

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10718

研究課題名(和文) 集中リハビリテーションにおける神経回路レベルでの作用機序の解明と臨床応用への展開

研究課題名(英文) Mechanism of forced-limb use after intracerebral hemorrhage in the neural circuit level in rats

研究代表者

石田 章真 (Ishida, Akimasa)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：20632607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳出血後の集中的リハビリテーションによる運動機能の改善が報告されている。その改善メカニズムにおける小脳が関与する運動調節系の関与について、赤核-オリブ核-小脳の回帰性回路に注目し、選択的神経遮断をラットで実施し、上肢巧緻機能を評価した。その結果、対照群に比べ小脳赤核路の神経遮断により改善機能が有意に低下することが証明され、脳出血後の麻痺側上肢集中使用による上肢巧緻機能の回復における小脳の調節機構が関係することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中後に麻痺側上肢を集中使用させるリハビリテーションとしてCI療法がおこなわれている。その改善メカニズムを動物実験レベルで検討するために本実験が実施された。これまでに脳内出血モデルを用いた研究から、脳出血後の麻痺側集中使用による機能改善と皮質赤核路の因果関係を示しているが、本研究の結果から上肢巧緻機能の回復における運動実行系の階層的な変化に加え、小脳赤核路が関与する運動調節系の関与も明らかになった。加えて、調節系においても実行系に即した階層的な変化が生じている可能性が示された。

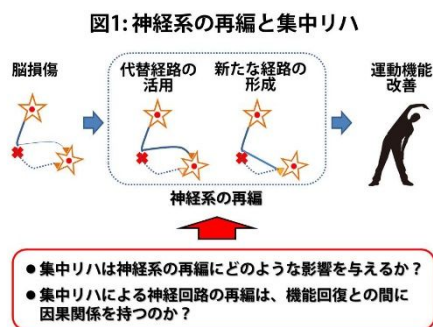
研究成果の概要(英文)：The improvement of motor function after cerebral hemorrhage with the intensive rehabilitation is reported. To know the recovery mechanism, we focused on the recurrent circuit of red nucleus-olive nucleus-cerebellum and performed the assessment of forelimb function after selective blockade of the recurrent circuit by double-virus infection method. We proved that functional recovery by the rehabilitation was significantly decreased in comparison with control group by the selective blockade of the circuit. Thus, it was revealed that motor regulatory system in the cerebellum (the cerebello-rubral pathway) is related to the functional recovery in the skilled forelimb reaching by intensive rehabilitation after cerebral hemorrhage.

研究分野：脳神経生理学

キーワード：麻痺側強制使用 脳内出血 上肢巧緻機能 小脳赤核路 ウイルス二重感染法 選択的神経遮断

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は高率に一側上下肢の運動・感覚機能障害を生じ、それにより著しい参加の制限および人生の質の低下を招くことから、その克服は医療において重要な課題である。これに対し、集中的なリハビリテーション(以下集中リハ)が有効な治療法の一つとして知られている。脳卒中後の集中リハは神経成長因子の発現増加や神経突起の伸長促進などの作用を持ち、損傷脳において残存した神経回路の再編成を促すことで機能の再獲得を増進するものと考えられている (Maier et al., 2008)。しかし、集中リハによる中枢神経系の変化と運動機能改善効果とを直接的に結びつけて証明した報告は未だ少ない。損傷脳において集中リハがどの神経回路を、どんな因子を介して変化させるか、それによりどんな運動機能が改善するか、といった因果関係レベルでの作用機序の解明は未だ進んでおらず、リハビリテーションの効果を増進させるために重要な問いとなっている(図1)。



これまでに所属研究室で開発された内包部出血モデルラットを用い、集中リハが中枢神経系に及ぼす影響を分析し、以下の成果を得ている。

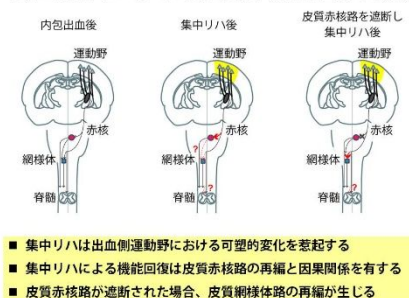
- I. 内包出血後早期からの麻痺肢集中リハにより、手の巧緻運動機能が改善する
- II. 内包出血後早期の集中リハは機能を大きく改善するが、慢性期での実施は効果が低い。 早期の集中リハにより、出血側運動野において神経活動マーカー (FosB) と成長関連因子 (BDNFおよびGAP43) の発現増加がみられ、樹状突起に豊富な分枝が生じる
- III. 出血側運動野において、集中リハ後には手の運動を担う領域が拡大し、運動機能の改善と関連する。同領域からは同側の赤核に対し豊富な軸索投射が生じ、これを選択的に遮断すると、集中リハによって改善を見せていた運動機能が再び悪化した
- IV. 上記の皮質赤核路を予め機能遮断した状態で集中リハを行うと、運動機能は改善した。この際、皮質赤核路の代わりに皮質網様体路に豊富な軸索分枝がみられた

これら成果から、集中リハの作用機序として以下のような推論を考えた(図2)。

- 1) 主に出血側運動野において可塑的变化が生じる。
- 2) 同領域の手の体部位再現領域の拡大が生じており、機能的な再構成が生じる。
- 3) 同領域から赤核や網様体への投射が再編されており、運動機能改善と因果関係を有する。

つまり、内包出血後の集中リハにより、主に脳幹の運動核をバイパスする運動性神経回路が代償的に発達することが示唆されている。

図2: 集中リハによる運動野-脳幹経路の再編



2. 研究の目的

本研究は、脳出血後の集中リハによる機能改善効果における運動野-脳幹間の果たす役割運動機能をより詳細に解析するため、赤核-オリブ核-小脳-赤核という回帰性回路の神経核間の選択的神経遮断を用い、脳出血後の麻痺側上肢集中使用による運動機能回復過程における小脳が関与する調節機構の適応的变化を解析することを目的とした。

最終目標に向けた目的のため、1)リハビリテーションによる運動機能の回復に関係すると考えられる赤核(小細胞部)へ入出力経路の確認、2)小脳核(歯状核)およびプルキンエ細胞からの多点電極を用いた電気応答確認の可否、3)ウイルス二重感染法の小脳および赤核への適応の可否を含む最終目的に向けた実験系確立、を実施し、次に脳出血後の麻痺側集中使用によって運動機能が回復した動物に対し、4)小脳へ AAV-DJ-EF1-DIO-hM4D(Gi)-mCherry を赤核小細胞部へ FuGE-MCSV-Cre を二重感染させ、5)CNO 投与による DREDD 法を用いペレットリーチ試験の上肢機能評価を実施する。さらに、6)多極電極法によって、機能変化に伴う小脳-赤核路の神経活動の変化を傍証として捉える。これにより、脳出血後の集中リハビリによる機能回復過程における小脳を介した調節機構のダイナミックな変化の検討を行った。

3. 研究の方法

1, 動物実験

8週齢以降の Wistar ST ラットを用い、脳定位固定器を用い順行性または逆行性トレーサーを赤核および小脳外側核へ投与し、その入出力経路の確認を行った。

脳定位固定器を用い内包近傍にコラゲナーゼ(1.4 μ l, 200U/ml)を7分間で注入し、脳出血モデルラットの作成をした。脳内出血後の上肢巧緻機能の評価法として、ペレットリーチテストによりその成功率を指標とした。

6週齢 Wistar ラットに対し2週間ペレットリーチングのプレトレーニングを実施したのち、8週齢時にレトルウイルスベクターを投与、9週齢時にアデノ随伴ウイルスベクターを投与し、ウイルス二重感染を実施した。

脳内出血1日後から7日間を麻痺側上肢集中使用(リハビリテーション)させ、出血12日後に上肢巧緻機能を評価、出血16, 20日後にCNO腹腔内投与30分後のリーチング機能を評価、さらに脳出血28日後にCNO非投与条件下で上肢巧緻機能の評価を行った。

2, 赤核への入出力経路の確認

赤核小細胞部へ Mini-Ruby を限局的に注入し、小脳外側核へ順行性トレーサーのピオチンデキストラミン(BDA)を注入した。

3, 多点電極を用いた小脳からの電気応答

脳定位固定器を用いてイソフルランの吸入麻酔下により、目的部位に多点電極(NeuroNexus)を刺入した。PLEXON社製 OmniPlex システム(16channel)を用いデータ解析を行った。

4, ウイルスベクター二重感染法

6週齢 Wistar ラットに対し2週間ペレットリーチングのプレトレーニングを実施した後、8週齢で赤核へレトルウイルスベクター(FuG-E-MSCV-Cre)を投与、その1週後に小脳外側核へアデノ随伴ウイルスベクター(AAV-DJ-EF1-DIO-hM4D(Gi)-mCherry)を投与し、小脳赤核路の神経遮断を可能とした。

4. 研究成果

1, 赤核(小細胞部)への入出力経路の確認

初めに逆行性トレーサー Mini-Ruby を赤核2カ所に注入し、対側小脳核、同側帯状回および同側運動野の染色性を検討した。その結果、小脳の外側核、中位核、内側核において Mini-Ruby 陽性細胞が検出できた。また sham 群、脳内出血群、脳内出血+リハビリ群の3群間に陽性細胞数に有意な差は認められなかった。すなわち、より限局した赤核へのトレーサー注入が必要であることが明らかになった。

次に、赤核小細胞部へ限局的に Mini-Ruby を注入し、小脳外側核へ順行性トレーサーのビオチンデキストラミン(BDA)を注入した。その結果、赤核の1箇所(A: -5.2mm, L: 1.6mm, V: 7.5mm)への Mini-ruby 投与により、対側外側核に比較的限局した陽性細胞の検出を確認した(図1)。

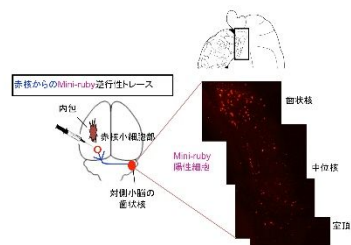


図1 赤核へのMini-Ruby注入による小脳核の逆行性トレーサー

また、BDA の外側核への投与により、対側赤核において BDA 陽性線維を確認、さらに小脳外側核への Mini-ruby 投与によりプルキンエ細胞層でその陽性細胞体を確認した。

以上の結果から、プルキンエ細胞-小脳外側核-赤核小細胞部の神経連絡が確認できた。

2, 小脳外側核およびプルキンエ細胞からの電気応答の確認

脳出血後のリハビリテーションによる運動調節系での電気応答変化を計測するため、その前段階として正常ラットのプルキンエ細胞において多点電極法による電気応答の検出を目指した。

その結果、脳固定器を用いた麻酔下において前肢対応部位の小脳皮質からスパイク応答を記録することが可能になった。また記録シグナルのスパイク解析から、単純スパイクおよび複雑スパイクの各応答が検出できていることが明らかになった(図2)。すなわち、脳出血後のリハビリテーションによる小脳プルキンエ細胞での電気応答変化を、多点プローブを用いた方法により計測することが可能となった。

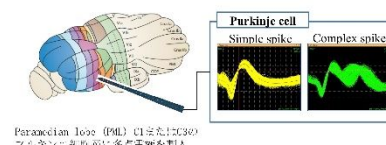


図2 小脳プルキンエ細胞からのスパイク検出と解析

3, 小脳-赤核路のウイルスベクター二重感染の最適化

小脳外側核-赤核小細胞部の神経連絡をウイルス二重感染法によって選択的神経遮断をするため、研究協力者の生理学研究所の小林憲太准教授と情報交換を行い、今後の実験計画を決定した。すなわち、小脳外側核へアデノ随伴ウイルスベクター(AAV-DJ-EF1-D10-hM4D(Gi)-mCherry)を注入、赤核小細胞部へレトルウイルスベクター(FuGE-MCSV-Cre)を注入することに決定した。

ウイルスベクター注入の最適化を検証するため、小脳外側核へ AAV-DJ-CAGGS-FLEX-EGFP を、赤核へ FuG-E-MSCV-Cre を投与し、注入条件(量、回数、速度)を検証した。Cre に応答し発現する EGFP 陽性細胞をマーカーとして確認した結果、表1のような条件により小脳-赤核路へウイルスベクターを効率的に二重感染させることが可能であることが判明した。

	各左右	注入量	AD	ML	DV	傾斜角
赤核小細胞部	1箇所	0.8 μ l /4min	- 5.2	\pm 1.6	脳表 7.5	側方 5度
小脳外側核	2箇所	0.6 μ l /3min	- 11.0	\pm 3.5	4.4	垂直
			- 11.4	\pm 3.6	4.3	

表1 小脳赤核路へのウイルス二重感染の条件

4, DREADD 法を用いた小脳赤核路の神経遮断による上肢運動機能の評価

8週齢で赤核へFuG-E-MSCV-Creを投与、さらに1週間後に小脳外側核へ(AAV-DJ-EF1-DIO-hM4D(Gi)-mCherry)を投与した。

脳内出血モデル作成の直前2~3日間のプレトレーニング時のリーチング機能を評価した。脳内出血1日後から7日間を麻痺側上肢集中使用(リハビリテーション)させ、出血12日後に機能評価し、出血16, 20日後にCNO投与30分後のリーチング機能を評価、さらに脳出血28日後にCNO非投与条件下で上肢機能を評価した(図1)。

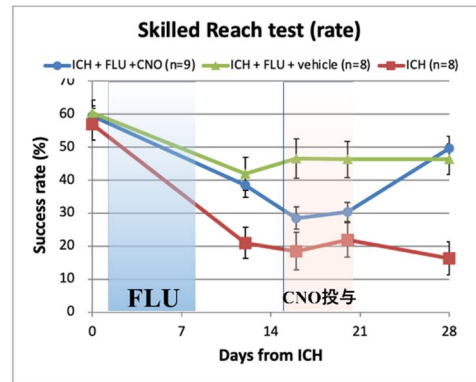


図1 CNO投与による小脳赤核路神経遮断

その結果、脳出血後のリハビリテーションにより12日後に改善を示した上肢機能が、CNO投与によりその改善効果が消失することが明らかになった。さらに脳出血28日後のCNO非投与時にはリハビリテーション改善効果が認められることも確認できた。一方、CNO作用は投与3時間後には消失し、再度リハビリテーション改善効果が確認できることも確認している(データ省略)。

以上より、CNO投与による小脳-赤核路の選択的神経遮断によって、脳出血後の麻痺側集中使用による上肢機能の改善が有意に消失することが示された。

5, 小脳外側核刺激による赤核での電気応答変化の確認

多点電極プローブを用いる電気生理学的な実験手法と解析技術を用い、以下の実験に取り組んだ。

前述のような小脳-赤核路の神経遮断により脳出血後のリハビリテーションによる上肢機能改善の阻害が示されたため、その傍証として小脳外側核の電気刺激に対する赤核応答性の解析を、多点電極ローブを用い実施している。

小脳外側核(AP: -13.2, ML:3.5, DV:4.5 後方20度傾斜)を電気刺激(10~200 μ A, duration: 0.1msec, interval: 3.3msec, 10 trains)し、赤核小細胞部から多点電極プローブより得られた3 train後の集合電位を計測評価した。

これまでに個体数は生食投与コントロール群およびCNO投与群ともにn=1であるが、小脳外側核刺激に応答する集合電位は生食投与1時間後まで大きな変化がないのに対し、CNO投与群では投与20分以降に最大35%程度の電位の減少が確認された。今後n数を増やす必要はあるが、CNO投与による小脳-赤核路の神経遮断効果の電気生理学的な傍証が推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ogawa S, Hagiwara M, Misumi S, Tajiri N, Shimizu T, Ishida A, Suzumori N, Mayumi Sugiura-Ogasawara M, Hida H	4. 巻 29
2. 論文標題 Transplanted oligodendrocyte progenitor cells survive in the brain of a rat neonatal white matter injury model but less mature in comparison with the normal brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689720946092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu T, Ishida A, Hagiwara M, Ueda Y, Hattori A, Tajiri N, Hida H	4. 巻 443
2. 論文標題 Social defeat stress in adolescent mice induces depressive-like behaviors with reduced oligodendrogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 218-232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishida A, Kobayashi K, Ueda Y, Shimizu T, Tajiri N, Isa T, Hida H.	4. 巻 39(37)
2. 論文標題 Dynamic Interaction between Cortico-Brainstem Pathways during Training-Induced Recovery in Stroke Model Rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 306 -7320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0649-19.2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ueda Yoshitomo, Bando Yoshio, Misumi Sachiyo, Ogawa Shino, Ishida Akimasa, Jung Cha-Gyun, Shimizu Takeshi, Hida Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Alterations of Both Dendrite Morphology and Weaker Electrical Responsiveness in the Cortex of Hip Area Occur Before Rearrangement of the Motor Map in Neonatal White Matter Injury Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2018.00443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Yoshitomo, Misumi Sachiyo, Suzuki Mina, Ogawa Shino, Nishigaki Ruriko, Ishida Akimasa, Jung Cha-Gyun, Hida Hideki	4. 巻 43
2. 論文標題 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	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 136 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2352-3	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 Shimizu T, Murakoshi H, Matsumoto H, Ichino K, Hattori A, Ueno S, Ishida A, Tajiri N, Hida H.	4. 巻 443
2. 論文標題 Tension Sensor Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Reveals Fiber Diameter-Dependent Mechanical Factors During Myelination.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 218-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2021.685044. eCollection 2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takeshi Shimizu, Hideji Murakoshi, Hidetoshi Matsumoto, Akimasa Ishida, Naoki Tajiri, Hideki Hida
2. 発表標題 New assay system to detect mechanical force in myelinating oligodendrocytes using a tension sensor probe
3. 学会等名 日本神経科学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Tajiri, Shino Ogawa, Atsunori Hattori, Akimasa Ishida, Takeshi Shimizu, Hideki Hida
2. 発表標題 Intracerebral grafts of oligodendrocyte progenitor cells attenuate behavioral deficits in neonatal white matter injury model of rats
3. 学会等名 日本神経科学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Shimizu, Hideji Murakoshi, Hidetoshi Matsumoto, Akimasa Ishida, Naoki Tajiri, Hideki Hida
2. 発表標題 Investigation of a novel mechanism underlying neuronal subtype-dependent myelination
3. 学会等名 日本生理学会2021 名古屋 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Shimizu, Akimasa Ishida, Naoki Tajiri, Hideki Hida
2. 発表標題 Chronic social defeat stress to adolescent mice induces anxiety-like behavior with reduced oligodendrogenesis
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsunori Hattori, Yoshitomo Ueda, Naoki Tajiri, Hideki Hida
2. 発表標題 Functional recovery by enriched environment in neonatal white matter injury: evidence from morphological and electrophysiological assessments
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Shimizu, Akimasa Ishida, Naoki Tajiri, Hideki Hida
2. 発表標題 Chronic social defeat stress to adolescent mice reduces anxiety-like behavior with reduced oligodendrocyte generation
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsunori Hattori, Yoshitomo Ueda, Naoki Tajiri, Shino Ogawa, Akimasa Ishida, Takeshi Shimizu, Hideki Hida
2. 発表標題 Effect of environmental enrichment on neonatal white matter injury in rat
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishida A, Kobayashi K, Ueda Y, Shimizu T, Tajiri N, Isa T, Hida H
2. 発表標題 Dynamic interaction between the cortico-rubral and the cortico-reticular tract in rehabilitation-induced functional recovery in internal capsule hemorrhage rats
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishida A, Shimizu T, Tajiri N, Kobayashi K, Isa T, Hida H
2. 発表標題 Role of cortico-brainstem circuits in poststroke rehabilitation-induced functional recovery
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishida A, Kobayashi K, Isa T, Hida H
2. 発表標題 Interaction between cortico-rubral tract and cortico-reticular tract in rehabilitation-induced functional recovery after capsular hemorrhage
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田章真、小林憲太、伊佐正、飛田秀樹
2. 発表標題 集中リハビリテーションによる機能代償における皮質赤核路と皮質網様体路の相互作用
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

1. 発表者名 Ishida A, Kobayashi K, Isa T, Hida H
2. 発表標題 Contribution of the cortico-rubral and cortico-reticular tracts on functional recovery induced by poststroke rehabilitation
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishida A, Kobayashi K, Isa T, Hida H
2. 発表標題 Sprouting of the cortico-rubral tract induced by an intensive rehabilitation contributed to functional recovery in internal capsule hemorrhage rats
3. 学会等名 25th the American Society for Neural Therapy and Repair (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishida A, Kobayashi K, Ueda Y, Isa T, Hida H
2. 発表標題 Compensative sprouting of the cortico-brainstem projections induced by an intensive rehabilitation in internal capsule hemorrhage rats
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
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
研究協力者	飛田 秀樹 (Hida Hideki)		

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
---------	---------