

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11295

研究課題名(和文)脳梗塞モデルラットへのリハビリが白質に及ぼす影響と三次元動作分析による運動評価

研究課題名(英文)Effect of rehabilitation on the white matter and evaluation of motor function using 3D motor analysis in the rat model of cerebral infarction.

研究代表者

熊田 竜郎 (Kumada, Tatsuro)

常葉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00402339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：実験的脳梗塞モデル動物(齧歯類)を用いて神経学的なリハビリの効果を解明するためには、運動機能と脳内の構造変化の明確な関係性を調べる必要がある。本研究では、脳の一部に脳梗塞を持つ実験的モデル動物(齧歯類)の歩行動作を三次元動作分析により運動評価を行い、障害側に特異的な運動機能の異常を見出した。一方、Nano-Suit法を用いた光-電子顕微鏡法解析により脳内の白質内にある髄鞘構造の違いがある予備的な結果が得られた。運動機能の異常と構造変化の時系列に伴う相関性について調査している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞は発症後に後遺症を残し日常生活に支障をきたす代表的な疾患であり、機能改善を促すリハビリは必要不可欠であるがその機序について不明なことが多く、実験的動物モデルで調べている。高速三次元動作分析法の改善によりモデル動物の障害の回復度合いを、より詳細に捉えられるようになることで、本疾患ばかりでなくリハビリの効果を評価できるようになることへの応用でき、ミエリン鞘などの脳内における組織構造の違いとの関係性を明らかにする礎となる知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the effects of neurological rehabilitation using the rodent model of cerebral infarction, it is important to clarify the relationship between motor dysfunction and structural changes in the brain. In this study, we improved the system of three dimensional (3D) kinematic analysis with a high-speed digital camera for evaluation of rodent behavior. And, also we performed 3D kinematic analysis of the rat model of cerebral infarction that was induced by photochemical induced thrombosis (PIT). This analysis enabled us to detect certain motor dysfunction on the affected side. In addition, Nano-suit method which enables both high-resolution and macro-imaging of fixed specimens gave preliminary results showing differences in the structure of myelin within the white matter of the brain between sham- and PIT-operated rats.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：三次元動作分析 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞を含む脳血管障害は発症後に後遺症を残し日常生活に支障をきたす代表的な疾患であり、機能改善を促すリハビリは必要不可欠である。しかし、運動処方への介入法は臨床的知見に基づき定められる事が多く、その神経学的な機序については良く分かっていない。一方、脳の可塑性は生後ほとんど失われると長い間信じられてきたが、近年神経科学の進歩から成体の脳においても潜在的に残存し、脳疾患後にはその潜在能力を顕在化していく事の重要性が示唆されている (Hubener & Bonhoeffer, *Cell*, 2014)。それゆえ、従来のリハビリにおいても最近の神経科学的な知見を元に捉え直す事により、新たな治療法を生み出す可能性がある。

運動系に障害を持つような神経系の障害モデル動物において脳機能の障害と脳内の神経回路・神経素子のレベルで調べていくためには、脳内の局所における障害やそれに伴う回路の異常と、それに対応する動物の運動機能とその違いとの対応付けをしていくことが重要である。近年、遺伝学的な手法の発展により様々な局所的な神経回路に変化(異常)をもつモデル動物の確立が大きく進歩している。一方、モデル動物の動作の分析法については、未だに大きな後れを取っている状況である。我々はリハビリテーション領域の特色を生かし、三次元動作分析法を用いて動物の運動機能を運動学的に詳細な定量化できるシステムの確立を目指している。

我々は、神経発生や再生における神経活動の役割の解明とその応用を目指して研究を進めている(熊田, 吉川, *常葉大学保健医療学部紀要*, 2016, Wang, et al., *Cereb Cortex*, 2014, Kumada and Komuro, *PNAS*, 2004 など)。その経緯からリハビリは脳内に電気活動を惹起する刺激となることに着目し、独自に確立し運動皮質梗塞モデル動物を用いて運動機能の回復と神経系の再構築における運動負荷の役割について検証してきた(Morishita, et al, *Brain Behav*, 2020)。オリゴデンドロサイトの発生・分化が神経活動で制御されるという報告(Gibson et al, 2014, Fields, 2015)もあり、リハビリテーションとオリゴデンドロサイトによるミエリン鞘との関係性について着目してアプローチした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動皮質梗塞モデルラットを用いて、リハビリテーション介入時における運動障害の変化を捉えることができるように三次元動作分析を確立し、脳梗塞前後および運動処方を課した場合の脳の再構築過程において白質内のミエリン鞘の形態的变化と運動障害との関係性について調べることである。

3. 研究の方法

a. 光増感(Photchemically Induced Thrombosis: PIT)法による運動皮質梗塞モデルラットの作製

8週齢のSDラットを用いた。全ての実験はアメリカNIHの動物実験の使用法に基づく常葉大学動物実験委員会の承認を得て行った。ラットを3.5%イソフルランによる深麻酔下で、歯科用ドリルで硬膜を傷つけないように頭蓋骨を削り、ファイバー光源の先端部をセットした。光増感剤であるローズベンガル液を尾静脈より注入後、頭部より波長540nmの

緑色光を 10 分間照射することで 皮質内の血管に血管内皮細胞性の血栓形成を誘導し、脳梗塞モデルラットを作出した。

実験終了後、脳梗塞モデルラットは、深麻酔下で脳切片を作製し、生細胞を染める 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド (TTC) 染色法により脳梗塞巣を評価した。梗塞巣の位置が頭頂部に限局しない、あるいは梗塞巣ができなかった動物は除外した。

b. 脳梗塞モデルラットの運動評価：ビームウォークテスト

運動皮質梗塞ラットの運動機能は、PIT 術前および術後に毎週 1 回、ビームウォークテストを用いて評価した。ラットを地上 30 cm の高さの木製梁 (幅 2.4 cm、長さ 150 cm) の上を横断させ、その様子を動画撮像し、以下の評点(0~5)で運動評価を点数化した。(0 点: 横断できない, 1 点: スリップが 90%以上, 2 点: スリップが 70%以上 90%未満, 3 点: スリップが 50%以上 70%未満, 4 点: スリップが 20%以上 50%未満, 5 点: スリップが 20%未満)。動物ごとの個体差を考慮して、それぞれ 5 回実施し、その平均点を算出した。

c. 三次元動作分析による動画分析

ラットを 3.5% イソフルランによる深麻酔下で、徒手的に両側四肢の 7 つの関節部位(肩関節, 肘関節, 手根関節, 股関節, 膝関節, 足首関節, 踵関節)を見出し、異なる色調で識別可能なマーカーを接着した

トレッドミル装置の左右両面に 4 台のデジタルカメラ(Casio 社, Ex-100Pro)を設置し、各辺の長さを固定値にしたキャリブレーションボックスを撮像後、トレッドミル上を毎分 15.4 m の速度で歩行させたラットを 4 倍速 (120 fps)の撮像速度で同期撮像した。撮像した動画は、三次元動作分析ソフトウェア(キッセイコムテック社)に取り込み、動作分析を行った。

d. 高速三次元動作分析

ラットより俊敏に走る C57BL6 マウスを用いて高速三次元動作分析の有用性を調べた。ラットと同様に深麻酔下で、マーカーを取り付けた後、4 台のカメラシステムを用いて高速同期撮像 (16 倍速)した。

e. 中枢神経系のパラフィン切片の作製と免疫組織学的解析

ラットを 3.5% イソフルランによる深麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定を行い、脳を取り出した。固定された脳はブレインマトリックスを用いて特定領域ごとの中枢神経部位に分離し、パラフィン包埋した。マイクロスライサーにて 4 mm 厚の切片を作製した。

切片は脱パラフィン処理と抗原不活化を行った後、ミエリン鞘に特異的なタンパク質に対する一次抗体反応、続いて蛍光標識された二次抗体を用いて免疫染色を行った。

f. Nano-Suits 法による電子顕微鏡解析

ラットを 3.5% イソフルランによる深麻酔下で固定溶液(本法に適する固定溶液については条件検討した)で灌流固定を行い、脳を取り出した。脳はパラフィン包埋後 マイクロスライサーにて 4 mm 厚の切片を作製した。切片は白質を標識した後、切片の全体像を病理検査用バーチャルスライドスキャナ(浜松ホトニクス)で撮像後、ナノスーツ法による切片の処理を行い電子顕微鏡解析を行った。

4. 研究成果

1) 三次元動作分析による局在性脳梗塞モデルラットの運動評価：

光増感法で作製した局所性脳梗塞モデルラットの運動評価を行った。このモデルは神経学的な評価では評点 1 と軽微な運動障害しか示さないが、ビームウォーク法では障害側の下肢に運動障害を示した。このモデル動物に対して上述の通り片側 7 カ所の関節部位にマーカーを接着し三次元動作分析を行った。一歩行周期上のパラメーターについては、脳梗塞モデル (PIT) 群および対照 (sham) 群の間で有意な差が無かった。一方、一歩行周期当たりの経時的な関節部位の軌跡解析を調べたところ、遠位部の関節領域にて障害の反対側で有意差があることが分かった(図 1)。

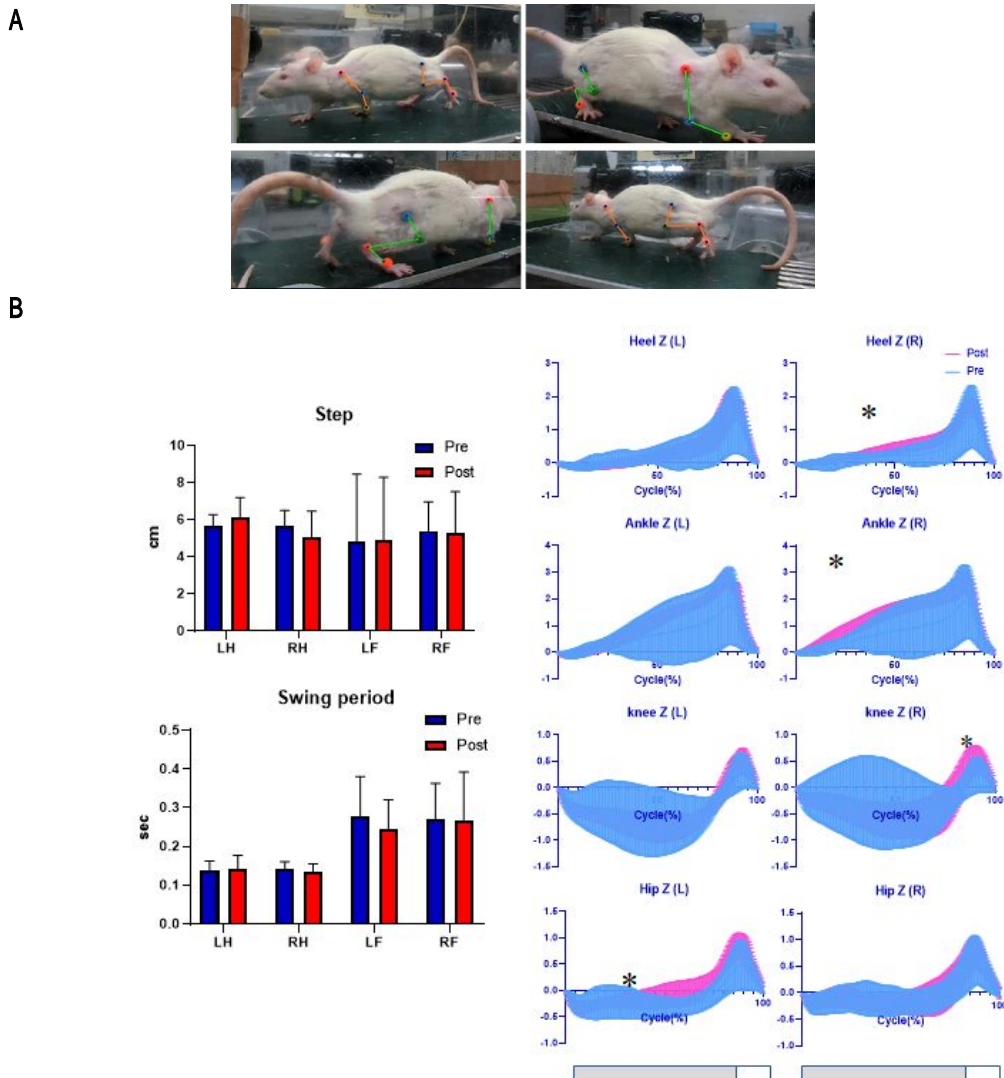


図 1. 脳梗塞ラットの三次元動作分析.

A : ラットの 7 つの関節部位に接着したカラーマーカーの動作を追跡して解析した.

B: (左上) 術前術後のラットの歩行周期解析 (左下) 各肢の遊脚期の違い

(右) 一歩行周期当たりのラット後肢の z 座標の経時的な変化

2) 高速三次元動作分析による実験的モデル動物の運動評価系の確立

脳梗塞をはじめとする神経系の障害モデル動物のリハビリテーションの効果を脳内で起こる神経回路レベルでの機序と結びつけて検証するために、実験的モデル動物の詳細な運動評価を運動学的に詳細な定量化できるシステムの確立を目指している。今回、より高速

化した(4~16倍速)撮像系のセットアップを用いてシステムの有用性の検討と齧歯類での運動評価について検討した。マウスを14.4 m/分のトレッドミル速度を走行させた場合の四肢の歩行周期は、 0.27 ± 0.04 (秒)であった。1フレーム当たり約0.02秒(16倍速)の撮像速度で撮像することにより、一歩行周期(%)を解析できる十分な時間解像度を持つことが分かった。この撮像系を使い、モデル動物のさらなる詳細な解析を行っている。

3) 局所性脳梗塞モデルラットの白質解析

我々は白質のミエリン鞘の詳細な変化を調べるため光-電子相関顕微鏡法を用いる方法を確立し、その手技の改善を行ってきた。実際に局所性脳梗塞モデルラットの薄切脳切片を作製して、白質領域の構造についてSham群と比較検討したところ、両者の微細構造に違いがある所見が認められた(図2)。さらにPIT群で観察された髄鞘構造の変化と脱髄疾患における所見との共通性と違いを調べるため、対照群として脱髄疾患モデル動物を作製して脳内の白質構造を電子顕微鏡にて撮像して比較検討をしている。

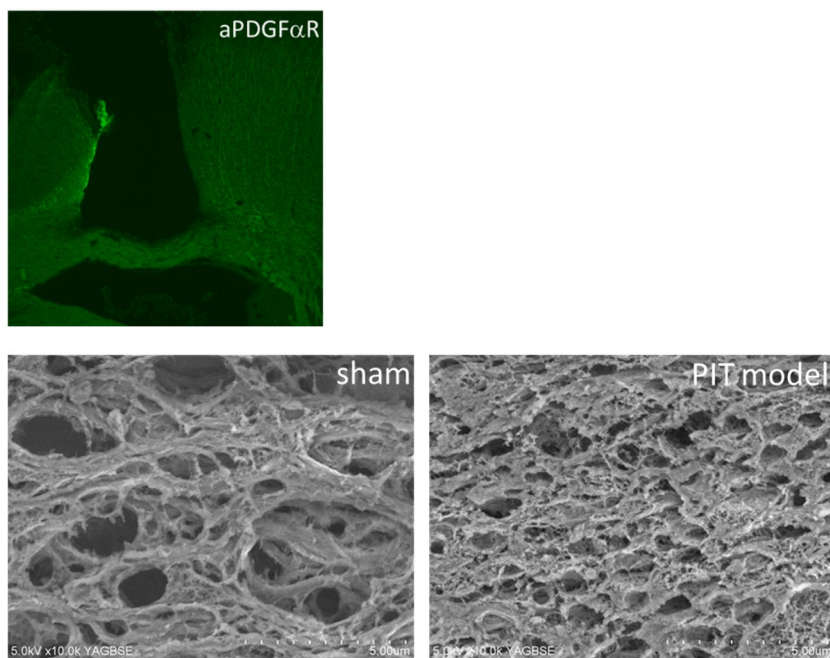


図2. 脳梗塞ラットの免疫組織学的解析(上図)と光-電子相関顕微鏡法による髄鞘構造の電子顕微鏡像(下図左: Sham, 下図右: 脳梗塞モデル)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Akira, Ohtaki Hirokazu, Miyamoto Kazuyuki, Kim SungHyek, Hase Kazunori, Yoshida Makoto, Kamijo Shotaro, Kamimura Sawa, Koiwa Nobuyoshi, Izumizaki Masahiko	4. 巻 1798
2. 論文標題 Mild-intensity running exercise recovered motor function by improvement of ankle mobility after unilateral brain injury of mice using three-dimensional kinematic analysis techniques	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148160 ~ 148160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2022.148160	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊田竜郎, 吉川輝, 森下紗帆, 外村和也, 梅村和夫
2. 発表標題 三次元動作分析による局所性脳梗塞ラットの行動評価
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊田竜郎, 森下紗帆
2. 発表標題 三次元動作分析による脱髄疾患モデルマウスの行動評価
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Kumada T and Fukuda A	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 21
3. 書名 Multimodal GABAA receptor functions in the development of the central nervous system. "Synapse Development and Maturation" In: Comprehensive Developmental Neuroscience, (Rubenstein, J., Rakic, P., eds),	

1. 著者名 Komuro Y, Fahrion JF, Foote KD, Fenner KB, Kumada T, Ohno N and Komuro H	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 33
3. 書名 Granule Cell Migration and Differentiation, In: Manto M., Gruol D., Schmähmann J., Koibuchi N., Sillitoe R. (eds) Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders	

〔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	森下 紗帆 (Morishita Saho) (30614010)	常葉大学・健康プロデュース学部・助教 (33801)	
研究分担者	梅村 和夫 (Umemura Kazuo) (40232912)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	吉川 輝 (Yoshikawa Akira) (90737355)	昭和大学・医学部・助教 (32622)	

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
---------	---------