

脳梗塞超早期リハビリテーションによる梗塞巣拡大機構の解明

新潟医療福祉大学リハビリテーション学部理学療法学科

講師 玉越 敬悟

はじめに

大規模な臨床研究において、脳卒中発症後24時間以内の超早期リハビリテーションは、脳内に悪影響を及ぼし、機能予後を悪化させることが報告されている⁽¹⁾。中大脳動脈閉塞モデルラットを用いて超早期運動の効果を検証した研究では、脳梗塞後6時間目の運動は炎症促進因子やアポトーシス関連因子の発現を増大させ、梗塞巣体積を拡大させることが報告されている⁽²⁻⁴⁾。脳梗塞後超早期運動による梗塞巣拡大には、炎症促進因子の増大が関与している可能性があるが、具体的な作用機序については不明な点が多い。そこで、本研究では、梗塞巣領域を大脳皮質感覚運動野に局限した脳梗塞モデルラットを用いて、皮質梗塞後超早期運動が梗塞巣における炎症関連因子に与える影響について検証した。

結 果

実験動物にはWistar系雄性ラットを用いた。対象を無作為に偽手術群（SHAM群）、脳梗塞+非運動群（ISC+Cont群）、脳梗塞+超早期運動群（ISC+VET群）の3群に分けた。脳梗塞モデルは、左大脳皮質感覚運動野にカニューレを挿入し、エンドセリン-1を一定流速で注入して作製した。ISC+VET群は、術後6時間目にトレッドミル走行運動（11m/min・60分間）を実施した。SHAM群およびISC+Cont群は、その間自然飼育とした。運動機能評価にはHorizontal ladder testを用いて梯子の掴み方をスコア化し、巧緻機能を評価した。また、Rotarodを用いて全身のバランス機能を評価した。運動機能評価は、発症4時間目および8時間目に実施した。その後、10時間目に脳組織を採取し、脳組織解析を行った（図1）。運動機能評価の結果は、発症4時間目および8時間目において、Ladder test（図2A）およびRotarod test（図2B）ともに全群間に有意差はなかった（ISC:n=8, ISC+VET:n=8, $P>0.05$ ）。脳組織解析では梗塞巣体積および炎症関連因子の解析を行った。梗塞巣体積の解析では、まず、灌流固定により脳組織を採取し、脳切片を作成した後、Nissl染色を施した。その後、顕微鏡にて画像を取り込み、ImageJにて体積を解析した。t検定を用いて両群のデータを統計解析した結果、ISC+VET群の梗塞巣体積はISC群と比較して有意に高値を示した（ISC:n=8, ISC+VET:n=8, 図3, $P<0.05$ ）。炎症関連因子の網羅的解析では、PCRarray法を使用した。灌流脱血後に脳を採取し、梗塞巣および梗塞巣周辺部をトリミングした。解析サンプルは各群で個々のサンプル（ISC:n=8, ISC+VET:n=8）を混合して使用した。各群の混合サンプルのmRNA濃度をBiospec-nanoを用いて測定し、一定濃度に統一した。ケ

モカイン遺伝子40種、インターロイキン遺伝子25種、腫瘍壊死因子遺伝子8種、その他の炎症関連遺伝子11種をRT2 Profiler PCR Arrays (QIAGEN) を用いて解析した(図4)。その結果、ISC+VET群の炎症関連遺伝子はISC群と比較してCxcr1、Tnfsf4、Ccl5、Ccr3、Cd40lgのmRNA発現量が増加し、Cxcl11、Cxcr5、Il11、Il7、Ccl20、Ccl9、Cxcr2のmRNA発現量が減少した。特に、Cxcr1のmRNA発現量が顕著に増加していた(表5)。

図1

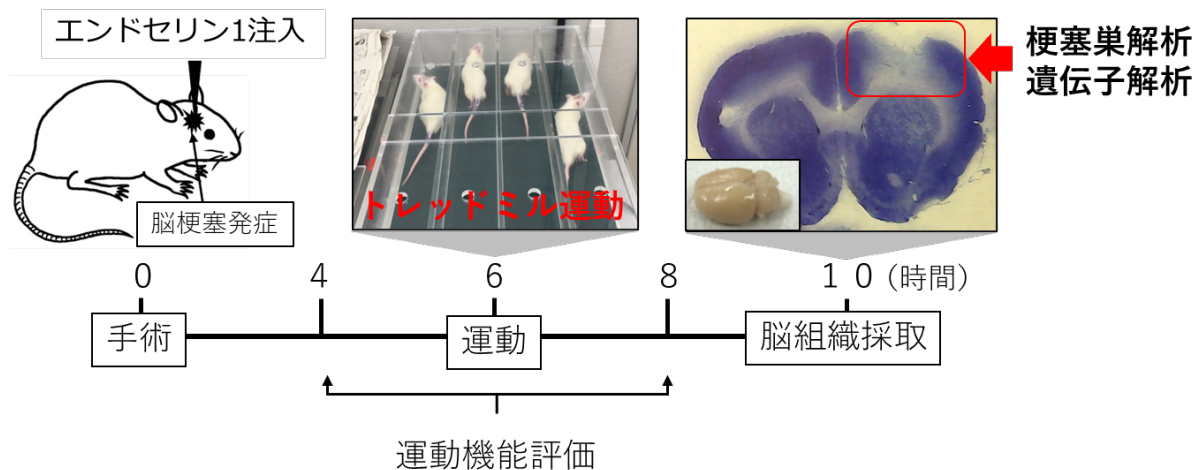


図2

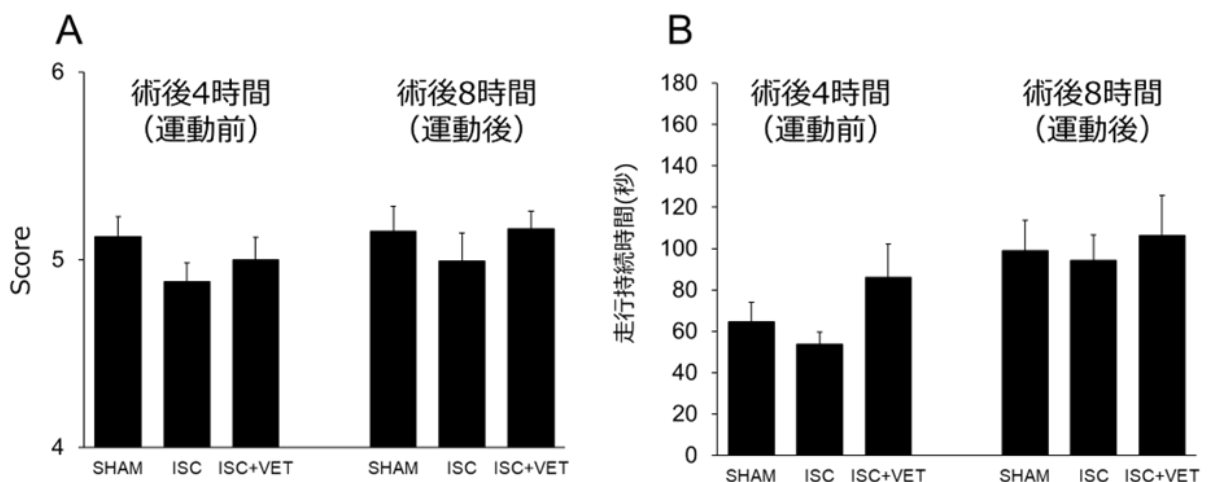


図3



図4

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|--------|----------------------|-------|-------|-----------|---------|---------|---------|----------|---------|--------|-------|
| A | Aimp1 | Bmp2 | Ccl11 | Ccl12 | Ccl17 | Ccl19 | Ccl2 | Ccl20 | Ccl22 | Ccl24 | Ccl3 | Ccl4 |
| B | Ccl5 | Ccl6 | Ccl7 | Ccl9 | Ccr1 | Ccr10 | Ccr2 | Ccr3 | Ccr4 | Ccr5 | Ccr6 | Ccr8 |
| C | Cd40lg | Csf1 | Csf2 | Csf3 | Cx3cl1 | Cx3cr1 | Cxcl1 | Cxcl10 | Cxcl11 | Cxcl12 | Cxcl2 | Cxcl6 |
| D | Cxcl9 | Cxcr2 | Cxcr3 | Cxcr5 | Faslg | Ifng | Il10ra | Il11 | Il13 | Il15 | Il16 | Il17a |
| E | Il17b | Il17f | Il1a | Il1b | Il1r1 | Il1rn | Il21 | Il27 | Il2rb | Il2rg | Il3 | Il33 |
| F | Il4 | Il5 | Il5ra | Il6r | Il6st | Il7 | Cxcr1 | Lta | Ltb | Mif | Nampt | Osm |
| G | Pf4 | RGD1561905_predicted | Spp1 | Tnf | Tnfrsf11b | Tnfsf10 | Tnfsf11 | Tnfsf13 | Tnfsf13b | Tnfsf14 | Tnfsf4 | Vegfa |

表5

| Symbol | Description | Fold Change |
|---------|-------------------------------------|-------------|
| Cxcr1 | Interleukin 8 receptor, alpha | 4.12 |
| Tnfsf14 | Tumor necrosis factor (ligand) sf14 | 2.78 |
| Ccl5 | Chemokine (C-C motif) ligand 5 | 2.26 |
| Ccr3 | Chemokine (C-C motif) receptor 3 | 2.13 |

| Symbol | Description | Fold Change |
|--------|------------------------------------|-------------|
| Cxcl11 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 | 0.49 |
| Cxcr5 | Chemokine (C-X-C motif) receptor 5 | 0.48 |
| Il11 | Interleukin 11 | 0.42 |
| Il7 | Interleukin 7 | 0.42 |
| Ccl20 | Chemokine (C-C motif) ligand 20 | 0.41 |
| Ccl9 | Chemokine (C-C motif) ligand 9 | 0.38 |
| Cxcr2 | Chemokine (C-X-C motif) receptor 2 | 0.33 |

考 察

本研究結果から皮質梗塞後6時間目における運動介入は梗塞巣拡大を促進させることが示された。炎症関連因子の網羅的解析結果からケモカイン遺伝子を中心とした多数の炎症関連因子が梗塞巣拡大に関与していることが分かり、特にCxCR1の遺伝子発現が深く関与している可能性が高いことが示された。中大脳動脈閉塞モデルラットを用いた研究においても発症6時間目における運動は、梗塞巣体積を拡大させることが示されており⁽²⁾、本研究の結果から皮質に限局した場合も発症6時間目の運動が梗塞巣体積を拡大させる効果があることが示唆された。しかし、運動機能障害には変化がなかったため、今後は他の運動機能評価を使用しながら運動機能障害への影響を検討する必要がある。梗塞巣拡大機構の解明のために、梗塞巣周囲の炎症因子を解析し、CxCR1の顕著な増加が見られた。CxCR1は、IL-8の受容

体であり、虚血初期における多形核白血球の蓄積や活性化に寄与する⁽⁵⁾。そのため、脳虚血後超早期の運動による梗塞巣拡大には、多形核白血球の活性化が関与している可能性があるため、今後、さらなる検証が必要である。

要 約

本研究は、皮質梗塞モデルラットを用いて、虚血後6時間目の超早期運動が梗塞巣および炎暑関連因子に及ぼす影響について検証した。脳梗塞モデルは、左大脳皮質感覚運動野にエンドセリン-1を一定流速で注入して作製し、術後6時間目にトレッドミル走行運動を実施した。運動群は非運動群と比較して梗塞巣体積が増加し、炎症関連因子の変化が見られた。特に、CxCR1に顕著な変化が見られた。今後、梗塞巣体積拡大とCxCR1の関連について検証する必要がある。

文 献

1. group, AVERT Trial Collaboration : Efficacy and safety of very early mobilisation within 24 h of stroke onset (AVERT) : a randomised controlled trial、Lancet 386 (9988) : 46-55、2015.
2. Li, F., Shi, W., Zhao, E. Y., Geng, X., Li, X., Peng, C., Shen, J., Wang, S., Ding, Y. : Enhanced apoptosis from early physical exercise rehabilitation following ischemic stroke、J Neurosci Res、95 (4) : 1017-1024、2017.
3. Li, F., Geng, X., Khan, H., Pendy, J. T., Peng, C., Li, X., Rafols, J. A., Ding, Y. : Exacerbation of Brain Injury by Post-Stroke Exercise Is Contingent Upon Exercise Initiation Timing、Front Cell Neurosci、11 : 311、2017.
4. Li, F., Pendy, J. T., Ding, J. N., Peng, C., Li, X., Shen, J., Wang, S., Geng, X. : Exercise rehabilitation immediately following ischemic stroke exacerbates inflammatory injury、Neurol Res、39 (6) : 530-537、2017.
5. Emerich, D. F., Dean, R. L., Bartus, R. T. : The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct?、Exp Neurol、173 (1) : 168-181、2002.