

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06538

研究課題名(和文) 麻痺肢集中使用法に関する中脳皮質辺縁ドパミン系の作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the involvement of VTA-M1 pathway on constraint induced movement therapy

研究代表者

上田 佳朋 (UEDA, Yoshitomo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30758420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：麻痺側集中使用(CIMT法)によるリハビリテーションは、障害された上肢の機能を改善する。このとき、モチベーションに関係する脳内回路である中脳皮質辺縁ドパミン系の関与を明らかにすることを目的として実験を行った。この回路の働きを選択的に遮断するために、主要な中継点と考えられる腹側被蓋野(VTA)と運動皮質(M1)の2か所にウイルスベクターを注入したが、感染を示す結果は得られなかった。この原因として、ウイルスの取り扱いのエラーや、注入手技の習熟が不十分であることなどが考えられる。また、ウイルスベクターの設計や、注入箇所・注入回数に関しても再検討が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rehabilitation by constraint induced movement therapy (CIMT) improves performance of injured upper limb. To reveal the involvement of midbrain-cortex dopamine pathway, which relates to motivation, in CIMT, we attempted to selectively block ventral tegmental area (VTA) - motor cortex (M1) pathway using two kinds of virus vectors. Obvious result of virus vector infection was not obtained until now. The problem could be caused by handling errors of virus vectors and/or manipulation errors of virus injection to the brain. Moreover, we should reconsider the structure of virus vectors and injection sites and number of times. Experimental setup was already prepared, so we continue these trials.

研究分野：神経科学

キーワード：脳内(内包)出血モデル 麻痺側集中使用リハビリテーション法(CIMT法) モチベーション 中脳皮質ドパミン系 二重ウイルス感染法

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 脳血管障害後にみられる上肢運動機能の障害は、日常生活や社会復帰を妨げる大きな要因となる。CIMT 法 (Constraint-induced Movement Therapy) は、健常側上肢の使用を制限させ麻痺側上肢の集中的な使用を誘導するリハビリテーション法であり、その有効性が注目されている。しかしながら、CIMT 法の作用機序に関しては未だ不明な点が多い。

(2) 申請者らは、内包近傍の小出血により大きな運動機能障害がみられる脳内出血モデルラットを用いて、早期からの CIMT 法によって上肢運動機能が改善されるメカニズムを探求してきた。これまでに、脳出血後の CIMT により、□ 手の巧緻運動機能が改善すること、□ 出血側運動野で NMDA 型受容体の発現が増加すること、□  $\Delta$ Fos 陽性細胞が増加し神経活動が亢進していること、□ 成長関連因子の発現が増加していること、などを報告した。さらに、皮質内微小電気刺激法によって CIMT 法により運動野で上肢領域が拡大することを電気生理学的にも明らかにし、学会等で報告した。

(3) リハビリテーションの効果が、患者の治療意識すなわち「モチベーションの有無により大きく異なる」ことは、臨床の中ですでに実感されている。近年、モチベーションに関係する中脳皮質辺縁ドパミン (DA) 系が、リハビリテーションにおいても重要な経路であることが明らかになってきた。すなわち、脳梗塞モデルや脊髄損傷モデルにおいて、この系が機能回復に関与していることが示された。また、巧緻運動スキルの獲得において、中脳の腹側被蓋野 (VTA) が重要であること

も示されている。

## 2. 研究の目的

脳出血後の CIMT 法による運動機能の再建過程において、モチベーションの有無が機能再建にいかに関与するのか、については不明である。この点について、中脳皮質辺縁 DA 系の DA 神経細胞が存在する「VTA から一次運動野 (M1) へ投射する経路」を、「ウイルスベクター二重感染法により選択的に遮断」し、「脳出血後の CIMT 法による上肢運動機能の回復が大きく変化するか」について検討し、明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) VTA-M1 経路の選択的遮断が可能な内包出血モデルラットの作製：健常 Wistar 雄ラットを用いて、M1 領域には逆行性のレトロウイルスベクター (NeuRet-TRE-EGFP.eTeNT) を、VTA には順行性のアデノ随伴ウイルスベクター (AAV1-CaMKII-rtTAV16) をそれぞれ注入する。二重感染したラットでは、ドキシサイクリン (DOX) を投与することにより、感染神経細胞で破傷風毒素が発現し、シナプス伝達が阻害されるため、神経活動を遮断できる。

二重感染の評価：ラットを灌流固定して 40 $\mu$ m の脳切片を作製し、抗 Green Fluorescent Protein (GFP) 免疫染色、抗 rtTAV in situ hybridization で、二重感染が行われていることを確認する。

感染による毒性の評価：著明な細胞障害がないことを Cresyl Violet 染色、Caspase-3 染色などを用いて評価する。

(2) VTA-M1 経路遮断時の早期 CIMT 法による機能回復の検討：M1 にレトロウイルスベ

クターを、VTA にアデノ随伴ウイルスベクターを感染させたラットに対し内包出血（麻酔下で片側内包部に微量の Collagenase を注入）を起こすことにより、「VTA-M1 の選択的遮断が可能な内包出血モデルラット」を作製する。このラットに対し、以下の手順で CIMT 中に経路を遮断し、機能回復の減弱が見られるかを行動学的、電気生理学的に解析する。

出血 1 日後から DOX の投与を行いながら非麻痺側の前肢をギブス包帯で拘束し、麻痺側前肢を集中的に使用させる（CIMT）。

出血 7 日後に、リーチ機能（Single-pellet Reaching Test）、ステップング（Horizontal Ladder Test）を行い、非経路遮断群と比べてスコアが減少しているかを評価する。

皮質内微小電気刺激法（ICMS）により、M1 領域の脳皮質マッピングを行い、非経路遮断群と比べて減弱しているかを評価する。

脳組織を取り出し、ウイルス感染を(1)と同様に評価する。

(3) 回復した機能の発現に対する VTA-M1 経路の影響の検討：VTA-M1 経路の遮断によって CIMT による機能回復の程度は減弱すると考えられるが、この経路が CIMT によって回復した機能を発揮する際に大きく関わっている可能性もあるため、「VTA-M1 経路の選択的遮断が可能な内包出血モデルラット」に対し、以下の手順で確認を行う。

DOX 非投与、つまり VTA-M1 経路を遮断しない状態で CIMT を行う。

運動機能評価、ICMS の評価前に、DOX を投与し、(2)と同様の運動機能評価、脳皮

質マッピングを行い、非経路遮断群と比べて機能低下が見られるかを評価する。

脳組織を取り出し、ウイルス感染を評価する。

(4) ドパミン(DA)の in vivo 計測法の確立：DA 選択的に Fast scan cyclic voltammetry (FSCV) を行い、CIMT を行った後、ラット運動皮質で DA 量の増加について検討する。

DA 選択的プローブを開発し、DA 量の測定を可能にする。

CIMT 法を行った後のラットに対し、大脳皮質運動野で DA 量の測定を行う。

#### 4 . 研究成果

これまでに、二重ウイルス感染法の手技を確立するため、健常 Wistar 雄ラットに対するウイルスベクターの注入実験を開始した。既に当研究室で確立されている運動皮質および中脳赤核に対する注入を参考に実験を行っているが、腹側被蓋野(VTA)-運動皮質(M1)経路において、感染を示す GFP の発現は現在までに十分確認されるに至っていない。ウイルスの取り扱いのエラーによる失活や、注入手技が未確立であるため生存する個体数が十分量得られなかったことなどが、現在の問題点としてあげられる。現在、ウイルスベクターの取り扱い、注入手技等を確認して、再度実験を行うことを計画している。また、ウイルスベクターの設計、serotype, promoter の種類や、注入箇所・注入回数に関しても、再度検討の余地があるものと考えられる。

当研究室において、内包出血後の CIMT 法による機能回復には皮質赤核路が関与することを示したが、当研究と関連する、Wistar

ラットに対する CIMT 法、Single-pellet Reaching Test、ICMS について、技術的習得を達成できている。

また、イオン交換膜、酵素 (MAO-B) 含有膜、抗酸化物質含有膜によりコーティングされた、DA バイオセンサー (電極) および、ボルタンメトリー・アンペロメトリーを行える増幅器の開発を行った。この電極および増幅器を用いて、*in vitro* で、DA、セロトニン、ノルアドレナリンを含むリン酸緩衝生理食塩液から選択的に DA 選択的に酸化電流が検出できることを見出した。また、*in vivo* で、線条体においてメタンフェタミン投与および内側全脳束刺激下に、DA 選択的に酸化電流の増加を検出した (論文投稿中)。今後、これらを用いて、運動皮質内の DA 量を直接比較測定することが可能となった。

今回の研究活動スタート支援により、必要な試薬類は全て揃えることができおり、セットアップは完了している。実験の試行には全く問題ないため、VTA-M1 経路への二重ウイルスベクター感染法を確立することを第一の目標として、今後も実験を継続していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Ishida Akimasa, Ueda Yoshitomo, Kobayashi Kenta, Isa Tadashi, Hida Hideki, "Effects of selective blockade of the cortico-rubral tract on the efficiency of intensive use of impaired

forelimb in rats with capsular hemorrhage", 第 39 回、日本神経科学学会大会、2016.07.20-22、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Ishida Akimasa, Ueda Yoshitomo, Kobayashi Kenta, Isa Tadashi, Hida Hideki, "Selective blockade of the corticorubral tract during intensive forelimb rehabilitation in rats with capsular hemorrhage"、Society for Neuroscience, Neuroscience 2016、2016.11.12-16、サンディエゴ (アメリカ) Ishida Akimasa, Imamura Atsushi, Ueda Yoshitomo, Hida Hideki, "Sub-chronic real-time measurement of dopamine in the brain with novel dopamine-selective biosensor"、第 94 回日本生理学会大会 2017.3.28-30、静岡県・浜松市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

上田 佳朋 (UEDA, Yoshitomo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 30758420

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

石田 章真 (ISHIDA, Akimasa)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20632607

飛田 秀樹 (HIDA, Hideki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00305525