

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16361

研究課題名(和文) 麻痺肢集中使用法に関する作用メカニズムの解明と臨床応用への展開

研究課題名(英文) Clarification and development of the mechanism of intensive rehabilitation

研究代表者

石田 章真 (Ishida, Akimasa)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20632607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は集中リハビリテーションが脳損傷後の神経系再編に及ぼす影響とその意義を明らかにするために行われた。内包出血ラットに対し麻痺肢を1週間集中使用させたところ、皮質赤核路が増加することが示された。次に、ウイルスベクターを介した経路選択的遮断法を用い、皮質赤核路を回復過程において様々なタイミングで遮断した。その結果、皮質赤核路の早期・慢性期の遮断により、回復した機能が再度悪化した。一方で、リハビリテーション中に皮質赤核路を遮断すると、代わりに皮質網様体路が増加し機能回復が生じる事が示された。これらの成果から、皮質-脳幹路の変化がリハビリテーションによる機能回復に深く関わる事が示された。

研究成果の概要(英文)：We focused to the alteration of the circuits by intensive rehabilitation and its causality for recovery. We forced the rats which received internal capsule hemorrhage to use their impaired forelimb as rehabilitation. Rehabilitated rats showed the increase of cortico-rubral projections. To test the causal relationship between the plasticity of the cortico-rubral tract and recovery, selective blockade of the pathway were conducted using a double-viral vector technique. In case of the blockade of the cortico-rubral tract after recovery, deficits of the recovered forelimb function were exhibited. However, in case of the blockade during rehabilitation, FLU-induced regain of forelimb function was not disturbed. Additionally, the change of the cortico-rubral tract was not observed, but instead, the cortico-reticular projection was increased. These data suggest that the cortico-rubral and cortico-reticular pathways could be neural substrates for recovery induced by rehabilitation after stroke.

研究分野：リハビリテーション学

キーワード：リハビリテーション 脳幹 赤核 網様体 前肢機能 脳出血 可塑性 経路選択的遮断

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害後には高率に一側上下肢の運動機能障害を生じ、日常生活活動ならびに生活の質を低下させる。これに対し、constraint-induced movement therapy に代表される集中的なりハビリテーションが有効な治療法とされている(脳卒中ガイドライン 2015)。麻痺肢に対する集中的なりハビリテーションは損傷後の中枢神経系において可塑的な変化を惹起し、運動系の再編を促すと考えられているが、集中なりハビリテーションが中枢神経回路にどのような変化を及ぼすか、またそれらの可塑的变化と機能改善との間に因果関係が存在するか、といったなりハビリテーションの作用機序に関わる領域においては未知な点が数多く残っているのが現状である。

我々はこれまでに、内包部出血モデルラットを用い、麻痺肢の集中使用が中枢神経系に及ぼす影響を検討してきた。その結果、出血側運動野において分子生物学的・生化学的・形態学的なプロファイルが大きく変化することを見出した。加えて、同運動野において手指領域が拡大しており、同領域から同側赤核への軸索投射が増加していることを確認した。更に、この皮質赤核路をウイルスベクターを用いた経路選択的遮断法にて機能的に遮断すると、なりハビリテーションにより改善した運動機能が再度悪化することを見出した。これらの結果は、損傷脳において集中的なりハビリテーションにより出血側の皮質-赤核路を中心とした再編が生じており、同経路が運動機能回復と因果関係を有することを示すものである。これらの結果を踏まえ、集中なりハビリテーションにおける皮質-赤核路が果たす役割を更に詳細に解析することで、脳損傷後なりハビリテーションの作用機序解明において重要な知見が得られると考え、以下の研究を立案した。

2. 研究の目的

内包部出血モデルラットを用い、集中なりハビリテーションによる皮質-脳幹系の再編機構を解析する。加えて、確認された変化と運動機能との因果関係について検討する。具体的には、神経トレーサーを用いた出血側運動野からの軸索投射の変化を確認する。加えて、変化の確認された経路に関し、ウイルスベクター二重感染法により選択的な経路遮断を行い、運動機能への影響を確認する。

3. 研究の方法

(1) 研究ストラテジー

集中なりハビリテーションによる出血側運動野から脳幹への軸索投射の変化の確認

申請者がこれまでに成果を得てきた内包出血モデルラットを用い、神経トレーサーにより出血側運動野から脳幹への軸索投射を標識し観察する。これにより、集中なりハ

ビリテーションによる皮質-脳幹路の構造的な変化を確認する。

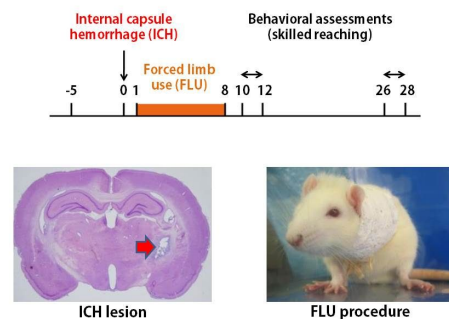
選択的経路遮断法による、皮質-赤核路がなりハビリテーションによる運動機能回復過程において果たす役割の解明

ウイルスベクター二重感染法を用い、皮質脳幹路を様々なタイミングで選択的に遮断し、運動機能回復への影響を確認する。これにより、なりハビリテーションにおける皮質赤核路の役割を詳細に解析できると考える。

(2) 具体的な研究方法

全体的な実験方法を図1に図示する。Wistar 系雄性成体ラットを用いる。一側の内包部に微量の collagenase を注入し内包出血(internal capsule hemorrhage: ICH) を作成する。出血後早期(1-8日)に非麻痺側前肢をギプスにより拘束し、麻痺側前肢を集中的に使用させる(forced limb use: FLU)。

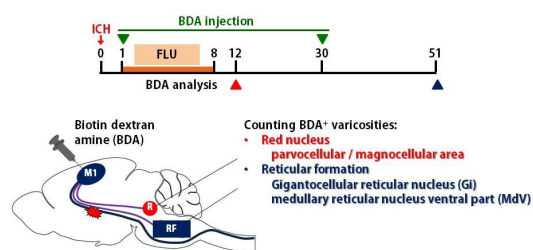
図1: 実験全体の基本プロトコール



皮質-脳幹路の軸索投射の解析

図2に実験プロトコールを示す。出血後1日目および30日目に出血側運動野に順行性神経トレーサーである Biotin dextran amine (BDA) を注入する。出血後12日目および51日目に深麻酔下でラットを安楽死させ、脳および脊髄を取り出し、BDAでラベルされた軸索を染色する。顕微鏡下で観察し、脳幹の赤核小・大細胞部および網様体 Gi 核・MdV 核への軸索投射を解析する。神経細胞体に触れている軸索ボタン数を数え、大脳脚において計数した総軸索数で除し標準化した値を求める。

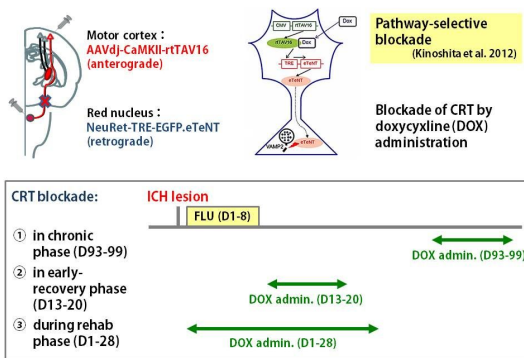
図2: 実験タイムコース (軸索投射の確認)



集中リハビリテーションによる機能回復過程における皮質赤核路の選択的遮断

図3に実験プロトコルを示す。本研究では、京都大学神経生物学講座の伊佐教授らによって開発された、ウィルスベクター二重感染法を用いる。本研究で使用するベクターは生理学研究所ウィルスベクター作成室小林憲太准教授に作成していただく。使用するベクターとして、逆行性のレンチウィルスベクター (NeuRet-TRE-EGFP.eTeNT) および順行性のアデノ随伴ウィルスベクター (AAVdj-CaMKII-rtTAV16) を用いる。これらのウィルスベクターを赤核および運動野に注入することにより、皮質赤核路ニューロンのみを二重に感染させる事ができる。二重感染ニューロンでは、ドキシサイクリン投与により神経伝達遮断に働くテタヌス毒素の発現を誘導することが可能である (Kinoshita M, et al., 2012)。これにより、皮質赤核路のみを可逆的に遮断する事が可能となる。当研究では内包出血および集中リハビリテーション後の慢性期、早期、およびリハビリテーション実施中の3種のプロトコルで実験を実施した。ドキシサイクリンは経口にて投与を行い、運動機能への影響を確認した。運動評価には single pellet reaching test を用いた。最終的に深麻酔下にて灌流固定を行い、組織学的検討により二重感染の確認を行った。

図3: 皮質赤核路の選択的遮断



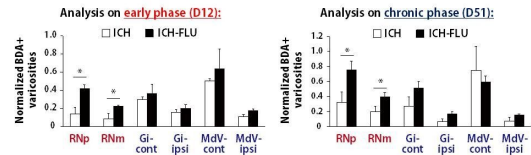
4. 研究成果

皮質-脳幹路の軸索投射の解析 (図4)

BDA を用いた染色の結果、大脳脚および脊髄における BDA 陽性線維の量には大きな差は認められなかった。出血側の赤核において、麻痺肢を集中的に使用させた群 (以下 ICH-FLU 群) では対照群 (以下 ICH 群) に比して有意な BDA 陽性軸索ボタン数の増加が認められた。この増加はリハビリテーション直後 (12 日目) から認められ、51 日目においても確認された。対照的に、網様体においては BDA 陽性軸索ボタン数において両群に有意な差異は認められなかった。このことから、内包出血後の集中リハビリテーションにより出血同側の皮質赤核路が中心に増強さ

れていることが明らかになった。

図4: 皮質-脳幹路の軸索投射の解析

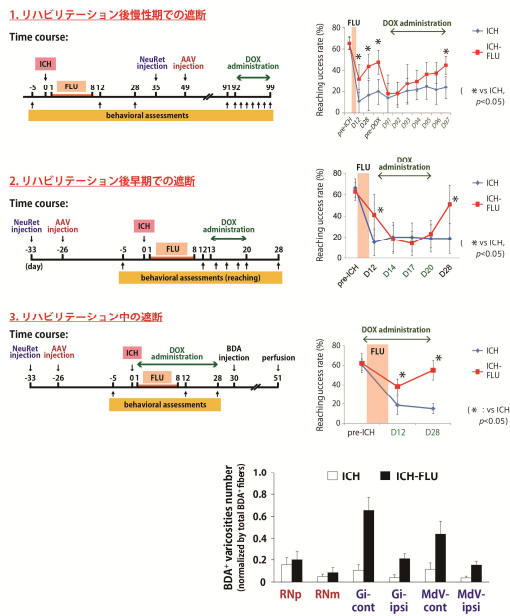


集中リハビリテーションによる機能回復過程における皮質赤核路の選択的遮断 (図5)

- (1) リハビリテーション後慢性期での遮断
二重感染を行った ICH-FLU 群ラットに対し、出血後 92-99 日目にドキシサイクリンを投与すると、single pellet reaching test に関し改善していたリーチ機能が再度障害され、ICH 群と同程度まで低下することが示された。また、一旦低下したリーチ機能は皮質赤核路遮断中においても徐々に改善していく事が示された。
- (2) リハビリテーション後早期での遮断
ICH-FLU 群ラットに対し、出血後 13-20 日目にドキシサイクリンを投与すると、リーチ機能が再度障害される事が示された。
- (3) リハビリテーション中の遮断
ICH-FLU 群ラットに対し、出血後 1-28 日目にドキシサイクリンを投与すると、リーチ機能の回復は阻害されない事が示された。実験終了後同群ラットに BDA を注入し軸索投射を確認すると、赤核ではなく網様体において、ICH 群に比べ BDA 陽性ボタンが増加していることが示された。

これらの成果から、皮質赤核路は集中リハビリテーションによる運動機能回復において因果関係を有する経路である、皮質赤核路は集中リハビリテーションによる運動機能回復において、リハビリテーション終了直後からダイレクトに関与する、皮質赤核路は集中リハビリテーションによる機能回復に関わる唯一の経路ではなく、皮質赤核路が遮断されている際には皮質網様体路が賦活化され代償に加わる可能性がある、といった知見が示された。これらは皮質赤核路を始めとした皮質-脳幹経路がリハビリテーションによる機能代償に大きく関与する事を示唆する内容であると考えられる。

図 5：集中リハビリテーションによる機能回復過程における皮質赤核路の選択的遮断



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 4 件)

Ishida A, Imamura A, Ueda Y, Shimizu T, Marumoto R, Jung CG, Hida H. A novel biosensor with high signal-to-noise ratio for real-time measurement of dopamine levels in vivo. *J Neurosci Res.* 96(5):817-827. 2018. doi: 10.1002/jnr.24193.

Ueda Y, Misumi S, Suzuki M, Ogawa S, Nishigaki R, Ishida A, Jung CG, Hida H. Disorganization of Oligodendrocyte Development in the Layer II/III of the Sensorimotor Cortex Causes Motor Coordination Dysfunction in a Model of White Matter Injury in Neonatal Rats. *Neurochem Res.* 43(1):127-137. 2018. doi: 10.1007/s11064-017-2352-3.

Ishida A, Isa K, Umeda T, Kobayashi K, Kobayashi K, Hida H, Isa T. Causal Link between the Cortico-Rubral Pathway and Functional Recovery through Forced Impaired Limb Use in Rats with Stroke. *J Neurosci.* 36(2):455-67. 2016. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2399-15.

Ishida A, Misumi S, Ueda Y, Shimizu S, Jung C-G, Tamakoshi K, Ishida K,

Hida H. Early constraint-induced movement therapy promotes functional recovery and neuronal plasticity in a subcortical hemorrhage model rat. *Behav Brain Res.* 284, 158-66, 2015. doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.022.

[学会発表](計 6 件)

Akimasa Ishida, Kenta Kobayashi, Yoshitomo Ueda, Tadashi Isa, Hideki Hida. Compensative sprouting of the cortico-brainstem projections induced by an intensive rehabilitation in internal capsule hemorrhage rats. 第 95 回日本生理学会大会. 2018.

Akimasa Ishida, Yoshitomo Ueda, Kenta Kobayashi, Tadashi Isa, Hideki Hida. Compensation of the cortico-reticular tract against cortico-rubral tract block after capsular hemorrhage is observed in intensive rehabilitation-induced recovery. *Neuroscience* 2017. 2017.

石田章真、小林憲太、上田佳朋、伊佐正、飛田秀樹. ウイルスベクターを用いた脳卒中後リハビリによる神経回路の可塑性の検討. 第 39 回神経組織培養研究会. 2017.

Akimasa Ishida, Yoshitomo Ueda, Kenta Kobayashi, Hideki Hida. Early involvement of cortico-rubral tract in intensive rehabilitation-induced recovery after capsular hemorrhage. 第 40 回日本神経科学大会. 2017.

石田章真. 脳卒中後の集中リハビリテーションにおける皮質-脳幹路系の役割. 第 52 回日本理学療法学会大会. 2017.

Akimasa Ishida, Kenta Kobayashi, Tadashi Isa, Hideki Hida. Rehabilitation-induced reorganization of the cortico-brainstem circuits after stroke. 第 94 回日本生理学会大会. 2017.

Akimasa Ishida, Yoshitomo Ueda, Kenta Kobayashi, Tadashi Isa, Hideki Hida. Selective blockade of the corticorubral tract during intensive forelimb rehabilitation in rats with capsular hemorrhage. *Neuroscience* 2016. 2016.

Akimasa Ishida, Yoshitomo Ueda,

Kenta Kobayashi, Tadashi Isa, Hideki Hida. 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 回日本神経科学大会. 2016.

石田章真. 損傷脳の再編と理学療法：基礎科学による証明、そして応用へ. 第 26 回愛知県理学療法学会. 2016.

石田章真, 伊佐かおる, 梅田達也, 小林憲太, 飛田秀樹, 伊佐正. 麻痺側前肢への集中的リハビリテーションによる運動機能の改善は皮質赤核路を介して生ずる. 第 51 回日本理学療法学会. 2016.

Akimasa Ishida, Atsushi Imamura, Hideki Hida. Selective and real-time measurement of dopamine in the brain with novel dopamine-selective biosensor. 第 93 回日本生理学会大会. 2016.

Akimasa Ishida, Yoshitomo Ueda, Cha-Gyun Jung, Kazuto Ishida, Hideki Hida. Changed profile of glutamate receptors by constraint-induced movement therapy links to functional recovery of the forelimb in capsular hemorrhage rats. Neuroscience 2015. 2015.

Akimasa Ishida, Yoshitomo Ueda, Sachiyo Misumi, Cha-Gyun Jung, Kazuto Ishida, Hideki Hida. Increase of NMDA receptor subunits by early constraint-induced movement therapy links to functional recovery after intracerebral hemorrhage. 第 38 回日本神経科学大会. 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/brain-physiol.dir/index.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
石田 章真 (ISHIDA AKIMASA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20632607

