

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19785

研究課題名（和文）GABA作用から探る運動麻痺回復時の脳可塑性に訓練の違いが及ぼす影響の検証

研究課題名（英文）The effects of training conditions for functional recovery and plasticity after stroke in view of GABA change.

研究代表者

佐藤 ちひろ（Sato, Chihiro）

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：70757468

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：脳卒中後の運動麻痺には運動療法が効果的だが、その作用機序は未解明である。脳可塑性の全貌を目指して本研究では、脳内抑制物質であるGABAが発達期や障害時においてはKCC2の働きを介して興奮性に作用する仕組みに着目し、脳卒中モデル動物を用いて運動療法の効果ならびにKCC2の変動を解析した。その結果、機能回復は運動療法により促進されるが、治療成績は運動様式に大きく左右された。また、病巣周辺におけるKCC2は脳出血発症後に著しく減少し、経過とともに回復した。以上の結果より、病態に応じた適切な治療種目の選択が機能回復の予後を大きく左右すること、機能回復の課程にはKCC2変動が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、脳卒中後に生じた運動機能の回復は運動療法により促進されるが、治療成績は運動様式に大きく左右されることが確認できた。さらに、脳出血巣の周辺組織においては発症直後からKCC2が著しく減少し、経過とともに回復することが明らかとなった。

以上の結果より、病態に応じた適切な治療種目の選択が機能回復の予後を大きく左右すること、機能回復の課程にはKCC2変動を通じたGABA作用の転換が脳内ネットワークの再構築に関与する可能性が示唆された。本成果は未だ乏しい脳卒中後リハビリテーションの神経科学的根拠の提言につながるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Exercise is effective for motor dysfunction after stroke. Elucidation of the mechanism is urgently needed, because it is unknown. We focused on the mechanism by GABA, an inhibitory substance in brain, acts on excitability through changing in KCC2 during development and having injury. In this study, we analyzed the effects of exercise and changes in KCC2 after stroke using model animals. As a result, it was found that functional recovery was promoted by exercise, but was greatly affected by exercise style. In addition, KCC2 levels around the lesion decreased markedly after the onset of hemorrhage, and recovered over time. These results suggested that the prognosis of functional recovery was greatly influenced by the selection of appropriate treatment according to the pathology, and that changing of KCC2 might be involved in the process of functional recovery.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：脳卒中モデル 運動麻痺 リハビリテーション 脳可塑性 GABA KCC2

1. 研究開始当初の背景

脳卒中後遺症の運動麻痺に対する治療の現状：

医療の発展により脳卒中後の死亡率は減少したが、生存後の後遺症治療の重要性が高まっている。種々の脳卒中後遺症のうち、多彩な役割を持つ“手”に生じた運動麻痺がもたらす弊害は非常に大きく、QOLを著しく悪化させる。そのため、効果的な運動麻痺治療法の開発が急がれているが、その詳細な作用機序が明らかでない。効果的な治療法として、感覚刺激すなわち求心性の入力が遠心性の出力に影響を与えることや、タスク課題やアクロバティック課題などの種目選択によって回復する脳領域が異なることなど、訓練の質が脳回復を左右することが分かってきたが、ヒトを対象とした脳内の可塑的変化の検証には限界があり、その全貌は未解明である。さらに申請者は、運動麻痺回復は身体的要素だけでなくモチベーションやストレスといった心理の影響を受けることを明らかにしており、脳回復に“こころ”が及ぼす影響を加味した訓練課題の提供により回復効果が飛躍的に向上する可能性がある。

発症後の脳内における変化：

従来、脳可塑性は残存神経によるネットワークの再構築とされてきたが、近年はある条件下において神経細胞新生が生じて神経回路に取り込まれることが注目されている。さらに、異常神経回路形成へグルタミン酸が関与することは知られていたが、発達期や傷害時には、成体脳内における抑制性伝達物質である GABA が KCC2 の働きを介して細胞内 Cl⁻濃度を変動させて興奮性に作用し、神経回路形成・再編成、細胞移動に重要な役割を果たすことが近年報告されている(J. Yamada et al (J.Physiol.2004))。脳卒中後の脳内では、上述のような変化が機能回復を促進させる役割を担っている可能性があるが、その詳細は明らかでない。

2. 研究の目的

上述のように、訓練負荷量や求心性刺激の入力が運動経路回復に与える影響を脳および個体レベルで検討することにより、上肢・手指に対する最も有効な運動麻痺治療法の開発につながると考えられる。さらに、KCC2 発現機構を通じた GABA 作用の反転、すなわち GABA グルタミン酸のバランスの変動の側面から脳可塑性の詳細解明を目指した報告は少ない。

本研究では、Photochemically Induced Thrombosis (PIT) 法により作出したモデルラットに対し、その病態解明、リハビリテーションによる機能回復、GABA 機構の観点から脳可塑的変化を促進する治療法の検討を目的に以下の内容に取り組む。

脳梗塞モデル動物の病態解析、運動療法による機能回復効果の検討、病期、訓練別の KCC2 発現状態の評価 を検討する。

3. 研究の方法

当初の計画では、モデルラットのみ使用予定であったが、研究効率の向上のためにモデルマウスを確立し、両モデルを用いて検討を行った。

(1) 脳梗塞モデル動物の作出および病態解析

ヒトにおける手の麻痺に対応させた病態再現のために、PIT 法を用いて光照射により限局的な脳梗塞を作出し、前肢のみに運動麻痺を呈するモデル動物を作出した。光増感剤にはローズベンガル(成体雄ラット：10mg/kg, 1.0ml/kg, v.p, 成体雄マウス：8ml/kg, 10mg/ml, i.p)を用い、前肢支配領域へ緑色光を照射した。

行動評価：前肢機能の微細運動機能の評価にはラット、マウスの両モデルに対して single-pellet reaching task を用い、20 施行中実施したうち把握・運搬に成功した回数の割合を成功率として算出した。また前肢の粗大運動の指標には、ラットには table test および Horizontal test を用い、マウスに対しては Horizontal Ladder test を用いて評価を行った。

(2) 訓練種目と前肢の運動麻痺改善効果との関連を検討

行動学的評価ならびに運動麻痺訓練を行い、最も効果的な訓練を決定する。運動介入には、ヒトにおける運動麻痺治療法の中でも最も推奨グレードの高い CI 療法を倣った、麻痺側前肢の強制使用 (Forced Limb Use, 以下 FLU) を用いる。非麻痺側前肢を弾性包帯で固定し、麻痺側肢での日常生活を 24 時間行わせた。摂食・飲水、排泄動作能力に影響がないこと、体重の過度な増減がないことを都度確認した。FLU の併用課題として、Single-pellet Reach Task を用い、麻痺側前肢手指の微細運動の機能回復を狙った。

運動機能評価は、上述の評価を用いて、運動機能の回復を経時的に評価した。

(3) 訓練による脳可塑性との関連の検討ならびに GABA-グルタミン酸バランスの作用

前述の個体レベルでの検証結果をもとに、運動機能改善時のストレスや脳回復の状態を評価した。ストレス状態の評価には、コルチコステロン濃度の計測を ELISA 法により行った。脳回復に影響を与える因子として KCC2 の発現状態を評価するために、脳スライス標本作製し、蛍光免疫染色を行った。評価時期は介入終了後とした。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞モデル動物の作出および病態解析

モデル動物の作出：

術後のモデルラット前肢の微細運動機能・粗大運動機能を評価した結果、両機能に術後1日目から重度の前肢機能障害が出現し、28日目まで障害は残存した。また歩行能力には著大な低下は認めなかった。同様に、マウスモデルに対する評価を実施した結果、同様の経過を示しており、前肢に限局したモデルマウスが確立できた。

(2) 訓練種目と前肢の運動麻痺改善効果との関連を検討

運動介入による機能回復：

ラットモデルに対して麻痺側肢強制使用単独およびFLUにsingle-pellet reaching taskを併用し回復を評価した。その結果、FLUを行うことにより粗大運動機能は回復したが微細運動機能は回復しなかったが、FLUにSingle-pellet reach taskを行った結果、粗大運動ならびに微細運動機能の回復を認めた。すなわち、微細運動機能の回復には課題特異的な回復が生じることを確認した。しかし、Single-pellet reach task単独による効果検証が不十分であったため、マウスモデルを用いて上記の介入に加えて、Single-pellet reach taskの効果検証を行った。その結果、微細運動機能の回復はFLUの実施に関わらず、Single-pellet reach taskの実施によって生じていた。反対に、粗大運動機能の回復はSingle-pellet reach taskの実施に関わらずFLU実施により生じていた。これらの結果より、肩・前腕など大関節の複合運動によって生じる対象物への手部の到達能力および手指・手関節の操作による微細運動機能の回復はいずれも課題依存的に起こる可能性があり、機能回復を狙った訓練設定はより生活課題に即した形で実施することが有用である可能性がある。

(3) 訓練による脳可塑性との関連の検討ならびにGABA-グルタミン酸バランスの作用

ストレス状態の評価：モデルラットを用いて運動介入後28日時点での血液サンプルを採取し、血漿中コルチコステロン濃度を計測した。その結果、28日時点においてFLU実施群のコルチコステロン濃度が他の2群において高く、介入時のストレスより反応性が高まっていた可能性が示唆された。しかし、この結果では運動介入直後の影響は不明であるため、現在は経時的な採血技術を確立し、介入経過中のストレス状態の評価を追って検証を進めている。

KCC2の発現状態評価：KCC2の発現状態を免疫染色で評価した。染色条件を検討するために、まずは先行研究に報告のある出血モデルの病巣周辺について解析を行った。その結果、術後24時間後の病巣周辺では、KCC2発現量が著しく低下していた。さらに、発症からの経過を追って観察したところ、術後1日から28日時点において同様の結果であった。このことから、脳卒中発症によるGABA-グルタミン酸バランスが変動しており、脳梗塞モデルにおいても同様の反応が生じている可能性が示唆された。現在、梗塞モデルに対して同様の評価を介入別・時期別に解析し、脳可塑性にGABA作用の反転が与える影響の検証を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 小枝周平, 手塚千尋, 對馬景子, 工藤洋子, 佐藤ちひろ, 山田順子	4. 巻 55
2. 論文標題 要介護高齢者の認知機能低下と金銭支払い能力との関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 作業療法ジャーナル	6. 最初と最後の頁 603-610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.5001202550	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 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Shuji Shimoyama, Mitsuru Chiba, Misaki Mikami, Shuhei Koeda, Koshi Sumigawa, Kazuki Akahira, Junko Yamada	4. 巻 31
2. 論文標題 Effects of voluntary and forced exercises on motor function recovery in intracerebral hemorrhage rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroreport	6. 最初と最後の頁 189-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001396	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 -

1. 著者名 Shuhei Koeda, Tatsuki Yoshikawa, Chihiro Sato, Koshi Sumigawa, Junko Yamada	4. 巻 31
2. 論文標題 Ultrasound irradiation before high-load exercise reduce muscle rigidity associated with delayed-onset muscle soreness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The journal of Physical Therapy Science	6. 最初と最後の頁 922-924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小枝周平, 三上美咲, 斉藤まなぶ, 佐藤ちひろ, 富田桃子, 中村和彦, 山田順子
2. 発表標題 運動嫌いにより介入が困難であった発達性協調運動障害の一症例
3. 学会等名 第4回日本DCD学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小枝周平 , 三上美咲 , 佐藤ちひろ , 山田順子
2. 発表標題 自閉症モデルマウスに対する強制運動の悪影響
3. 学会等名 第55回日本作業療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuheii Koeda, Ayaka Monden, Misaki Mikami, Chihiro Sato, Junko Yamada
2. 発表標題 Forced exercise causes the negative emotional and behavioral changes to the mouse model of autism spectrum disorder.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuheii Koeda, Honami Yanagimachi, Misaki Mikami, Chihiro Sato, Junko Yamada
2. 発表標題 Enrich environment causes the emotional and behavioral changes to the mouse model of autism spectrum disorder.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤ちひろ, 小枝周平, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットにおける運動種類の違いが運動麻痺回復および脳可塑性関連因子に及ぼす影響
3. 学会等名 第54回日本作業療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤ちひろ, 小枝周平, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 脳出血ラットにおける運動種類の違いが機能回復に与える影響
3. 学会等名 第52回東北生理談話会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Mitsuru Chiba, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The motor recovery synaptic plasticity after stroke were affected by the types of exercise
3. 学会等名 The 43th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Koeda Suhei, Mana Kishimoto, Shun Mori, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The motor recovery and synaptic plasticity was affected by the types of exercise in the hemorrhage model rat
3. 学会等名 the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, the 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤ちひろ
2. 発表標題 ニューロリハビリテーション研究紹介～機能回復は脳回復・脳可塑性は可能性～
3. 学会等名 令和2年度 第2回 弘前大学生体応答科学研究センターサロン
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Shuji Shimoyama, Misaki Mikami, Kazuki Akahira, Junko Yamada
2. 発表標題 The comparison of the synaptic changes with voluntary and forced rehabilitation in intracerebral hemorrhage model rats.
3. 学会等名 The 1st Japan-Korea-Taiwan Neurorehabilitation Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 The effect of the voluntary and forced exercise for the motor recovery and neural function in the stroke model rat
2. 発表標題 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Shuji Shimoyama, Misaki Mikami, Kazuki Akahira, Junko Yamada
3. 学会等名 The 42th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤ちひろ、澄川幸志、小枝周平、赤平一樹、山田順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットにおける運動に伴うモチベーションが麻痺回復および脳機能に及ぼす効果
3. 学会等名 第53回日本作業療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小枝周平、佐藤ちひろ、澄川幸志、吉川達己、工藤洋子
2. 発表標題 要介護女性高齢者の認知機能低下と金銭支払い動作との関係
3. 学会等名 第53回日本作業療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤ちひろ、小枝周平、三上美咲、赤平一樹、山田順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットにおける異なる種類の運動が機能回復に与える影響
3. 学会等名 第157回弘前医学例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澄川幸志、佐藤ちひろ、田中 真、小枝周平
2. 発表標題 作業療法学生における授業形式とストレスの関係
3. 学会等名 第53回日本作業療法学会
4. 発表年 2019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	山田 順子 (Yamada Junko) (30334965)	弘前大学・総合リハビリテーション科学領域・教授 (11101)	
研究協力者	熊田 竜郎 (Kumada Tatsuro) (00402339)	常葉大学・保健医療学部・教授 (33801)	

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