



Title	GABA受容体を標的とする薬理的神経制御と運動療法が脳卒中後の機能回復に与える影響
Author(s)	井上, 貴博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第14860号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14860
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89022
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Inoue.pdf



学位論文

GABA 受容体を標的とする薬理的神経制御と運動療法が
脳卒中後の機能回復に与える影響

井上 貴博

北海道大学大学院保健科学院
保健科学専攻保健科学コース

2021 年度

目 次

要約	1
本論文で用いた略語	3
本論文で用いた用語	4
第 I 章 序論	
I-1. 脳卒中の疫学的所見と課題	7
I-2. 脳卒中後の機能回復に寄与する神経可塑性	8
I-3. 脳卒中後の運動療法による可塑性修飾	9
I-4. 興奮抑制バランスに基づく神経活動の調節	10
I-5. GABA 受容体を標的とする薬理的神経制御	11
I-6. 薬理的コンディショニングと運動介入の併用効果	13
I-7. 脳梗塞モデル研究から得られた知見と解決すべき課題	14
I-8. 本研究の目的	15
第 II 章 内包損傷を伴う脳出血後の機能障害と神経栄養因子発現の特徴	
II-1. 背景	17
II-2. 方法	
II-2-1. 対象および実験概要	18
II-2-2. 脳出血モデルの作成	19
II-2-3. 行動学的評価	20
II-2-4. 組織採取	23
II-2-5. 生化学的解析	25
II-2-6. 変数処理および統計解析	27

II-3. 結果	
II-3-1. 行動学的評価	28
II-3-2. BDNF 発現量	30
II-4. 考察	32
II-5. 小括	34
II-6. 補遺	35

第三章 GABA 受容体を標的とする薬理的神経制御の検証

III-1. 背景	43
III-2. 方法	
III-2-1. 対象および実験概要	45
III-2-2. 薬剤投与	46
III-2-3. 行動学的評価	46
III-2-4. 組織採取	47
III-2-4. 生化学的解析	48
III-2-6. 統計解析	48
III-3. 結果	
III-3-1. 行動学的評価	49
III-3-2. mRNA 発現量	50
III-4. 考察	53
III-5. 小括	55
III-6. 補遺	56

第四章 薬理的神経制御を伴う運動療法が脳出血後の機能回復に与える影響

IV-1. 背景	59
IV-2. 方法	

IV-2-1.	対象および実験概要.....	61
IV-2-2.	運動介入.....	62
IV-2-3.	薬剤投与.....	62
IV-2-4.	行動学的評価.....	63
IV-2-5.	組織採取.....	64
IV-2-6.	形態計測学的解析.....	64
IV-2-7.	生化学的解析.....	65
IV-2-8.	統計解析.....	66
IV-3.	結果	
IV-3-1.	行動学的評価.....	67
IV-3-2.	出血損傷体積.....	69
IV-3-3.	蛋白発現量.....	70
IV-4.	考察.....	75
IV-5.	小括.....	78
第V章	総合考察.....	79
第VI章	結論.....	82
謝辞	83
引用文献	84
業績一覧	98

要 約

【背景】脳卒中後の運動機能障害は、本邦のみならず世界の公衆衛生においても影響が大きく、機能回復を促進する治療戦略の開発は喫緊の課題である。今日の脳卒中リハビリテーションにおいて、運動療法は主要な治療介入であり、身体運動に伴う神経活動依存的な可塑性修飾を介して機能回復を促進することが知られるが、その機能回復効果は限定的である。そこで、中枢神経系において主要な抑制作用を担う GABA 受容体の薬理的阻害は、活動依存的可塑性を強化するための易興奮性コンディショニングとして期待される。本研究は、Tonic inhibition (GABA 受容体を介した持続的な抑制様式) を担う $\alpha 5$ GABA_A 受容体を薬理標的とし、薬理的コンディショニングと運動介入の併用が、脳卒中後の機能回復に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【内包損傷を伴う脳出血後の機能障害と神経栄養因子発現の特徴】本研究では脳卒中病型の中でも脳出血に焦点を当て、はじめに、内包損傷を伴う脳出血病態を模した IC-ICH モデルラットの機能障害と大脳皮質運動野における神経栄養因子発現の特徴について精査した。雄性 Wistar ラットを、偽手術による手術侵襲のみを与える SHAM 群 ($n = 7$) と、脳出血を誘導する ICH 群 ($n = 8$) の 2 群に割り当てた。IC-ICH モデルは、血管基底膜破壊酵素のコラゲナーゼ溶液を左線条体・内包領域に微小投与することで作成した。行動学的評価を用いて、運動機能障害、自発的活動性、不安様行動の経時的变化を、脳出血前および脳出血後 3 日から 4 週まで長期的に評価した。脳由来神経栄養因子 (BDNF) 発現は、運動機能局在の中枢である大脳皮質運動野に着目し、脳出血後 4 週目に採取した組織から mRNA 発現と蛋白発現を定量した。その結果、ICH 群では、著明な運動機能障害が脳出血後 4 週間にわたり持続することが確認された。ICH 群の自発的活動性は、脳出血後低下した後に、一時的に改善し、再び低下する所見が認められた。一方で、脳出血に起因する ICH 群の不安様行動は認められなかった。また、脳出血後 4 週目の大脳皮質運動野における BDNF 発現量は、SHAM 群と ICH 群の間に有意な群間差は認められなかった。本章で得られた結果から、IC-ICH モデルラットは、運動機能障害の長期的検証が可能であり、本研究において有用な脳出血モデルとなり得ることが示された。

【GABA 受容体を標的とする薬理的神経制御の検証】次に、 $\alpha 5$ GABA_A 受容体の特異的阻害薬 (L-655,708) の単回投与が、中枢神経系の神経活動に与える影響について検証した。薬剤投与の効果を確認するため、本章は健常ラットを対象とした。雄性 Wistar ラットを、対照群となる CON 群 ($n = 6$) と、L-655,708 を投与する L655 群 ($n = 6$) の 2 群に割り当てた。L-655,708 は 0.5 mg/kg の用量で腹腔内投与した。投与から 30 分後に行動学的評価を実施し、自発的活動性や懸念される副作用への影響について検証した。神経活動の評価には

生化学的手法を用いて、神経活動の分子マーカーである最初期遺伝子の発現 (c-Fos mRNA) を各領域 (大脳皮質, 海馬, 脊髄) で定量した. その結果, 大脳皮質運動野における L655 群の c-Fos mRNA 発現量は, CON 群と比較し有意に高値を示した. 一方で, 大脳皮質感覚野, 海馬, 脊髄における c-Fos mRNA 発現量に有意な群間差は認められなかった. 行動評価において自発的活動性は, CON 群と比較し, L655 群では有意に増強した. また, 行動に反映される明らかな副作用は認められなかった. 本章の結果から, 薬理的 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害は, 中枢神経系の中でも, とりわけ大脳皮質運動野の神経活動修飾を目的とした薬理的コンディショニングとなり得ることが示された.

【薬理的神経制御を伴う運動療法が脳出血後の機能回復に与える影響】最後に, ここまでに得られた知見を基に, IC-ICH モデルラットに対する薬理的 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害と運動介入の併用効果について検証した. 雄性 Wistar ラットを, 偽手術による手術侵襲のみを与える SHAM 群 (n = 8), ICH 手術のみを行う ICH 群 (n = 8), ICH 手術後に運動介入を行う ICH+EX 群 (n = 8), ICH 手術後に L-655,708 投与を行う ICH+L6 群 (n = 8), ICH 手術後に L-655,708 投与と運動介入を併用する ICH+L6EX 群 (n = 8) の 5 群に割り当てた. ICH 手術では, 血管基底膜破壊酵素のコラゲナーゼ溶液を左線条体・内包領域に微小投与した. L-655,708 は 0.5 mg/kg の用量で腹腔内投与し, ICH+L6EX 群への投与は運動介入の 10-15 分前に行った. 運動介入は, トレッドミルを用いて走行速度 12 m/min の中等度強度で 30 分間の運動介入を実施した. 各介入は, 脳出血後 1 週から 4 週までの計 3 週間とし, 1 回/日, 5 日/週の頻度で実施した. 最終介入の 24 時間後に, 大脳皮質運動野および脊髄の組織採取を行い, 各領域における脳由来神経栄養因子 (BDNF), 軸索発芽マーカー (GAP-43), シナプスマーカー (Synaptophysin), 成長阻害因子 (Nogo-A) の蛋白発現量を定量した. その結果, ICH+L6 群と ICH+EX 群の機能回復は限定的であるが, 併用介入を行った ICH+L6EX 群においては脳出血後の機能回復が効果的に促進されることが示された. ICH+L6 群では大脳皮質 BDNF 発現, 脊髄 BDNF 発現, 脊髄 GAP-43 発現の増強が認められた. これに加えて, ICH+L6EX 群の脊髄においては, Synaptophysin および Nogo-A の発現増強が認められた.

【考察・結論】運動介入と $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬の投与はそれぞれ単独では機能回復効果が乏しいものの, 各介入を併用することにより脳出血後の機能回復が効果的に促進されることが明らかとなった. 併用介入による機能回復の背景には, 大脳皮質における可塑性修飾のみならず, 出血病巣から離れた脊髄における軸索発芽やシナプス形成, さらには成長阻害因子による神経回路の安定化なども関与している可能性が示唆された. 本研究の結果は, 脳卒中後の機能回復を効果的に促進する治療戦略の Proof of concept study として重要な基礎的知見を示し, $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の特異的に阻害する薬理的神経制御と運動療法の併用は, 脳卒中後の機能回復を促進する新たな治療戦略の 1 つとなることが示唆された.

本論文で用いた略語

- **BDNF** : Brain-derived neurotrophic factor
- **CST** : Corticospinal tract
- **DALYs** : Disability-adjusted life years
- **DTT** : Diffusion tensor tractography
- **GABA** : Gamma amino butyric acid
- **GAP-43** : Growth-associated protein 43
- **HRP** : Horseradish peroxidase
- **IC** : Internal capsule
- **ICH** : Intracerebral hemorrhage
- **IEG** : Immediate-early genes
- **MCAO** : Middle cerebral artery occlusion
- **mRNA** : Messenger ribonucleic acid
- **MRS** : Magnetic resonance spectroscopy
- **tDCS** : Transcranial direct current stimulation
- **TMB** : 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine
- **TMS** : Transcranial magnetic stimulation
- **tPA** : Tissue plasminogen activator
- **TrkB** : Tropomyosin receptor kinase B

本論文で用いた用語

- ◆ **$\alpha 5$ GABA_A受容体** : $\alpha 5$ サブユニットを含む GABA_A 受容体.
- ◆ **Bicuculline** : GABA_A 受容体阻害薬. GABA_A 受容体全般に作用する.
- ◆ **bregma** : 頭蓋骨における矢状縫合と冠状縫合の交点.
- ◆ **cDNA** : 相補的 DNA (Complementary deoxyribonucleic acid). mRNA を鋳型とし, 逆転写反応によって合成された DNA.
- ◆ **DALYs** : 障害調整生存年数 (Disability-adjusted life years). 疾病に起因する障害や死亡により失われた年数. 疾病負荷を総合的に示す指標で, 健康的な生活の損失を表す.
- ◆ **DTT** : 拡散テンソルトラクトグラフィ. MRI により水分子の拡散異方性を捉え, 神経白質線維の走行を非侵襲的に可視化する手法.
- ◆ **ELISA 法** : 酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-linked immunosorbent assay). 抗原抗体反応を利用し, 酵素反応に基づく発色・発光により目的蛋白質を定量する方法.
- ◆ **GABRA5** : GABA_A 受容体の $\alpha 5$ サブユニットをコードする遺伝子
- ◆ **HRP** : 反応性, 安定性に優れた酵素. 基質に反応し化学発光する.
- ◆ **IC-ICH モデル** : 内包損傷を伴う脳出血モデル.
- ◆ **in vitro** : 主に, 環境が人為的にコントロールされている条件 (試験管内や培養器内) のことを指す.
- ◆ **in vivo** : 主に, 環境が人為的にコントロールされていない条件 (生体内) のことを指す.
- ◆ **L-655,708** : $\alpha 5$ GABA_A 受容体のネガティブアロステリックモジュレーター.
- ◆ **Latency to remove** : Tape removal task におけるテープを剥がすまでの時間.
- ◆ **mRNA** : 蛋白質に翻訳され得る塩基配列情報と構造を持った RNA.
- ◆ **MRS** : 磁気共鳴スペクトロスコピー. 磁気共鳴画像診断装置 (Magnetic Resonance Imaging : MRI) により, 共鳴周波数の違いを利用して生体内の分子の種類や成分などを非侵襲的に調べる手法.
- ◆ **Neuromodulation** : 電気刺激や化学薬品などの各種刺激を用いて, 体内の特定の神経部位に標的化して送達することにより神経活動を変化させること.
- ◆ **Nogo-A** : 成長阻害因子の 1 つ. 軸索伸展を阻害する作用を有する.
- ◆ **Phasic inhibition** : 主に, シナプス内 GABA_A 受容体を介した一過性の抑制様式.
- ◆ **RT-PCR 法** : 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription polymerase chain reaction). 逆転写酵素を用いて合成した cDNA から, 目的とする塩基配列を PCR 法によって増幅することで目的遺伝子の発現量を定量する手法.
- ◆ **SHAM** : 偽手術. 手術侵襲のみを与える処置.
- ◆ **TMB** : HRP と反応し, 酸化することで青色に発色する基質.

- ◆ **Tonic inhibition** : 主に, シナプス外 GABA_A 受容体を介した持続的な抑制様式.
- ◆ **tPA 治療**: 詰まった血栓を溶解し脳血流の再開通を図る治療法. 一般的に, 発症から 4.5 時間以内の脳梗塞に適応される.
- ◆ **Western Blotting 法** : 電気泳動で分離した蛋白をメンブレンに転写し, 抗原抗体反応を利用して目的蛋白質を検出する手法.
- ◆ **アロステリック部位** : 受容体の基質 (リガンド) 結合部位ではない部位
- ◆ **アロステリックモジュレーター** : アロステリック部位に結合し受容体の機能を変化させる薬剤を指す. 促進効果のあるものをポジティブアロステリックモジュレーター, 抑制効果があるものをネガティブアロステリックモジュレーターと呼ぶ.
- ◆ **オルソステリック部位** : 受容体の基質 (リガンド) 結合部位.
- ◆ **機能回復** : 本論文では主に, 脳卒中により損なわれた身体機能 (運動機能) の回復を指す.
- ◆ **最初期遺伝子** : 細胞への刺激に応じて急速に発現が誘導される遺伝子の総称.
- ◆ **シナプス** : 神経細胞間の接合部. 神経細胞の情報伝達に重要な役割を果たす.
- ◆ **シナプス可塑性** : 神経可塑性の中でも, シナプスの機能修飾に関する可塑性.
- ◆ **軸索** : 神経細胞の一部. 他の神経細胞へと情報を送り出すために長く伸びた突起.
- ◆ **樹状突起** : 神経細胞の一部. 他の神経細胞からの情報を受け取るための突起.
- ◆ **神経可塑性** : 内因性および外因性の刺激に応答するために, 構造, 機能, 接続を変化させる神経系の能力.
- ◆ **内包** : 大脳基底核の内側に位置する白質部. 皮質脊髄路をはじめ多くの神経線維が通過している.
- ◆ **年齢調整死亡率** : 基準人口を基に年齢構成を調整した上で算出した死亡率.

第 I 章

序 論

I-1. 脳卒中の疫学的所見と課題

脳卒中とは、脳血管の梗塞あるいは出血により神経学的な機能障害が生じる脳血管疾患である¹。最新の統計調査(1990年-2019年)によると、世界では現在、年間約1220万人が脳卒中を発症し、約1億100万人の脳卒中患者がいると推定されている²。また、1990年から2019年までの推移をみると、年齢調整死亡率は著しく減少している一方で、症例数の総数としては大幅に増加している^{2,3}。これはすなわち、脳卒中医療の発展に伴い一命を取り留めることは可能となってきている一方で、機能障害を抱えた脳卒中患者は世界的に増え続けていることを意味する。

脳卒中後の機能障害は、病巣の部位や大きさなどに依存して多岐にわたる。とりわけ、病巣半球の反対側に生じる一側性の運動麻痺(片麻痺)などの運動機能障害は、患者の日常生活活動や生活の質を損なう主要な機能障害である^{4,5}。実際、本邦の国民生活基礎調査では、介護が必要となった主な原因として、脳卒中が全体の16.1%を占めており(厚生労働省、令和元年国民生活基礎調査IV介護の状況より)、世界的な統計調査においても、DALYs(Disability-adjusted life years: 年齢調整死亡率)の原因疾患すなわち健康的な生活を損なった要因として脳卒中は上位に位置している(2019年、全年齢で3位、50-74歳または75歳以上で2位)⁶。こうした疫学的所見からも、世界の公衆衛生における脳卒中の影響の大きさが推察される。

脳卒中患者の増加傾向が今後も同様に続いた場合、2050年には、世界の脳卒中患者は2億人以上にのぼることが予測されている²。しかし現在において、脳卒中に対する根本的な治療法は確立していない。tPA療法や血栓除去術などの「初期障害を軽減する」治療戦略が急速に発展した近況を鑑みると^{7,8}、今後は「機能回復を効果的に促進する」治療戦略の開発にも目を向ける必要がある(図1-1)。

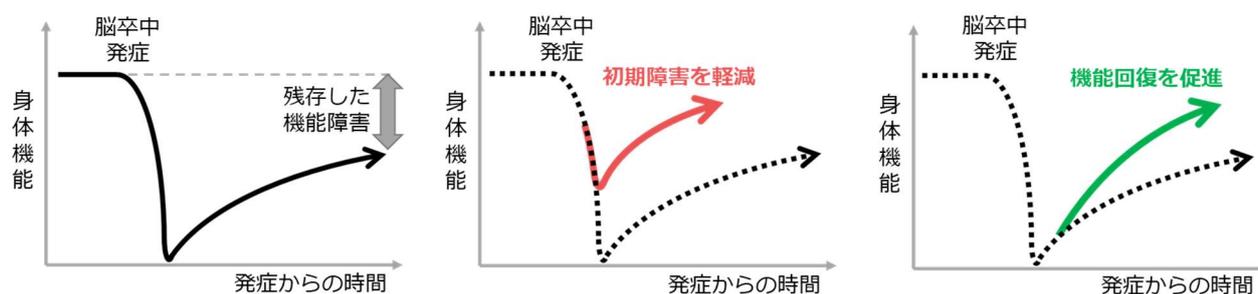


図 1-1. 脳卒中後の機能障害と治療戦略

- (左) 脳卒中後には一定の自然回復が生じるが、多くの場合、機能障害が残存する。
- (中央) tPA療法や血栓除去術などの超急性期/急性期治療は、初期障害を軽減する。
- (右) 機能回復を効果的に促進する治療戦略の開発にも目を向ける必要がある。

I-2. 脳卒中後の機能回復に寄与する神経可塑性

脳卒中後の機能回復は主に、残存した中枢神経領域において生じる適応的な変化、すなわち神経可塑性に起因すると考えられている。神経可塑性とは、「内因性および外因性の刺激に応答するために、構造、機能、接続を変化させる神経系の能力」と定義することができ、分子から細胞、システム、行動といった幅広いプロセスにわたって示される⁹。

脳卒中モデル動物を対象とした基礎研究においては、多様な神経可塑性が実証されており、神経新生、軸索発芽、樹状突起分岐、シナプス形成、スパイン成長などの構造的可塑性 (Structural plasticity) や、神経興奮性、大脳皮質マップ再編、脳領域間ネットワーク再編などの機能的可塑性 (Functional plasticity) が、脳卒中後の機能回復に寄与することが示されている¹⁰⁻¹⁴。さらに近年では、DTT (Diffusion tensor tractography : 拡散テンソルトラクトグラフィ) や MRS (Magnetic resonance spectroscopy 磁気共鳴スペクトロスコピー) といったイメージング技術により、ヒト脳内の神経線維の可視化や神経伝達物質の定量も可能となっており、実際の脳卒中患者に生じる神経可塑性についても明らかとなりつつある¹⁵⁻¹⁷。

しかしながら、こうした神経可塑性による回復機序があるにも関わらず、脳卒中後の機能回復の大部分は発症後 3 か月以内に生じ、その後はプラトーに達し回復が頭打ちになる傾向が示されている¹⁸⁻²¹。この背景にある神経学的機序として、脳卒中後の神経可塑性には、発達期の臨界期に似た「反応性が高まる限られた時間枠」が存在することが示唆されている^{12,22-24}。現在のコンセンサスでは、脳卒中発症後の時間軸は、超急性期 (Hyper-acute, 発症後 24 時間以内)、急性期 (Acute phase, 発症後 1-7 日)、亜急性期 (Subacute, 発症後 1 週-6 か月; 前期, Early Subacute, 1 週-3 か月; 後期, Late Subacute, 3-6 か月)、慢性期 (Chronic, 発症から 6 か月以降) という 4 つのフェーズに分類される²⁵。この中で、内因性の可塑性が特に高まる時間枠は亜急性期に該当し、超急性期・急性期における細胞死・炎症反応の後に生じる生物学的プロセスであると解釈されている²⁶。機能回復を目的とする今日の治療介入の多くは、この可塑性が高まる時間枠を活用し、中枢神経系で生じる可塑的变化を誘導・強化することで、脳卒中後の機能回復を促進している。

I-3. 脳卒中後の運動療法による可塑性修飾

今日の脳卒中医療において、リハビリテーションは脳卒中後の機能回復を図る治療介入として中心的な位置づけにある¹⁹。運動療法は、脳卒中リハビリテーションの一翼を担う理学療法において根幹を成す治療介入の1つであり、その機能回復効果は多くの臨床研究によって裏付けられる²⁷⁻³¹。一方で、運動依存的な機能回復は多くの場合不完全であるため、より効果的な運動療法の確立に向けて更なる検討が必要とされている^{32,33}。

脳卒中モデル動物を用いた基礎研究は、神経新生、軸索の発芽や伸展、シナプス形成、神経回路の再編といった様々な可塑的变化が、運動により増強されることを実証している³⁴。こうした運動介入による可塑性修飾は、運動誘発性神経可塑性 (Exercise-induced neuroplasticity) と近年ではしばしば称される³⁴⁻³⁶。この Exercise-induced neuroplasticity に寄与する分子基盤として、神経栄養因子が挙げられる。

脳や脊髄などの中枢神経系に広く存在している BDNF (Brain-derived neurotrophic factor : 脳由来神経栄養因子) は神経栄養因子の1つであり、高親和性受容体の Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) 受容体と結合し、BDNF-TrkB シグナル伝達経路を活性化することで、神経可塑性に有益な変化をもたらす^{37,38}。Ploughman らは、脳卒中モデルラットに対して、走行運動と前肢リーチ課題で構成されるトレーニングを行った場合に、通常であれば麻痺肢運動機能が回復することを示した上で、脳 BDNF 発現を抑制した状態では同様の介入を行っても機能回復が生じないことを実証した³⁹。この研究は、運動療法による機能回復効果を得るためには脳 BDNF 発現が極めて重要であることを、因果関係レベルで示した初の研究である。そのため、脳卒中リハビリテーションにおいて効果的な機能回復を促すためには、BDNF をはじめとする可塑性修飾因子に富んだ脳環境を作る必要性が示唆される。

中枢神経系における BDNF 発現を増強する運動様式として、有酸素運動が有効であることは広く知られており⁴⁰⁻⁴²、ヒトにおいても血中 BDNF 濃度が上昇することが確認されている^{42,43}。こうした運動介入による BDNF 発現増強効果の機序について全容は明らかでないものの、BDNF は神経活動に依存して発現が増強する特徴を有するため⁴⁴⁻⁴⁶、運動による BDNF 発現増強効果は、身体運動に伴う脳循環代謝の向上、それに続く神経活動の増強によってもたらされると考えられている³⁶。したがって、運動療法による有益な可塑性修飾を増強するためには、効率的な神経活動の惹起が重要であると推察される。

I-4. 興奮抑制バランスに基づく神経活動の調節

中枢神経系の神経活動すなわち神経細胞の活動電位は、神経細胞を脱分極/過分極させる刺激入力の総和が一定の閾値に達することで生じる。主に、脱分極はグルタミン酸をはじめとする興奮性神経伝達物質を介した興奮性シナプス入力により生じ、過分極は GABA (Gamma amino butyric acid : γ アミノ酪酸) など抑制性神経伝達物質を介した抑制性シナプス入力によって生じる⁴⁷。神経活動はこうした興奮抑制バランスに基づいて制御されていることから、「興奮性入力の増強」あるいは「抑制性入力の阻害」を図る介入は、神経活動の効率的な惹起につながることを期待される (図 1-2)。

今日、この興奮抑制バランスに基づく神経活動を非侵襲的に調節する Neuromodulation という技術が注目されている。現在、臨床研究が盛んに行われている tDCS (Transcranial direct current stimulation : 経頭蓋直流電気刺激) や TMS (Transcranial magnetic stimulation : 経頭蓋磁気刺激) は、電気刺激や磁気刺激を用いて神経活動を調節する Neuromodulation に位置づけられる。とりわけ tDCS の電気刺激は、直接的に活動電位を惹起するレベルの刺激ではなく、2 mA 以下の微弱な電気刺激を頭蓋骨の上から適用することにより、刺激領域における神経細胞の膜電位を脱分極方向へとシフトさせることを目的としている⁴⁸。すなわち、tDCS は神経活動が惹起されやすい易興奮性コンディショニングを行い、神経活動依存的な可塑性修飾を可能とする⁴⁹。

実際、tDCS は脳卒中患者の麻痺肢運動機能の改善に有効であることがメタアナリシスで示されている⁵⁰。しかし、同メタアナリシスにおいて tDCS の有効性を示した研究の多くは上肢機能の改善を報告しており、下肢機能への有効性を示した研究はわずか 2 報にとどまっている⁵⁰。加えて、他のメタアナリシスにおいては、下肢機能への tDCS の有効性は認められなかったと結論付けている⁵¹。こうした背景には、大脳縦裂内に位置する大脳皮質一次運動野の下肢領域は、頭表から遠く、従来の刺激様式では適用が困難であることが限界として指摘されている⁵²。

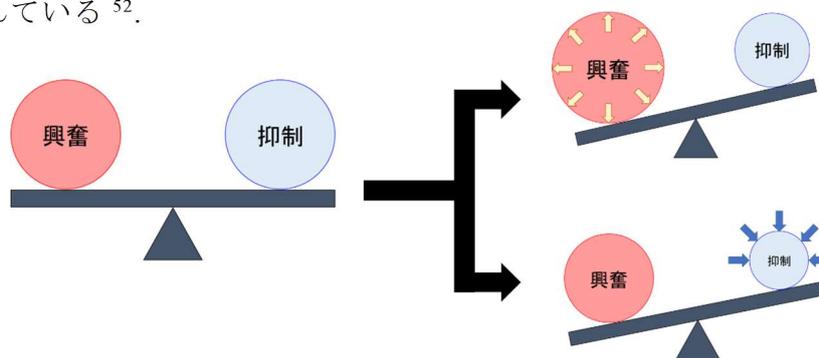


図 1-2. 興奮抑制バランスに基づく神経活動の調節

神経活動は、興奮と抑制のバランスに基づいて制御されていることから、「興奮性入力の増強」あるいは「抑制性入力の阻害」を図る介入は、神経活動の効率的な惹起につながると考えられる。

I-5. GABA 受容体を標的とする薬理的神経制御

そこで、tDCS と同様の易興奮性コンディショニングを生体内から調節する方法の 1 つとして、抑制性入力を阻害する薬理的なアプローチが挙げられる。中枢神経系において主要な抑制性の神経伝達を担う GABA は、細胞膜に存在するイオンチャネル型の GABA_A 受容体と結合することで、細胞内への塩化物イオン (Cl⁻) の流入をもたらす、過分極方向すなわち抑制性に作用する⁵³⁻⁵⁷ (実際は細胞内 Cl⁻ 濃度に依存するため、一部の条件下においては興奮性作用も示す^{58,59})。また、GABA_A 受容体を介した抑制作用は、シナプス内 GABA_A 受容体による一過性の抑制 (Phasic inhibition) と、シナプス外 GABA_A 受容体による持続的な抑制 (Tonic inhibition) という 2 つの抑制様式に大別される⁶⁰ (図 1-3)。このように、幅広い抑制作用を担う GABA_A 受容体は、神経活動の恒常性が損なわれる疾患において興奮抑制バランスを是正するための潜在的な薬理標的であり⁶¹⁻⁶³、脳卒中もその例外ではない。

Clarkson らは、脳卒中モデルマウスを用いた研究から、病巣周辺皮質において Tonic inhibition が増強されていることを明らかにした⁶⁴。この所見は、脳卒中後の大脳皮質では抑制作用の増大により、神経興奮性の低下とそれに伴う活動依存的な可塑性が損なわれることを意味している。また同研究では、薬理的あるいは遺伝学的にこの Tonic inhibition を減弱させることで脳卒中後の機能回復が促進することを実証し、脳卒中後の過剰な Tonic inhibition は機能回復の阻害因子であることを見出した。Clarkson らの研究は、脳卒中後の機能回復を促進させる治療開発において、極めて重要な位置づけとなっており⁶⁵、その後多くの研究が、GABA_A 受容体阻害を目的とした薬理的介入の有効性を報告している⁶⁶⁻⁶⁹。これらを鑑みると、GABA_A 受容体の薬理的阻害は、活動依存的な可塑性を増強し、効果的な機能回復を促すための易興奮性コンディショニングとして期待される。

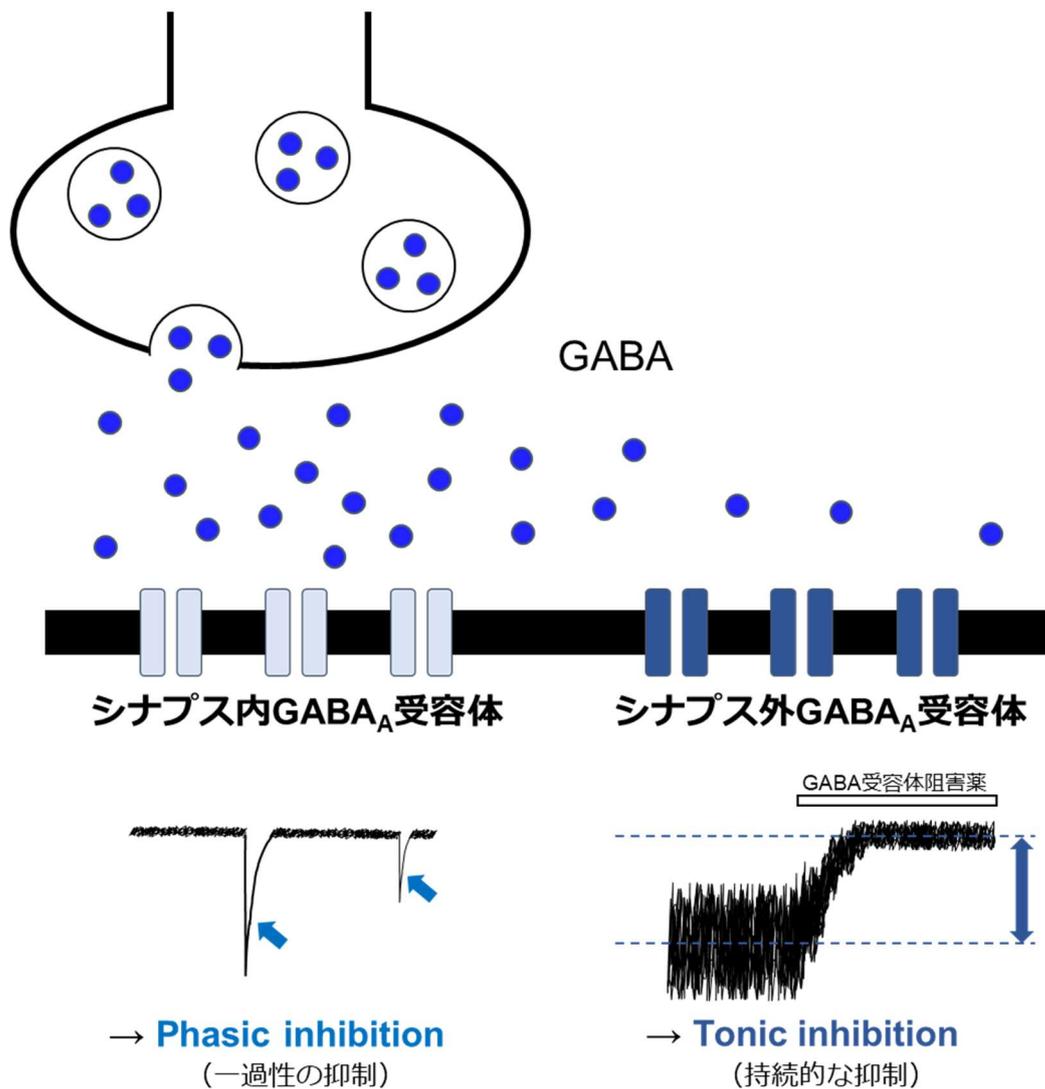


図 1-3. GABA_A 受容体を介した抑制様式

中枢神経系において、GABA は主要な抑制性の神経伝達を担う。GABA_A 受容体を介した抑制作用は、シナプス内 GABA_A 受容体による一過性の抑制 (Phasic inhibition) と、シナプス外 GABA_A 受容体による持続的な抑制 (Tonic inhibition) という 2 つの抑制様式に大別される。Phasic inhibition は、GABA が後シナプスにある GABA_A 受容体に結合した際に生じる抑制性シナプス後電流で表される。一方、シナプス外へと漏れてきた GABA により持続的に活性化されている Tonic inhibition は、受容体阻害薬を適用した際の基線の変化として表される。

I-6. 薬理的コンディショニングと運動介入の併用効果

前節までの知見をまとめると、①脳卒中後の機能回復において神経可塑性は重要な役割を果たし、運動療法はその可塑性に対して有益に寄与すること、②この運動療法による有益な可塑性修飾を増強するためには、効率的な神経活動の惹起が重要であること、③しかしながら、脳卒中後の大脳皮質においては GABA_A 受容体の抑制作用が増強し、神経活動が惹起されにくいコンディションとなること、④GABA_A 受容体の薬理的阻害は、易興奮性コンディショニングとなり得ること、が明らかとなった。そこで、これらの知見を統合し、脳卒中後の機能回復を効果的に促進する治療戦略について再考すると、「GABA_A 受容体阻害薬を用いた薬理的コンディショニングの下で運動療法を行った場合、活動依存的な可塑性修飾が強化され、より効果的に脳卒中後の機能回復が促進されるのではないか」という仮説を立てることができる。

この仮説に基づき、Takahashi らは健常マウスを対象に、GABA_A 受容体阻害薬 Bicuculline とトレッドミル走行による有酸素運動を 2 週間実施し、薬理的コンディショニングと運動介入の併用効果について検証した⁷⁰。その結果、薬剤投与あるいは運動介入のみでは大脳皮質運動野における BDNF 蛋白の発現増強は乏しいが、それらを併用することで各介入が相乗的に作用し、BDNF 蛋白発現が著しく増強されることが明らかとなった⁷⁰。この所見は、GABA_A 受容体の薬理的阻害が、運動介入効果を高めるための易興奮性コンディショニングとして有効であることを意味する。加えて、同様の介入を長期的に 4 週間行った筆者らの研究からは、Bicuculline 投与により小脳においても BDNF 発現が増強することが明らかとなった⁷¹。このことから、GABA_A 受容体阻害薬を用いた薬理的コンディショニングの効果は脳だけに留まらず、その受容体が存在する中枢神経系全体への波及性もあることが示唆される。

I-7. 脳梗塞モデル研究から得られた知見と解決すべき課題

前述の健常マウスの研究から得られた知見を脳卒中リハビリテーションに応用するため、筆者らは、MCAO (Middle cerebral artery occlusion : 中大脳動脈閉塞) 術による脳梗塞 MCAO モデルラットを対象に、脳梗塞後 3 日目から 2 週間の介入期間を設け、Bicuculline 投与による薬理的コンディショニングと運動介入の併用効果について検証した⁷²。その結果、Bicuculline 投与と運動介入を併用した群でのみ、麻痺肢運動機能の改善が認められ、この併用群特異的な機能回復には、損傷側半球の大脳皮質運動野における BDNF 発現の増強が関与している可能性が示された⁷²。MCAO モデルラットを用いたこの研究知見は、GABA_A 受容体の薬理的阻害が、脳卒中リハビリテーション効果を増強するための薬理的コンディショニングとなり得ることを示唆する重要な知見である。

一方で、この新たな治療戦略を臨床へと応用する将来を見据えた際には、様々な解決すべき課題が残っていた。第一に、脳卒中モデル動物の質に関する課題である。筆者らが以前に使用した MCAO モデルは、ヒト脳梗塞の発生機序を模しており、広く用いられている脳梗塞モデルである⁷³⁻⁷⁵。しかし、近年発表された国際的コンセンサスにおいては、MCAO モデルは組織損傷とその変動性が大きいことから、ヒト脳卒中への翻訳性が懸念されている⁷⁶。併せて、同コンセンサスにおいては、脳卒中後の長期的な機能転帰について検証することを推奨している⁷⁶。

第二に、脳卒中の病型に関する課題である。脳卒中病型は主に、脳梗塞と脳出血に大別されるが、両モデル動物を用いた過去の研究から、同部位同程度の組織損傷であっても脳卒中病型 (脳梗塞 or 脳出血) により回復過程が異なることが明らかとなっている^{77,78}。したがって、各病型によって回復機序や治療介入効果は異なることが推察されるため、脳出血後の薬理的コンディショニングと運動介入の併用効果については不明であった。また、脳出血研究の文献レビューでも指摘されているように、脳梗塞と比較し、脳出血の新規治療法に関する臨床試験例は非常に少ない⁷⁹。この背景には、脳出血モデルを対象とした基礎研究自体が不足していることが要因として推察される。

第三に、薬理的コンディショニングに用いる薬剤の課題である。筆者らが易興奮性コンディショニングの導入として用いた GABA_A 受容体阻害薬の Bicuculline は、GABA の結合部位 (オルソステリック部位) に作用する薬剤であるため、GABA_A 受容体全般を阻害する⁸⁰。中枢神経系で幅広い抑制作用を担う GABA_A 受容体のサブタイプ非特異的な阻害薬は、痙攣発作や不安惹起などの既知の副作用に加え、未知の副作用も懸念されている^{61,81}。こうした非特異的阻害に起因する副作用を回避する方法の 1 つは、サブタイプ特異的な阻害薬を用いることである⁸²。前述した Clarkson らの研究知見を鑑みると、脳卒中後の機能回復を促進するためには、Tonic inhibition に関与するシナプス外 GABA_A 受容体の特異的阻害に着目し、運動介入との相乗効果について検証することが有望であると考えられる。

I-8. 本研究の目的

以上より本研究は、脳卒中後の機能回復を効果的に促進する治療戦略の Proof of concept study として、Tonic inhibition に関与する GABA 受容体を標的とした薬理的神経制御と運動療法の併用が脳出血後の機能回復に与える影響を明らかにすることを主目的とした。本研究の全体像を図 1-4 に示す。

はじめに、対象とする脳出血モデルの妥当性について検証を行った (第II章)。ここでは、内包損傷を伴う脳出血モデルラットの機能障害の特徴を明らかにすることを目的に、行動学的評価を用いて長期的 (脳出血後 1 か月間) な機能転帰を評価した。加えて、機能回復の素子となり得る BDNF 発現について、運動機能局在の中枢である大脳皮質運動野に着目し検証を行った。

次に、Tonic inhibition を担うシナプス外 GABA_A 受容体の特異的阻害による薬理的神経制御の効果検証を行った (第III章)。ここでは、シナプス外 GABA_A 受容体の主要サブユニットである $\alpha 5$ を含んでいる $\alpha 5$ GABA_A 受容体に着目し、その特異的阻害薬 (L-655,708) を用いた。また、薬理的神経制御の効果を明確にするため、本研究は健常ラットを対象とした。本章の目的は、L-655,708 の単回投与が中枢神経領域 (大脳皮質、海馬、脊髄) における神経活動に与える影響を、生化学的手法を用いて明らかにすることとした。加えて、行動学的評価も実施し、自発的活動性や懸念される副作用への影響についても検証した。

最後に、以上から得られた知見を基に、脳出血モデルラットに対する薬理的コンディショニングと運動介入の併用効果について検証した (第IV章)。ここでは、各介入が脳出血後の機能回復に与える影響のみならず、神経栄養因子発現や軸索発芽・シナプス形成といった観点から、各介入が大脳皮質および脊髄における神経可塑性へ与える影響についても明らかにすることを目的とした。

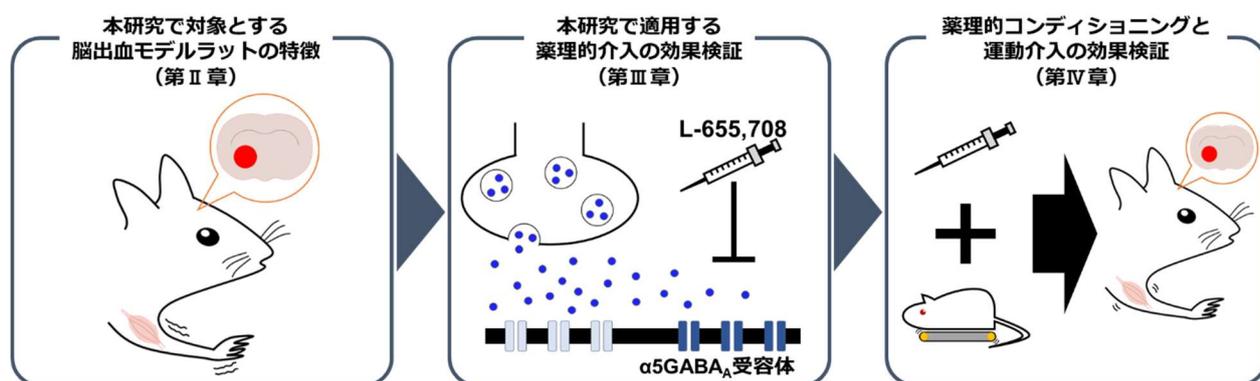


図 1-4. 本研究の全体像

本研究は、3つの研究を通じて、脳卒中リハビリテーションにおける新たな治療戦略のコンセプトについて検討を行った。

第 II 章

内包損傷を伴う脳出血後の機能障害と神経栄養因子発現の特徴

【Inoue et al., *Brain Research* 1767, 147536, (2021)】

II-1. 背景

近年の脳出血に関する疫学的調査の1つとして、2008年から2012年にかけて行われた世界的な大規模臨床試験 (INTERACT2) の結果がある。INTERACT2の結果から、脳出血による損傷部位の上位は被殻、内包後脚、視床であることが明らかとなっており、とりわけ内包後脚が損傷した場合は、重度の身体機能障害とQOL低下をもたらすことが示されている⁸³。内包は、主要な運動性下降路である皮質脊髄路が通過しており、脳出血好発部の被殻と視床の近辺に位置するため損傷を受けやすい⁸⁴。しかしながら、脳出血モデルを対象とする基礎研究においては、内包よりも前方の線条体 (被殻+尾状核) を出血巣とする線条体出血モデルが慣例的に用いられており、内包損傷の有無が考慮されていない問題点が近年指摘されている⁸⁵。

そこで本章では、2018年にLiuらによって確立された内包損傷を伴う脳出血モデル (IC-ICHモデル) ラットを使用し、その機能障害の特徴について精査することとした。同様のIC-ICHモデルは、従来の線条体出血モデルと比較し運動機能障害が重度であるという報告が散見されるものの⁸⁶⁻⁸⁸、運動機能障害以外の行動学的特徴については不明な点が多い。こうした現状を踏まえ、本章はIC-ICHモデルを対象に、脳出血後の運動機能障害だけでなく、自発的活動性や不安様行動についても、脳出血後1か月間 (4週間) にわたる経時的変化を明らかにすることを目的とし、本研究で用いる脳卒中モデルとしての妥当性を検討した。

加えて、本章では、IC-ICHモデルの大脳皮質におけるBDNF発現についても検証を行った。BDNFは脳卒中後の機能回復や運動依存的な可塑性修飾の重要な素子であるとされているが、脳卒中後のBDNF発現動態は脳部位により異なり、病巣部位、発症からの時間といった様々な因子により変動する⁸⁹⁻⁹²。また、脳出血後のBDNF発現を検証した過去の研究は、BDNF遺伝子 (BDNF mRNA) もしくはBDNF蛋白のいずれかの発現動態に着目しており⁹³⁻⁹⁶、脳出血後のBDNF発現の体系的な理解には至っていない。

以上より本章の目的は、IC-ICHモデルラットの行動学的機能障害および大脳皮質運動野におけるBDNF発現の特徴を明らかにすることであった。

II-2. 方法

II-2-1. 対象および実験概要

本章の実験概要を図 2-1 に示す。手術実施時において 9 週齢の雄性 Wistar ラット 16 匹 (282.0 ± 12.4 g, 平均値 \pm 標準偏差) を, 偽手術による手術侵襲のみを与える SHAM 群 ($n = 7$) と, 脳出血を誘導する ICH 群 ($n = 8$) の 2 群に無作為に割り当てた。手術中に死亡したラット 1 匹は対象から除外された。

ラットは 12 時間の明暗サイクルの下, 餌と水が自由に摂取できる環境で飼育された。本研究は北海道大学動物実験委員会による審議を経て, 北海道大学総長の承認の下で「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り実施された (承認番号: 19-0101)。

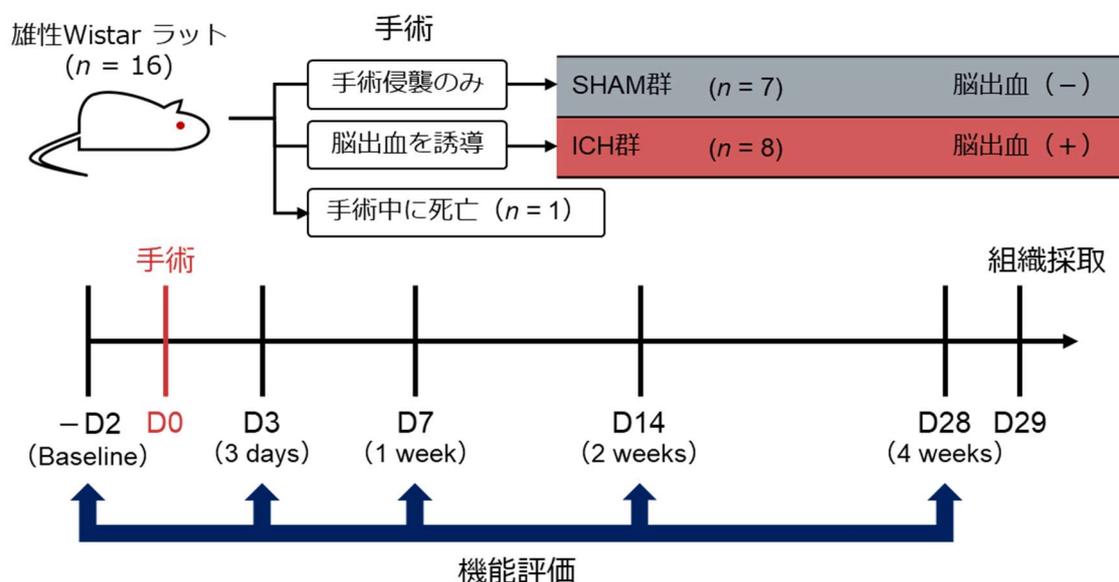


図 2-1. 本章の実験概要

雄性 Wistar ラットを SHAM 群と ICH 群の 2 群に割り当て, 脳出血後の機能障害の経時的変化を検証した。行動学的な機能評価として, 運動機能障害を評価する Cylinder test と, 自発的活動性および不安様行動を評価する Open field test を実施した。脳出血後 4 週間の機能評価を行った後に組織採取を行い, 採取した大脳皮質組織から BDNF 発現を定量した。

II-2-2. 脳出血モデルの作成

先行研究の手術プロトコルに基づき⁸⁶, 左線条体・内包領域 (bregma より後方 2.0 mm, 左外側 3.7 mm, 深さ 6.0 mm) に血管基底膜を破壊する酵素であるコラゲナーゼを注入することで内包損傷を伴う脳出血モデルを作成した. 硫酸アトロピン 10 mg/kg (ニプロ ES ファーマ, 日本) の腹腔内投与による副交感神経ブロック後, 塩酸メドトミジン 0.15 mg/kg (ドミツール, 日本全薬工業, 日本), ミタゾラム 2 mg/kg (ドルミカム, 丸石製薬, 日本), 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg (ベトルファール, Meiji Seika ファルマ, 日本) で構成される三種混合麻酔薬 2.5 mL/kg を腹腔内投与し全身麻酔をかけた後, ラットを脳定位固定器 (SR-5R-HT, ナリシゲ, 日本) に固定した. 手術中はヒーターマット (KN-475-3-40, 夏目製作所, 日本) を使用し, ラットの体温を約 37°C に維持した. 頭部の皮膚を正中切開し, ドリルを用いて頭蓋骨 (bregma より後方 2.0 mm, 左外側 3.7 mm) に直径約 1.5 mm の小穴を開け, マイクロシリンジ (Hamilton® syringe 701N, Hamilton, USA) を脳表面から 6.4 mm の深さまで挿入し, 0.4 mm 引き戻した. 続いて, Type IV コラゲナーゼ溶液 0.24 U (C5138, Sigma-Aldrich, USA) を生理食塩水 1.2 μ L (0.9% NaCl, 大塚生食注, 大塚製薬, 日本) に溶解し, 電動マイクロインジェクター (IMS-20, ナリシゲ, 日本) を用いて流速 0.2 μ L/min で 6 分間かけて注入した. コラゲナーゼ溶液注入後, 溶液の逆流を防ぐため, 注射針を 7 分間留置した後, 1 mm 引き上げ更に 2 分間留置した後に注射針を引き抜いた. 偽手術の場合は同様の手順でコラゲナーゼ溶液の代わりに生理食塩水 1.2 μ L を注入した. 切開部を縫合・消毒した後にラットをケージに戻し, 塩酸メドトミジン拮抗薬のアンチセダン 0.75 mg/kg (日本全薬工業) を投与し, 意識が回復するまで安静にさせた. 術後疼痛管理のために鎮痛剤の Carprofen 4.4 mg/kg (PHR1452, Sigma-Aldrich) を皮下投与した.

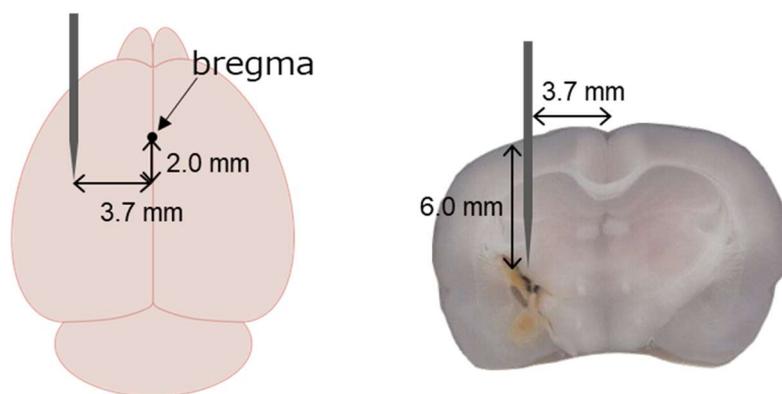


図 2-2. 脳出血モデル手術の概要

左線条体・内包領域 (bregma より後方 2.0 mm, 左外側 3.7 mm, 深さ 6.0 mm) に, 血管基底膜を破壊する酵素であるコラゲナーゼ溶液を注入することで, 内包損傷を伴う脳出血モデルを作成した.

II-2-3. 行動学的評価

手術 2 日前 (Baseline), 手術後 3 日目 (3 days), 7 日目 (1 week), 14 日目 (2 weeks), 28 日目 (4 weeks) に, Cylinder test および Open field test を実施し, 脳出血後の行動学的な機能障害を評価した. 各テストの評価手順は以下に示す.

Cylinder test

前肢使用の非対称性を評価するために実施した (図 2-3). 先行研究のプロトコルに基づき^{72,97}, ラットを円柱状の亚克力シリンダー (直径 20 cm, 高さ 45 cm) に入れ, 3 分間ビデオ撮影した. ラットが立ち上がった際, 壁に触れた前肢の回数を, 右前肢 (麻痺肢), 左前肢, 両前肢でそれぞれカウントし, 麻痺肢の使用率を以下の計算式により算出した. 麻痺肢使用率は両前肢を均等に使用した場合 50%となり, 脳卒中による運動機能障害がある場合, 麻痺肢使用率が低値となる.

$$\text{麻痺肢使用率 (\%)} = \{(\text{右前肢使用回数} + \text{両前肢使用回数} \times 0.5) / \text{総使用回数}\} \times 100$$



図 2-3. Cylinder test の様子

Cylinder test では, シリンダー内のラットの行動を観察した. 通常, ラットは立ち上がった際に両前肢を壁に触れるが (左写真), 脳卒中による運動機能障害がある場合, 麻痺肢は不使用となる (右写真, 矢印は麻痺肢).

Open field test

自発的活動性および不安様行動を評価するために実施した (図 2-4). 先行研究のプロトコルに基づき^{98,99}, ラットの背部を赤色マーカーで着色し, 白色のオープンフィールド (60 cm × 60 cm) の中央に配置した後, 自由行動する様子を 5 分間ビデオ撮影した (フレームレート 30 fps). 各ラットのテスト毎に, 70%エタノールでフィールドを消毒・清掃した.

Open field test の解析手順を図 2-5 に示す. 撮影した動画ファイルは, フレーム毎の画像ファイルに分割した. その後, MATLAB software (R2019b, MathWorks Inc, USA) を用いて, 各画像ファイルからラットの赤色マーカーを検出し位置座標を同定した. 自発的活動性の評価として, 各フレーム間のマーカー位置の変位量を算出し, 5 分間の総移動距離を定量した. また, 不安様行動の評価として, 各辺を 5 分割した 5 × 5 エリア (1 エリア : 12 cm × 12 cm) を作成し, 四隅のエリア (Corner area) に滞在した時間の合計 (Corner area 滞在時間) と, 外周エリア (Peripheral area) に滞在した時間の合計 (Peripheral area 滞在時間) をそれぞれ算出した. Open field test において, 不安の強いラットは中央での滞在を避けて壁際周辺領域に滞在する^{100,101}. そのため, Corner area 滞在時間もしくは Peripheral area 滞在時間の高値は, 不安様行動を示す.

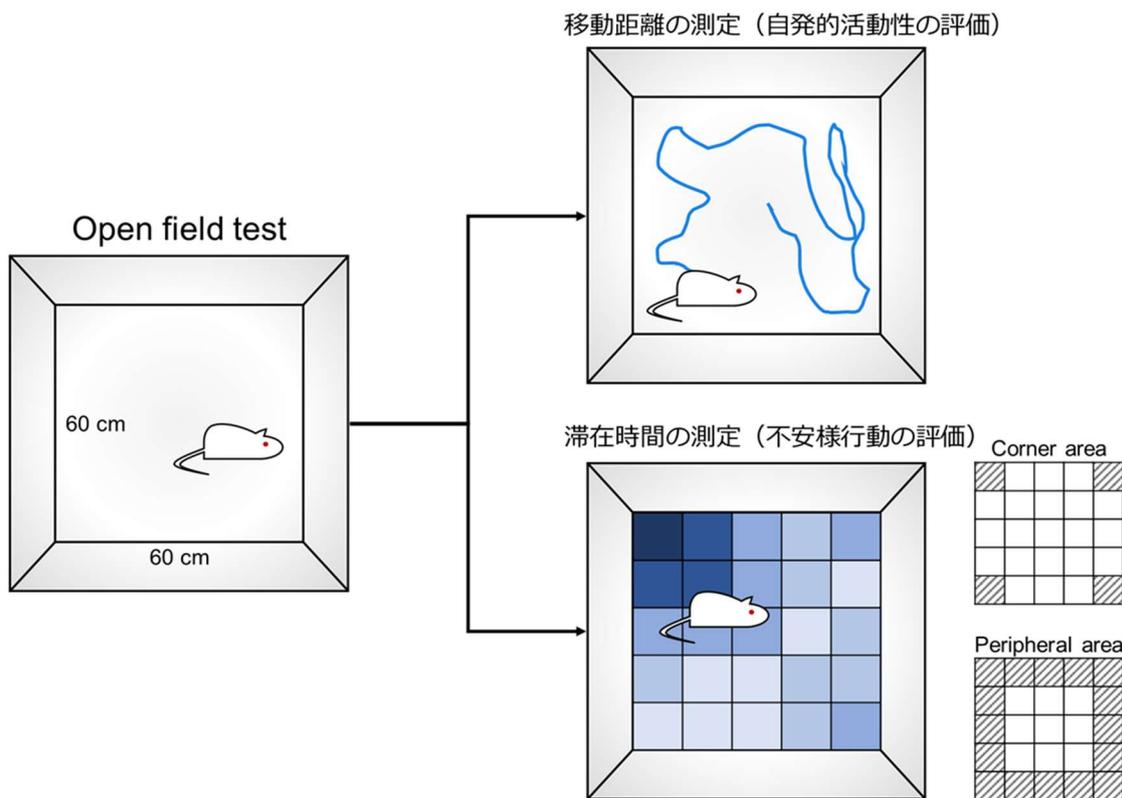


図 2-4. Open field test で測定した指標

Open field test では, フィールド内のラットの自由行動を撮影し, 移動距離および滞在領域を定量することで, 自発的活動性および不安様行動を評価した.

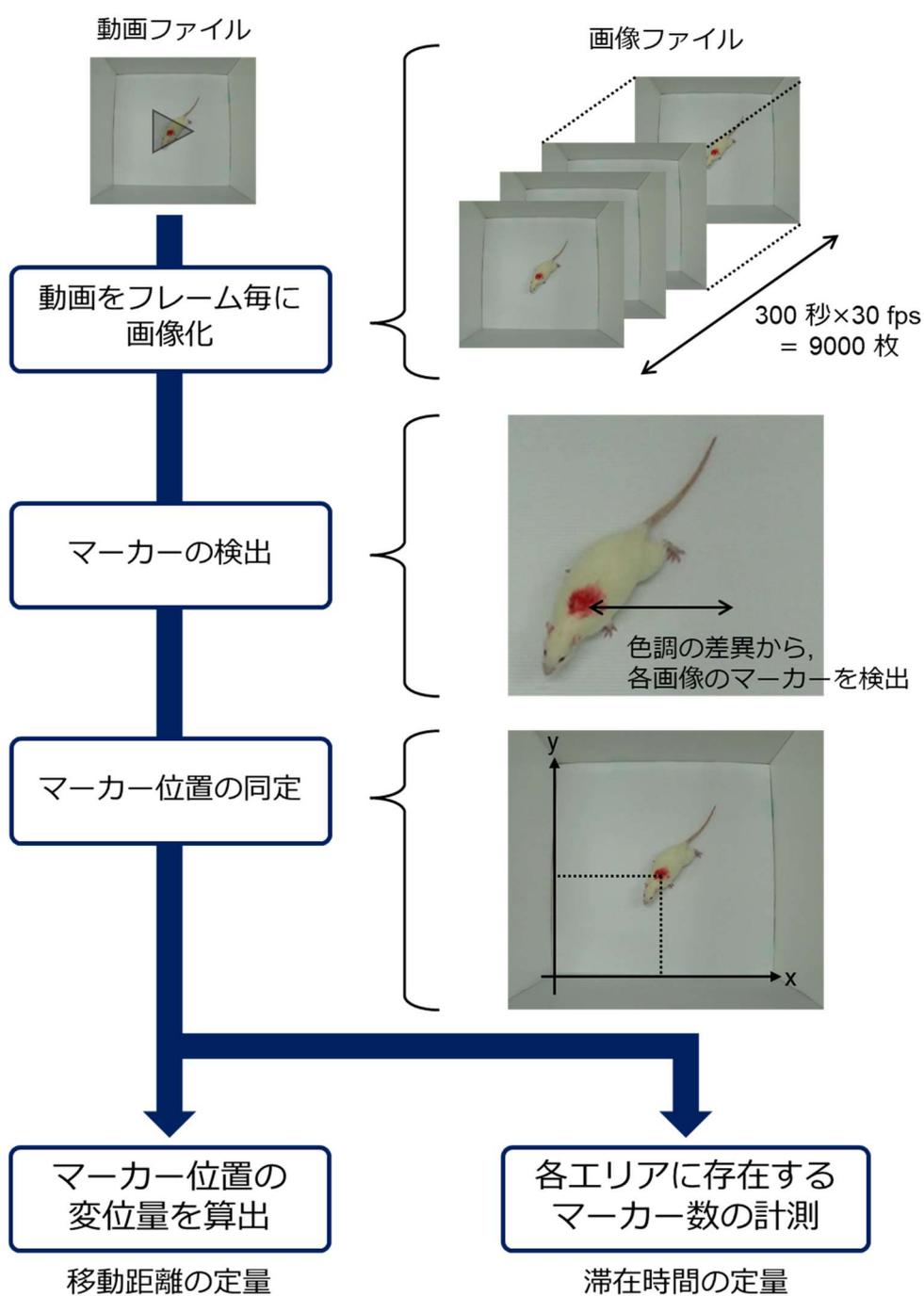


図 2-5. Open field test の解析手順

撮影した動画ファイルは、フレーム毎の画像ファイルに分割した。続いて、MATLAB ソフトウェアを用いて、各画像ファイルから赤色マーカーを検出し、マーカー位置を同定した。その後、マーカー位置の変位量を算出することでラットの移動距離を定量し、各エリア (Corner area および Peripheral area) に存在するマーカー数を計測し滞在時間を定量した。

II-2-4. 組織採取

ICH手術から約4週間後(29日目, 図2-1)に, SHAM群とICH群の組織採取を実施した. ラットを4%抱水クロラル(05-2660-5, Sigma-Aldrich, USA)の過剰投与(25 mL/kg)による深麻酔下状態にした後に, 生理食塩水で経心灌流を行った. 脱血後に全脳を採取し, ブレインスライサ(MK-RC-01, 室町機械, 日本)を用いて, bregmaから前方に3枚, 後方に3枚, 計6枚の前額断脳スライスを厚さ2 mmで作成した(図2-6). 撮影した全ての脳組織画像は盲検化された2名の検者により, 1) SHAM群の全てのラットに出血損傷領域が存在しないこと, 2) ICH群の全てのラットに出血損傷領域が存在すること, の2点が確認された.

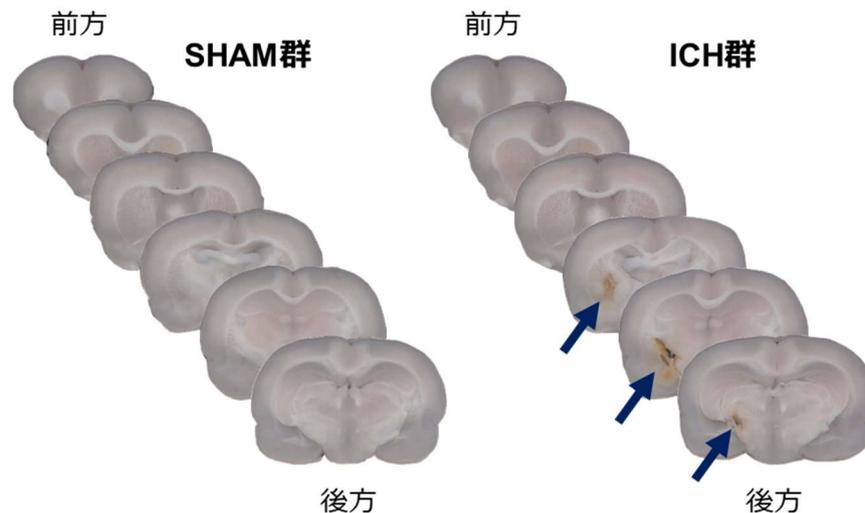


図2-6. 各群から採取した脳組織

ICH手術から4週間後に採取した各群の脳組織の画像. 各断面は前方から bregma 前後 4.0, 2.0, 0.0, -2.0, -4.0, -6.0 mm を示す. ICH群の矢印は出血損傷領域を示す.

その後、ラット脳アトラスを参考に¹⁰²、前方から2枚目の前額断スライスの大脳皮質運動野 (bregma 2.0 ~ 4.0 mm) を RNA 抽出に、前方から3枚目の前額断スライスの大脳皮質運動野 (bregma 0.0 ~ 2.0 mm) を蛋白抽出に使用するためにそれぞれ採取した (図 2-7). 各試料はドライアイス上で凍結させた後に、生化学的解析に使用するまでディープフリーザー (-80°C) で保存した. なお, RNA 抽出に使用する組織は, 直ちに各組織の約 10 倍量の RNA stabilization reagent (RNAlater, QIAGEN, オランダ) の液中に浸し, RNA を安定化させて保存した.

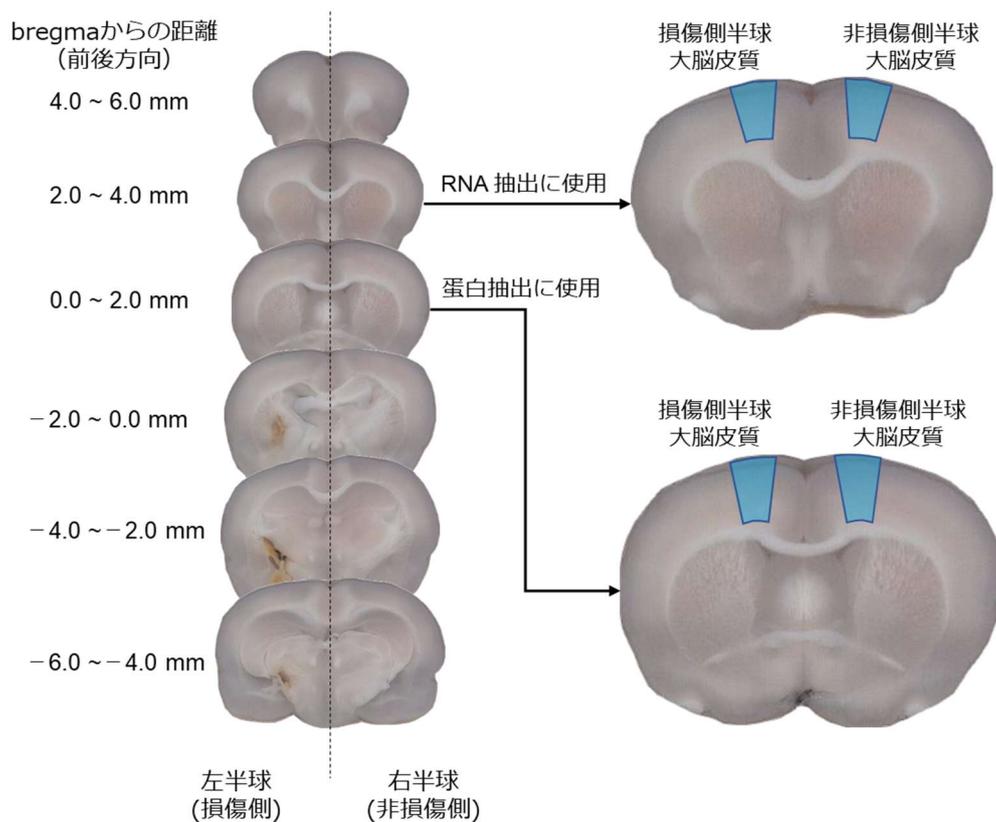


図 2-7. 大脳皮質サンプルの採取

ラット脳アトラスを参考に、前方から2枚目 (bregma 2.0 ~ 4.0 mm) と3枚目 (bregma 0.0 ~ 2.0 mm) の前額断スライスから大脳皮質運動野を各半球から採取した (青枠部分).

II-2-5. 生化学的解析

RNA サンプルの抽出と cDNA の作成

採取した大脳皮質組織を QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) 1 mL 中に移し、ホモジナイザー (PowermasherII, BioMasherII, ニッピ, 日本) を使用し組織を磨砕した。その後は, RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) の手順に従い, 磨砕した組織を含む QIAzol Lysis Reagent にクロロホルム (Cat#: 038-02606, 富士フイルム和光純薬, 日本) 200 μ L を加え十分に攪拌した。その後, 遠心分離器 (Centrifuge 5417R, eppendorf, ドイツ) を用いて, 遠心分離し (13000 rpm, 4 °C, 15 分), 上清液を約 600 μ L 回収した。そこに 70% エタノールを 600 μ L 加え, 十分に攪拌した後に再び遠心分離した (10000 rpm, 室温, 20 秒)。その後, Buffer RW1 700 μ L を加え, 再び遠心分離した (10000 rpm, 室温, 20 秒)。その後, Buffer RPE 500 μ L を加え, 再び遠心分離した (10000 rpm, 室温, 2 分)。最後に, RNase-free water 30 μ L を加え遠心分離 (10000 rpm, 室温, 1 分) する工程を 2 度繰り返し, 総 RNA サンプルを含む RNase-free water を 60 μ L 回収した。後日, 分光光度計 (NanoDrop ND-2000, Thermo Scientific, USA) を使用し, 付属の手順に準じて, 各サンプルの総 RNA 濃度を測定した。この時, すべての採取組織から RNA が 50 ng/ μ L 以上の濃度で抽出できていることを確認した。

続いて, High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4374966, Applied Biosystems, USA) に付属の 10 \times RT Buffer 2.0 μ L, 10 \times RT Random Primers 2.0 μ L, 25 \times dNTP Mix 0.8 μ L, MultiScribe Reverse Transcriptase 1.0 μ L, RNase Inhibitor 1.0 μ L, RNase-free water 3.2 μ L を混合した 2 \times Reverse Transcription Master Mix 10 μ L と総 RNA が 500 ng 含まれるサンプル 10 μ L を混合し, TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (TP600, タカラバイオ, 日本) を用いて逆転写を行った。25 °C (10 分), 37 °C (120 分), 85 °C (5 分) で反応させた後, 4 °C でインキュベートすることで各サンプルの cDNA を 20 μ L 作成した。

定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現量の相対定量

作成した cDNA を用いて, リアルタイム PCR システム (StepOnePlus™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems) を用いた定量的 PCR を行った。TaqMan® Fast Advanced Master Mix 10 μ L, RNase-free water 7 μ L, ターゲット遺伝子の BDNF (Assay ID: Rn02531967_s1, Applied Biosystems) ならびに内部標準遺伝子 β -actin (4352340E, Assay ID: Rn00667869_m1, Applied Biosystems) の TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) をそれぞれ 1 μ L, 各 cDNA サンプル 1 μ L, 計 20 μ L を 96-well の PCR プレート (μ ltraAmp PCR Plate, Sorenson BioScience, USA) の各 well 内に混合した。その後, PCR プレートを 50 °C (2 分), 95 °C (20 秒) で反応させ, 続けて 95 °C (1 秒) と 60 °C (20 秒) のサイクルを 40 回行いターゲット遺伝子と内部標準遺伝子を増幅した。発現量の定量は比較 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) に基づ

き、内部標準遺伝子 β -actin の発現量で正規化した後、各半球における SHAM 群を基準に ICH 群の BDNF mRNA 発現量を相対定量した。

総蛋白サンプルの抽出

Minute™ Total Protein Extraction Kit (SD-001/SN-002, Invent Biotechnologies, USA) を使用し、採取した大脳皮質から総蛋白を抽出した。蛋白質の分解およびリン酸化を防ぐために、抽出キット付属の Native Cell Lysis Buffer (SN-002) 100 mL に AEBSF 104 mM, Aprotinin 80 μ M, Bestatin 4 mM, E-64 1.4 mM, Leupeptin 2 mM, Pepstatin A 1.5 mM を含有する 1 mL のプロテアーゼ阻害剤 (Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts, P8340, Sigma-Aldrich, USA) およびホスファターゼ阻害剤 (PhosSTOP™, Roche, スイス) を加えた。その後、付属の手順に準じて、各凍結組織をフィルターカートリッジに乗せプラスチックロッドで 50–60 回磨砕した。そこに Lysis Buffer 200 μ L を加え、再びプラスチックロッドで 30–60 回磨砕した。氷上で 5 分間インキュベートした後、遠心分離し (13000 rpm, 4 °C, 1 分)、総蛋白が含まれる抽出液 200 μ L を回収した。

続いて、Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Cat#: 23227, Thermo Scientific) を使用し、抽出した蛋白サンプルの総蛋白濃度を BCA 法により定量した。付属の手順に準じて、96-well マイクロプレート (Cat#: 3590, Corning, USA) の各 well 内に、蛋白サンプル 10 μ L と BCA working reagent 200 μ L を混合し、37 °C で 30 分間インキュベートした。その後、プレートリーダー (ARVO MX 1420-032, PerkinElmer, USA) を用いて波長 560 nm における吸光度を測定した。ウシ血清アルブミン標準液 (20-2000 μ g/mL) により作成された検量線を基に、各蛋白サンプルの総蛋白濃度を算出した。

ELISA 法による BDNF 蛋白発現量の定量

Mature BDNF Rapid ELISA Kit (BEK-2211, Biosensis, USA) を用いて、蛋白サンプルに含まれる BDNF 蛋白量を定量した。付属の手順に準じて、BDNF 補足抗体がプレコーティングされたマイクロプレートに、蛋白サンプル 40 μ L と RNase-free water 60 μ L を混合した 100 μ L または BDNF 標準液 (7.8-500 pg/mL) 100 μ L を各 well に加え、45 分間 140 rpm で振盪しながら室温でインキュベートした。その後、wash buffer で各 well を 5 回洗浄した後、Assay diluent に 100 倍希釈した BDNF 検出抗体 100 μ L を各 well に加え、30 分間 140 rpm で振盪しながら室温でインキュベートした。再度、wash buffer で各 well を 5 回洗浄した後、Assay diluent に 100 倍希釈した二次抗体 (HRP 標識された Streptavidin) 100 μ L を各 well に加え、30 分間 140 rpm で振盪しながら室温でインキュベートした。再度、wash buffer で各 well を 5 回洗浄した後、TMB substrate 100 μ L を各 well に加え、室温の暗所で 10 分間インキュベートした。最後に、TMB stop solution 100 μ L を各 well に加えた後、プレートリーダー

ー (ARVO MX 1420-032, PerkinElmer) を用いて波長 450 nm における吸光度を測定した. BDNF 標準液により作成された検量線を基に BDNF 濃度を算出し, 総蛋白濃度を用いて正規化することで総蛋白 1.0 mg あたりの BDNF 蛋白発現量を算出した. その後, 各半球における SHAM 群の平均値を基準に, ICH 群の蛋白発現量を相対値で示した.

II-2-6. 変数処理および統計解析

事前解析として, SHAM 群および ICH 群の大脳皮質 BDNF 発現量を半球間で比較検証したところ, BDNF mRNA 発現量において手術侵襲の影響が認められた (補遺 1). したがって, 手術侵襲の影響を排除するために, BDNF 発現量は各半球における SHAM 群の平均値に基づきそれぞれ正規化された.

統計解析には SPSS Statistics (v26.0, IBM, USA) を使用した. Cylinder test および Open field test の各指標には, 時間 (Baseline, 3 日目, 1 週目, 2 週目, 4 週目) および群 (SHAM 群, ICH 群) を二要因とする二元配置反復測定分散分析を実施した. 有意な交互作用が認められた場合, 事後検定として Bonferroni 検定を用いて, 各群内の経時的変化の検証ならびに各時点における群間比較を行った. BDNF mRNA 発現量および蛋白発現量は, 対応のない t 検定 (両側検定) を用いて SHAM 群と ICH 群の群間比較を行った. 二変数間の関連性の検証には, Pearson の相関係数 (r) を用いて相関分析を行った. 有意水準はそれぞれ 5%とした.

II-3. 結果

II-3-1. 行動学的評価

Cylinder test における麻痺肢使用率の経時的変化を図 2-8A に示す。二元配置反復測定分散分析の結果、麻痺肢使用率において有意な交互作用および各要因の有意な主効果が認められた (交互作用: $F_{4,52} = 4.424, p = 0.004$, 時間: $F_{4,52} = 2.706, p = 0.040$, 群: $F_{1,13} = 26.525, p < 0.001$)。事後検定の結果、脳出血後の ICH 群の麻痺肢使用率は、Baseline と比較し有意に減少し (Baseline vs. 3 days, $p = 0.012$; vs. 1 week, $p = 0.002$; vs. 2 weeks, $p = 0.003$; vs. 4 weeks, $p = 0.006$)、脳出血後のいずれの時点においても SHAM 群と比較し有意に低値であった (3 days, $p < 0.001$; 1 week, $p = 0.005$; 2 weeks, $p = 0.004$; 4 weeks, $p = 0.013$)。Baseline における有意な群間差、SHAM 群における有意な経時的変化は認められなかった。

Open field test における総移動距離の経時的変化を図 2-8B に示す。二元配置反復測定分散分析の結果、総移動距離に有意な交互作用および時間の主効果が認められた (交互作用: $F_{4,52} = 2.964, p = 0.028$; 時間: $F_{4,52} = 9.774, p < 0.001$; 群: $F_{1,13} = 0.058, p = 0.813$)。事後検定の結果、ICH 群の総移動距離は Baseline と比較し、脳出血後 3 日目、1 週目、4 週目に有意に減少し (Baseline vs. 3 days, $p = 0.005$; vs. 1 week, $p = 0.006$; 4 weeks, $p < 0.001$)、4 週目の総移動距離は 2 週目と比較し有意に減少した (2 weeks vs. 4 weeks, $p = 0.005$)。SHAM 群における総移動距離については有意な経時的変化は認められず、いずれの時点においても SHAM 群と ICH 群の間に有意な群間差は認められなかった。また、各エリアの滞在時間の経時的変化を図 2-8C,D に示す。二元配置反復測定分散分析の結果、いずれの滞在時間においても有意な交互作用および主効果は認められなかった (Corner area 滞在時間, 交互作用: $F_{4,52} = 0.704, p = 0.593$, 時間: $F_{4,52} = 1.461, p = 0.227$, 群の主効果: $F_{1,13} = 1.204, p = 0.292$, 図 2-8C; Peripheral area 滞在時間, 交互作用: $F_{4,52} = 2.117, p = 0.092$, 時間: $F_{4,52} = 1.586, p = 0.192$, 群: $F_{1,13} = 0.064, p = 0.804$, 図 2-8D)。

これらの結果を総括すると、内包損傷を伴う脳出血後には、①麻痺肢の著明な運動機能障害を呈し、その障害が長期的に持続すること、②自発的活動性が脳出血後急性期に低下し、一時的に回復した後に再び低下すること、③脳出血に起因する不安様行動は認められないこと、がそれぞれ示された。

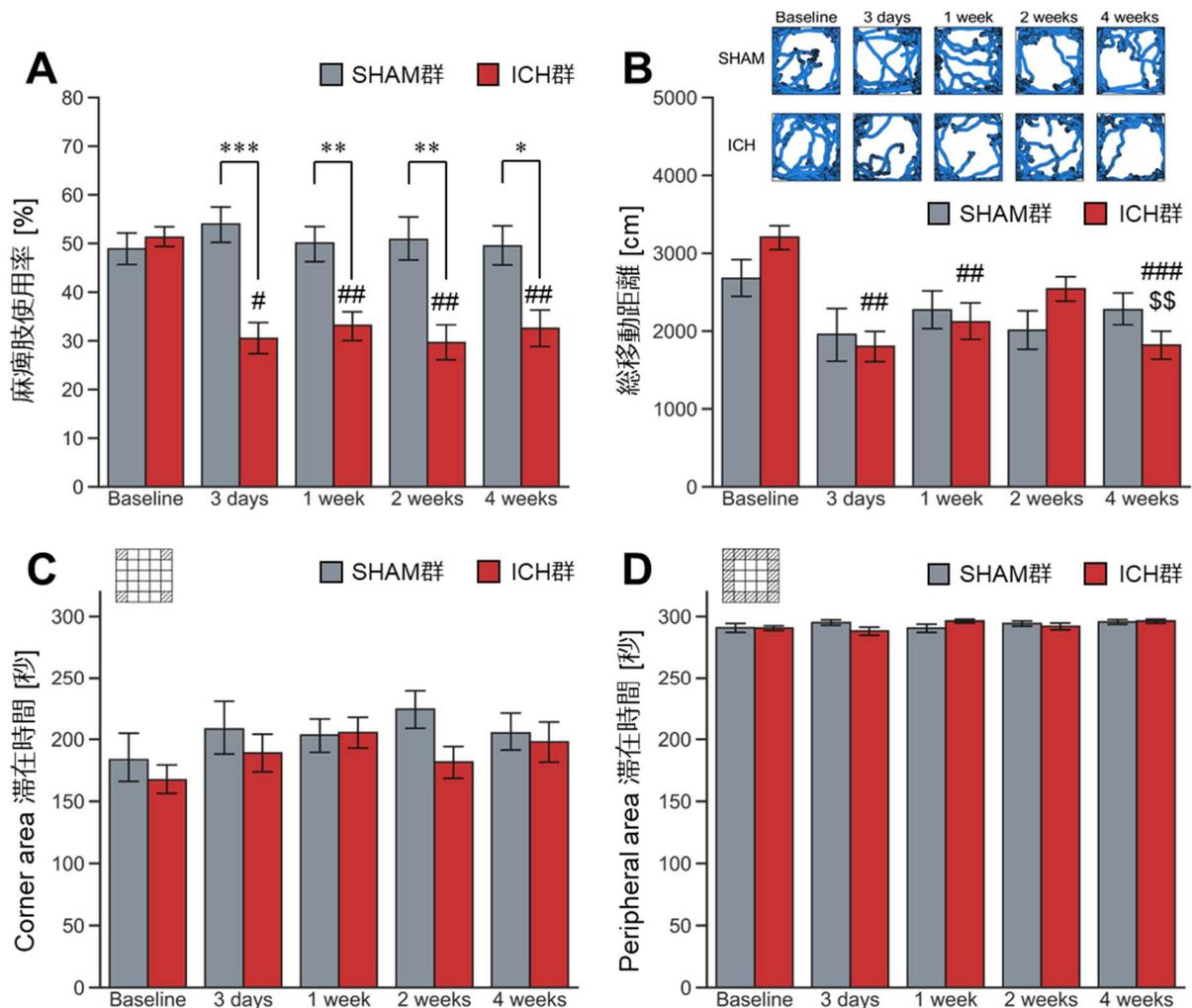


図 2-8. 脳出血後の行動学的機能障害の経時的変化

各グラフは Cylinder test における麻痺肢使用率 (A), Open field test における総移動距離 (B, 上図は代表的な移動軌跡), Corner area 滞在時間 (C), Peripheral area 滞在時間 (D) を示す。脳出血後の ICH 群の麻痺肢使用率は、Baseline と比較し有意に減少し、脳出血後のいずれの時点においても SHAM 群と比較し有意に低値であった (A)。ICH 群の総移動距離は Baseline と比較し、脳出血後 3 日目、1 週目、4 週目に有意に減少し、4 週目の総移動距離は 2 週目と比較し有意に減少していた (B)。結果は平均値±標準誤差で表記した。[* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ SHAM vs. ICH]. [# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. Baseline]. [\$\$ $p < 0.01$, vs. 2 weeks].

II-3-2. BDNF 発現量

mRNA 発現量

各群の脳皮質運動野における BDNF mRNA 発現量を図 2-9 に示す。いずれの半球においても, SHAM 群と ICH 群の BDNF mRNA 発現量に有意差は認められなかった (損傷側半球, $t = -0.761, p = 0.460$, 図 2-9A; 非損傷側半球, $t = 1.613, p = 0.131$, 図 2-9B)。この結果は, 脳出血後 4 週目において, 脳出血は脳皮質 BDNF mRNA 発現量に影響を与えないことを示している。

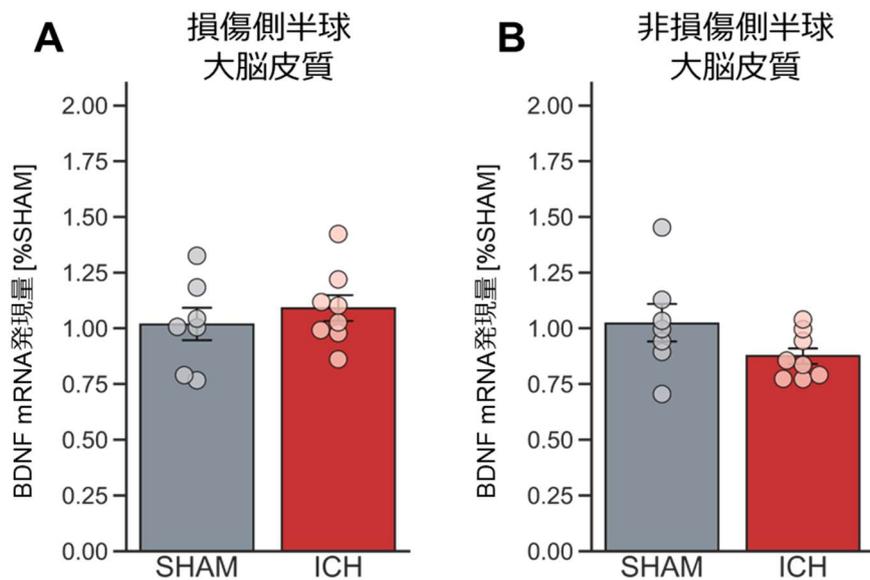


図 2-9. 脳出血後の脳皮質運動野における BDNF 遺伝子発現

各グラフは各群の損傷側半球 (A) と非損傷側半球 (B) における脳皮質 BDNF mRNA 発現量を示す。いずれの半球においても, SHAM 群と ICH 群の BDNF mRNA 発現量に有意差は認められなかった。結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした。BDNF mRNA 発現量は各半球における SHAM 群の発現量を基準とする相対発現量でそれぞれ表記した。

蛋白発現量

各群の大脳皮質運動野における BDNF 蛋白発現量を図 2-10 に示す. いずれの半球においても, SHAM 群と ICH 群の BDNF 蛋白発現量に有意差は認められなかった (損傷側半球, $t = -0.032, p = 0.975$, 図 2-10A; 非損傷側半球, $t = 0.048, p = 0.962$, 図 2-10B). この結果は, 脳出血後 4 週目において, 脳出血は大脳皮質 BDNF 蛋白発現量にも影響を与えないことを示している.

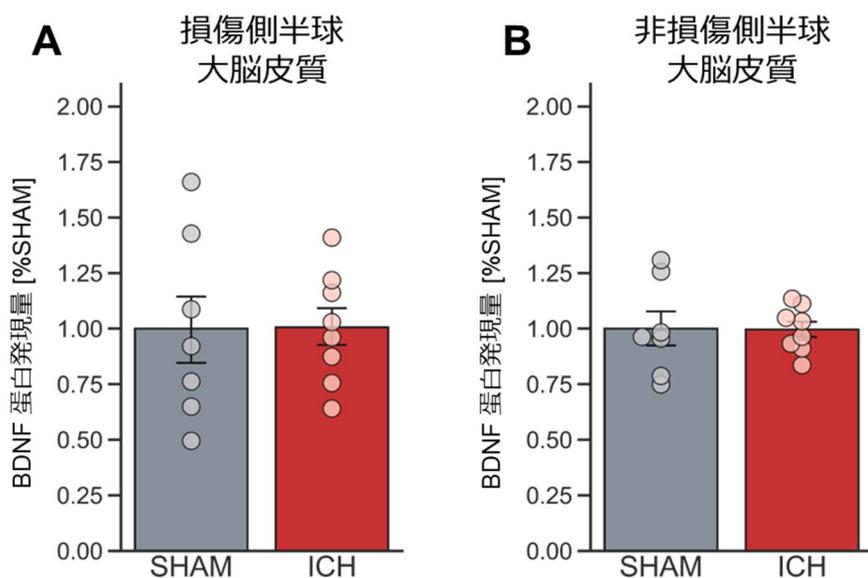


図 2-10. 脳出血後の大脳皮質運動野における BDNF 蛋白発現

各グラフは, 各群の損傷側半球 (A) と非損傷側半球 (B) における大脳皮質 BDNF 蛋白発現量を示す. いずれの半球においても, SHAM 群と ICH 群の BDNF 蛋白発現量に有意差は認められなかった. 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. BDNF 蛋白発現量は各半球における SHAM 群の発現量を基準とする相対発現量でそれぞれ表記した.

II-4. 考察

本章では、IC-ICH モデルラットの行動学的機能障害および大脳皮質運動野における BDNF 発現の特徴について検証した。その結果、IC-ICH モデルラットは運動機能障害が長期的に持続することに加えて、自発的活動性が経時的に変化すること、脳出血に起因する不安様行動は認められない、という一連の特徴が明らかとなった (図 2-11)。また、脳出血後 4 週目の大脳皮質運動野における BDNF 発現は、両側半球ともに mRNA・蛋白発現量に変化がないことも明らかとなった。さらに、脳出血後には BDNF 発現量の半球間発現比が変化する可能性や、損傷側半球の大脳皮質 BDNF mRNA 発現量は、麻痺側前肢の運動機能障害の重症度と関連している可能性も示唆された (補遺にて詳解)。

まず、本モデルラットの作成は、コラゲナーゼ溶液を標的座標 (bregma より後方 2.0 mm, 左外側 3.7 mm, 深さ 6.0 mm) へと微小投与する手術プロトコルで作成した。出血損傷の要となるコラゲナーゼ溶液の投与は、脳定位固定器を用いて投与座標を同定し、電動マイクロインジェクターを用いて投与速度・投与量を機械的制御下にて実施している。そのため、手術手技に依存する変動性は可能な限り排除されており、図 2-8A に示す前肢の運動機能障害が個体間で一様に生じている (標準誤差が小さい) ことから、本モデルの手技的再現性の高さが伺える。

皮質脊髄路 (Corticospinal tract : CST) は運動性下降路として随意運動制御において重要な役割を果たすため^{103,104}、脳卒中による CST の損傷は、運動機能障害の予後予測因子の 1 つとして知られている¹⁰⁵。本章で使用した IC-ICH モデルラットは、CST が通過する内包の損傷を伴うため、CST 損傷が重度であることは先行研究において既に確認されている⁸⁶。したがって、IC-ICH モデルラットが著明かつ長期的な運動機能障害を呈したことは合理的であり、同様のモデルマウスを用いた先行研究の所見とも一致する⁸⁷。実際の臨床においても内包損傷を伴う脳出血患者の機能転帰が不良であることを鑑みると¹⁰⁶⁻¹⁰⁸、IC-ICH モデルラットは、臨床病態を正確に反映しているモデルであると解釈できる。

一方で、これまでの研究では IC-ICH モデルの運動機能以外の機能障害については焦点が当てられておらず、その理解はほとんど進んでいなかったが、本章では IC-ICH モデルが不安様行動を呈さないということを初めて実証した。脳卒中後の不安障害は、脳卒中後うつと相互に作用し、機能転帰を不良にする一要因として知られている¹⁰⁹。したがって、その情動的影響が少なく、著明かつ持続的な運動機能障害を示す IC-ICH モデルは、脳出血後の運動機能回復に焦点を当てた長期的検証に適した脳卒中モデルであることが示唆される。

興味深いことに、ICH 群の自発的活動性は急性期に一度下がり、回復した後に再度低下するという二峰性の経時的変化が生じていた。同様のテストコンディションであった SHAM 群においては有意な変化が認められなかったことから、この自発的活動性の変化は

脳出血に起因するものであると推察される。しかし、本章では脳出血後 4 週目の組織しか採取できていないため、活動性の経時的变化をもたらす神経学的機序については検証することができなかった。脳出血は出血による一次損傷だけでなく、遅れて二次的な損傷や退行的変性も生じることが知られていることから^{79,110}、今後の研究では、経時的な組織採取により、IC-ICH モデルの機能障害をもたらす神経学的機序まで明らかにすることが期待される。

また、脳出血後 4 週目の大脳皮質運動野における BDNF 発現は、両側半球ともに mRNA・蛋白発現量に有意な変化は認められなかった。この結果は、脳出血後の同時期同部位における BDNF 発現を定量した過去の報告からも概ね支持される⁹⁴⁻⁹⁶。一方で、線条体など出血周辺領域においては、脳出血後に BDNF の mRNA・蛋白発現が増強することが報告されている^{93,111}。BDNF が神経保護効果を有していることを考慮すると¹¹²、出血周辺領域ではその保護効果を得るために BDNF 発現が増強し、損傷領域から離れた大脳皮質においては神経保護の必要性が低いため BDNF 発現量に変化がなかったのではないかと考えられる。

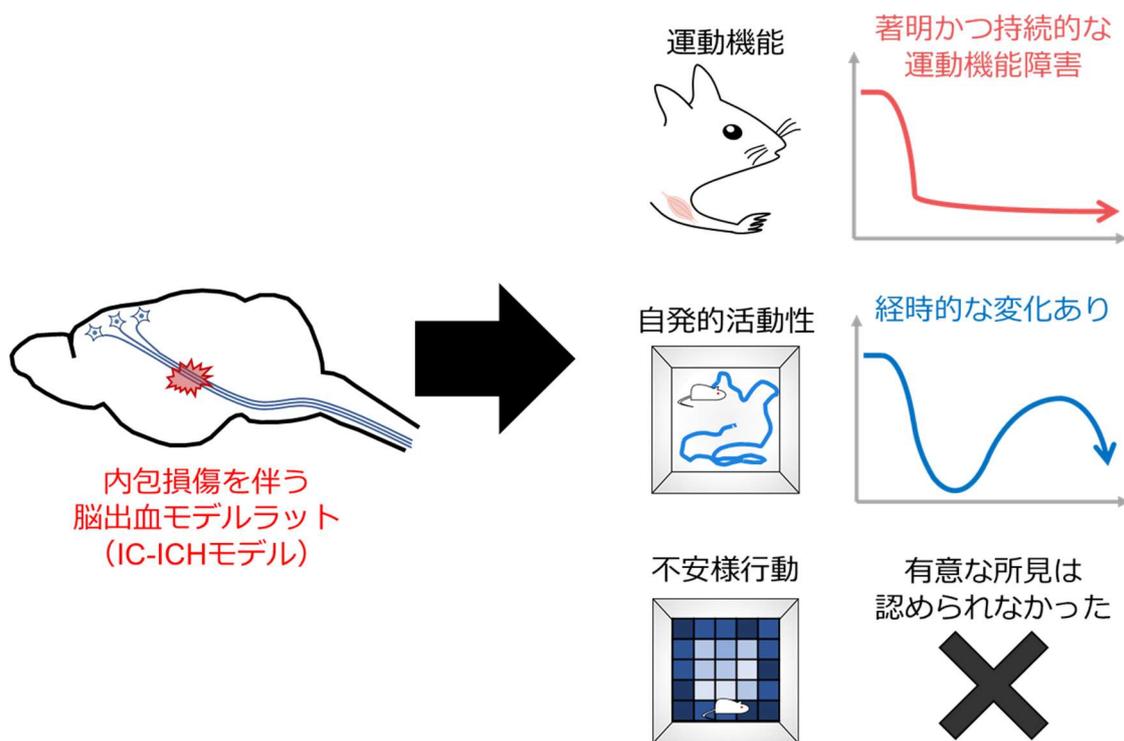


図 2-11. 本章で示された IC-ICH モデルラットの行動学的機能障害の特徴

内包損傷を伴う脳出血病態を模した IC-ICH モデルラットは、運動機能障害が長期的に持続することに加えて、自発的活動性が経時的に変化すること、脳出血に起因する不安様行動は認められないこと、が示された。

II-5. 小括

本章を総括すると、内包損傷を伴う脳出血病態を模した IC-ICH モデルラットは、著明な運動機能障害を長期的に呈し、実際の臨床病態を的確に反映している所見が認められた。加えて、本モデルラットは手技的再現性も高く、脳出血に起因する不安様行動は認められなかったことから、運動機能回復を検証する本研究において、十分な妥当性と臨床的還元性を有している脳出血モデルであると考えられる。また、本研究から得られた脳出血後大脳皮質における神経栄養因子発現の所見は、脳卒中後 BDNF 発現動態の体系的な理解に向けた一助となり得る。

II-6. 補遺

補遺 1: BDNF 発現量の半球間比較

SHAM 群および ICH 群の各半球における大脳皮質 BDNF 発現量を比較検証した。SHAM 群の損傷側半球における発現量を基準とする BDNF mRNA/蛋白発現量を図 2-12 に示す。統計解析として、群 (SHAM 群, ICH 群) および半球 (損傷側, 非損傷側) を二要因とする二元配置分散分析に実施した。

二元配置分散分析の結果, BDNF mRNA 発現量において半球の有意な主効果が認められたが, 有意な交互作用は認められなかった (交互作用: $F_{1,26} = 3.076, p = 0.091$, 群: $F_{1,26} = 0.754, p = 0.393$, 半球: $F_{1,26} = 18.094, p < 0.001$, 図 2-12A). 一方で, BDNF 蛋白発現量においては有意な交互作用および主効果は認められなかった (交互作用: $F_{1,26} = 0.003, p = 0.960$, 群: $F_{1,26} < 0.001, p = 0.994$, 半球: $F_{1,26} = 0.249, p = 0.622$, 図 2-12B). これらの結果から, 脳出血の有無に関わらず, 半球間で BDNF mRNA 発現量に有意な差が生じること, すなわち手術侵襲が BDNF mRNA 発現量に影響を及ぼすことが示唆された。

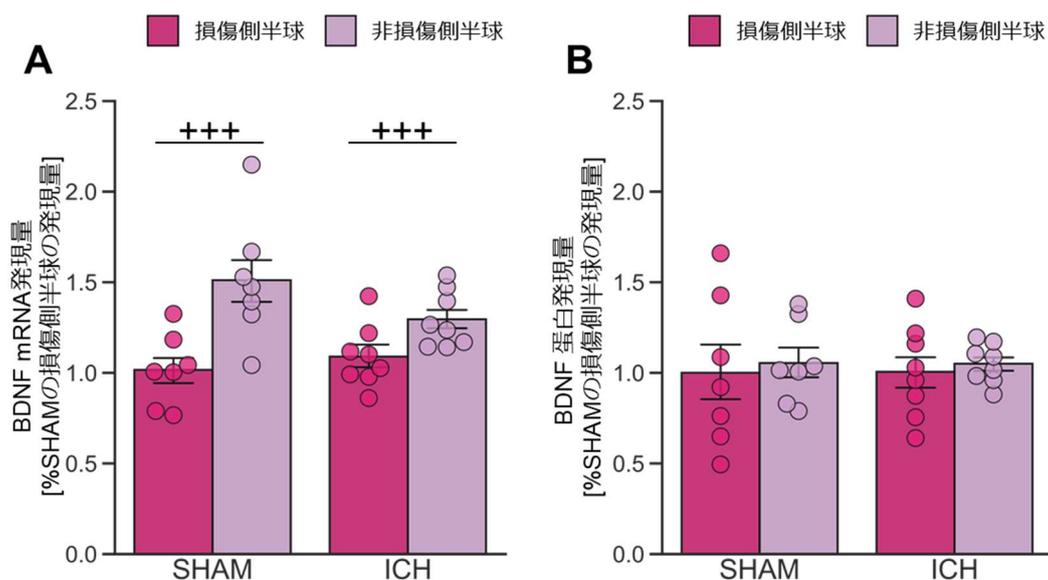


図 2-12. 各半球における大脳皮質 BDNF 発現量の比較

グラフは各群の大脳皮質における BDNF mRNA 発現量 (A) および蛋白発現量 (B) を示す. BDNF mRNA 発現量においては, 群に関わらず, 半球間で BDNF mRNA 発現量に有意差が生じた (A). 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. [+++ $p < 0.001$, 半球の主効果 (損傷側半球 vs. 非損傷側半球)]

前述の結果から、手術侵襲により半球間の BDNF mRNA 発現量に差が生じることが明らかとなったが (図 2-12A), 半球間の有意差が生じる要因として以下の 3 つの可能性が考えられた: 1) 損傷側半球の発現量が減少したことによる半球間の有意差, 2) 非損傷側半球の発現量が増強したことによる半球間の有意差, 3) 損傷側半球の発現量の微増および非損傷側半球の発現量の微減による半球間の有意差. そこで、手術侵襲を加えていない同週齢の健常 Wistar ラット (Control 群, $n = 4$) の大脳皮質における BDNF mRNA 発現量を基準に、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いて SHAM 群の各半球における BDNF 発現量を検証した. 統計解析として一元配置分散分析を実施し、事後検定として Dunnett 検定を用いて多重比較を行った.

Control 群, SHAM 群の損傷側半球, SHAM 群の非損傷側半球における大脳皮質 BDNF mRNA 発現量を図 2-13 に示す. 一元配置分散分析の結果、有意な主効果が認められた ($F_{2,15} = 4.992, p = 0.022$). 事後検定の結果、SHAM 群の損傷側半球における BDNF mRNA 発現量は Control 群と比較し有意に低値を示したが ($p = 0.037$), SHAM 群の非損傷側半球と Control 群の発現量に有意差は認められなかった ($p = 0.958$). この結果から、上記 1) 手術侵襲により損傷側半球の大脳皮質 BDNF mRNA 発現量が減少することで、半球間の BDNF mRNA 発現量に差が生じていることが示された.

以上より本章においては、これら手術侵襲の影響を排除するために、BDNF 発現量は各半球における SHAM 群の発現量に基づきそれぞれ正規化された (図 2-9,2-10).

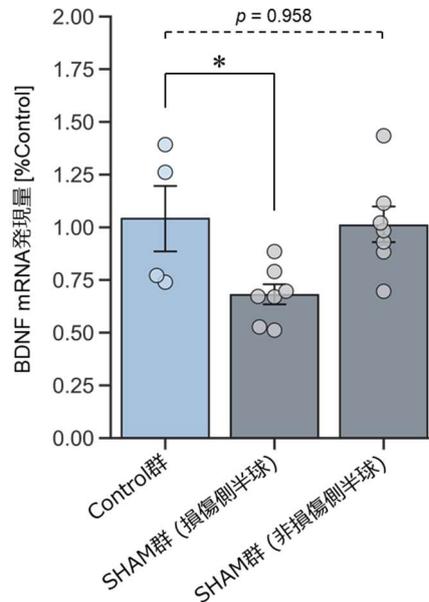


図 2-13. 手術侵襲が大脳皮質 BDNF mRNA 発現量に与える影響

グラフは Control 群, SHAM 群の損傷側半球と非損傷側半球における BDNF mRNA 発現量を示す. SHAM 群の損傷側半球における BDNF mRNA は、Control 群と比較し有意に低値を示した. 結果は平均値 ± 標準誤差で表記し、各値をプロットした. [* $p < 0.05$, Control 群 vs. SHAM 群(損傷側半球)].

補遺 2 : 大脳皮質 BDNF 発現量の半球間の関係性

本章では、脳出血後 4 週目の大脳皮質運動野における BDNF 発現量は、SHAM 群と ICH 群の間に有意な群間差は認められなかった。そこで、脳出血後の BDNF 発現の特徴についてより詳細に検証を行った。各群の BDNF 発現量について、「mRNA 発現量と蛋白発現量の関係性」ならびに「半球間の発現量の関係性」についての相関分析の結果を図 2-14 に示す。相関分析の結果、SHAM 群において半球間の BDNF mRNA 発現量に有意な正の相関が認められたが ($r = 0.862, p = 0.013$), ICH 群においては同様の関係性は認められなかった ($r = 0.136, p = 0.748$)。この結果は、脳出血が大脳皮質 BDNF mRNA 発現量の半球間の関係性に影響を与えること、すなわち、①健常脳において一方の半球における大脳皮質 BDNF mRNA 発現量が高い個体は、もう一方の半球における BDNF mRNA 発現量も高いという“半球間対称性”があること、②脳出血後の脳においてはその対称性が損なわれ、非対称的であることを示している。

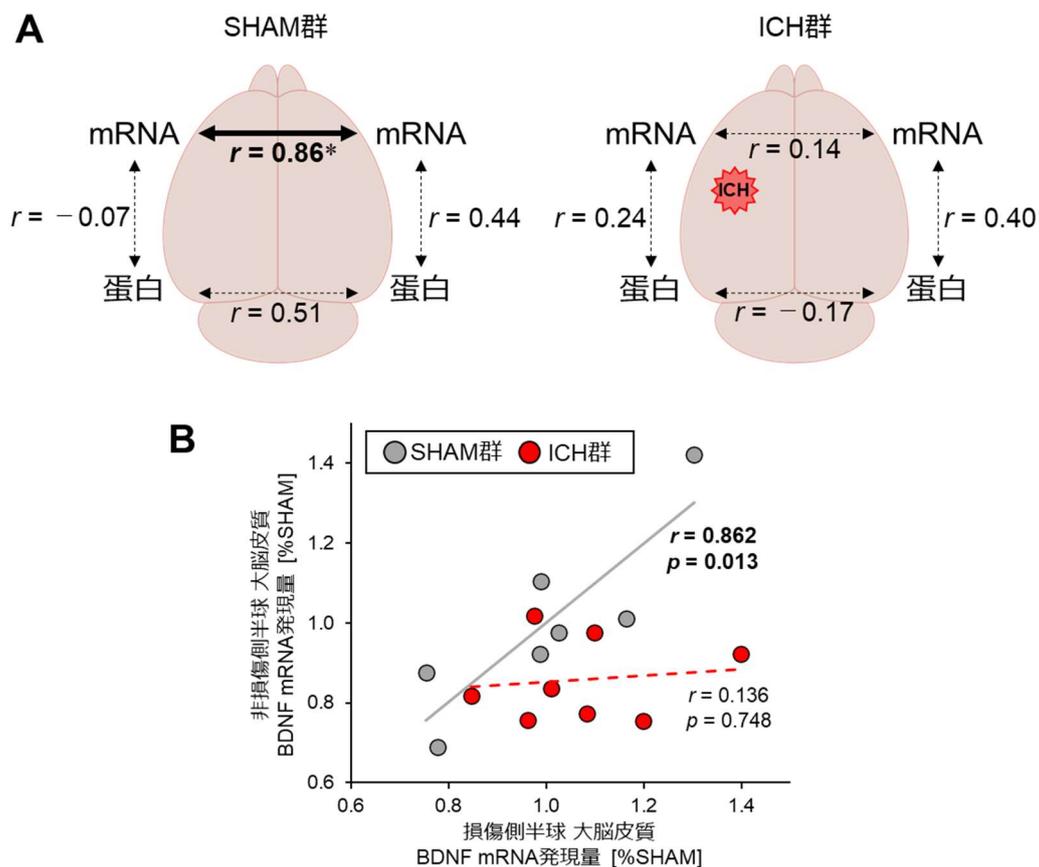


図 2-14. 脳出血が大脳皮質 BDNF 発現量の半球間の関係性に与える影響

(A) 各群の「mRNA 発現量と蛋白発現量の関係性」ならびに「半球間の発現量の関係性」。SHAM 群のみ、半球間の BDNF mRNA 発現量に有意な正の相関が認められた ($r = 0.862, p = 0.013$, B)。

脳出血後 BDNF 発現量の半球間の関係性についてさらに精査するために、非対称性指数を用いて各個体の大脳皮質 BDNF 発現量の半球間側性，すなわち「半球間の発現バランス」を評価した．先行研究の計算式に従って¹¹³，非対称性指数を以下の計算式を用いて算出した．非対称性指数は，BDNF 発現量が半球間で均等の場合は 0 となり，非対称性指数の増加は半球間の発現バランスが損傷側半球へとシフトすることを意味する．

$$\text{非対称性指数} = \log(\text{損傷側半球における発現量} / \text{非損傷側半球における発現量})$$

各群の BDNF mRNA 発現量および BDNF 蛋白発現量の非対称性指数を図 2-15 に示す．BDNF mRNA 発現において，ICH 群の非対称性指数は SHAM 群と比較し有意に高値を示した ($t = -2.692, p = 0.018, A$)．一方，BDNF 蛋白発現において各群の非対称性指数に有意差は認められなかった ($t = -0.273, p = 0.789, B$)．これらの結果は，大脳皮質 BDNF mRNA 発現の半球間の発現バランスが，脳出血後に損傷側半球へとシフトすることを示している．

この非対称性指数と行動評価の結果との相関分析では，有意な相関関係は認められなかった (Data not shown)．本研究で明らかになった半球間発現バランスのシフトが何を意味しているのか，機能回復に寄与する潜在的な可塑性なのか，という点を解明するには更なる研究が必要である．

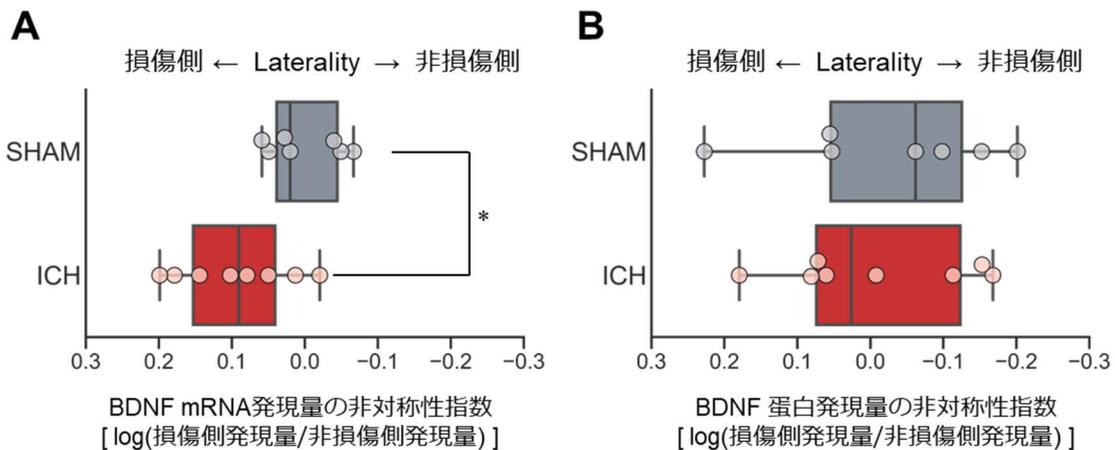


図 2-15. 脳出血が BDNF 発現量の半球間の発現バランスに与える影響

各グラフは，BDNF mRNA 発現量の非対称性指数 (A) および BDNF 蛋白発現量の非対称性指数 (B) を示す．BDNF mRNA 発現量において，ICH 群の非対称性指数は，SHAM 群と比較し有意に高値を示した (A)．結果は箱ひげ図で表記し，各値をプロットした．なお，箱ひげ図の x 軸は前出の脳イラストと左右 (損傷側/非損傷側) の関係性を一致させるため正負を反転している．[* $p < 0.05$, SHAM vs. ICH].

補遺 3 : 脳出血後の BDNF 発現量と行動学的機能障害との関係性

最後に, BDNF 発現量と行動学的機能障害との関係性について検証した. 各群の BDNF 発現量と行動評価の結果との相関分析の結果を図 2-16A に示す. 相関分析の結果, ICH 群において, 損傷側半球の大脳皮質 BDNF mRNA 発現量と麻痺肢使用率との間に有意な正の相関が認められた ($r = 0.759, p = 0.029$, 図 2-16B). 一方で SHAM 群においては, 同様の関係性は認められなかった ($r = -0.366, p = 0.420$, 図 2-16B). これらの結果は, 損傷側大脳皮質 BDNF mRNA 発現量が高い個体ほど前肢運動機能障害が軽度であることを示しており, この関係性は ICH 群のみで認められるため, 脳出血後特有の関係性であることが示唆される.

現在のところ, 脳出血後の BDNF 発現と機能障害の関連性について報告した研究はなく, この相関関係を明らかにしたのは本研究が初めてである. 本研究では運動機能局在の中核である大脳皮質運動野の BDNF 発現を定量したため, Open field test における活動性や不安様行動の指標ではなく, Cylinder test における前肢運動機能の指標のみと相関関係が認められた点は合理的である. 本研究では, BDNF 発現と機能障害をつなぐ詳細なメカニズムは明らかにできていないが, この関係性を鑑みると, 損傷側半球大脳皮質 BDNF mRNA 発現を増強する治療戦略は, 脳出血後の運動機能障害の改善に有効であるかもしれない.

また, 上述の相関関係が BDNF mRNA 発現のみで認められた点は興味深い. mRNA 発現と蛋白発現の特徴の乖離については, いくつかの理由が考えられる. 1 つ目に, 脳出血は, 転写 (mRNA 発現) と翻訳 (蛋白合成) の過程に, それぞれ異なる影響を与えた可能性である. 2 つ目に, 核内で生じる BDNF mRNA の転写反応と異なり, BDNF 蛋白は順行性/逆行性の軸索輸送を介して他の領域に/から輸送される可能性である^{114,115}. したがって, 本研究で定量した BDNF 蛋白発現量に関しては, 大脳皮質運動野と解剖学的な接続のある他領域の影響を含んでいる可能性が考えられる. 3 つ目に, 本研究における BDNF 発現の定量は mRNA も蛋白も大脳皮質運動野の脳組織から定量したものであるが, それぞれ別組織を使用しているため厳密な領域は異なるという点である (図 2-7). 過去の研究は, 脳卒中後の前肢運動領域における機能的役割が, 吻側前肢領域 (Rostral forelimb area, 前方から 2 枚目の前額断スライスに該当, RNA 抽出組織) と尾側前肢領域 (Caudal forelimb area, 前方から 3 枚目の前額断スライスに該当, 蛋白抽出組織) で異なることを報告している^{116,117}. したがって, BDNF mRNA 発現と蛋白発現の特徴の乖離が, 採取領域およびその領域の機能的役割に依存している可能性については否定できない.

以上までを総括し, 本章で認められた脳出血後 4 週目の大脳皮質運動野 BDNF 発現の特徴を図 2-17 に示す. これらの所見は, 脳卒中後 BDNF 発現動態の体系的な理解に向けた一助となり得る.

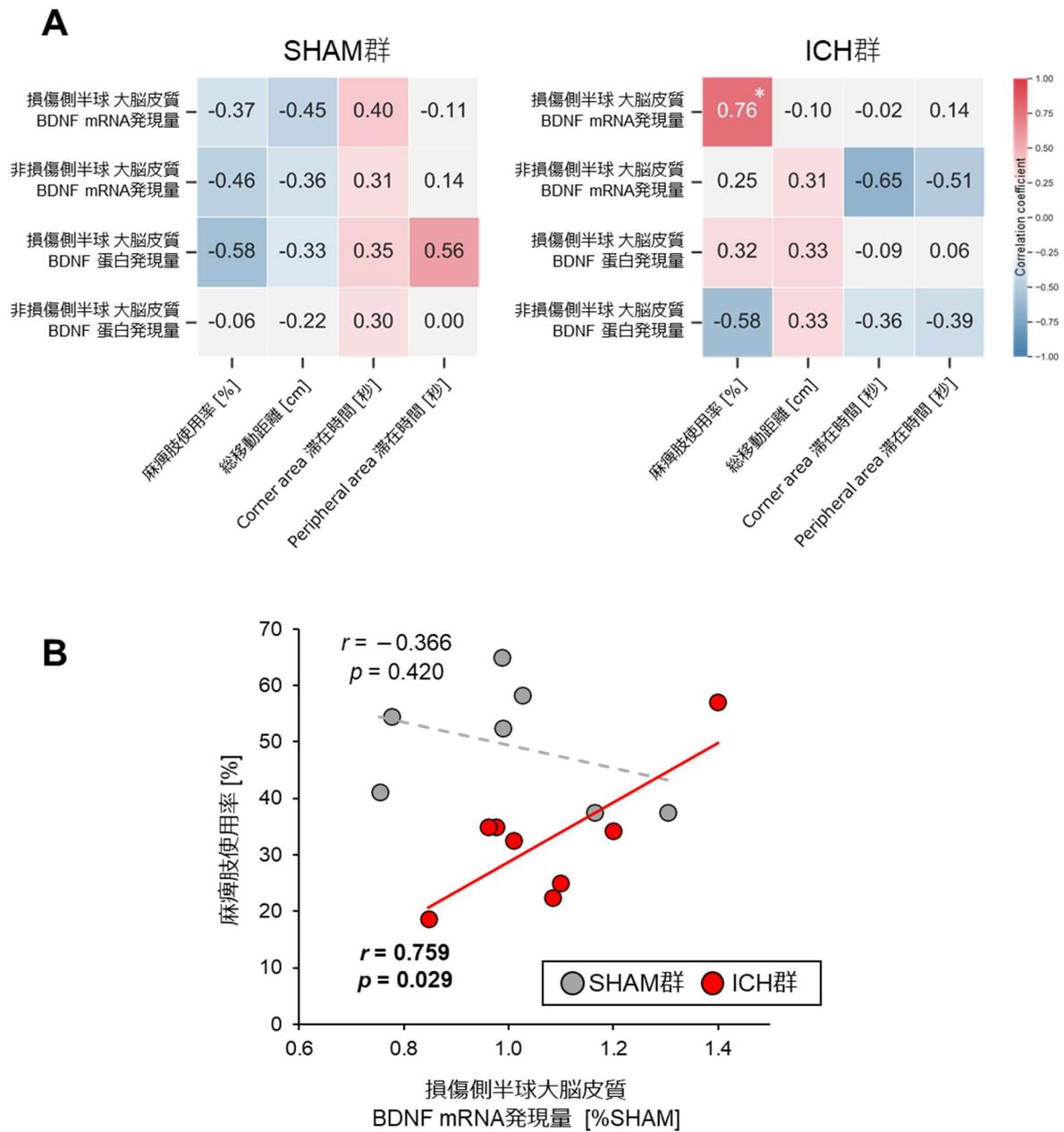


図 2-16. BDNF 発現量と行動学的機能障害との関係

(A) 各群の BDNF mRNA/蛋白発現量と行動評価の結果との関係性. 各マスの数値は相関係数 r を示す. ICH 群のみ, 損傷側半球の大脳皮質 BDNF mRNA 発現量と麻痺肢使用率との間に有意な正の相関が認められた (B).

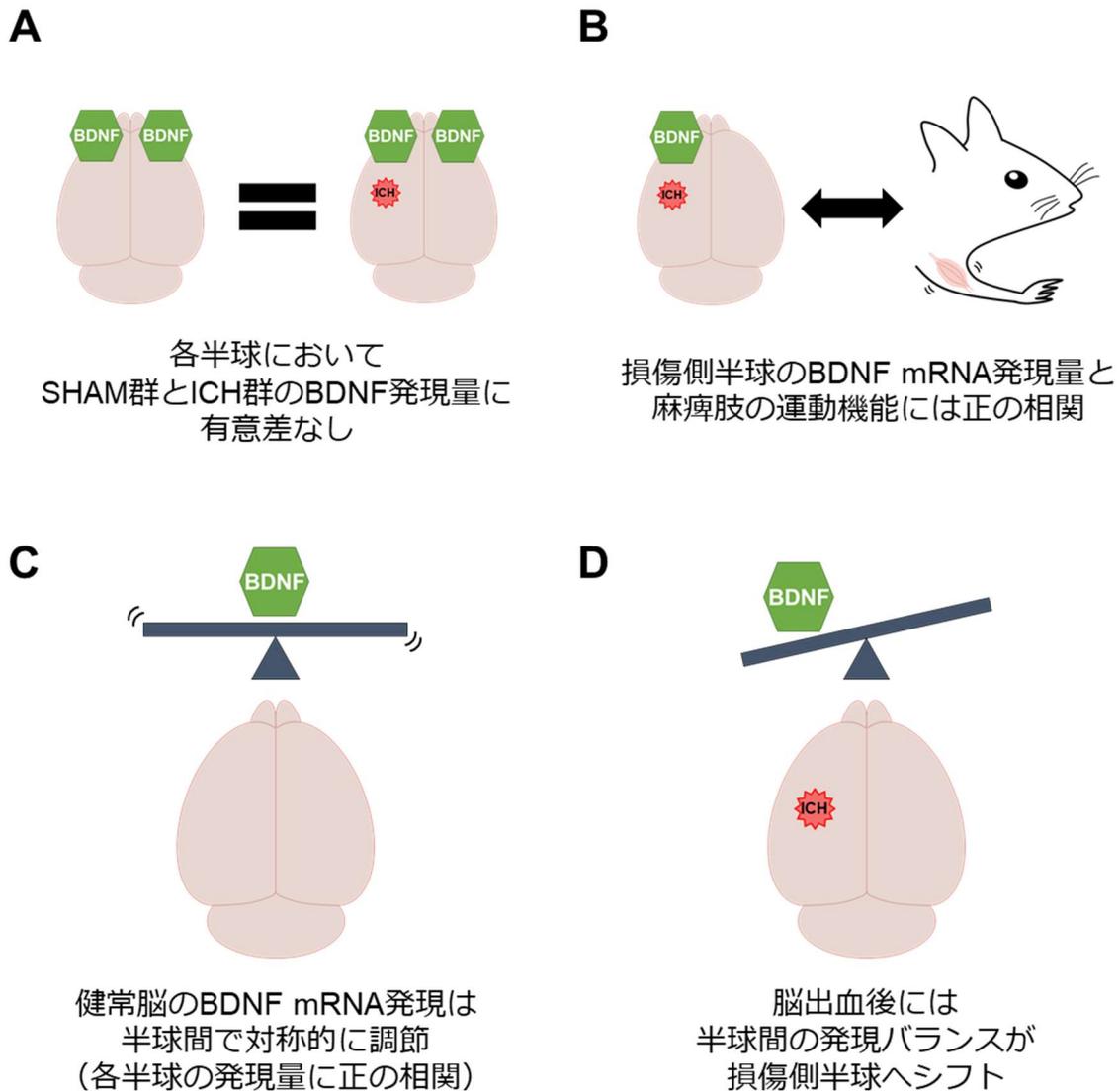


図 2-17. 脳出血後 4 週目の大脳皮質運動野における BDNF 発現の特徴

本章で明らかになった脳出血後 4 週目の大脳皮質運動野 BDNF 発現の特徴. 各半球の大脳皮質運動野において, 脳出血による BDNF 発現量の変化は認められなかった (A). 損傷側半球の BDNF mRNA 発現量は, 麻痺肢の運動機能に関連している可能性が示された (B). 健常脳において, 半球間の BDNF mRNA 発現量は対称的であった (C). 脳出血後には, その対称性が損なわれ, BDNF mRNA の半球間の発現バランスは, 損傷側半球へとシフトしていた (D).

第 III 章

GABA 受容体を標的とする薬理的神経制御の検証

【Inoue et al., *Biomedical Research* 42(3), 103-108, (2021)】

Ⅲ-1. 背景

中枢神経系において主要な抑制作用を担う GABA 受容体の構造や機能解析については、古くから多くの神経科学者の関心を集めており、未だに日進月歩で新たな知見が明らかとなっている^{118,119}。GABA_A受容体を構成するサブユニットは、現在のところ α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1-3 の 19 種類が同定されており、これらを組み合わせた 5 量体で機能する (脳内では α 1 β 2 γ 2 の組み合わせが最も多い)⁶⁰。Phasic inhibition の大部分を担うシナプス内 GABA_A受容体は主に α 1 サブユニットを含んでおり^{120,121}、一方の Tonic inhibition を担うシナプス外 GABA_A受容体は、主に α 5 や δ サブユニットを含むことが知られる^{64,122,123}。したがって、Tonic inhibition の特異的阻害を目的とする薬理的神経制御においては、 α 5 サブユニットを含む GABA_A受容体 (α 5GABA_A受容体) あるいは δ サブユニットを含む GABA_A受容体が薬理標的となるが、 α 5GABA_A受容体を介した Tonic inhibition の方が脳卒中後機能回復の阻害因子としての役割が大きいことから⁶⁴、本研究では α 5GABA_A受容体の特異的阻害薬を用いることとした (図 3-1)。

L-655,708 は α 5GABA_A受容体を薬理標的とし、受容体のアロステリック部位に結合することで、Cl⁻の細胞内流入を阻害するネガティブアロステリックモジュレーターである¹²⁴。Atack らは、L-655,708 の α 5 サブユニットに対する親和性は、他のサブユニット (α 1, α 2, α 3) と比較し約 30-70 倍高いことを確認しており¹²⁵、他の研究では L-655,708 が Phasic inhibition に影響を与えず Tonic inhibition のみを減弱させることを実証している⁶⁴。こうした一連の研究知見から、L-655,708 は、 α 5GABA_A受容体を介した Tonic inhibition の特異的阻害薬であることは裏付けられる。しかしながら、L-655,708 の薬理効果に関する研究は、in vitro 実験による電気生理学的検証や^{126,127}、in vivo 実験では一定期間の薬剤投与による効果検証が多く^{66,67,69}、L-655,708 の単回投与が中枢神経系の神経活動や行動に与える影響については十分に理解されていない。そこで本章では、L-655,708 投与が易興奮性の薬理的コンディショニングとしての妥当性を有しているか検討することとした。

中枢神経系における神経活動を評価する 1 つの指標として、最初期遺伝子 (Immediate-early genes : IEG) 発現が挙げられる。c-Fos, Arc, Egr-1 などの IEG 発現は、神経活動に伴う Ca²⁺流入により、細胞内シグナル伝達が活性化されることで急速 (数分以内) に誘導されるため、神経活動の分子マーカーとして一般的に使用されている¹²⁸。また、序論で述べたように、BDNF も神経活動依存的に発現増強するため、しばしば IEG として分類される¹²⁸。

以上より本章では、薬理的神経制御の効果を明確にするために健常ラットを対象とし、L-655,708 の単回投与が中枢神経領域 (大脳皮質、海馬、脊髄) における神経活動に与える影響を、生化学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。加えて、行動学的評価も実施し、自発的活動性や懸念される副作用への影響についても検証した。

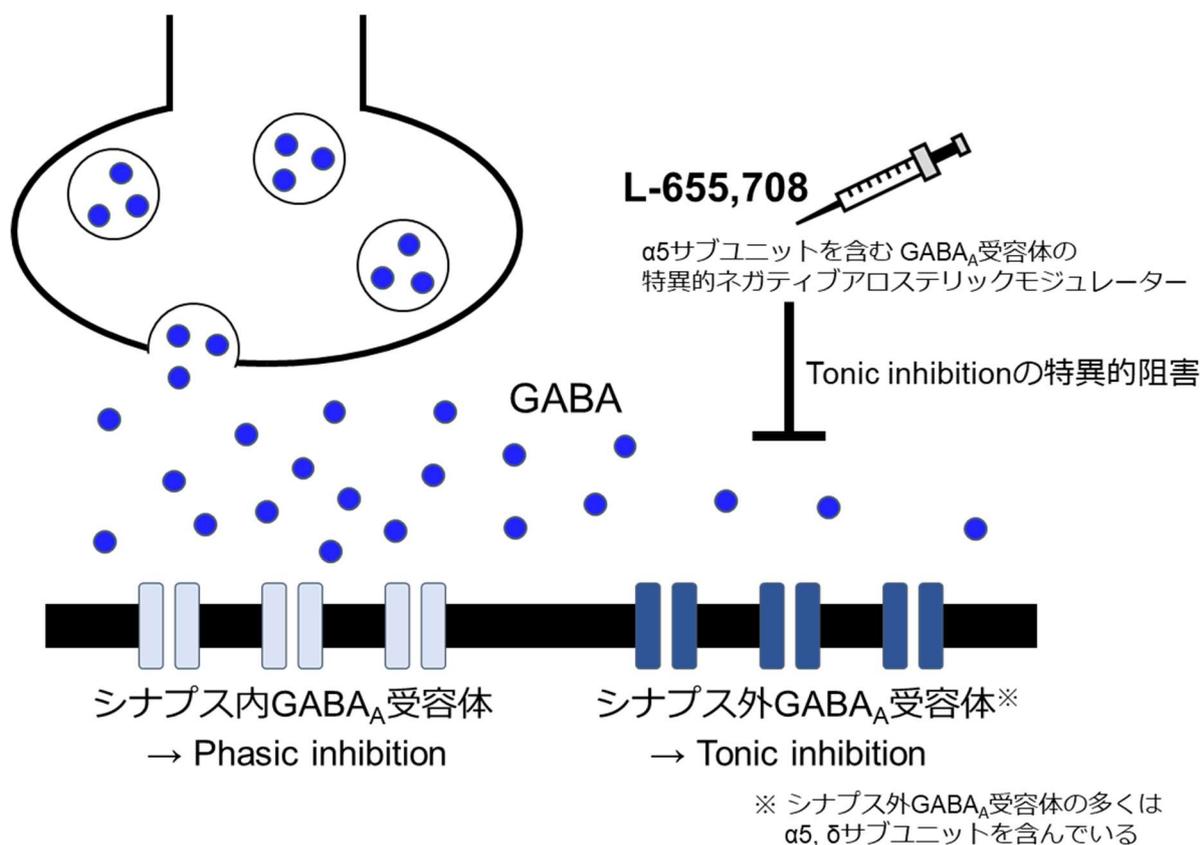


図 3-1. Tonic inhibition を特異的に阻害するための薬理標的

Tonic inhibition を担うシナプス外 GABA_A 受容体は主に, $\alpha 5$ や δ サブユニットを含んでいる. そのため本研究では, $\alpha 5$ サブユニットを含む GABA_A 受容体 ($\alpha 5$ GABA_A 受容体) の特異的ネガティブアロステリックモジュレーターである L-655,708 を用いて, Tonic inhibition を特異的に阻害する薬理的神経制御の効果検証を行った.

Ⅲ-2. 方法

Ⅲ-2-1. 対象および実験概要

本章の実験概要を図 3-2 に示す. 7 週齢の雄性 Wistar ラット 12 匹 (300.3 ± 12.0 g, 平均値 \pm 標準偏差) を, 対照群となる CON 群と, $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の薬理的阻害を行う L655 群に 6 匹ずつ無作為に割り当てた. 実験動物の飼育管理等は前章に準ずる. 本研究も前章と同様に, 北海道大学動物実験委員会による審議を経た後, 北海道大学総長の承認の下で「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り実施された (承認番号: 19-0101).

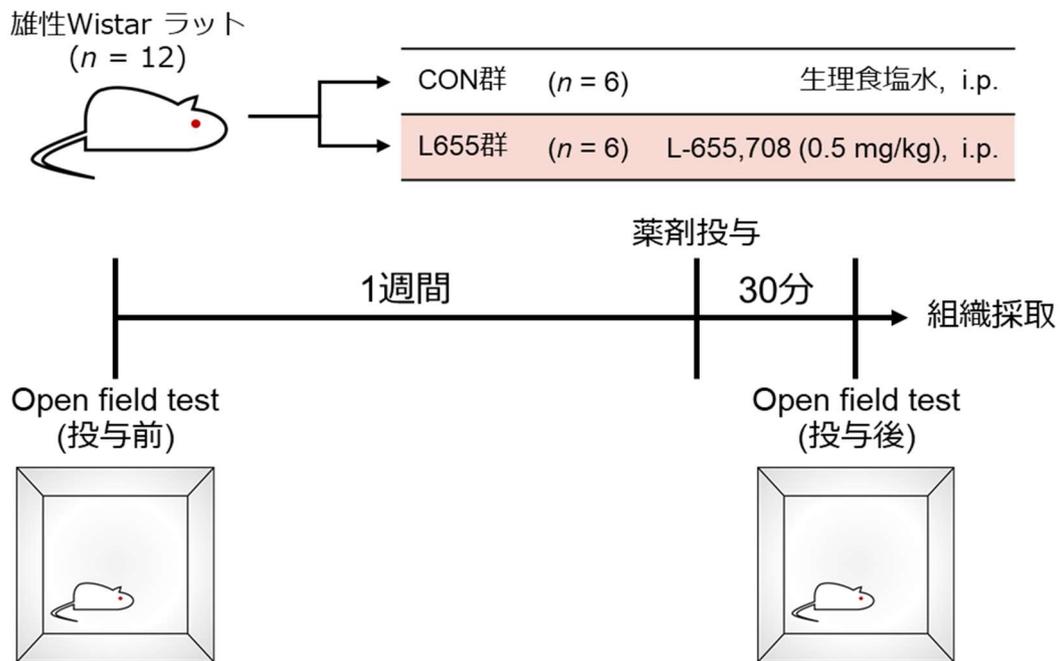


図 3-2. 本章の実験概要

雄性 Wistar ラット 12 匹を, CON 群と L655 群の 2 群に割り当て, L-655,708 投与の急性効果を検証した (i.p.: 腹腔内投与). Open field test は薬剤投与の 1 週間前 (投与前) と薬剤投与の 30 分後 (投与後) の計 2 回実施した. 組織採取は薬剤投与後の Open field test の直後に実施し, 採取した脳・脊髄組織から遺伝子発現を定量した.

Ⅲ-2-2. 薬剤投与

L655 群には $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体特異的ネガティブアロステリックモジュレーター の L-655,708 (Tocris Bioscience, Cat.#1327, UK) を 0.5 mg/kg の用量で腹腔内投与した. L-655,708 はジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, DMSO, 049-07213, 富士フイルム和光純薬) に溶解した後, 生理食塩水で希釈し L655 群のラットに投与された¹²⁹. 同等の侵襲を与えるために, CON 群には同容量の DMSO を含む生理食塩水を腹腔内に投与した. *in vivo* 薬理動態検証から, 本薬剤 0.5 mg/kg の投与量は, 脳 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の 50–65% に結合し作用すると推定されている⁸².

Ⅲ-2-3. 行動学的評価

自発的活動性および不安様行動を評価するために, 薬剤投与の 30 分後に Open field test (投与後) を実施した. Open field test のプロトコルは前章に準ずる. 事前に各個体の行動特徴を確認するために, 薬剤投与の 1 週間前にも Open field test (投与前) を実施した.

また, L-655,708 投与による痙攣発作の有無を確認するために, Modified Racine's scale を用いて行動学的な痙攣発作の評価を行った¹³⁰. 薬剤投与後 10 分間, ラットをケージに戻し自由行動している様子をビデオ撮影した. 撮影した動画から, 1 名の盲検化された検者が下記要領で点数付けを行った (表 1). このスケールは点数が高いほど, 痙攣発作が重度であることを示しており, 各点数のラット行動は脳波所見の重症度とも一致することが確認されている¹³⁰.

表 1. Modified Racine's scale

点数	ラットの行動
0	No change in behavior 行動の変化なし
1	Sudden behavioral arrest, motionless staring (with orofacial automatism) 突然の行動停止, (口腔顔面の引き付けを伴う) 不動の凝視
2	Head nodding 頭部の下垂
3	Forelimb clonus with lordotic posture 姿勢弯曲を伴う前肢の間欠性発作
4	Forelimb clonus, with rearing and falling 立ち上がり行動や転倒を伴う前肢の間欠性発作
5	Generalized tonic-clonic activity with loss of postural tone, often resulting in death, wild jumping 全身低緊張, しばしば死や暴走を引き起こす全身性の強直-間欠性行動

Ⅲ-2-4. 組織採取

組織採取の方法は前章に準ずる。Open field test (投与後) を実施した後、直ちに脱血処理を行い全脳および脊髄組織を採取した。全脳サンプルから計 6 枚の厚さ 2 mm 前額断脳スライスを作成し、ラット脳アトラスを参考に¹⁰²、前方から 2 枚目の前額断スライス (bregma 2.0 ~ 4.0 mm) から大脳皮質運動野を、前方から 3 枚目の前額断スライス (bregma 0.0 ~ 2.0 mm) から大脳皮質感覚野を、前方から 6 枚目の前額断スライス (bregma -6.0 ~ -4.0 mm) から海馬をそれぞれ採取した (図 3-3, 青枠部分)。脊髄組織は下位頸髄にあたる C4-6 レベルを採取した (図 3-3)。各組織は、直ちに組織重量の約 10 倍量の RNA stabilization reagent (RNAlater, QIAGEN, オランダ) の液中に浸した状態でドライアイス上にて凍結させた後に、生化学的解析に使用するまでディープフリーザー (-80°C) で保存した。

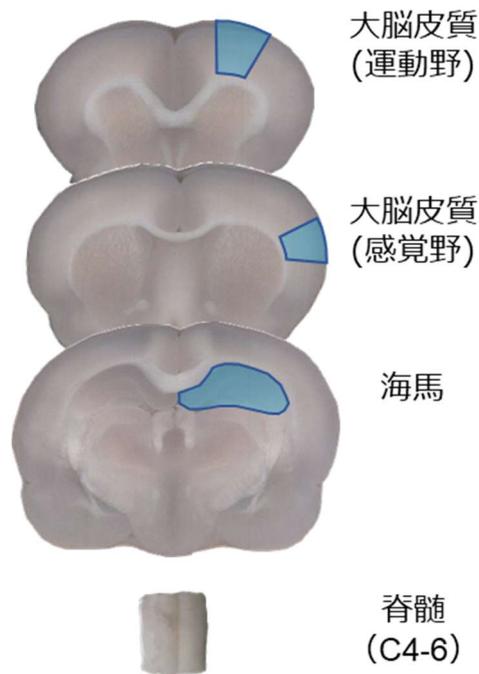


図 3-3. 採取した脳・脊髄組織

採取した大脳皮質運動野、大脳皮質感覚野、海馬、脊髄を示す。各脳領域は青枠で囲まれた部分を採取し、生化学的解析に使用した。

Ⅲ-2-5. 生化学的解析

mRNA 発現量の定量方法および生化学的解析の基本的操作は前章に準ずる。各組織から RNA を抽出後、逆転写を行った。定量的 PCR におけるターゲット遺伝子および内部標準遺伝子の TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems) には以下を使用した: c-Fos (Assay ID: Rn02396759_m1), BDNF (Assay ID: Rn02531967_s1), GABRA5 (Assay ID: Rn00568803_m1), β -actin (4352340E, Assay ID: Rn00667869_m1)。前章と同様に、各 mRNA 発現量は比較 Ct 法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) による相対定量を行い、CON 群 (図 3-5, 3-10) または大脳皮質運動野 (図 3-9) を基準とする mRNA 発現量を算出した。

Ⅲ-2-6. 統計解析

統計解析には SPSS Statistics (v26.0, IBM) を使用した。CON 群と L655 群の Open field test の各指標 (総移動距離, 各エリア滞在時間), mRNA 発現量 (c-Fos, BDNF) の群間比較には、対応のない t 検定 (両側検定) を実施した。なお、Open field test の指標は各評価時点 (投与前または投与後) においてそれぞれ群間比較を行った。二変数間の関連性の検証には、Pearson の相関係数 (r) を用いて相関分析を実施した。有意水準はそれぞれ 5%とした。

III-3. 結果

III-3-1. 行動学的評価

各群の Open field test の結果を図 3-4 に示す. 投与前の Open field test において, 各指標に有意な群間差は認められなかった ($t = 0.089, p = 0.931$, 図 3-4B; $t = -1.095, p = 0.299$, 図 3-4C; $t = -0.190, p = 0.853$, 図 3-4D 投与前). この結果は, 薬剤投与前において各群の行動特徴は同様であったことを示している.

薬剤投与後の Open field test において, L655 群の総移動距離は CON 群と比較し有意に高値を示した ($t = -2.832, p = 0.018$, 図 3-4A 投与後). その他の指標において, CON 群と L655 群との間に有意差は認められなかった ($t = 1.336, p = 0.228$, 図 3-4C; $t = 0.649, p = 0.531$, 図 3-4D 投与後). また, 薬剤投与後に実施した Modified Racine's scale は, L655 群の全てのラットで 0 点であり, 行動学的な痙攣発作は認められなかった. これらの結果は, L-655,708 の単回投与が, 副作用を呈することなく自発的活動性を増強したことを示している.

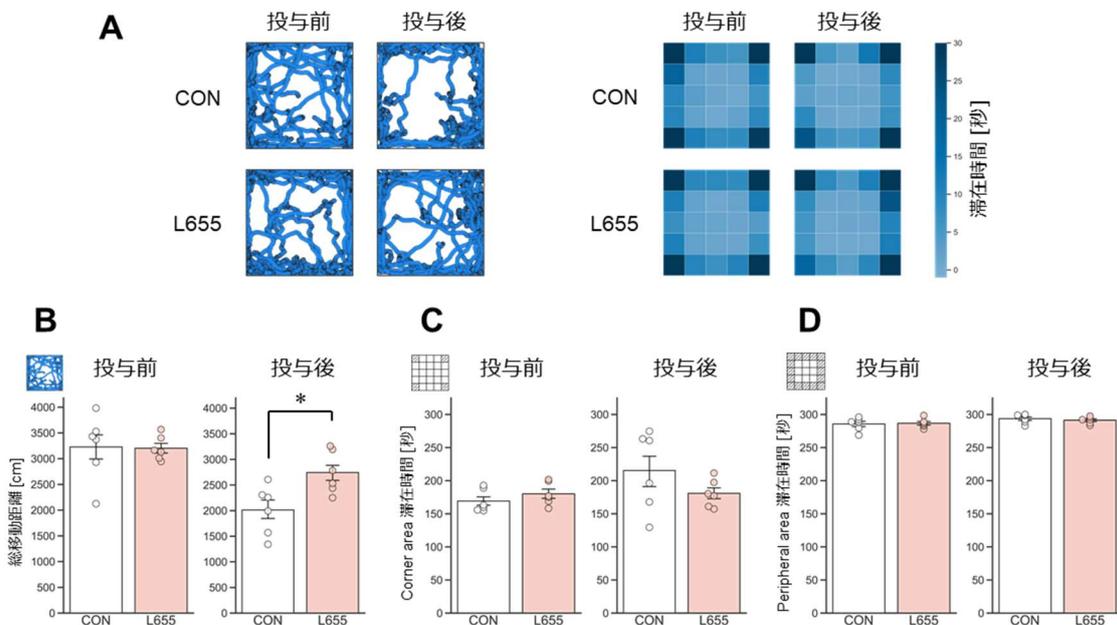


図 3-4. L-655,708 投与が自発的活動性および不安様行動に与える影響

(A) 左: Open field test 中のラットの代表的な移動軌跡. 右: フィールドを 5×5 に細分化した際の各マスにおけるラットの滞在時間の平均値. 青色が濃いほど滞在時間が長いことを示す. (B-D) L-655,708 投与が Open field test の各指標に与える影響 (それぞれ左: 投与前, 右: 投与後). 各グラフは総移動距離 (B), Corner area 滞在時間 (C), Peripheral area 滞在時間 (D) を示す. 投与後の Open field test において, L655 群の総移動距離は CON 群と比較し有意に高値を示した (B). 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. [* $p < 0.05$, CON vs. L655].

Ⅲ-3-2. mRNA 発現量

L-655,708 投与が神経活動マーカーと神経栄養因子の遺伝子発現に与える影響

各群の c-Fos, BDNF mRNA 発現量を図 3-5 に示す. 大脳皮質運動野における L655 群の c-Fos mRNA 発現量は, CON 群と比較し有意に高値を示した ($t = -3.261, p = 0.009$, 図 3-5A). その他の領域における c-Fos mRNA および BDNF mRNA 発現に有意な群間差は認められなかった ($t = -1.290, p = 0.226$, 図 3-5B; $t = -0.031, p = 0.976$, 図 3-5C; $t = -0.564, p = 0.585$, 図 3-5D; $t = -1.268, p = 0.233$, 図 3-5E; $t = -0.871, p = 0.404$, 図 3-5F; $t = 0.423, p = 0.681$, 図 3-5G; $t = -0.464, p = 0.653$, 図 3-5H). これらの結果は, L-655,708 投与により大脳皮質運動野の神経活動が易興奮性に修飾された一方で, その効果は大脳皮質運動野に限局されており, 中枢神経系の各領域により薬剤効果に違いがあることを示唆している.

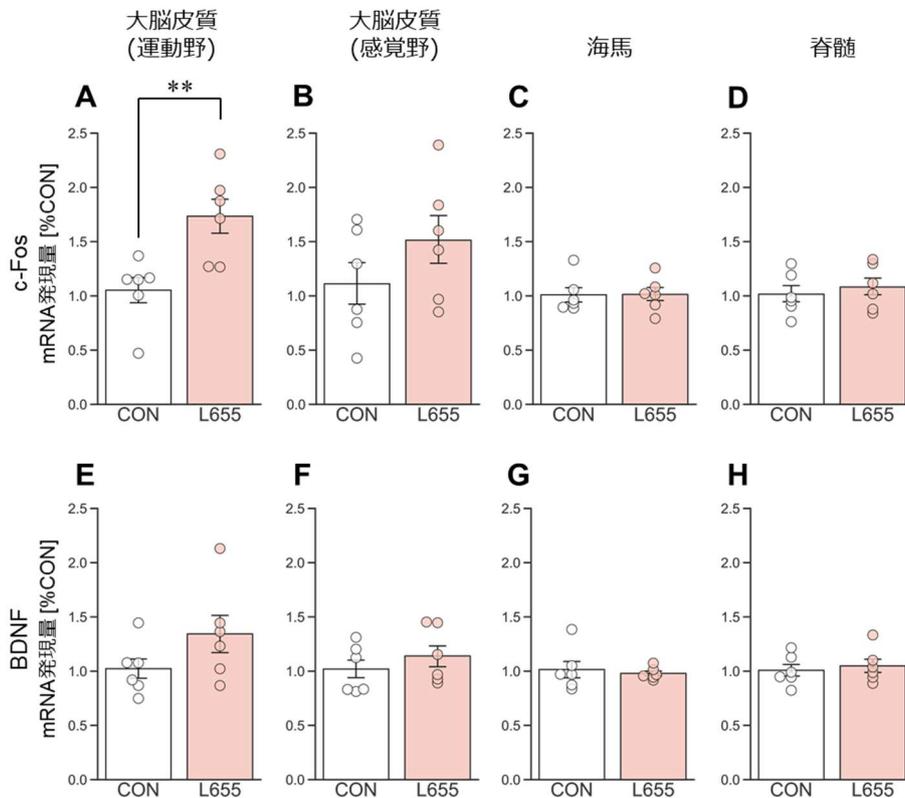


図 3-5. L-655,708 投与が中枢神経系における遺伝子発現に与える影響

L-655,708 投与が大脳皮質運動野 (A, E), 大脳皮質感覚野 (B, F), 海馬 (C, G), 脊髄 (D, H)における c-Fos mRNA 発現 (A-D), BDNF mRNA 発現 (E-F) に与える影響. 大脳皮質運動野における L655 群の c-Fos mRNA 発現は, CON 群と比較し有意に高値を示した (A). その他の領域における c-Fos mRNA および BDNF mRNA 発現に有意な群間差は認められなかった. 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. 各 mRNA 発現量は各領域における CON 群の発現量を基準とする相対発現量で表記した. [** $p < 0.01$, CON vs. L655]

大脳皮質運動野における神経活動マーカーと神経栄養因子の遺伝子発現量の関係

L-655,708 投与により神経活動の修飾が認められた大脳皮質運動野に着目し、神経活動マーカーと BDNF 遺伝子発現との関係性について検証した。相関分析の結果、大脳皮質運動野における c-Fos mRNA 発現量と BDNF mRNA 発現量との間に有意な正の相関が認められた ($r=0.609, p=0.036$, 図 3-6)。この結果は、大脳皮質運動野における神経活動マーカーの発現量が高い個体ほど、同領域における BDNF 遺伝子発現量も大きいことを示している。

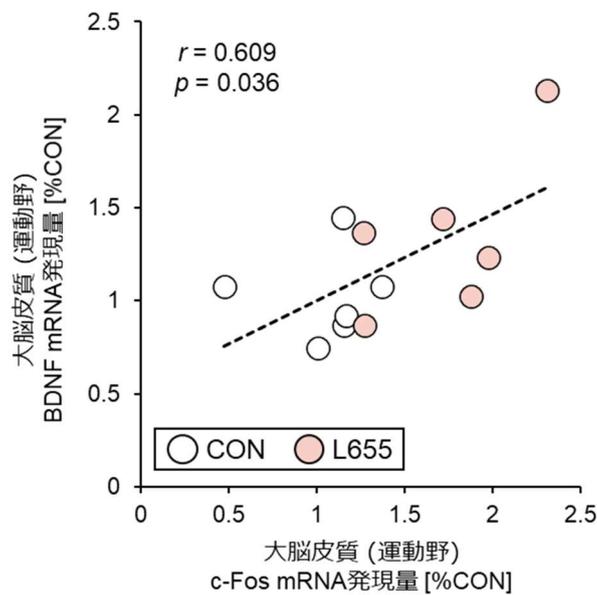


図 3-6.大脳皮質運動野における c-Fos mRNA 発現量と BDNF mRNA 発現量の関係
大脳皮質運動野における c-Fos mRNA 発現量と BDNF mRNA 発現量との間に有意な正の相関が認められた。

自発的活動性と神経活動マーカー、神経栄養因子の遺伝子発現量との関係

最後に、自発的活動性と大脳皮質運動野における遺伝子発現との関係について検証した。相関分析の結果、Open field test (投与後) における総移動距離と大脳皮質運動野 c-Fos mRNA 発現量との間に有意な正の相関が認められた ($r = 0.589$, $p = 0.044$, 図 3-7A)。加えて、総移動距離と大脳皮質運動野 BDNF mRNA 発現量との間にも有意な正の相関が認められた ($r = 0.610$, $p = 0.035$, 図 3-7B)。これらの結果は、自発的活動性が高い個体ほど、大脳皮質運動野の神経活動マーカーおよび BDNF 遺伝子の発現量が大きいことを示している。

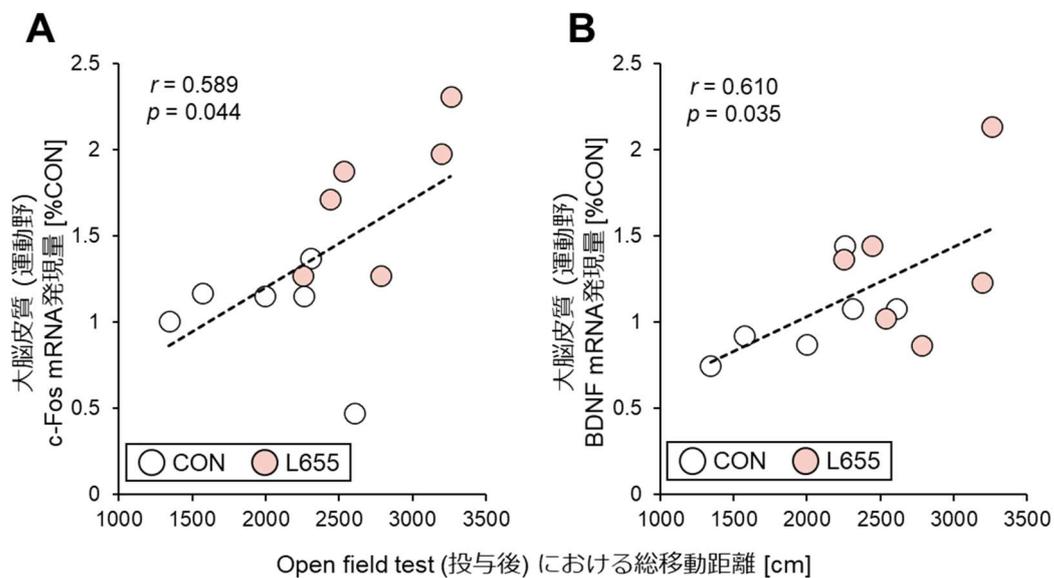


図 3-7. 自発的活動性と大脳皮質運動野における遺伝子発現量との関係

Open field test (投与後) における総移動距離と大脳皮質運動野 c-Fos mRNA 発現量との間に有意な正の相関が認められた (A)。また、総移動距離と大脳皮質運動野 BDNF mRNA 発現量との間にも有意な正の相関が認められた (B)。

III-4. 考察

本章では、L-655,708 (0.5 mg/kg) の単回腹腔内投与が、健常ラットの中枢神経系における神経活動や行動に与える影響を検証した。その結果、L-655,708 投与は大脳皮質運動野において神経活動マーカーの c-Fos mRNA 発現を増強することが明らかとなった。さらに、L-655,708 投与は痙攣発作や不安様行動に影響を与えることなく、自発的活動性を増強することが示された。自発的活動性は中枢神経系の興奮性を示す行動指標の 1 つであることを踏まえると^{131,132}、本章で用いた薬剤投与プロトコルは、易興奮性コンディショニングを目的とする薬理的神経制御としての妥当性を有することが生化学的解析および行動学的解析の両方の検証結果によって支持される。

本章では探索的に大脳皮質、海馬、脊髄の神経活動を検証したが、興味深いことに、L-655,708 による神経活動の有意な増強は大脳皮質運動野に限局されていた (図 3-5)。 $\alpha 5$ GABA_A 受容体を構成する $\alpha 5$ サブユニットは、中枢神経系の中でも特に海馬と大脳皮質深層に多く発現していることが知られており^{60,133}、本実験からも $\alpha 5$ サブユニットをコードする GABRA5 遺伝子発現は、海馬で最も多いことが確認できた (補遺 1)。加えて、L-655,708 投与は各領域の GABRA5 遺伝子発現に影響を与えなかった (補遺 2)。そのため本章の結果からは、L-655,708 投与による神経活動修飾効果は、薬理標的の $\alpha 5$ GABA_A 受容体の発現量に依存しないことが示唆される。領域間の薬剤効果の乖離を明らかにするには更なる検証が必要である。

その一方で、L-655,708 投与は、大脳皮質運動野の神経活動を直接的に増強したのではなく、自発的活動性の増強を介して間接的に神経活動が増強された可能性も考えられる。実際、自発的活動性が高い個体ほど大脳皮質運動野 c-Fos mRNA 発現量が多いという関係性が認められているが (図 3-7)、本研究の結果からはこれらの因果関係までは言及できない。しかし、本研究から得られた主要な知見：①L-655,708 の投与により自発的活動性および大脳皮質運動野 c-Fos 発現が増強されること (図 3-4, 3-5)、②その自発的活動性および大脳皮質運動野 c-Fos 発現は、大脳皮質運動野 BDNF mRNA 発現量と正の相関関係を有すること (図 3-6, 3-7) を総じて鑑みると、少なくとも、L-655,708 投与は大脳皮質運動野の神経活動依存的な可塑性を有益に修飾することが可能であると解釈できる (図 3-8)。

重要なことに、本章における L-655,708 (0.5 mg/kg) の単回腹腔内投与は、行動に反映される明らかな副作用を示さなかった。L-655,708 投与の安全性を保証するためには、脳波計測による痙攣評価や不安様行動に特化した行動学的評価 (高架式十字迷路) などを用いて¹³⁴⁻¹³⁶、更なる検証が必要だが、本研究の行動評価の結果は投与用量を決定する際の一助となり得る。GABA_A 受容体は、構成するサブユニットに依存した抑制作用を有していると理解されており、不安や痙攣には主に $\alpha 2$ や $\alpha 3$ サブユニットが関与する⁵⁴。L-655,708 は $\alpha 5$ サブユニットへの親和性が非常に高いことが知られている一方¹²⁵、高用量で適用した場合に

は、他のサブユニット ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) への親和性も増し、特異性の欠如につながる事が実証されている⁸²。そのため、高用量の L-655,708 投与は副作用が懸念されており、実際に他の研究は、本実験よりも 1.25-10 倍高い用量での L-655,708 の投与により不安様行動が増加したことを報告している¹³⁷。したがって、L-655,708 投与による薬的神経制御において副作用を回避するためには、本章で採用した 0.5 mg/kg のように低用量で $\alpha 5$ サブユニット特異性を保つことが重要であると考えられる。

最後に、次章において L-655,708 投与と運動介入の併用効果について検証するにあたり、薬剤投与後の適切な時間枠にて運動介入を行う必要があることを付記する。本章では、L-655,708 投与後 30 分に行った行動評価および生化学的解析から神経活動修飾効果が認められた。Atack らの先行研究において、L-655,708 の腹腔内投与直後から 120 分間は、脳 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の半数以上を阻害 (占有率 50%以上) しているが、投与後 60 分以降は高かった占有率 (約 80%) が急激に低下している様子が認められる¹²⁵。また、血中薬理動態の検証では投与後 30 分で L-655,708 の血中濃度が半減期を迎えることが示されているため⁸²、L-655,708 は代謝が早く、長時間の神経活動修飾効果は期待できないことが推察される。本章で認められた L-655,708 の効果が、投与後いつから始まり、どの程度維持されるのかを明らかにするには更なる検証が必要であるが、これら一連の知見を鑑みると、L-655,708 による薬理的コンディショニングの下で運動介入を行うには、薬剤投与から 30 分後に運動介入を行っている状態が望ましいと考えられる。

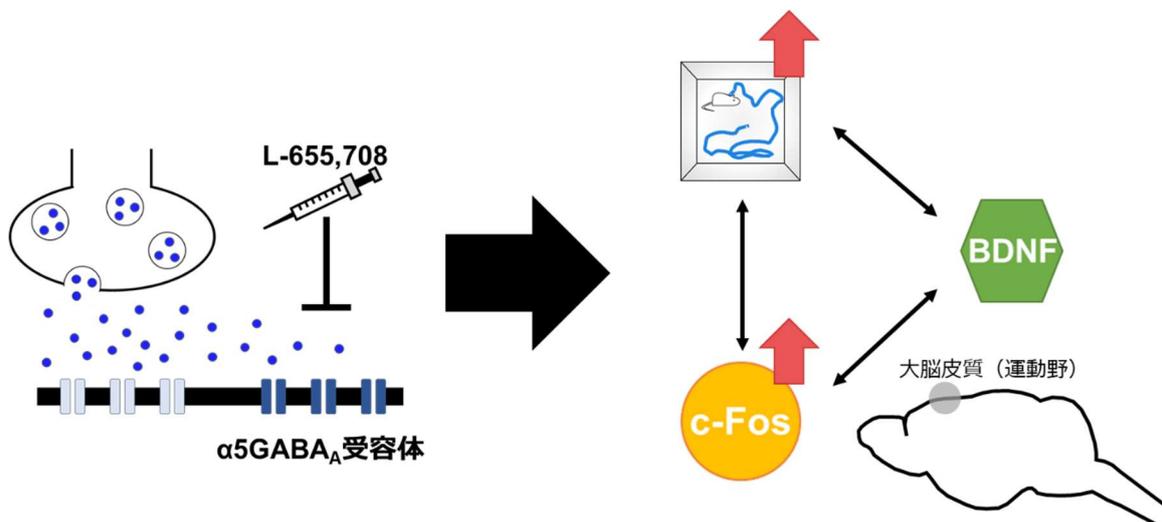


図 3-8. $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体を標的とする薬理的神経制御の効果

$\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の特異的阻害薬である L-655,708 投与は、健常ラットの自発的行動性や大脳皮質運動野における神経活動マーカー (c-Fos mRNA) 発現を有意に増強した。また、これらの指標と大脳皮質運動野における神経栄養因子 (BDNF) の遺伝子発現量の間には有意な正の相関が認められた。本章の一連の結果から、L-655,708 投与は、大脳皮質運動野の神経活動依存的な可塑性を有益に修飾することが示唆される。

Ⅲ－5. 小括

本章を総括すると, L-655,708 (0.5 mg/kg) の腹腔内投与による薬理的神経制御は, 大脳皮質運動野における神経活動を増強し, 活動依存的な可塑性を有益に修飾し得ることが明らかとなった. 加えて, 本章で用いた薬剤投与プロトコルでは行動に反映される明らかな副作用を示さなかったことも重要な所見である. 一方で, 本章では大脳皮質感覚野, 海馬, 脊髄には薬剤投与効果が認められなかったことから, 本プロトコルによる薬理的 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害は, 中枢神経系の中でも, とりわけ大脳皮質運動野の易興奮性コンディショニングとして有用であることが示唆される.

III-6. 補遺

補遺 1: 中枢神経系における GABRA5 遺伝子発現

L-655,708 は $\alpha 5$ GABA_A 受容体を薬理標的とし, その $\alpha 5$ GABA_A 受容体の $\alpha 5$ サブユニットは GABRA5 遺伝子にコードされる. そのため事前に, 中枢神経系の領域間における $\alpha 5$ GABA_A 受容体の発現量の違いを推定するため, 薬剤投与による影響を受けていない CON 群のサンプルを対象に, 各領域の GABRA5 遺伝子発現量を定量した. GABRA5 遺伝子発現量の領域間の比較には一元配置分散分析を実施した. 主効果が有意であった場合は, 事後検定として Tukey 検定を用いて多重比較を行った. GABRA5 mRNA 発現量は大脳皮質運動野の発現量を基準とする相対発現量で表記した.

大脳皮質, 海馬, 脊髄における GABRA5 mRNA 発現量を図 3-9 に示す. 一元配置分散分析の結果, 有意な主効果が認められた ($F_{2,15} = 26.470, p < 0.001$). 多重比較の結果, 海馬 GABRA5 mRNA 発現量は他の領域と比較し有意に高値を示した ($p < 0.001$). また, 大脳皮質運動野の GABRA5 mRNA 発現量は, 大脳皮質感覚野および脊髄と比較し有意に高値を示した ($p < 0.001$). 大脳皮質感覚野と脊髄 GABRA5 mRNA 発現量の間には有意差は認められなかった ($p = 0.647$). これらの結果から, GABRA5 mRNA は海馬で最も発現が高く, 次いで大脳皮質運動野であり, 次いで大脳皮質感覚野と脊髄は同等の発現量であることが確認された.

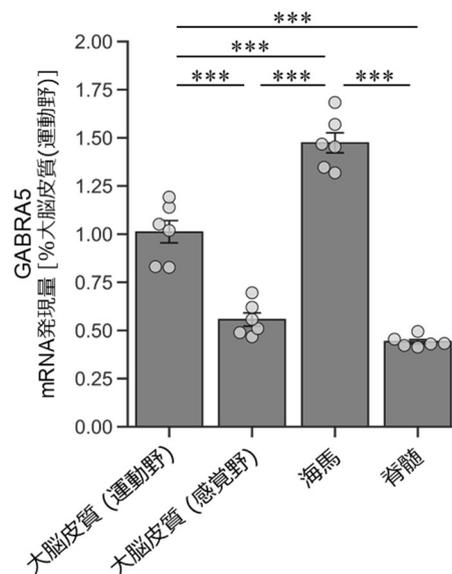


図 3-9. 中枢神経系における GABRA5 遺伝子発現

中枢神経系における GABRA5 mRNA 発現量の差異. GABRA5 mRNA は海馬で最も発現が高く, 次いで大脳皮質運動野であり, 次いで大脳皮質感覚野と脊髄は同等の発現量であった. 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. GABRA5 mRNA 発現量は大脳皮質運動野の発現量を基準とする相対発現量で表記した. [*** $p < 0.001$, 有意な領域間の差].

補遺 2: L-655,708 投与が中枢神経系における GABRA5 発現に与える影響

各群の GABRA5 mRNA 発現量を図 3-10 に示す. 対応のない t 検定の結果, いずれの領域においても, GABRA5 mRNA 発現量に有意な群間差は認められなかった ($t=0.032, p=0.975$, 図 3-10A; $t=0.083, p=0.935$, 図 3-10B; $t=0.650, p=0.531$, 図 3-10C; $t=-1.294, p=0.225$, 図 3-10D). この結果は, L-655,708 の単回投与が, 薬理標的である $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の $\alpha 5$ サブユニットをコードする GABRA5 遺伝子発現に影響を与えないことを示している. したがって, L-655,708 投与はその薬理標的である受容体の発現量には影響を与えないことが示唆される.

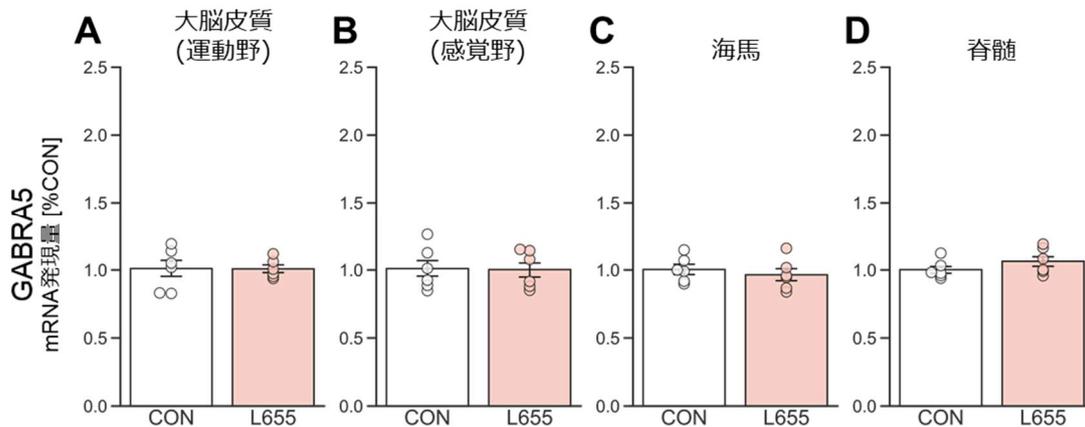


図 3-10. L-655,708 投与が中枢神経系における GABRA5 発現に与える影響

各グラフは大脳皮質運動野 (A), 大脳皮質感覚野 (B), 海馬 (C), 脊髄 (D) における CON 群と L655 群の GABRA5 mRNA 発現量を示す. いずれの領域においても, GABRA5 mRNA 発現量に有意な群間差は認められなかった. 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. GABRA5 mRNA 発現量は各領域における CON 群の発現量を基準とする相対発現量でそれぞれ表記した.

第 IV 章

薬理的神経制御を伴う運動療法が脳出血後の機能回復に与える影響

【Inoue et al., *Neuroscience Letters* 766, 136344, (2022)】

IV-1. 背景

脳卒中後の Tonic inhibition を標的とする薬物療法においては、現在 2 つの治療戦略が提唱されている¹³⁸。まず 1 つ目は先にも述べたように、脳卒中後に過剰に増強する Tonic inhibition は機能回復の阻害因子として負の影響をもたらすため、Tonic inhibition を阻害・減弱しようとする試みである^{64,66,69}。一方で、Clarkson らは、Tonic inhibition を阻害する L-655,708 を脳卒中発症直後から投与した場合、損傷領域が拡大することを明らかにし、脳卒中後の Tonic inhibition は神経保護的な役割も有していることを見出した⁶⁴。このことから、脳卒中後初期 (3 日以内) においては、翻って Tonic inhibition を増強する治療戦略が有効であると考えられており、実際に Tonic inhibition を増強すると、炎症反応の抑制と損傷領域が縮小する所見が認められている^{138,139}。これらを鑑みると、脳卒中後の Tonic inhibition を阻害する本研究の薬理的コンディショニングは、脳卒中急性期を避け、亜急性期以降に行うべき治療戦略であると考えられる。そこで本章では、第 II 章で著明かつ長期的な運動機能障害を呈した IC-ICH モデルを対象に、脳出血後 1 週からの亜急性期に焦点を当て、運動介入と $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬の投与が脳出血後の機能回復に与える影響を明らかにすることを目的とした。

脳卒中後の機能回復は、主に残存した中枢神経領域に依存するが、近年では病巣から離れた非損傷側半球や脊髄領域における可塑的变化も注目を集めている^{92,140,141}。特に、大脳皮質を起点に脊髄へと投射する皮質脊髄路 (CST) の脊髄内での再編は、脳卒中後に生じる部分的な自然回復や、リハビリによる機能回復を支える重要な神経学的機序の 1 つである¹⁴²⁻¹⁴⁴。CST の再編は、下位頸髄領域で多く報告されており^{145,146}、再編し新たに形成された神経回路は、その支配領域にあたる前肢 (齧歯類) の運動機能を担うことが示されている^{146,147} (図 4-1)。

神経回路の再編は主に、軸索発芽およびシナプス形成に基づくと考えられており¹⁴⁸、その素子として、脳や脊髄における BDNF をはじめ様々な可塑性関連因子が分子マーカーとなり得る^{92,147,149,150}。例えば、GAP-43 (Growth-associated protein 43) は、軸索の成長円錐に多く存在する成長関連蛋白であり、軸索の再生や発芽に伴って発現量が高くなることから軸索発芽マーカーとして使用される¹⁵¹。また、Synaptophysin は活動依存的なシナプス形成に関与するシナプス小胞蛋白であり、広くシナプスマーカーとして使用されている¹⁵²。一方で、中枢神経系には内因性の成長阻害因子も存在し、Nogo-A と呼ばれるミエリン関連蛋白は軸索伸展を阻害、すなわち成長阻害作用を有している¹⁵³。以上より、本章では各介入の機能回復効果のみならず、運動介入と薬理的 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害が、大脳皮質および脊髄における可塑性関連因子の蛋白発現に与える影響も明らかにし、機能回復を支える可塑的变化についても検証を行った。

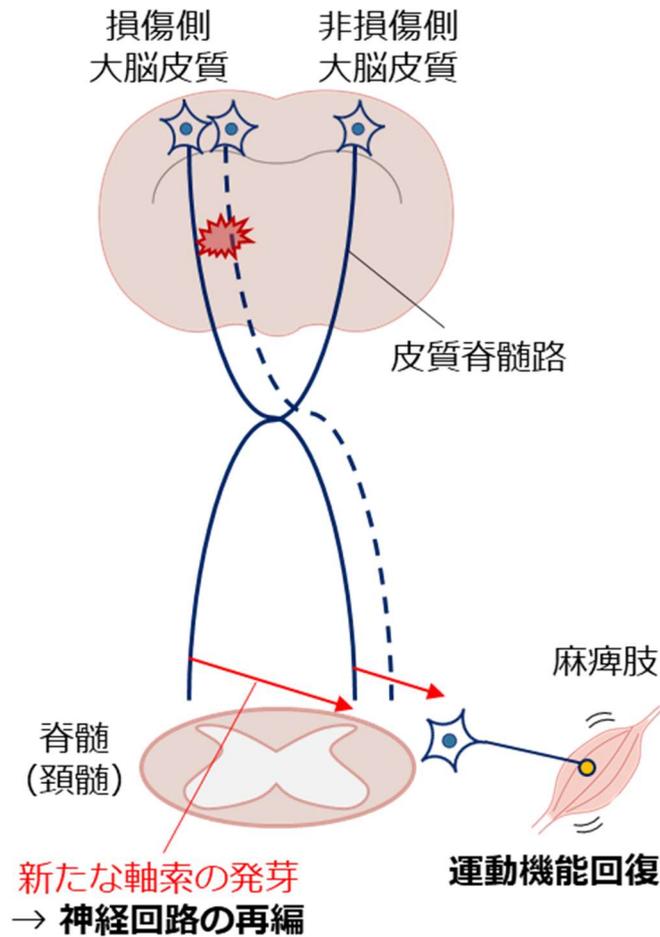


図 4-1. 皮質脊髓路の再編

脳卒中後に残存した皮質脊髓路は、脊髓内で新たな軸索を発芽し、代償的な神経回路を形成 (再編) することが報告されている。この新たに形成された神経回路は、障害された運動機能を担う役割を持つため、脳卒中後に生じる部分的な自然回復や、リハビリによる機能回復を支える重要な神経学的機序の 1 つである。こうした神経回路の再編は主に、軸索発芽やシナプス形成に基づくと考えられている。

IV-2. 方法

IV-2-1. 対象および実験概要

本章の実験概要を図 4-2 に示す. 本章における脳出血モデルラットは, 第 II 章と同様の IC-ICH モデルを用いており, 手術プロトコルは第 II 章と同様である. 手術実施時において 9 週齢の雄性 Wistar ラット 41 匹 (277.1 ± 11.7 g, 平均値 \pm 標準偏差) を, 偽手術による手術侵襲のみを与える SHAM 群 ($n = 8$), ICH 手術のみを行う ICH 群 ($n = 8$), ICH 手術後に運動介入を行う ICH+EX 群 ($n = 8$), ICH 手術後に L-655,708 投与を行う ICH+L6 群 ($n = 8$), ICH 手術後に L-655,708 投与と運動介入を併用する ICH+L6EX 群 ($n = 8$) の 5 群に無作為に割り当てた. 手術中に死亡した個体 1 匹は対象から除外された. 動物の飼育管理等は前章までと同様である. 本研究も前章までと同様に, 北海道大学総長の承認の下で「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り実施された (承認番号: 19-0101).

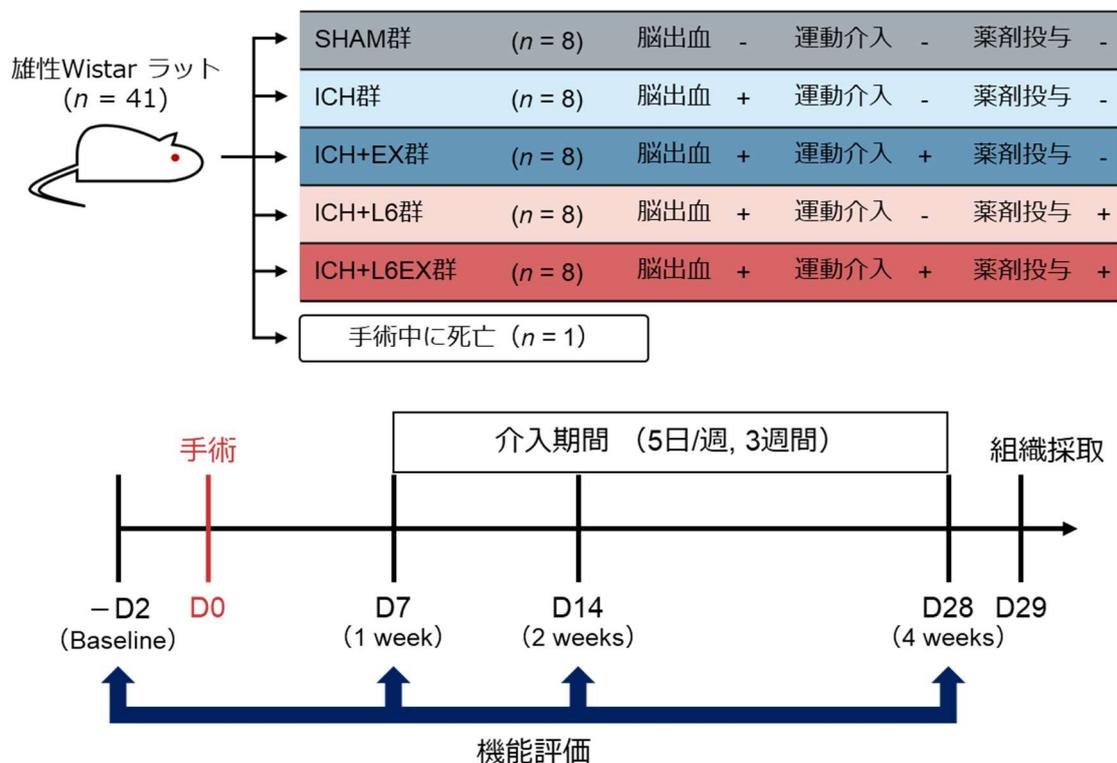


図 4-2. 本章の実験概要

雄性 Wistar ラットを, 各要因の有無により SHAM 群, ICH 群, ICH+EX 群, ICH+L6 群, ICH+L6EX 群の 5 群に割り当て, 運動と L-655,708 投与の介入効果を検証した. 各介入は, 術後 1 週から術後 4 週までの計 3 週間, 1 回/日, 5 日/週の頻度で実施した. 手術 2 日前 (Baseline), 1 週目, 2 週目, 4 週目において Tape removal task を実施し, 前肢感覚運動機能の評価を行った. 組織採取は最終介入の翌日に実施し, 採取した脳・脊髄組織から可塑性関連因子の蛋白発現を定量した.

IV-2-2. 運動介入

ICH+EX 群と ICH+L6EX 群には、トレッドミル走行による運動介入を実施した (図 4-3). 脳卒中モデルラットの機能回復促進や脳 BDNF 発現増強を報告した先行研究の運動強度に基づき^{41,154}, 走行速度 12 m/min の中等度強度で 30 分間の運動介入を実施した. 介入期間は, 術後 1 週から術後 4 週までの計 3 週間とし, 1 回/日, 5 日/週の頻度で実施した. 運動環境に対する適応のため, 走行速度 5 m/min で 5 分間の走行練習を, 術前に合計 3 日間実施した. 発症前の運動介入は, 様々な脳障害に対する神経保護効果を有することが実証されているため^{155,156}, 手術前の走行練習は ICH+EX 群と ICH+L6EX 群のみならず全てのラットを対象とした.



図 4-3. トレッドミル走行運動の様子

小動物用トレッドミル (MK-680, 室町機械) を用いて運動介入を実施した.

IV-2-3. 薬剤投与

ICH+L6 群と ICH+L6EX 群には, $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体特異的ネガティブアロステリックモジュレーターの L-655,708 (Tocris Bioscience, Cat.#1327, UK) を, 0.5 mg/kg の用量で腹腔内投与した. 薬剤投与も運動介入と同様に, 術後 1 週から術後 4 週までの計 3 週間, 1 回/日, 5 日/週の頻度で行った. 前章の結果より, 投与 30 分後に神経活動マーカー c-Fos 発現の増強が確認されたため, 運動中にその神経活動修飾効果を得るために ICH+L6EX 群への薬剤投与は運動介入の 10-15 分前に行った. 薬剤投与群と同等のストレスおよび侵襲を与えるために, SHAM 群, ICH 群と ICH+EX 群には同時刻に同容量の生理食塩水を腹腔内投与した. なお, 本研究において L-655,708 を投与した全てのラットに痙攣発作は観察されていない.

IV-2-4. 行動学的評価

手術 2 日前 (Baseline), 1 週目, 2 週目, 4 週目において, Tape removal task を実施し, ラット前肢の感覚運動機能を評価した (図 4-4). 先行研究のプロトコルに基づき^{72,157}, ラットの手掌に粘着テープ (約 169 mm²) を貼った後, 白色のオープンフィールド (60 cm × 60 cm) に入れ, 粘着テープを手掌から剥がすまでの時間 (Latency to remove) を計測した. 測定は左右前肢それぞれ 1 回ずつ実施し, 上限は計測開始から 120 秒とした. 前肢の感覚運動障害を呈する場合, Latency to remove の値は大きくなる. 全てのラットは手術前に合計 5 日間 (1 日 1 回) の練習を行った. なお, 1 週目, 2 週目, 4 週目の評価は各介入前に実施しており, 本評価前の約 24 時間以内に運動介入や薬剤投与による外因的な刺激はなかった.

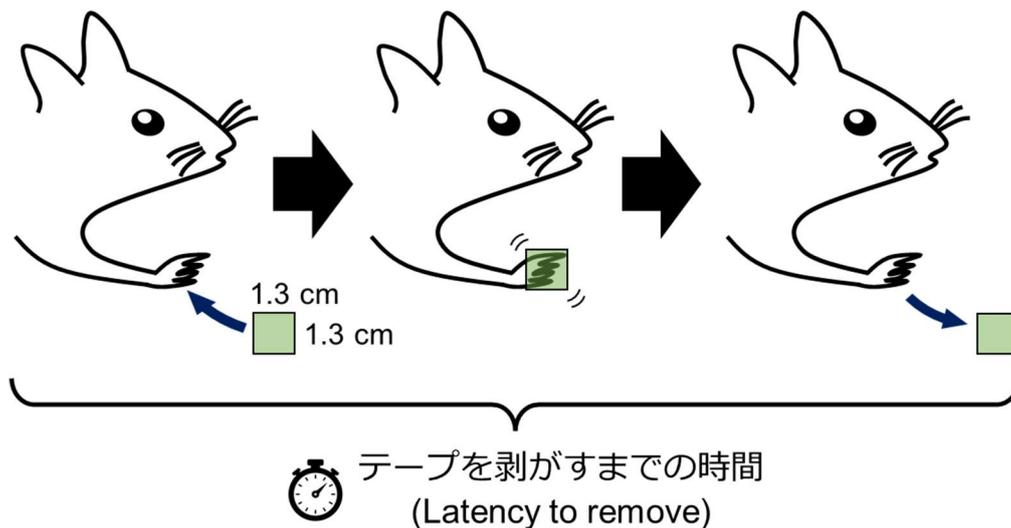


図 4-4. Tape removal task の概要

Tape removal task では, ラット前肢に貼ったテープを剥がすまでの時間 (Latency to remove) を計測する. 脳卒中による前肢の感覚運動障害を呈する場合, Latency to remove の値は大きくなる.

IV-2-5. 組織採取

最終介入の24時間後に組織採取を行った。組織採取の方法および、前額断脳スライスの作成は前章までと同様である。スキャナー (GT-S650, EPSON, 日本) で脳スライス断面の画像を取得後、前方から3枚目の前額断スライスから両側半球の大脳皮質運動野 (bregma 0.0 ~ 2.0 mm) を、脊髄組織は下位頸髄にあたる C4-6 レベルを採取した。各試料はドライアイス上で凍結させた後に、生化学的解析に使用するまでディープフリーザー (-80°C) で保存した。

IV-2-6. 形態計測学的解析

先行研究のプロトコルに基づき¹⁵⁸⁻¹⁶⁰, 撮影した脳組織画像から出血損傷体積を算出した。ImageJ software (v1.52, NIH, USA) を用いて、盲検化された2名の検者が各スライスの出血損傷領域の面積を計測した (図 4-5)。各個体の出血損傷領域の面積の合計に、脳スライスの厚さ (2 mm) を乗じて出血損傷体積を算出した。

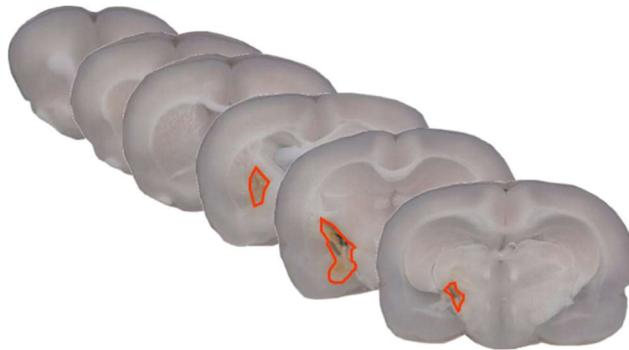


図 4-5. 出血損傷体積の算出

撮影した脳組織画像 (1 個体あたり 6 枚の前額断スライス) から, ImageJ software を用いて, 盲検化された検者が損傷領域の面積 (赤枠部分) を計測した。その面積値に脳スライスの厚さ (2 mm) を乗じて出血損傷体積を算出した。

IV-2-7. 生化学的解析

採取した大脳皮質・脊髄組織から、生化学的解析により可塑性関連因子の蛋白発現量を定量した。BDNF は ELISA 法, その他の蛋白は Western Blotting 法を用いて定量した。総蛋白サンプルの抽出, 総蛋白濃度の計測, ELISA 法のプロトコルは第 II 章に準ずる。

Western Blotting 法による蛋白発現量の相対定量

62.5 mM Tris-HCl, 2% Sodium dodecyl sulfate (SDS, 199-0714, 富士フイルム和光純薬), 10% Glycerol (17029-00, 関東化学, 日本), bromophenol blue (04319-60, 関東化学), 5% 2-mercaptoethanol (137-06862, 富士フイルム和光純薬) を含む SDS sample loading buffer を加え, 95 °C で 5 分間加熱し, 蛋白サンプルの還元・変性処理を行った。

総蛋白 10 µg を含む蛋白サンプル溶液 16 µL ならびに各種分子量マーカー (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, RPN800E, GE Healthcare, UK; MagicMark™ XP Western Protein Standard, LC5602, Invitrogen, USA; YesBlot™ Western Marker I, WM1000, SMOBIO, Taiwan; G-02102, BIO CRAFT, 日本) を 12% ポリアクリルアミドゲルの各レーンに注ぎ, 電気泳動装置 (AE-6530, WSE-1165, ATTO, 日本) を使用し 300 V, 50 mA で 90 分間電気泳動を行った。その後, セミドライ式ブロッティング装置 (AE-6677, WSE4025, ATTO) を使用し, PVDF メンブレン (FluoroTrans W, EH-2222, Pall Corporation, USA) に 300 V, 100 mA で 60 分間かけて転写した。転写終了後, Tris buffered saline with Tween® 20 (TBST) 溶液で 10 分間洗浄した後, TBST に 5% のスキムミルク (190-12865, 富士フイルム和光純薬) を溶解させた 5% Blocking buffer に室温で 1 時間インキュベートし, ブロッキングを行った。

ブロッキング後, TBST で 10 分間洗浄した後, 2.5% Blocking buffer に一次抗体を混合し, ハイブリパックに挿入し 4 °C にて一晩反応させた。一次抗体は, ウサギ由来抗 GAP-43 抗体 (1:500, 5307S, Cell signaling technology, USA), ウサギ由来抗 Synaptophysin 抗体 (1:10000, 5431S, Cell signaling technology), ウサギ由来抗 Nogo-A 抗体 (1:500, 13401S, Cell signaling technology), マウス由来抗 β -actin 抗体 (1:10000, A5316, Sigma-Aldrich, USA) をそれぞれ使用した。翌日, TBST で十分に洗浄した後, 一次抗体に対応する二次抗体として HRP 標識ウサギ IgG 抗体 (1:10000, NA934, GE Healthcare, USA), もしくは HRP 標識マウス IgG 抗体 (1:10000, NA931, GE Healthcare) に室温で 2 時間反応させた。

その後, ECL Prime Western Blotting Detection System (RPN2232, GE Healthcare) を用いて化学発光させ, ImageQuant LAS 4000 system (GE Healthcare) により以下の分子量域における各標的蛋白質のバンドを検出した (Synaptophysin, 38 kDa; β -actin, 42 kDa; GAP-43, 43 kDa; Nogo-A, 180kDa)。バンド濃度は, 画像解析ソフトウェア ImageJ software (v1.51, NIH, USA) を用いて定量した。各サンプルの値を, 内因性コントロールの β -actin の値で正規化し, 各蛋白発現量は SHAM 群の発現量を基準とする相対発現量で表記した。

IV-2-8. 統計解析

統計解析には SPSS Statistics (v26.0, IBM, USA) を使用した。Tape removal task における各前肢の Latency to remove には、時間 (Baseline, 1 週目, 2 週目, 4 週目) および群 (SHAM 群, ICH 群, ICH+EX 群, ICH+L6 群, ICH+L6EX 群) を二要因とする二元配置反復測定分散分析を実施した。有意な交互作用が認められた場合、事後検定として Bonferroni 検定を用いて、各群内の経時的変化の検証ならびに各時点における群間比較を行った。損傷体積、各蛋白発現量には、一元配置分散分析を実施した。有意な主効果が認められた場合、事後検定として Tukey 検定による多重比較を行った。二変数間の関連性の検証には、Pearson の相関係数 (r) を用いて相関分析を行った。有意水準はそれぞれ 5%とした。

IV-3. 結果

IV-3-1. 行動学的評価

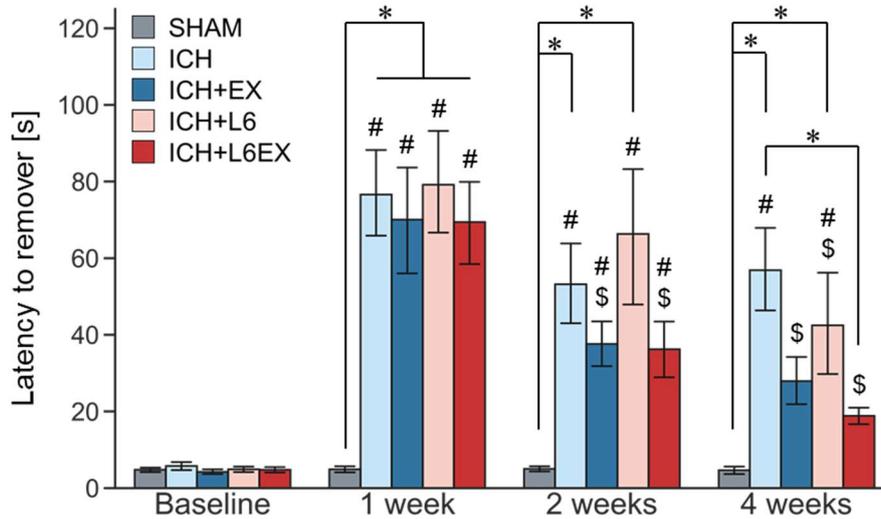
運動および L-655,708 投与が脳出血後の機能回復に与える影響

Tape removal task における両前肢の Latency to remove の経時的变化を図 4-6 に示す. 二元配置反復測定分散分析の結果, 麻痺側前肢の Latency to remove に有意な交互作用および各要因の有意な主効果が認められた (交互作用: $F_{12,105} = 3.594, p < 0.001$, 時間: $F_{3,105} = 43.286, p < 0.001$, 群: $F_{4,35} = 8.663, p < 0.001$, 図 4-6A). 一方で, 非麻痺側前肢の Latency to remove には有意な交互作用および主効果はいずれも認められなかった (交互作用: $F_{12,105} = 0.768, p = 0.682$, 時間: $F_{3,105} = 2.430, p = 0.069$, 群: $F_{4,35} = 1.148, p = 0.350$, 図 4-6B).

麻痺側前肢の Latency to remove に関する事後検定の結果を以下に示す. Baseline における有意な群間差, SHAM 群における有意な経時的变化は認められなかった. 脳出血後の ICH 群の値は, Baseline と比較し有意に増加し (1 week: $p < 0.001$, 2 week: $p < 0.001$, 4 week: $p < 0.001$), 脳出血後のいずれの時点においても SHAM 群と比較し有意に高値であった (1 week: $p = 0.002$, 2 week: $p = 0.025$, 4 week: $p = 0.001$). また, 脳出血後の ICH+L6 群の値も同様に, Baseline と比較し有意に増加し (1 week: $p < 0.001$, 2 week: $p < 0.001$, 4 week: $p = 0.001$), 脳出血後のいずれの時点においても SHAM 群と比較し有意に高値であったが (1 week: $p = 0.001$, 2 week: $p = 0.002$, 4 week: $p = 0.035$), 脳出血後 4 週目の値は 1 週目と比較し有意に減少した (1 week vs. 4 weeks: $p = 0.039$). 脳出血後の ICH+EX 群および ICH+L6EX 群の値は, 脳出血後 1 週目に Baseline と比較し有意に増加し (ICH+EX, Baseline vs. 1 week: $p < 0.001$; ICH+L6EX, Baseline vs. 1 week: $p < 0.001$), 同時点では SHAM 群と比較し有意に高値であったが (SHAM vs. ICH+EX, $p = 0.005$; vs. ICH+L6EX, $p = 0.005$), いずれの群も脳出血後 2-4 週目には 1 週目と比較し有意に減少した (ICH+EX, 1 week vs. 2 weeks: $p = 0.028$, 1 week vs. 4 weeks: $p = 0.013$; ICH+L6EX, 1 week vs. 2 weeks: $p = 0.023$, 1 week vs. 4 weeks: $p = 0.002$). また, ICH+EX 群および ICH+L6EX 群の値は, 脳出血後 2-4 週目において SHAM 群との有意差は認められず, 脳出血後 4 週目においてはいずれの群の値も Baseline と比較し有意差は認められなかった. さらに, 脳出血 4 週間後においては, ICH+L6EX 群の値のみ ICH 群と比較し有意に低値を示した (ICH vs. ICH+L6EX, $p = 0.034$).

これらの結果を総括すると, ①本評価は脳出血モデルラットの麻痺側前肢の感覚運動機能障害を正確に検出でき, 非介入群 (ICH 群) の機能障害は本実験の最後 (脳出血後 4 週目) まで持続したこと, ②介入前 (脳出血後 1 週目) の各群の機能障害は同等であったこと, ③運動あるいは L-655,708 投与による部分的な機能回復効果は認められるものの, その効果は限定的であること (ICH+EX 群および ICH+L6 群), ④運動と L-655,708 投与の併用介入により効果的に機能回復が促進すること (ICH+L6EX 群), がそれぞれ示された.

A 麻痺側前肢



B 非麻痺側前肢

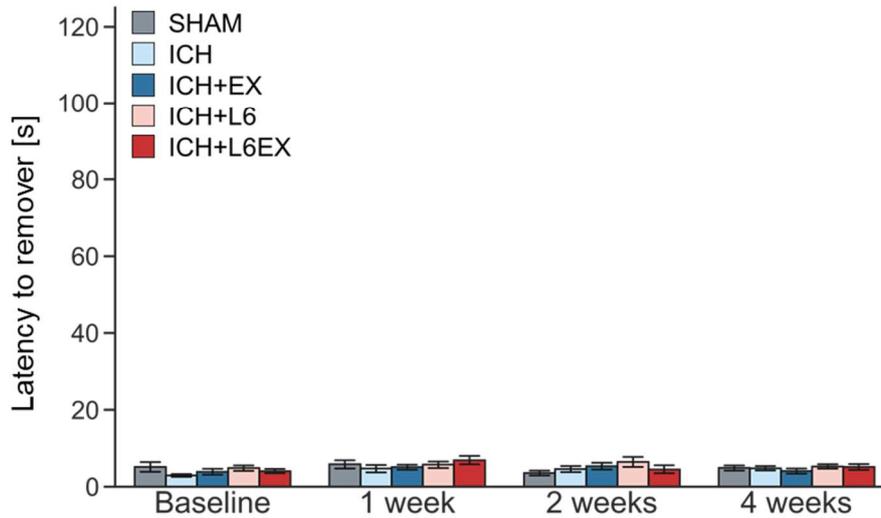


図 4-6. 各介入が脳出血後の機能回復に与える影響

各グラフは, Tape removal task のテープを剥がすまでの時間 (Latency to remove) を示す (A: 麻痺側前肢, B: 非麻痺側前肢). 前肢の機能障害を有する場合, Latency to remove の値は大きくなる. 結果は平均値±標準誤差で表記した. [* $p < 0.05$, 有意な群間差] [# $p < 0.05$, vs. Baseline] [\$ $p < 0.05$, vs. 1 week]

IV-3-2. 出血損傷体積

各群の出血損傷体積を図 4-7 に示す. 一元配置分散分析の結果, 有意な主効果が認められた ($F_{4,35} = 19.904, p < 0.001$). 事後検定の結果, 脳出血を誘導した ICH 群, ICH+EX 群, ICH+L6 群, ICH+L6EX 群はいずれも, SHAM 群と比較し有意な損傷領域が確認された ($p < 0.001$, 図 4-7). 一方で, ICH 群, ICH+EX 群, ICH+L6 群, ICH+L6EX 群の損傷体積に有意な群間差は認められなかった. この結果は, ①本実験の全ての脳出血モデルラットは, 出血による脳組織の病変を確実に有していたこと, ②各介入は出血損傷体積に影響を与えなかったこと, を示している.

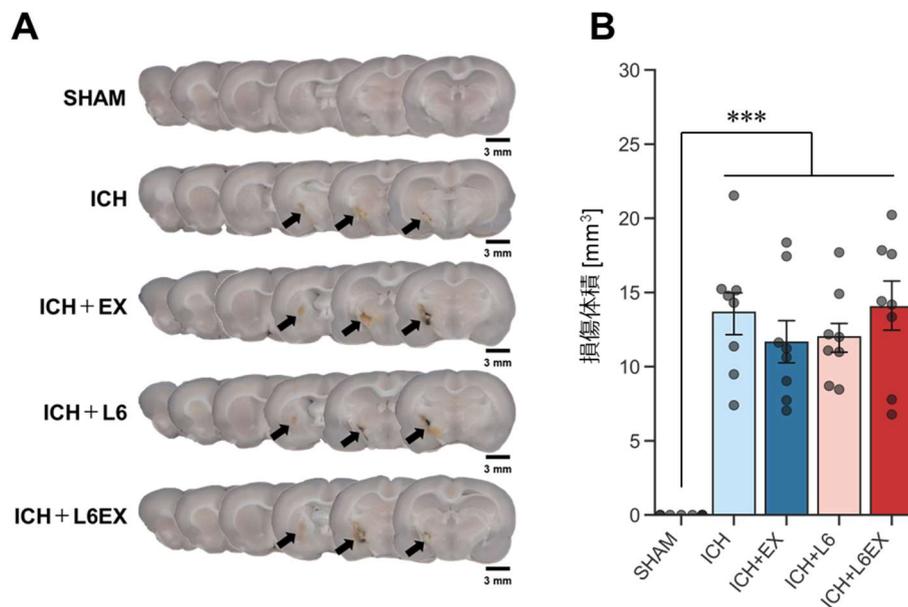


図 4-7. 各介入が出血損傷領域に与える影響

各群の代表的な脳組織画像 (A) および出血損傷体積 (B) を示す. 脳出血を誘導した 4 群 (ICH 群, ICH+EX 群, ICH+L6 群, ICH+L6EX 群) はいずれも有意な損傷領域が確認された一方で, その 4 群の損傷体積に有意な群間差は認められなかった. 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. [*** $p < 0.001$, vs. SHAM]

IV-3-3. 蛋白発現量

運動および L-655,708 投与が大脳皮質運動野における可塑性関連因子発現に与える影響

損傷側半球の大脳皮質運動野における BDNF, GAP-43, Synaptophysin の蛋白発現量を図 4-8 に示す. 一元配置分散分析の結果, BDNF 蛋白発現量のみ有意な主効果が認められた (BDNF, $F_{4,35} = 29.347$, $p < 0.001$, 図 4-8A; GAP-43, $F_{4,35} = 1.172$, $p = 0.340$, 図 4-8B; Synaptophysin, $F_{4,35} = 1.694$, $p = 0.173$, 図 4-8C). 事後検定の結果, ICH+L6 群および ICH+L6EX 群の BDNF 蛋白発現量は, 他の 3 群と比較し有意に高値を示した ($p < 0.001$, 図 4-8A). 一方で GAP-43 および Synaptophysin 蛋白発現量に有意な群間差は認められなかった (図 4-8B, 4-8C).

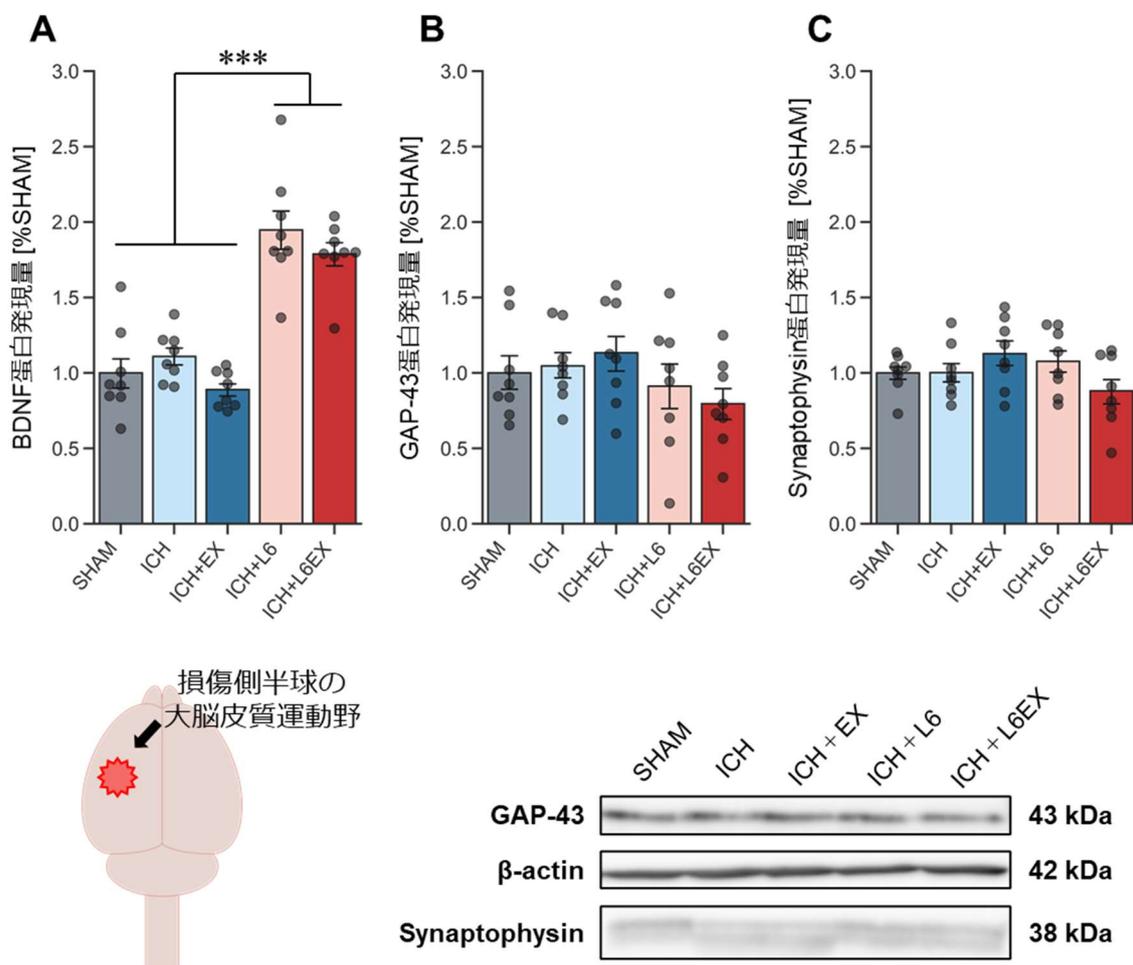


図 4-8. 損傷側半球の大脳皮質運動野における可塑性関連因子の蛋白発現

各グラフは損傷側半球の大脳皮質運動野における BDNF (A), GAP-43 (B), Synaptophysin (C) の蛋白発現量を示す. ICH+L6 群および ICH+L6EX 群の BDNF 蛋白発現量は, 他の群と比較し有意に高値を示した (***) $p < 0.001$, (A). 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. 各蛋白発現量は SHAM 群の発現量を基準とする相対発現量で表記した.

非損傷側半球の大脳皮質運動野における BDNF, GAP-43, Synaptophysin の蛋白発現量を 図 4-9 に示す. 一元配置分散分析の結果, BDNF 蛋白発現量のみ有意な主効果が認められた (BDNF, $F_{4,35} = 39.203$, $p < 0.001$, 図 4-9A; GAP-43, $F_{4,35} = 0.216$, $p = 0.927$, 図 4-9B; Synaptophysin, $F_{4,35} = 0.084$, $p = 0.987$, 図 4-9C). 事後検定の結果, ICH+L6 群および ICH+L6EX 群の BDNF 蛋白発現量は, 他の 3 群と比較し有意に高値を示した ($p < 0.001$, 図 4-9A). 一方で GAP-43 および Synaptophysin 蛋白発現量に有意な群間差は認められなかった (図 4-9B, 4-9C).

これらの結果は, 脳出血後に L-655,708 投与をすることで, 両側半球の大脳皮質運動野 BDNF 発現が増強されることを示している.

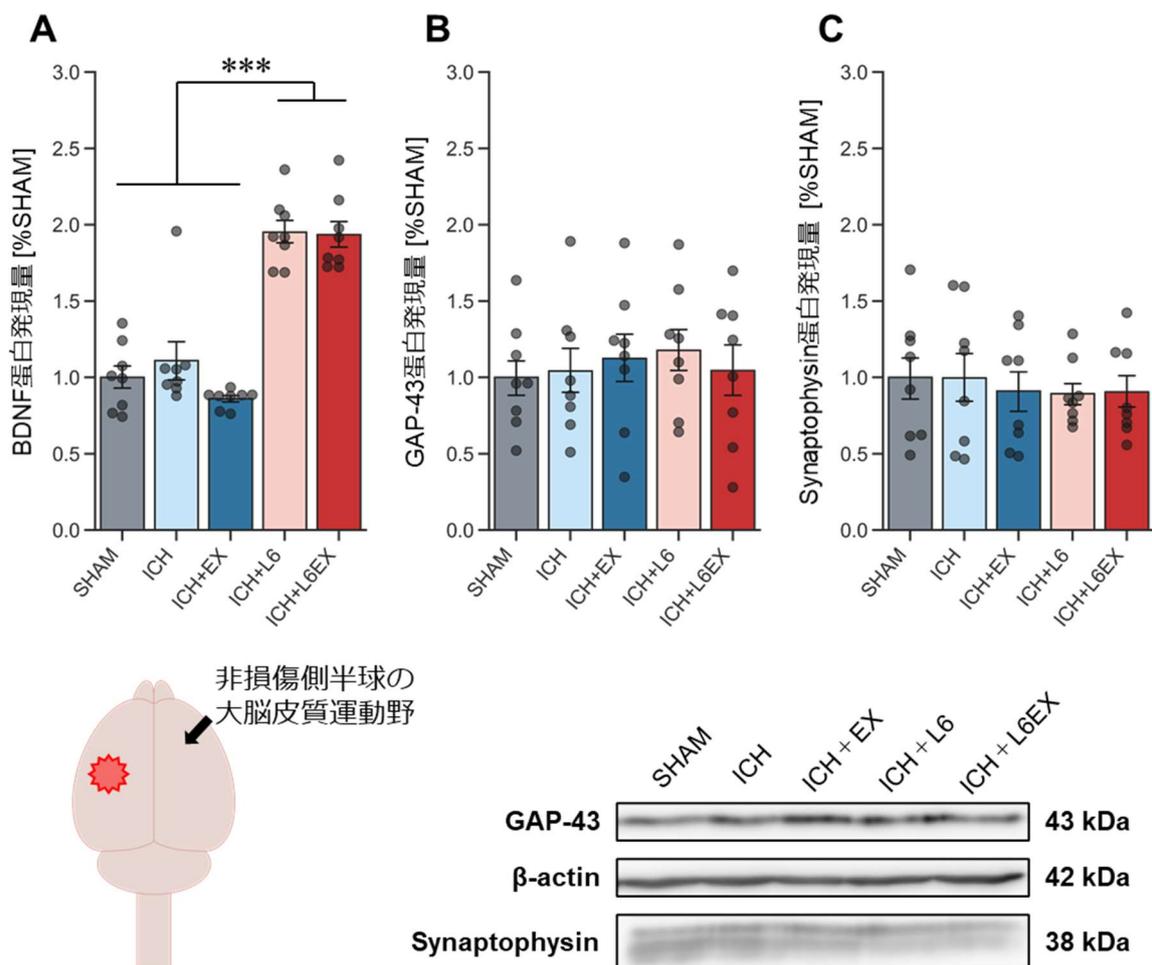


図 4-9. 非損傷側半球の大脳皮質運動野における可塑性関連因子の蛋白発現

各グラフは非損傷側半球の大脳皮質運動野における BDNF (A), GAP-43 (B), Synaptophysin (C) の蛋白発現量を示す. ICH+L6 群および ICH+L6EX 群の BDNF 蛋白発現量は, 他の群と比較し有意に高値を示した (***) $p < 0.001$, (A). 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. 各蛋白発現量は SHAM 群の発現量を基準とする相対発現量で表記した.

運動および L-655,708 投与が脊髄における可塑性関連因子発現に与える影響

脊髄における BDNF, GAP-43, Synaptophysin の蛋白発現量を図 4-10 に示す. 一元配置分散分析の結果, いずれの蛋白発現量にも有意な主効果が認められた (BDNF, $F_{4,35} = 7.841$, $p < 0.001$, 図 4-10A; GAP-43, $F_{4,35} = 8.032$, $p < 0.001$, 図 4-10B; Synaptophysin, $F_{4,35} = 2.985$, $p = 0.032$, 図 4-10C). 事後検定の結果, ICH+EX 群, ICH+L6 群, ICH+L6EX 群の BDNF 蛋白発現量は, SHAM 群と比較し有意に高値を示した (SHAM vs. ICH+EX, $p = 0.016$; vs. ICH+L6, $p < 0.001$; vs. ICH+L6EX, $p = 0.001$, 図 4-10A). また, ICH+L6 群および ICH+L6EX 群の GAP-43 蛋白発現量は, 他の 3 群と比較し有意に高値を示した (SHAM vs. ICH+L6, $p = 0.004$; ICH vs. ICH+L6, $p = 0.014$; ICH+EX vs. ICH+L6, $p = 0.009$; SHAM vs. ICH+L6EX, $p = 0.003$; ICH vs. ICH+L6EX, $p = 0.012$; ICH+EX vs. ICH+L6EX, $p = 0.008$, 図 4-10B). さらに, ICH+L6EX 群の Synaptophysin 蛋白発現量は, SHAM 群と比較し有意に高値を示した (SHAM vs. ICH+L6EX, $p = 0.030$, 図 4-10C). これらの蛋白発現の結果は, 各介入が脊髄可塑性に対して有益な影響を与えること, すなわち, ①運動あるいは L-655,708 投与はいずれも BDNF 発現を増強すること, ②L-655,708 投与により軸索発芽マーカー (GAP-43) 発現が脊髄で増強されること, ③運動と L-655,708 投与を併用した場合のみ, 脊髄におけるシナプスマーカー (Synaptophysin) 発現が増強されること, をそれぞれ示している.

最後に, 運動および L-655,708 投与が脊髄における成長阻害因子の蛋白発現に与える影響を検証した. 各群の脊髄における Nogo-A の蛋白発現量を図 4-11A に示す. 一元配置分散分析の結果, 有意な主効果が認められた ($F_{4,35} = 3.613$, $p = 0.014$). 事後検定の結果, ICH+L6EX 群の Nogo-A 蛋白発現量は, SHAM 群, ICH 群, ICH+EX 群と比較し有意に高値を示した (SHAM vs. ICH+L6EX, $p = 0.027$; ICH vs. ICH+L6EX, $p = 0.049$; ICH+EX vs. ICH+L6EX, $p = 0.032$). また, 脊髄における Nogo-A と Synaptophysin の蛋白発現量の関係性について相関分析を用いて検証したところ, Nogo-A 発現量と Synaptophysin 発現量の間有意な正の相関が認められた ($r = 0.710$, $p < 0.001$, 図 4-11B). これらの結果は, ①運動と L-655,708 投与の併用は脊髄における成長阻害因子 (Nogo-A) 発現を増強すること, ②その阻害因子発現が高い個体ほど, 同領域におけるシナプスマーカー発現も高いことを示している.

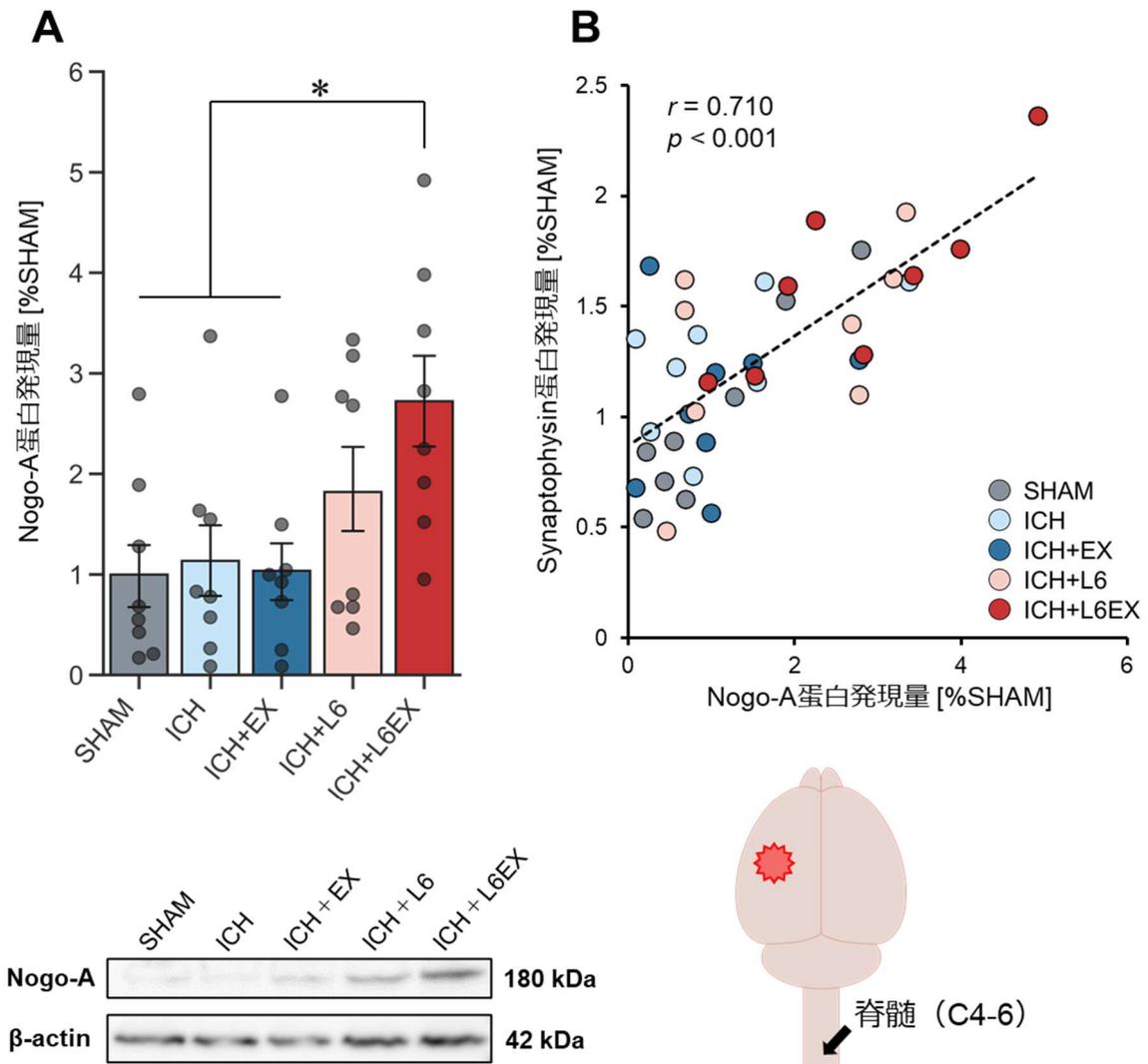


図 4-11. 脊髄における成長阻害因子の蛋白発現

各群の脊髄における Nogo-A の蛋白発現量を示す (A). ICH+L6EX 群の Nogo-A 蛋白発現量は, SHAM 群, ICH 群, ICH+EX 群と比較し有意に高値を示した (* $p < 0.05$, A). 結果は平均値±標準誤差で表記し, 各値をプロットした. 各蛋白発現量は SHAM 群の発現量を基準とする相対発現量で表記した. (B) 脊髄における Nogo-A と Synaptophysin 蛋白発現量の相関分析. Nogo-A と Synaptophysin 蛋白発現量の間には有意な正の相関が認められた.

IV-4. 考察

本章では、運動介入と $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬の投与が脳出血後の機能回復に与える影響について検証した。その結果、運動あるいは薬剤投与 (ICH+EX 群あるいは ICH+L6 群) による部分的な機能回復効果は認められるものの、脳出血後 4 週目における非介入群 (ICH 群) との比較において有意な改善には至らなかった (図 4-6)。しかしながら、運動介入と $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬の投与を併用した場合 (ICH+L6EX 群) のみ、非介入群 (ICH 群) と比較し有意な機能改善が認められた (図 4-6)。この結果は、運動介入と薬理的 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害はそれぞれ単独での機能回復効果は限定的であるが、それらを併用することで、脳出血後の機能回復が効果的に促進されることを初めて示したものであり、薬理的コンディショニングと運動介入を併用する治療戦略の介入根拠を提供する重要な基礎的所見である。

いずれの介入も出血損傷体積に影響を与えなかったことから (図 4-7)、併用介入による効果的な機能回復は、損傷領域やその近傍へ対する保護効果ではなく、直接的損傷を逃れた残存領域における可塑的变化に起因すると考えられる。また、併用介入群においては、大脳皮質・脊髄における神経栄養因子 (BDNF 発現) の発現増強に加えて、脊髄の軸索発芽マーカー、シナプスマーカー (GAP-43, Synaptophysin 発現) の発現増強が認められた (図 4-7A, 4-8A, 4-9)。これら一連の可塑性関連因子の発現動態を踏まえると、併用介入による効果的な機能回復には、脳内だけでなく出血病巣から離れた脊髄における可塑性修飾も重要な役割を果たしていることが推察される。

意義深い所見として、 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬の投与により、両側大脳皮質 BDNF 発現と脊髄 GAP-43 発現の著明な増強が認められた (図 4-8A, 4-9A, 4-10B)。この背景には、皮質脊髄路を構成する神経細胞 (CST ニューロン) の関与が考えられる。 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体は海馬と大脳皮質深層に豊富に分布し⁶⁰、大脳皮質運動野の深層とりわけ第 V 層には CST ニューロンが局在している。そのため、薬理的 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害は、CST ニューロンの活動依存的な BDNF 発現増強をもたらし、その BDNF の成長促進効果を享受することで³⁷、投射先の脊髄において軸索発芽を促進した可能性が示唆される。しかし、こうした CST ニューロンの可塑性修飾、すなわち神経回路の再編を示唆する所見があったにも関わらず、薬剤投与のみでは機能回復効果は乏しかった。

過去の研究から、機能回復に寄与する脊髄内での神経回路の再編には、軸索発芽とシナプス形成が重要と考えられている¹⁴⁸。よって、同領域における軸索発芽マーカー (GAP-43, 図 4-10B) およびシナプスマーカー (Synaptophysin, 図 4-10C) の両方の発現増強が認められた併用介入群のみで効果的な機能回復が生じたことは合理的である。また、運動介入だけでは脊髄 Synaptophysin 発現に有意な変化がなかったことを踏まえると、併用介入で認められた脊髄シナプス修飾は、単なる相加効果によるものではなく、薬理的コンディショ

ニングと運動介入の併用により初めてもたらされる相乗的な効果であると推察される (図 4-12).

Dobkin らは、効果的な機能回復を促すための 1 要素として「成長阻害因子を抑制すること」を挙げているが²⁶、興味深いことに、運動と $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬による併用介入は有益な可塑性関連因子 (BDNF, GAP-43, Synaptophysin) の発現を増強するだけでなく、成長阻害因子の Nogo-A 発現も増強することが明らかとなった (図 4-11A). このことから、併用介入による効果的な機能回復には成長関連因子だけでなく、成長阻害因子による一定の制御も重要であることが示唆される. Nogo-A は内因性の成長阻害因子として一般には神経可塑性に対する負の因子として知られているが、その反面、軸索発芽にブレーキをかけることによって神経回路を安定させる役割を併せ持つとも考えられている¹⁶¹. 実際、脊髄 Nogo-A と Synaptophysin 発現の間には有意な正の相関が認められるため (図 4-11B), Nogo-A による神経回路の安定化がなされるほど、より機能的な回路となりシナプス形成が促進されることが考えられる.

本研究で認められた中枢神経系の可塑性関連因子の所見をまとめると、① $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の薬理的阻害は脳や脊髄において有益な可塑性修飾 (神経栄養因子発現の増強, 軸索発芽の促進) を可能とするが、それだけでは脳出血後の機能回復は乏しいこと、②薬理的 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害に運動介入を併用することで脊髄内でのシナプス可塑性が強化され、機能回復が効果的に促進されること、③併用介入の機能回復には、脊髄可塑性に対する促進/抑制の双方向からの適切な制御が重要である可能性、が示唆される. しかしながら、本研究では可塑性関連因子の蛋白発現定量しかできていないため、併用介入群の機能回復機序については推測の域を出ない. 併用介入群の機能回復が皮質脊髄路の再編に起因するものであると強固な結論を導くためには、今後の研究において神経トレーサーと免疫組織化学染色を用いた神経細胞の構造的変化の検証や、電気生理学的手法あるいは光遺伝学的手法を用いた神経回路の機能的検証などが期待される.

最後に、今日の脳卒中理学療法において重要な位置づけにある運動介入の効果について言及する. ICH+EX 群の運動機能障害は、脳出血後 1 週目 (介入前) と比較し、脳出血後 2-4 週目には有意に改善しているため、運動介入には一定の機能回復効果があったと解釈できる. しかしながら、脳出血後 4 週目において非介入群 (ICH 群) と比較すると、有意な機能改善には至っておらず (図 4-6), また、大脳皮質における BDNF 発現に運動依存的な可塑性修飾は認められなかった (図 4-8A, 4-9A). この結果は、同様の運動強度 (12 m/min, 30 分間) で有意な機能改善や脳 BDNF 発現増強を報告している先行研究と異なるものであるが^{41,154}、この要因の 1 つとして、介入開始のタイミングが考えられる. 本研究では亜急性期における介入効果の検証に焦点を当てるため、脳出血後 1 週目から運動介入を実施した (図 4-2). 過去の研究からは、脳出血後 3 日以内の急性期から介入開始した場合に比べ、脳

IV-5. 小括

本章を総括すると、運動介入と $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬の投与はそれぞれ単独では機能回復効果が乏しいものの、各介入を併用することにより脳出血後の機能回復が効果的に促進されることが初めて明らかとなった。これは、脳卒中リハビリテーションにおいて、薬理的コンディショニングと運動療法の併用介入が有効な治療戦略となり得ることを示す重要な所見である。この併用介入による機能回復には、脳内（大脳皮質）における活動依存的な可塑性修飾のみならず脊髄における軸索発芽やシナプス形成、さらには成長阻害因子による神経回路の安定化などが関与している可能性が示唆された。

第 V 章 総合考察

本論文では、これまでの健常マウス^{70,71}および脳梗塞 MCAO モデル⁷²を用いた研究から得られた知見と課題を礎に、「GABA_A 受容体阻害薬を用いた薬理的コンディショニングの下で運動療法を行った場合、活動依存的な可塑性修飾が強化され、より効果的に脳卒中後の機能回復が促進されるのではないか」という仮説の下、3 つの研究 (Inoue et al, *Brain Research* 2021; *Biomedical Research* 2021; *Neuroscience Letters* 2022) を通じて、脳卒中リハビリテーションにおける新たな治療戦略のコンセプトについて検討を行った。第 II 章では、内包損傷を伴う脳出血病態を模した IC-ICH モデルラットが、運動機能回復に焦点を当てた本研究において長期的検証が可能かつ高い臨床的還元性を有していることを示した。第 III 章では、Tonic inhibition に関与する $\alpha 5$ GABA_A 受容体を特異的に阻害する薬理的神経制御が、大脳皮質運動野における神経活動マーカーの遺伝子発現を増強することを明らかにした。第 IV 章では、その $\alpha 5$ GABA_A 受容体阻害による薬理的コンディショニングと運動介入を併用することで IC-ICH モデルラットの機能回復が効果的に促進されることを初めて実証した。本研究から得られた一連の知見は、近年注目されている電気刺激、磁気刺激、薬剤、細胞移植といった介入とリハビリテーションを併用し機能回復効果の増強を図る「生体内反応の修飾×リハビリテーション」という治療コンセプト¹⁶⁴⁻¹⁷¹を支持するとともに、臨床病態を的確に反映した IC-ICH モデルラットを通して有効性を示したという点においては、脳卒中リハビリテーションにおける Proof of concept study の 1 つとして大いに臨床的意義を有すると考えられる。

第 III 章において、 $\alpha 5$ GABA_A 受容体阻害薬の単回投与は大脳皮質 c-Fos mRNA 発現を増強したが脊髄においてはその効果は認められなかった (図 3-5)。しかし第 IV 章においては、 $\alpha 5$ GABA_A 受容体阻害薬の投与により、大脳皮質の神経栄養因子発現の増強だけでなく (図 4-8, 4-9)、脊髄の可塑性修飾効果も有する所見が認められた (図 4-10)。対象の違い (健常ラット/脳出血モデルラット) や組織採取のタイミング (30 分後/24 時間後) については議論の余地があるが、 $\alpha 5$ GABA_A 受容体阻害薬の投与は、長期的な介入に伴う波及性として、大脳皮質のみならず中枢神経系の幅広い領域の活動依存的可塑性を強化できる可能性が考えられる。

先行研究の知見から、Tonic inhibition の特異的阻害を可能とする $\alpha 5$ GABA_A 受容体阻害薬は、脳梗塞後の運動機能回復を促進させる有望な薬物療法として期待されている^{64,67,69}。加えて、パーキンソン病やアルツハイマー型認知症といった他の中枢神経疾患の運動・認知機能障害においても、Tonic inhibition の増強が関与することが報告されている^{172,173}。こうした事実からも、 $\alpha 5$ GABA_A 受容体阻害薬による薬物療法は、脳卒中のみならず他の疾患

においても有望な治療法となり得るが、脳出血後の投与効果を初めて検証した本研究において、その機能回復効果は懐疑的であった (図 4-6, ICH+L6 群). この背景には、脳卒中病型 (脳梗塞 or 脳出血) によって、Tonic inhibition の変化が異なることが推察される. 脳梗塞モデルマウス/ラットを用いた研究は、脳梗塞後の大脳皮質において Tonic inhibition が増強することを報告しており、その機序として、シナプス間隙で余剰 GABA の回収をする GABA トランスポーター (GAT-3/GAT-4) の機能不全や⁶⁴、反応性アストロサイトが過剰に GABA を産出することが一因と考えられている¹⁷⁴. しかしながら、現在のところ脳出血後の Tonic inhibition について検証を行った研究はなく、その理解は進んでいない. したがって、脳出血後の機能回復促進を目的とする薬物療法として $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害の意義を見出していくためには、脳卒中病型に応じて Tonic inhibition がどのように異なるのかを解明する必要があるとあり、神経伝達機構やグリア細胞との相互作用といった観点からの検証が期待される.

一方で、第IV章の ICH+L6EX 群のように、 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬を内因性の神経可塑性を高めるための薬理的コンディショニングとして位置づけ、運動介入と併用した場合には脳出血後の機能回復効果が期待されることを本研究は実証した. Wahl らは、脳卒中リハビリテーションによる機能回復を最大限効果的にするためには、まず中枢神経系 (脳・脊髄) における内因性の神経可塑性を強化し、機能回復を支える神経基盤を作った後に、新たに形成された神経回路の機能的接続性をリハビリテーションによって強化することが重要であると考えている¹⁷⁵. 本研究においては、 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の薬理的阻害により、脳や脊髄において神経栄養因子発現の増強、軸索発芽マーカーの発現増強がもたらされ、そこに運動介入を併用した相乗効果として、神経回路の接続強化・安定化に寄与する Synaptophysin や Nogo-A 発現の増強が生じていた (図 4-10, 4-11). この結果は、Wahl らの考えを支持するものと解釈でき、本研究はこうした可塑性修飾が脳出血後の脊髄領域においても生じ得ることを見出した. 以上までを総括すると、 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬による薬理的神経制御は、長期的に介入することで中枢神経系の幅広い領域において神経活動依存的な可塑性修飾を可能とするが、脳出血後の運動機能障害に対する直接的な治療介入ではなく、あくまでリハビリテーション効果を高めるためのツールとして用いることが期待される. このことから、「生体内反応の修飾×リハビリテーション」というコンセプトにおいては、理学療法をはじめとする実践ベースの治療介入の存在が極めて重要であると考えられる.

本研究の限界

考慮すべき限界の 1 つとして、本研究 (第 II 章および第 IV 章) で行った生化学的解析は、一時点 (脳出血後 4 週、最終介入の 24 時間後) の組織採取から得られたデータであるため、脳出血後 4 週よりも早期に生じていた可塑的变化や、各介入の直後数時間に生じ得る急性効果については議論できていない。特に、本研究では脳出血後 4 週目において脳出血に起因する可塑性関連因子の発現変化 (SHAM 群と ICH 群の間に認められる変化) が検出されなかったが、この結果は、脳出血後の遺伝子・蛋白発現の増減を否定するものではない。脳梗塞後の大脳皮質や脊髄において、BDNF や GAP-43, Synaptophysin の経時的発現動態を検証した過去の研究では、脳梗塞に起因する蛋白発現の変化は、概ね発症後 2 週間以内に生じることを示しており、4 週目には多くの蛋白発現がベースラインに戻っている^{149,176}。そのため、本研究の ICH 群の可塑性関連因子発現においても、同時期に増強/減少し 4 週目にはベースライン、すなわち SHAM 群と同レベルの定常状態に戻っており有意な変化が認められなかったと考えるのが妥当だろう。また、本研究で行った一連の生化学的解析では、mRNA・蛋白発現の局在や責任細胞などは不明であるため、今後は免疫組織化学染色と組み合わせてより詳細な可塑性修飾の検証をしていくことが必要となる。

今後の展望

現在の脳卒中リハビリテーションにおいて、どの時期に、どのようなリハビリを、どのくらいの用量 (期間, 強度, 時間) で行うべきなのかという治療介入の標準化には至っていない。この背景には、脳卒中病態の多様性・不均一性、すなわち病型や発症部位・損傷の大きさが様々で、それに伴う機能障害も多岐にわたることが、標準的治療介入の確立を困難にする一因であると考えられる。こうした状況を踏まえると、One size fits all の治療概念ではなく、各病態に応じて最適化された介入方法を見出していく必要性が推察される。そのため、GABA 受容体を標的とした薬理的神経制御と運動療法の併用という新たな治療戦略の可能性を育むためには、薬剤投与の安全性を検証するだけでは不十分で、緻密な脳病態解析に基づいて適用可能な脳卒中病態を同定するとともに、併用に最適な運動療法の種類や、併用するタイミングの検討を通して、治療介入の最適化を図ることが重要である。こうした基礎研究から得られる 1 つ 1 つの知識の蓄積が、将来的には臨床現場の治療変革をもたらすものと思われる。

第 VI 章

結論

本研究は、脳卒中後の機能回復を効果的に促進する治療戦略の Proof of concept study として、Tonic inhibition に関与する GABA 受容体を標的とした薬理的神経制御と運動療法の併用が脳出血後の機能回復に与える影響を明らかにすることを目的とした。第 II 章では、内包損傷を伴う脳出血モデルラットの機能障害の特徴と大脳皮質の神経栄養因子発現について精査した。第 III 章では、 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体の特異的阻害が中枢神経系の神経活動に与える影響について検証した。第 IV 章では、運動介入と $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬投与の併用が脳出血後の機能回復に与える影響について検証した。これら一連の研究から見出された新たな知見を以下に示す。

1. 内包損傷を伴う脳出血病態を模した IC-ICH モデルラットは、著明な運動機能障害を長期的に呈し、実際の臨床病態を的確に反映している所見が認められた。また、機能回復の阻害因子となり得る情動的影響を受けにくいことが示唆された。そのため、本モデルは運動機能回復に焦点を当てた脳出血基礎研究において、長期的検証が可能であり、また、高い臨床的還元性を有した脳出血モデルであると考えられる。
2. $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬 (L-655,708) 投与による薬理的神経制御は、大脳皮質運動野における神経活動を増強し、活動依存的な可塑性を有益に修飾し得ることが明らかとなった。また、本研究の行動評価からは薬剤投与に伴う副作用は認められなかった。単回での薬理的介入は、他の中枢神経領域に対する効果は乏しかったため、特に、大脳皮質運動野の神経活動修飾を目的とした薬理的コンディショニングに有効であると推察される。しかし、長期的な介入に伴う波及性として、大脳皮質のみならず中枢神経系の幅広い領域の活動依存的可塑性を強化できる可能性がある。
3. 運動介入あるいは $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体阻害薬の薬物療法としての機能回復効果は限定的であるが、各介入を併用した場合には、内包損傷を伴う脳出血後の機能回復が効果的に促進することが明らかとなった。併用介入による機能回復には、大脳皮質における可塑性修飾のみならず、出血病巣から離れた脊髄における軸索発芽やシナプス形成、さらには成長阻害因子による神経回路の安定化なども関与している可能性が示唆された。したがって、 $\alpha 5\text{GABA}_A$ 受容体を標的とした薬理的神経制御と運動療法の併用は、脳卒中後の機能回復を促進する新たな治療戦略の 1 つとなることが期待される。

謝辞

本研究は、筆者が北海道大学大学院保健科学院博士後期課程在学中に、同大学大学院保健科学研究院リハビリテーション科学分野の前島洋教授のもとで行われました。本論文の作成にあたり、終始多大なるご指導ご鞭撻を賜りました前島教授に謹んで感謝の意を表します。在学中には、実験技術や論文執筆のみならず研究者としての心得や在り方についても学ぶことができ、前島教授のもとで研究者としての第一歩を踏み出せたことを誇りに思います。

北海道大学大学院保健科学研究院リハビリテーション科学分野の遠山晴一教授には、副指導教員を引き受けていただき、本研究を遂行する際に親身なご指導や建設的なご意見を賜りました。深く感謝申し上げます。また、北海道大学大学院保健科学研究院リハビリテーション科学分野の境信哉教授ならびに宮崎太輔准教授には、ご多忙の中、本論文の審査員を引き受けていただき、建設的なご意見を賜りましたこと、深く感謝いたします。

北海道大学大学院保健科学研究院リハビリテーション科学分野の高松泰行助教には、本研究を進めるにあたり、懇切丁寧な技術指導や、論文投稿に際し建設的なご意見を多く賜りました。また、平素からの格別なご厚情に謹んで感謝申し上げます。

北海道大学大学院保健科学研究院リハビリテーション科学分野の浅賀忠義教授をはじめ、長谷川直哉助教ならびに大分大学福祉健康科学部理学療法コースの萬井太規講師には、数値計算ソフトウェアを使用した行動学的評価の定量解析や数値データの可視化に関して親身な技術指導を賜りました。また、先生方と日頃より胸襟を開いて議論交わし、本研究を進める上で多大な動機を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。

北海道大学大学院医学研究院附属動物実験施設の先生方、職員の皆様には、実験動物の取り扱いや飼育管理に関して多大なるご支援を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

鹿児島大学大学院保健学研究科の榎間春利教授をはじめ、神経・運動器障害リハビリテーション研究室の皆様には親身な技術指導を賜りました。深く感謝いたします。

北海道大学適応運動医科学研究室（前島ゼミ）の皆様には、データ収集や測定・解析など、本研究へご協力いただき感謝いたします。特に、岡村未里さんには、脳出血モデルやWestern Blottingの立ち上げの際に共に試行錯誤し、本研究に多大な貢献をいただきました。ここに感謝申し上げます。

また、本研究を進める上で重要な臨床的観点は、札幌・すがた医院をはじめ臨床実習でお世話になった諸病院から涵養されたものと思います。関係者の皆様に御礼申し上げます。

本研究の一部は、以下の日本学術振興会科学研究費助成事業の研究課題として実施されました: JP19J23508 (研究代表者: 井上貴博), JP17H02117, JP20H04048 (研究代表者: 前島洋)。

引用文献

1. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, et al. An updated definition of stroke for the 21st century: A statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association. *Stroke*. 2013;44(7):2064-2089. doi:10.1161/STR.0b013e318296aecca
2. Feigin VL, Stark BA, Johnson CO, et al. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Neurol*. 2021;20(10):795-820. doi:10.1016/S1474-4422(21)00252-0
3. Krishnamurthi R V., Ikeda T, Feigin VL. Global, Regional and Country-Specific Burden of Ischaemic Stroke, Intracerebral Haemorrhage and Subarachnoid Haemorrhage: A Systematic Analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Neuroepidemiology*. 2020;54(2):171-179. doi:10.1159/000506396
4. Dimyan MA, Cohen LG. Neuroplasticity in the context of motor rehabilitation after stroke. *Nat Rev Neurol*. 2011;7(2):76-85. doi:10.1038/nrneurol.2010.200
5. Donkor ES. Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. *Stroke Res Treat*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/3238165
6. Vos T, Lim SS, Abbafati C, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020;396(10258):1204-1222. doi:10.1016/S0140-6736(20)30925-9
7. Mikulik R, Wahlgren N. Treatment of acute stroke: an update. *J Intern Med*. 2015;278(2):145-165. doi:10.1111/joim.12387
8. Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein RA. Acute Stroke Intervention. *JAMA*. 2015;313(14):1451. doi:10.1001/jama.2015.3058
9. Cramer SC, Sur M, Dobkin BH, et al. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*. 2011;134(6):1591-1609. doi:10.1093/brain/awr039
10. Joy MT, Carmichael ST. Encouraging an excitable brain state: mechanisms of brain repair in stroke. *Nat Rev Neurosci*. 2020;22(January):38-53. doi:10.1038/s41583-020-00396-7
11. Cirillo C, Brihmat N, Castel-Lacanal E, et al. Post-stroke remodeling processes in animal models and humans. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2020;40(1):3-22. doi:10.1177/0271678X19882788
12. Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(12):861-872. doi:10.1038/nrn2735
13. Ward NS. Restoring brain function after stroke — bridging the gap between animals and humans. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(4):244-255. doi:10.1038/nrneurol.2017.34
14. Regenhardt RW, Takase H, Lo EH, Lin DJ. Translating concepts of neural repair after stroke: Structural and functional targets for recovery. *Restor Neurol Neurosci*. 2020;38(1):67-92. doi:10.3233/rnn-190978
15. Blicher JU, Near J, Næss-Schmidt E, et al. GABA levels are decreased after stroke and

GABA changes during rehabilitation correlate with motor improvement. *Neurorehabil Neural Repair*. 2015;29(3):278-286. doi:10.1177/1545968314543652

16. Sun C, Liu X, Bao C, et al. Advanced non-invasive MRI of neuroplasticity in ischemic stroke: Techniques and applications. *Life Sci*. 2020;261(July):118365. doi:10.1016/j.lfs.2020.118365
17. Koh CL, Yeh CH, Liang X, et al. Structural Connectivity Remote from Lesions Correlates with Somatosensory Outcome Poststroke. *Stroke*. 2021;(September):2910-2920. doi:10.1161/STROKEAHA.120.031520
18. Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Vive-Larsen J, Støier M, Olsen TS. Outcome and time course of recovery in stroke. Part II: Time course of recovery. The copenhagen stroke study. *Arch Phys Med Rehabil*. 1995;76(5):406-412. doi:10.1016/S0003-9993(95)80568-0
19. Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G. Stroke rehabilitation. *Lancet*. 2011;377(9778):1693-1702. doi:10.1016/S0140-6736(11)60325-5
20. Kwakkel G, Kollen BJ. Predicting activities after stroke: What is clinically relevant? *Int J Stroke*. 2013;8(1):25-32. doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00967.x
21. Dromerick AW, Geed S, Barth J, et al. Critical Period after Stroke Study (CPASS): A phase II clinical trial testing an optimal time for motor recovery after stroke in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(39). doi:10.1073/pnas.2026676118
22. Krakauer JW, Marshall RS. The proportional recovery rule for stroke revisited. *Ann Neurol*. 2015;78(6):845-847. doi:10.1002/ana.24537
23. Cassidy JM, Cramer SC. Spontaneous & Therapeutic-Induced Mechanisms of Functional Recovery After Stroke. *Transl Stroke Res*. 2017;8(1):33-46. doi:10.1007/s12975-016-0467-5
24. Ballester BR, Maier M, Duff A, et al. A critical time window for recovery extends beyond one-year post-stroke. *J Neurophysiol*. 2019;122(1):350-357. doi:10.1152/jn.00762.2018
25. Bernhardt J, Hayward KS, Kwakkel G, et al. Agreed Definitions and a Shared Vision for New Standards in Stroke Recovery Research: The Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable Taskforce. *Int J Stroke*. 2017;12(5):793-799. doi:10.1177/1545968317732668
26. Dobkin BH, Carmichael ST. The Specific Requirements of Neural Repair Trials for Stroke. *Neurorehabil Neural Repair*. 2016;30(5):470-478. doi:10.1177/1545968315604400
27. Duncan PW, Studenski S, Richards L, et al. Randomized clinical trial of therapeutic exercise in subacute stroke. *Stroke*. 2003;34(9):2173-2180. doi:10.1161/01.STR.0000083699.95351.F2
28. Xing Y, Yang SD, Dong F, Wang MM, Feng YS, Zhang F. The beneficial role of early exercise training following stroke and possible mechanisms. *Life Sci*. 2018;198(139):32-37. doi:10.1016/j.lfs.2018.02.018
29. An M, Shaughnessy M. The Effects of Exercise-Based Rehabilitation on Balance and Gait for Stroke Patients. *J Neurosci Nurs*. 2011;43(6):298-307. doi:10.1097/JNN.0b013e318234

ea24

30. Billinger SA, Arena R, Bernhardt J, et al. Physical activity and exercise recommendations for stroke survivors: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014;45(8):2532-2553. doi:10.1161/STR.0000000000000022
31. Pin-Barre C, Laurin J. Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke. *Neural Plast*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/608581
32. Saunders DH, Greig CA, Mead GE. Physical activity and exercise after stroke: Review of multiple meaningful benefits. *Stroke*. 2014;45(12):3742-3747. doi:10.1161/STROKEAHA.114.004311
33. Cooke E V., Mares K, Clark A, Tallis RC, Pomeroy VM. The effects of increased dose of exercise-based therapies to enhance motor recovery after stroke: A systematic review and meta-analysis. *BMC Med*. 2010;8. doi:10.1186/1741-7015-8-60
34. Xing Y, Bai Y. A Review of Exercise-Induced Neuroplasticity in Ischemic Stroke: Pathology and Mechanisms. *Mol Neurobiol*. 2020;57(10):4218-4231. doi:10.1007/s12035-020-02021-1
35. Nicolini C, Fahnstock M, Gibala MJ, Nelson AJ. Understanding the Neurophysiological and Molecular Mechanisms of Exercise-Induced Neuroplasticity in Cortical and Descending Motor Pathways: Where Do We Stand? *Neuroscience*. 2021;457:259-282. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.12.013
36. El-Sayes J, Harasym D, Turco C V., Locke MB, Nelson AJ. Exercise-Induced Neuroplasticity: A Mechanistic Model and Prospects for Promoting Plasticity. *Neuroscientist*. 2019;25(1):65-85. doi:10.1177/1073858418771538
37. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. 2004;22(3):123-131. doi:10.1016/j.bbi.2008.05.010
38. Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(1):7-23. doi:10.1038/nrn3379
39. Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Doré JJ, Corbett D. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke*. 2009;40(4):1490-1495. doi:10.1161/STROKEAHA.108.531806
40. Mang CS, Campbell KL, Ross CJD, Boyd LA. Promoting Neuroplasticity for Motor Rehabilitation After Stroke: Considering the Effects of Aerobic Exercise and Genetic Variation on Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Phys Ther*. 2013;93(12):1707-1716.
41. Ploughman M, Austin MW, Glynn L, Corbett D. The Effects of Poststroke Aerobic Exercise on Neuroplasticity: A Systematic Review of Animal and Clinical Studies. *Transl Stroke Res*. 2015;6(1):13-28. doi:10.1007/s12975-014-0357-7
42. Rasmussen P, Brassard P, Adser H, et al. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol*. 2009;94(10):1062-1069. doi:10.1113/

expphysiol.2009.048512

43. Limaye NS, Carvalho LB, Kramer S. Effects of Aerobic Exercise on Serum Biomarkers of Neuroplasticity and Brain Repair in Stroke: A Systematic Review. *Arch Phys Med Rehabil.* 2021;102(8):1633-1644. doi:10.1016/j.apmr.2021.04.010
44. Berretta A, Tzeng YC, Clarkson AN. Post-stroke recovery: The role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Expert Rev Neurother.* 2014;14(11):1335-1344. doi:10.1586/14737175.2014.969242
45. Jeon SJ, Rhee SY, Seo JE, et al. Oroxylin A increases BDNF production by activation of MAPK-CREB pathway in rat primary cortical neuronal culture. *Neurosci Res.* 2011;69(3):214-222. doi:10.1016/j.neures.2010.11.008
46. Vermehren-Schmaedick A, Khanjian RA, Balkowiec A. Cellular mechanisms of activity-dependent BDNF expression in primary sensory neurons. *Neuroscience.* 2015;310:665-673. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.007
47. Foster AC, Kemp JA. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6:7-17. doi:10.1016/j.coph.2005.11.005
48. Woods AJ, Antal A, Bikson M, et al. A technical guide to tDCS, and related non-invasive brain stimulation tools. *Clin Neurophysiol.* 2016;127(2):1031-1048. doi:10.1016/j.clinph.2015.11.012
49. Fritsch B, Reis J, Martinowich K, et al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: Potential implications for motor learning. *Neuron.* 2010;66(2):198-204. doi:10.1016/j.neuron.2010.03.035
50. Kang N, Summers JJ, Cauraugh JH. Non-Invasive Brain Stimulation Improves Paretic Limb Force Production: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Brain Stimul.* 2016;9(5):662-670. doi:10.1016/j.brs.2016.05.005
51. Elsner B, Kugler J, Pohl M, Mehrholz J. Transcranial direct current stimulation (tDCS) for improving activities of daily living, and physical and cognitive functioning, in people after stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;2020(11). doi:10.1002/14651858.CD009645.pub4
52. Gowan S, Hordacre B. Transcranial direct current stimulation to facilitate lower limb recovery following stroke: Current evidence and future directions. *Brain Sci.* 2020;10(5). doi:10.3390/brainsci10050310
53. Lee V, Maguire J. The impact of tonic GABAA receptor-mediated inhibition on neuronal excitability varies across brain region and cell type. *Front Neural Circuits.* 2014;8(February):1-27. doi:10.3389/fncir.2014.00003
54. Maramai S, Benchekroun M, Ward SE, Atack JR. Subtype Selective γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor (GABAAR) Modulators Acting at the Benzodiazepine Binding Site: An Update. *J Med Chem.* 2020;63(7):3425-3446. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01312
55. Olsen RW. GABAA receptor: Positive and negative allosteric modulators. *Neuro pharmacology.* 2018;136:10-22. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.01.036

56. Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM, Kim JJ, Hibbs RE. Structure of a human synaptic GABA A receptor. *Nature*. 2018;559(7712):67-88. doi:10.1038/s41586-018-0255-3
57. Olsen RW, Sieghart W. GABA Receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*. 2009;56(1):141-148. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.045
58. Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(9):728-739. doi:10.1038/nrn920
59. Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neuroscientist*. 2012;18(5):467-486. doi:10.1177/1073858412438697
60. Engin E, Benham RS, Rudolph U. An Emerging Circuit Pharmacology of GABA_A Receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2018;39(8):710-732. doi:10.1016/j.tips.2018.04.003
61. Rudolph U, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABA A receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(9):685-697. doi:10.1038/nrd3502
62. Rudolph U, Möhler H. GABA A Receptor Subtypes: Therapeutic Potential in Down Syndrome, Affective Disorders, Schizophrenia, and Autism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2014;54(1):483-507. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011613-135947
63. Esmaeili A, Ghaedi K. GABA A receptors as novel drug targets for treatment of mental disorders. *J Paramed Sci*. 2010;1(3):50-61.
64. Clarkson AN, Huang BS, MacIsaac SE, Mody I, Carmichael ST. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature*. 2010;468(7321):305-309. doi:10.1038/nature09511
65. Carmichael ST. Brain excitability in stroke: The yin and yang of stroke progression. *Arch Neurol*. 2012;69(2):161-167. doi:10.1001/archneurol.2011.1175
66. Orfila JE, Grewal H, Dietz RM, et al. Delayed inhibition of tonic inhibition enhances functional recovery following experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(6):1005-1014. doi:10.1177/0271678X17750761
67. He WM, Ying-Fu L, Wang H, Peng YP. Delayed treatment of $\alpha 5$ GABA_A receptor inverse agonist improves functional recovery by enhancing neurogenesis after cerebral ischemia-reperfusion injury in rat MCAO model. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-8. doi:10.1038/s41598-019-38750-0
68. Alia C, Spalletti C, Lai S, Panarese A, Micera S, Caleo M. Reducing GABA_A-mediated inhibition improves forelimb motor function after focal cortical stroke in mice. *Sci Rep*. 2016;6(37823). doi:10.1038/srep37823
69. Lake EM, Chaudhuri J, Thomason L, et al. The Effects of Delayed Reduction of Tonic Inhibition on Ischemic Lesion and Sensorimotor Function. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(10):1601-1609. doi:10.1038/jcbfm.2015.86
70. Takahashi K, Maejima H, Ikuta G, Mani H, Asaka T. Exercise combined with low-level

GABAA receptor inhibition up-regulates the expression of neurotrophins in the motor cortex. *Neurosci Lett*. 2017;636:101-107. doi:10.1016/j.neulet.2016.10.052

71. Inoue T, Ninuma S, Hayashi M, Okuda A, Asaka T, Maejima H. Effects of long-term exercise and low-level inhibition of GABAergic synapses on motor control and the expression of BDNF in the motor related cortex. *Neurol Res*. 2018;40(1):18-25. doi:10.1080/01616412.2017.1382801
72. Inoue T, Okamura M, Kitahara M, Takamatsu Y, Sakakima H, Maejima H. Exercise Plus Pharmacological Neuromodulation of Synaptic Inhibition Enhance Motor Function Recovery After Ischemic Stroke. *Neuroscience*. 2020;430:12-24. doi:10.1016/j.neuroscience.2020.01.012
73. Shi X, Luo L, Wang J, et al. Stroke subtype-dependent synapse elimination by reactive gliosis in mice. *Nat Commun*. 2021;12(1):6943. doi:10.1038/s41467-021-27248-x
74. Bi M, Gladbach A, van Eersel J, et al. Tau exacerbates excitotoxic brain damage in an animal model of stroke. *Nat Commun*. 2017;8(1):473. doi:10.1038/s41467-017-00618-0
75. Nih LR, Gojgini S, Carmichael ST, Segura T. Dual-function injectable angiogenic biomaterial for the repair of brain tissue following stroke. *Nat Mater*. 2018;1. doi:10.1038/s41563-018-0083-8
76. Corbett D, Carmichael ST, Murphy TH, et al. Enhancing the Alignment of the Preclinical and Clinical Stroke Recovery Research Pipeline: Consensus-Based Core Recommendations from the Stroke Recovery and Rehabilitation Roundtable Translational Working Group *. *Int J Stroke*. 2017;12(5):462-471. doi:10.1177/1545968317724285
77. Tamakoshi K, Kondo H, Akatsuka N, Meguro K, Takahashi Y. A Comparison of Motor Functional Recovery and Brain Damage between Striatal Lesions Induced by Ischemia and Hemorrhage in Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2020;29(5):1-5. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104668
78. Mestriner RG, Miguel PM, Bagatini PB, et al. Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. *Behav Brain Res*. 2013;244:82-89. doi:10.1016/j.bbr.2013.02.001
79. Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: Mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurol*. 2012;11(8):720-731. doi:10.1016/S1474-4422(12)70104-7
80. Johnston GA. Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *Br J Pharmacol*. 2013;169(2):328-336. doi:10.1111/bph.12127
81. Braudeau J, Delatour B, Duchon A, et al. Specific targeting of the GABA-A receptor $\alpha 5$ subtype by a selective inverse agonist restores cognitive deficits in Down syndrome mice. *J Psychopharmacol*. 2011;25(8):1030-1042. doi:10.1177/0269881111405366
82. Atack JR, Pike A, Clarke A, et al. Rat pharmacokinetics and pharmacodynamics of a sustained release formulation of the GABAA $\alpha 5$ -selective compound L-655,708. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(5):887-893. doi:10.1124/dmd.105.006973
83. Delcourt C, Sato S, Zhang S, et al. Intracerebral hemorrhage location and outcome among

INTERACT2 participants. *Neurology*. 2017;88(15):1408-1414. doi:10.1212/WNL.0000000000003771

84. Jiang Y Bin, Wei KY, Zhang XY, Feng H, Hu R. White matter repair and treatment strategy after intracerebral hemorrhage. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(10):1113-1125. doi:10.1111/cns.13226
85. Katsuki H, Hijioka M. Intracerebral hemorrhage as an axonal tract injury disorder with inflammatory reactions. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(5):564-568. doi:10.1248/bpb.b16-01013
86. Liu Y, Lu G, Su XW, et al. Characterization of Axon Damage, Neurological Deficits, and Histopathology in Two Experimental Models of Intracerebral Hemorrhage. *Front Neurosci*. 2018;12(December):1-15. doi:10.3389/fnins.2018.00928
87. Matsushita H, Hijioka M, Hisatsune A, et al. MRI-Based Analysis of Intracerebral Hemorrhage in Mice Reveals Relationship between Hematoma Expansion and the Severity of Symptoms. *PLoS One*. 2013;8(7):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0067691
88. Masuda T, Hida H, Kanda Y, et al. Oral Administration of Metal Chelator Ameliorates Motor Dysfunction After a Small Hemorrhage Near the Internal Capsule in Rat. *J Neurosci Res*. 2007;85:213-222. doi:10.1002/jnr.21089
89. Béjot Y, Mossiat C, Giroud M, Prigent-Tessier A, Marie C. Circulating and brain BDNF levels in stroke rats. relevance to clinical studies. *PLoS One*. 2011;6(12):6-11. doi:10.1371/journal.pone.0029405
90. Quirié A, Hervieu M, Garnier P, et al. Comparative Effect of Treadmill Exercise on Mature BDNF Production in Control versus Stroke Rats. *PLoS One*. 2012;7(9):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0044218
91. Rahman M, Luo H, Sims NR, Bobrovskaya L, Zhou XF. Investigation of Mature BDNF and proBDNF Signaling in a Rat Photothrombotic Ischemic Model. *Neurochem Res*. 2018;43(3):637-649. doi:10.1007/s11064-017-2464-9
92. Madinier A, Bertrand N, Rodier M, et al. Ipsilateral versus contralateral spontaneous post-stroke neuroplastic changes: Involvement of BDNF? *Neuroscience*. 2013;231:169-181. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.11.054
93. Guo YC, Song XK, Xu YF, Ma JB, Zhang JJ, Han PJ. The expression and mechanism of BDNF and NGB in perihematomal tissue in rats with intracerebral hemorrhage. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(15):3452-3458.
94. Ishida A, Misumi S, Ueda Y, et al. Early constraint-induced movement therapy promotes functional recovery and neuronal plasticity in a subcortical hemorrhage model rat. *Behav Brain Res*. 2015;284:158-166. doi:10.1016/j.bbr.2015.02.022
95. Takamatsu Y, Tamakoshi K, Waseda Y, Ishida K. Running exercise enhances motor functional recovery with inhibition of dendritic regression in the motor cortex after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Behav Brain Res*. 2016;300:56-64. doi:10.1016/j.bbr.2015.12.003
96. Tamakoshi K, Kawanaka K, Onishi H, Takamatsu Y, Ishida K. Motor Skills Training

- Improves Sensorimotor Dysfunction and Increases Microtubule-Associated Protein 2 mRNA Expression in Rats with Intracerebral Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2016;25(8):2071-2077. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.05.007
97. Mu XP, Wang HB, Cheng X, et al. Inhibition of Nkcc1 Promotes Axonal Growth and Motor Recovery in Ischemic Rats. *Neuroscience.* 2017;365:83-93. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.09.036
 98. Torres O V., Gentil LG, Natividad LA, Carcoba LM, O'Dell LE. Behavioral, Biochemical, and Molecular Indices of Stress are Enhanced in Female Versus Male Rats Experiencing Nicotine Withdrawal. *Front Psychiatry.* 2013;4(May):1-12. doi:10.3389/fpsy.2013.00038
 99. Su X, Chen JJ, Liu LY, et al. Neonatal CX26 removal impairs neocortical development and leads to elevated anxiety. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(12):3228-3233. doi:10.1073/pnas.1613237114
 100. Das SK, Barhwal K, Hota SK, Thakur MK, Srivastava RB. Disrupting monotony during social isolation stress prevents early development of anxiety and depression like traits in male rats. *BMC Neurosci.* 2015;16(1):1-13. doi:10.1186/s12868-015-0141-y
 101. Jamil A, Mahboob A, Ahmed T. Ibuprofen targets neuronal pentraxins expression and improves cognitive function in mouse model of AIC13-induced neurotoxicity. *Exp Ther Med.* 2016;11(2):601-606. doi:10.3892/etm.2015.2928
 102. Paxinos G, Charles Watson. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition.*; 2007. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-547620-1.50008-4
 103. Levine AJ, Lewallen KA, Pfaff SL. Spatial organization of cortical and spinal neurons controlling motor behavior. *Curr Opin Neurobiol.* 2012;22(5):812-821. doi:10.1016/j.conb.2012.07.002
 104. Ueno M, Nakamura Y, Li J, et al. Corticospinal Circuits from the Sensory and Motor Cortices Differentially Regulate Skilled Movements through Distinct Spinal Interneurons. *Cell Rep.* 2018;23(5):1286-1300.e7. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.137
 105. Zhu LL, Lindenberg R, Alexander MP, Schlaug G. Lesion load of the corticospinal tract predicts motor impairment in chronic stroke. *Stroke.* 2010;41(5):910-915. doi:10.1161/STROKEAHA.109.577023
 106. Puig J, Blasco G, Terceño M, et al. Predicting motor outcome in acute intracerebral hemorrhage. *Am J Neuroradiol.* 2019;40(5):769-775. doi:10.3174/ajnr.A6038
 107. Eslami V, Tahsili-Fahadan P, Rivera-Lara L, et al. Influence of Intracerebral Hemorrhage Location on Outcomes in Patients with Severe Intraventricular Hemorrhage. *Stroke.* 2019;50(7):1688-1695. doi:10.1161/STROKEAHA.118.024187
 108. Lee KB, Kim JS, Hong BY, Kim YD, Hwang BY, Lim SH. The motor recovery related with brain lesion in patients with intracranial hemorrhage. *Behav Neurol.* 2015;2015(2). doi:10.1155/2015/258161
 109. Lee EH, Kim JW, Kang HJ, et al. Association between anxiety and functional outcomes in patients with stroke: A 1-year longitudinal study. *Psychiatry Investig.* 2019;16(12):919-925.

doi:10.30773/pi.2019.0188

110. Lok J, Leung W, Murphy S, Butler W, Noviski N, Lo EH. Intracranial Hemorrhage: Mechanisms of Secondary Brain Injury. Zhang J, Colohan A, eds. *Acta Neurochir (Wien)*. 2011;111:63-69. doi:10.1007/978-3-7091-0693-8_11
111. Lei C, Wu B, Cao T, Zhang S, Liu M. Activation of the high-mobility group box 1 protein-receptor for advanced glycation end-products signaling pathway in rats during neurogenesis after intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2015;46(2):500-506. doi:10.1161/STROKEAHA.114.006825
112. Chen A, Xiong L, Tong Y, Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Reports*. 2013;1(2):167-176. doi:10.3892/br.2012.48
113. Kononenko O, Watanabe H, Stålhandske L, et al. Focal traumatic brain injury induces neuroplastic molecular responses in lumbar spinal cord. *Restor Neurol Neurosci*. 2019;37(2):87-96. doi:10.3233/RNN-180882
114. Altar CA, Distefano PS. Neurotrophin trafficking by anterograde transport. *Trends Neurosci*. 1998;21(10):433-437. doi:10.1016/S0166-2236(98)01273-9
115. DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, et al. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*. 1992;8(5):983-993. doi:10.1016/0896-6273(92)90213-W
116. Kim SY, Allred RP, De Adkins AL, et al. Experience with the “good” limb induces aberrant synaptic plasticity in the perilesion cortex after stroke. *J Neurosci*. 2015;35(22):8604-8610. doi:10.1523/JNEUROSCI.0829-15.2015
117. Okabe N, Shiromoto T, Himi N, et al. Neural network remodeling underlying motor map reorganization induced by rehabilitative training after ischemic stroke. *Neuroscience*. 2016;339:338-362. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.10.008
118. Cerne R, Lippa A, Poe MM, et al. GABAkinases – Advances in the discovery, development, and commercialization of positive allosteric modulators of GABAA receptors. *Pharmacol Ther*. 2021;(xxxx):108035. doi:10.1016/j.pharmthera.2021.108035
119. Sallard E, Letourneur D, Legendre P. Electrophysiology of ionotropic GABA receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2021;78(13):5341-5370. doi:10.1007/s00018-021-03846-2
120. Hiu T, Farzampour Z, Paz JT, et al. Enhanced phasic GABA inhibition during the repair phase of stroke: A novel therapeutic target. *Brain*. 2016;139(2):468-480. doi:10.1093/brain/awv360
121. Fritschy J-M, Mohler H. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: Differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*. 1995;359(1):154-194. doi:10.1002/cne.903590111
122. Caraiscos VB, Elliott EM, You-Ten KE, et al. Tonic inhibition in mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons is mediated by $\alpha 5$ subunit-containing γ -aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3662-3667. doi:10.1073/pnas.0307231101

123. Walker MC, Semyanov A. Regulation of excitability by extrasynaptic GABAA receptors. *Results Probl Cell Differ.* 2007;44(June):29-48. doi:10.1007/400_2007_030
124. Soh M, Lynch J. Selective Modulators of $\alpha 5$ -Containing GABAA Receptors and their Therapeutic Significance. *Curr Drug Targets.* 2015;16(7):735-746. doi:10.2174/1389450116666150309120235
125. Atack JR, Alder L, Cook SM, Smith AJ, McKernan RM. In vivo labelling of $\alpha 5$ subunit-containing GABAA receptors using the selective radioligand [3H]L-655,708. *Neuropharmacology.* 2005;49(2):220-229. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.03.004
126. Bonin RP, Martin LJ, MacDonald JF, Orser BA. $\alpha 5$ GABAA receptors regulate the intrinsic excitability of mouse hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 2007;98(4):2244-2254. doi:10.1152/jn.00482.2007
127. Lecker I, Yin Y, Wang DS, Orser BA. Potentiation of GABAA receptor activity by volatile anaesthetics is reduced by 5GABAA receptor-preferring inverse agonists. *Br J Anaesth.* 2013;110(SUPPL.1):i73-i81. doi:10.1093/bja/aet038
128. Okuno H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: Beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res.* 2011;69(3):175-186. doi:10.1016/j.neures.2010.12.007
129. Khodaei S, Avramescu S, Wang D-S, et al. Inhibiting $\alpha 5$ Subunit-Containing γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors Attenuates Cognitive Deficits After Traumatic Brain Injury. *Crit Care Med.* 2020;48(4):533-544. doi:10.1097/CCM.00000000000004161
130. Ihara Y, Tomonoh Y, Deshimaru M, et al. Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations. Biagini G, ed. *PLoS One.* 2016;11(2):e0150095. doi:10.1371/journal.pone.0150095
131. Dey P, Chandra S, Chatterjee P, Bhattacharya S. Neuropharmacological properties of *Mikania scandens* (L.) Willd. (Asteraceae). *J Adv Pharm Technol Res.* 2011;2(4):255-259. doi:10.4103/2231-4040.90883
132. Sultana T, Mannan MA, Ahmed T. Evaluation of central nervous system (CNS) depressant activity of methanolic extract of *Commelina diffusa* Burm. in mice. *Clin Phytoscience.* 2018;4(1):1-7. doi:10.1186/s40816-018-0063-1
133. Fritschy JM, Brünig I. Formation and plasticity of GABAergic synapses: Physiological mechanisms and pathophysiological implications. *Pharmacol Ther.* 2003;98(3):299-323. doi:10.1016/S0163-7258(03)00037-8
134. Van Erum J, Van Dam D, De Deyn PP. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. *Epilepsy Behav.* 2019;95:51-55. doi:10.1016/j.yebeh.2019.02.029
135. Lüttjohann A, Fabene PF, van Luijckelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav.* 2009;98(5):579-586. doi:10.1016/j.physbeh.2009.09.005
136. Hei M, Chen P, Wang S, et al. Effects of chronic mild stress induced depression on synaptic plasticity in mouse hippocampus. *Behav Brain Res.* 2019;365(February):26-35. doi:10.1016/j.bbr.2019.02.044
137. Navarro JF, Burón E, Martín-López M. Anxiogenic-like activity of L-655,708, a selective

- ligand for the benzodiazepine site of GABAA receptors which contain the alpha-5 subunit, in the elevated plus-maze test. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2002;26(7-8):1389-1392. doi:10.1016/S0278-5846(02)00305-6
138. Clarkson AN, Boothman-Burrell L, Dósa Z, et al. The flavonoid, 2'-methoxy-6-methylflavone, affords neuroprotection following focal cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(7):1266-1282. doi:10.1177/0271678X18755628
 139. Neumann S, Boothman-burrell L, Gowing EK, Jacobsen TA. The Delta-Subunit Selective GABA A Receptor Modulator , DS2 , Improves Stroke Recovery via an Anti-inflammatory Mechanism. *Front Neurosci*. 2019;13(1133). doi:10.3389/fnins.2019.01133
 140. Grefkes C, Ward NS. Cortical reorganization after stroke: How much and how functional? *Neuroscientist*. 2014;20(1):56-70. doi:10.1177/1073858413491147
 141. Tennant KA. Thinking outside the brain: Structural plasticity in the spinal cord promotes recovery from cortical stroke. *Exp Neurol*. 2014;254:195-199. doi:10.1016/j.expneurol.2014.02.003
 142. Liu Z, Xin H, Chopp M. Axonal remodeling of the corticospinal tract during neurological recovery after stroke. *Neural Regen Res*. 2021;16(5):939-943. doi:10.4103/1673-5374.297060
 143. Otsuka N, Miyashita K, Krieger DW, Naritomi H. Compensatory Contribution of the Contralateral Pyramidal Tract after Stroke. In: *Frontiers of Neurology and Neuroscience*. Vol 32. ; 2013:45-53. doi:10.1159/000348821
 144. Okabe N, Narita K, Miyamoto O. Axonal remodeling in the corticospinal tract after stroke: How does rehabilitative training modulate it? *Neural Regen Res*. 2017;12(2):185-192. doi:10.4103/1673-5374.200792
 145. Sato T, Nakamura Y, Takeda A, Ueno M. Lesion Area in the Cerebral Cortex Determines the Patterns of Axon Rewiring of Motor and Sensory Corticospinal Tracts After Stroke. *Front Neurosci*. 2021;15(October):1-14. doi:10.3389/fnins.2021.737034
 146. Wahl AS, Omlor W, Rubio JC, et al. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke. *Science (80-)*. 2014;344(6189):1250-1255. doi:10.1126/science.1253050
 147. Ueno M, Hayano Y, Nakagawa H, Yamashita T. Intraspinal rewiring of the corticospinal tract requires target-derived brain-derived neurotrophic factor and compensates lost function after brain injury. *Brain*. 2012;135(4):1253-1267. doi:10.1093/brain/aws053
 148. Liu Z, Chopp M, Ding X, Cui Y, Li Y. Axonal Remodeling of the Corticospinal Tract in the Spinal Cord Contributes to Voluntary Motor Recovery After Stroke in Adult Mice. *Stroke*. 2013;44(7):1951-1956. doi:10.1161/STROKEAHA.113.001162
 149. Sist B, Fouad K, Winship IR. Plasticity beyond peri-infarct cortex: Spinal up regulation of structural plasticity, neurotrophins, and inflammatory cytokines during recovery from cortical stroke. *Exp Neurol*. 2014;252:47-56. doi:10.1016/j.expneurol.2013.11.019
 150. Kaiser J, Maibach M, Salpeter I, et al. The spinal transcriptome after cortical stroke — In

- search of molecular factors regulating spontaneous recovery in the spinal cord. *J Neurosci*. 2019;2571-18. doi:10.1523/JNEUROSCI.2571-18.2019
151. Holahan MR. A shift from a pivotal to supporting role for the growth-associated protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity. *Front Cell Neurosci*. 2017;11(August):1-19. doi:10.3389/fncel.2017.00266
 152. Tarsa L, Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(2):1012-1016. doi:10.1073/pnas.022575999
 153. Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(12):799-811. doi:10.1038/nrn2936
 154. Zhang QW, Deng XX, Sun X, Xu JX, Sun FY. Exercise promotes axon regeneration of newborn striatonigral and corticonigral projection neurons in rats after ischemic stroke. *PLoS One*. 2013;8(11). doi:10.1371/journal.pone.0080139
 155. Otsuka S, Sakakima H, Terashi T, Takada S, Nakanishi K, Kikuchi K. Preconditioning exercise reduces brain damage and neuronal apoptosis through enhanced endogenous 14-3-3 γ after focal brain ischemia in rats. *Brain Struct Funct*. 2019;224(2):727-738. doi:10.1007/s00429-018-1800-4
 156. Taylor JM, Montgomery MH, Gregory EJ, Berman NEJ. Exercise preconditioning improves traumatic brain injury outcomes. *Brain Res*. 2015;1622:414-429. doi:10.1016/j.brainres.2015.07.009
 157. Bouet V, Boulouard M, Toutain J, et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc*. 2009;4(10):1560-1564. doi:10.1038/nprot.2009.125
 158. Liew HK, Pang CY, Hsu CW, et al. Systemic administration of urocortin after intracerebral hemorrhage reduces neurological deficits and neuroinflammation in rats. *J Neuroinflammation*. 2012;9:1-17. doi:10.1186/1742-2094-9-13
 159. Liew HK, Hu WF, Lin PBC, et al. Over-Activated Proteasome Mediates Neuroinflammation on Acute Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Cells*. 2019;8(11). doi:10.3390/cells8111326
 160. King MD, McCracken DJ, Wade FM, Meiler SE, Alleyne CH, Dhandapani KM. Attenuation of hematoma size and neurological injury with curcumin following intracerebral hemorrhage in mice: Laboratory investigation. *J Neurosurg*. 2011;115(1):116-123. doi:10.3171/2011.2.JNS10784
 161. Kempf A, Schwab ME. Nogo-A represses anatomical and synaptic plasticity in the central nervous system. *Physiology*. 2013;28(3):151-163. doi:10.1152/physiol.00052.2012
 162. Tamakoshi K, Ishida K, Hayao K, Takahashi H, Tamaki H. Behavioral Effect of Short- and Long-Term Exercise on Motor Functional Recovery after Intracerebral Hemorrhage in Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(12):3630-3635. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.08.038
 163. Park JW, Bang MS, Kwon BS, et al. Early treadmill training promotes motor function after

- hemorrhagic stroke in rats. *Neurosci Lett.* 2010;471(2):104-108. doi:10.1016/j.neulet.2010.01.020
164. Alsharidah M, Al-Hussain F, Iqbal M, Hamza A, Yoo WK, Bashir S. The effect of transcranial direct current stimulation combined with functional task training on motor recovery in stroke patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018;22(21):7385-7392. doi:10.26355/eurrev-201811-16277
165. Choi I-A, Lee C, Kim H, Choi D-H, Lee J. Effect of Inhibition of DNA Methylation Combined with Task-Specific Training on Chronic Stroke Recovery. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2019):1-19. doi:10.3390/ijms19072019
166. Allegra Mascaro AL, Conti E, Lai S, et al. Combined Rehabilitation Promotes the Recovery of Structural and Functional Features of Healthy Neuronal Networks after Stroke. *Cell Rep.* 2019;28(13):3474-3485.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.08.062
167. Cui J, Kim C-S, Kim Y, Sohn MK, Jee S. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) combined with aerobic exercise on the recovery of motor function in ischemic stroke rat model. *Brain Sci.* 2020;10(3):186. doi:10.1016/j.ibror.2019.07.520
168. Jefferson SC, Clayton ER, Donlan NA, Kozlowski DA, Jones TA, Adkins DL. Cortical Stimulation Concurrent with Skilled Motor Training Improves Forelimb Function and Enhances Motor Cortical Reorganization Following Controlled Cortical Impact. *Neurorehabil Neural Repair.* 2016;30(2):155-158. doi:10.1177/1545968315600274
169. O'Bryant AJ, Adkins DL, Sitko AA, Combs HL, Nordquist SK, Jones TA. Enduring Poststroke Motor Functional Improvements by a Well-Timed Combination of Motor Rehabilitative Training and Cortical Stimulation in Rats. *Neurorehabil Neural Repair.* 2016;30(2):143-154. doi:10.1177/1545968314562112
170. Shimogawa T, Sakaguchi H, Kikuchi T, et al. Therapeutic effects of combined cell transplantation and locomotor training in rats with brain injury. *Regen Med.* 2019;4(1):1-8. doi:10.1038/s41536-019-0075-6
171. Abe H, Jitsuki S, Nakajima W, et al. CRMP2-binding compound, edonergic maleate, accelerates motor function recovery from brain damage. *Science (80-).* 2018;360(6384):50-57. doi:10.1126/science.aao2300
172. Heo JY, Nam M-H, Yoon HH, et al. Aberrant Tonic Inhibition of Dopaminergic Neuronal Activity Causes Motor Symptoms in Animal Models of Parkinson's Disease. *Curr Biol.* 2020;30(2):276-291.e9. doi:10.1016/j.cub.2019.11.079
173. Jo S, Yarishkin O, Hwang YJ, et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2014;20(8):886-896. doi:10.1038/nm.3639
174. Nam MH, Cho J, Kwon DH, et al. Excessive Astrocytic GABA Causes Cortical Hypometabolism and Impedes Functional Recovery after Subcortical Stroke. *Cell Rep.* 2020;32(1):107861. doi:10.1016/j.celrep.2020.107861
175. Wahl AS, Schwab ME. Finding an optimal rehabilitation paradigm after stroke: Enhancing fiber growth and training of the brain at the right moment. *Front Hum Neurosci.*

2014;8(JUNE):1-13. doi:10.3389/fnhum.2014.00381

176. Huang X, Wang X, Yang M, et al. Spontaneous Neuronal Plasticity in the Contralateral Motor Cortex and Corticospinal Tract after Focal Cortical Infarction in Hypertensive Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2020;29(12):105235. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105235

業績一覧

1. 学術雑誌への論文掲載

1. **Takahiro Inoue**, Yasuyuki Takamatsu, Taichi Nishio, Kiho Soma, Misato Okamura, Harukazu Tohyama, Hiroshi Maejima, Combined treatment with exercise and $\alpha 5$ GABA_AR inhibitor promotes motor function recovery after intracerebral hemorrhage, *Neuroscience Letters*, 766, 136344 (2022)
2. Hiroki Mani, Saori Miyagishima, Naoki Kozuka, **Takahiro Inoue**, Naoya Hasegawa, Tadayoshi Asaka, Development of the relationships among dynamic balance control, inter-limb coordination, and torso coordination during gait in children aged 3–10 years, *Frontiers in Human Neuroscience*, 15, 740509 (2021)
3. **Takahiro Inoue**, Yasuyuki Takamatsu, Misato Okamura, Hiroshi Maejima, Ipsilateral BDNF mRNA expression in the motor cortex positively correlates with motor function of the affected forelimb after intracerebral hemorrhage, *Brain Research*, 1767, 147536 (2021)
4. Naoya Hasegawa, Shintaro Tanaka, Hiroki Mani, **Takahiro Inoue**, Yun Wang, Kazuhiko Watanabe, Tadayoshi Asaka, Adaptation of the compensatory stepping response following predictable and unpredictable perturbation training, *Frontiers in Human Neuroscience*, 15, 674960 (2021)
5. **Takahiro Inoue**, Yasuyuki Takamatsu, Misato Okamura, Hiroki Mani, Naoya Hasegawa, Hiroshi Maejima, Specific inhibition of $\alpha 5$ subunit-containing GABA_A receptors enhances locomotor activity and neuronal activity in the motor cortex, *Biomedical Research*, 42(3), pp.103-108 (2021)
6. Yasuyuki Takamatsu, **Takahiro Inoue**, Misato Okamura, Ryo Ikegami, Hiroshi Maejima, In vivo local transcranial static magnetic field stimulation alters motor behavior in normal rats, *Neuroscience Letters*, 753, 135864 (2021)
7. Mika Kitahara, **Takahiro Inoue**, Hiroki Mani, Yasuyuki Takamatsu, Ryo Ikegami, Harukazu Tohyama, Hiroshi Maejima, Exercise and pharmacological inhibition of histone deacetylase improves cognitive function accompanied by an increase of gene expressions crucial for neuronal plasticity in the hippocampus, *Neuroscience Letters*, 749, 135749 (2021)
8. Hiroki Mani, Saori Miyagishima, Naoki Kozuka, Kenta Takeda, Kenji Taneda, **Takahiro Inoue**, Yui Sato, Tadayoshi Asaka, Development of temporal and spatial characteristics of anticipatory postural adjustments during gait initiation in children aged 3–10 years, *Human Movement Science*, 75, 102736 (2021)
9. Hiroshi Maejima, Mika Kitahara, Yasuyuki Takamatsu, Hiroki Mani, **Takahiro Inoue**,

- Effects of exercise and pharmacological inhibition of histone deacetylases (HDACs) on epigenetic regulations and gene expressions crucial for neuronal plasticity in the motor cortex, *Brain Research*, 1751, 147191 (2021)
10. 萬井 太規, 宮城島 沙織, 小塚 直樹, 種田 健二, 井上 貴博, 佐藤 優衣, 武田 賢太, 浅賀 忠義, 5つの運動機能領域から見た健常児の歩行特性—3歳から10歳児と成人との比較, *理学療法学*, 47(6), pp. 560-567, (2020)
 11. Misato Okamura, Takahiro Inoue, Yasuyuki Takamatsu, Hiroshi Maejima, Low-level inhibition of GABAergic synapses enhances gene expressions crucial for neuronal plasticity in the hippocampus after ischemic stroke, *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 29(12), 105316 (2020)
 12. Takahiro Inoue, Misato Okamura, Mika Kitahara, Yasuyuki Takamatsu, Harutoshi Sakakima, Hiroshi Maejima, Exercise plus pharmacological neuromodulation of synaptic inhibition enhance motor function recovery after ischemic stroke, *Neuroscience*, 430, pp.12-24 (2020)
 13. Xiang Li, Takahiro Inoue, Masataka Hayashi, Hiroshi Maejima, Exercise enhances the expression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus accompanied by epigenetic alterations in senescence-accelerated mice prone 8, *Neuroscience Letters*, 706, pp.176-181 (2019)
 14. Hiroshi Maejima, Shuta Ninuma, Akane Okuda, Takahiro Inoue, Masataka Hayashi, Exercise and low-level GABA_A receptor inhibition modulate locomotor activity and the expression of BDNF accompanied by changes in epigenetic regulation in the hippocampus, *Neuroscience Letters*, 685, pp.18-23 (2018)
 15. Takahiro Inoue, Shuta Ninuma, Masataka Hayashi, Akane Okuda, Tadayoshi Asaka, Hiroshi Maejima, Effects of long-term exercise and low-level inhibition of GABAergic synapses on motor control and the expression of BDNF in the motor related cortex, *Neurological Research*, 40(1) pp.18-25 (2018)

2. 総説・解説

1. Takahiro Inoue*, Kenji Taneda, Transcranial Direct Current Stimulation Modulates GABA Levels Beyond the Stimulated Region: Perspectives for Stroke Rehabilitation, *The Journal of Neuroscience*, 39(10), pp.1768-1770, (2019)
2. Hiroshi Maejima, Takahiro Inoue, Yasuyuki Takamatsu, Therapeutic exercise accompanied by neuronal modulation to enhance neurotrophic factors in the brain with central nervous system disorders, *Physical Therapy Research*, 22(1), pp.38-43, (2019)

3. 学会発表

1. **T. Inoue**, Y. Takamatsu, T. Nishio, K. Soma, M. Okamura, H. Tohyama, H. Maejima, Treadmill exercise concurrent with pharmacological inhibition of $\alpha 5$ -GABA_A receptor improves motor function and enhances spinal cord plasticity after intracerebral hemorrhage in rats, Neuroscience 2021 (The Society for Neuroscience 50th Annual Meeting), P336.03, Web, Nov 8-11 (2021) **JNS-SfN Exchange Travel Award 受賞**
2. H. Maejima, M. Kitahara, Y. Takamatsu, H. Mani, **T. Inoue**, Pharmacological inhibition of histone deacetylases (HDACs) presents an enriched neuronal platform in the brain for neurorehabilitation, Neuroscience 2021 (The Society for Neuroscience 50th Annual Meeting), P309.01, Web, Nov 8-11 (2021)
3. **井上 貴博**, 高松 泰行, 西尾 太一, 相馬 希帆, 岡村 未里, 遠山 晴一, 前島 洋, 運動介入と $\alpha 5$ GABA 受容体阻害薬の投与が脳出血モデルラットの機能回復に与える影響, 第 26 回 日本基礎理学療法学会学術大会, 2G2-02, Web, 10/24 (2021) **優秀賞 受賞**
4. 西尾 太一, 三島 大雅, 相馬 希帆, 近藤 裕輝, 高村 巴菜, **井上 貴博**, 岡村 未里, 高松 泰行, 前島 洋, 脳出血モデルラットに対するトレッドミル運動は前肢運動協調性を改善する, 第 26 回 日本基礎理学療法学会学術大会, 2G2-03, Web, 10/24 (2021)
5. **井上 貴博**, 高松 泰行, 西尾 太一, 前島 洋, 運動と $\alpha 5$ GABA 受容体阻害薬の併用は脳出血後の脊髄 TrkB 遺伝子発現を促進する, 第 19 回 コ・メディカル形態機能学会学術集会, 口演 II -5, Web, 9/11 (2021) **学会優秀賞 受賞**
6. **T. Inoue**, H. Takamura, T. Nishio, K. Soma, Y. Takamatsu, H. Maejima, Temporal changes in GFAP gene expression in the motor cortex after intracerebral hemorrhage, The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 4P-355, Kobe/Web, July 31 (2021)
7. H. Maejima, M. Okamura, **T. Inoue**, Y. Takamatsu, Epigenetic modifications in the motor cortex caused by exercise plus pharmacological inhibition of histone deacetylases (HDACs) after intracerebral hemorrhage, The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 4P-356, Kobe/Web, July 31 (2021)
8. Y. Takamatsu, **T. Inoue**, M. Okamura, R. Ikegami, H. Maejima, In vivo transcranial static magnetic field stimulation over the primary motor cortex causes inhibitory changes of motor function in normal rats, The 98th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, a90016, Web, Mar 28-30 (2021)
9. R. Ikegami, M. Kitahara, **T. Inoue**, H. Mani, Y. Takamatsu, H. Tohyama, H. Maejima, Exercise and pharmacological inhibition of histone deacetylase improves cognitive function in normal mice, The 98th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, a90105, Web, Mar 28-30 (2021)

10. **T. Inoue**, Y. Takamatsu, M. Okamura, H. Maejima, BDNF mRNA expression level in the ipsilateral motor cortex correlates with motor impairment of paralyzed forelimb after intracerebral hemorrhage in rats, SfN Global Connectome 2021, P140.01, Web, Jan 11 (2021)
11. 岡村 未里, **井上 貴博**, 高松 泰行, 萬井 太規, 前島 洋, 脳出血モデルラットに対するトレッドミル走行が認知機能に与える影響, 第 25 回 日本基礎理学療法学会学術大会, 1G2-02, Web, 12/12-18 (2020)
12. **井上 貴博**, 高松 泰行, 岡村 未里, 前島 洋, 脳出血後の運動機能障害と大脳皮質における BDNF 遺伝子発現の関係, 第 6 回 北海道大学部局横断シンポジウム, p_b1_04f_05, Web, 10/19 (2020)
13. **T. Inoue**, Y. Takamatsu, M. Okamura, H. Mani, N. Hasegawa, H. Maejima, Pharmacological neuromodulation reducing tonic inhibition of GABA_A receptors upregulates neuronal activity in the motor cortex in rats, 11th World Congress for Neurorehabilitation (WCNR 2020), P0367, Web, Oct 7-11 (2020)
14. **T. Inoue**, Y. Takamatsu, M. Okamura, H. Mani, H. Maejima, Time course of motor impairments after intracerebral hemorrhage with internal capsule injury in rats, The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, LBA-048, Web, July 29 (2020)
15. 北原 美佳, **井上 貴博**, 萬井 太規, 高松 泰行, 前島 洋, エピジェネティクス制御を伴う有酸素運動が海馬における脳由来神経栄養因子の発現に与える影響, 第 24 回 日本基礎理学療法学会学術大会, 2O9-05, 新潟, 12/1 (2019)
16. 萬井 太規, 宮城島 沙織, 小塚 直樹, 種田 健二, **井上 貴博**, 佐藤 優衣, 武田 賢太, 浅賀 忠義, 歩行開始時の予測的姿勢調節の発達過程の方向特異性, 第 24 回 日本基礎理学療法学会学術大会, 1O1-01, 新潟, 11/30 (2019)
17. 萬井 太規, 宮城島 沙織, 小塚 直樹, 種田 健二, **井上 貴博**, 佐藤 優衣, 武田 賢太, 浅賀 忠義, 歩行機能別に見た歩行能力の発達過程, 第 6 回 日本小児理学療法学会学術大会, O-1-3, 福岡, 11/16-17 (2019) **奨励賞 受賞**
18. **T. Inoue**, M. Kitahara, M. Okamura, Y. Takamatsu, H. Maejima, Combination of exercise and pharmacological neuromodulation targeting GABA_A receptors promotes motor recovery and BDNF protein expression in the M1 after focal brain ischemia in rats, Neuroscience 2019 (The Society for Neuroscience 49th Annual Meeting), 368.01/B22, Chicago, IL, Oct 21 (2019)
19. H. Maejima, M. Hayashi, **T. Inoue**, M. Kitahara, Voluntary exercise combined with repetitive inhibition of GABAergic synapses modulates the expression of BDNF in the motor cortex, Neuroscience 2019 (The Society for Neuroscience 49th Annual Meeting), 368.03/B24, Chicago, IL, Oct 19-23 (2019)

20. **T. Inoue**, M. Okamura, M. Kitahara, Y. Takamatsu, H. Maejima, Treadmill exercise beneficially contributes to gene expressions relating to synaptic and axonal plasticity in the motor cortex after ischemic stroke in rats, The 1st International Sport Neuroscience Conference, P31, Tsukuba, Sep 18 (2019) **Travel Award 受賞**
21. **井上 貴博**, 脳卒中リハビリテーションにおける GABA 受容体を標的とした薬理的ニューロモジュレーション, 第 4 回 基礎理学療法学 夏の学校, 若手研究者講演 O-1-5, 鹿児島, 8/24 (2019)
22. **T. Inoue**, Y. Takamatsu, H. Maejima, The interactive effects of GABA_A receptor antagonist and exercise on the recovery of motor function and BDNF expression in the ipsilesional M1 after ischemic stroke in rats, NEURO2019 (The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society), PA-365, Niigata, July 25 (2019)
23. M. Okamura, **T. Inoue**, A. Kako, Y. Takamatsu, H. Maejima, The effects of low-intensity exercise on the gene expressions relating to synaptic plasticity in the hippocampus following ischemic stroke in rats, NEURO2019 (The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society), PA-359, Niigata, July 25 (2019)
24. H. Maejima, M. Kitahara, **T. Inoue**, Y. Takamatsu, Exercise combined with repetitive inhibition of histone deacetylases modulates the expression of neurotrophin in the cerebral cortex, NEURO2019 (The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society), PA-L-523, Niigata, July 25 (2019)
25. H. Maejima, X Li, **T. Inoue**, M. Hayashi, Exercise habit enhances the expression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus accompanied by epigenetic changes in senescence-accelerated mice prone 8, FENS Regional Meeting 2019, P359, Belgrade, July 13 (2019)
26. H. Mani, S. Miyagishima, N. Kozuka, K. Taneda, **T. Inoue**, K. Takeda, T. Asaka, Development of postural control during single-leg standing in children aged 3–10 years, ISPGR World Congress 2019, P3-I-80, Edinburgh, Scotland, July 4 (2019)
27. **井上 貴博**, 林 聖隆, 李 想, 北原 美佳, 前島 洋, GABA 受容体阻害下の運動療法が脳梗塞モデルラットの機能回復に与える影響, 第 23 回 日本基礎理学療学会学術大会, O9-1, 京都, 12/16 (2018)
28. 萬井 太規, 宮城島 沙織, 小塚 直樹, 種田 健二, **井上 貴博**, 武田 賢太, 浅賀 忠義, 予測的姿勢調節の潜時と振幅の発達過程は異なる ～体重心と足圧中心点を用いた分析～, 第 23 回 日本基礎理学療学会学術大会, O7-1, 京都, 12/16 (2018)
29. **井上 貴博**, 薬理的中枢性コンディショニングを伴う運動療法の検討 —神経栄養因子の発現から— 第 3 回 基礎理学療法学 夏の学校, 名古屋, 8/25-26 (2018) **Most**

Impressive Presenter 賞 受賞

30. **T. Inoue**, S. Ninuma, M. Hayashi, A. Okuda, T. Asaka, H. Maejima, Low-level inhibition of GABA_A receptor and motor exercise modulate BDNF expression in the motor related cortex, The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 3P-001, Kobe, July 28 (2018)
31. X. Li, **T. Inoue**, M. Hayashi, M. Kitahara, H. Maejima, The effect of aging and long-term exercise on the expression of BDNF in the hippocampus of senescent accelerated mice accompanied by epigenetic alternations, The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 3P-LBA15, Kobe, July 28 (2018)
32. H. Maejima, M. Kitahara, M. Hayashi, **T. Inoue**, X. Li, Site-specific modulation of BDNF expression in the brain following chronic GABA_A receptor inhibition, 11th FENS Forum of Neuroscience, B030, Berlin, Germany, July 8 (2018)
33. H. Maejima, S. Ninuma, A. Okuda, **T. Inoue**, M. Hayashi, Exercise combined with low-level GABA_A receptor inhibition modulates the expression of BDNF in the hippocampus accompanied by changes in epigenetic regulation, Neuroscience 2017 (The Society for Neuroscience 47th Annual Meeting), 373.14/D10, Washington, DC, Nov 13 (2017)
34. **T. Inoue**, S. Ninuma, M. Hayashi, A. Okuda, T. Asaka, H. Maejima, The effects of long-term exercise combined with low-level GABAergic synapses on motor control and the expression of BDNF in the motor cortex, The 3rd FHS International Conference, 1-31, Sapporo, July 07 (2017)

4. 受賞

1. **優秀賞**, 第 26 回日本基礎理学療法学会学術大会 (2021/11/30 受賞通知)
2. **JNS-SfN Exchange Travel Award**, 日本神経科学学会, 2021/10/11
3. **学会優秀賞**, 第 19 回 コ・メディカル形態機能学会学術集会, 2021/9/11
4. **保健科学院研究奨励賞**, 北海道大学大学院保健科学院, 2021/8/2
5. **Travel Award**, The 1st International Sport Neuroscience Conference, 2019/9/18
6. **保健科学院修士課程研究発表賞 (Best Presentation Award)**, 北海道大学大学院保健科学院, 2019/3/25
7. **Most Impressive Presenter 賞**, 第 3 回 基礎理学療法学 夏の学校, 2018/8/26

5. その他

1. 日本学術振興会 特別研究員 DC1 (2019/4 - 2022/3)
2. 日本学術振興会 科学研究費助成事業 (特別研究員奨励費: 19J23508) 研究代表者