

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500631

研究課題名(和文)多発性脳梗塞後のリハビリテーションがアミロイドの沈着に与える効果

研究課題名(英文)The effect of rehabilitation on accumulation of Amyloid beta after onset of cerebral micro infarction.

研究代表者

氷見 直之(Himi, Naoyuki)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：70412161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性脳梗塞モデル動物(ラット)を実際に作製し、染色にて梗塞部位が確認された。さらに2回目の梗塞発症を誘発すべく、マイクロポンプやカテーテルによるマイクロスフェアの頻回投与、光感受性色素を用いた梗塞作製を試みたがいずれも十分な梗塞の頻発を誘発できず、時間的な影響は断念し、単回のマイクロスフェア投与による空間的な影響のみ観察した。その結果、脳組織にアミロイドの蓄積は観察されなかったが、リハビリテーションによる認知機能の回復は観察された。老齢ラットにおいてもアミロイドは確認されなかったため、アミロイドの蓄積には頻回の梗塞発症が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The effects of exercise on spatial memory function recovery and accumulation of amyloid beta were tested using in a rat model of brain embolism. Intra-arterial microspheres (MS) injection induced multiple emboli in the rat brain and small multiple stroke were observed in the brain. Treadmill exercise was started after MS injection. The non-exercise (NE) and sham-operated groups were included as controls. Memory function was evaluated by the Morris water-maze (MWM) test and amyloid beta level was detected by histological method. Unfortunately, repeated MS injection was difficult and repeated onset of stroke was occurred in no rat. After single onset of stroke, amyloid beta was not detected in every young and old stroke rats. However, memory function was recovered in exercise group. It was estimated that single onset of multiple stroke might provide less effect on accumulation of amyloid beta.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学

キーワード：リハビリテーション 脳梗塞 アミロイド

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー症の主要原因であるアミロイドβの脳への蓄積は、脳虚血により増幅されるという知見が複数報告されている¹⁾。脳虚血は、微小な脳梗塞が確認される軽度なものから、脳の広範囲の欠損に到る重度なものまで症状は広範に及ぶ。中でも、軽度な脳梗塞を高頻度で発症する多発性脳梗塞は、比較的反リハビリテーションによる回復も見込め、重症化しにくい。しかし、軽度な梗塞が頻発することにより、個々の梗塞部位で微量なアミロイドβ蓄積が発生し、脳全体におけるアミロイドβの蓄積速度は梗塞の発生頻度とともに加速され、アルツハイマー症の早期発症につながることも危惧される。ところが、脳虚血とアミロイドβ蓄積の関係を示唆した報告のほとんどは、重度な脳虚血を発症させる動物モデルによる実験結果を元に考察されており、軽度な脳梗塞が広範囲に頻発することによる時間的および空間的な加算効果の影響については言及していない。

一方、軽度な脳梗塞は全身症状も軽く、全身運動のようなリハビリテーションが行いやすい。全身運動により脳の神経細胞が保護され、成長するという報告もあり、リハビリテーションとして行う軽度な運動が微小な脳梗塞の改善、さらにはアミロイドβ蓄積の抑制につながることを考えられる。しかし実際に運動によりアミロイドβの蓄積が抑制されたという報告は少なく、多発性脳梗塞において時間経過を追跡した報告は皆無である。

さらには、適度な運動がアルツハイマー症の予防になることは動物実験による知見とともに広く知られているが、脳梗塞によりアミロイドβ蓄積が促進された状態で、運動負荷がなおアルツハイマー症への進展を予防することを示した報告はない。脳梗塞の頻発によるアミロイドβ蓄積の増加が運動負荷により抑制されることが示されて、脳梗塞後のリハビリテーションの新たな意義付けのための基礎実験が期待されている。

参照：1) Honigら Arch. Neurol. 60, 2003

2. 研究の目的

脳梗塞やアミロイドβ発現および蓄積に関して動物実験により得られた知見は多数報告されているが、軽度な脳梗塞を繰り返し発生させて脳機能の変化を追跡した例はほとんどない。さらに、アミロイドβ量の変化を脳梗塞の発症頻度に関連付けた報告はなく、当研究は多発性脳梗塞によるアルツハイマー症進展への関与の有無を示唆する唯一の知見となり得る。

我々は、従来より脳梗塞後の運動療法の意義に関する研究に用いてきた、マイクロスフェア塞栓による多発性脳梗塞モデル動物を用いてアミロイドβ蓄積量の経時変化を追跡し、多発性脳梗塞によるアルツハイマー症進行の可能性を検証する。また、脳梗塞後の

継続的なリハビリテーション(全身運動)が、脳梗塞により低下した認知機能を回復させることを示した多くの報告例に基づき、多発性脳梗塞モデル動物に運動負荷を与えることによる認知機能の回復およびアミロイドβ増加速度の低下を期待し、これについても検証を行う。

最終的な到達目標として、継続的な運動負荷を与えた多発性脳梗塞モデル動物の脳、特に海馬領域における過酸化脂質などの酸化ストレス関連物質、脳由来神経栄養因子(BDNF)、アミロイドβ前駆タンパク(APP)、γセクレターゼ(BACE1)などのアミロイドβ沈着関連タンパク類発現量の経時変化および梗塞発症回数との相関を非運動群および非梗塞群と比較し、梗塞の頻発による各因子およびタンパクの発現量の変化を確認する。これにより、運動負荷 - 各因子およびタンパクの変化 - アミロイドβ量変化の各因果関係を明確化し、これを基にリハビリテーションの専門家と十分な議論を行い運動負荷の効果を提唱することを目的とする。

さらに日本では多発性脳梗塞の患者数が脳梗塞患者の35%を占めるほど多いにも関わらず、症状が比較的軽度な場合が多いため、アルツハイマー症への進行が加速している可能性など、水面下における変化についてほとんど議論されていない。当研究により、多発性脳梗塞によるアルツハイマー症への進展のリスクおよび運動によるそのリスクの軽減の可能性について提唱したい。

3. 研究の方法

< 概要 >

多発性脳梗塞モデル動物として、マイクロスフェア塞栓によりラットに梗塞を発症させる。マイクロスフェアを繰り返し投与し、梗塞発症回数に応じた脳組織を摘出し、梗塞部位およびアミロイドβ沈着部位を確認する。また、脳組織中の酸化ストレス関連物質およびアミロイドβ関連物質の発現に対する梗塞発症回数の影響を調べる。更に梗塞を繰り返し発症させながら運動負荷を与え、運動によるアミロイドβ沈着の進行度変化などの効果を検証する。

梗塞部位やアミロイドβ沈着部位の確認は組織染色法にて、認知機能の確認は水迷路試験にて行った。運動はトレッドミルにて負荷する。

< 詳細 >

9週齢のSDラットをsevoflurane麻酔下にて頸部切開し、右外頸動脈および右翼突口蓋動脈を閉止後、マイクロスフェア(Polyscience, 径45μm)を右内頸動脈より3000個注入し、その後閉止した血管の血流を再開させた。この手法にて、大脳の右半球に塞栓を多発させた。塞栓の箇所数や部位は、蛍光マイクロスフェアを注入したラット脳のスライスを蛍光顕微鏡下で観察して確認した。また、マイ

クロスフェア注入ラットの全身症状は、マイクロクロスフェア注入6時間後に体幹の屈曲、寡動および回旋歩行の有無の3項目を目視にて評価しスコア化した。

梗塞部位とアミロイドβ沈着部位の空間的關係およびアミロイドβ沈着領域の経時変化を確認するため、梗塞発症 14 日間後に 4%-Paraformaldehyde にて灌流固定を行い、脳を摘出して厚さ 16 μm の凍結切片を作製してアミロイドβを行った。染色はコンゴレッドまたは蛍光アミロイド試薬である 1-Bromo-2,5-bis(3-carboxy-4-hydroxystyryl)benzene, BSB を用いた。

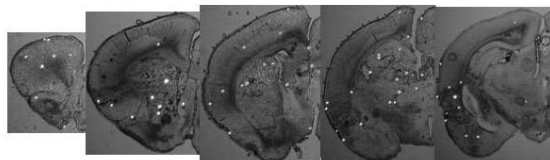
微小梗塞を繰り返し発症させる方法として、(1)マイクロクロスフェアの繰り返し注入、および(2)光ファイバー刺入と光感受性色素による方法を検討した。(1)は、頸部切開し総頸動脈に注入する前述の方法を繰り返す。(2)は、目的部位に先端が到達するように径 100 μm の光ファイバーを脳表より刺入しておき、尾静脈より光感受性色素であるローズベンガル溶液を 20mg/kg 注入後、ファイバー先端より 532nm のレーザー光を 1 分間照射した。梗塞部位は、凍結切片のヘマトキシリン-エオシン(HE)染色像にて確認した。

梗塞発症後に行うリハビリテーションとして軽度なトレッドミル運動を課した。マイクロクロスフェア注入翌日より運動を開始した早期運動群と、8日後より開始した遅延運動群に分けて評価した。運動強度は、有酸素運動の領域である 15m/min にて 1 日 30 分の走行を 7 日間続けた。

認知機能の一つとして空間記憶能をモリス水迷路試験により測定した。径 1500mm、深さ 300mm の円形のプールに墨汁にて着色した水を張って、水面下 15mm に径 150mm の透明な逃避台(ゴール)を設置した。任意の縁からラットを自由遊泳させ、ゴールに到達するまでの時間を日に 3 回測定し、これを 4 日間続けゴールの空間的な位置を記憶させた。5 日目に逃避台を外し、30 秒間の自由遊泳中、逃避台のあった 1/4 区画に滞在した時間の割合を測定し、空間記憶の指標として各群間で比較した。

4. 研究成果

マイクロクロスフェアの注入 6 時間後の全身症状のスコアは平均 4.2 であった(0 が症状なし、9 が最も重篤)が、24 時間後にはトレッドミル走行が可能なまでに回復していた。蛍光マイクロクロスフェア注入画像にてマイクロクロスフェアによる塞栓発生箇所が注入側の大脳皮質、海馬および線条体に広く分布している様子が確認された(図 1)。また単回のマイクロクロスフェア注入 2 週後に水迷路試験を行った結果、認知機能(空間記憶能)は低下していた(図 2 非運動群)。しかし水迷路試験実施後に摘出した脳の切片ではアミロイドβ染色像は確認されなかった。



吻側 ← 2mm毎、200μm厚 → 尾側

図 1 : マイクロスフェア塞栓の一例
白く見える輝点がマイクロクロスフェア塞栓

さらに 2 回目の投与を実施すべく、まずはマイクロクロスフェアを含有した生理食塩水を充填したマイクロポンプの埋め込みを考えたが、マイクロクロスフェア粒子が非常に沈殿しやすい性質があり、長期間ポンプのリザーバタンクに懸濁状態を保ったまま貯めておくことが難しいという問題に直面した。これを回避するために、毎回注入部位を露出させて投与を行う方法を試みたが、生体組織や新生血管が発達してしまい、出血リスクの大きい手術となることが危惧され断念した。そこで微小カテーテルを留置しておき、皮下の注入口からマイクロクロスフェア懸濁液を注入する方法を試行したが、可動範囲の広い頸部にカテーテルを挿入しているため日常動作によりカテーテルが容易に外れ、出血死に至る可能性が極めて高く、この方法についても安定したモデルを得ることが困難と考え断念した。微小梗塞を頻発させる手法としてマイクロクロスフェア法に替わり、光感受性色素を用いた微小脳梗塞作製を試みた。ラットの大脳皮質表面の頭蓋骨を穿孔しておき、尾静脈よりローズベンガルを注入後、頭蓋骨穿孔部より波長 532nm の光を照射して照射部位に脳梗塞を作製した。3 日後に脳を摘出し、凍結切片標本作製し HE 染色にて梗塞部位を観察した結果、梗塞部位が大脳皮質の光照射部位を中心とした広範囲に及んでしまい、当研究の狙いである微小梗塞の作製に至らなかった。そこでより小規模な梗塞を発症させるために単一の光ファイバーを経由して光を照射した。光路が細くなることにより光エネルギーが小さくなることを避けるため、LASER 光を光源として用いた。その結果、マイクロクロスフェア法で得られるようなサイズの微小梗塞が作製できた。しかしながら光照射法では大脳皮質表面にしか梗塞を作製できない欠点がある。脳表のみの梗塞では脳梗塞頻発を狙ったモデルおよび認知記憶に關与する海馬に梗塞を生じたモデルとしては不十分であると考え、脳深部や海馬、線条体にも梗塞を作製させるべく、光ファイバーを皮質表面より刺入し、ファイバー先端が到達した領域に梗塞を起こさせる方法を試みた。ファイバーを刺入することによる機械的ダメージはあるが、ファイバーの刺入のみを行った sham 群と比較して光照射を行った群では明らかに海馬や線条体に微小梗塞巣が見られた。しかし光ファイバーの海馬領域への刺入による出血が光ファイバー先端を覆いレ-

レーザー光の照射を阻害し、安定した梗塞巣が形成されない問題も同時に生じた。微小梗塞が見られた場合においても、複数回の光ファイバー刺入による出血、脳組織の機械的な損傷が、光照射による微小梗塞の部位を面積的に上回り、非梗塞群と梗塞群の比較が困難なものとなった。そこで微小梗塞を時間的に頻発させるモデル作製が難しいため、空間的に頻発させるモデルで検討する考え方に切り替え、当初に検討していたマイクロスフェア注入法に戻した。マイクロスフェアの総頸動脈からの注入を反復して行うことが困難であるために断念した経緯があったが、単回のマイクロスフェア注入で空間的に広範囲に塞栓を発生させることが可能であったためである。またマイクロスフェア注入の利点は、注入回数の変更により、症状の重篤度をコントロールできる点にある。本研究における注入回数は、運動機能には影響がなく、かつ認知機能(空間認知能)のみが障害される3,000個に設定した。マイクロスフェア注入後のBSB染色にてアミロイドβが染色されなかった要因の一つとして、若年ラットを使用していることが考えられた。そこで、加齢のリスクファクターが加わることでアミロイドβがより蓄積しやすいと思われる18月齢の老齢ラットを5頭入手し、同様の検討を行った。老齢ラットにおいてもマイクロスフェア注入により空間認知能が低下したが、脳スライス標本の染色ではアミロイドβ像は確認されなかった。

一方、トレッドミル運動の効果については、早期運動群において空間記憶能が回復した。しかし遅延運動群では回復が見られなかったことから、運動は微小脳梗塞発症後の早期に行うことがリハビリテーション効果として有効であることが示唆された(図2)。この結果とアミロイドβの蓄積については現時点では関連付けはできないが、早期リハビリテーションが、アミロイドβによる認知機能悪化に対して間接的に影響しうる可能性があると考えられる。

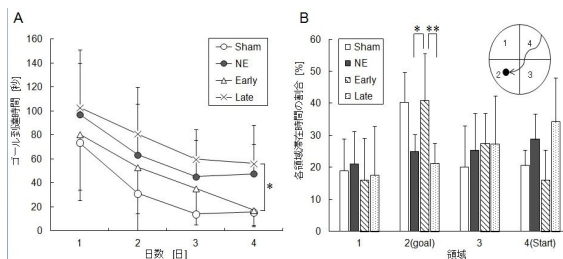


図2：運動が空間記憶能に与える効果

A：水面下に隠された逃避台（ゴール）に到達するまでの時間 B：逃避台除去後、ゴールがあった領域に滞在した時間の割合（4領域あるので、ランダムに滞在すると25%、記憶していれば割合は高くなる）sham：擬手術群（マイクロスフェアなし）、NE：非運動群、Early：早期運動群、Late：遅延運動群

微小梗塞の頻発がアミロイドβの蓄積を加速させる、という本研究の仮説において、同時に複数箇所微小梗塞が発生する形の「空間的な頻発」の影響は確認されなかった。しかし本来「時間的な頻発」の影響を検証することが当初の目的であったため、梗塞発症後に十分な期間を置くなどの方法で、研究助成期間終了後も検討を続行し、早急に社会に研究結果を配信したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 2件)

The effects of increase of BDNF in hippocampus on recovery of cognitive function in cerebral infarction model rats. Himi N. 他 第90回日本生理学会(東京)2013

The exercise at early stage after stroke enhanced the recovery of memory function via BDNF elevation in the hippocampus in stroke model rats. Himi N. et al. Society for Neuroscience (San Diego, USA) 2013

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/physiology>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氷見 直之 (HIMI, Naoyuki)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：70412161

(2) 研究分担者

宮本 修 (MIYAMOTO, Osamu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00253287

岡部 直彦 (OKABE, Naohiko)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30614276

(3) 連携研究者

古我 知成 (KOGA, Tomoshige)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：50186649

国安 勝司 (KUNIYASU, Katsushi)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・教授

研究者番号：10299258