

令和元年6月22日現在

機関番号：34449

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16378

研究課題名（和文）麻痺回復を拒む“6か月の壁”の打破を目指して

研究課題名（英文）Research to develop the new treatment for motor paralysis in maintenance period of stroke

研究代表者

木村 晃大 (Kimura, Akihiro)

大阪保健医療大学・大阪保健医療大学 保健医療学部・講師（特任）

研究者番号：30709811

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）：本研究課題では複数のラットを長期に飼育する必要があり、飼育に関わる労力削減の為、自動でラットに給餌する機械を開発・作成した。次に長期的に重度な運動麻痺が持続する脳卒中モデルラットを作成し、深層学習技術を用いた動画解析システムの立ち上げを行い、それを用いてラットの動作・姿勢を経時的に定量評価した。結果、脳卒中で変化し、時間の経過とともに回復する複数のパラメータを発見した。これらはラットの脳卒中の重症度および運動麻痺からの回復の程度を評価する指標としての使用が期待できる。現在は脳卒中モデルラットの運動麻痺に対して治療を試みており、上記方法で効果を判定する。データを収集後、積極的に発信していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患の治療方法を新しく開発する際には、動物実験でその治療法を試験し効果を判定する必要がある。本研究課題では、脳卒中モデル動物の麻痺の程度の評価方法として、動作中の姿勢について深層学習を用いた動画解析を新たに試みた。そして、そこから得られた、運動麻痺の程度および麻痺からの回復を反映すると考えられるパラメータを使用する事により、動物実験において、運動麻痺の重症度および治療効果を、定量的に、より迅速、簡便に検討出来、運動麻痺の新たな治療法の開発の際に有用な物となるだろうと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research, rats need to be fed for long period, so first, I developed and made the machine to feed rats automatically to reduce efforts related to feeding animals. Secondly, I made rat stroke model having severe motor paralysis which didn't recover for long period. And I set up the movie analyzing system using deep learning skills. Then I evaluated the change with stroke in the movement and posture of rats quantitatively by using the system wrote above, and found a few parameters reflecting the extent of paralysis and recovery from it. They seems to be useful for evaluating the severity and recovery of motor paralysis with stroke. Now I am trying treatments for motor paralysis of stroke model rat and will evaluate the effect of it with the way wrote above.

研究分野：神経科学

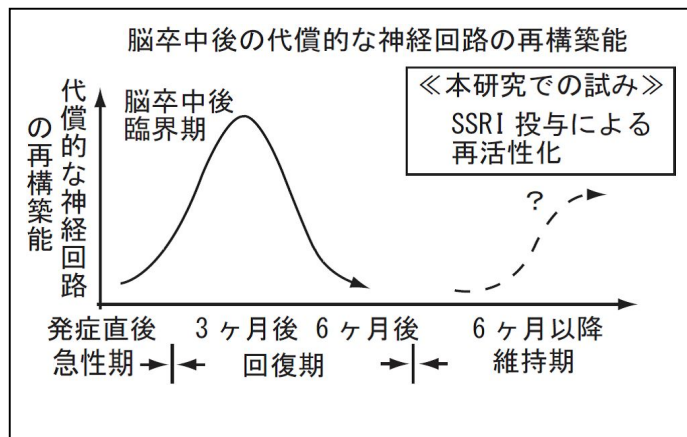
キーワード：運動麻痺の重症度の定量的評価 治療効果の定量的評価 深層学習による動画解析

1. 研究開始当初の背景

脳卒中後の運動麻痺に対しては発症直後から積極的なリハビリが行われるが、後遺症が残ることが多い。なかでも随意運動が完全に消失し麻痺肢に全く筋運動が認められない完全麻痺や、健常肢の運動の際に麻痺肢に意図しない運動や筋緊張が認められる不適切な運動の発現（連合反応）は、その治療が難しく、QOL を著しく低下させる原因となっている。治療を困難にする原因として、機能回復における臨界期の存在と不適切な神経回路形成がある。その克服には成熟脳における神経回路の再構築機構、およびシナプスレベルでの可塑的变化機構に基づく合目的な医療介入が不可欠である。申請者はそれまで成熟脳における視床-皮質間の視覚情報処理メカニズム(Kimura et al, 2013; Naito et al, 2013)とその可塑性研究に従事して来たが、ニューロン固有の性質とされていた光反応特性も薬物投与による抑制性ニューロン活動の操作と特定の視覚刺激の繰り返し呈示により可塑的に変化させ得る可能性を見出し、これを応用して上記の問題を解決する独自の治療手法を考案するに至った。

2. 研究の目的

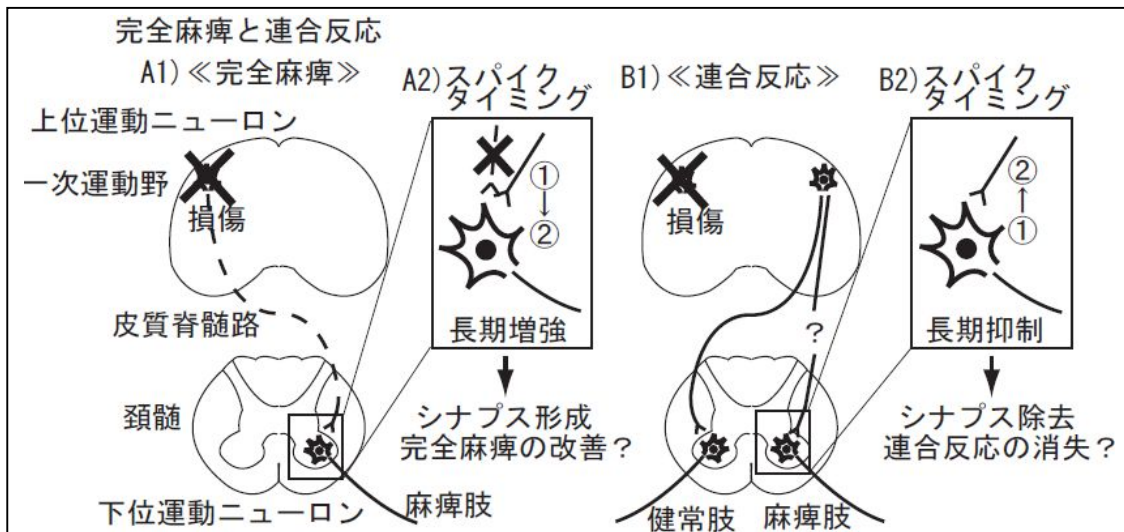
脳卒中発症後 6 ヶ月を過ぎると脳の神経回路の再構築能は著しく減弱し、リハビリの効果は得られなくなる。これは機能回復に臨界期が存在することを意味し、“6 ヶ月の壁”と呼ばれる。そのため、運動麻痺の治療には臨界期後に減弱した脳の神経回路再構築能の回復が不可欠である。そこで申請者は、近年、神経細胞を脱分化（若返り）させる作用が注目されている SSRI を利用して脳の可塑性を高めて神経回路再構築能を回復させ、また、神経細胞間のシナプスにおける結合強度を変化させるルール（スパイクタイミング依存的シナプス可塑性）に基づく電気刺激の併用により、連合反応の元となる不必要な神経回路形成を抑制しつつ完全麻痺に対して適切な神経回路形成を促す新たな治療手法を考案した。これを実験的に検証することが本研究の目的である。



3. 研究の方法

まずラットの脳に対して人工的な脳卒中を作成し運動麻痺を持つラットを作成する。方法は電気メスで脳を焼却する、あるいはエンドセリン(脳梗塞を誘発する)やコラゲナーゼ(脳出血を誘発する)など脳卒中を誘発する薬剤を脳へ投与するなど、最適な方法を検討して選択する。対象とする脳部位は、運動麻痺を引き起こす領域として一次運動野、線条体、内包のうち最適な部位を検討して選択する。その様にして作成した運動麻痺モデルラットをその後6カ月飼育した後に、残存する麻痺に対して治療を試みる。

治療は上述の SSRI を投与する事で神経回路の再構築能を回復させると同時に、神経回路の再形成を促す処置を行う。神経細胞間のシナプスにおける結合強度を変化させるルール（スパイクタイミング依存的シナプス可塑性）に基づき、シナプス結合を強めたい半球側の上位運動

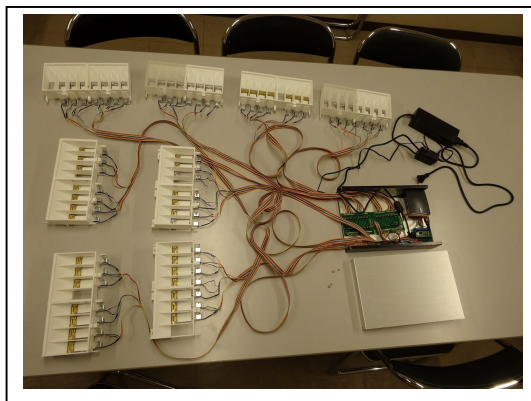


ニューロン 麻痺肢の下位運動ニューロンという順に活動を引き起こすことで、シナプスの結合を増強させれば麻痺肢の運動の回復が期待できる。一方で、連合反応がある場合には連合反応がある麻痺肢の下位運動ニューロン シナプス結合を抑制したい上位運動ニューロンという順に活動を引き起こすことで、シナプス結合の抑制が期待できる。具体的な方法としては、一次運動野を活動させる為に、2肢選択課題を学習させる事により、自発的な運動野の活動を利用する、開頭下で運動野のニューロンを電気刺激する事により活動させる、開頭せず経頭蓋的な電気刺激による活動の誘発を試みるなど最適な方法を検討して選択する。また、麻痺肢のニューロンを活動させる方法は、麻痺肢の神経を電気刺激する事で行う。治療効果を高めるために経頭蓋直流電気刺激(tDCS)の併用を試みる。

4. 研究成果

まず、プログラミング言語 MATLAB を使用して、ラットの2肢選択課題の治療実験セットを作成した。これはラットを覚醒下に頭部固定した上でモニターに視覚刺激を提示し、それに対してラットがレバーを引くという課題を学習させる物で、同時にプログラムにより電気刺激装置を稼働させる事で、麻痺肢の神経に対して電気刺激を行う。以降これを元に治療方法を検討することとなった。

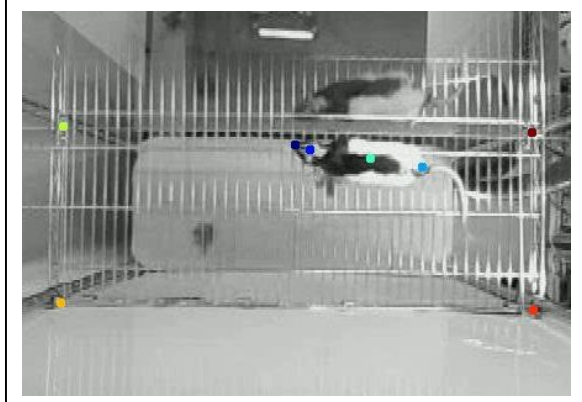
次に、本研究課題では長期間ラットの飼育を行う為に毎日の給餌にかかる労力が大きくラットの飼育に困難が伴う状態にあった。そこで実験者の労力を軽減する為に、電子工作によりラットの自動給餌システムを作成した。これは Raspberry Pi (小型コンピューター) 上でプログラミング言語 python のプログラムを実行させ、それを USB シリアル変換モジュールを介して出力し外部の機械を動作させる。この機械は1日おきに規定時間になるとラットのケージに自動で餌を供給する。最終的にこれを2台作成し、最大 16 ケージ内のラットを一週間のあいだ自動で飼育できる様にした。



次に長期的に重度な運動麻痺が持続する脳卒中モデルラットを作成した。脳卒中モデルの作成では、対象の脳部位として 体性運動皮質、線条体、内包を検討した。また、対象部位を破壊する方法として、電気メスで焼却、自家血の脳内投与、エンドセリンの脳内投与(脳梗塞)、コラゲナーゼの脳内投与(脳出血)を試した。運動皮質への処置では、損傷領域の広狭に関わらず思う様な重度な麻痺が現れず、あるいは運動麻痺が見られても短期間で回復してしまい、6 ヶ月を超える長期的な麻痺を観察出来なかった。様々試験した結果、内包へのコラゲナーゼ投与、あるいはこれを皮質破壊と組み合わせる事により、長期に残る重度な運動麻痺を再現性高く惹起出来ることが分かった。



次に、ラットの運動麻痺の評価法として、よく使用される神経脱落スコア(NDS)を使用したが、これは麻痺の評価法として優れているが定性的な評価であり、治療効果としてラットの運動機能の微妙な変化を評価するには適していないと考えられた。そこで、ラットの行動を定量的に解析する為に、動画解析システム(deeplabcut)の立ち上げを行った。これは近年流行している深層学習技術を利用した物で、動物にマーカーを予め装着せずとも、撮影した動画を使用して、ラットの追跡したい体部位を動画から抽出した画像フレーム上でマークしてそれを深層学習させる事で任意の部位のモーションキャプチャ・データを得ることができ、歩行時の姿勢の経時的な評価など、動作中の数千フレームに渡る膨大な画像データを簡単に定量評価出来る点で優れている。その後、角形オープンフィールドを作成して、脳出血の作成前~後数ヶ月に渡りラットの自由行動下での姿勢を経時的に撮影して上記方法で解析した。その結果、脳出血の作成に伴い変化し、経時



的に回復する複数のパラメーターを発見した。これらはラットの脳卒中の重症度や運動麻痺に対する治療効果の定量的な評価に使用する事できると考えられる。

本研究期間内では、残念ながら治療の効果判定を行う所まで実現する事が出来なかったが、現在、半年以上飼育した脳卒中モデルラットに対して治療を試みており、上記方法で効果を判定し、データを収集後、積極的に発信していきたいと考えている。

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

Akihiro Kimura, Satoshi Shimegi, Fuyuki Ueda, Akinori Sato, and Hiromichi Sato : Temporal analysis of GABAergic effect on shaping the spatial frequency tuning of relay cells in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat. 北米神経科学学会 Neuroscience 2017, ワシントン D.C., アメリカ, 2017.11.11-2017.11.15

6．研究組織

大阪保健医療大学

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：七五三木 聡

ローマ字氏名：Shimegi satoshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。