

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16303

研究課題名(和文) 発達期白質障害モデルに対する豊かな環境飼育による小児期リハビリテーションの検討

研究課題名(英文) Effect of environmental enrichment on neonatal white matter injury in rat

研究代表者

上田 佳朋 (Ueda, Yoshitomo)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：30758420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児リハビリテーションの基礎実験モデル系の豊かな環境飼育(EE)の新生児低酸素虚血性白質傷害(NWMI)モデルに対する効果を、障害運動機能障害への影響および皮質内微小電気刺激法による電気生理学的影響から検討した。その結果、離乳後から成熟するまでの発育期のEEにより、棒状歩行試験、水平梯子歩行試験、後肢引き戻し試験などによる運動試験の実施により、DWMIにおいて障害されていた運動機能が改善されること、それに一致して皮質微小電気刺激法による運動マップの改善及び皮質刺激閾値の正常化が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラットを用いた本研究は、動物レベルにおいて発育期のリハビリテーションが障害された運動機能を改善すること、またそれを裏付ける電気生理学的な証拠が確実に示された。今後このメカニズムを詳細に動物レベルで解析を進めて行くことによって、新生児低酸素虚血性白質傷害に対する小児期のリハビリテーションが効果を持つことという事実を科学的な証明を与えることに繋がり、ヒトへの本実験結果の還元が期待される。また、薬剤などによる効果を調べていくことにより、更なる治療効果の展開へと繋がる。

研究成果の概要(英文)：The effect of environmental enrichment (EE), which is considered as a basic model for the research of children rehabilitation, was examined in a rat model of neonatal white matter injury (NWMI) from the aspect of the recovery of disturbed motor functions and the electrophysiological response to intracerebral microstimulation (ICMS). we found that EE from postnatal day 25th for 5 weeks in the model cause functional recovery of disturbed motor functions (beam walk ability test, horizontal ladder test, hindlimb retraction test), the expansion of motor map comparable to normal rat, and normalization of the threshold of the cortex to ICMS. Thus, the effect of EE on NWMI was clearly revealed by our experiments.

研究分野：神経科学

キーワード：低酸素虚血性白質傷害 豊かな環境飼育 皮質内微小電気刺激 水平梯子歩行試験 運動マップ 皮質興奮性

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オリゴデンドロサイト (OL) 前駆細胞は特に虚血に対し脆弱であり、早産児が低酸素虚血にさらされると、OL 前駆細胞の傷害により、低酸素虚血性白質障害が生じやすい。周産期医療の進歩により重症例は減少しているが、むしろ軽症例はわずかに増加している。そのため病態の解明・治療的介入法の確立が急務となっている。すなわち、顕微鏡レベルの微小傷害とその傷害による運動機能障害を示すモデル動物を用いた基礎研究が重要となっている。

生後 3 日齢ラットを用い、新生児低酸素虚血性白質障害 (Neonatal White Matter Injury, NWMi) モデルをこれまでに確立してきた。申請者は、これまでに ロタロッド試験、歩行解析 (DigiGate) などによる、軽度の運動機能障害、皮質内微小電気刺激 (ICMS) による大脳皮質電気応答の変化、神経樹状突起の形態変化、樹状突起の形態に影響しうる IGF-2 の増加、等を明らかにしてきた。すなわち、NWMi モデルでは大脳皮質内の回路発達が正常とは異なることを見出し、OL 前駆細胞の低酸素虚血後変化と生後発達が複雑に関係していると明らかにした。

一方、小児神経リハビリテーションのモデル系としての豊かな環境飼育 (Enrich Environment, EE) の可能性が期待されている。小児に対するリハビリテーションでは、脳障害後の生体反応に加え発達過程の強い可塑性が加わり、さらに抑制性神経の作用が弱いことなどにより、高い効果が期待できる。

発達期の EE 飼育は小児期神経リハビリテーションの要素を含むモデル系として考えられ、発達期の EE 介入の有効性は、呼吸器障害モデルでの介在ニューロン発達遅延の軽減 (Komitova *et al.*, 2013)、帝王切開モデルでの発達初期の運動機能回復 (Kiss *P et al.*, 2013) など、神経機能回復効果を示す報告がある。しかし、成長後の運動機能は検討されておらず、NWMi に対する EE 飼育の効果とそのメカニズムについては不明である。

本申請では、皮質神経細胞数は減少しないものの、神経シナプスネットワーク障害を示す NWMi モデルを用いて、皮質内の神経回路再構築・皮質電気応答性の改善に焦点を絞り、運動機能回復において EE 飼育の有用性についての検討を目指した。

2. 研究の目的

新生児低酸素虚血性白質障害 (NWMi) モデルを確立し、大脳皮質の電気反応変化と神経シナプスの変化が下肢機能障害を惹起する可能性を示したので、神経機能賦活・障害改善作用が知られている小児リハビリテーションの基礎実験系として有用なモデルである豊かな環境飼育 (EE) の NWMi モデルに対する影響を、豊かな環境飼育が運動機能障害を改善するか、電気生理学的に神経シナプス機能を改善するか、等を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NWMi モデルの作成

所属教室からの報告したこれまでの論文に従い (Misumi *S et al.*, 2016)、イソフルラン吸入麻酔 (1.5%) 下にて生後 3 日齢ラット右総頸動脈閉塞動脈と 6% の低酸素条件 (1 時間) を組み合わせた条件により作成した。

(2) 豊かな環境飼育

SANKO (株) 製ワイルドホームフェレット用のケージ (810 × 510 × 530 mm) の中に、アメニック (株) 製イグルー (K-3327, K-3328) トンネル (K-3325, K-3326) Crawl Ball (K-3329, K-3330) 梯子や金網を入れ、離乳直後の生後 25 日齢から 6 匹で飼育した。1 週間に 2 回、餌

箱および給水ボトルを含める全ての器具の位置を交換した (Urakawa *S et al*, 2007)。

対照の通常飼育群では、一般的な飼育ケージ (400 × 230 × 180 mm) で 2 匹飼育した。

(3) 行動評価

後肢引き伸ばし試験、棒状歩行試験、水平梯子歩行試験およびロタロッド試験により、運動機能障害を評価した。生後 25 日、35 日、70 日の発育成長を考慮し、経時的な評価を行った。

(3-1) 後肢引き伸ばし試験 (Hindlimb retraction test)

左右それぞれの後肢が正常に機能しているかを確認するため、後肢を後方に 20-30 mm 引き伸ばし、正常な位置に戻るか否かを、左右交互に 20 回ずつ実施し、麻痺の程度を対側の後肢を比較対象として評価した。正常 0 点最重症 4 点の 5 段階評価として Motor Deficit Score で算出して、運動機能障害の程度を評価した。

(3-2) 棒上歩行試験 (Beam walking test)

歩行の協調運動機能の評価するため、木製の角棒上を歩行する際の後肢踏み外し回数を評価した。成長に合わせ、生後 25 日では 20 × 20 × 800 mm、生後 35 日では 25 × 25 × 800 mm、生後 70 日では 30 × 30 × 800 mm を用い、床上 75 cm の位置で歩行させた。1 回の試験でこの歩行試験を 3 回行い、正常 0 点最重症 4 点の Motor Deficit Score で算出した。

(3-3) 水平梯子歩行試験 (Horizontal ladder walking test)

1 cm 間隔でステンレス棒 (3 mm) の装着が可能な長さ 100cm の水平梯子を用いた。梯子に慣れさせるため 3 日間各日 3 回の歩行練習を行った。成長段階に対応し、生後 22 日から 24 日の間は 1 cm 間隔、生後 32 日から 34 日の間は 2 cm 間隔、生後 67 日から生後 69 日の間は 3 cm 間隔にステンレス棒を配置し歩行練習を行った。

試験当日に、成長段階に対応した梯子の間隔をランダムの間隔に配置 (生後 25 日 1~4 cm 間隔 45 本ステンレス棒、生後 35 日 2~5 cm 間隔 35 本ステンレス棒、生後 70 日 2~5 cm 間隔 25 本ステンレス棒) さらにアクリル板の横幅を可変させ (生後 25 日 4 cm、生後 35 日 5 cm、生後 70 日 7 cm) 歩行試験を実施した。

デジタルビデオカメラで撮影し、歩行姿勢を動画で解析した。動画にて 1 歩行ずつ左右それぞれ解析した。後肢がステンレス棒を正確に把持できていない足踏の全体に対する割合を算出して評価した。

(3-4) ロタロッド試験 (Rotarod test)

全身の協調運動機能の評価するため、Panlab (株) 製 Rota Rod (#LE8305) を用いた。まず 3 日間練習を行い、各日 10 rpm の一定の回転数で 5 分ずつ 3 回歩行させた。生後 22 日から 24 日の間はマウス用ドラムを用い、生後 32 日から 34 日の間および生後 67 日から生後 69 日の間はラット用ドラムを用いて行った。

試験当日は、回転数を 4 回転/分から 40 回転/分のスピードに 1 分間加速するように設定し、最大 60 秒として落下するまでの時間を測定した。各個体で 3 回試行し、最長時間を結果として用いた。

(3-5) 皮質内微小電気刺激法 (Intracortical microstimulation, ICMS)

生後 70 日齢ラットへケタミン (60 mg/kg)・キシラジン (10 mg/kg) 混合溶液を腹腔内へ投与し麻酔した。脳浮腫を防止のためデキサメタゾン溶液 (0.05 mg/kg) を対側後肢から投与した。実験記録中の麻酔深度を一定とするため、必要に応じケタミン (30 mg/kg)・キシラジン (5

mg/kg) 混合溶液を腹腔内に追加投与した。

脳定位固定装置にラットを固定し、右大脳皮質(プレグマから側方 1.0~3.0 mm, 後方 1.0~3.0 mm)へ、Glass insulated tapered tungsten electrodes (インピーダンス: 0.7 M Ω , シヤフト径: 250 μ m, #380-080607-11) を刺激電極として使用し、固定装置用マニピュレーター (#SMM-200, #DMA-1650) に電極を接続、大脳皮質運動野第 V 層 (皮質表面下 1400-1600 μ m) まで電極を静かに下げた。電極を \pm 200 μ m 間隔で調節し、スパイク波形を測定しながら適切な深度を決定した。

日本光電(株)製の電気刺激装置(#SEN-8203)から二相性矩形波(周波数: 333 Hz, パルス幅: 200 μ s, 10 連続刺激)をアイソレーター(#SS-203J)を通して 2 秒毎に電極刺激を行った。刺激応答を、オシロスコープに接続した A-M Systems(株)製の AC Amplifier(#1800)によって電流増幅させ測定した。

刺激電流は、関節や筋の動きが検出されるまで 10 μ A ずつ徐々に上げ、運動マップや大脳皮質の反応閾値の変化を確認するため、目視および触診によって筋収縮の確認を行った。筋収縮を誘発できる必要な最小電流を運動閾値として記録した。また 200 μ A で筋収縮が誘導されなかった場合には「反応なし」として定義した (Ishida A et al, 2016)。

4. 研究成果

(1) 実験デザインの設定

豊かな環境飼育が DMMI モデルに対し有効性があるか否かを検証するために、EE の対照群として通常飼育(SE)群を設定した。また、本実験では生後 3 日で DMMI モデルを作製したのち(sham 群と DMMI 群)、生後 25 日まで母親と共に SE で飼育し、25 日から 70 日までの 5 週間を EE または SE の 2 つの環境に分けて飼育した。

すなわち、疾患モデル、飼育環境の 2 つの実験要因を考慮し、Sham-SE 群、Sham-EE 群、NWMI-SE 群、NWMI-EE 群、の計 4 群を設定し、行動学的、組織学的、電気生理学的、免疫組織学的評価を行った。

(2) 豊かな環境飼育(EE)による体重変化

群別ごとのラットの体重変化を、生後 25 日から 70 日まで経時的に測定した(Sham-SE: n=17, Sham-EE: n=12, NWMI-SE: n=8, NWMI-EE: n=18)。その結果、それぞれの群において体重の変化に差は認められなかった(two-way ANOVA, P25, P28, P35, P42, P49, P56, P63, P70, Tukey's test, no significant)

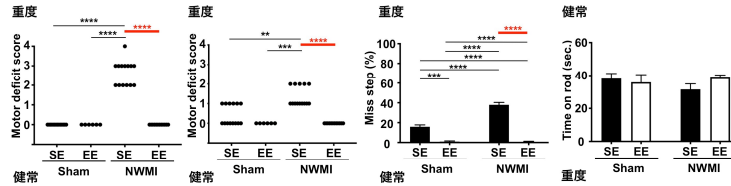
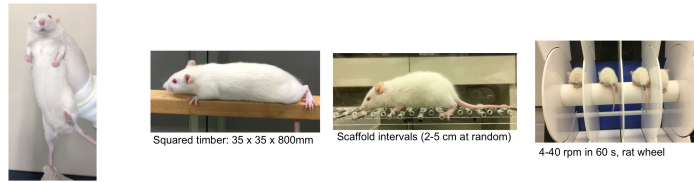
(3) NWMI モデル動物に対する EE による運動機能変化

Sham-SE 群、Sham-EE 群、NWMI-SE 群、NWMI-EE 群の 4 群に対し、後肢引戻し試験、棒状歩行試験、水平梯子歩行試験およびロタロッド試験を、生後 25 日、35 日、70 日の発育成長の経時的变化を評価した。

その結果、後肢引戻し試験、棒状歩行試験、水平梯子歩行試験のいずれの試験において、NWMI モデルに対し発育期の EE は障害運動機能の改善をもたらすことが明らかになった。一方、ロタロッドにおいては有為な変化を観測するには至らなかった。

EEは後肢運動機能を改善した

<Hindlimb retraction> <Beam walking> <Horizontal ladder> <Rotarod>



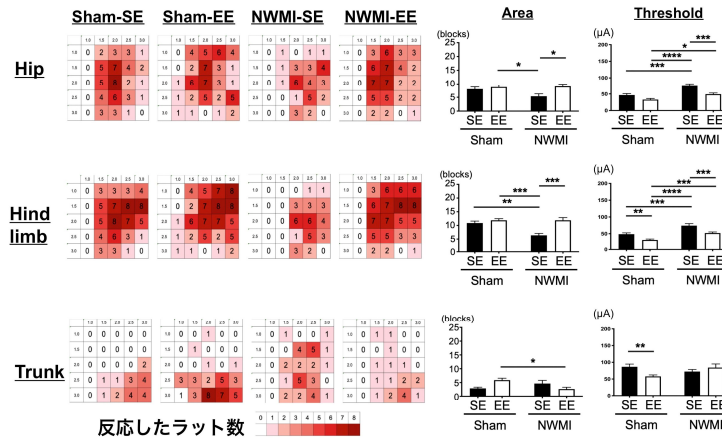
Sham-SE: n=14, Sham-EE: n=6, NWMI-SE: n=14, NWMI-EE: n=12 **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

(4) ICMSによる運動マップおよび皮質刺激性変化の観測

プレグマから側方1~3 mm および後方1~3 mm の領域を0.5 mm 間隔で格子状に25箇所刺激部位を指定し、各部位をランダムにICMS刺激した。

その結果を、閾値と反応部位を色分けし、また同時に反応閾値も記載した。

EEは運動マップを正常化した



Sham-SE: n=8, Sham-EE: n=8, NWMI-SE: n=8, NWMI-EE: n=8 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

参考文献

Misumi S, Ueda Y, Nishigaki R, Suzuki M, Ishida A, Jung CG, Hida H. Dysfunction in motor coordination in neonatal white matter injury model without apparent neuron loss: a rat model for cell-based therapy using oligodendrocyte progenitors. *Cell Transplantation*: 25, 2016, 1381-93.

Urakawa S, Hida H, Masuda T, Misumi S, Kim T-S, Nishino H. Environmental enrichment brings a beneficial effect on beam walking and enhances the migration of doublecortin-positive cells following striatal lesions in rats. *Neuroscience* 144: 2007, 920-933.

Ishida A, Isa K, Umeda T, Kobayashi K, Kobayashi K, Hida H, Isa T. Causal link between the cortico-rubral pathway and functional recovery through forced impaired limb use in rats with stroke. *J Neurosci* 36(2): 2016, 455-467.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueda Y, Bando Y, Misumi S, Ogawa S, Ishida A, Jung CG, Shimizu T, Hida H	4. 巻 9
2. 論文標題 Alterations of both dendrite morphology and weaker electrical responsiveness in the cortex of hip area occur before rearrangement of the motor map in neonatal white matter injury model rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2018.00443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishigaki R, Yokoyama Y, Shimizu Y, Marumoto R, Misumi S, Ueda Y, Ishida A, Shibuya Y, Hida H	4. 巻 1690
2. 論文標題 Monosodium glutamate ingestion during the development period reduces aggression mediated by the vagus nerve in a rat model of attention deficit hyperactivity disorder	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 40-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ueda Y, Misumi S, Suzuki M, Ogawa S, Nishigaki R, Ishida A, Cha-Gyun Jung, Hida H.	4. 巻 43(1)
2. 論文標題 Disorganization of oligodendrocyte development in the layer II/III of the sensorimotor cortex causes motor coordination dysfunction in a model of white matter injury in neonatal rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 127-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s11064-017-2352-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ogawa S, Hagiwara M, Shimizu T, Ueda, Y, Misumi S, Ishida A, Hida H.
2. 発表標題 Insulin-like growth factor-2, an increasing factor in neonatal white matter injury brain, promotes the differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in vitro
3. 学会等名 ASNTR-25/INTR-15 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部篤紀, 田尻直輝, 上田佳朋, 小川紫野, 石田章真、清水健史、飛田秀樹
2. 発表標題 発育期の豊かな環境飼育が新生児低酸素虚血性白質障害モデルラットに与える影響
3. 学会等名 中部日本生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tajiri N, Hattori A, Ueda Y, Ogawa S, Ishida, A, Shimizu T, Hida H
2. 発表標題 Enriched environment during the period of development attenuates hindlimb dysfunction in neonatal white matter injury model
3. 学会等名 第96回日本生理学会 / FAOPS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueda Y, Bando Y, Misumi S, Ishida A, Hida H.
2. 発表標題 Caspar-positive cell decrease and dendritic morphological change in the sensorimotor cortex are related to motor coordination dysfunction in neonatal white matter injury model rat
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogawa S, Hagiwara M, Shimizu T, Ueda, Y, Misumi S, Ishida A, Hida H
2. 発表標題 Insulin-like growth factor-2, an increasing factor in neonatal white matter injury brain, promotes the differentiation of oligodendrocyte progenitor cells in vitro
3. 学会等名 ASNTR-25/INTR-15 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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