

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 元年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16421

研究課題名(和文)脳シナプス解析からみた脳梗塞ラットの介入別の運動麻痺改善効果の検討

研究課題名(英文)The comparison of the efficacy of the functional recovery by the different types trainings in models of ishchemic model rats by the Photochemically Induced Thrombosis.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中後の後遺症の中でも手の運動麻痺は患者の心身の健康を著しく悪化させるため、有効な訓練開発が急がれる。ヒトにおける脳解析には限界があるため有用なモデル動物を用いて運動機能回復と併せた脳機能評価を行うことが重要である。本研究では、脳卒中後の運動麻痺改善に有効なリハビリテーション開発ならびに改善メカニズムを目指して、Photochemically Induced Thrombosis (PIT)法を用いて前肢麻痺を呈する脳梗塞モデルラットを作出し、訓練の効果検証ならびに脳機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

訓練手法によって脳卒中後の運動麻痺の回復効果は異なるが、有効な訓練手法および要素は未だ未解明であり、さらには脳可塑性のメカニズムも詳細が明らかでない。本研究遂行による前述の課題を解決できる可能性があり、それらが明らかとなることで神経学的根拠に基づく最適な治療手段を用いてリハビリテーションを提供することにつながることから訓練効果を飛躍的に向上させる。さらには、効率的な訓練提供は患者や介護者の負担感軽減にも有益である。

研究成果の概要(英文)：Constraint-induced movement therapy (CIMT) and motor skill training (MST) like the reaching training are regarded as effective treatments for upper limb dysfunction in human and animals. However, it is unclear which training is better for recovery of motor function. Furthermore, there are few reports about the mechanisms of the neural change. We demonstrated the effects of CIMT and MST for recovery of upper limb function and brain. The surgery was carried out by the Photochemically Induced Thrombosis (PIT). The rats were divided into the three groups; CIMT group, CIMT+MST group, non-exercise group. In the CIMT group, the gross motor function was recovered but not skilled function after the training. In the CIMT+MST group, there were recovery not only the gross motor function but also skilled motor functions. These data suggested that the FLU+MST promotes the recovery of upper limb function. Especially, the MST is effective for treating the fine motor function.

研究分野：総合領域

キーワード：脳梗塞モデル リハビリテーション 脳卒中 運動麻痺 片麻痺 CI療法 作業療法

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 手の運動麻痺が患者の生活の及ぼす悪影響:

医療の発展により脳卒中による死亡率は減少したが、延命後の後遺症、特に運動麻痺は日常生活活動(ADL)動作、生活の質(QOL)に多大な影響を及ぼす。さらには、精神医学的問題の引き金となりうるため、運動麻痺は患者個人や介護者にとって深刻な病態である。

(2) 訓練の質により大きく変化する脳回復:

脳卒中後の機能改善は、残存した脳神経細胞間の新たなネットワークの構築、すなわち新規シナプス形成による失った機能の再建が必要である。運動麻痺治療の中でも、訓練・生活場面における麻痺側肢の集中的使用により能動運動を促すCI療法は有効な治療法として多く用いられるが、運動麻痺治療のエビデンスには不明な点が多く、神経科学的根拠に基づいたリハビリのゴールドスタンダードの確立が急務である。

またリハビリテーション分野では、運動機能回復に心理面が及ぼす影響に注目が集まっており、ストレスやモチベーションといった要素が運動機能回復を左右する可能性があるが、その機序については明らかではない。

(3) 脳可塑性のメカニズム:

神経科学的根拠に基づいた訓練展開が切望されながらも、有効な治療法や回復の詳細なメカニズムの詳細は未解明である。ヒトを対象とした研究では脳機能解析などには限界があるため、有用なモデル動物を用いて効果的訓練手法ならびに訓練後のシナプス再構築の関係を解明することが不可欠である。

2. 研究の目的

前述の背景を受けて、本研究課題では運動麻痺改善のメカニズムを脳神経レベルでの解明を目指し、脳梗塞モデルラットに対する運動介入効果を運動種類別にさらに心理的影響を加味して脳シナプスレベルからそれぞれ検証することとした。これらが明らかになることで、運動麻痺改善に効果的な脳卒中後リハビリテーションの展開が可能となる。さらには、訓練による脳修復のメカニズムが明らかになることで、神経科学的根拠に基づいた訓練手法の提示が可能になり、リハビリテーション効果の向上に寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

モデルラットを用いた脳梗塞病態の解析と機能改善のための効果的介入の検討

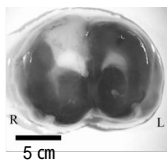
(1) 運動介入が運動麻痺改善に及ぼす効果の検証:

ラットは Wistar 系の成熟した雄を使用した。浜松大・梅村教授らの開発した Photochemically Induced Thrombosis (PIT) 法を用いて、前肢に限局した運動麻痺を呈する中大脳動脈梗塞ラット(以下 PIT モデルラット)を作成し、手術実施 24 時間後に脳梗塞の出現を確認した。(右図) PIT モデルラットに対して運動介入実施の前後で以下の内容を検証した。

PIT モデルラットの神経症状評価のために、以下の項目を手術前後で評価・比較を行った。

運動麻痺: Wire hang test, forelimb placing test (前肢麻痺の指標)

Ladder test, beam walking test (歩行能力の指標)



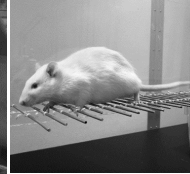
梗塞巣の評価(術後 24 h)



Wire hang test



Forelimb placing test



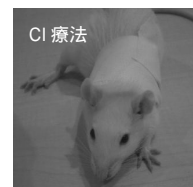
Ladder test

PIT モデルラットに対して上肢運動機能改善を狙った訓練を実施しその効果を比較した。

運動介入期間: 1 週間

評価時期: 介入開始 1, 4, 7, 10, 14day, 1-4week

訓練方法(リハビリテーション)
CI 療法のみ(右上図): CI 群 CI 療法: 非麻痺肢の使用を制限し麻痺肢を日常生活で使用
CI 療法 + 餌へのリーチ運動(右下図): CI+reach 群 餌へのリーチ運動: 前方に設置された餌に対するリーチ運動。 難易度を変えて前方(易)、下方(難)の課題を実施。
脳梗塞作成後は非介入: コントロール群



(2) モデルラットへの運動介入による脳内変化の評価:

運動訓練に伴う心理的側面が機能回復に与える影響:

脳梗塞モデルラットの脳スライス作製、生理学的・組織学的検討の実施

脳シナプスのレベルでの運動麻痺改善に有効な介入手法検証を目的に、PIT モデルラットの脳スライス標本を作製し、免疫染色による神経細胞新生の有無やシナプス電流の解析による神経ネットワーク再構築の状態を観察・比較した。

(形態学的検証)

訓練実施後に PIT モデルラットを抜脳、脳スライス標本を作製した。訓練後の細胞新生を観察するために BrdU を用いた免疫染色を実施し、陽性細胞数を計測した。

(電気生理学的検証)

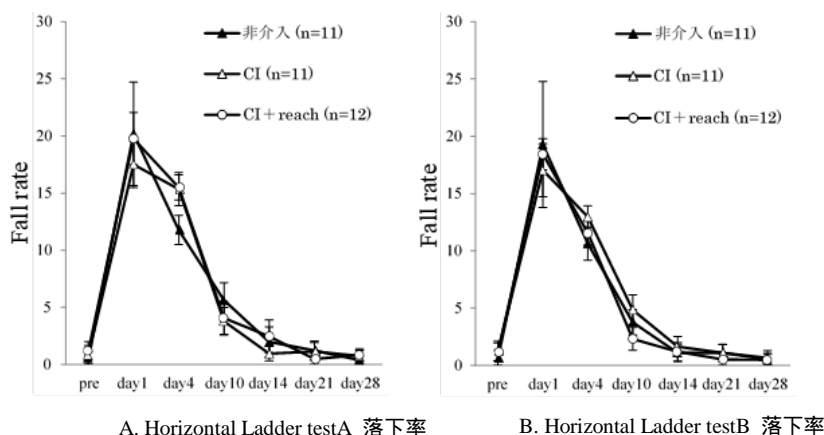
脳スライス標本を用いたパッチクランプ法による解析を行うための予備的検討を行った。動物は脳出血モデルラットを用い、運動野(M1)における自発性興奮性シナプス電流(mEPSC)解析のために線条体へ逆行性トレーサを注入し M1 の細胞体を標識した。

4. 研究成果

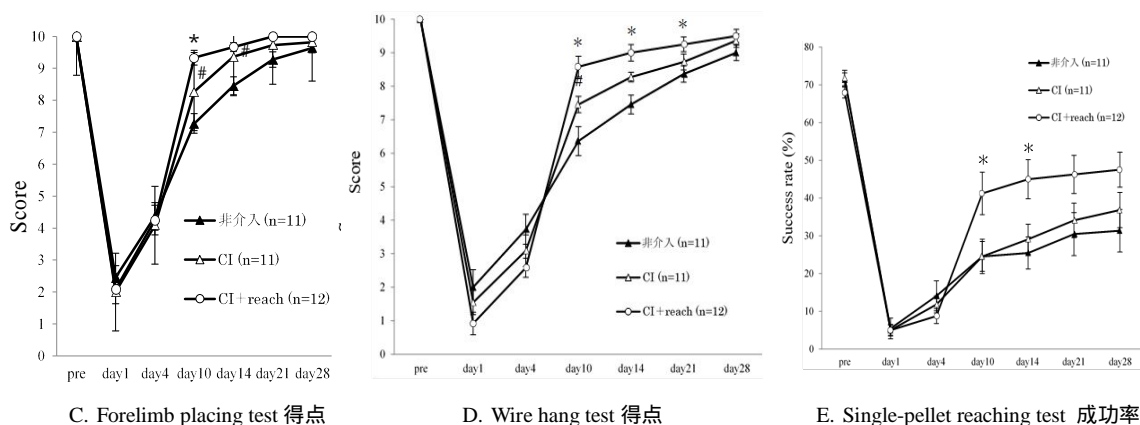
(1) 運動訓練が運動麻痺の改善に与える影響

CI療法とリーチ訓練による運動麻痺改善効果:

PIT 法を用いて作出した梗塞巣のモデルラットの神経症状評価のために、手術前後の運動機能の経時的変化を評価した。前後肢の協調運動を評価するため Horizontal Ladder test を行った結果、評価日ごとの3群間の落下率に有意な差は認められなかった(下図 A,B)。



CI群、CI+reach群において Forelimb placing test (前方)、Wire hang test では運動介入後早期に有意な機能回復を示した。(下図 C,D)また、非介入群と CI+reach 群の比較においてのみ手術後 10、14 日目と早期に Single-pellet reaching test で機能回復を示した。(下図 E)



(2) 運動後の脳機能回復に関する評価

運動訓練に伴う心理的側面が機能回復に与える影響:

訓練に伴うモチベーションやストレス負荷といった心理的負荷が運動機能の回復に与える影響を明らかにするために予備的検討を行った。脳出血モデルに対して、自発的な回転ケージ運動と強制的なトレッドミル訓練を実施した。その結果、自発運動を実施した動物の脳内では他群に比べて、モチベーションの関連領域である側坐核中に FosB 蛋白が多く発現していた。さらに、強制的運動群の動物では、血漿中のストレスホルモン(コルチコステロン)が増加していた。これらのことから、モチベーション

といった心理は運動機能回復を促進する一方で、ストレスは運動機能回復を阻害する可能性が示された。

運動訓練の有無と細胞新生状態との関連：

運動介入の効果を脳神経ネットワークの改善のレベルから明らかにするため、モデルラットの脳スライスを作製し、電気生理学的手法(パッチクランプ法)と形態学的評価(蛍光染色)を用いて脳神経のネットワーク再構築の様子や神経修復の程度について観察する。

(形態学的検証)

運動介入群と非介入群とを比較すると、運動介入群における BrdU 陽性細胞が多く、訓練による細胞新生の可能性が示唆されたが、神経細胞であるかの検証は現在解析を進めている。

(電気生理学的検証)

運動介入群と非介入群とを比較したところ、強制的トレッドミル走ならびに自発的回転ケージ運動を行った群はいずれも mEPSC の頻度、振幅ともに増加を認めた。(データ未発表)

今後は、神経ネットワークの状態について経過を追って観察する。次に各種受容体拮抗薬、作動薬を用いて回復過程におけるシナプスでの薬理的検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 32 件)

1. Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Kazuki Akahira, Koshi Sumigawa, Shuhei Koeda, Misaki Mikami, Junko Yamada. The 1st Japan-Korea-Taiwan Neurorehabilitation Conference (Japan, Sendai). The comparison of the synaptic changes with voluntary and forced rehabilitation in intracerebral hemorrhage model rats. (20190528-29) Poster award 受賞

2. Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Shuji Shimoyama, Misaki Mikami, Kazuki Akahira, Junko Yamada. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (Kobe, JAPAN). Voluntary and forced rehabilitation to promote motor palsy recovery in intracerebral hemorrhage rats. (20190328-31)

3. Junko Yamada, Kazuki Akahira, Chihiro Sato. et. al. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies congress (Kobe, JAPAN). The effect of forced limb training of rats under photochemically induced focal cerebral ischemia. (20190328-31)

4. 赤平 一樹, 佐藤 ちひろ, 三上 美咲, 山田 順子. 第 156 回弘前医学例会(青森県弘前市). PIT 法を用いた脳梗塞モデルラットに対する麻痺側肢集中使用による運動機能回復効果の検討.(20190118) 奨励賞受賞

5. Chihiro Sato, Kazuki Akahira, Shuhei Koeda, Koshi Sumigawa, Misaki Mikami, Junko Yamada. (San Diego, USA). Annual meeting of Society for Neuroscience 2018 The effect of forced limb training for recovery of motor paralysis in a photochemically induced thrombosis model of cerebral ischemic stroke in rats (20181103-07)

6. 佐藤 ちひろ, 小枝 周平, 澄川 幸志, 山田 順子. 第 44 回日本脳科学会(青森県弘前市). The comparison of the recovery of motor paralysis by the voluntary and forced exercises in intracerebral hemorrhage model rats. (20171014) 奨励賞受賞

(他 26 件)

[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：

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名:山田 順子

ローマ字氏名:YAMADA Junko

研究協力者氏名:熊田 竜朗

ローマ字氏名:KUMADA Tatsuro