞を単離し脳梗塞後の運動によるトランスクリプトームの変化をみた研究はこれまでに行われていない。本研究では、脳梗塞後の皮質から目的のグリア細胞のみを単離し、遺伝子発現解析を行うことで脳梗塞後の運動がスパイン形態に影響を与える詳細な機序を明らかにすることを目指した。

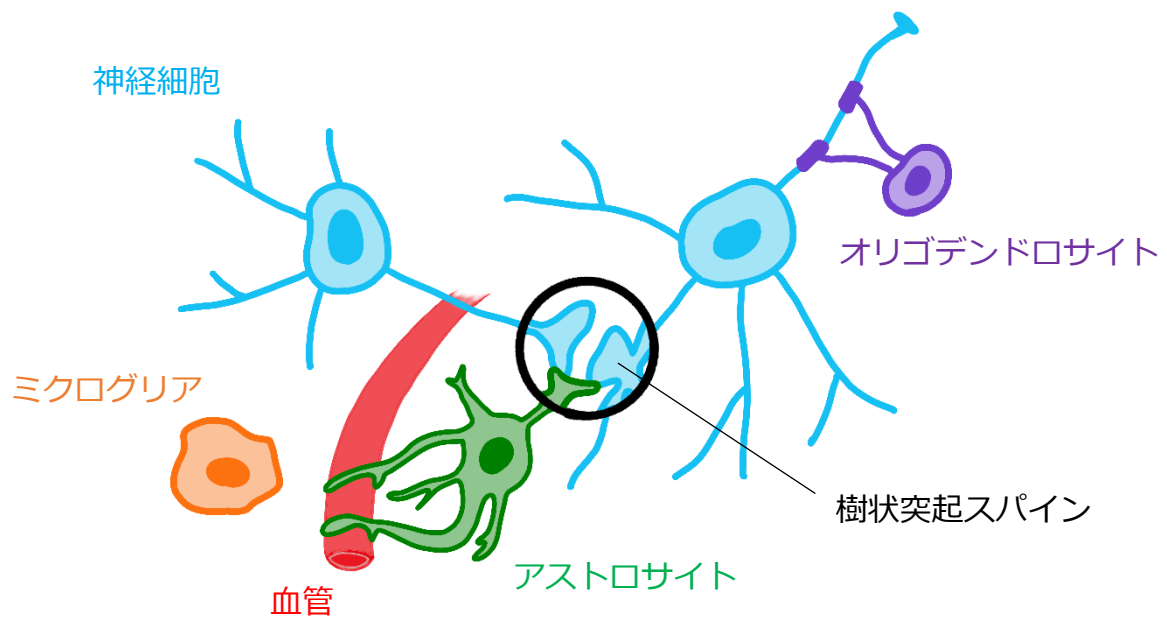


図 3-1. 神経細胞とグリア細胞の関係

グリア細胞は、神経細胞周囲の環境を支持する。オリゴデンドロサイトは神経細胞の軸索にミエリンを形成し、活動電位の伝達速度を速める。ミクログリアは不要な死細胞などを貪食することで脳の恒常性維持に貢献する。アストロサイトは神経伝達の制御、血液脳関門形成、血中から得たエネルギー源の神経細胞への供給を担う。

3.1 実験方法

3.1.1 5-Bromo-2'-deoxyuridine 投与

脳梗塞後に新しく生まれた細胞を標識するために、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; FUJIFILM Wako, Osaka, Japan) を MCAO 直後、POD1、2、3 に腹腔内投与した (50 mg/kg/day)。

3.1.2 免疫染色

灌流固定 (第 2 章 2.1.5.1) 後の脳を 4% PFA で 48 時間後固定し、凍結保護のために 30% スクロース溶液で置換した。Leica CM1860 cryostat を用いて 30 μ m 厚の冠状断切片を作製した。1 時間 25 $^{\circ}$ C でブロッッキング後、1 次抗体と 16 時間 4 $^{\circ}$ C で反応させた：ラット抗 BrdU 抗体 (BU1/75 [ICR1], 1:1,000; Abcam, Cambridge, UK)、ラビット抗 ionized calcium-binding adapter molecule 1 抗体 (Iba1, 1:500; FUJIFILM Wako, Osaka, Japan)、ラビット抗 glutathione S-transferase- π 抗体 (GST- π , 1:1,000; MBL, Tokyo, Japan)、マウス抗 glial fibrillary

acidic protein 抗体 (GFAP, 2E1.E9, 1:500; BioLegend, San Diego, CA, USA)、ラビット抗 GFAP 抗体 (1:2,000; Agilent, Santa Clara, CA, USA)。3 時間 25 °C で 2 次抗体と反応させた: ビオチン標識抗ラット IgG (1:2,000; KPL, Milford, MA, USA)、Alexa Fluor 488 標識抗ラット IgG (1:2,000, Abcam)、Alexa Fluor Plus 488 標識抗ラビット IgG (1:2,000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、Alexa Fluor 546 標識抗ラビット IgG (1:2,000, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor Plus 647 標識抗ラビット IgG (1:2,000, Thermo Fisher Scientific)、Alexa Fluor 647 標識抗マウス IgG (1:2,000, Thermo Fisher Scientific)、ビオチン標識した 2 次抗体は streptavidin 488 (1:2,000, Thermo Fisher Scientific) で可視化した。BrdU 検出のため、切片を 1N HCl に 30 分 37 °C、30 分 25 °C で処理してから免疫染色を行った。細胞核は DAPI (1:5,000, Sigma, Darmstadt, Germany) で可視化した。

3.1.3 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick 3'-end labeling (TUNEL) 評価

死細胞検出のため、GFAP、DAPI を染色した切片に対して DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて TUNEL アッセイを行った。15 分間 equilibration buffer に浸けたあと、fluorescein-12-dUTP と terminal deoxynucleotidyl transferase に 60 分 37 °C で反応させた。

3.1.4 画像取得

運動野が観察できる bregma 1.98 mm から bregma 1.70 mm の切片を用いた。共焦点顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i; OLYMPUS, Tokyo, Japan)、対物レンズ 60 倍 (OLYMPUS PlanApo, NA = 1.4) もしくは ECLIPSE Ti2 顕微鏡 (Nikon, Tokyo, Japan) に共焦点ユニット (MAICO; HAMAMATSU PHOTONICS, Shizuoka, Japan) を取り付けたものに対物レンズ 40 倍 (Nikon Plan Apo, NA = 1.0) を用いて撮影した。核の凝縮が起こっている領域を脳梗塞巣とした。1 視野 212 μm \times 212 μm の画像を 4 枚撮影し、脳梗塞巣に隣接した 424 μm \times 424 μm の領域を解析した。1 視野 150 μm \times 200 μm の画像を 6 枚撮影し、脳梗塞巣に隣接した 450 μm \times 400 μm の領域を解析した。

3.1.5 Iba1 陽性面積測定

取得した画像は、ソフトウェア Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>) を用いて解析した。Iba1 を染色した画像を 8-bit に変換し、Default algorithm を用いて二値化した。Iba1 陽性領域を自動的に計測した。

3.1.6 アストロサイト分画回収

POD15 に、梗塞側皮質からアストロサイトを分画回収した。2 匹または 3 匹を合わせて 1 サンプルとした。20 U/mL パパインと 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase I を 10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-

1-piperazinyl] ethanesulfonic acid-NaOH (pH 7.4) に溶かした溶液に組織を採取し、18G の針を通して解離させた。30 分 37 °C でインキュベーションしたあと、27G の針に 2 回ずつ通し、更に解離させた。細胞懸濁液を 70 μ m セルストレーナーを用いてさらに単一細胞に篩い分けた。セルストレーナーを 10 mL の 2% fetal bovine serum (FBS) および 1 mM EDTA を含む PBS (反応用バッファーとする) で洗い流し、300 \times g、3 分、4 °C で遠心した。細胞を 500 μ L 反応用バッファーに再懸濁し、300 \times g、3 分、4 °C で遠心したのち上清を除去した。34 μ L 反応用バッファーに 66 μ L の 30 μ g/mL ビオチン標識抗 astrocyte cell surface antigen-2 抗体 (anti-ACSA-2; Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, Bergisch Gladbach, Germany) を合わせ、細胞を懸濁した。15 分後、4 mL の反応用バッファーを添加し、ピペッティング後 300 \times g、5 分、25 °C で遠心した。上清を除去し、100 μ L の反応用バッファーに細胞を懸濁した。10 μ L の Mojosort Streptavidin Nanobeads (BioLegend, San Diego, CA, USA) を添加し、15 分反応させた。2.5 mL の反応用バッファーを添加し、ピペッティングした。チューブを EasyEights EasySep Magnet (VERITAS, Santa Clara, CA, USA) に 10 分間静置し、上清を除去した。この操作を 3 回行い、磁氣的に回収した細胞を最終的に 200 μ L の反応用バッファーに懸濁した。

3.1.7 マイクロアレイ

RNA は TRIZOL reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出した。1 グループ 4 つのサンプルから RNA を約 70 ng ずつ合わせて 1 つにした。各グループ約 200 ng の RNA を Clariom™ S Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いた受託解析サービス (Filgen, Aichi, Japan) を利用して解析した。データは NCBI の Gene Expression Omnibus database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE210674>) にてアクセス可能である。ネガティブコントロールよりも発現が低い遺伝子を除外し、発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes: DEGs) を \log_2 fold change > 1 (発現上昇)、< -1 (発現低下) とした。非運動群と比較して運動群において発現低下した遺伝子は Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>, accessed on June 2022) を用いて gene ontology (GO) biological processes に当てはめて分類した。遺伝子の識別子を対応する *Mus musculus* の Entrez gene ID に最新のデータベースを用いて変換した (2022 年 4 月 22 日アップデート)。P-value < 0.01、minimum count 3、enrichment factor > 1.5 のタームをクラスター分類した。

3.1.8 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

RNA は TRIZOL reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて各サンプル 100 ng の RNA から cDNA を作製した。qPCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)、KOD SYBR qPCR Mix を用いて行った。用いたプライマーは以下の通りで

ある（表 3-1）。目的遺伝子の発現量は、*36b4* の発現量で標準化した。全てのデータを、MCAO+運動群の平均発現量で割ったものを示した。

表 3-1. qPCR に用いたプライマー

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>36b4</i>	TCATCCAGCAGGTGTTTGACA	GGCACCGAGGCAACAGTT
<i>Vascular endothelial growth factor A (Vegfa)</i>	GCTACTGCCGTCCGATTGAG	TGATCCGCATGATCTGCATGG
<i>Lipocalin 2 (Lcn2)</i>	CCACCACGGACTACAACCAG	AGTCCTTGGTTCTTCCATACA

3.1.9 統計

データは平均値±標準誤差で表した。n≥5 のサンプル数に対し、Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いたウェルチの *t* 検定によって解析した。p<0.05 を有意差ありとした。BrdU 染色の実験において、MCAO+非運動群から 1 匹、MCAO+運動群から 3 匹を染色不良により除外した。

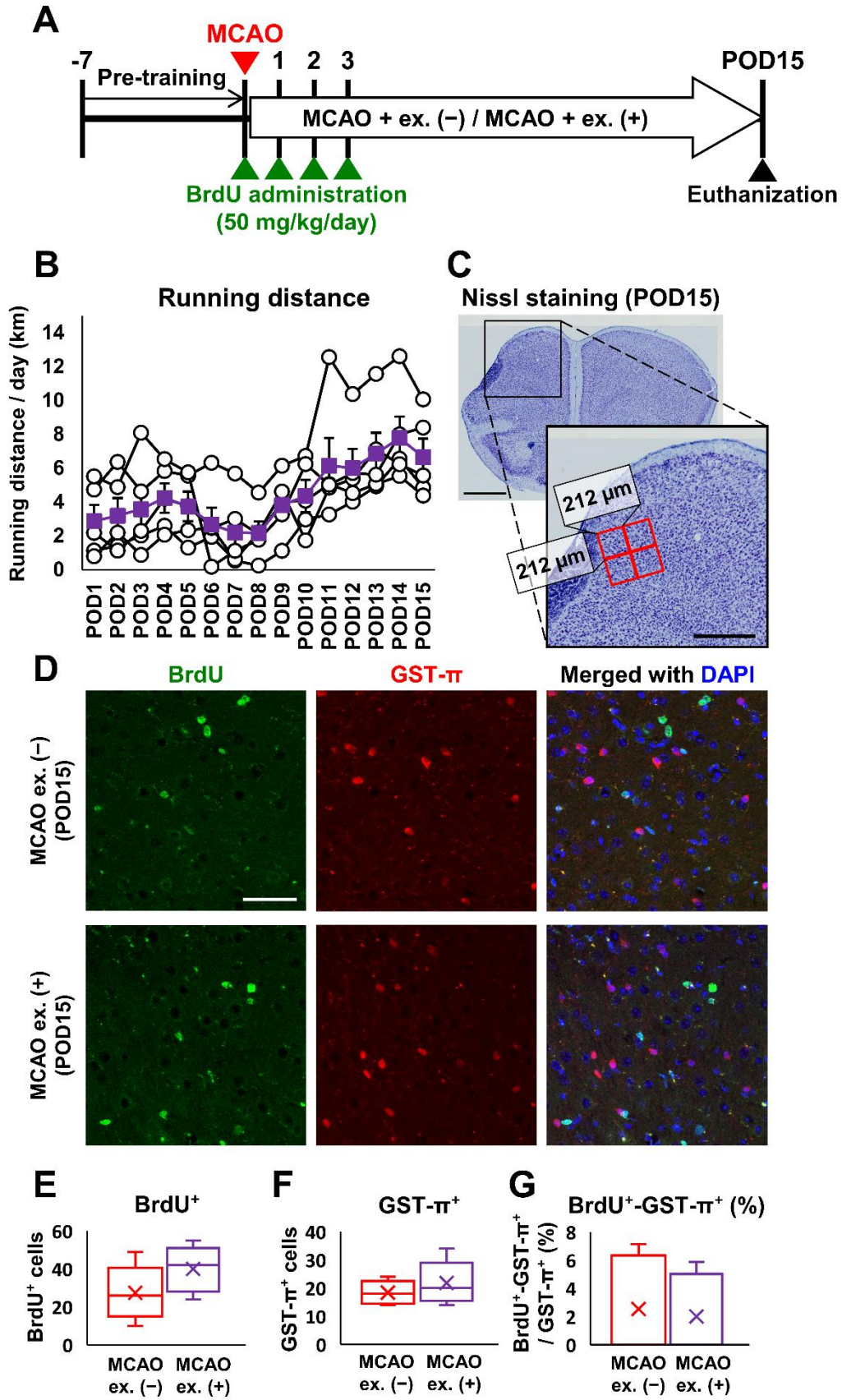
3.2 実験結果

3.2.1 運動は新生アストロサイトの割合を POD15 において増加させた

第 2 章において、脳梗塞後の運動が POD15 での機能回復を促進し、樹状突起スパイン減少を緩和することを明らかにした。脳梗塞巣周囲の神経細胞は損傷されるため (Enright et al., 2007)、脳梗塞後の神経可塑性を促進するためにはそれを支持する環境が必要である。グリア細胞はその重要な構成要素であるため、POD15 において運動がグリア細胞に与える影響について検討した。脳梗塞巣周囲におけるグリア細胞の増殖は、脳梗塞後 3 日目に顕著であると報告されている (Li et al., 2014; Sawano et al., 2015)。脳梗塞後に新生した細胞はその厳しい環境に対応するため、脳梗塞以前から存在していた細胞とは異なる機能をもつことが予想される。それゆえ、我々は脳梗塞直後から 3 日目までに新生した細胞に運動が与える影響を脳梗塞後 15 日目において観察した。脳梗塞直後から 3 日目までに新生した細胞を標識するために BrdU を POD0 (脳梗塞直後)、1、2、3 に投与した (図 3-1A)。

MCAO+運動群の 5 匹のマウスのうち、4 匹は脳梗塞から 24 時間で 1 km 以上の走行量を示し、走行量は POD8 から徐々に増加していった (図 3-1B)。このことから、脳梗塞後早期から非運動群と運動群の運動量に差があることが分かった。脳梗塞直後から 3 日目までに新生した細胞数 (BrdU 陽性細胞数) とグリア細胞数を、POD15 における脳梗塞巣周囲 (424 μm × 424 μm) で計測した (図 3-1C)。BrdU 陽性細胞数は、MCAO+非運動群と

MCAO+運動群で差がみられなかった (図 3-1D, E)。オリゴデンドロサイトは抗 GST- π 抗体を用いて可視化した。GST- π 陽性細胞数は、MCAO+非運動群と MCAO+運動群で差がみられなかった (図 3-1F)。脳梗塞直後から 3 日目までに新生した GST- π 陽性細胞が全 GST- π 陽性細胞に占める割合は低く、MCAO+非運動群と MCAO+運動群の間にも差はなかった (図 3-1G)。ミクログリアは抗 Iba1 抗体を用いて可視化した。ミクログリアの活性化は Iba1 染色領域の増加をもって示される (Kopp et al., 2013; Sloka et al., 2013; Wang et al., 2014)。Iba1 陽性細胞は肥大した形態を示し (図 3-1H)、ミクログリアの活性化が 15 日目まで持続していることが分かった。Iba1 陽性細胞数、脳梗塞直後から 3 日目までに新生した Iba1 陽性細胞が全 Iba1 陽性細胞に占める割合は運動によって変化しなかった (図 3-1I, J)。また、Iba1 陽性面積に MCAO+非運動群と MCAO+運動群で差はみられなかった (図 3-1K)。アストロサイトは抗 GFAP 抗体を用いて可視化した。ただし、GFAP は反応性アストロサイトにおいて発現が上昇するため、可視化できる GFAP 陽性細胞は全アストロサイトの一部である (Eng & Ghirnikar, 1994; Wilhelmsson et al., 2006)。GFAP 陽性細胞数は MCAO+非運動群と MCAO+運動群で変化しなかった (図 3-1L, M)。一方で、脳梗塞直後から 3 日目までに新生した GFAP 陽性細胞が全 GFAP 陽性細胞に占める割合は MCAO+非運動群と比較して MCAO+運動群において有意に増加していた (図 3-1N)。脳梗塞後の自発運動は、POD15 における全 GFAP 陽性アストロサイトのうち、POD3 までに新生した GFAP 陽性アストロサイトが占める割合を増加させることが分かった。



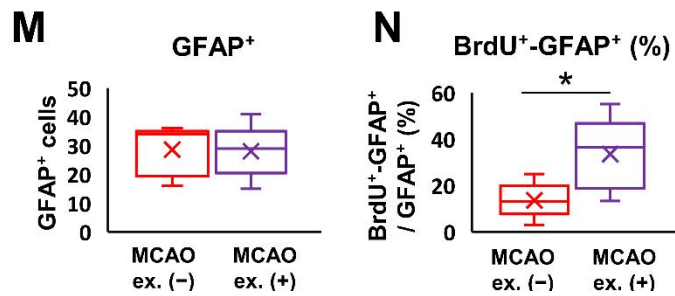
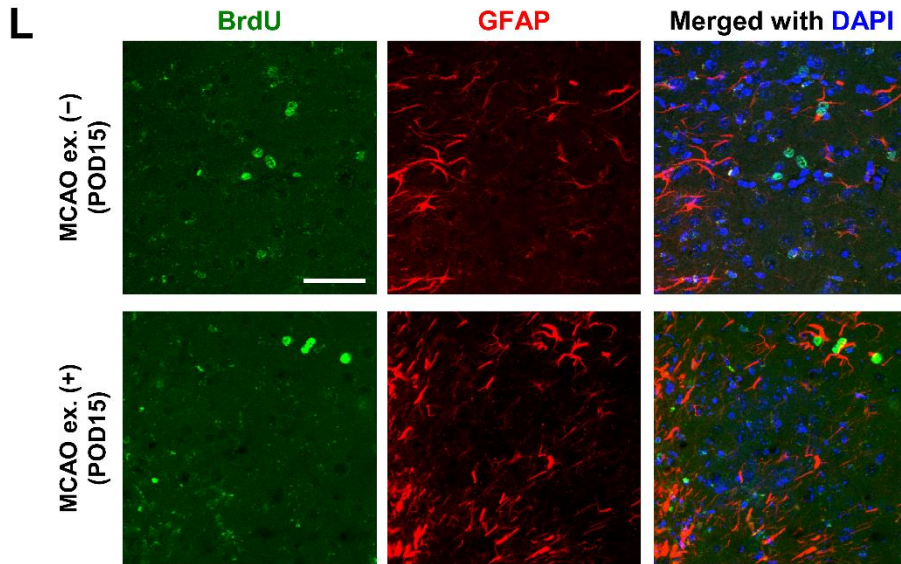
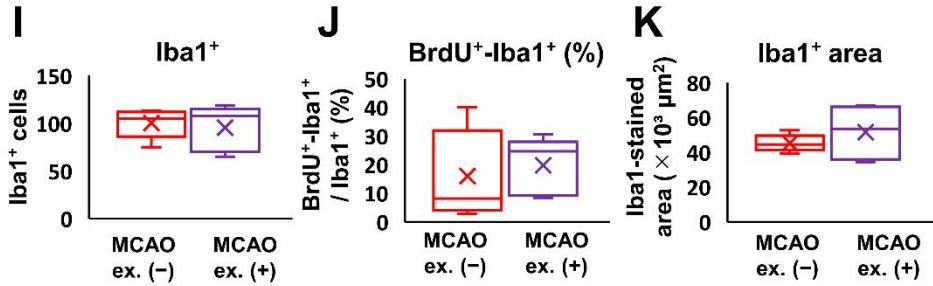
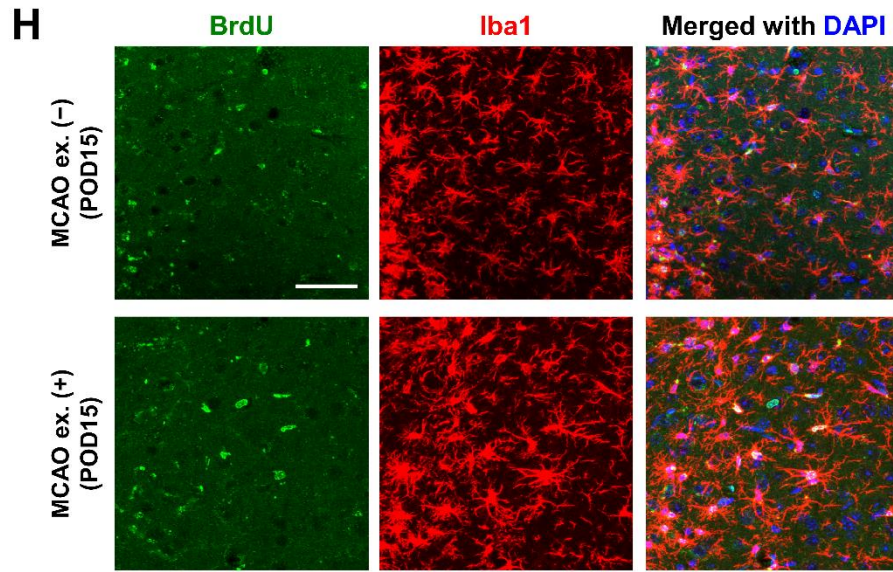


図 3-1. 自発運動によって新生 GFAP 陽性細胞の POD15 における割合が増加した

(A) 1 週間のプレトレーニング後、マウスを MCAO+非運動群 {MCAO ex. (-)}、MCAO+運動群 {MCAO ex. (+)} に分けた。脳梗塞直後から 3 日目まで BrdU 投与を行い、この時期に新生した細胞を標識した。

(B) 脳梗塞後 24 時間あたりの個々の走行距離 (白) と平均走行距離 (紫)。

(C) POD15 におけるニッスル染色。1 視野 $212\ \mu\text{m} \times 212\ \mu\text{m}$ の写真を 4 枚撮影し、脳梗塞巣に隣接する $424\ \mu\text{m} \times 424\ \mu\text{m}$ 領域を解析した。スケールバー：1 mm (左)、 $500\ \mu\text{m}$ (右)。

(D) POD15 において BrdU とオリゴデンドロサイトマーカー GST- π 染色を行った切片。脳梗塞巣は画像の左に位置する。スケールバー： $50\ \mu\text{m}$ 。

(E-G) BrdU 陽性細胞数 (E)、GST- π 陽性細胞数 (F)、全 GST- π 陽性細胞に対する BrdU-GST- π 二重陽性細胞の割合 (G)。

(H) POD15 において BrdU とミクログリアマーカー Iba1 染色を行った切片。脳梗塞巣は画像の左に位置する。スケールバー： $50\ \mu\text{m}$ 。

(I, J) Iba1 陽性細胞数 (I)、全 Iba1 陽性細胞に対する BrdU-Iba1 二重陽性細胞の割合 (J)。

(K) Iba1 染色した画像を二値化し、Iba1 陽性面積を計測した。

(L) POD15 において BrdU とアストロサイトマーカー GFAP 染色を行った切片。脳梗塞巣は画像の左に位置する。スケールバー： $50\ \mu\text{m}$ 。

(M, N) GFAP 陽性細胞数 (M)。全 GFAP 陽性細胞に対する BrdU-GFAP 二重陽性細胞の割合 (N)。

n = 5 マウス {MCAO ex. (-)}、n = 5 マウス {MCAO ex. (+)}。

プロットは各個体を表す。バーは平均値±標準誤差。

* $p < 0.05$ 。

3.2.2 運動は脳梗塞後初期のアストロサイト増殖を促進しなかった

POD15において、脳梗塞直後からPOD3までに新生したGFAP陽性細胞が全GFAP陽性細胞に占める割合が運動によって有意に増加していたことから(図3-1N)、脳梗塞後初期の時点で運動がアストロサイト増殖を亢進させるのか検討した。脳梗塞後早期から1日1km以上の運動量が運動群において確保できていること(図3-1B)、脳梗塞後のGFAP陽性細胞の増殖は3日目に顕著に誘導されることから(Li et al., 2014)、POD3において脳梗塞巣に隣接した450 μm \times 400 μm の領域に存在する細胞周期マーカーKi67とGFAP陽性細胞数を計測した(図3-2A)。Ki67は細胞増殖を休止しているG0期以外の全ての細胞周期に存在する核タンパク質である。Sham群の皮質ではKi67陽性細胞、GFAP陽性細胞、Ki67-GFAP二重陽性細胞は殆ど観察できなかった(図3-2B)。一方で、MCAOによってKi67陽性細胞数、GFAP陽性細胞数、Ki67-GFAP二重陽性細胞が全GFAP陽性細胞に占める割合が増加した(図3-2B-E)。しかしながら、運動によってKi67-GFAP二重陽性細胞が全GFAP陽性細胞に占める割合は増加しなかった(図3-2E)。このことから、運動によるPOD15における新生アストロサイト割合の増加は、脳梗塞後初期のGFAP陽性アストロサイト増殖亢進によるものではないということが分かった。

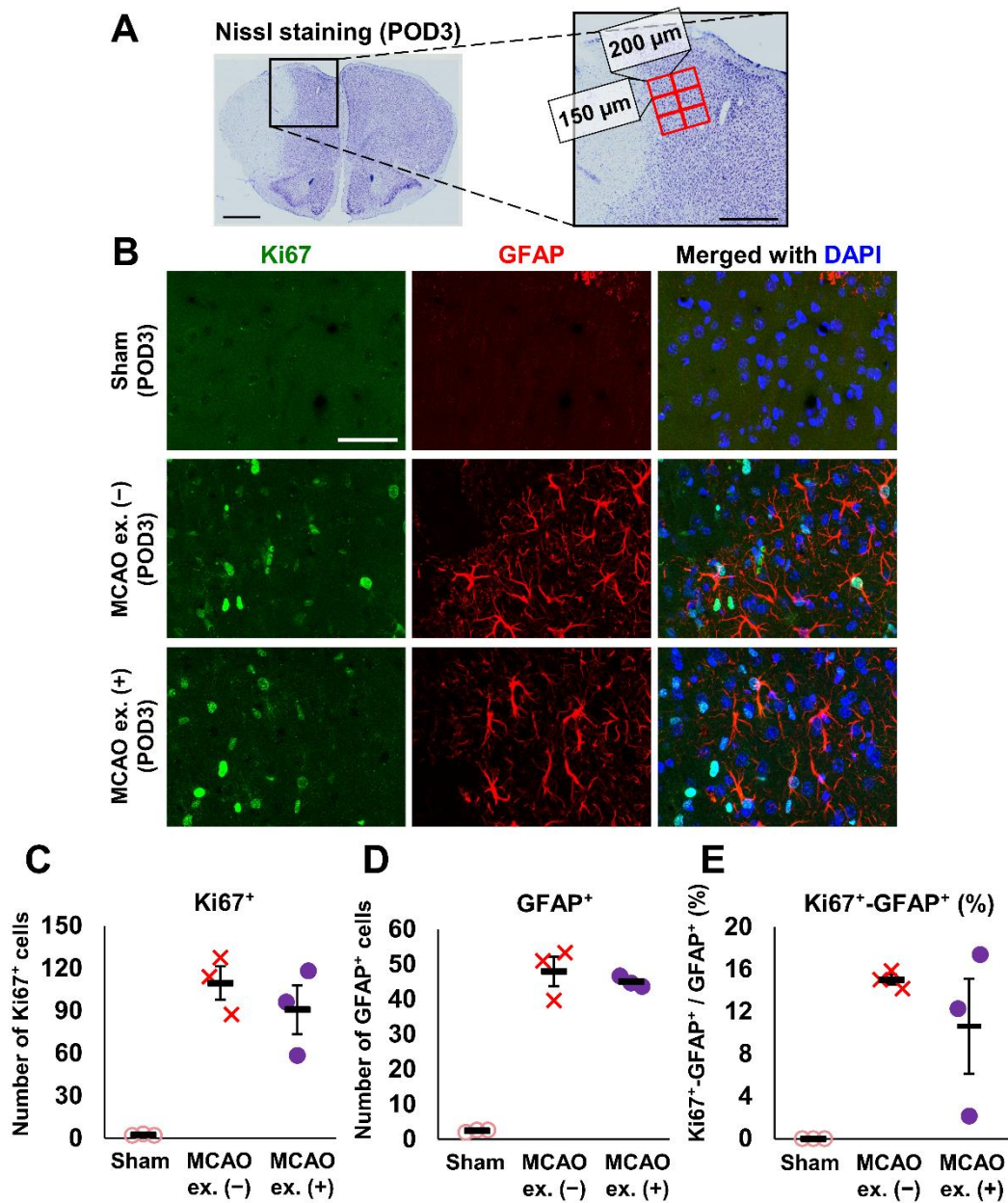


図 3-2. 自発運動は POD3 時点での GFAP 陽性細胞の増殖を促進しなかった

(A) POD3 におけるニッスル染色。1 視野 $150\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ の写真を 6 枚撮影し、脳梗塞巣に隣接する $450\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ 領域を解析した。スケールバー：1 mm (左)、 $500\ \mu\text{m}$ (右)。

(B) POD3 において細胞周期マーカー Ki67 と GFAP 染色を行った切片。脳梗塞巣は画像の左に位置する。スケールバー： $50\ \mu\text{m}$ 。

(C-E) Ki67 陽性細胞数 (C)、GFAP 陽性細胞数 (D)、全 GFAP 陽性細胞に対する Ki67-GFAP 二重陽性細胞の割合 (E)。

$n = 3$ マウス (Sham)、 $n = 3$ マウス {MCAO ex. (-)}、 $n = 3$ マウス {MCAO ex. (+)}。プロットは各個体の 3 切片の平均値を表す。バーは平均値 \pm 標準誤差。

3.2.3 運動は脳梗塞後のアストロサイト細胞死に影響を与えなかった

脳梗塞直後から POD3 までに新生したアストロサイト (BrdU-GFAP 二重陽性細胞) の細胞死が運動によって抑制され、脳梗塞以前から存在していたアストロサイト (BrdU 陰性 GFAP 陽性細胞) の細胞死が増加していれば、POD15 において新生アストロサイトが占める割合が MCAO+運動群で増加したことが説明できる。GFAP 陽性細胞数は POD6 以降減少することが報告されている (Li et al., 2014)。このことから、POD6 において脳梗塞巣に隣接した $450\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ の領域で TUNEL 染色を行った (図 3-3A)。TUNEL 染色は、細胞死によって生じた断片化 DNA を検出するために行うものである。TUNEL 陽性細胞は脳梗塞巣境界線周囲で主に観察された (図 3-3B)。GFAP 陽性細胞数、TUNEL 陽性細胞数、TUNEL-GFAP 二重陽性細胞数は MCAO+非運動群と比較して MCAO+運動群で変化しなかった (図 3-3C, D, E)。さらに、TUNEL-GFAP 二重陽性細胞数は両群においてわずかであった ($< 1.4\ \text{cells}$)。これらのことから、POD15 において新生アストロサイトが占める割合が MCAO+運動群で増加したことは、運動によってアストロサイトの細胞死に変化があったからではないということが分かった。よって、全 GFAP 陽性アストロサイト数を増加させることなく BrdU-GFAP 二重陽性細胞の割合が MCAO+運動群において増加したことは、運動が BrdU を取り込んだ細胞の GFAP 発現低下を抑制し、脳梗塞以前から存在していたアストロサイトの GFAP 発現低下を促進したことによって起こった可能性が考えられる。

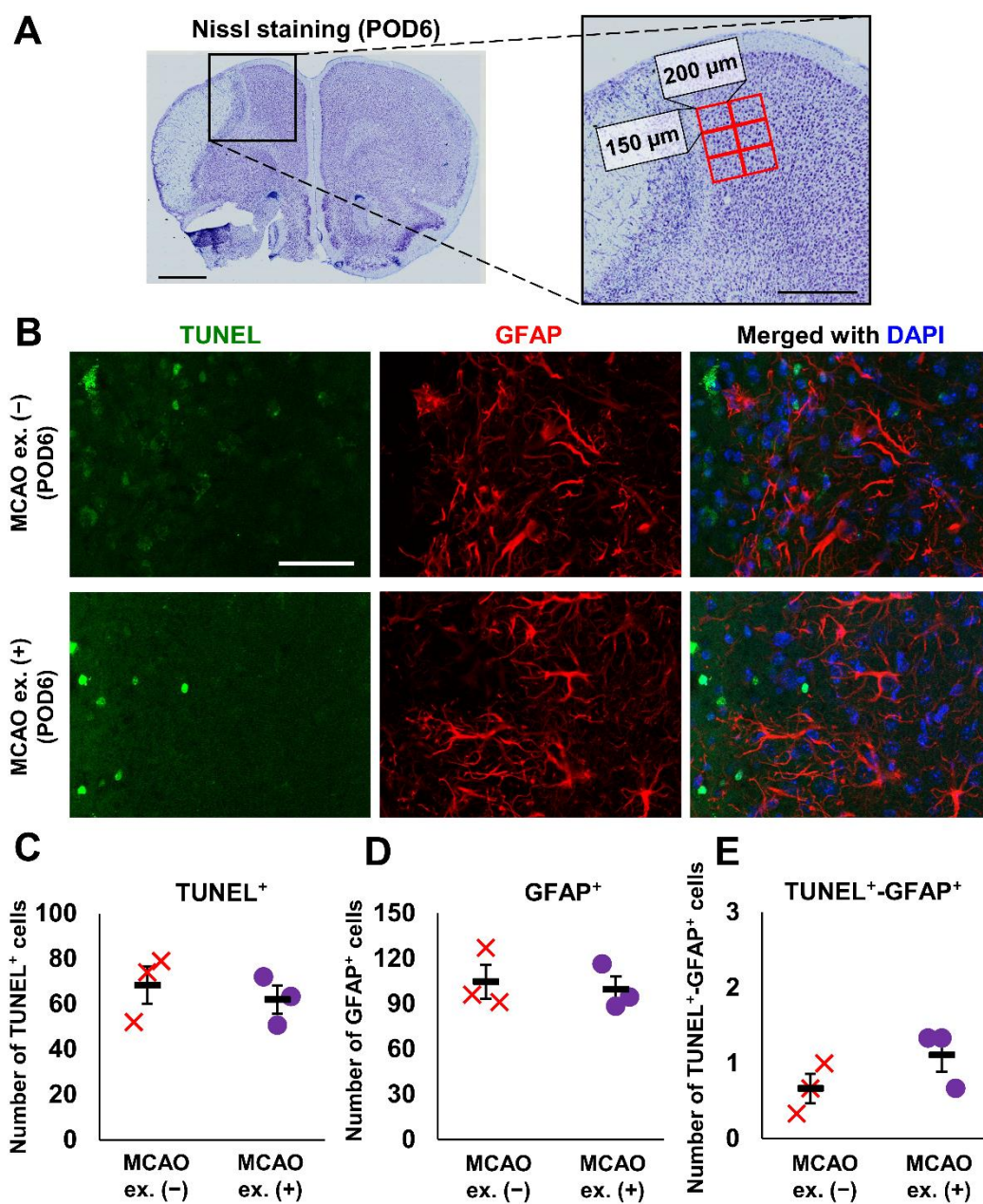


図 3-3. POD6 における TUNEL 及び GFAP 染色

(A) POD6 におけるニッスル染色。1 視野 $150\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ の写真を 6 枚撮影し、脳梗塞巣に隣接する $450\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ 領域を解析した。スケールバー：1 mm (左)、 $500\ \mu\text{m}$ (右)。

(B) POD6 において死細胞マーカー TUNEL と GFAP 染色を行った切片。脳梗塞巣は画像の左に位置する。スケールバー： $50\ \mu\text{m}$ 。

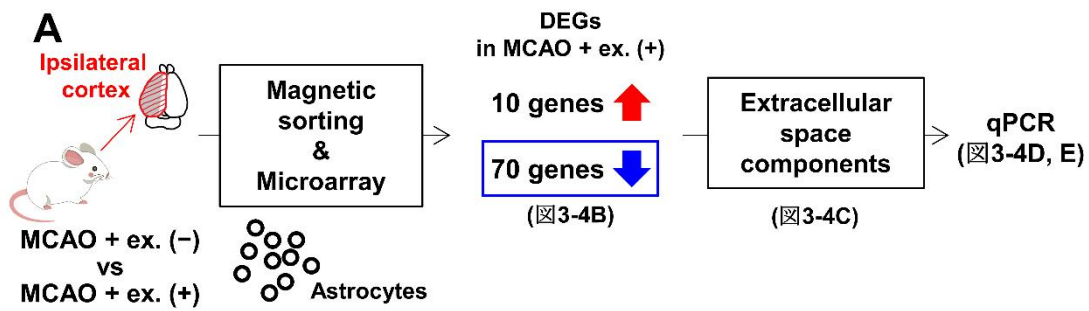
(C-E) TUNEL 陽性細胞数 (C)、GFAP 陽性細胞数 (D)、TUNEL-GFAP 二重陽性細胞の数 (E)。

$n = 3$ マウス {MCAO ex. (-)}、 $n = 3$ マウス {MCAO ex. (+)}。

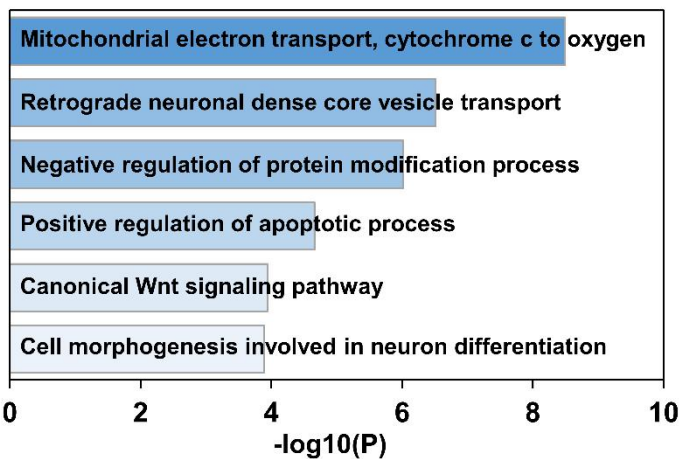
プロットは各個体の 3 切片の平均値を表す。バーは平均値 \pm 標準誤差。

3.2.4 運動は脳梗塞後のアストロサイト *Lcn2* 発現を減少させた

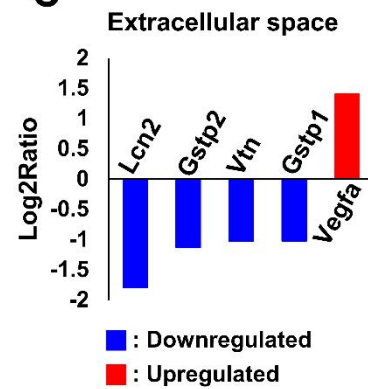
運動によって新生アストロサイトの割合が増加したことが、アストロサイトの機能変化を引き起こすのではないかと考え、MCAO+非運動群とMCAO+運動群のアストロサイトトランスクリプトームをPOD15において比較した。アストロサイトは梗塞側の皮質から分画回収した。MCAO+非運動群と比較して、MCAO+運動群では10遺伝子が発現上昇し、70遺伝子が発現減少していた(図3-4A)。MCAO+運動群のアストロサイトで発現減少していた遺伝子群にはGO biological processes termである“Cell morphogenesis involved in neuron differentiation”が上位に含まれていた(図3-4B)。脳梗塞による樹状突起スパイン減少が運動によって緩和される機序を明らかにするため、アストロサイトから分泌されることで神経細胞に作用し得る因子を探した。運動によって発現が変動した遺伝子から、GO cellular component termである“extracellular components”でアノテーションされた遺伝子を抽出した(図3-4A)。その結果、発現上昇した1つの遺伝子 *Vegfa* と発現減少した4つの遺伝子 *Lcn2*、*Glutathione S-transferase, pi 2 (Gstp2)*、*Vitronectin (Vtn)*、*Glutathione S-transferase, pi 1 (Gstp1)* が挙げられた(図3-4C)。最も発現が変動していた *Vegfa* と *Lcn2* は樹状突起スパイン密度に関わることが知られている。VEGFAは樹状突起スパイン形成を誘導し(Licht et al., 2010)、*Lcn2* は樹状突起スパイン密度を減少させる(Mucha et al., 2011)。また、第2章において、運動によって血管面積の増加がみられたことから(図2-7)、血管新生を促進する *Vegfa* の発現が運動群で上昇することを期待した。脳梗塞後のアストロサイトにおける *Vegfa* と *Lcn2* の発現をqPCRによって確認したところ、*Lcn2* 発現が運動によって減少する傾向($p=0.074$)にあった(図3-4D, E)。さらに、POD15における *Lcn2* のタンパク質レベルでの発現を脳梗塞巣に隣接した $450\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ の領域で解析した(図3-4F)。*Lcn2* の発現は主に脳梗塞巣境界付近で観察された(図3-4G)。全GFAP陽性細胞のうち、*Lcn2*-GFAP二重陽性細胞が占める割合が運動によって有意に減少することを確認し(図3-4H)、運動が脳梗塞後のアストロサイトの表現型に影響を与えることが明らかになった。脳梗塞後の運動はアストロサイトに作用し、スパイン密度を減少させる *Lcn2* の発現を減少させることで脳梗塞後のスパイン数減少緩和に貢献する可能性が示唆された。



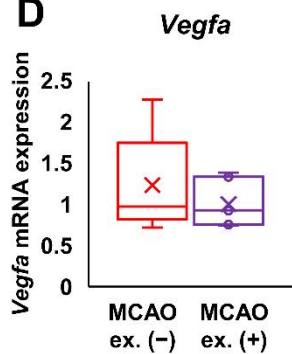
B Enrichment Analysis (GO Biological Processes)



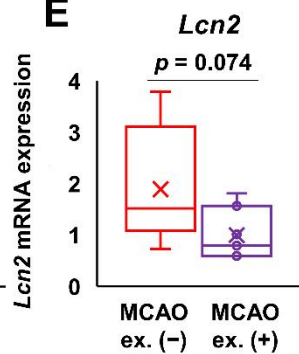
C



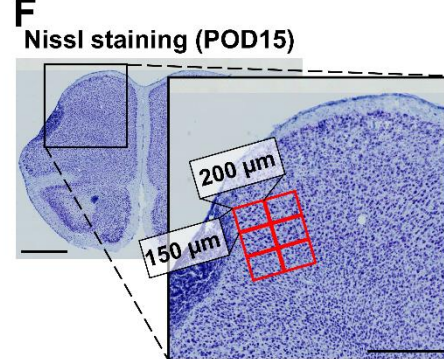
D



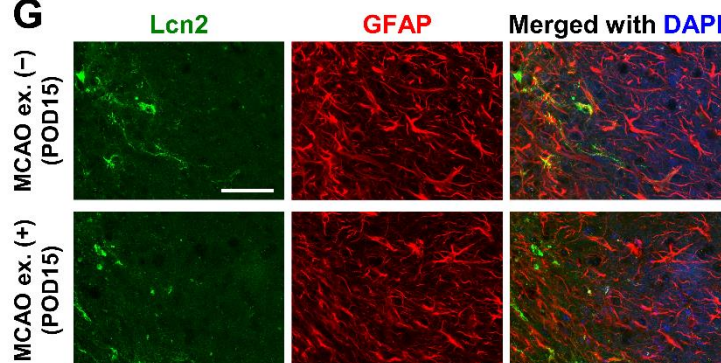
E



F



G



H

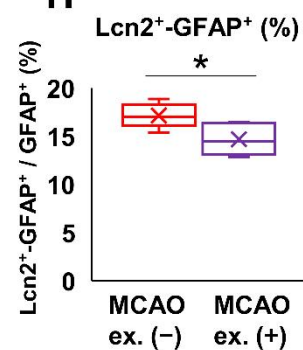


図 3-4. 自発運動によって脳梗塞後のアストロサイト *Lcn2* 発現が減少した

(A) MCAO+非運動群 {MCAO ex. (-)}、MCAO+運動群 {MCAO ex. (+)} の脳梗塞側皮質からアストロサイトを分画回収し、トランスクリプトーム解析を行った。ネガティブコントロールよりも発現が低い遺伝子を除外し、発現変動遺伝子を \log_2 fold change > 1 (発現上昇)、< -1 (発現低下) とした。GO cellular component term である “extracellular components” でアノテーションされた遺伝子を抽出し、qPCR を行った。

(B) MCAO+運動群で発現が減少していた 70 遺伝子に対して GO biological process エンリッチメント解析を行い、上位 6 位のクラスターを示した。

(C) MCAO+運動群における発現変動遺伝子のうち、GO cellular component term である “extracellular space” に関連する遺伝子。

(D, E) 脳梗塞後のアストロサイトにおける *Vegfa* (D) と *Lcn2* (E) の mRNA 発現量。n=8 サンプル {MCAO ex. (-)}、n=7 サンプル {MCAO ex. (+)}。2 または 3 マウスを 1 サンプルとした。

(F) POD15 におけるニッスル染色。1 視野 $150\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ の写真を 6 枚撮影し、脳梗塞巣に隣接する $450\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$ 領域を解析した。スケールバー：1 mm (左)、 $500\ \mu\text{m}$ (右)。

(G) POD15 において *Lcn2* (緑) と GFAP (赤) 染色を行った切片。脳梗塞巣は画像の左に位置する。スケールバー： $50\ \mu\text{m}$ 。

(H) 全 GFAP 陽性細胞に対する *Lcn2*-GFAP 二重陽性細胞の割合。n=5 マウス {MCAO ex. (-)}、n=5 マウス {MCAO ex. (+)}。

箱ひげ図において、×は平均値、箱内の線は中央値、箱の両端は第三四分位数 (上端)、第一四分位数 (下端)、ひげは四分位範囲の 1.5 倍を上下限とした。

* $p < 0.05$ 。

3.3 考察

第2章では、脳梗塞後の自発運動によって脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第5層において樹状突起スパイン数の減少が緩和されることを明らかにした。神経細胞の機能や構造は神経細胞周囲の環境に支持されていることから、脳梗塞後の運動によって引き起こされるグリア細胞の変化に着目した。グリア細胞は脳梗塞後の皮質において活発に増殖し (Li et al., 2014; Sawano et al., 2015, 2019; Wada et al., 2016)、神経細胞周囲の環境に影響を与え得る。脳梗塞後に新生したグリア細胞が神経細胞形態に影響を与えるためには、ある程度の期間残存する必要があると考えた。脳梗塞巣周囲のグリア細胞の増殖は POD3 頃が顕著であるとの報告があるため (Li et al., 2014; Sawano et al., 2015)、POD3 までに新生した細胞を BrdU 投与によって標識し、運動によるスパイン減少緩和がみられた POD15 における残存を確認した。脳梗塞後の運動は、POD3 までに新生し POD15 まで残存した GFAP 陽性アストロサイトが全 GFAP 陽性アストロサイトに占める割合を増加させた (図 3-1L-N)。POD3 に行った Ki67 染色によって、GFAP 陽性アストロサイトの脳梗塞後初期の増殖の程度は非運動群と運動群で差がないことが分かった (図 3-2)。これらの結果より、脳梗塞後初期に新生し POD15 まで残存した GFAP 陽性アストロサイトの割合が運動群で増加していたのは、運動によって脳梗塞後初期のアストロサイト増殖が亢進していたからではないということが言える。GFAP 陽性細胞数は脳梗塞後初期に増加し、POD6 以降減少する (Li et al., 2014)。しかしながら、POD6 において GFAP 陽性細胞の細胞死は殆ど存在せず、TUNEL-GFAP 二重陽性細胞数も運動によって変化しなかった (図 3-3)。これらのことから、脳梗塞後初期に新生し POD15 まで残存した GFAP 陽性アストロサイトの割合が運動群で増加していたのは、GFAP 陽性アストロサイト細胞死の程度が群間で変化したからではないと考えられる。そこで、アストロサイトにおける GFAP 発現の可変性に着目した。GFAP-*CreERTM;tdRFP* マウスを用い、脳梗塞後にタモキシフェンを投与した実験では、約 25% の tdRFP 陽性細胞が GFAP で免疫染色されなかったという報告がある (Shimada et al., 2012)。これは GFAP 陽性アストロサイトが脳梗塞後に GFAP 発現を低下させたことを意味する。POD3 において運動はアストロサイトの増殖を亢進させなかったことから、POD3 までの BrdU 取り込み量は MCAO+非運動群と MCAO+運動群で同程度であったと考えられる。これに加え、脳梗塞後のアストロサイト細胞死は両群で殆ど起こっていなかった。以上の結果より、運動は BrdU を取り込んだ細胞の GFAP 発現低下を抑制し、一方で脳梗塞以前から存在していたアストロサイトの GFAP 発現低下を促進したと考えられる。その結果、全 GFAP 陽性アストロサイト数を増加させることなく BrdU-GFAP 二重陽性細胞の割合が MCAO+運動群において増加した (図 3-5)。

GFAP 陽性細胞は POD6 以降に減少することから (Li et al., 2014)、運動は脳梗塞後 1 週間頃に GFAP 発現に作用し得ることが本研究において示唆された。MCAO+運動群の 5 匹のマウスのうち 4 匹の走行距離は脳梗塞後 24 時間で 1 km 以上に達し、POD8 以降徐々に

増加していく (図 3-1B)。このことから、アストロサイトにおける GFAP 発現の変化は 1 週間以上の継続的な自発運動と 1 週間後頃の高強度の運動の相乗効果によってもたらされると考えられる。

GFAP は反応性アストロサイトのマーカーであることから (Eng & Ghimikar, 1994)、この GFAP 発現の変化はアストロサイト活性における変化を意味する。反応性アストロサイトは、そのサブタイプによってそれぞれ異なるトランスクリプトームや機能を持ち

(Liddel et al., 2017; Zamanian et al., 2012)、それらの表現型は状況によって変化する

(Zamanian et al., 2012)。脳梗塞後に新生した細胞はその厳しい環境に対応するため、脳梗塞以前から存在していた細胞とは異なる機能をもつことが予想される。運動群では、脳梗塞後に新生し POD15 まで残存した GFAP 陽性アストロサイトの割合が非運動群と比較して増加していた。このことから、非運動群のアストロサイトと運動群のアストロサイトでは異なる機能を持つ可能性を期待し、トランスクリプトームを比較した。その結果、運動群のアストロサイトでは“Cell morphogenesis involved in neuron differentiation”に関わる遺伝子群が発現変動しており、運動によるアストロサイトの変化が脳梗塞後の樹状突起スパイン減少抑制に関与している可能性が示された。マイクロアレイにより、MCAO+運動群のアストロサイトにおいて神経細胞形態に影響しうる因子として *Lcn2* mRNA 発現量が減少する可能性が示唆されたため、これを qPCR によって確認した。しかし、傾向は示されたものの有意な減少を確認することはできなかった (図 3-4E)。その一方で、運動によってアストロサイトにおける *Lcn2* の発現がタンパク質レベルで有意に減少していた (図 3-4G, H)。*Lcn2* の翻訳は miR-138 によって阻害され (Xiong et al., 2016)、miR-138 は傷害を受けた皮質において運動によって上昇することが知られている (Miao et al., 2015)。運動によって増加した miR-138 によって *Lcn2* の翻訳が抑制された結果、タンパク質レベルにおいて GFAP 陽性アストロサイトの *Lcn2* 発現が顕著に低下したのだと考えられる。

Lcn2 はリポカリンファミリーに属する分泌型のタンパク質であり、脳梗塞や炎症性の刺激によってアストロサイトや内皮細胞で発現上昇する (Jin et al., 2014; Suk, 2016; Wan et al., 2022)。*Lcn2* の受容体は、主に神経細胞、アストロサイト、内皮細胞に存在する (Jin et al., 2014)。*Lcn2* を初代培養神経細胞に作用させると、樹状突起スパイン密度が減少し

(Mucha et al., 2011)、*Lcn2* 欠損マウスでは樹状突起スパイン密度が高くなる (Skrzypiec et al., 2013)。さらに、*Lcn2* はアストロサイトにおいて炎症促進活性を誘導する (Jang et al., 2013; S. Lee et al., 2009)。炎症性刺激は樹状突起スパイン減少やシナプス機能障害を引き起こす (Centonze et al., 2009; Prada et al., 2018; Tong et al., 2012)。以上より、*Lcn2* は脳梗塞後に発現上昇し、樹状突起スパインを減少させる作用を持つと言える。*Lcn2* は脳梗塞後 24 時間で最大に誘導されることが知られている (Jin et al., 2014)。しかしながら、我々は POD15 においても *Lcn2* 陽性アストロサイトが脳梗塞巣境界周囲の領域に存在することを明らかにした (図 3-4G, H)。*Lcn2* 発現アストロサイトはミエリンを貪食し脱髄を促進するが、それを阻害することで神経毒性や行動異常が緩和されることが分かっている (Jin et

al., 2014; Wan et al., 2022)。我々はこれまでに、脳梗塞後の運動によってアストロサイトの Lcn2 発現が減少した領域において、樹状突起スパイン減少が緩和されることを明らかにしている。これらのことから、運動によってアストロサイトの Lcn2 発現が減少することで脳梗塞後のスパイン減少の緩和や機能回復促進に貢献している可能性が示唆された。

本研究の限界点は、運動による脳梗塞後のアストロサイト Lcn2 発現の減少が脳梗塞後に新生したアストロサイトの割合が増加したことによるものかどうか特定することができない点である。しかしながら、我々は脳梗塞後に新生したアストロサイトと脳梗塞以前から存在するアストロサイトは異なる表現型を持つことが期待できると考えている。これまでに、脳梗塞以前から存在するアストロサイトと脳梗塞後に新生したアストロサイトの機能の違いに着目した研究は殆ど存在しない。本研究は、脳梗塞後に新生したアストロサイトが持つ新規機能が脳梗塞後の機能回復に貢献する可能性を提示することができるものであると考える。

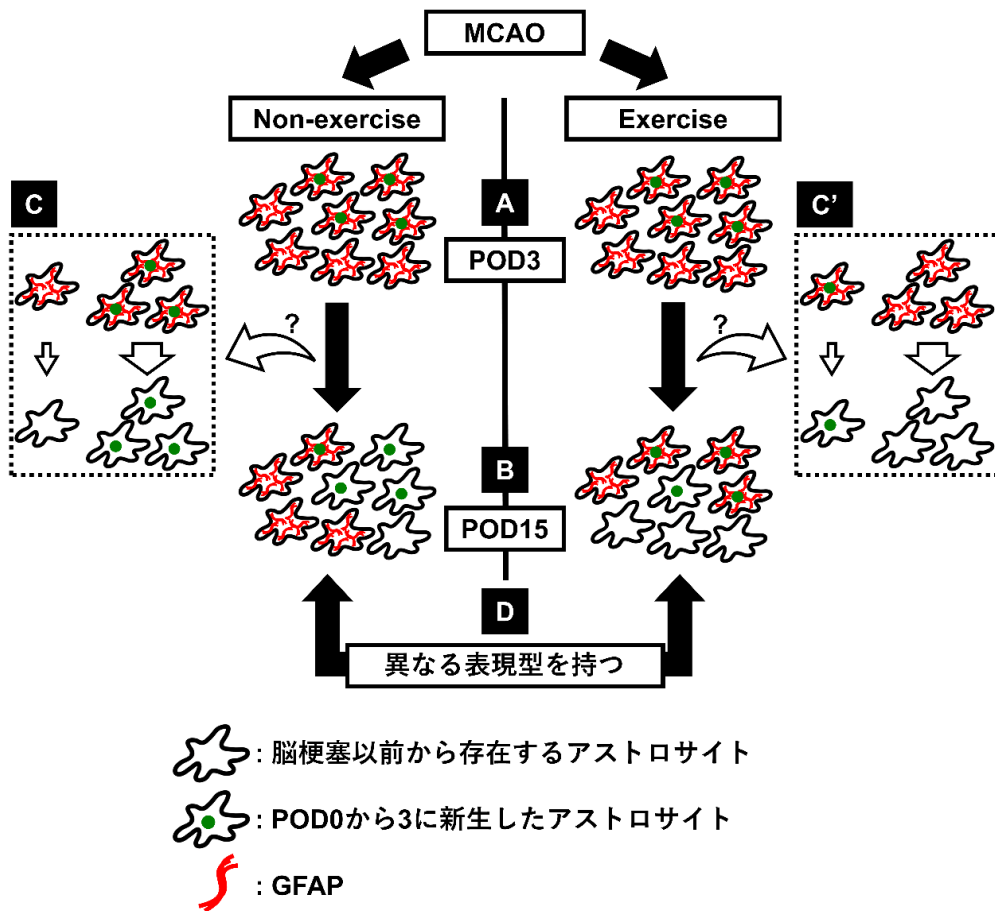


図 3-5. 自発運動が脳梗塞後のアストロサイトに与える影響

- (A) 自発運動は、POD3 における GFAP 陽性アストロサイトの増殖を促進しなかった。
- (B) POD15 において、POD0 から 3 に新生した GFAP 陽性アストロサイトが占める割合が自発運動によって増加した。
- (C, C') 運動は脳梗塞以前から存在したアストロサイトの GFAP 発現を減少させ、脳梗塞後に新生したアストロサイトの GFAP 発現減少を抑制することが予想される。
- (D) 異なる組成から成る MCAO+非運動群のアストロサイトと MCAO+運動群のアストロサイトはそれぞれ異なる表現型を示すことが考えられる。

第4章 結論

本研究は、再現性の高い脳梗塞モデルマウスに対して自発運動を促し、神経細胞の形態的可塑性、神経細胞の機能や環境を支持するグリア細胞の変化、その他の組織学的変化を正確に評価し、機能回復促進機序を明らかにすることを目的とした。

脳梗塞後、2週間の自発運動によって機能回復が促進された。このとき、脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第5層の錐体細胞において樹状突起スパインの減少が緩和された。大脳皮質運動野第5層の錐体細胞は随意運動の出発点であり、スパインは適切な運動を引き起こすために処理された情報を受け取る。スパインの減少が緩和されたことは、残存した領域における新しい神経回路の編成を意味しており、機能回復に貢献する可能性が示唆された。

脳梗塞後の運動によって神経細胞の形態的可塑性が引き起こされたことから、神経細胞周囲の環境を支持するグリア細胞に起こる変化に着目した。脳梗塞という厳しい環境下に生まれ、スパイン減少の緩和に働きかけるためには、脳梗塞後ある程度まで残存する必要がある。脳梗塞直後から3日目までに新生し、15日目まで残存したアストロサイトの割合が運動によって増加していた。トランスクリプトーム解析により、非運動群のアストロサイトと運動群のアストロサイトは異なる機能を持つことが明らかになった。実際に、運動群の脳梗塞巣周囲の大脳皮質運動野第5層では、樹状突起スパインを減らす作用を持つ *Lipocalin 2* を発現するアストロサイトが減少していた。

これらのことから、脳梗塞後のリハビリテーションによる機能改善には自発運動によって脳梗塞巣周囲の樹状突起スパイン減少が抑制されることが重要であり、それにはアストロサイトの表現型変化が関わっていることが示された。また、本研究から得られた知見より、自発運動の効果機序である血管新生の促進や *Lcn2* 発現の抑制を薬剤投与などによって代替することができれば、自発運動を行うことが難しい患者に対しても効率的に機能回復を促すことが期待できる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、恵まれた環境で研究する機会を与えてくださった立命館大学大学院 生命科学研究科 生命科学専攻 薬理学研究室 田中秀和教授に深く御礼申し上げます。また、本研究室講師の中谷仁先生、助教の澤野俊憲先生、薬理学研究室の皆様には多くのご支援・ご教授をいただき、大変お世話になりました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

兵庫医科大学 先端医学研究所 神経再生研究部門 松山知弘先生には脳梗塞モデルマウス作製術をご指導いただきました。

兵庫医科大学 土江伸誉先生には行動実験に関して多くのご教授を賜りました。

京都大学 横川拓海様にはマウスに対する運動介入の方法について様々なご助言を賜りました。

立命館大学 理工学部 工作センターの職員の方々には実験装置の作製の際、お世話になりました。

なお、本研究は、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2101 の支援を受けたものです。

皆様に心から深く感謝申し上げます。

参考文献

- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2009). Glia — More than Just Brain Glue. *Nature*, *457*(7230), 675–677. <https://doi.org/10.1038/457675a>
- Andoh, M., Shibata, K., Okamoto, K., Onodera, J., Morishita, K., Miura, Y., Ikegaya, Y., & Koyama, R. (2019). Exercise Reverses Behavioral and Synaptic Abnormalities After Maternal Inflammation. *Cell Reports*, *27*(10), 2817–2825.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.015>
- Arya, K. N., Pandian, S., Verma, R., & Garg, R. K. (2011). Movement Therapy Induced Neural Reorganization and Motor Recovery in Stroke: A Review. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, *15*(4), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.jbmt.2011.01.023>
- Barthas, F., & Kwan, A. C. (2017). Secondary Motor Cortex: Where ‘Sensory’ Meets ‘Motor’ in the Rodent Frontal Cortex. *Trends in Neurosciences*, *40*(3), 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.11.006>
- Brodmann, K. *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues* (Leipzig: Barth, 1909). <https://wellcomecollection.org/works/vrnkkxtj>
- Brown, C. E., Boyd, J. D., & Murphy, T. H. (2010). Longitudinal in vivo Imaging Reveals Balanced and Branch-Specific Remodeling of Mature Cortical Pyramidal Dendritic Arbors After Stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *30*(4), 783–791. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.241>
- Brown, C. E., Li, P., Boyd, J. D., Delaney, K. R., & Murphy, T. H. (2007). Extensive Turnover of Dendritic Spines and Vascular Remodeling in Cortical Tissues Recovering from Stroke. *The Journal of Neuroscience*, *27*(15), 4101–4109. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4295-06.2007>
- Brown, C. E., Wong, C., & Murphy, T. H. (2008). Rapid Morphologic Plasticity of Peri-Infarct Dendritic Spines After Focal Ischemic Stroke. *Stroke*, *39*(4), 1286–1291. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.498238>
- Bullitt, E. (1990). Expression of c-Fos-Like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*, *296*(4), 517–530. <https://doi.org/10.1002/cne.902960402>
- Centonze, D., Muzio, L., Rossi, S., Cavaiani, F., De Chiara, V., Bergami, A., Musella, A., D’Amelio, M., Cavallucci, V., Martorana, A., Bergamaschi, A., Cencioni, M. T., Diamantini, A., Butti, E., Comi, G., Bernardi, G., Cecconi, F., Battistini, L., Furlan, R., & Martino, G. (2009). Inflammation Triggers Synaptic Alteration and Degeneration in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience*, *29*(11), 3442–3452.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5804-08.2009>

- Chen, Z., Hu, Q., Xie, Q., Wu, S., Pang, Q., Liu, M., Zhao, Y., Tu, F., Liu, C., & Chen, X. (2019). Effects of Treadmill Exercise on Motor and Cognitive Function Recovery of MCAO Mice Through the Caveolin-1/VEGF Signaling Pathway in Ischemic Penumbra. *Neurochemical Research*, *44*(4), 930–946. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02728-1>
- Clark, T. A., Sullender, C., Jacob, D., Zuo, Y., Dunn, A. K., & Jones, T. A. (2019). Rehabilitative Training Interacts with Ischemia-Instigated Spine Dynamics to Promote a Lasting Population of New Synapses in Peri-Infarct Motor Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *39*(43), 8471–8483. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1141-19.2019>
- Eng, L. F., & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology*, *4*(3), 229–237. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1994.tb00838.x>
- Enright, L. E., Zhang, S., & Murphy, T. H. (2007). Fine Mapping of the Spatial Relationship Between Acute Ischemia and Dendritic Structure Indicates Selective Vulnerability of Layer V Neuron Dendritic Tufts Within Single Neurons in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *27*(6), 1185–1200. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600428>
- Eroglu, C., & Barres, B. A. (2010). Regulation of Synaptic Connectivity by Glia. *Nature*, *468*(7321), 223–231. <https://doi.org/10.1038/nature09612>
- Gao, J.-Q., Wang, P., Yan, J.-W., Ba, L.-N., Shi, P.-L., Wu, H.-M., Guan, X.-Y., Cao, Y., Sun, H.-L., & Mao, X.-Y. (2021). Shear Stress Rescued the Neuronal Impairment Induced by Global Cerebral Ischemia Reperfusion via Activating PECAM-1-eNOS-NO Pathway. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.631286>
- Geng, H.-Y., Arbuthnott, G., Yung, W.-H., & Ke, Y. (2022). Long-Range Monosynaptic Inputs Targeting Apical and Basal Dendrites of Primary Motor Cortex Deep Output Neurons. *Cerebral Cortex*, *32*(18), 3975–3989. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab460>
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O’Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M., & Attwell, D. (2014). Capillary Pericytes Regulate Cerebral Blood Flow in Health and Disease. *Nature*, *508*(7494), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>
- Hooks, B. M., Mao, T., Gutnisky, D. A., Yamawaki, N., Svoboda, K., & Shepherd, G. M. G. (2013). Organization of Cortical and Thalamic Input to Pyramidal Neurons in Mouse Motor Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *33*(2), 748–760. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4338-12.2013>
- Jang, E., Kim, J.-H., Lee, S., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Jin, M., Lee, M.-G., Jang, I.-S., Lee, W.-H., & Suk, K. (2013). Phenotypic Polarization of Activated Astrocytes: The Critical Role of Lipocalin-2 in the Classical Inflammatory Activation of Astrocytes. *The Journal of Immunology*, *191*(10), 5204–5219. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301637>

- Jin, M., Kim, J.-H., Jang, E., Lee, Y. M., Han, H. S., Woo, D. K., Park, D. H., Kook, H., & Suk, K. (2014). Lipocalin-2 Deficiency Attenuates Neuroinflammation and Brain Injury After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, *34*(8), 1306–1314. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.83>
- Kawaguchi, Y. (2017). Pyramidal Cell Subtypes and Their Synaptic Connections in Layer 5 of Rat Frontal Cortex. *Cerebral Cortex*, *27*(12), 5755–5771. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx252>
- Kopp, B. L., Wick, D., & Herman, J. P. (2013). Differential Effects of Homotypic vs. Heterotypic Chronic Stress Regimens on Microglial Activation in the Prefrontal Cortex. *Physiology & Behavior*, *122*, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.030>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: A Sensor for Pathological Events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, *19*(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Lee, J.-K., Park, M.-S., Kim, Y.-S., Moon, K.-S., Joo, S.-P., Kim, T.-S., Kim, J.-H., & Kim, S.-H. (2007). Photochemically Induced Cerebral Ischemia in a Mouse Model. *Surgical Neurology*, *67*(6), 620–625. <https://doi.org/10.1016/j.surneu.2006.08.077>
- Lee, S., Park, J.-Y., Lee, W.-H., Kim, H., Park, H.-C., Mori, K., & Suk, K. (2009). Lipocalin-2 Is an Autocrine Mediator of Reactive Astrocytosis. *The Journal of Neuroscience*, *29*(1), 234–249. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5273-08.2009>
- Li, H., Zhang, N., Lin, H.-Y., Yu, Y., Cai, Q.-Y., Ma, L., & Ding, S. (2014). Histological, Cellular and Behavioral Assessments of Stroke Outcomes After Photothrombosis-Induced Ischemia in Adult Mice. *BMC Neuroscience*, *15*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-58>
- Licht, T., Eavri, R., Goshen, I., Shlomai, Y., Mizrahi, A., & Keshet, E. (2010). VEGF is Required for Dendritogenesis of Newly Born Olfactory Bulb Interneurons. *Development*, *137*(2), 261–271. <https://doi.org/10.1242/dev.039636>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W.-S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic Reactive Astrocytes are Induced by Activated Microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Lipton, P. (1999). Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiological Reviews*, *79*(4), 1431–1568. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1431>
- Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., & Cummins, R. (1989). Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion Without Craniectomy in Rats. *Stroke*, *20*(1), 84–91. <https://doi.org/10.1161/01.STR.20.1.84>
- Lundquist, A. J., Parizher, J., Petzinger, G. M., & Jakowec, M. W. (2019). Exercise Induces Region-Specific Remodeling of Astrocyte Morphology and Reactive Astrocyte Gene Expression Patterns in Male Mice. *Journal of Neuroscience Research*, *97*(9), 1081–1094.

<https://doi.org/10.1002/jnr.24430>

- Maddock, R. J., Casazza, G. A., Buonocore, M. H., & Tanase, C. (2011). Vigorous Exercise Increases Brain Lactate and Glx (Glutamate+Glutamine): A Dynamic 1H-MRS Study. *NeuroImage*, 57(4), 1324–1330. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.05.048>
- Magee, J. C., & Johnston, D. (1997). A Synaptically Controlled, Associative Signal for Hebbian Plasticity in Hippocampal Neurons. *Science*, 275(5297), 209–213. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.209>
- Matsuda, F., Sakakima, H., & Yoshida, Y. (2011). The Effects of Early Exercise on Brain Damage and Recovery After Focal Cerebral Infarction in Rats. *Acta Physiologica*, 201(2), 275–287. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02174.x>
- Miao, W., Bao, T. H., Han, J. H., Yin, M., Yan, Y., Wang, W. W., & Zhu, Y. H. (2015). Voluntary Exercise Prior to Traumatic Brain Injury Alters miRNA Expression in the Injured Mouse Cerebral Cortex. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(5), 433–439. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20144012>
- Morland, C., Andersson, K. A., Haugen, Ø. P., Hadzic, A., Kleppa, L., Gille, A., Rinholm, J. E., Palibrk, V., Diget, E. H., Kennedy, L. H., Stølen, T., Hennestad, E., Moldestad, O., Cai, Y., Puchades, M., Offermanns, S., Vervaeke, K., Bjørås, M., Wisløff, U., Storm-Mathisen, J., & Bergersen, L. H. (2017). Exercise Induces Cerebral VEGF and Angiogenesis via the Lactate Receptor HCAR1. *Nature Communications*, 8(1), 15557. <https://doi.org/10.1038/ncomms15557>
- Mucha, M., Skrzypiec, A. E., Schiavon, E., Attwood, B. K., Kucerova, E., & Pawlak, R. (2011). Lipocalin-2 Controls Neuronal Excitability and Anxiety by Regulating Dendritic Spine Formation and Maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18436–18441. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107936108>
- Murray, E. A., & Coulter, J. D. (1981). Organization of Corticospinal Neurons in the Monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 195(2), 339–365. <https://doi.org/10.1002/cne.901950212>
- Nudo, R. J., Wise, B. M., SiFuentes, F., & Milliken, G. W. (1996). Neural Substrates for the Effects of Rehabilitative Training on Motor Recovery After Ischemic Infarct. *Science*, 272(5269), 1791–1794. <https://doi.org/10.1126/science.272.5269.1791>
- Okabe, N., Shiromoto, T., Himi, N., Lu, F., Maruyama-Nakamura, E., Narita, K., Iwachidou, N., Yagita, Y., & Miyamoto, O. (2016). Neural Network Remodeling Underlying Motor Map Reorganization Induced by Rehabilitative Training After Ischemic Stroke. *Neuroscience*, 339, 338–362. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.008>
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA Receptor Subunit Diversity: Impact on Receptor Properties, Synaptic Plasticity and Disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>

- Prada, I., Gabrielli, M., Turola, E., Iorio, A., D'Arrigo, G., Parolisi, R., De Luca, M., Pacifici, M., Bastoni, M., Lombardi, M., Legname, G., Cojoc, D., Buffo, A., Furlan, R., Peruzzi, F., & Verderio, C. (2018). Glia-to-Neuron Transfer of miRNAs via Extracellular Vesicles: A New Mechanism Underlying Inflammation-Induced Synaptic Alterations. *Acta Neuropathologica*, *135*(4), 529–550. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1803-x>
- Qian, H.-Z., Zhang, H., Yin, L., & Zhang, J. (2018). Postischemic Housing Environment on Cerebral Metabolism and Neuron Apoptosis After Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Current Medical Science*, *38*(4), 656–665. <https://doi.org/10.1007/s11596-018-1927-9>
- Ramos-Fernández, E., Tajés, M., ILL-Raga, G., Vargas, L., Busquets-García, A., Bosch-Morató, M., Guivernau, B., Valls-Comamala, V., Gomis, M., Grau, C., Fandos, C., Rosen, M. D., Rabinowitz, M. H., Inestrosa, N., Maldonado, R., Altafaj, X., Ozaita, A., Alvarez, A., Vicente, R., Valverde, M. A., & Muñoz, F. J. (2016). Glutamatergic Stimulation Induces GluN2B Translation by the Nitric Oxide-Heme-Regulated eIF2 α Kinase in Cortical Neurons. *Oncotarget*, *7*(37), 58876–58892. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11417>
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T. (1988). Expression of c-Fos Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level. *Science*, *240*(4857), 1328–1331. <https://doi.org/10.1126/science.3131879>
- Sawano, T., Tsuchihashi, R., Watanabe, F., Niimi, K., Yamaguchi, W., Yamaguchi, N., Furuyama, T., Tanaka, H., Matsuyama, T., & Inagaki, S. (2019). Changes in L-arginine Metabolism by Sema4D Deficiency Induce Promotion of Microglial Proliferation in Ischemic Cortex. *Neuroscience*, *406*, 420–431. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.037>
- Sawano, T., Watanabe, F., Ishiguchi, M., Doe, N., Furuyama, T., & Inagaki, S. (2015). Effect of Sema4D on Microglial Function in Middle Cerebral Artery Occlusion Mice. *Glia*, *63*(12), 2249–2259. <https://doi.org/10.1002/glia.22890>
- Schaechter, J. D. (2004). Motor Rehabilitation and Brain Plasticity After Hemiparetic Stroke. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 73, Issue 1, pp. 61–72). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.04.001>
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, *74*(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Shang, J., Cheng, Q., Duan, S., Li, L., & Jia, L. (2018). Cognitive Improvement Following Ischemia/Reperfusion Injury Induced by Voluntary Running-Wheel Exercise is Associated with LncMALAT1-Mediated Apoptosis Inhibition. *International Journal of Molecular Medicine*, *41*(5), 2715–2723. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3484>
- Shimada, I. S., LeComte, M. D., Granger, J. C., Quinlan, N. J., & Spees, J. L. (2012). Self-Renewal

- and Differentiation of Reactive Astrocyte-Derived Neural Stem/Progenitor Cells Isolated from the Cortical Peri-Infarct Area After Stroke. *The Journal of Neuroscience*, 32(23), 7926–7940. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4303-11.2012>
- Shiromoto, T., Okabe, N., Lu, F., Maruyama-Nakamura, E., Himi, N., Narita, K., Yagita, Y., Kimura, K., & Miyamoto, O. (2017). The Role of Endogenous Neurogenesis in Functional Recovery and Motor Map Reorganization Induced by Rehabilitative Therapy after Stroke in Rats. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 26(2), 260–272. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.016>
- Skrzypiec, A. E., Shah, R. S., Schiavon, E., Baker, E., Skene, N., Pawlak, R., & Mucha, M. (2013). Stress-Induced Lipocalin-2 Controls Dendritic Spine Formation and Neuronal Activity in the Amygdala. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061046>
- Sloka, S., Metz, L. M., Hader, W., Starreveld, Y., & Yong, V. W. (2013). Reduction of Microglial Activity in a Model of Multiple Sclerosis by Dipyridamole. *Journal of Neuroinflammation*, 10(1), 855. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-89>
- Song, I., & Dityatev, A. (2018). Crosstalk Between Glia, Extracellular Matrix and Neurons. *Brain Research Bulletin*, 136, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.003>
- Steele, E. C., Guo, Q., & Namura, S. (2008). Filamentous Middle Cerebral Artery Occlusion Causes Ischemic Damage to the Retina in Mice. *Stroke*, 39(7), 2099–2104. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.107.504357>
- Stuart, G. J., & Sakmann, B. (1994). Active Propagation of Somatic Action Potentials into Neocortical Pyramidal Cell Dendrites. *Nature*, 367(6458), 69–72. <https://doi.org/10.1038/367069a0>
- Su, Y., Shin, J., Zhong, C., Wang, S., Roychowdhury, P., Lim, J., Kim, D., Ming, G., & Song, H. (2017). Neuronal Activity Modifies the Chromatin Accessibility Landscape in the Adult Brain. *Nature Neuroscience*, 20(3), 476–483. <https://doi.org/10.1038/nn.4494>
- Suk, K. (2016). Lipocalin-2 as a Therapeutic Target for Brain Injury: An Astrocentric Perspective. *Progress in Neurobiology*, 144, 158–172. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.08.001>
- Taguchi, A., Kasahara, Y., Nakagomi, T., Stern, D. M., Fukunaga, M., Ishikawa, M., & Matsuyama, T. (2010). A Reproducible and Simple Model of Permanent Cerebral Ischemia in CB-17 and SCID Mice. *Journal of Experimental Stroke and Translational Medicine*, 3(1), 28–33. <https://doi.org/10.6030/1939-067X-3.1.28>
- Takamatsu, Y., Tamakoshi, K., Waseda, Y., & Ishida, K. (2016). Running Exercise Enhances Motor Functional Recovery with Inhibition of Dendritic Regression in the Motor Cortex After Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Behavioural Brain Research*, 300, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.003>
- Takatsuru, Y., Fukumoto, D., Yoshitomo, M., Nemoto, T., Tsukada, H., & Nabekura, J. (2009).

- Neuronal Circuit Remodeling in the Contralateral Cortical Hemisphere during Functional Recovery from Cerebral Infarction. *The Journal of Neuroscience*, 29(32), 10081–10086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1638-09.2009>
- Tanaka, Y., Nakagomi, N., Doe, N., Nakano-Doi, A., Sawano, T., Takagi, T., Matsuyama, T., Yoshimura, S., & Nakagomi, T. (2020). Early Reperfusion Following Ischemic Stroke Provides Beneficial Effects, Even After Lethal Ischemia with Mature Neural Cell Death. *Cells*, 9(6), 1374. <https://doi.org/10.3390/cells9061374>
- Tao, T., Liu, Y., Zhang, J., Xu, Y., Li, W., & Zhao, M. (2013). Therapeutic Hypercapnia Improves Functional Recovery and Attenuates Injury via Antiapoptotic Mechanisms in a Rat Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Model. *Brain Research*, 1533, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.08.014>
- Tennant, K. A., Taylor, S. L., White, E. R., & Brown, C. E. (2017). Optogenetic Rewiring of Thalamocortical Circuits to Restore Function in the Stroke Injured Brain. *Nature Communications*, 8(1), 15879. <https://doi.org/10.1038/ncomms15879>
- Tian, S., Zhang, Y., Tian, S., Yang, X., Yu, K., Zhang, Y., Shen, X., Zhang, L., Sun, Y., Xie, H., He, Z., Guo, Z., Jia, J., Wu, Y., Bai, Y., Zhu, Y., Cheng, Y., Wang, X., Wu, J., Wang, N., Yu, H., & Hu, Y. (2013). Early Exercise Training Improves Ischemic Outcome in Rats by Cerebral Hemodynamics. *Brain Research*, 1533, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.07.049>
- Tong, L., Prieto, G. A., Kramár, E. A., Smith, E. D., Cribbs, D. H., Lynch, G., & Cotman, C. W. (2012). Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Synaptic Plasticity Is Suppressed by Interleukin-1 β via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Neuroscience*, 32(49), 17714–17724. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1253-12.2012>
- Tsay, D., & Yuste, R. (2002). Role of Dendritic Spines in Action Potential Backpropagation: A Numerical Simulation Study. *Journal of Neurophysiology*, 88(5), 2834–2845. <https://doi.org/10.1152/jn.00781.2001>
- Wada, T., Sawano, T., Tanaka, T., Furuyama, T., Fukumoto, M., Yamaguchi, W., Saino, O., Takeda, Y., Kogo, M., Matsuyama, T., & Inagaki, S. (2016). Absence of Sema4D Improves Oligodendrocyte Recovery After Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Neuroscience Research*, 108, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.12.016>
- Wan, T., Zhu, W., Zhao, Y., Zhang, X., Ye, R., Zuo, M., Xu, P., Huang, Z., Zhang, C., Xie, Y., & Liu, X. (2022). Astrocytic Phagocytosis Contributes to Demyelination After Focal Cortical Ischemia in Mice. *Nature Communications*, 13(1), 1134. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28777-9>
- Wang, K., Peng, B., & Lin, B. (2014). Fractalkine Receptor Regulates Microglial Neurotoxicity in an Experimental Mouse Glaucoma Model. *Glia*, 62(12), 1943–1954.

- <https://doi.org/10.1002/glia.22715>
- Warraich, Z., & Kleim, J. A. (2010). Neural Plasticity: The Biological Substrate for Neurorehabilitation. *PM&R*, 2(12 SUPPL), S208–S219.
<https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2010.10.016>
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M. H., & Pekny, M. (2006). Redefining the Concept of Reactive Astrocytes as Cells That Remain Within Their Unique Domains upon Reaction to Injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17513–17518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602841103>
- Xiong, H., Luo, T., He, W., Xi, D., Lu, H., Li, M., Liu, J., & Guo, Z. (2016). Up-Regulation of miR-138 Inhibits Hypoxia-Induced Cardiomyocyte Apoptosis via Down-Regulating Lipocalin-2 Expression. *Experimental Biology and Medicine*, 241(1), 25–30.
<https://doi.org/10.1177/1535370215591831>
- Zamanian, J. L., Xu, L., Foo, L. C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R. G., & Barres, B. A. (2012). Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. *The Journal of Neuroscience*, 32(18), 6391–6410.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>
- Zheng, J., Sun, X., Ma, C., Li, B., & Luo, F. (2019). Voluntary Wheel Running Promotes Myelination in the Motor Cortex Through Wnt Signaling in Mice. *Molecular Brain*, 12(1), 85.
<https://doi.org/10.1186/s13041-019-0506-8>