

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01492

研究課題名（和文）脳梗塞後のリハビリテーションによる神経活動の変化～電気生理学的手法を用いた検討

研究課題名（英文）The effects of rehabilitation on activity of hippocampal neurons &amp;#211; electrophysiological study

研究代表者

氷見 直之（Himi, Naoyuki）

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70412161

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：軽度脳梗塞モデルラットにリハビリテーションとして有酸素運動を負荷することで、海馬ネットワークやニューロンの活動性がどう変化するか電気生理学的手法にて解析した。結果として、有酸素運動群では空間記憶能が非運動群と比較して有意に向上したが、海馬ニューロンの興奮性やシナプス間の短期可塑性には群間で差が認められなかった。そこで電気生理学的検討から離れてシナプス関連分子の発現量を測定したところ、synaptophysinおよびMAP-2は群間で差は見られなかったが、PSD95が非運動群において低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動機能は正常で、認知・記憶能力が損なわれる軽度脳梗塞患者がリハビリテーションとして有酸素運動を行うことで、海馬でシナプス数が減少するのを阻止して健常レベルに維持できることが動物実験により間接的に示された。これは従来の研究で報告されていない知見である。電気生理学的な手法ではシナプス伝達の変化は見られなかったが、そのような測定できないレベルの微小な変化ではあるが、有酸素運動で確実にシナプス伝達が強化されていると考える。

研究成果の概要（英文）：The effects of rehabilitation, an aerobic exercise, on neuronal activity and synapse transmission of hippocampus were analyzed by electrophysiological method in cerebrovascular embolism model rats. As a result, spatial memory capacity was significantly improved in the aerobic exercise group compared with the non-exercise group. However, there was no difference between the groups both in excitability of hippocampal neurons and short-term synaptic plasticity. On the other hand, as a result of comparing the expression levels of synapse-related molecules between the groups, there was no difference between synaptophysin and MAP-2, but PSD95 was decreased in the non-exercise group.

研究分野：神経科学

キーワード：リハビリテーション 脳梗塞 シナプス 海馬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は死因上位にあげられる重大疾患であり、生存した場合でも重度の運動および認知機能障害が残り、日常生活や社会への復帰に長期のリハビリテーションを余儀なくされる場合が多い。そこでより効果的なリハビリテーション技術の要求の高まりから、従来は経験則に依存していた手技から、最近では基礎研究に基づいた新たな技術の導入が進んできている。例えば経頭蓋電気刺激または磁気刺激、ボツリヌス毒素注入法などである。これらの新技術は、関連各分子の発現やニューロン形態の変化など生化学的および組織学的な基礎検討により得られた国内外の多くの研究成果に基づいて実用化されており信頼度も高い。しかしながらこのようなミクロな変化と個体の機能・行動の変化の間にはいまだに大きな飛躍があり、リハビリテーションのメカニズムの完全なる解明には至っていない。我々は動物実験により脳梗塞後のリハビリテーションに関する基礎検討を実施してきた中で、梗塞後の脳組織にて観察されるニューロンの形態や分子発現の変化が行動試験結果と因果関係を有することは示せても、その詳細メカニズムを説明し切れていないと感じてきた。そこでニューロンの活動変化やニューロン間の情報伝達効率の変化が追跡できればミクロな変化と機能・行動面の変化をつなぐ理論的架け橋になると考え、特に生きた標本を用いた電位生理学的手法でこの中間過程を検討するという着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究は、研究期間内に段階的に以下の項目を達成することを目的とする。

脳梗塞モデル動物において梗塞発症後のニューロン活動、シナプス伝達効率を電気生理学的手法および組織学的手法を用いて解析し、健常脳の値と比較し差を明確にする。

リハビリテーションとしての運動の介入により に挙げた神経活動がどのように変化するかを記録、解析し、行動実験結果も加味して介入の効果を明確にする。

さらに効果的なリハビリテーションの提言のために、運動の強度や巧緻性を変えて に挙げた神経活動の変化を記録・解析し、運動の種類、強度の各因子の影響を明確にする。

近年リハビリテーションの研究において、生化学的技術や計測機器の進歩により、リハビリテーション的介入による脳や脊髄組織の関連分子の発現変化やニューロンの形態変化を検出した結果が急速に報告されるようになった。さらにこれらの論文では分子発現と個体の行動試験結果を関連付けたものも多い。しかしこのような分子発現やニューロンの形態変化は機能および行動変化の1つの素過程にすぎず、その結果どのように情報伝達系が変化して機能および行動の変化につながるのかを系統的に説明しきれていない。本研究は、分子・形態過程と機能・行動過程を橋渡しする中間過程であるニューロン活動およびシナプス伝達過程を明確にすることにより従来の理論的飛躍を補間し、一貫したリハビリテーションのメカニズム解明に寄与するものである。またこのような中間メカニズムが解明されれば、副作用が大きいことが予想される分子をターゲットとした創薬開発よりも、特定の神経経路の活動を強化することをターゲットした手技の開発など、より実践的で害の少ない治療法へ応用でき、患者の quality of life 改善に直結すると期待している。

一方、電気生理学的手法によりリハビリテーション過程の神経活動を記録した例は少なく、本研究では、リハビリテーション過程におけるニューロンの興奮性、シナプス伝達の経時的な変化を追跡し、伝達効率が変化した結果として生じる機能・行動の変化まで観察することでリハビリテーションのメカニズムをより総合的に考察するという、新しい視点からの検討を加える。この結果は、例えばリハビリテーションの現場において、回復過程において現れる機能変化を反映しながら、より効果の高い手技に随時見直していく際の根拠となることを期待している。

### 3. 研究の方法

研究目的に従い、脳梗塞後の脳組織に起こるニューロン活動やシナプス伝達強度の変化を明確化する。手法として脳スライス標本からパッチクランプ法で記録すると同時に記録ニューロンの可視化やシナプス密度の組織学的観察も併用する。次にリハビリテーションの効果を検証する実験に着手する。脳梗塞後に軽度な運動負荷を与え、脳組織のニューロン活動およびシナプス伝達強度の変化を解析し、非運動群と比較する。この変化に大きく影響すると考えられる脳由来神経栄養因子 (BDNF) の生化学的測定も行う。リハビリテーションによる電気生理学的变化を解析後、リハビリテーションの強度および種類のチューニングをし、その影響を確認していく。

8週齢の Sprague Dawley ラットをセボフルランにて麻酔後、頸部を切開し、右内頸動脈よりマイクロスフェア (MS, Polyscience, 径 45 $\mu$ m) を注入して脳梗塞を発症させる。この手法は我々が既に確立した手法であり、全身症状は軽度でありながら8日後には海馬のニューロンが一部損傷されて空間記憶能の低下が見られるため、運動療法を検討するモデルとして有用である。MS注入8~12日後に空間記憶能の低下をモリス水迷路にて確認後、断頭しマイクロスライサーにて迅速に海馬を含む脳スライス標本を作成する。脳スライスは両側とも使い、右 (MS注入側) を梗塞側、左を健常側とする。スライスを人工脳脊髄液 (ACSF) 灌流下のチャンパーに設置し、海馬 CA3 領域にタングステン双極電極を置いて電気刺激し、興奮性シナプス後電流

(EPSP)をCA1ニューロンよりホールセルパッチクランプ法により記録し、シナプスの短期可塑性を解析し左右の海馬にて比較する。

続いて脳梗塞モデルラットに対しMS注入24時間後よりトレッドミルにて全身運動を課す。運動は15m/minの速度で30min/dayとし、これを7日間行う。この運動により梗塞海馬組織の脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現が高まり、その結果ニューロン死が抑制されると考えている。脳梗塞モデルラットを運動群と非運動群に分け、運動終了後に海馬を摘出して海馬シナプスの伝達強度を解析し、運動の効果を比較する。運動により空間記憶能が回復することは既知であるが、海馬のシナプス伝達強度の変化がそれを反映していることを確認する。

#### 4. 研究成果

##### <記録システムの構築>

研究課題である脳梗塞後のリハビリテーションにより機能が回復するメカニズムと考えられる神経活動の変化を解析する上で、新規導入したA/D変換器(Digidata1550, Molecular Devices社)により安定かつ高速な電気生理学実験システムが構築できた。モデルセルを用いた測定では十分なノイズレベルの低下を達成できたことを確認し、S/N比も充分であった。

また計測システムは構築されたがその一方で安定した海馬スライス標本が得られない問題に直面したが、海馬のニューロンが虚血に弱いことを考え、摘出からスライス作成に到るまで全ての手順を見直した。最適な手法として、Sucroseベースの冷却等張バッファを麻酔後のラットの心臓より灌流し、脳組織を十分に冷却し、低Na<sup>+</sup>環境とする。灌流後迅速に脳組織を摘出し、氷冷Sucroseバッファ中にて5分置く。その際、O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>=95/5%の混合ガスをバブリングしておく。スライサーで切片を切り出す際にも混合ガスをバブリングした氷冷sucroseバッファ中で行い、切片はバブリングした30の通常人工脳脊髄液(ACSF)へ移し、1時間休ませてから記録を行う。記録チャンバーの液は混合ガスをバブリングさせたACSFを、32、2ml/minで灌流させる。以上の手順を見出し、データ取得が可能となった。

##### <電気生理学的記録>

スライス標本のCA3領域にタングステン双極電極を置き、CA1領域の錐体細胞にパッチクランプを行い活動を記録したが、刺激に応じた後シナプス電流(EPSP)が得られず、電極の設置位置、刺激条件および灌流液組成などを見直した。今回用いた海馬スライスは冠状断であるため、同一スライス内でCA3からCA1への連絡(Schaffer側枝)が分断されていると考え、できる限り記録領域に近い部位でCA3の放線層を刺激したところ、EPSCが記録可能となった。また、記録細胞に自発性活動電位が生じてEPSCの波形に重なることがあり、EPSCのamplitudeを解析する上で障害となった。これは、パッチ電極内液に細胞内からNaチャンネルをブロックするアンタゴニストであるQX314を添加することにより解決した。以上の策により鮮明なEPSCが得られたが、運動群の脳と非運動群の脳でpaired刺激による応答に差異は見られなかった(図1)。

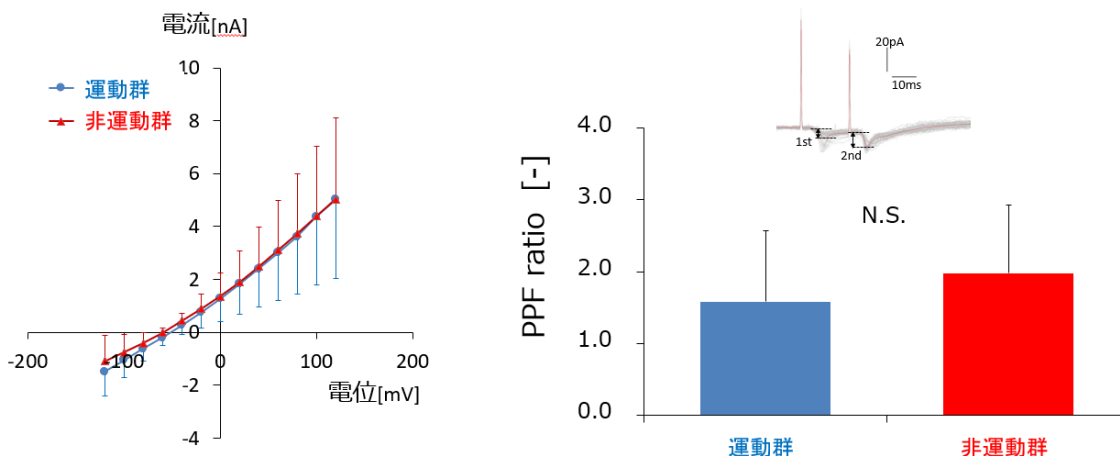


図1 左:シナプス後細胞の電流-電位特性 右:paired刺激による応答(2回目/1回目の振幅比)

##### <シナプス関連タンパクの比較>

脳梗塞後の運動により個々のシナプスにおける伝達効率は変わっていないがシナプス数や密度が変化しているとの仮説を立て、シナプスの形成量を生化学的に確認した。シナプス前のマーカーである synaptophysin、後シナプス側のマーカーである PSD95 および後シナプスの樹状突起のマーカーである MAP2 について組織免疫染色および Western Blot を行った。運動群の脳では非運動群の脳に比べて PSD95 と MAP2 の発現が有意に上昇していることが確認された。一方で synaptophysin 発現量には群間に差はなかった(図2)。

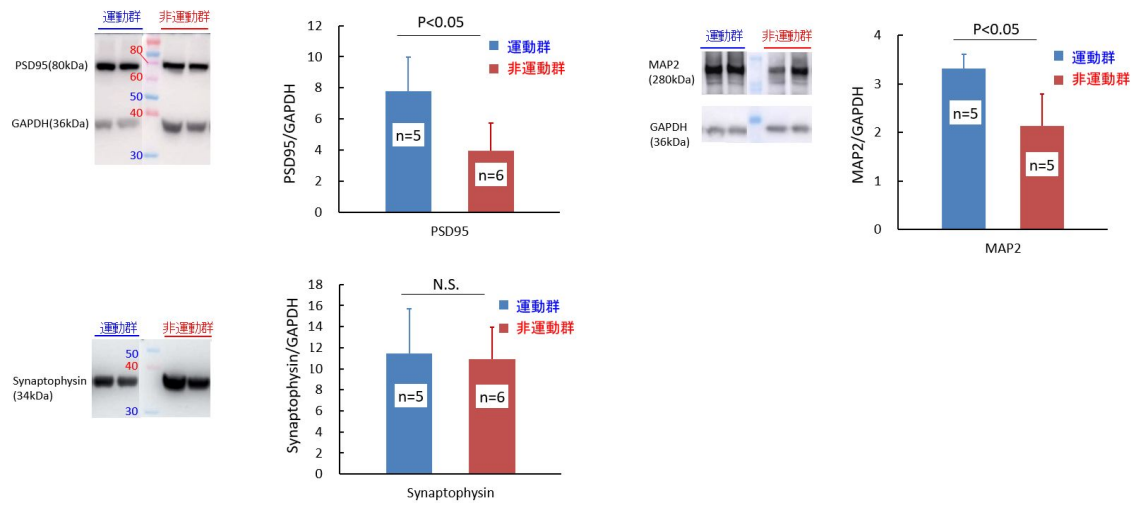


図 2 シナプス関連分子 ( PSD95、synaptophysin、MAP2 ) の発現 ( ハウスキーピングタンパクである GAPDH に対するバンド濃度の比 )

< 結論 >

軽度な脳梗塞モデルであるマイクロスフェア塞栓モデルの海馬では有酸素運動によるシナプス伝達効率に変化は見られなかったが、運動群では CA1 ( 後シナプス側 ) のシナプス形成数が増加していることが示唆され、これを本研究の結論としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naoyuki Himi, Naohiko Okabe, Hisashi Takahashi, Emi Nakamura-Maruyama, Norito Hayashi, Issei Sakamoto, Tomoshige Koga, Osamu Miyamoto
2. 発表標題 Characteristics and functions of cerebral hypoperfusion model rats by microsphere embolism.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生理学2教室ホームページ <a href="http://www.kawasaki-m.ac.jp/physiology/index.html">http://www.kawasaki-m.ac.jp/physiology/index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮本 修  (Miyamoto Osamu)  (00253287)	川崎医科大学・医学部・教授   (35303)	
研究分担者	岡部 直彦  (Okabe Naohiko)  (30614276)	川崎医科大学・医学部・助教   (35303)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	丸山 恵美  (Nakamura-Maruyama Emi)  (30792072)	川崎医科大学・医学部・助教     (35303)	