



脳卒中モデル動物における中枢神経系の変化について(自然科学系)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山野, 眞利子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00010819

報告

脳卒中モデル動物における中枢神経系の変化について

山野真利子

(大阪府立看護大学医療技術短期大学部理学療法学科)

What Happened in the Stroke Model Mice

Mariko Yamano

(Department of Physical Therapy, Osaka Prefecture College of Health Sciences)

Key words: 皮質脊髄路破壊動物; *c-fos*; GFAP

はじめに

1950年より30年間、日本人の死因の第1位をしめていた脳卒中は、栄養指導や高血圧などの疾患対策によりやや低下し、癌にその1位の座を渡したが、現在も心疾患と並び死因の2位と3位をしめている。患者数は依然増加傾向にあり、高齢化に向かう我が国ではこれからますます増えていく可能性がある。さらに脳卒中はたとえ死を免れても、肢体の不自由や痴呆、寝たきり状態や介護の必要性など社会的問題は大きい。

私はこれまで脳神経系の機能を解析する研究に携わってきた。7年前より本学理学療法学科に所属し教育に従事する中で、脳卒中後のリハビリテーションがいかにか大変で理学療法にとって大きな課題であるかを知り、「脳卒中を克服する」という壮大なテーマを掲げて研究に取り組んでいる。

脳卒中モデルマウスの作成

まず脳卒中を起こしている脳内では実際どのようなことが起こっているのかを検証するために、モデル動物の作成に着手した。これまで世界中で研究されている方法は1) 遺伝的高血圧発症ラット (Wistar-Kyoto Rat) が卒中を起こした直後のもの (高価で手に入らない)、2) 中大脳動脈や内頸動脈を結紮または詰まらせたもの (梗塞巣が脳の広範囲にわたる)、3) 中大脳動脈や内頸動脈の血流を短時間止めた一過性虚血 (主に海馬に傷害が限局する) がある。しかし高価な1)を除きヒトでの症例に類似していない欠点があり躊躇していた。

ヒトの脳梗塞や脳出血は中大脳動脈の領域で多発し、病巣が内包を圧迫し運動麻痺を伴う錐体路障害をよく起こす。これがいわゆる片麻痺である。なぜなら随意運動をつかさどる錐体路は、大脳皮質の運動野から内包を通過し、対側脊髄の運動神経細胞に到達する長い錐体細胞の軸索が集まった束であり、この経路のどこで障害され

運動や内頸動脈を結紮または詰まらせたもの (梗塞巣が脳の広範囲にわたる)、3) 中大脳動脈や内頸動脈の血流を短時間止めた一過性虚血 (主に海馬に傷害が限局する) がある。しかし高価な1)を除きヒトでの症例に類似していない欠点があり躊躇していた。

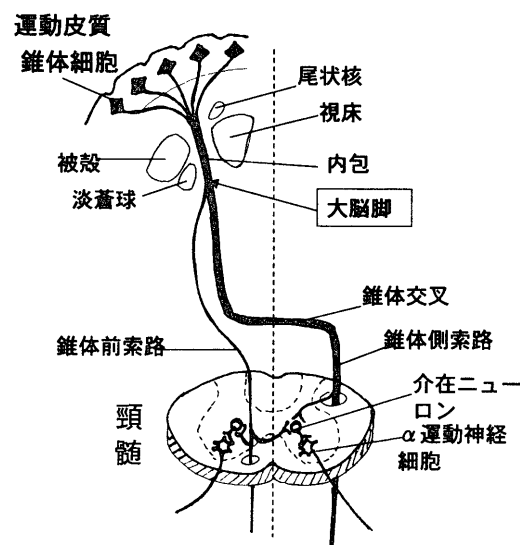


図1 ヒトの錐体路の概略図
ただしマウスでは脊髄において一部異なり、錐体側索路が後索を通る。

紀要委員会注：本報告は、平成13年度大阪府立看護大学医療技術短期大学部学長指定研究補助金を用いてなされた研究成果の報告である。

(受付日 2002年8月30日, 受理日 2002年11月22日)

ても、反対側の上下肢を動かさなくなる (図 1 参照)。

そこで私はこの錐体路に着目し、内包のすぐ後部にあたる大脳脚部で、片側を小さく電気破壊した皮質脊髄路破壊マウスを作成し、それをを用いて以下の実験をおこなった。術後の回復過程における脳内の変化は、各種抗体を用い免疫組織化学的に検出し、顕微鏡で観察した。

術後のマウスは片麻痺などの症状を伴うが、麻痺の程度と脳内物質との関連や、障害の回復過程における物質の変化については本報告ではふれない。

モデルマウスの有用性

錐体路破壊マウスは術後 7 日目には術側の大脳皮質運動野の大型錐体細胞が殆ど消失し、以後 2 ヶ月後も回復が見られず、破壊部よりの逆行性変性が確かに生じていることが確認できた。その他の神経細胞は形態的に変化がなく、視床や線条体の細胞も全く影響なく、脳卒中のうち特に錐体路障害モデルとして使用可能であると判断し、このモデルマウスを使って実験した。

術後の経過

脳を傷つけるとその直後より、多くの神経活性物質や神経栄養因子が出現することは報告されている。またやや遅れてグリア細胞が出現し、傷の修復に関与することもよく知られている。本研究でも早期には傷害側脳内に多くの早初期遺伝子 *c-fos* 陽性細胞が出現した。神経細胞の核内に *c-fos* が出現すると、これが遺伝子の AP-1 部に結合して転写が開始されることから、神経細胞の活性化の指標とされている。このことより皮質脊髄路破壊早期には傷害側の脳は広範囲に神経細胞が活性化(興奮)している様子が伺えたが、先行研究と同様に 3 日以降は *c-fos* 陽性細胞は減少し、殆ど発現が認められなくなり、異常な興奮がおさまってきたと考えられた。

次に脳に栄養を与え環境を整えているグリア細胞の変化を見ると、モデルマウスでは術後 4 日目より 2 週間にかけて、この損傷部だけでなく脳半側にわたる広い範囲に突起が太くなった活性化アストロサイト (glial fibrillary acidic protein: GFAP 免疫陽性) が多数出現し、傷の修復に働いていると考えられた。

運動負荷によって新事実が判明

モデル動物の安静時の脳の現象は上記の実験で明らかになり、破壊 4 日目以後はグリアの活性化と一部の錐体細胞の脱落以外は両側とも形態的に何の変化もないことが、どうしてもヒト脳卒中での重篤な症状と結びつかな

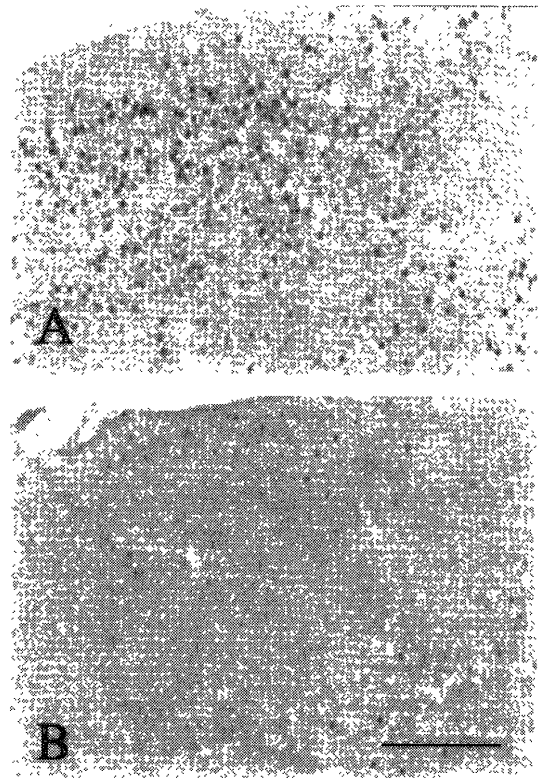


図 2 皮質脊髄路破壊 7 日後の動物における *c-fos* 免疫陽性細胞の顕微鏡写真。A は正常側大脳皮質で *c-fos* 陽性細胞が豊富に認められるが、B の術側大脳皮質では殆ど消失し、細胞の活動が抑制されていることが示唆された。スケールバー：200 μ m。

い。モデルマウスの神経細胞は本当に活動しているのであろうかと考え、次の実験を試みた。

神経細胞の多くは活動時に早初期遺伝子の *c-fos* を核内に発現する。モデルマウスをマウス用のトレッドミル上で 30 分間走らせ、直後の脳を観察したところ、驚くべきことが明らかになった。すなわち運動させたことで脳内には *c-fos* 陽性細胞が豊富に出現すると予測したが、健側では多いにもかかわらず、術側では *c-fos* 陽性細胞は殆ど認められず、神経細胞はあまり活動していないことが示唆された (図 2 参照)。この減少は術後 4 日目から 10 日目にかけて起こっていた。以後徐々に増加し、14 日目以後は *c-fos* 陽性細胞は両側脳内に等しく豊富に見られるようになった。ヒトでも脳卒中発症後 1~2 週間は脳代謝量が減少することが知られている。ヒトでの脳代謝量の減少は、*c-fos* 発現の抑制による神経細胞の活動の低下によって引き起こされる可能性が本実験より考えられた。

本研究結果より、ヒトの脳卒中発症後 2 週間は、傷害側の脳の広い範囲で神経細胞の働きが大幅に減少している可能性が推察された。またモデルマウスに運動刺激を負荷しても、術後 2 週間は傷害側の脳の神経細胞は殆ど興奮していないことから、錐体路障害が認められる患者

の麻痺側への早期リハビリテーションは、上位中枢の興奮抑制などの混乱が起こっている可能性があることから、注意しておこなう必要があり、筋や関節への運動療法に留めるべきではないであろうか。

何が神経細胞の活動を抑制するのか

脳卒中モデルマウスの脳内で *c-fos* 陽性細胞が減少した全く同じ領域で、GFAP 陽性の活性化アストロサイトが非常に多く出現した。このことは活性化アストロサイトが神経細胞の活動を抑制する可能性が考えられる。そこで次にアストロサイトを活性化させる2つの実験を試みた。

アストロサイトを活性化した物質は何であろうか？

グリアであるアストロサイトは神経細胞に栄養を与え、また神経細胞周囲の K^+ などのイオン環境を整えている。細胞が破壊されると大量に K^+ が放出される。これを処理するためにアストロサイトが活性化したのではないであろうか。そこで Kraig ら (1991 年, 文献参照) の方法を用いて、正常マウスの片側の脳表に 1 mol/L の高濃度 KCl 含有寒天 (5 mm 直径) を 1 時間置く実験をおこなった。術後 7 日後、KCl 処置側大脳皮質には GFAP 陽性アストロサイトが多数出現した。さらに運動を負荷するとやはり GFAP 陽性アストロサイトが多い領域では *c-fos* 免疫陽性細胞は殆ど出現しなかった。このことより破壊部から放出された K^+ がアストロサイトの活性化の引き金になり、活性化したアストロサイトがさらに神経細胞の活性を押さえた可能性があると考えられる。

次にアストロサイトの GFAP 遺伝子を活性化する白血

病抑制因子 (leukemia inhibitory factor: LIF) を用いて実験をおこなった。LIF は傷害部の細胞などから放出されるサイトカインで、アストロサイトの LIF 受容体に結合すると、核内に移行して GFAP のプレカーサー部に結合し、GFAP の産生を促進するとされる。そこで正常マウスの片側脳内に LIF 1 μ g を注入し 3 日後に運動負荷をおこなった結果、やはり活性化アストロサイトが脳の広範囲に出現し、運動負荷後の *c-fos* の発現も一致して減少していた。このことより恐らく破壊部周辺細胞から分泌された LIF により、アストロサイトが活性化し、神経細胞の活動を抑制した可能性が示唆される。しかしなぜ広範囲なのか、またなぜ神経細胞の働きを抑制するのかは不明であるが、一定期間脳の活動を抑制することでこれらを保護し、神経回路の再構築を促しているとも考えられる。

今後培養アストロサイトや栄養因子の注入などにより、破壊された錐体路を再生する方法を検討し、脳卒中による身体障害を軽微に、より早期に回復する手立てを研究していくつもりである。

本研究の一部は「皮質脊髓路破壊動物回復期における神経栄養因子等の免疫組織化学的検討」というタイトルで平成14年3月第107回日本解剖学会において発表した。

文 献

Kraig, R., Dong, L., Thisted, R. and Jaeger, C. B. (1991) Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein. *J. Neurosci.*, 11:2187-2198.