

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 14 日現在

機関番号：33111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25750231

研究課題名(和文)脳出血後のスキルトレーニングによる運動機能改善メカニズムの解明

研究課題名(英文)Effect of motor skills training on motor function and central nervous system in intracerebral hemorrhage rat

研究代表者

玉越 敬悟(tamakoshi, keigo)

新潟医療福祉大学・医療技術学部・助教

研究者番号：30632658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中後のリハビリテーションとして、スキルトレーニングは神経可塑性を基盤とした脳内作用機序で運動機能障害を改善させることが知られている。本研究は脳出血後のスキルトレーニングが運動機能障害および中枢神経系に与える影響について検証した。脳出血後のスキルトレーニングは運動機能回復を有意に改善させ、大脳皮質感覚運動野におけるdeltaFosB陽性細胞数、PSD95タンパク発現量、MAP2およびAMPAmRNA発現量を有意に増加させた。本研究から脳出血後のスキルトレーニングは大脳皮質感覚運動野における神経活動と神経可塑性関連タンパク・遺伝子を増加させ、運動機能回復を促進させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of motor skills training on the sensorimotor function and synaptic plasticity after intracerebral hemorrhage in rats. We analyzed sensorimotor function, deltaFosB positive neuron, PSD95 protein expression, the mRNA expression of MAP2, GAP43, BDNF and AMPA in rat with motor skills training or no exercise. Our results demonstrated that sensorimotor functional recovery following motor skills training after ICH is promoted by neural plasticity related protein and mRNA expression in the sensorimotor cortex.

研究分野：理学療法学

キーワード：脳出血 スキルトレーニング 神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

脳卒中後のリハビリテーションにおいて、運動療法は脳卒中後遺症の片麻痺に対する運動機能改善に重要な治療手段であり、脳卒中後の運動療法による脳機能改善機序の解明とともに、効果的な運動療法の開発が求められている。運動療法の中でスキルトレーニングは神経可塑性を基盤とした脳内作用機序で運動機能回復を促進させる効果があることが知られているが、具体的な作用機序は未だ不明な点が多い

2. 研究の目的

本研究は、脳出血後のスキルトレーニングが運動機能回復および神経活動や神経可塑性に関わるタンパク・遺伝子に与える影響について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

脳出血モデルラットは先行研究を参考にコラゲナーゼ注入法を用いて作製した。ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与 (45 mg/kg) 麻酔下にて、ラットを脳定位固定器に固定した。頭部の皮膚を切開して頭蓋骨を露出させた後、ドリルでプレグマ縫合から前方 0.2 mm, 左外側 3.0 mm の位置に小穴を開けた。マイクロシリンジポンプとつないだステンレス製カニューレを頭蓋骨表面から深度 6.0 mm まで挿入した。マイクロシリンジポンプを用いてコラゲナーゼ・タイプ IV (200 units/ml, Sigma-Aldrich 社) を 0.2 ul/min で 6 分間注入した。実験群には偽手術群, 偽手術+スキルトレーニング群, 脳出血+非運動群, 脳出血+スキルトレーニング群を設けた。スキルトレーニングには, (A) 縄梯子, (B) 格子台, (C) 綱渡り, (D) 平行棒, (E) 障壁の 5 つのアクロバティック課題を用いた (図 1)。各コース長は出発地点から最終地点まで 1m あり, 自発的運動を促すために最終地点に Dark Box を設置した。各課題を 1 日 4 回, 脳出血後 4 日目から 28 日目まで実施した。運動機能評価として, Motor Deficit Score, Horizontal ladder test, Forelimb placing test を経時的に実施した。脳出血後 14 日目と 29 日目において脳組織を採取し, 傷害体積, 神経活動, 神経可塑性に関わるタンパク・遺伝子を解析した。神経活動の検証には, Δ FosB タンパクを免疫組織化学染色で検出し, 大脳皮質および線条体における Δ FosB 陽性細胞数を解析した。また, ウェスタンブロッティング法を用いて大脳皮質および線条体の PSD95 のタンパク発現量を解析した。さらに, リアルタイム RT-PCR 法を用いて, MAP2, GAP43, BDNF, AMPA 受容体サブユニット (GluR1, 2, 3, 4) の mRNA 発現量を解析した。

4. 研究成果

運動機能評価

Motor Deficit Score, Horizontal ladder test, Forelimb placing test において, 脳出血+スキルトレーニング群は, 非運動群より有意な改善を示した (図 2-4)。脳出血後のスキ

ルトレーニングは神経障害学的機能および協調運動機能を改善させることが分かった。

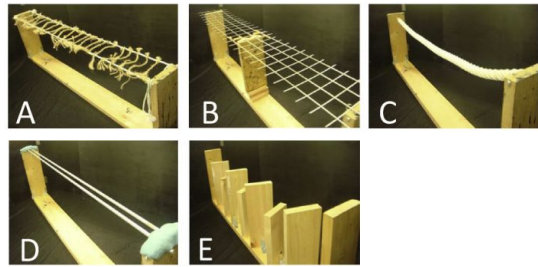


図 1. アクロバティックトレーニング

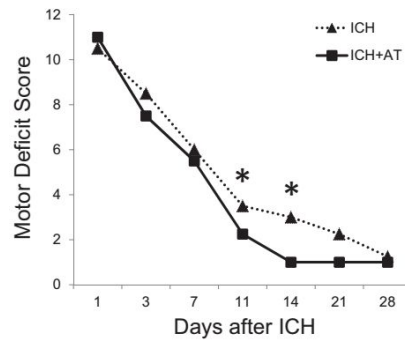


図 2. Motor Deficit Score

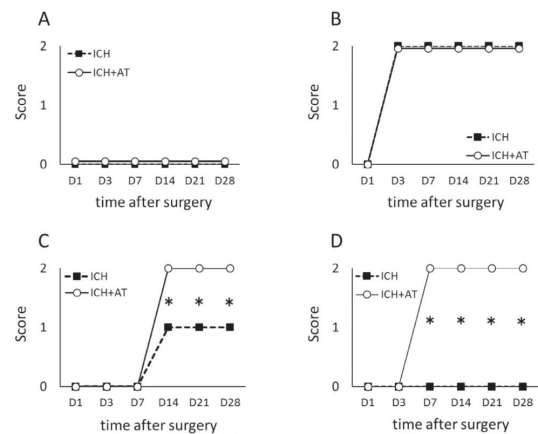


図 3. Forelimb placing test

(A)前肢のポジション, (B)前肢置き換え, (C)前肢置き換え(頭部 45° 引き上げ), (D)前肢側面接地

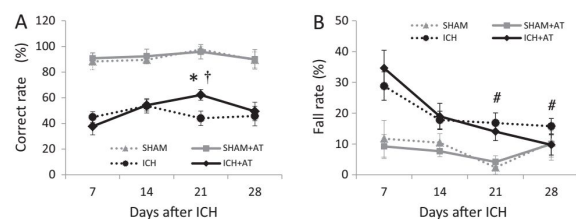


図 4. Horizontal ladder test

(A)前肢, (B)後肢

傷害体積の解析

脳出血後 29 日目における傷害体積を HE 染色にて解析した結果、脳出血後のスキルトレーニングは傷害体積を軽減させなかった (図 5)。

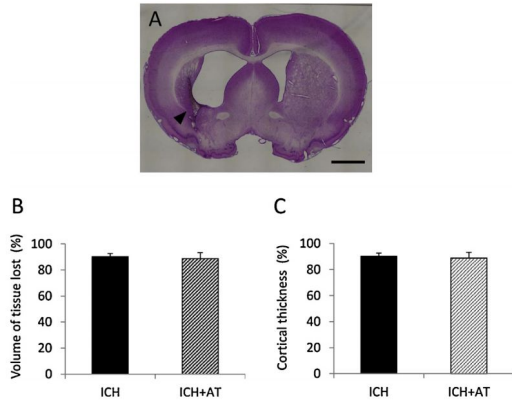


図 5. 傷害体積の結果 (A)HE 染色による染色像, (B)組織損失体積, (C)大脳皮質の厚さ

神経活動の解析(Δ FosB)

脳出血後 14 日目と 29 日目において線条体と大脳皮質感覚運動野の Δ FosB 陽性細胞数を解析した。脳出血後 29 日目において脳出血+スキルトレーニング群は、非運動群より大脳皮質感覚運動野の Δ FosB 陽性細胞数を有意に増加させた (図 6)。

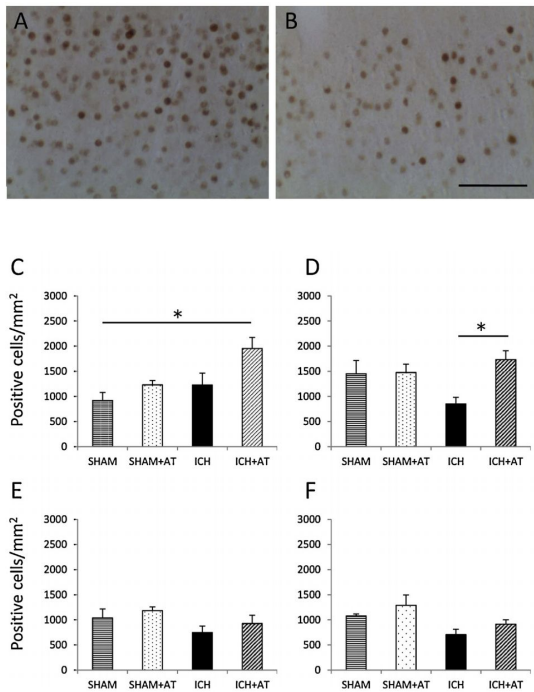


図 6. Δ FosB 陽性細胞 (A)脳出血+スキルトレーニング群, (B)脳出血+非運動群, (C,D) 第 II-III 層, (E,F) 第 V 層, (C,E) 傷害側, (D,F) 非傷害側

神経可塑性関連タンパクの解析

脳出血後 14 日目と 29 日目において線条体と大脳皮質感覚運動野の PSD95 タンパク発現量を解析したところ、脳出血後 29 日目において脳出血+スキルトレーニング群は、大脳皮質感覚運動野の PSD95 タンパク発現量を非運動群より有意に増加させた (図 7)。脳出血後 14 日目では、線条体において脳出血+スキルトレーニング群は、非運動群より有意に PSD95 タンパク発現量を増加させた (図 8)。

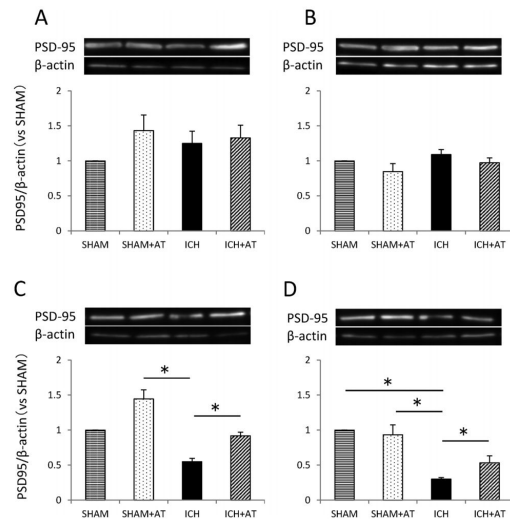


図 7. 大脳皮質感覚運動野における PSD95 タンパク発現量 (A,B)脳出血後 14 日目, (C,D)脳出血後 29 日目, (A,C)傷害側, (B,D)非傷害側

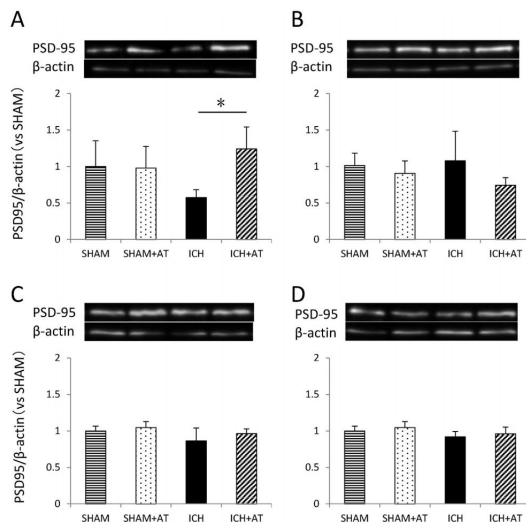


図 8. 線条体における PSD95 タンパク発現量 (A,B)脳出血後 14 日目, (C,D)脳出血後 29 日目, (A,C)傷害側, (B,D)非傷害側

神経可塑性関連遺伝子の解析
 神経可塑性関連タンパクとして MAP2, GAP43, BDNF を解析したところ, 脳出血後 29 日目において脳出血+スキルトレーニング群は, 大脳皮質感覚運動野の MAP2mRNA 発現量を非運動群より有意に増加させた(図 8)。また AMPA 受容体の全サブユニット mRNA 発現量を有意に増加させた。

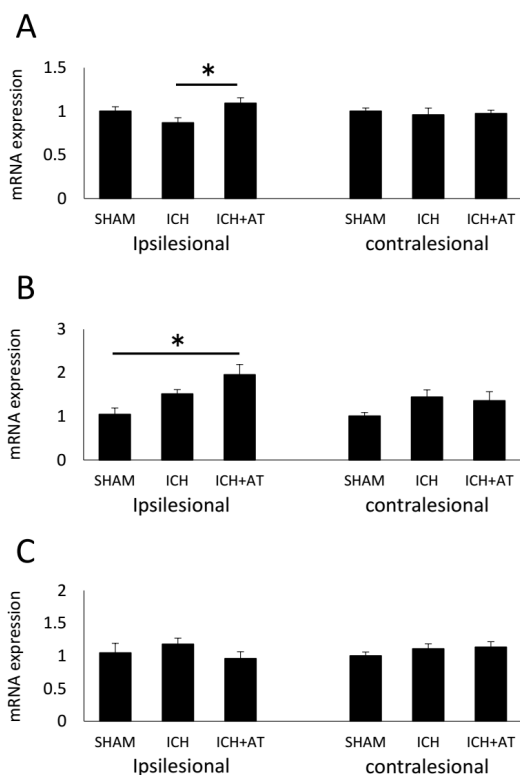


図 8. MAP2mRNA 発現量
 (A)MAP2 (B)BDNF (C)GAP43

本研究から脳出血後のスキルトレーニングは大脳皮質感覚運動野における神経活動と神経可塑性関連タンパク・遺伝子を増加させ, 運動機能回復を促進させることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

Tamakoshi K, Kawanaka K, Onishi H, Takamatsu Y, Ishida K: Motor skills training improves sensorimotor dysfunction and increases MAP2 mRNA expression in rats with intracerebral hemorrhage, *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 2016 (in press)

Tamakoshi. K, Ishida. A, Takamatsu. Y, Hamakawa. M, Nakashima. H, Shimada. H, Ishida. K: Motor skills training promotes motor functional recovery and induces synaptogenesis

in the motor cortex and striatum after intracerebral hemorrhage in rats, *Behavioural Brain Research*, 2014 Mar 1;260:34-43.

[学会発表](計 10 件)

玉越敬悟, 石田章真, 野口泰司, 戸田拓哉, 石田和人: 脳出血モデルラットにおけるスキルトレーニングが運動機能回復および大脳皮質と線条体に及ぼす影響. 第 48 回日本理学療法学会(愛知), 2013.5.

玉越敬悟, 高松泰行, 野口泰司, 戸田拓哉, 早稲田雄也, 加藤寛聡, 石田和人: 脳出血モデルラットにおけるスキルトレーニングとトレッドミル走行が運動機能回復に与える影響の違い. 第 49 回日本理学療法学会(神奈川), 2014.5.

玉越敬悟, 田巻弘之, 川中健太郎, 大西秀明, 高松泰行, 石田和人: 脳出血後のスキルトレーニングが前肢感覚運動機能に与える影響. 第 1 回日本基礎理学療法学会(名古屋), 2014.11.

玉越敬悟, 川中健太郎, 大西秀明, 高松泰行, 伊東祐太, 石田和人: 脳出血後のスキルトレーニングが感覚運動機能および AMPA 受容体サブユニットに与える影響. 第 92 回日本生理学会(神戸), 2015.3.

玉越敬悟, 田巻弘之, 川中健太郎, 大西秀明, 高松泰行, 石田和人: 脳出血モデルラットにおけるスキルトレーニングが NMDA 受容体および AMPA 受容体のサブユニットに及ぼす影響. 第 22 回脳機能とリハビリテーション研究会(東京), 2015.4.

Tamakoshi K, Tamaki H, Kawanaka K, Onishi H, Takamatsu Y, Ishida K: Effects of motor skills training on the subunits of AMPA and NMDA receptors in intracerebral hemorrhage rats. *Neuroscience* 2015, Kobe, July

玉越敬悟, 川中健太郎, 大西秀明, 高松泰行, 石田和人: 脳出血後のスキルトレーニングが AMPA 受容体サブユニットと興奮性および抑制性ニューロンに与える影響. 第 50 回日本理学療法学会(東京), 2015.5.

玉越敬悟, 田巻弘之, 大西秀明: 脳出血モデルラットにおけるスキルトレーニングが感覚運動機能および神経可塑性関連遺伝子に与える影響. 第 23 回日本運動生理学会(東京), 2015.7.

玉越敬悟, 田巻弘之, 大西秀明, 高松泰行, 石田和人: 脳出血モデルラットにおけるスキルトレーニングが大脳皮質および線条体の AMPA 受容体に及ぼす影響. 第 15 回新潟医療福祉学会(新潟), 2015.10. (会頭賞受賞)

玉越敬悟，田巻弘之，大西秀明，高松泰行，石田和人：脳出血後のスキルトレーニングは脳皮質感覚運動野におけるAMPA 受容体サブユニットを増加させる 第2回日本基礎理学療法学術集会(神奈川)，2015.11. (奨励賞受賞)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

玉越 敬悟 (Tamakoshi Keigo)

新潟医療福祉大学・医療技術学部・助教

研究者番号：30632658