

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16382

研究課題名(和文) リハビリテーションによる運動野再構成機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism of the motor map reorganization induced by rehabilitative training after stroke

研究代表者

岡部 直彦 (Naohiko, Okabe)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30614276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後のリハビリテーションにより運動機能の回復が期待できるが、この運動機能の回復には、残存した脳領域が障害された脳領域の機能を補填する運動野の再構成が重要な役割を果たしていると考えられている。本研究で我々は、運動野再構成時の神経ネットワークの変化を調べた。実験の結果、脳梗塞後の前肢リハビリテーションにより、梗塞前に脊髄の体幹部分を支配していた神経細胞の軸索が進展し、脊髄の前肢支配領域へ新たな接続を形成することが明らかとなった。この結果は軸索リモデリングがリハビリテーションによる運動野再構成と機能回復に重要な役割を担っていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Rehabilitative training can improve functional recovery after stroke. Previous reports demonstrated that motor map reorganization plays pivotal role in the functional recovery induced by rehabilitative training. However, the mechanism of it was not known. In the current study, we revealed that rehabilitative forelimb training after stroke induces axonal remodeling in which corticospinal neurons originally projecting to the spinal area which innervate trunk muscle extend their axons to form new connections to the spinal area which innervate forelimb muscle. Our results suggest this axonal remodeling contributes to the motor map reorganization and functional recovery induced by rehabilitative training.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション 脳梗塞 皮質脊髄路 運動野再構成

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は発現頻度が高く、高率に麻痺などの後遺症を残すため長期にわたる介護を必要とする疾患である。そのため、寝たきり老人の4割、要介護者の3割を脳卒中患者が占めているなど、医療費・介護費という観点からも社会的負荷の極めて大きな疾患である。脳梗塞の治療法としては急性期にはtPAが使用されているが慢性期ではリハビリテーションが主な治療となる。このためリハビリテーション治療の発展は我が国の医療・介護の現場に大きな影響を与えることが考えられる。近年このような社会的要求をうけ、Robot Assisted Rehabilitation (RAR)や

Constraintinduced movement therapy (CI療法)といった新しいリハビリテーション治療が開発されているが、現在までの治療法は「経験則」が土台となっており、神経科学としてのリハビリテーションの理解は“use-dependent”と“task specific”という古くから知られている概念を超えられていない。しかし、既存の概念に基づく治療の効果には限界があり、特に梗塞発症からの期間が長い場合などには高い確率で後遺症が残ってしまうのが現状である。そこで、それ以上の治療効果をもつ治療法の開発には、癌治療における分子標的薬の開発のように、リハビリテーションによる機能回復の基本的なメカニズムを解明し、治療の限界となる要因にターゲットを絞った治療法の開発が必要になると考えられる。

運動野を皮質内微小刺激 (ICMS) すると体の一部に運動が誘発され、この体部位を脳表面にマッピングしていくと運動野マップができあがる。この地図の一部を脳梗塞などで破壊すると、破壊された部分の脳地図が、残存した脳地図領域上に現れる (例えば、前肢の領域を破壊した後、梗塞前はヒゲの領域出会った部位が前肢の領域に変化する)。これを運動野の再構成と呼ぶが、この現象は“use-dependent”と“task specific”というリハビリテーションの原則に従うことが分かっており、脳障害後の機能回復に重要な現象であると考えられている (Nudo et al, 1996)。我々の研究チームでは ICMS を用い、一次運動野前肢領域である CaudalForelimb Area (CFA) および二次運動野前肢領域である Rostral Forelimb Area (RFA) の変化を解析し、これまでの研究で梗塞後にリハビリテーションを行うと RFA 領域の拡大が見られることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では以下の4項目を明らかにするために実験を行う

- (1) 逆行性及び順行性トレーサーを用いて、リハビリテーションによる運動野再構成が起こる際にどのような神経回路の変化が起こるのかを明らかにする (運動野再構成の解剖学的基盤の解明)。

- (2) ウェスタンブロット・ELISAなどの生化学的手法を用いてリハビリテーションが神経回路の再構築を引き起こす際に起こる分子的变化を明らかにする (運動野再構成の分子的基盤の解明)
- (3) リハビリテーションにより変動する分子の機能を阻害することによりリハビリテーションによる運動野再構成のメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 順行性トレーサーを用いた皮質脊髓路の解析: 4週間のリハビリテーション終了後に順行性トレーサーであるビオチン化デキストランアミン (BDA) を RFA 領域に注入し、2週間後に灌流固定し、RFA 領域の神経細胞からの軸索が脊髓の前肢支配領域にどのように存在するかを調べた。BDA 陽性軸索は DAB 法により可視化し、Photoshop を用いて、手動でトレースした後、ImageJ で定量化した。
- (2) 逆行性トレーサーを用いた皮質脊髓路の解析: 4週間のリハビリテーション終了後に逆行性トレーサーである Retrobeads を吻側頸髄 (赤色) と尾側頸髄 (緑色) に注入し、1週間後に灌流固定し、RFA 領域のから頸髄への神経投射の変化を調べた。Retrobeads 陽性細胞は、ImageXpress にて自動で識別し吻側頸髄投射細胞数、尾側頸髄投射細胞数及び吻側・尾側頸髄投射細胞数を計測した。
- (3) 複数梗塞による解析: 運動野再構成の見られた RFA をリハビリテーションによる機能回復後に破壊することにより、RFA の機能への貢献を評価した。また、CFA と RFA を同時に破壊したラットでリハビリテーションを行うことにより RFA の機能回復における重要性を評価した。
- (4) ERK リン酸化の測定: 梗塞前、梗塞 1, 4, 7, 14, 28 日後に両側の RFA から組織を採取しウェスタンブロットを用いて ERK のリン酸化を測定した。
- (5) BDNF 濃度の測定: 梗塞前、梗塞 1, 4, 7, 14, 28 日後に両側の RFA 及び尾側頸髄から組織を採取し ELISA を用いて組織中の BDNF 濃度を測定した。

4. 研究成果

運動野再構成の起こった領域から脊髓へ投射する軸索を

順行性トレーサーを用いた皮質脊髓路の解析において運動野再構成の見られた RFA から脊髓への軸索を計測すると、リハビリテーションを行ったラットでは軸索の密度が尾側脊髓 (前肢領域を支配する) で有意に増加していた (図1)。脊髓軸索の増加は尾側脊髓の背脊中でも見られた。また、逆行性トレーサーを用いた皮質脊髓路の解析において RFA における脊髓投射神経細胞数を計測すると、リハビリテーションを行ったラットでは吻側領域

に投射する神経細胞数は変化しなかったが、尾側領域に投射する神経細胞数及び吻側領域と尾側領域の両方に投射する神経細胞の数が有意に増加した(図2)。これらの結果は、梗塞前には脊髄吻側領域(体幹を支配)に投射していた神経細胞が軸索を進展し、脊髄尾側領域(前肢を支配)に新たな神経投射を獲得したことを示唆していると考えられた(図3)。運動野再構成と軸索変化の見られたRFAをリハビリテーションによる機能回復後に破壊すると、回復した機能が失われた。また、最初の梗塞時にRFAを同時に破壊するリハビリテーションにより機能を回復することができなかった(図4)。この結果は運動野再構成及び軸索変化の起こったRFAが機能回復に極めて重要な役割を果たしていることを示唆している。これらの解剖学的変化を誘発する分子的基盤を明らかにするため、脳の可塑性に重要であるとされる栄養因子であるBDNFの組織中濃度とシグナル分子であるERKのリン酸化をそれぞれELISAとウエスタンブロットによって経時的に調べた。BDNFの測定では脊髄、RFAともに梗塞後にBDNF濃度の低下が見られたが、リハビリテーションによる有意な変化は検出できなかった(図5)。また、ERKのリン酸化も梗塞2週間後から増加を示したが、リハビリテーションによる変化は検出できなかった(図6)。今回の我々の研究ではトレーサーを用いた実験により、運動野再構成時の神経回路の変化を明らかにした。これはリハビリテーションによる機能回復機構の一端を明らかにしたものであり、今後の研究に有用な知見を提供したものである。しかしながら、分子的検討においてはリハビリテーションによる分子的变化を検出することができなかった。今後、梗塞モデル・リハビリテーション法・組織の採取時間・分子の検出法などをさらに検討することによりリハビリテーションによる機能回復の分子メカニズムを明らかにしたい。

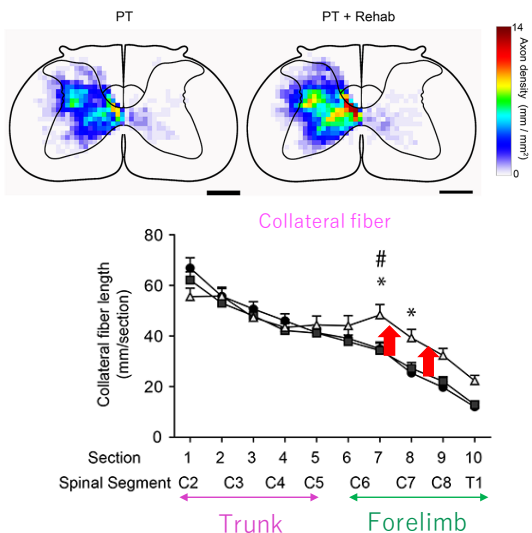


図1 脳梗塞後の皮質脊髄路軸索密度におけるリハビリテーションの効果

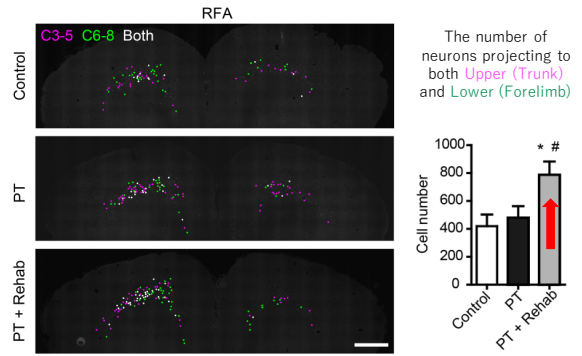


図2 脳梗塞後の皮質脊髄神経投射におけるリハビリテーションの効果



図3 実験結果から推測されるリハビリテーションによる軸索リモデリング

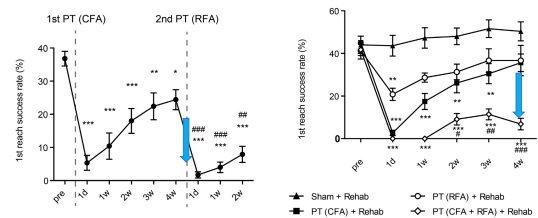


図4 機能回復後のRFA破壊の運動機能への影響、及びRFA/CFA同時破壊のリハビリテーションの効果への影響

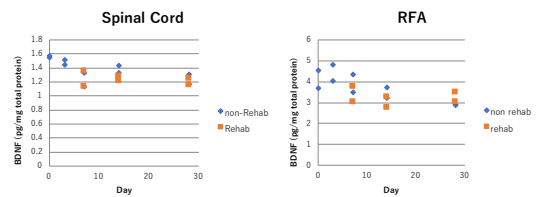


図5 脳梗塞後のBDNF濃度の変化とリハビリテーションの効果

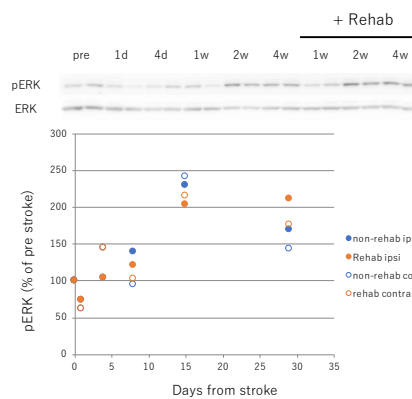


図6 脳梗塞後のERKリン酸化の変化とリハビリテーションの効果

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 6 件)

1. Okabe N (corresponding author), Miyamoto O. Axonal remodeling in corticospinal tract after stroke: How does rehabilitative training modulate it? *Neural Regen Res.* 2017;12(2):185-192. doi: 10.4103/1673-5374.200792. Review.
2. Okabe N (corresponding author), Shiromoto T, Himi N, Lu F, Nakamura E, Narita K, Yagita Y, Miyamoto O. Neural network remodeling underlying motor map reorganization induced by rehabilitative training after ischemic stroke. *Neuroscience.* 2016 339: 338-362. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.008.
3. Shiromoto T, Okabe N (corresponding author), Lu F, Nakamura E, Himi N, Narita K, Yagita Y, Kimura K, Miyamoto O. The role of endogenous neurogenesis in functional recovery and motor map reorganization induced by rehabilitative therapy after stroke in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016 S1052-3057: 30345-7. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.09.016.
4. Himi N, Takahashi H, Okabe N, Nakamura E, Shiromoto T, Narita K, Koga T, Miyamoto O. Exercise in the Early Stage after Stroke Enhances Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression and Memory Function Recovery. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016 S1052-3057: 30289-0. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.08.017.
5. Lu F, Nakamura T, Okabe N, Himi N, Nakamura-Maruyama E, Shiromoto T, Narita K, Tsukamoto I, Xi G, Keep RF, Miyamoto O. COA-Cl, a Novel Synthesized Nucleoside Analog, Exerts Neuroprotective Effects in the Acute Phase of Intracerebral Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016 3057(16): 30189-6. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.07.006.
6. Nakamura-Maruyama E, Miyamoto O, Okabe N, Himi N, Feng L, Narita K, Keep RF, Yamamoto T, Nakamura T. Ryanodine receptors contribute to the induction of

ischemic tolerance. *Brain Res Bull.* 2016 122: 45-53. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.02.018.

[学会発表] (計 13 件)

1. 岡部直彦、氷見直之、丸山-中村衣美、成田和彦、宮本修
Neural network remodeling induced by task-specific rehabilitative training after stroke、
第 94 回日本生理学会大会
2017/3/30
アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市)
2. Naoyuki Himi, Naohiko Okabe, Emi Nakamura, Takashi Shiromoto, Hisashi Takahashi, Kazuhiko Narita, Tomoshige Koga, Osamu Miyamoto
Customary exercise prevents the poststroke memory dysfunction by constitutive elevation of hippocampal BDNF
Society for Neuroscience 2016
2016/11/14
San Diego Convention Center (San Diego, USA)
3. 氷見直之、岡部直彦、丸山-中村恵美、高橋尚、古我知成、宮本修
運動による脳梗塞後の記憶障害予防効果の検証
第 71 回 日本体力医学会大会
2016/09/25
岩手県情報交流センター (岩手県・盛岡市)
4. 氷見直之、岡部直彦、丸山恵美、陸豊、城本高志、高橋尚、成田和彦、古我知成、宮本修
運動習慣による海馬 BDNF の上昇は脳虚血発症による記憶障害を予防する
第 39 回日本神経科学大会
2016/07/22
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
5. 岡部直彦、城本高志、氷見直之、陸豊、丸山恵美、成田和彦、宮本修
脳梗塞後リハビリテーションによる運動野再構成時におこる軸索リモデリング
39 回日本神経科学大会
2016/07/21
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
6. 城本高志、岡部直彦、陸豊、中村-丸山恵美、氷見直之、成田和彦、八木田佳樹、宮本修
脳梗塞後の内因性神経細胞新生は大脳皮質運動野再構築と機能回復に関連がある
第 41 回脳卒中学会総会
2016/04/16
ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

7. 岡部直彦、城本高志、陸豊、丸山恵美、氷見直之、成田和彦、宮本修
脳梗塞後リハビリテーションによる運動野再構成のメカニズム
第 93 回日本生理学会大会
2016/03/24
札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

8. 岡部直彦、城本高志、陸豊、丸山恵美、氷見直之、成田和彦、宮本修
脳梗塞後リハビリテーションによりおこる神経ネットワークのリモデリング
第 93 回日本生理学会大会
2016/03/24
札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

9. 岡部直彦、城本高志、氷見直之、丸山恵美、成田和彦、宮本修
脳梗塞後のリハビリテーションによる運動野再構成の作用機序
第 67 回日本生理学会中国四国地方会
2015/10/25
米子コンベンションセンター（鳥取県・米子市）

10. 氷見直之、高橋尚、岡部直彦、城本高志、陸豊、中村恵美、古我知成、宮本修
微小脳梗塞モデルラットにおける急性期運動負荷による海馬のアポトーシス抑制効果の検証
第 70 回日本体力医学会大会
2015/09/18
和歌山県民文化会館・ホテルアバローム紀の国（和歌山県・和歌山市）

11. 岡部直彦、城本高志、丸山恵美、氷見直之、岩知道信久、成田和彦、宮本修
脳梗塞後のリハビリテーションにより引き起こされる神経回路変化の解析
第 38 回日本神経科学大会
2015/07/28
神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

12. 氷見直之、高橋尚、岡部直彦、陸豊、丸山恵美、城本高志、成田和彦、古我知成、宮本修
The exercise in early stage poststroke reduces neuronal apoptosis in hippocampus by elevation of BDNF
第 38 回日本神経科学大会
2015/07/28
神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

13. Naoyuki Himi, Hisashi Takahashi, Naohiko Okabe, Feng Lu, Emi Nakamura, Takashi Shiromoto, Kazuhiko Narita, Tomoshige Koga, Osamu Miyamoto

The early elevation of hippocampal BDNF by exercise after cerebral microemboli reduces the apoptosis of neuron
27th International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function
2015/06/28
Vancouver Convention Centre (Vancouver, Canada)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/physiology/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
岡部 直彦 (OKABE NAOHIKO)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：30614276

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()

