

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350594

研究課題名(和文) 運動皮質梗塞モデルによる運動負荷と新生GABAシステムに依存的な神経再構築の関係

研究課題名(英文) The roles of exercises on motor recovery and neuronal reorganization related with GABA systems in the focal motor stroke rats

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：運動処方(運動療法)は脳梗塞後の運動機能の回復を促進する事が知られるが、神経学的な機序については不明である。運動負荷は成体脳での神経新生を促進する事が知られるので、我々は運動皮質に梗塞巣が限局するモデルを確立し、脳梗塞後の神経新生や分化などの神経系の再構築と運動機能に対する各種運動負荷の役割について検討した。特に神経新生についてはGABA細胞のサブポピュレーションに注目した。梗塞巣が限局する我々の動物では障害の程度は軽度であるが、評価項目を増やしたビームウォーク試験により機能回復に対する運動負荷の有効性が明らかになった。一方、現時点ではGABA細胞のサブポピュレーションの産生に対する影響は見えていない。

研究成果の概要(英文)：Although exercise therapies in the rehabilitation can promote motor recovery after cerebral infarction, the neurologic mechanism underlying them remained largely unknown. As exercise affects neurogenesis in adult brain, we examined the role of different types of exercises on the generation and lineage of neural stem cells (especially GABAergic cells) and motor recovery using the motor cortex stroke rats. Conventional motor analysis failed to detect the functional recovery during recovery period. However, beam-walking tests with minor modifications enables us to reveal in gait deficits and show the significant effect on promotion of motor recovery. To evaluate de novo neurogenesis, we have performed lineage analysis of newly-generating neural stem cells using BrdU labeling and immunohistochemistry. Although BrdU(+) cells were increased in stroke rats, these are appeared not to become some subpopulation of GABAergic cells.

研究分野：リハビリテーション医学、神経生理学

キーワード：脳梗塞モデル動物 運動負荷 神経再構築

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来、成体の脳では神経細胞の新生はほとんど起こらないと考えられてきたが、近年ある一定の条件下では新たに神経細胞の産生が促進され、神経回路網に組み込まれることが明らかになってきた(総説: van Praag, et al, Nat Rev Neurosci. 2000)。例えば、実験動物(齧歯類)を自発運動させるなど周囲の環境に富む条件で飼育すると海馬の歯状回で新生する神経幹細胞の数が増すことから、神経新生と運動の関連が示唆されてきた。一方、大脳新皮質を構成する神経細胞については生理的な条件下では神経新生が起こる知見は確認できないが、虚血などにより病的な状態へ変化をきたすと新たに神経産生を惹起する事が知られていた(総説: Ohira, Cell Mol. Life Sci., 2011; Zimka-Nalecz et al, Acta Neurobiol. Exp. 2012 など)。例えば広範に実験的脳梗塞を起こした動物では、脳室上衣下層(SVZ)領域で新生した神経細胞が梗塞巣へ向かい移動していくことから、特定の病変時における神経細胞の新生は神経組織の修復や再構成に関与している可能性が示唆された。

(2) 神経発生期において未熟な神経細胞は、シナプスを形成する前より、しばしば各プロセス(細胞分化や細胞移動、神経突起形成など)に特異的なパターンを持つ神経活動(細胞内 Ca^{2+} 変化や膜電位変化など)を示し、その神経活動に依存して発生プログラムが実行される事が知られる(Komuro & Kumada, Cell Calcium 2005; Spitzer, Nature 2009; Nat Rev Neurosci, 2012)。研究代表者らも脳スライス培養標本を用いて長時間タイムラプス観察と Ca^{2+} イメージング法を同時に駆使しながら、この神経活動変化を引き起こす要因として神経伝達物質に着目し、その役割について研究を行ってきた(Kumada & Komuro, PNAS 2004, Kumada et al, J Neurosci 2005, Wang, Kumada et al, 2014, など)。神経発生期や病的な状態においては細胞内の塩化物イオン濃度が高いため、脱分極(興奮)性に作用する。近年、研究代表者らも「てんかん」モデル動物を用いて、神経発生期に細胞外 GABA の分布とその応答性が時空間的に乱れることが皮質異形成を引き起こす事を明らかにし、先に興奮性の GABA システムが構築されることが神経回路形成に重要であることが明らかになってきた(Wang, Kumada et al, 2014)。

(3) また、脳卒中後のリハビリテーション(運動負荷)は運動障害や高次脳機能などの機能回復に重要であることは周知の事実である。しかしながら、障害回復期に課す運動負荷が神経新生や機能再建に対してどのような効果を持つのかについては未だ良く分

かっていない。そこで、研究代表者らは、脳梗塞後のリハビリテーションの役割を調べるために、一次運動野のある頭頂部近傍に局所的に脳梗塞を起こす実験的脳梗塞モデル動物を確立した。

2. 研究の目的

運動負荷を課すリハビリテーションは、神経活動を促すことで神経活動に依存した神経発生プログラムに影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、研究代表者らは実験的脳梗塞モデル動物に対して運動処方と課し、その後の運動機能の回復と神経幹細胞の新生を中心に調査することで、神経系の再構築における運動負荷の役割を明らかにしようとした。また、その機序として GABA 系の関与についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験的脳梗塞モデル動物の作出: 頭頂部に脳梗塞巣を持つモデル動物の新規作出
我々は光増感法(Photochemically-induced thrombosis: PIT 法)で運動皮質が存在する大脳皮質頭頂部にのみ脳梗塞巣が生じるモデル動物を効率よく作出する方法を確立した。具体的には、深麻酔下で頭頂部の皮膚を切開後、頭蓋骨表面のプレグマから左外側 2.0mm、前方 2.0mm の位置にドリルで小穴を開け、光増感剤であるローズベンガルを静脈内投与した後、専用にデザインした光ファイバーを用いて緑色光を中大脳動脈の支流に 10 分間照射することで血管内皮細胞障害性血栓生成を惹起し、中大脳動脈を血栓閉塞した。

(2) 脳梗塞モデル動物の運動機能の評価法の検討

脳梗塞モデル動物の運動機能の評価するため、以下の試験を行った。

ロータロッド試験

脳梗塞モデル動物の協調運動を調べるために、動物を漸増加速する回転ローラーに乗せて、ローラー上に維持している時間を計測するロータロッド試験を行った。

フットプリント法による足跡解析

脳梗塞時によく見られる歩幅等の違いを調べるため、ラットの四肢にインクをつけて白紙上を歩行させ、その足跡を解析するフットプリント法による評価を行った。

ビームウォーク試験による肢スリップ解析

動物を細い角棒の上を歩行させて、各四肢のスリップ度合いを評価するビームウォーク試験を行った。

(3) 脳梗塞モデル動物に課す運動負荷の条件検討

脳梗塞後の運動機能や神経系の再構築に係るより効果的な運動負荷法を調べるために、以下の運動負荷法を課した。トレッドミル走による強制走行、回転ケージを飼育ケージに設置することによる自発走の促進、対照群は特に運動負荷を課さなかった。

(4) 運動負荷が神経新生 (GABA 細胞) に及ぼす影響：蛍光免疫組織学的検討

脳梗塞時における新生細胞について調べるために、分裂細胞を標識する BrdU ラベリング実験を実施した。下記に示す免疫染色法により BrdU 陽性細胞と各種細胞系譜のマーカーとの共染色を行った。具体的には、麻酔後灌流固定したラットより大脳を取り出し、パラフィン包埋後、薄層切片を作製した。抗 BrdU 抗体と各種系譜マーカー (DCX など) や GABA 関連マーカー (GAD67 など) の抗体を用いて蛍光二重免疫染色を行った。

(5) 実験的脳梗塞モデル動物への薬物投与系の確立

脳梗塞モデル動物に浸透圧ポンプを取り付けて、投薬する系を確立した。

4. 研究成果

(1) 実験的脳梗塞モデル動物の作出：頭頂部に脳梗塞巣を持つモデル動物の新規作出

本研究課題で挙げた作業仮説を検証するために光増感法で右側中大脳脈に血栓形成を惹起する方法 (Photochemically-induced thrombosis :PIT 法) で実験的脳梗塞モデルを作出した。このモデル動物は中大脳脈の閉塞で生じる点から臨床的に実際に起こる脳梗塞を検討する上では貴重なモデルであるが、様々な脳機能を果たしている脳領域が広範に梗塞巣となってしまうため、メカニズムを調べるためには複雑すぎる問題を持つ。そこで、我々はラットの運動皮質が存在する大脳皮質頭頂部にのみ脳梗塞巣が生じるモデル動物の開発を試みた。その結果、脳梗塞術を改良し、右側中大脳脈の側枝に血栓形成を惹起する方法にて運動皮質にのみ脳梗塞巣が生じるモデル動物の作出に成功した。術後翌日に四肢の触診を行ったところ、多くの動物で麻痺を示すことが分かった。運動負荷が運動系を支配する神経回路網の再構築に対して、どのような影響を及ぼしていくのか、そのメカニズムを解明するのに非常に有用なモデルとなる。

(2) 脳梗塞モデル動物の運動機能の評価法

の検討と各種運動負荷の効果について

脳梗塞後の障害とその回復度合いの程度について、上述した方法 (ロータロッド試験、フットプリント法、ビームウォーク試験) により評価した。意外なことに、フットプリント法ではヒトの脳梗塞後にはよく認められる歩幅や歩隔などのパラメーターは術前・術後で有意差はなかった。ロータロッド試験やビームウォーク試験では脳梗塞術による機能低下を捉えることが出来たが、機能回復時の各種運動負荷間の効果の違いが出なかった。本モデル動物の梗塞巣の範囲が狭いため、運動機能への障害の程度が軽度であることが考えられる。しかし、触診や観察上に違いがあるため、より詳細な方法での差の検出を試みた。そこで、歩行動作から評価項目を追加して、再度ビームウォーク試験にて評価を実施したところ、運動負荷を課すことが、運動機能の時間的な機能回復を有意に促進することを見いだした。また、運動負荷法の違いについても違いが出つつあり、定量的な検証を行っている。

(3) 神経細胞 (特に GABA 細胞) の新生と運動負荷の関係性

脳梗塞術後の運動負荷が神経新生に与える影響について調べるために、術後 1 週間 BrdU を投与後、経時的に脳切片を作製し、免疫組織学的に新生細胞の分布と系譜について解析した。脳梗塞モデル動物では梗塞巣近傍に BrdU 陽性細胞が広がる様子が認められた。これらの新生細胞には未熟な神経細胞のマーカーである DCX 陽性となる細胞のほかに、グリア細胞のマーカーである GFAP や Iba1 陽性となる分布が含まれていた。一方、現在までのところ GABA 細胞のサブpopulation である Calretinin 陽性となる BrdU 陽性細胞は認められていない。脳梗塞時には正常時の aSVZ 由来の新生細胞の系譜とは異なる可能性が示唆された。BrdU の分布は運動負荷に伴って領域ごとに異なる可能性が見いだされているので、現在定量中である。

また、GABA システムの関与について調査するために、まず薬物の in vivo 投与系を確立した。既知の物質投与による運動機能・神経新生に与える影響について検討できたので、今後 GABA 系に影響を与える薬物の投与による影響について調べる予定である。

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 3 件)

Qian, T., Chen, R., Nakamura, M., Furukawa, T., Kumada, T., Akita, T., Kilb, W., Luhmann, H. J., Nakahara, D., and Fukuda, A. Activity-dependent endogenous taurine release

facilitates excitatory neurotransmission in the neocortical marginal zone of neonatal rats. Front Cell Neurosci. 2014 Feb 10; 8:33. 2014

Akita, T*., Kumada, T*., Yoshihara, S. I*., Egea, J*., and Yamagishi, S*. Ion channels, guidance molecules, intracellular signaling and transcription factors regulating nervous and vascular system development. J Physiol Sci. 66:175-88. 2015 (*: equally contributed).

熊田竜郎, 吉川輝. 神経発生学的な視点から再生医療のリハビリテーションについて考える: 神経の電気的な活動を損傷するニューロリハへの可能性. 常葉大学保健医療学部紀要 7: (2016) 17-27.

〔学会発表〕(計 7件)

熊田竜郎, Ca²⁺やサイクリックヌクレオチドシグナリングを介する intrinsic プログラムによる小脳顆粒細胞の移動の制御 Control of cerebellar granule cell migration by intrinsic programs through modulating Ca²⁺ and cyclic nucleotide signaling. 第 92 回日本生理学会, シンポジウム「神経発達制御機構の新たな潮流」(招待講演), 神戸, 2015.03.23

渡部美穂, 岩田暁美, 古川智範, 熊田竜郎, 内田巧, 廣瀬伸一, 福田敦夫, カリウム-クロライド共役担体 KCC2 の機能制御, Functional regulation of neuronal K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2. 第 92 回日本生理学会, シンポジウム「抑制システムにマルチモダリティをもたらす形態と機能の仕組みとそのダイナミクス」, 神戸, 2015.03.23

森下紗帆, 懸信秀, 外村和也, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. 光増感(PIT)法で惹起した運動皮質梗塞ラットにおける運動機能回復と神経新生に対するトレッドミル運動の効果. 第 92 回日本生理学会, 神戸, 2015.03.22

森下紗帆, 外村和也, 懸信秀, 吉川輝, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. 光増感(PIT)法で作出した運動皮質梗塞ラットにおける運動機能回復と神経新生に対する運動負荷の効果. 第 133 回日本薬理学会関東部会, 柏, 2015.10.10

森下紗帆, 外村和也, 吉川輝, 懸信秀, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. 運動

皮質梗塞ラットにおける運動機能回復および神経新生に対する走行運動の効果. Effect of exercise on the motor recovery and neurogenesis in rats with motor cortex infarct. 第 93 回日本生理学会大会, 札幌, 2016.03.24

森下紗帆, 外村和也, 懸信秀, 吉川輝, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. 運動皮質梗塞ラットの運動機能回復と神経新生を促がす運動負荷法の検討. 第 135 回日本薬理学会関東部会, 浜松, 2016.10.08

森下紗帆, 外村和也, 吉川輝, 懸信秀, 梅村和夫, 筒井祥博, 熊田竜郎. Effect of different exercises on neurogenesis and motor recovery in rats with motor cortex infarction. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松, 2017.03.29

〔図書〕(計 1件)

熊田竜郎(分担執筆), 杉江秀夫(総編集), PT/OT リハ演習メソッド、診断と治療社、2016

〔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:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

筒井 祥博 (TSUTSUI Yoshihiro)
常葉大学・保健医療学部・教授
研究者番号：50073135

縣 信秀 (AGATA Nobuhide)
常葉大学・保健医療学部・講師
研究者番号：00549313

梅村 和夫 (MEMURA Kazuo)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：40232912

外村 和也 (HOKAMURA Kazuya)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：90436965

(4)研究協力者

森下 紗帆 (MORISHITA Saho)
常葉大学・健康プロデュース学部・助手
研究者番号：30614010

吉川 輝 (YOSHIKAWA Akira)
昭和大学・医学部 助教
研究者番号：90737355