

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700572

研究課題名(和文)脳梗塞後の神経回路再構成における分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)The molecular mechanism of neural network reorganization after stroke

研究代表者

岡部 直彦 (Okabe, Naohiko)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30614276

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)：脳梗塞後の機能回復には神経ネットワークの再構成により障害を受けなかった脳領域が障害を受けた脳領域の機能を代償することが重要であると考えられているが、そのメカニズムはよく分かっていない。本研究ではラット一次運動野前肢領域の脳梗塞後にリハビリテーションを行うと機能の回復と同時に二次運動野前肢領域の拡大がおこることを明らかにした。また、二次運動野前肢領域から脊髄へと投射する軸索の伸展はリハビリテーションを行ったラットで促進される傾向が見られており、このことが運動野が変化する原因の一因となっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：It has been well known that the neural network is reorganized after cerebral infarct to compensate the lost function. However, the mechanism underlying the neural network reorganization is not known. In previous study, we found that the rehabilitation therapy causes the secondary motor cortex forelimb area expansion after cerebral infarct in primary motor cortex forelimb area in rat. Anatomical analysis revealed that the rehabilitation therapy enhanced axon growth in spinal cord, suggesting rehabilitation therapy induces motor map reorganization by promoting axon remodeling in spinal cord.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は先進国において主な死因の一つであり、要介護の原因となる最も頻度の高い疾患である。脳梗塞の治療法としては現在、tPA による血栓溶解療法が広く行われているが、治療可能な時間が短いため、治療の対象となる患者は全体の 1 割程度に過ぎず、多くの場合で後遺症が残ることになる。脳梗塞の慢性期の治療としてはリハビリテーションが主な治療法であり、後遺症の回復に有効であるが、効果が限定的であることも多く、より効果の高いリハビリテーション治療法が望まれている。治療法の開発にはその治療法の解剖・生理・分子的な理解が不可欠であるが、リハビリテーションの理論は現在でも "use dependent" と "task specific" という古くから知られた概念に限られており、分子的な理解についてはほとんど研究が行われていないというのが現状である。

脳梗塞後の回復メカニズムとしては障害を受けた部位の機能を、障害を受けなかった部位が代償することが重要であり、この時に神経回路の再構成が行われると考えられている。この神経回路の再構成は運動野の場合では運動野リマッピングとして知られており、例えば運動野の手の領域を破壊した後に手のリハビリテーションを行うと、足やヒゲなどの障害前は手でなかった領域が手の領域に置き換わるという現象が見られることがわかっている。

2. 研究の目的

本研究では前述した運動野リマッピングの分子メカニズムを解明することにより、リハビリテーションによる神経回路再構成のメカニズムを明らかにすることを最終的な目的とした。そして、この目的を達成するために以下の課題を達成することを当初の目的とした。

- (1) リハビリテーションによる神経回路再構成を観察するのに最適な実験システムの確立
- (2) リハビリテーションによる運動野再構成への時間空間的影響の評価
- (3) リハビリテーションによる運動野再構成の組織・生化学的作用機序の解明

3. 研究の方法

- (1) 動物実験 (機能評価・脳梗塞モデル・運動野マップの作成)
実験は 8 週齢の F344 ラットを使用した。ラットの四肢運動機能の評価としてはラットに片手でペレットをつかみ食べさせる skilled forelimb reach test (リーチテスト) を用いた。脳梗塞モデルはローズベンガルを用いた光塞栓法 (Photothrombosis, PT) を用い、大脳皮質運動野の尾側前肢領域 (Caudal Forelimb Area, CFA) を破壊した。運動野の評価としては運動野に直接電極を

刺入し、電気刺激を行う intracortical microstimulation (ICMS) により前肢領域の大きさを評価した。

ラットは Sham 群, Sham + Rehab 群, PT 群, PT + Rehab 群の 4 群に分けられ、リーチテストを 1 日 50 試行、1 週間に 5 日行うトレーニングを 4 週間行った後に脳梗塞を作成した。また、Sham + Rehab 群および PT + Rehab 群では脳梗塞作成後も脳梗塞作成前のトレーニングを行うことでリハビリテーションを行い、4 週間のリハビリテーション終了後に ICMS を行い運動野の変化を観察した。ICMS 後ラットを灌流固定し、組織学的解析を行い、梗塞体積を測定した。

- (2) 運動野マップの経時的観察
PT 群および PT + Rehab 群の ICMS をリーチテストのトレーニング終了時、梗塞作成 1, 4, 10, 18 日後に行うことによりリハビリテーションによる運動野再構成への時間空間的影響を評価した。また、ICMS 後に組織学的解析を行い、梗塞体積の経時変化も観察した。
- (3) ウエスタンブロットによる大脳皮質運動野の吻側前肢領域 (Rostral Forelimb Area, RFA) でのシナプス関連タンパクの発現解析
4 週間のリハビリテーション終了後にラットの RFA 領域の組織を採材し、RIPA バッファー、SDS で処理した後にウエスタンブロットを行った。抗体はシナプス新生のマーカである Synaptophysin, GluR2, GABAR 1、コントロールとして -Actin を用いた。
- (4) 逆行性トレーサーを用いた RFA 領域への神経投射回路の解析
4 週間のリハビリテーション終了後に逆行性トレーサーであるフルオロゴールド (FG) を RFA 領域に注入し、1 週間後に灌流固定し、RFA 領域に軸索を投射する細胞の数を計測した。計測は解析ソフト ImageXpress と ImageJ を併用して行い、脳の 30 の領域に存在する FG 陽性細胞数をそれぞれ調べた。
- (5) 順行性トレーサーを用いた RFA 領域から脊髄への神経投射回路の解析
4 週間のリハビリテーション終了後に順行性トレーサーであるビオチン化デキストランアミン (BDA) を RFA 領域に注入し、2 週間後に灌流固定し、RFA 領域の神経細胞からの軸索が脊髄の前肢支配領域にどのように存在するかを調べた。BDA 陽性軸索は DAB 法により可視化し、Photoshop を用いて、手動でトレースした後、ImageJ で定量化した。

4. 研究成果

我々の実験システムでは大脳皮質運動野のうち一次運動野に相当すると考えられているCFA領域に脳梗塞を作成しリハビリテーションを行ったが、リーチテストにおいてPT + Rehab 群ではPT 群と比べ有意な回復傾向を示した(図1)。また、ICMSによる運動野マップの解析ではPT + Rehab 群ではPT 群と比べ、二次運動野に相当するRFA領域が有意に拡大するという傾向が見られた(図2)。

この運動野マップの変化を経時的に観察すると、RFA領域の大きさは梗塞直後に一時的に縮小し、その後時間の経過とともに徐々に大きくなっていくことが分かった。この変化はPT 群、PT + Rehab 群両方に見られており、PT + Rehab 群ではこの回復期の傾きが大きくなるということが分かった(図3)。また、別の実験においてCFA領域にGABA受容体作動薬であるムシモルを注入し、CFA領域の神経細胞の活動を阻害した場合でも、同様にRFAの大きさが縮小したことから、梗塞直後にはCFAからの入力なくなることによる機能不全(Diaschisis)が起こっているものと考えられ、さらにその後の回復にはリハビリテーション依存的な回復機構と、リハビリテーション非依存的な回復機構が同時に働いていることが考えられた。しかし、梗塞体積にはPT 群、PT + Rehab 群間で差は見られておらず(図4)、リハビリテーションの作用機序は神経細胞の保護効果ではないと思われた。

リハビリテーションがどのようなメカニズムで運動野マップの再構成を行うのかを検討するために、リハビリテーションにより運動野マップに変化が生じるRFA領域におけるシナプス関連タンパクの発現量、RFAに投射する神経細胞数、RFAから脊髄へ投射する軸索量を調べたが、シナプス関連タンパクの発現量と、RFAに投射する神経細胞数ではPT 群とPT + Rehab 群の間には有意な差は見られなかった(図5, 6)。しかし、脊髄の前肢支配領域における軸索量ではPT + Rehab 群ではPT 群とくらべて有意な増加がみられ、リハビリテーションが皮質脊髄路の軸索の成長を促進していると考えられた(図7)。また、PT + Rehab 群では錐体路が通る脊髄後索での軸索数も増加する傾向があり、リハビリテーションにより脊髄後索と脊髄灰白質の両方での軸索の伸長が促進されていることが考えられた。この現象は脊髄の前肢支配領域より頭側に存在する頸部支配領域に投射していた軸索が軸索を延長し、前肢支配領域に新たな神経回路を形成していることを示唆しており、それにより運動野マップの再構成が生じている可能性が考えられた(図8)。これらの結果は現在まで未知であったリハビリテーションの回復メカニズムを明らかにするものであり、今後さらに分子メカニズムなどが明らかになっていけば、より有効な

リハビリテーション法の開発につながることを期待される。

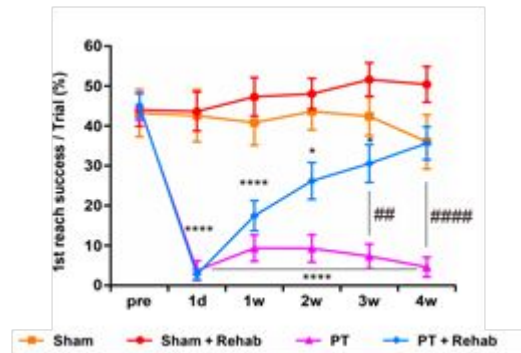


図1 脳梗塞後の前肢機能の回復におけるリハビリテーションの効果

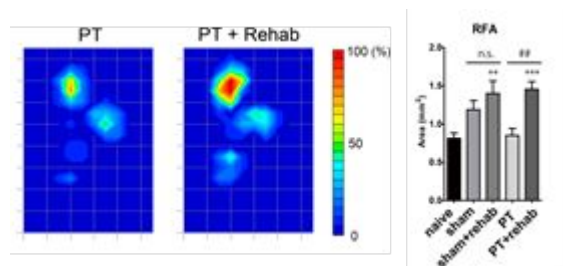


図2 脳梗塞後の運動野マップの変化とリハビリテーションによる影響

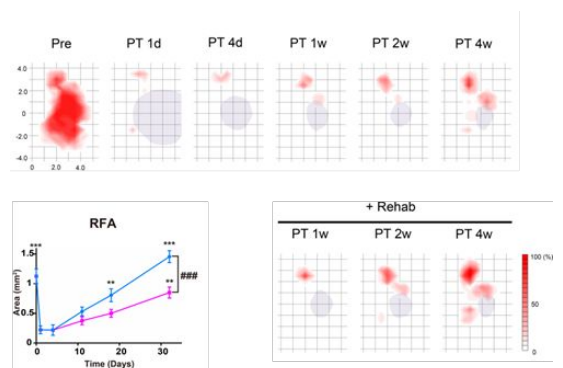


図3 脳梗塞後の運動野マップの経時的変化とリハビリテーションによる影響

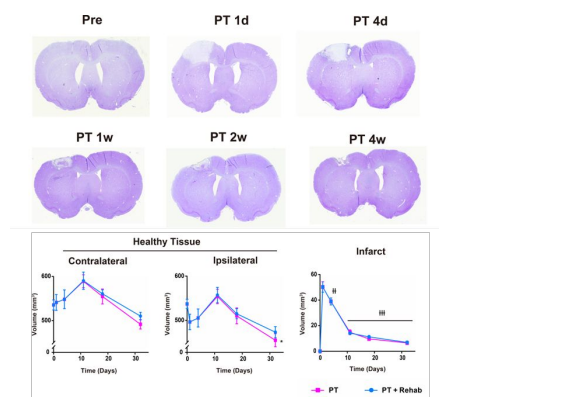


図4 脳梗塞後の梗塞体積の変化とリハビリテーションによる影響

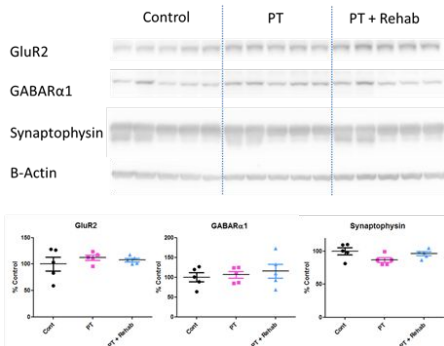


図5 シナプス関連タンパク発現に対するリハビリテーションの効果

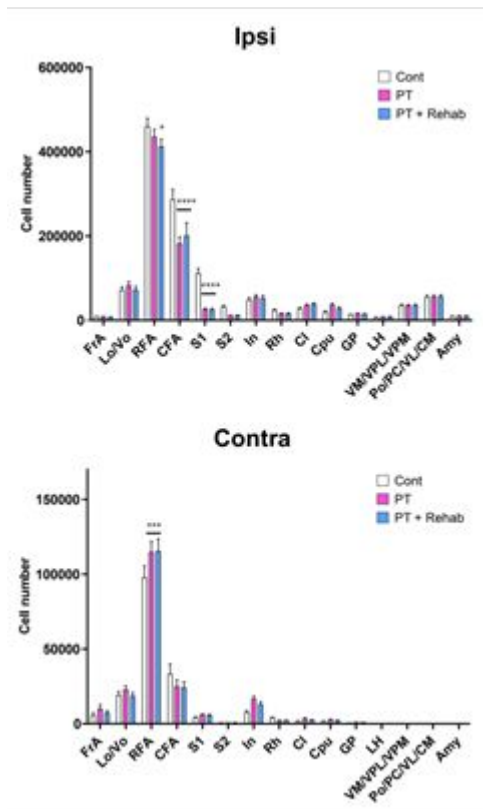


図6 RFA 領域への軸索投射神経細胞数に対するリハビリテーションの効果

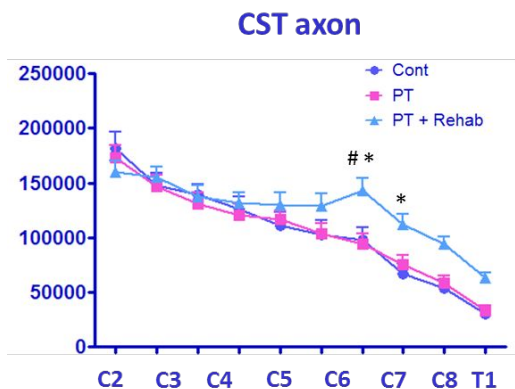


図7 RFA 領域から脊髄へ投射する軸索量に対するリハビリテーションの効果

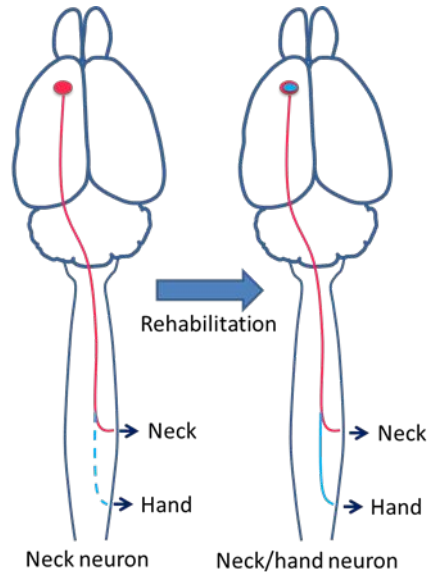


図8 リハビリテーションによる運動野再構成のメカニズム

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 2 件)

Lu F, Nakamura T, Toyoshima T, Liu Y, Shinomiya A, Hirooka K, Okabe N, Miyamoto O, Tamiya T, Keep RF, Itano T.

Neuroprotection of granulocyte colony-stimulating factor during the acute phase of transient forebrain ischemia in gerbils.

Brain Res. 2014 ;1548:49-55.

doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.010.

査読有

Okabe N, Nakamura E, Himi N, Narita K, Tsukamoto I, Maruyama T, Sakakibara N, Nakamura T, Itano T, Miyamoto O.

Delayed administration of the nucleic acid analog 2Cl-C.OXT-A attenuates brain damage and enhances functional recovery after ischemic stroke.

Brain Res. 2013 ;1506:115-31.

doi: 10.1016/j.brainres.2013.02.009.

査読有

[学会発表](計 14 件)

氷見直之, 高橋尚, 岡部直彦, 陸豊, 中村恵美, 城本高志, 成田和彦, 古我知成, 宮本修

脳塞栓発症後の早期運動による海馬 BDNF 濃度の変化と神経細胞保護に対する役割

第92回日本生理学会大会

2015/03/23

神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

岡部直彦, 城本高志, 陸豊, 丸山恵美, 氷見直之, 岩知道信久, 成田和彦, 宮本修

脳梗塞後における運動野マップ再構成の時空間的解析

第92回日本生理学会大会

2015/03/23

神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

岡部直彦、城本高志、陸豊、丸山恵美、氷見直之、岩知道信久、成田和彦、宮本修

脳梗塞後の運動野再構成に対するリハビリテーションの時空間的影響の検討

第26回日本脳循環代謝学会総会

2014/11/22

岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

氷見直之、高橋尚、岡部直彦、城本高志、陸豊、中村恵美、古我知成、宮本修

微小脳梗塞モデルラットにおけるリハビリテーションとしての運動による海馬 BDNF 濃度の経時変化

第69回日本体力医学会

2014/09/20

長崎大学文教キャンパス（長崎県・長崎市）

岡部直彦、城本高志、陸豊、中村一丸山恵美、氷見直之、成田和彦、岩知道信久、宮本修

脳梗塞後のリハビリテーションが運動野マップ再構成に与える時空間的影響

第37回日本神経科学大会

2014/09/13

パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

城本高志、岡部直彦、陸豊、中村一丸山恵美、氷見直之、成田和彦、木村和美、宮本修

脳梗塞後の神経新生と機能回復の関連について

第37回日本神経科学大会

2014/09/13

パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

陸豊、岡部直彦、氷見直之、中村一丸山恵美、城本高志、成田和彦、塚本郁子、丸山徳見、榊原紀和、宮本修

出血性脳障害後の細胞障害における新規薬剤（2Cl-C.OXT-A）の効果の検討

第37回日本神経科学大会

2014/09/13

パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

陸豊、岡部直彦、氷見直之、中村一丸山恵美、城本高志、成田和彦、塚本郁子、丸山徳見、榊原紀和、宮本修

出血性脳梗塞に対する新規核酸アナログ（2Cl-C.OXT-A）の脳細胞保護効果

第91回日本生理学会大会

2014/03/16

鹿児島大学郡元キャンパス（鹿児島県・鹿児島市）

氷見直之、高橋尚、岡部直彦、古我知成、中村恵美、陸豊、宮本修

脳梗塞モデルラットにおいて急性期運動は海馬 BDNF 濃度上昇を介して認知機能回復に寄与する

第68回日本体力医学会大会

2013/09/21

日本教育会館（東京都・千代田区）

Naoyuki Himi, Hisashi Takahashi, Naohiko Okabe, Tomoshige Koga, Emi Nakamura, Lu Feng, Takashi Shiromoto, Kazuhiko Narita and Osamu Miyamoto

The exercise at early stage after stroke enhanced the recovery of memory function via BDNF elevation in the hippocampus in stroke model rats.

Neuroscience 2013

2013/11/09

San Diego Convention Center (San Diego, USA)

丸山恵美、岡部直彦、氷見直之、成田和彦、宮本修

The involvement of ryanodine receptors on ischemic preconditioning

第90回日本生理学会大会

2013/03/28

タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

岡部直彦、丸山恵美、氷見直之、成田和彦、塚本郁子、丸山徳見、榊原紀和、板野俊文、宮本修

Delayed administration of the nucleic acid analog 2Cl-C.OXT-A attenuates brain damage and enhances functional recovery after ischemic stroke

第90回日本生理学会大会

2013/03/28

タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

氷見直之、高橋尚、古我知成、岡部直彦、丸山恵美、成田和彦、宮本修

The effects of increase of BDNF in hippocampus on recovery of cognitive function in cerebral infarction model rats

第90回日本生理学会大会

2013/03/28

タワーホール船堀（東京都・江戸川区）

氷見直之、高橋尚、丸山恵美、国安勝志、岡部直彦、成田和彦、古我知成、宮本修

The effects of exercise in acute-phase after cerebral infarction on the recovery of cognitive and motor dysfunction in cerebral infarction model rats

第35回日本神経科学大会

2012/09/18

名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 直彦 (OKABE NAOHIKO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30614276

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：