

令和元年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03046

研究課題名(和文)脳梗塞からの回復過程における神経回路機能再編と運動負荷および運動制限の役割解明

研究課題名(英文)The study on reorganization of neuronal circuit function after cerebral infarction with or without limitation of movement

研究代表者

石橋 仁 (Ishibashi, Hitoshi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：50311874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後の神経機能の変化は十分には解明されていない。ラット大脳皮質運動野にエンドセリンを微量注入すると、注入した脳部位と対側の前肢の運動機能が低下したが、数週間後には前肢機能の回復が見られた。脳梗塞部位は3週間後でも回復していないことから、脳梗塞後には傷害を受けていない脳部の神経回路機能の再編が起こっていると考えられた。また、ブラジキニンが心臓神経叢を介して心臓機能を変化させ、脳梗塞の発生に影響を与えてい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

ラット大脳皮質運動野に血管収縮作用のあるエンドセリンを注入すると、注入部位周囲に脳梗塞ができることがわかった。右脳にエンドセリンを注入すると左前肢の動きに障害が生じた。この運動障害は、エンドセリンの影響を受けていない部位の神経回路機能が再編成を起こすことにより徐々に回復していることが示唆され、今後の研究進展のための基礎を築けたと考えている。また、ブラジキニンが心臓神経叢を介して心拍を抑制して脳梗塞の発生に影響を与えている可能性が示唆された。このことは、高血圧治療に使用されるACE阻害剤の副作用を解明する一端となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms leading to functional changes in neural network after stroke remain to be elucidated. In the present study, we produced the cortical ischemic lesions by injection of the vasoconstrictor endothelin-1 into motor cortex of the adult rats, and investigated the contralateral forepaw movements in a so called cylinder test. There was a reduction in forepaw placement on the cylinder wall in the endothelin-injection group at one week after injection. This reduction displayed gradual recovery. The results suggest that the brain has capacity to compensate for structural damage through reorganizing of surviving neural networks. In addition, we found that bradykinin, which is increased by peptidase inhibitor therapy such as angiotensin converting enzyme, activates intracardiac neurons, suggesting that bradykinin affects the formation and expansion of cerebral infarction via regulation of cardiac plexus.

研究分野：生理学

キーワード：脳・神経 生理学 神経科学 リハビリテーション科学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳卒中は、脳梗塞や脳内出血などの脳血管障害による疾患であり、言語障害、運動障害など多様な神経症状を伴う。これらの症状に対してリハビリテーションが行われるが、旧来のリハビリテーションアプローチは、脳卒中後の残存機能による代償手段の獲得が中心であり、いったん失われた機能は元に戻らないことを前提に行われていた。一方、最近のfMRIやNIRSなどのイメージング技術の発展に伴って、適切なりハビリテーションによって、脳神経回路が再編成されて、機能が回復することが示唆されている。しかし、その回復メカニズムは分かっていない。

モデル動物を用いた研究で、A) 脳機能の代償の際には梗塞と反対側の脳半球における神経回路の構造的・機能的再編が起こっていること<sup>1)</sup>、B) 大脳半球間および脳脊髄間のネットワークに再編成が起こっていること<sup>2)</sup>、C) 脳梗塞後、正常な手を拘束して強制的に麻痺側の手を使わせることにより機能回復が良くなり、これに大脳皮質への入力機構の再編成が関与すること<sup>3)</sup>、などが報告されている。これらの報告は脳内神経回路再編成と機能回復の関連性を示唆するが、それらの詳細メカニズムは不明である。また、大脳皮質には、片側の大脳皮質が興奮すると、その部位に対応する反対側の脳部位が脳梁を介して抑制されるシステムが存在する。例えば、片側の大脳皮質運動野が興奮すると、反対側の運動野が抑制される。脳梗塞後には、この半球間抑制に不均衡が生じて麻痺等が生じることが示唆されているが<sup>4)</sup>、この半球間抑制の不均衡が生じる詳細な仕組みやその解消法は解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞モデルラットおよびモデルマウスを用い、運動野に生じた脳梗塞によって生じる大脳皮質の神経回路再編成とそのメカニズムを解明し、その結果に基づいて脳梗塞後の運動が与える効果を考察することを目的とする。

### 3. 研究の方法

ラットおよびマウスの目的の脳部位に局限して梗塞を作成するため、ローズベンガルを尾静脈に注入した後、頭蓋骨の上から目的の脳部位に市販LEDライトをあてることで目的部位に容易に脳梗塞を作成することが可能である。また薬物(エンドセリン)を注入することによっても、比較的容易に目的部位に局限して脳梗塞を作成できることがわかっている。本研究では、四肢を支配する大脳皮質運動野の一部に梗塞を作成する。ローズベンガルを用いて光学的手法で梗塞作成を開始するが、不都合が出る場合にはエンドセリンの脳内注入に切り換えることを考えて研究をスタートした。電気生理学的な測定では、パッチクランプ法を用いて脳スライス標本や急性単離神経細胞から膜電位やイオンチャンネル電流を記録した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脳梗塞モデル動物の作成

まず、脳梗塞モデル動物を安定的に作成することを目的に、ローズベンガルを尾静脈に注入後、市販のLEDライトをあてることによって脳梗塞の作成を試みた。脳梗塞が希望通りに作成できることもあったが(図1)、梗塞領域が小さすぎたり大きすぎたりして安定しなかった。このため脳梗塞モデルの作成を、強力な血管収縮物質であるエンドセリンの注入に代えて行うことにしたところ、比較的安定して脳梗塞を作成することが可能となった。

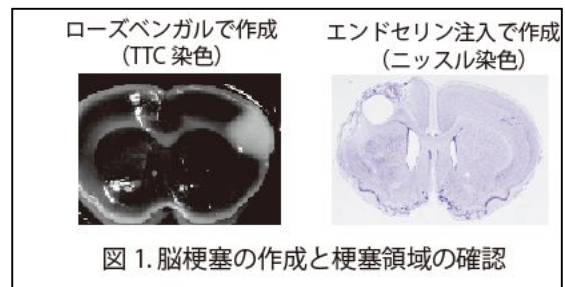


図1. 脳梗塞の作成と梗塞領域の確認

#### (2) 運動機能の評価

大脳皮質運動野にマイクロキャピラリーを用いてエンドセリン(2µg/2µl)を4分間で注入し、脳梗塞モデルラットを作成した。行動実験には、前肢の運動機能の評価するためにシリンドertestを用いた。実験は、脳の大脳皮質へET-1注入を行う前日に1回目の測定を行い、1週間後(1W群)、2週間後(2W群)、および3週間後(3W群)に測定を行った。図2は右脳の大脳皮質にエンドセリンを注入した際の左前肢の機能変化を示す。

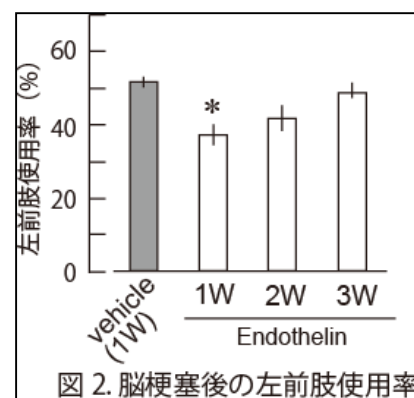


図2. 脳梗塞後の左前肢使用率

右運動野にエンドセリンを注入することにより、エンドセリン注入1週間後にシリンドertestにおいて左前肢の使用率の低下が認められた。この左前肢使用率の低下は、注入2週間後、注入3週間後と回復傾向にあった。

#### (3) 薬物の影響

これまでの我々の研究で、パーキンソン病モデルラットにおいて、ドーパミンD1受容体アゴニストのSKF38393(SKf)とグルタミン酸NR2B受容体(NR2B-R)のアнтаゴニストのイフェンプロディルが前肢運動機能を改善することが明らかとなっている。そこで、本研究においても、エ

ンドセリン注入 1 週間後の運動機能障害に対して、これら薬物の影響を検討したが、顕著な効果は認められなかった。また、運動量を増加させると報告されている甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) 誘導体のタルチレリンの効果についても検討したが、著明な運動機能改善効果は認められなかった。

#### (4) 心臓神経節ニューロンに対するブラジキニンの興奮作用

心臓の機能変化によって脳梗塞が生じることがある。例えば、心房細動が起きると、心臓が細かく震えて脈が乱れ、心臓の中で血栓ができやすくなる。その血栓が脳に流れていくと、脳の血管に詰まって脳梗塞を引き起こす。本研究を遂行中に、心房細動などの不整脈にブラジキニンが関与しているのではないかと考えられた。このため、ブラジキニンの心臓に対する作用について検討したところ、心臓周囲の神経叢 (心臓神経叢) を興奮させていることがわかったので、その詳細について検討した。

ラット心臓周囲の心臓神経叢から神経節ニューロンを急性単離し、アンホテンシン B 穿孔パッチクランプ法を適用して、ブラジキニンを投与したところ、膜電位が脱分極して活動電位の繰り返し発火が認められた (図 3)。

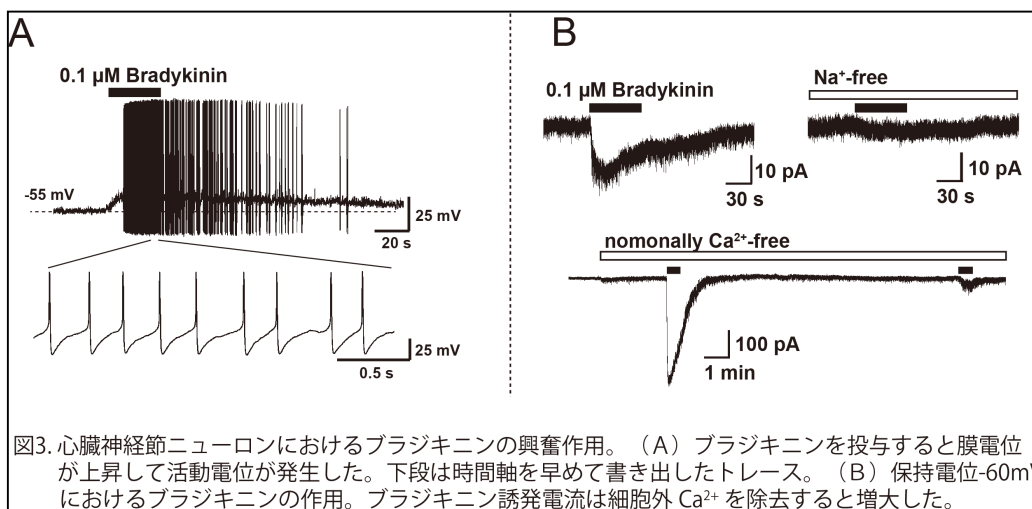


図3. 心臓神経節ニューロンにおけるブラジキニンの興奮作用。(A) ブラジキニンを投与すると膜電位が上昇して活動電位が発生した。下段は時間軸を早めて書き出したトレース。(B) 保持電位-60mVにおけるブラジキニンの作用。ブラジキニン誘発電流は細胞外  $Ca^{2+}$  を除去すると増大した。

膜電位固定法を用いてブラジキニン応答を解析したところ、(A) ブラジキニンは小胞体からの細胞内  $Ca^{2+}$  放出を誘発して非選択性の陽イオンチャネルを活性化すること、(B) M 型  $K^+$  チャネルを抑制することを明らかにした。また、この陽イオンチャネルがムスカリン受容体によっても活性化されることも明らかにした (図 4)。さらに、アルファアドレナリン受容体も同じ陽イオンチャネルを活性化するという予備実験結果も得られた。従って、この陽イオンチャネルは、心臓神経節ニューロンへのさまざまな入力を細胞膜の興奮へと変換するための統合装置として働いていると考えられた。しかし、この陽イオンチャネルの分子実体は未解明なままであり、今後の研究で明らかにしたいと考えている。

通常、ブラジキニンの生体内での寿命は短く、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) などの酵素により速やかに不活性化される。一方、高血圧治療等で使用される ACE 阻害薬によって、ブラジキニンの分解が抑制され、ブラジキニンが組織中に蓄積することが示唆されている。従って、本研究での結果から、ブラジキニンは心臓を支配する副交感神経系節後線維を興奮させ、心臓機能に影響を与えて脳梗塞の発症に関与する可能性があるのではないかと考察された。

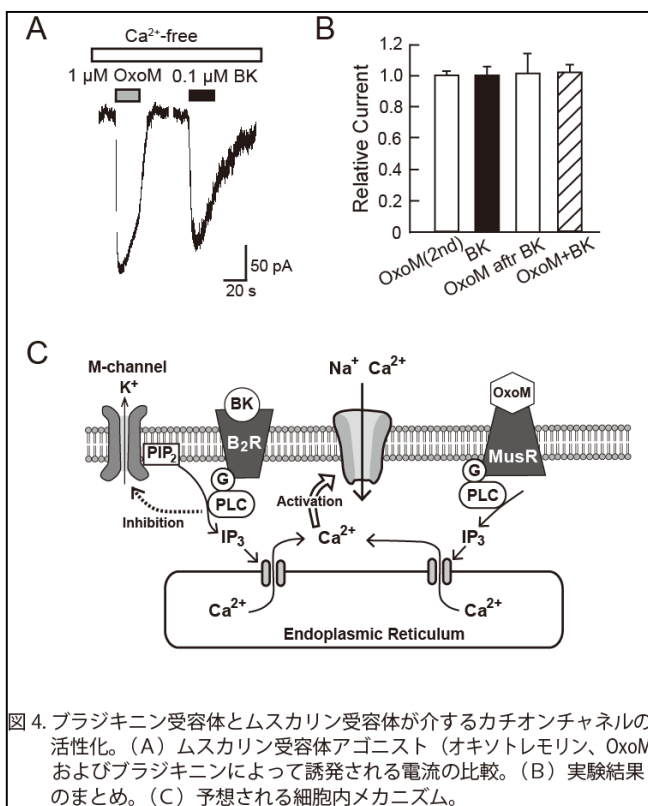


図 4. ブラジキニン受容体とムスカリン受容体が介するカチオンチャネルの活性化。(A) ムスカリン受容体アゴニスト (オキソトレモリン, OxoM) およびブラジキニンによって誘発される電流の比較。(B) 実験結果のまとめ。(C) 予想される細胞内メカニズム。

< 引用文献 >

- Takatsuru et al., Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neurosci* 29(32):10081-6, 2009
- van Meer et al., Extent of bilateral neuronal network reorganization and functional recovery in relation to stroke severity. *J Neurosci*. 32:4495-507, 2012
- Joo et al., Influence of constraint-induced movement therapy upon evoked potentials in rats with cerebral infarction. *Eur J Neurosci*. 36(12):3691-7, 2012.
- Pino et al, Modulation of brain plasticity in stroke: a novel model for neurorehabilitation. *Nat Rev Neurol* 2014 (doi: 10.1038/nrneuro.2014.162).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

- Arichi S, Sasaki-Hamada S, Kadoya Y, Ogata M, Ishibashi H. Excitatory effect of bradykinin on intrinsic neurons of the rat heart. *Neuropeptides*. in press (2019)  
pii: S0143-4179(19)30008-3. doi: 10.1016/j.npep.2019.04.002. 査読有
- Ogata M, Akita H, Ishibashi H. Behavioral responses to anxiogenic tasks in young adult rats with neonatal dopamine depletion. *Physiol Behav*. 204:10-19, 2019.  
doi: 10.1016/j.physbeh.2019.02.006. 査読有
- Sasaki-Hamada S, Narusawa K, Nakamura R, Ishibashi H, Oka JI. Effects of centrally administered glucagon-like peptide-2 on blood pressure and barosensitive neurons in spontaneously hypertensive rats. *Neuropeptides*. 869:66-75, 2018.  
doi: 10.1016/j.npep.2018.04.007. 査読有
- Ishikawa T, Eto K, Kim SK, Wake H, Takeda I, Horiuchi H, Moorhouse AJ, Ishibashi H, Nabekura J. Cortical astrocytes prime the induction of spine plasticity and mirror image pain. *Pain*. 159:1592-1606, 2018.  
doi: 10.1097/j.pain.0000000000001248. 査読有
- Kanemoto-Kataoka Y, Oyama K, Oyama TM, Ishibashi H, Oyama Y. Ziram, a dithiocarbamate fungicide, exhibits pseudo-cytoprotective actions against oxidative stress in rat thymocytes: Possible environmental risks. *Environ Res*. 160:232-238, 2018.  
doi: 10.1016/j.envres.2017.09.027. 査読有
- Nakahata Y, Eto K, Murakoshi H, Watanabe M, Kuriu T, Hirata H, Moorhouse AJ, Ishibashi H, Nabekura J. Activation-dependent rapid postsynaptic clustering of glycine receptors in mature spinal cord neurons. *eNeuro*. 4(1), 2017. pii: ENEURO.0194-16.2017.  
doi: 10.1523/ENEURO.0194-16.2017. 査読有

[学会発表](計 13 件)

- Arichi S, Hamada S, Ogata M, Ishibashi H. Electrophysiological characterization of bradykinin B<sub>2</sub> receptors in rat intracardiac neurons. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019), 2019年3月29日 - 31日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).
- Ogata M, Akita S, Ishibashi H. Effects of neonatal dopamine depletion on behavioral responses to anxiogenic tasks in adult rats. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019), 2019年3月29日 - 31日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).
- Ishikawa T, Eto K, Ozaki N, Ishibashi H, Nabekura J. The role of primary somatosensory cortex in causing mirror image pain. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019), 2019年3月29日 - 31日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市).
- Shibata K, Suzuki M, Shimizu S, Kawaguchi T, Ishibashi H, Akita H, Fukuda M, Matsunaga A. Changes in corticospinal excitability in muscle shortening or lengthening during repetitive passive movements. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2018年11月3日 - 7日、San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA).
- Kawaguchi T, Matsunaga A, Suzuki M, Shimizu S, Shibata K, Watanabe A, Watanabe M, Akita H, Fukuda A, Ishibashi H. Transcranial direct current stimulation over the prefrontal cortex alters performance in trial-and-error behavioral learning 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2018年11月3日 - 7日、San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA).
- Arichi S, Hamada S, Ishibashi H. Bradykinin excites intracardiac ganglion neurons by activating non-selective cation channels and inhibiting M-currents. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 2018年7月1日 - 6日、国立京都国際会館 (京都府京都市).
- 緒形雅則、秋田久直、石橋 仁、幼若期ドーパミン欠損ラットの発育並びに運動制御に関する特性、第95回日本生理学会大会、2018年3月28日 - 30日、サンポートホール高松・

高松シンボルタワー（香川県高松市）。

Arichi S, Hamada S, Ishibashi H., Bradykinin excites intracardiac ganglion neurons, 第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日 - 23 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）。

Eto K, Ishibashi H, Nabekura J., The role of cortical inhibitory neuronal function in chronic pain, 第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日 - 23 日、幕張メッセ（千葉県千葉市）。

江藤 圭、石川達也、石橋 仁、鍋倉淳一、一次体性感覚野の機能的変容による領域間調節機構の慢性疼痛への寄与、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日 - 30 日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）。

濱田幸恵、成澤孝二、中村龍治、石橋 仁、岡 淳一郎、中枢投与による Glucagon-like peptide-2 の降圧作用：高血圧自然発症モデルラットと Wistar-Kyoto ラットでの比較、第 94 回日本生理学会大会、2017 年 3 月 28 日 - 30 日、アクトシティ浜松（静岡県浜松市）。

Ogata M, Akita H, Ishibashi H. Itch-related behavior and spinal c-Fos expression induced by 5-hydroxytryptamine in adolescent rats with neonatal dopamine depletion. 16th World Congress on pain. 2016 年 9 月 26 日 - 30 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

江藤 圭、石橋 仁、鍋倉淳一、Attenuation of GABA inhibition due to down regulation of K-Cl cotransporter 2 in the primary somatosensory cortex accelerate chronic pain. 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20 日 - 22 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）。

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名： 江藤 圭

ローマ字氏名： ETO, kei

所属研究機関名：生理学研究所

部局名：基盤神経科学研究領域

職名：助教

研究者番号（8 桁）：30545257

研究分担者氏名： 小島 史章

ローマ字氏名： KOJIMA, fumiaki

所属研究機関名：北里大学

部局名：医療衛生学部

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：30550545

研究分担者氏名： 秋田 久直

ローマ字氏名： AKITA, hisanao

所属研究機関名：北里大学

部局名：医療衛生学部

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：70118777

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。