

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04053

研究課題名（和文）霊長類脳梗塞片麻痺モデルを用いた新たなリハビリテーションと脳・神経可塑性の研究

研究課題名（英文）Innovative research regarding rehabilitation and neuroplasticity using primate cerebral infarction model with hemiplegia

研究代表者

下堂 蘭 恵 (Shimodozono, Megumi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30325782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトに近い脳構造や機能を有する霊長類を利用した脳卒中モデルは、脳卒中後のリハビリテーションの効果やその基盤となる神経可塑性の研究に有用と考えられる。今回、片麻痺の機能回復を時間の制約なく定量的に評価するシステムを構築するために、まずコモンマーモセットを用いた脳梗塞モデルを安定して作成できることをMRIで評価した。次に脳梗塞の作成後28日間、新たな3次元行動解析装置MarmoDetectorで急性期の行動軌跡や移動距離、移動速度を解析した。その結果、片麻痺モデルの機能障害に関して新たな3次元行動解析と従来の神経学的評価との有意な相関関係を明らかにした。また、光操作法による介入予備実験を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中は要介護の主たる原因疾患であり、片麻痺などの機能障害に対し、より効果的なリハビリテーション治療法の開発が必要である。今回、ヒトに近い脳の構造、機能を有する小型霊長類であるコモンマーモセットを用いて光血栓法による脳梗塞モデルを安定的に作成した。さらに、脳梗塞後の機能障害やその回復過程の定量的評価のために、新たな3次元行動解析装置MarmoDetectorを用いて解析した結果、従来の神経学的評価スコアと有意に相関することを明らかにした。今回の成果により今後の新たな介入法の有用性やその作用を検証するための基盤が整った。このシステムの利用により新たな光操作法による介入の予備実験を開始し得た。

研究成果の概要（英文）：A non-human primate stroke model is useful to study effects of rehabilitation on motor impairment after stroke and neuroplasticity because the primate has brain structures and functions similar to those of humans. The purpose of this study is to construct a new system quantitatively evaluating changes in functional impairments in the stroke model. We made an ischemic stroke model of common marmosets using photosensitive dye. The success of the procedure was confirmed by magnetic resonance imaging. Then, we analyzed parameters, such as distance traveled, speed, activity time, and behaviors for 28 days post-stroke using a new three-dimensional monitoring system, MarmoDetector. As a result, a significant correlation was observed between the 3D data and conventional neurological scores, that were the worst immediately after stroke and did not recover to pre-infarction levels during the study period. In addition, we started a preliminary study about rehabilitation using optogenetics.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：非ヒト霊長類 脳梗塞モデル 3次元行動解析 リハビリテーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は脳卒中片麻痺に対するリハビリテーション治療として促通反復療法などの運動療法(Kawahira ほか 2010、Shimodozono ほか 2013、Matsumoto ほか 2016、Miura ほか 2019)、さらに蛋白同化ホルモンやボツリヌス療法など薬物療法との併用(Shimodozono ほか 2010、Hokazono ほか 2022)、電気刺激や振動刺激、反復経頭蓋磁気刺激などの物理的刺激(Shimodozono ほか 2014、Noma ほか 2012、Miyara ほか 2018、Etoh ほか 2013、2016、2019、Amano ほか 2020)などの臨床的有用性を検討してきた。しかし機能回復に伴う中枢神経系の作用機序については不明の点も多い。そのため脳卒中の病態解明や新しい治療法の開発には、動物実験が大きく貢献している。しかし、脳卒中治療法の開発を目的とした前臨床試験のほとんどは、げっ歯類モデルであり、脳の構造および脳損傷の程度の違いからヒトと脳卒中後の回復過程が大きく異なるという課題がある。そこで、脳卒中後の介入効果やその作用機序の解明には、神経解剖学的構造や機能がヒトと類似している非ヒト霊長類を疾患モデルとした基礎研究によってさらに発展させる必要がある。この経緯から我々は霊長類を用いた研究を開始した。我々の研究室では小型霊長類であるコモンマーモセットを用いて、光血栓法で脳梗塞を生じさせ、低侵襲かつ再現性の高い非ヒト霊長類脳梗塞モデルの作製に成功した(Ikeda, Harada [equally contribution]ほか 2013)。一方で、マーモセット脳梗塞モデルには従来いくつかの行動テストが存在するものの、機能障害を定量的に評価することに限界と困難さが生じていた。第一に、マーモセットはストレスに非常に敏感であり、特定の行動テストの間、ストレスのない方法で取り扱う必要がある。第二に、評価者と動物の信頼関係を確立することが不可欠であり、事前に十分なトレーニングを行う必要がある。これら2つの要因は、霊長類の機能障害を評価する上で大きな障壁となっていた。したがって、本研究は、マーモセット脳梗塞モデルを発展させると共に、脳卒中後の機能障害に対する定量的評価システムの構築や、脳卒中に対するリハビリテーションや物理療法、薬物療法の効果を検証した。

2. 研究の目的

本研究は非ヒト霊長類脳梗塞モデルを用いて機能障害を定量的に評価するシステムを構築させることと、リハビリテーション・物理刺激・薬物療法がどのような機序で脳内の神経に可塑的变化をもたらしているのか、組織学的および電気生理学的に明らかとすることを目的とする。そのために以下のことを達成させる。

- (1) 行動評価や治療に適した、脳梗塞モデルを作製する。
- (2) 脳梗塞モデルの機能障害に対する定量的評価システムを構築する。
- (3) 脳梗塞モデルを用いて、治療介入群と自然回復群の回復過程を定量的評価で比較検証し、評価後に個体の脳標本作製し、組織学的変化を調べる。

霊長類モデルの機能障害を従来の行動試験や観察による神経学的スコアで評価するには様々な制約やばらつきが生じやすく、十分に対応することはできない。そのため、本研究では脳卒中後の機能障害に対する定量的評価システムを構築させ、その評価システムを用いて、非ヒト霊長類脳梗塞モデルに対して、リハビリテーションや物理療法、薬物療法の併用効果を検証し、加えて回復に寄与した神経メカニズムについて組織学的及び電気生理学的に追及していくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞モデルの作成

コモンマーモセットに全身麻酔を施して一次運動野直上に直径 2.3mm の穴を開け、脳マッピングで運動野を同定した。

Rose Bengal (20mg/kg) を静脈内投与し、緑色光(532nm)で 20 分間、光量 20 mW にて標的領域に照射した。

脳梗塞作製 1 日後に実験動物用頭部 MRI で脳梗塞領域を確認した。

動物実験は、NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 8023, revised 1978)に従って実施し、すべての動物実験は大阪大学大学院医学系研究科の Institutional Animal Care and Use Committee (承認番号: 01-056-003) および鹿児島大学動物実験委員会(承認番号: MD19099, MD20026 および MD20087) の承認を得て行った。

(2) モニタリングシステムを用いた定量的評価

脳梗塞発症後 28 日間、モニタリングシステム MarmoDetector を用いた 3 次元行動解析ソフトで急性期の 1 日に移動した距離、移動速度、活動時間、飛び回数を算出する。加えて、脳梗塞後のマーモセットがケージ内で示す行動の軌跡を脳梗塞作成後 2 日目から 28 日まで解析した。

従来の神経学的スコアは、観察的行動評価は、Marshall(1996) の神経学的スコアを改良し、

独自の神経学的スコアで測定した。脳梗塞作製後にマーモセットの行動を観察し、以下の4つの異常徴候があるかどうかを確認した。手足がスノコから滑り落ちる、手が止まり木からぶら下がったままになる、腕が屈曲肢位で異常な姿勢をする、腕と手が連動しない振りをする。各徴候に1点ずつ加算、合計4点として、脳梗塞発症後28日間、観察によって測定した。

全個体ともMRI拡散強調画像およびT2強調画像で脳梗塞像を確認できた。MarmoDetectorのデータでは、いずれの指標も脳梗塞発症直後から数週間かけて徐々に改善した。行動軌跡は術後2日目まで行動範囲が制限されていたが、術後3日目には拡大し始めた。神経学的スコアは脳梗塞発症直後が最も悪く、観察期間中(28日間)に発症前のレベルまで回復することはなかった。相関分析を行い、行動解析と神経学的スコアとの間に有意な相関を示した。

(3) 治療介入群と自然回復群の比較

治療介入群に光遺伝学用ウイルスベクターを注入し、脳梗塞モデル作製後から青色光刺激で脳梗塞周辺の神経細胞の活性化を図った。

治療介入群と自然回復群で脳梗塞後の機能障害を定量的に評価し、比較検証した。

治療介入個体にて運動機能回復が促進され、組織学的評価で神経賦活効果が確認された。

4. 研究成果

(1) これまでの脳梗塞モデルは生存率が低いことや個体差が大きいことが問題だった。光血栓法による脳梗塞作製法は標的領域に脳梗塞を確実に作製することが可能であり、かつ生存率も高いことが特徴である。また、長期に渡って麻痺が残存することを確認しており、行動評価や治療介入に適した脳梗塞モデルが確立された(Hirohata ほか 2022)。

(2) これまで脳梗塞モデルの行動実験は測定バイアスやデータのばらつきが課題とされてきたが、モニタリングシステムを用いて、脳梗塞モデルの回復過程を定量的に評価するシステムを構築した(Hirohata ほか 2022)。

(3) 定量的評価システムを用いて、霊長類脳梗塞モデルに対する治療介入群と自然回復群の比較試験を実施した。治療介入群と自然回復群に差がみられ、脳梗塞回復過程を再現性の高いデータが抽出でき、安定した介入の実行可能性が示された(廣畑ほか 2022)。

これらの成果から、これまで基礎的研究が困難とされた、脳梗塞に対するリハビリテーション及び物理療法、薬物療法の併用効果を検証するために必要な基盤技術が確立された。

<引用文献>

1. Kawahira K, Shimodozono M, Etoh S, Kamada K, Noma T, Tanaka N. Effects of intensive repetition of a new facilitation technique on motor functional recovery of the hemiplegic upper limb and hand. *Brain Inj.* 2010;24(10):1202-13
2. Shimodozono M, Noma T, Nomoto Y, Hisamatsu N, Kamada K, Miyata R, Matsumoto S, Ogata A, Etoh S, Basford JR, Kawahira K. Benefits of a repetitive facilitative exercise program for the upper paretic extremity after subacute stroke: a randomized controlled trial. *Neurorehabil Neural Repair.* 2013 May;27(4):296-305.
3. Matsumoto S, Shimodozono M, Noma T, Uema T, Horio S, Tomioka K, Sameshima JI, Yunoki N, Kawahira K. Outcomes of repetitive facilitation exercises in convalescent patients after stroke with impaired health status. *Brain Inj.* 2016;30(13-14):1722-1730.
4. Miura S, Miyata R, Matsumoto S, Higashi T, Wakisaka Y, Ago T, Kitazono T, Iihara K, Shimodozono M. Quality Management Program of Stroke Rehabilitation Using Adherence to Guidelines: A Nationwide Initiative in Japan. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2019 Sep;28(9):2434-2441.
5. Shimodozono M, Kawahira K, Ogata A, Etoh S, Tanaka N. Addition of an anabolic steroid to strength training promotes muscle strength in the nonparetic lower limb of poststroke hemiplegia patients. *Int J Neurosci.* 2010 Sep;120(9):617-24
6. Hokazono A, Etoh S, Jonoshita Y, Kawahira K, Shimodozono M. Combination therapy with repetitive facilitative exercise program and botulinum toxin type A to improve motor function for the upper-limb spastic paresis in chronic stroke: A randomized controlled trial. *J Hand Ther.* 2022 Oct-Dec;35(4):507-515.
7. Shimodozono M, Noma T, Matsumoto S, Miyata R, Etoh S, Kawahira K. Repetitive facilitative exercise under continuous electrical stimulation for severe arm impairment after sub-acute stroke: a randomized

controlled pilot study. *Brain Inj.* 2014;28(2):203-10.

8. Noma T, Matsumoto S, Shimodozono M, Etoh S, Kawahira K. Anti-spastic effects of the direct application of vibratory stimuli to the spastic muscles of hemiplegic limbs in post-stroke patients: a proof-of-principle study. *J Rehabil Med.* 2012 Apr;44(4):325-30.
9. Miyara K, Matsumoto S, Uema T, Noma T, Ikeda K, Ohwatashi A, Kiyama R, Shimodozono M. Effect of whole body vibration on spasticity in hemiplegic legs of patients with stroke. *Top Stroke Rehabil.* 2018 Mar;25(2):90-95.
10. Etoh S, Noma T, Ikeda K, Jonoshita Y, Ogata A, Matsumoto S, Shimodozono M, Kawahira K. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on repetitive facilitation exercises of the hemiplegic hand in chronic stroke patients. *J Rehabil Med.* 2013 Sep;45(9):843-7.
11. Etoh S, Noma T, Takiyoshi Y, Arima M, Ohama R, Yokoyama K, Hokazono A, Amano Y, Shimodozono M, Kawahira K. Effects of repetitive facilitative exercise with neuromuscular electrical stimulation, vibratory stimulation and repetitive transcranial magnetic stimulation of the hemiplegic hand in chronic stroke patients. *Int J Neurosci.* 2016 Nov;126(11):1007-12.
12. Etoh S, Kawamura K, Tomonaga K, Miura S, Harada S, Noma T, Kikuno S, Ueno M, Miyata R, Shimodozono M. Effects of concomitant neuromuscular electrical stimulation during repetitive transcranial magnetic stimulation before repetitive facilitation exercise on the hemiparetic hand. *NeuroRehabilitation.* 2019;45(3):323-329.
13. Amano Y, Noma T, Etoh S, Miyata R, Kawamura K, Shimodozono M. Reaching exercise for chronic paretic upper extremity after stroke using a novel rehabilitation robot with arm-weight support and concomitant electrical stimulation and vibration: before-and-after feasibility trial. *Biomed Eng Online.* 2020 May 6;19(1):28.
14. Ikeda S, Harada K (equally contribution), Ohwatashi A, Kamikawa Y, Yoshida A, Kawahira K. A new non-human primate model of photochemically induced cerebral infarction. *PLoS One.* 2013;8(3):e60037.
15. Hirohata T, Kitano T, Saeki C, Baba K, Yoshida F, Kurihara T, Harada K, Saito S, Mochizuki H, Shimodozono M. Quantitative behavioral evaluation of a non-human primate stroke model using a new monitoring system. *Front Neurosci.* 2022 Sep 1;16:964928.
16. 廣畑俊和、北野貴也、原田雄大、上野真、吉田輝、馬場孝輔、下堂園恵、非ヒト霊長類脳梗塞モデルに対する光操作法を用いた脳梗塞後運動機能回復促進、第59回日本リハビリテーション医学会学術集会、2022。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 1件）

1. 著者名 Hirohata Toshikazu, Kitano Takaya, Saeki Chizu, Baba Kousuke, Yoshida Fumiaki, Kurihara Takashi, Harada Katsuhiro, Saito Shigeyoshi, Mochizuki Hideki, Shimodozono Megumi	4. 巻 16
2. 論文標題 Quantitative behavioral evaluation of a non-human primate stroke model using a new monitoring system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 964928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.964928	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 河村健太郎, 衛藤誠二, 下堂園恵	4. 巻 57
2. 論文標題 リハビリテーション医学研究のこれから 促通反復療法研究とその周辺	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine	6. 最初と最後の頁 13 - 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2490/jarmc.57.1087	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 4件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下堂園 恵
2. 発表標題 脳卒中の新たなリハビリテーション治療
3. 学会等名 第57回日本リハビリテーション医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下堂園 恵
2. 発表標題 脳卒中片麻痺に対する促通反復療法とロボットリハビリテーション
3. 学会等名 第57回日本リハビリテーション医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下堂 園 恵
2. 発表標題 促通反復療法とロボットリハビリテーション
3. 学会等名 第46回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下堂 園 恵
2. 発表標題 脳卒中片麻痺に対する促通反復療法とその併用治療の展開
3. 学会等名 第58回日本リハビリテーション医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣畑俊和、北野貴也、原田雄大、上野真、吉田輝、馬場孝輔、下堂園恵
2. 発表標題 非ヒト霊長類脳梗塞モデルに対する光操作法を用いた脳梗塞後運動機能回復促進
3. 学会等名 第59回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下堂 園 恵
2. 発表標題 脳卒中片麻痺に対するリハビリテーション治療 - 促通反復療法を基盤とした併用治療の新展開
3. 学会等名 第59回日本リハビリテーション医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究分担者	栗原 崇 (Kurihara Takashi) (60282745)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	原田 雄大 (Harada Katsuhiro) (30755228)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	吉田 輝 (Yoshida Akira) (40347109)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師 (17701)	
研究分担者	大渡 昭彦 (Ohwatashi Akihiko) (30295282)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	吉野 紀美香 (Yoshino Kimika) (80594902)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------