

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750213

研究課題名(和文) 麻痺肢の集中使用に伴う神経再編機構の解明および臨床応用にむけた発展的検討

研究課題名(英文) Investigation and development of the mechanism of the intensive use of an impaired limb for clinical application

研究代表者

石田 章真 (Ishida, Akimasa)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20632607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は麻痺肢集中使用法(CIMT法)の作用機序の解明を主眼とした研究である。内包部に小出血を作成したモデルラットに対し、麻痺肢を1週間集中的に使用させ、その後出血側運動野に順行性トレーサーを注入し軸索投射の変化を解析した。その結果、運動皮質から同側の赤核へと新規な軸索投射が増加していることを発見した。次に、この皮質-赤核経路に対しウイルスベクターを用いた選択的経路遮断法を実施したところ、CIMT法によって回復が認められた麻痺肢の運動機能が再度低下した。これらの結果から、内包出血後の麻痺肢集中使用においては、皮質-赤核路の変化が作用機序の一端であることが示された。

研究成果の概要(英文)：As constraint-induced movement therapy (CIMT) promotes functional recovery of impaired forelimb after hemiplegic strokes, including intracerebral hemorrhage (ICH), we challenged to determine the causal relationship between the CIMT-induced reorganization of the circuit and behavioral recovery after stroke.

We clarified the detailed and longitudinal reorganization of the ipsi-lesional motor cortex induced by CIMT after internal capsule hemorrhage in rats. Using the double-viral vector technique which induces pathway-selective blockade of the target pathway, we clearly revealed that the increased cortico-rubral axonal projections had causal linkage to the CIMT-induced recovery of forelimb reaching function. The present study demonstrates the cortico-rubral pathway is responsible circuits for the efficiency of CIMT. Our data will provide new insight into the underlying neural mechanisms of poststroke neurorehabilitative therapies.

研究分野：医歯薬学(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 脳出血 内包 CI療法 赤核 運動野 可塑的变化 機能回復

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳卒中後の運動機能障害、特に上肢の運動麻痺は日常生活活動ならびに生活の質を低下させる主因である。これに対し、麻痺側上肢の集中的な使用を誘導する constraint-induced movement therapy (CIMT) が有効な治療法として注目されている (Taub E, et al, 1993)。CIMT に関しては高いエビデンスが示されており推奨される治療法とされているが (Wolf SL, et al, 2007)、麻痺肢の集中的使用がどのような機能および因子に影響を及ぼすか、またどのような再編メカニズムで機能改善を導くか、といった基礎的な作用機序については未知な点が多く残っているのが現状である。

(2) 我々はこれまでに、内包部出血モデルラットを用い、麻痺肢の集中的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、同領域における体部位表現マップに関し、手指に関する領域が CIMT 法により拡大することを見出した。これらの結果は、損傷後の中枢神経系において、CIMT 法における麻痺肢集中使用が、出血側運動野を中心とした神経回路の再編を惹起していることを強く示唆するものと考えられる。これらの結果を踏まえ、麻痺肢集中使用が中枢神経系の再編にどのような影響を及ぼすかについての詳細な検討、ならびに機能回復との因果関係の解明を行うことは、CIMT 法の作用機序の解明において重要な知見になると考え、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、CIMT 法による中枢神経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、ウィ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

CIMT 法による傷害側運動野から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の軸索投射を標識し観察する。これにより、CIMT 法による運動性下行路の構造的な変化を確認する。

選択的経路遮断法による、CIMT 法による中枢神経系の構造的変化と運動機能との関連

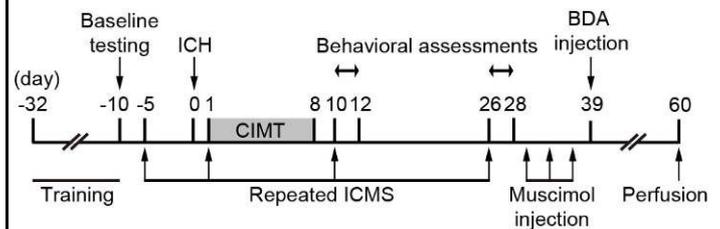
これまでの検討より、CIMT 法により出血

側運動野において主に機能的・構造的変化が生じてきた事が確認されている。そこで、生理学研究所認知行動発達研究部門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、CIMT 法により変化が認められた経路を選択的に遮断し、運動機能回復への影響を確認する。これにより、CIMT 法における作用機序を因果関係のレベルにおいて証明できると考える

(2) 具体的な研究方法

Wistar 系雄性成体ラットを用いる。実験のタイムコースを図 1 に示す。

図 1 実験タイムコース (軸索投射確認)

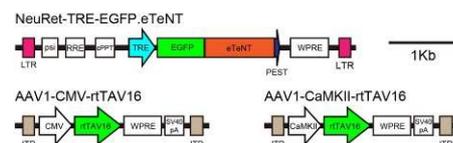
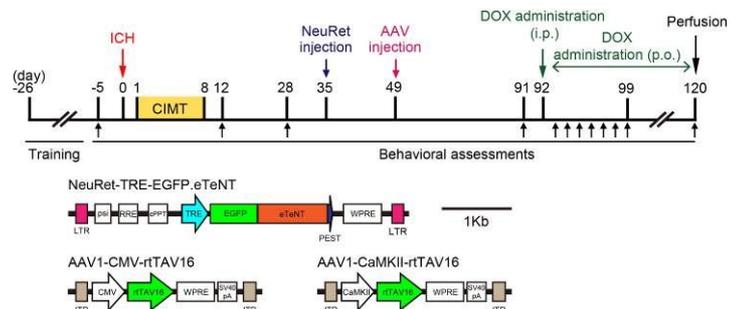


一側の内包部に微量の collagenase を注入し内包出血を作成する (Masuda T, et al., 2007)。出血後早期 (1-8 日) に非麻痺側前肢をギプスにより拘束し、麻痺側前肢を集中的に使用させる。麻酔下にて出血側の感覚運動野・前肢領域にあたる部分を開頭する。開頭部にはデルリンチャンバーを設置し密閉する。その後皮質内にタングステン電極を刺入し電気刺激を行う。刺激により誘発される運動を触察から同定し、0.5mm 毎に記録し、運動野の運動マップを作成する。同一個体において、内包出血手術前、出血直後、集中使用終了直後、集中使用終了 2 週間後の 4 点で経時的にマッピングを行う。

マッピング終了後、吻側もしくは尾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。注入 1 週後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、皮質内および皮質下 (脳幹・脊髄) への投射、および分枝の程度を網羅的に解析する。

また、上記の検討により、CIMT 法により変化が認められた経路が確認された後は、以下の方法により選択的な経路遮断を行った。

図 2 実験タイムコース (選択的経路遮断)



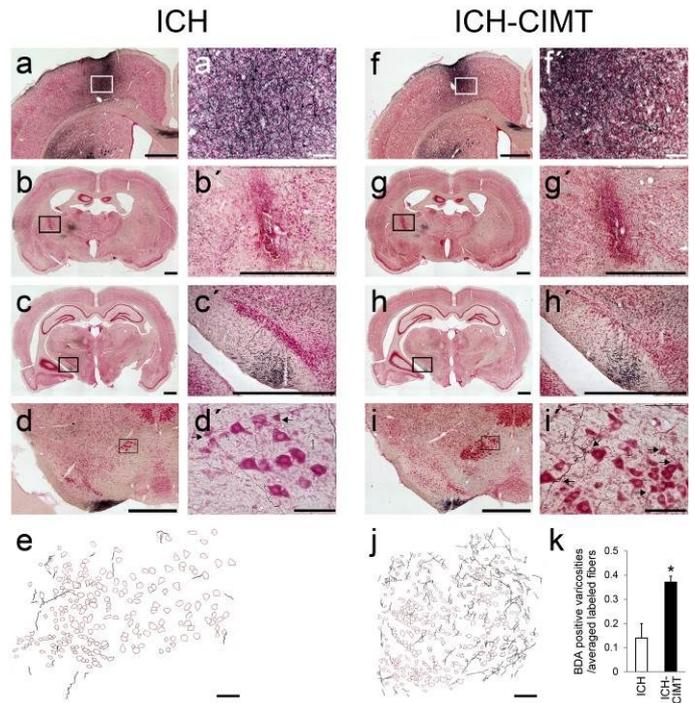
本研究では、生理学研究所認知行動発達研究部門の伊佐教授らによって開発された、ウイルスベクター二重感染法を中心的な手法として用いる。本研究で使用するベクターは生理学研究所ウイルスベクター作成室小林憲太准教授に作成していただく。使用するベクターとして、Vesicular Stomatitis Virus G glycoprotein (VSVG) および rabies virus glycoprotein (RVG) の融合糖タンパク FuG-C および FuG-E でエンベロープタンパクを置換しシュードタイプ化した逆行性レンチウイルスベクターを利用する。また、順行性にアデノ随伴ウイルス (AAV) も用いる。ベクターの具体的なコンストラクトについては巻末に添付する。これらの順行性、逆行性ベクターに二重に感染した神経細胞では、テトラサイクリンによる遺伝子発現調節、いわゆる Tet-On (Off) システムを応用し、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トキシシン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、特定の経路のみを可逆的に遮断する事が可能となる。

ケタミン麻酔下にてコラゲナーゼを内包に注入し、脳出血を作成する。その後ラットの非麻痺側前肢を拘束し、麻痺肢のみを使用可能な状況に置く。その状態で1週間ケージ内で飼育する。その後、出血 35 日目および 42 日目にレンチウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターを標的とする神経経路 (主に運動野-赤核路を想定) に注入し、二重感染させる。その後出血後 92 日目よりドキシサイクリンを経口投与し、運動機能への影響を確認する。運動評価には single pellet reaching test および horizontal ladder test を行う。最終的に深麻酔下にて灌流固定を行い、組織学的検討および分子生物学的検討を行う。

#### 4. 研究成果

出血側運動野からの軸索投射を確認する為に、順行性トレーサーである BDA を同領域に注入した。BDA の染色像を図 3 に示す。染色の結果、運動野 (a, f)、出血部 (b, g)、大脳脚 (c, h) 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。しかし、出血側の赤核 (d, i) において、CIMT 群では対照群に比して明らかな BDA 陽性線維の増加を認めた (e, j)。定量的な解析を行った所、CIMT 群では対照群に比して、赤核周辺部における軸索ボタン数が有意に増加していることが示された。このことから、内包出血後の CIMT は出血同側の運動野におけるマップの変化を惹起し、その変化したマップからは同側の赤核へと投射が増えており、新たなシナプス形成を促進していることが明らかになった。

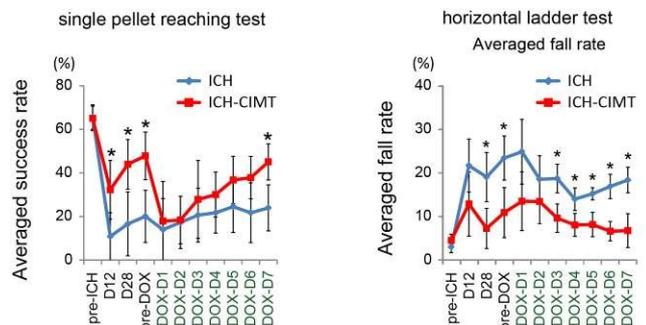
図 3 BDA トレーシングの結果



上記の結果より、CIMT 法により主に出血側運動野-赤核間の軸索投射が増加していることが示唆された。この変化が CIMT 法による運動機能回復と因果関係を有するかを確認するために、ウイルスベクター二重感染法を用いた選択的経路遮断を行い、その影響を確認した。

運動機能評価の結果を図 4 に示す。

図 4 皮質-赤核路遮断と運動機能の変化



二重感染を行った CIMT 群ラットに対し、ドキシサイクリンを投与すると、single pellet reaching test に関し一旦回復していたリーチ機能が再度障害され、対照群と同程度まで低下することが示された。それに対し、horizontal ladder test に関しては有意な変化は認められなかった。このことから、CIMT によって生じた皮質-赤核路の分枝増加は、CIMT 法による手指の巧緻運動機能回復に関し、その作用機序の一端であることが示された。

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3件)

Ishida A, Misumi S, Ueda Y, Shimizu Y, Cha-Gyun J, 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. (査読有) 284: 158-66, 2015. doi: 10.1016/j.bbr.2015.02.022.

Tamakoshi K, Ishida A, Takamatsu Y, Hamakawa M, Nakashima H, Shimada H, Ishida K. Motor skills training promotes motor functional recovery and induces synaptogenesis in the motor cortex and striatum after intracerebral hemorrhage in rats. Behav Brain Res. (査読有) 260:34-43. 2014. doi: 10.1016/j.bbr.2013.11.034.

Ueda Y, Masuda T, Ishida A, Misumi S, Shimizu Y, Jung CG, Hida H. Enhanced electrical responsiveness in the cerebral cortex with oral melatonin administration after a small hemorrhage near the internal capsule in rats. J Neurosci Res. (査読有) 92(11):1499-508.2014. doi: 10.1002/jnr.23434.

〔学会発表〕(計7件)

石田章真, 伊佐かおる, 小林憲太, 梅田達也, 伊佐正, 飛田秀樹. Selective blockade of the cortico-rubral pathway masks the recovery of forelimb function by CIMT in capsular hemorrhage rats. 第92回日本生理学会大会. 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市). 2015.3.21-23.

Akimasa Ishida, Kaoru Isa, Kenta Kobayashi, Tatsuya Umeda, Tadashi Isa, Hideki Hida. Contribution of the cortico-rubral axons to recovery by the constraint-induced movement therapy in capsular hemorrhage rats. Neuroscience 2014. Washington DC. (USA), 2014.11.15-19.

石田章真, 伊佐かおる, 小林憲太, 梅田達也, 伊佐正, 飛田秀樹. Contribution of the cortico-rubral pathway to the recovery of skilled forelimb movements through CIMT after

capsular hemorrhage in rats. 第37回日本神経科学大会. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市). 2014.9.11-13.

石田章真, 梅田達也, 伊佐正, 飛田秀樹. 内包出血後の麻痺肢集中使用による運動野からの軸索投射の再編. 第49回日本理学療法学会. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市). 2014.5.30-2014.6.1.

Akimasa Ishida, Tatsuya Umeda, Tadashi Isa, Hideki Hida. Reorganization of ipsilateral motor cortex by constraint-induced movement therapy in capsular hemorrhage model rat. Neuroscience 2013. San Diego (USA), 2013.11.9-13.

石田章真. 麻痺肢集中使用による中枢神経系の再編と機能回復. 第3回日本基礎理学療法学会. 名古屋大学医学部保健学科 大幸キャンパス(愛知県・名古屋市). 2013.10.27

石田章真, 梅田達也, 伊佐正, 飛田秀樹. Intensive use of impaired limb alters forelimb representation of affected motor cortex and facilitates functional recovery in rats with capsular hemorrhage. 第36回日本神経科学大会. 国立京都国際会館(京都府・京都市). 2013.6.20-23.

〔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

<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・助教  
研究者番号: 20632607