

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02117

研究課題名(和文)脳卒中リハビリテーションにおける薬理的シナプス伝達制御を伴う新たな運動療法の開発

研究課題名(英文)Development of exercise therapy combined with pharmacological treatment of synaptic transmission for stroke rehabilitation

研究代表者

前島 洋(Maejima, Hiroshi)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：60314746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,100,000円

研究成果の概要(和文)：GABA受容体阻害剤bicuculline腹腔内投与による薬理的シナプス伝達制御とトレッドミル運動介入が、脳梗塞モデルラットの運動機能回復に与える影響とその神経学的機序について検証した。中大脳動脈閉塞術後の片麻痺により運動機能障害と損傷側大脳皮質運動野における脳由来神経栄養因子(BDNF)の蛋白発現低下が生じた。これに対する2週間の介入の結果、トレッドミル運動、或いはbicuculline投与の単独介入による運動機能回復は認められなかったが、両者を組み合わせた介入により相乗的に運動機能回復が確認され、損傷側大脳皮質におけるBDNF蛋白発現の増強が生じることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中後の機能回復を目的とするリハビリテーションにおいて、運動療法は中枢神経系の可塑的变化を誘導し機能回復を促進する中心的な治療介入であるが、その治療効果を最大限有効にするため、運動療法に対する事前の神経賦活化コンディショニングが期待される。本研究は、GABA受容体阻害下における運動は相乗的に脳卒中後の運動機能回復を促進し、損傷脳におけるBDNF発現を増強することを明らかとした。従って、抑制性シナプス伝達の薬理的阻害は、脳卒中リハビリテーションにおける運動療法効果を増強するための有益な中枢性コンディショニングとなり得ることを示す基礎研究として本研究は学術的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：This study elucidated the effects of daily combined therapy of treadmill exercise (11m/min) and administration of GABA_A receptor inhibitor (bicuculline, 0.25mg/kg) for 2 weeks on motor recovery and neurological modification in the motor cortex. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) surgery impaired motor function of the paralyzed limbs and decreased the protein expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the ipsilateral motor cortex. Neither bicuculline administration nor treadmill exercise recovered motor function, whereas treadmill exercise combined with bicuculline administration improved motor function, accompanying the increase of protein BDNF expression in the ipsilateral motor cortex. This study showed the combined therapy with exercise and the inhibition of GABAergic synapses facilitates motor recovery accompanied by the increase of BDNF expression in the ipsilateral motor cortex in the model rats of ischemic stroke.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：リハビリテーション 脳卒中 運動 GABA受容体 コンディショニング

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は重篤な運動機能障害を引き起こし、罹患患者の日常生活活動や生活の質に長期的な影響を及ぼす脳血管疾患である。本邦において、脳卒中は介護を必要とする主たる要因として上位に挙げられており、脳卒中後の長期的な機能障害は社会的な課題となっている。

脳卒中後の機能回復を目的とする今日のリハビリテーションにおいて、運動療法は中心的な治療介入である。運動療法は中枢神経系における可塑的变化を誘導し脳卒中後の機能回復を促進する一方で、脳卒中患者において、覚醒レベルを含む中枢神経系全般の賦活レベルにより運動療法による介入効果は大きく阻害されている。そこで、限られた理学療法の治療機会を最大限有効にするため、運動療法に対する事前の神経賦活化コンディショニングが注目されている。

神経賦活化コンディショニングを薬理的の導入する方法として、中枢神経系において主要な抑制性シナプス伝達を担うアミノ酪酸 (GABA) 受容体を阻害する方法が考えられる。とりわけ、GABA 受容体の軽微な阻害は、直接的に神経細胞の活動電位を惹起するレベルの刺激ではなく、皮質神経細胞の脱分極を促し、シナプス入力集積による活動電位の発生を容易とする。したがって、GABA 受容体の阻害は、神経活動依存的な可塑的变化に基づく運動療法の機能回復効果を増強することが期待されるが、脳卒中後に薬理的シナプス伝達制御と運動療法を併用した場合の相乗的な効果に関する報告はない。本研究課題では、脳卒中リハビリテーションにおける GABA 受容体の薬理的阻害と運動療法の相乗効果について検証した。

2. 研究の目的

本研究では、GABA 受容体阻害による薬理的シナプス伝達制御と運動介入が、脳梗塞モデルラットの運動機能回復に与える影響、及びその背景にある神経学的機序を明らかとすることを目的とした。具体的には、脳由来神経栄養因子 (BDNF : Brain-derived neurotrophic factor) とその受容体 (TrkB : Tropomyosin receptor kinase B)、シナプスマーカー (Synaptophysin, PSD-95) などの、シナプス可塑性に有益に寄与する修飾因子の発現に着目し、大脳皮質一次運動野 (M1) におけるこれらの発現量を定量した。

3. 研究の方法

(1) 対象

10 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット 55 匹 (336.0 ± 20.9 g) を、偽手術を行い手術侵襲のみを与える SHAM 群 ($n = 8$)、MCAO 術のみを行う Control 群 (CON 群, $n = 7$)、MCAO 術後に運動介入を行う Exercise 群 (EX 群, $n = 7$)、MCAO 術後に Bicuculline 投与を行う Bicuculline 群 (BIC 群, $n = 7$)、MCAO 術後に Bicuculline 投与と運動介入を共に行う Bicuculline+Exercise 群 (BICEX 群, $n = 8$) の 5 群に分類した。術後に死亡または十分な虚血反応が得られなかった個体 18 匹は対象から除外された。

(2) 脳梗塞モデルの作成

脳梗塞モデルラットを作成するために、中大脳動脈閉塞 (MCAO : Middle cerebral artery occlusion) 術を実施した。全身麻酔後、頸部腹側切開部の総頸動脈から 4-0 モノフィラメント (4037PK5Re, Doccol Corporation, USA) を挿入し、中大脳動脈領域への血流を遮断、60 分後に再開通させ、当該領域への虚血/再灌流ダメージを与えた。SHAM 術では頸部切開を行った後に血流を遮断することなく再び縫合を行い、同様の手術侵襲を与えた。

(3) 薬剤投与

BIC 群と BICEX 群には、術後 3 日目から術後 17 日目までの 2 週間毎日、GABA_A 受容体阻害薬の Bicuculline (0.25 mg/kg) を 1 日 1 回腹腔内投与した。BICEX 群への投与は運動介入の約 15 分前に行った。薬剤投与と同等の侵襲を与えるために、CON 群と EX 群には同容量の生理食塩水を腹腔内投与した。

(4) 運動介入

EX 群と BICEX 群には、術後 3 日目から術後 17 日目までの 2 週間毎日、低負荷強度のトレッドミル走行運動 (11 m/min, 30 分) を 1 日 1 回実施した。BICEX 群への運動介入は薬剤投与の約 15 分後に行った。

(5) 行動学的評価

介入前 (術後 3 日目) および介入後 (術後 17 日目) において、粗大な神経学的機能障害を評価する Zea Longa score、上肢使用の非対称性を評価する Cylinder test、上肢の感覚機能と巧緻性を評価する Adhesive removal test を実施した。

(6) 組織採取および TTC 染色による虚血損傷体積の定量解析

最終評価から 24 時間後 (術後 18 日目) に、ラット脳組織を採取した。採取した脳組織は、厚さ 2 mm の前額断スライスに分割した後、2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 染色を行い、虚血損傷体積を計測した。TTC 染色後、腹側から 2 枚目の前額断スライスの M1 を定量的 RT-PCR に、腹側から 3 枚目の前額断スライスの M1 を ELISA に使用するために各組織を両側半球から採取した。

(7) 生化学的解析

定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現量の定量

採取した M1 組織から、RNeasy® Liquid Tissue Mini Kit (QIAGEN, ドイツ) を使用し、総 RNA を抽出した。RNA サンプルは High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。続いて、リアルタイム PCR システム (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA) を用いた定量的 PCR を行った。TaqMan® Fast Advanced Master Mix と TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) を用いてターゲット遺伝子の BDNF、TrkB、Synaptophysin、PSD-95 の cDNA をそれぞれ増幅し、内部標準遺伝子として β -actin を用いた比較 Ct 法 (Ct 法) に基づき、それぞれの mRNA 発現量を相対定量した。

ELISA 法による蛋白発現量の定量

採取した M1 組織から、Minute™ Total Protein Extraction Kit (Invent Biotechnologies, USA) を使用し、総蛋白を抽出した。その後、分光光度計 (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA) を用いて蛋白サンプルの総蛋白濃度を測定した。続いて、BDNF Emax® Immuno Assay System (Promega, USA) を用いて、BDNF 蛋白の定量を行った。ELISA で作成した検量線をもとに BDNF 濃度を算出し、総蛋白 1.0 mg に含まれる BDNF 蛋白量を算出した。

(8) 統計解析

脳卒中の影響の検証 (次章の (1))

SHAM 群と CON 群の 2 群間での群間比較を行うことで、脳卒中の影響を検証した。順序尺度を用いた Zea Longa score には Mann-Whitney の U 検定を実施した。その他の比例尺度を用いた行動学的評価および mRNA 発現量、蛋白発現量には、対応のない t 検定を実施した。有意水準はそれぞれ 5% とした。結果は平均値 \pm 標準誤差で表記した。

介入効果の検証 (次章の (2))

CON 群、EX 群、BIC 群、BICEX 群の 4 群間での群間比較を行うことで介入効果を検証した。順序尺度を用いた Zea Longa score には Kruskal-Wallis 検定を実施した。その他の比例尺度を用いた行動学的評価および mRNA 発現量、蛋白発現量には、一元配置分散分析を実施した。事後検定の多重比較として Tukey-Kramer 検定を行った。有意水準はそれぞれ 5% とした。結果は平均値 \pm 標準誤差で表記した。

4. 研究成果

(1) 脳卒中の影響の検証

行動学的評価

術後 3 日目に実施した行動学的評価の Zea Longa score、Cylinder test、Adhesive removal test のいずれにおいても、CON 群は SHAM 群認められ、MCAO 術によって神経学的機能障害および運動機能障害を確実に誘導できたことが示された。同様に、術後 17 日目に実施した行動学的評価の Zea Longa score、Cylinder test、Adhesive removal test のいずれにおいても、SHAM 群と CON 群との間に有意差が認められ、術後 17 日目においても脳卒中による運動機能障害が残存したことが示された。また、TTC 染色で定量した損傷体積において、SHAM 群には損傷領域は認められず、CON 群は SHAM 群と比較し有意に高値であった (SHAM: $0.0 \pm 0.0\%$, CON: $36.0 \pm 8.5\%$, $p < 0.001$)。したがって、成体が持つ自然回復機構を考慮した上でも、これらの行動学的評価は MCAO 術後 2 週間の機能障害を検出する評価として有益であったことが示された。

mRNA・蛋白発現量

損傷側半球 M1 において、CON 群の BDNF mRNA 発現量は SHAM 群と比較し減少する傾向が確認された ($p = 0.067$)。CON 群の Synaptophysin mRNA 発現量は SHAM 群と比較し有意な減少が認められた ($p < 0.001$)。一方、非損傷側半球 M1 においては、CON 群の BDNF mRNA 発現量は SHAM 群と比較し増強する傾向が確認された ($p = 0.050$)。その他の mRNA 発現量に関しては、CON 群と SHAM 群の間に有意差は認められなかった。CON 群の損傷側半球 M1 における BDNF 蛋白発現量は、SHAM 群と比較し有意な減少が認められた ($p < 0.001$)。一方で非損傷側半球 M1 においては、SHAM 群と CON 群の BDNF 蛋白発現量に有意な群間差は認めら

れなかった。これらの結果から、脳卒中 2 週後の損傷側半球 M1 においては、Synaptophysin mRNA 発現量および BDNF 蛋白発現量が減少していることが明らかとなった。

以上までの結果を総括すると、MCAO 術後の行動学的機能障害は少なくとも術後 2 週間持続し、BDNF や Synaptophysin をはじめとする遺伝子発現は脳卒中後に各半球で異なる調節が行われることが示された。

(2) 介入効果の検証

行動学的評価

術後 3 日目に実施した介入前の Zea Longa score、Cylinder test、Adhesive removal test のいずれにおいても、CON 群、EX 群、BIC 群、BICEX 群の 4 群間に有意な群間差は認められなかった。この結果は、介入前における運動機能障害の重症度に関して、いずれの群も同様の機能障害を呈していたことを示す。

術後 17 日目に実施した介入後の行動学的評価において、Zea Longa score に有意な群間差は認められなかった (図 1A)。一方で、Cylinder test における BICEX 群の麻痺肢使用率は CON 群と比較し有意に高値であった ($p < 0.05$, 図 1B)。さらに、Adhesive removal test における EX 群、BIC 群、BICEX 群の time-to-contact は、CON 群と比較し有意に短かった (EX 群: $p < 0.05$, BIC 群: $p < 0.01$, BICEX 群: $p < 0.01$, 図 1C)。加えて、同評価における BICEX 群の time-to-remove は、CON 群と比較し有意に短かった ($p < 0.05$, 図 1D)。

これらの結果から、1) 粗大な神経学的機能評価に関して各介入効果は認められないこと、2) 運動介入ならびに GABA 受容体阻害は脳卒中後の上肢感覚機能を改善すること、3) 運動と GABA 受容体阻害を併用した場合にのみ上肢使用率と運動機能の機能回復が促進されることが明らかとなった。尚、介入終了後のラットの損傷体積において、有意な群間差は認められなかった (CON: $36.0 \pm 8.5\%$, EX: $33.6 \pm 6.5\%$, BIC: $28.9 \pm 9.7\%$, BICEX: $23.0 \pm 5.0\%$)。

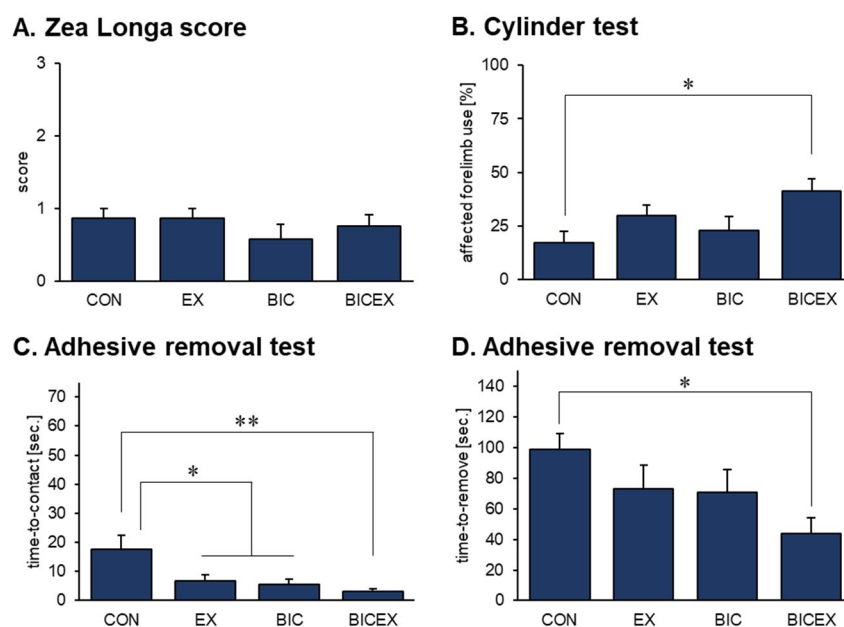


図 1: 運動介入および GABA 受容体阻害薬投与が脳卒中後の機能回復に与える影響

(一元配置分散分析, post hoc: Tukey-Kramer, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

mRNA 発現量

損傷側半球 M1 において、EX 群の Synaptophysin mRNA 発現量は CON 群と比較し有意な増強が認められた ($p < 0.05$, 図 2C)。また、BIC 群と BICEX 群の Synaptophysin mRNA 発現量も、CON 群と比較し増強する傾向が確認された (BIC vs. CON: $p = 0.050$, BICEX vs. CON: $p = 0.086$, 図 2C)。損傷側半球 M1 におけるその他の mRNA 発現量に関して、4 群間に有意差は認められなかった (図 2A,B,D)。一方で、非損傷側半球 M1 において、EX 群および BIC 群の Synaptophysin mRNA 発現量は CON 群と比較し有意な増強が認められた ($p < 0.05$, 図 2G)。非損傷側半球 M1 におけるその他の mRNA 発現量に関して、4 群間に有意差は認められなかった (図 2E,F,H)。

これらの結果は、脳卒中後において各介入が損傷側および非損傷側 M1 の遺伝子発現に影響を与えること、即ち 1) 運動介入は両側半球の Synaptophysin mRNA 発現量を増強すること、2) Bicuculline 投与による GABA 受容体阻害は非損傷側半球の Synaptophysin を増強することを示している。このことから、運動または GABA 受容体阻害薬投与それぞれ単独の介入であっても、前シナプスマーカーの遺伝子発現を増強することで、シナプス可塑性に有益に寄与する可

能性が示唆された。

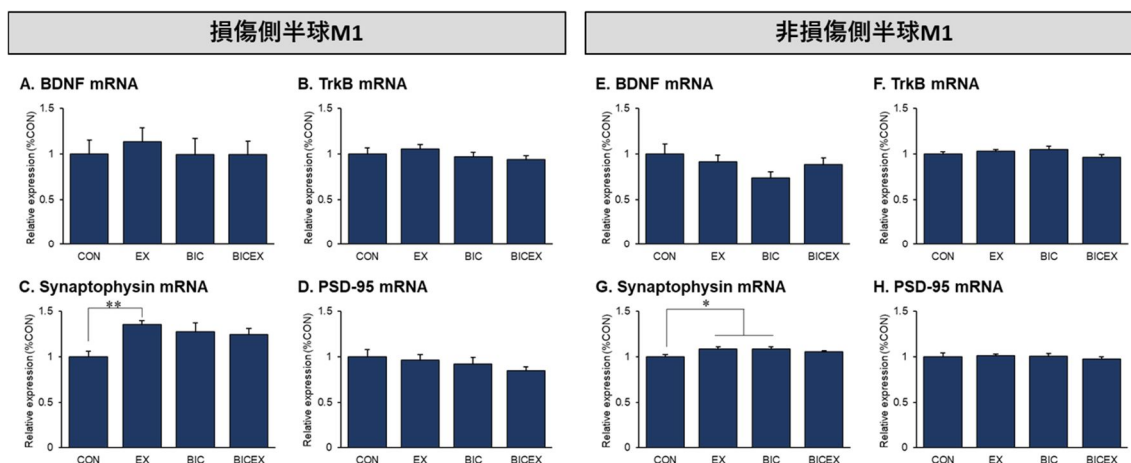


図 2: 運動介入および GABA 受容体阻害薬投与が各半球 M1 領域の mRNA 発現に与える影響
(一元配置分散分析, post hoc: Tukey-Kramer, * p<0.05, ** p<0.01)

BDNF 蛋白発現量

損傷側半球 M1 において、BICEX 群の BDNF 蛋白発現量は CON 群、EX 群、BIC 群と比較し有意な増強が確認された。(p<0.001 vs CON, p<0.01 vs EX, p<0.05 vs BIC, 図 3A)。一方で非損傷側半球 M1 においては、BDNF 蛋白発現量に有意な群間差は認められなかった(図 3B)。この結果から、脳卒中後に運動介入と GABA 受容体阻害を併用した場合にのみ、損傷側半球 M1 における BDNF 発現が特異的に増強することが明らかとなった。

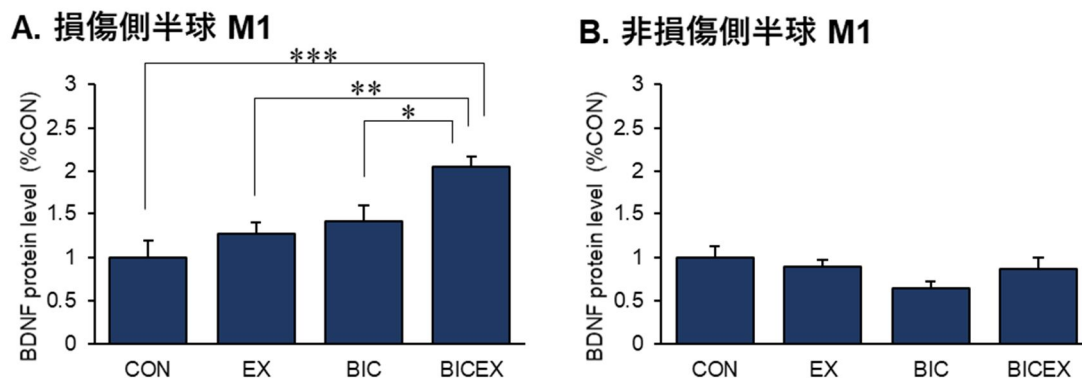


図 3:
運動介入および GABA 受容体阻害薬投与が各半球 M1 領域の BDNF 蛋白発現に与える影響
(一元配置分散分析, post hoc: Tukey-Kramer, * p<0.05, ** p<0.01)

以上を総括すると、GABA 受容体阻害投与と運動介入による併用療法は、脳梗塞モデルラットの運動機能回復を効果的に促進するとともに損傷側半球 M1 における BDNF 発現を増強することが本研究課題から明らかとなった。したがって、抑制性シナプス伝達の薬理的阻害は、脳卒中リハビリテーションにおける運動療法効果を増強するための有益な中枢性コンディショニングとなる可能性がある。また、その機能回復効果は、大脳皮質運動野における神経栄養因子発現の増強に伴うシナプス可塑性の向上に起因する可能性が本研究課題から示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue T., Okamura M., Kitahara M., Takamatsu Y., Sakakima H., Maejima H.	4. 巻 430
2. 論文標題 Exercise plus pharmacological neuromodulation of synaptic inhibition enhance motor function recovery after ischemic stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 12-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.01.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maejima H., Inoue T., Takamatsu Y.	4. 巻 22(1)
2. 論文標題 Therapeutic exercise accompanied by neuronal modulation to enhance neurotrophic factors in the brain with central nervous system disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physical Therapy Research	6. 最初と最後の頁 38-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1298/ptr.R0004. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maejima Hiroshi, Ninuma Shuta, Okuda Akane, Inoue Takahiro, Hayashi Masataka	4. 巻 685
2. 論文標題 Exercise and low-level GABAA receptor inhibition modulate locomotor activity and the expression of BDNF accompanied by changes in epigenetic regulation in the hippocampus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 18~23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamura M., Inoue T., Takamatsu Y., Maejima H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Low-Level Inhibition of GABAergic Synapses Enhances Gene Expressions Crucial for Neuronal Plasticity in the Hippocampus After Ischemic Stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease	6. 最初と最後の頁 105316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105316.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Inoue T., Kitahara M., Okamura M., Maejima H.
2. 発表標題 Combination of exercise and pharmacological neuromodulation targeting GABAA receptors promotes motor recovery and BDNF protein expression in the M1 after focal brain ischemia in rats
3. 学会等名 The Society for Neuroscience 48th Annual Meeting (Neuroscience 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maejima H., Hayashi M., Inoue T., Kitahara M.
2. 発表標題 Voluntary exercise combined with repetitive inhibition of GABAergic synapses modulates the expression of BDNF in the motor cortex.
3. 学会等名 The Society for Neuroscience 48th Annual Meeting (Neuroscience 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue T. Okamura M., Kitahara M., Takamatsu Y., Maejima H.
2. 発表標題 Treadmill exercise beneficially contributes to gene expressions relating to synaptic and axonal plasticity in the motor cortex after ischemic stroke in rats.
3. 学会等名 The 1st International Sport Neuroscience Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maejima H., Ikuta G., Takahashi K.
2. 発表標題 Exercise combined with low-level GABAA receptor inhibition modulates the expression of neurotrophins in the cerebellum.
3. 学会等名 The 1st International Sport Neuroscience Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamura M., Inoue T., Kako Y., Takamatsu H., Maejima H.
2. 発表標題 The effects of low-intensity exercise on the gene expressions relating to synaptic plasticity in the hippocampus following ischemic stroke in rats.
3. 学会等名 The 42st Annual Meeting of the Japan Neurosciece Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue T., Takamatsu Y., Maejima H.
2. 発表標題 The interactive effects of GABA receptor antagonist and exercise on the recovery of motor function and BDNF expression in the ipsilesional M1 after ischemic stroke in rats.
3. 学会等名 The 42st Annual Meeting of the Japan Neurosciece Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maejima H., Kitahara M., Hayashi M., Inoue T., Li X.
2. 発表標題 Site-specific modulation of BDNF expression in the brain following chronic GABAA receptor inhibition.
3. 学会等名 FENS Forum 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inoue T., Ninuma N., Hayashi M., Okuda A., Asaka T., Maejima H.
2. 発表標題 Low-level inhibition of GABAA receptor and motor exercise modulate BDNF expression in the motor related cortex.
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neurosciece Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前島 洋
2. 発表標題 エピジェネティクス制御を伴う脳由来神経栄養因子の運動依存的発現修飾
3. 学会等名 日本基礎理学療法学会 夏の学校
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上貴博, 林 正隆, 李 想, 北原美佳, 前島 洋
2. 発表標題 GABA受容体阻害下の運動療法が脳卒中後の機能回復に与える影響
3. 学会等名 第23回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	真先 敏弘 (Masaki Toshihiro) (00585028)	帝京科学大学・医学教育センター・教授 (33501)	
研究分担者	榊間 春利 (Harutoshi Sakakima) (10325780)	鹿児島大学・歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	齊藤 展士 (Hiroshi Saito) (60301917)	北海道大学・保健科学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------