

## 9. レトロウイルス感染症 (HTLV-1 と HIV)

Retrovirus infection (HTLV-1 and HIV)

中川 正法\*

レトロウイルスは逆転写酵素をもつ一本鎖 RNA ウィルスである。オンコウイルス亜科の HTLV (ヒト T 細胞白血病ウイルス)-1, HTLV-2 や、レンチウイルス亜科の HIV (ヒト免疫不全ウイルス)-1, HIV-2 などがヒトに感染して、神経疾患である HAM (HTLV-1 associated myelopathy : HTLV-1 関連脊髄症) や NeuroAIDS (HIV 感染にともなう神経合併症) を引き起こす。HTLV-1 感染者数は約 108 万人と推定され、HAM 患者が大都市圏で増加傾向となっている。T<sub>HAM</sub> の発見をはじめ、HAM の免疫学的病態解明が進んでいる。HIV 感染者の長期予後の改善にともない、HIV 関連神経認知障害 (HIV-associated neurocognitive disorders : HAND) の増加が指摘されている。

Key Words : Retrovirus / Neurologic complications / HAM / T<sub>HAM</sub> / HAND

### I HAM (HTLV-1 関連脊髄症)

1980年、HTLV (ヒト T 細胞白血病ウイルス) が発見され、1981年には HTLV が成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスであると確認された。1985年6月に鹿児島大学第三内科で HAM (HTLV-1 associated myelopathy : HTLV-1 関連脊髄症) 患者第一例が発見された<sup>1)</sup>。1986年11月からは献血の HTLV-I スクリーニングが開始され、その後、スクリーニングを受けた血液製剤による HAM 発症はない。2008年に HAM は厚生労働省特定疾患に指定されたが、慢性進行性の疾患であり、医療費軽減措置を含む総合的な HTLV-1 対策の充実が望まれる。

#### 1. HAM の疫学

最近、HTLV-1 感染者および第三次 HAM 患者全国調査が行われた。その結果、HTLV-1 感染者は全国で約 108 万人存在し<sup>2)</sup>、関東、関西などの

都市圏で HAM 患者が増加していた (図1)<sup>3)</sup>。また、1995 年以降は高齢発症の HAM 患者が多く、高齢発症割合 (65 歳以上) は 1994 年以前の 1.3% から、1995 年以降は 26.3% に増加していた。ALS (筋萎縮性側索硬化症) の有病率との比較に基づいて HAM の推定有病率は 3.0 人/人口 10 万人と推定された。

#### 2. HAM の病態

HAM では、胸髄中下部の左右対称性の側索、前側索、後索腹側部の変性、血管周囲から実質内に広がる小円形細胞の浸潤がみられ、慢性炎症が持続していると考えられている。HTLV-1 mRNA およびプロウイルス DNA は浸潤単核細胞内の CD4 陽性 T リンパ球内のみ確認される。

HAM の発症には宿主側とウイルス側の発症関連要因 (HLA, ウィルスタイプなど) が関与している。脊髄病巣部の HTLV-1 感染 CD4 陽性 T リンパ球と、それを攻撃する HTLV-1 特異的 CD8

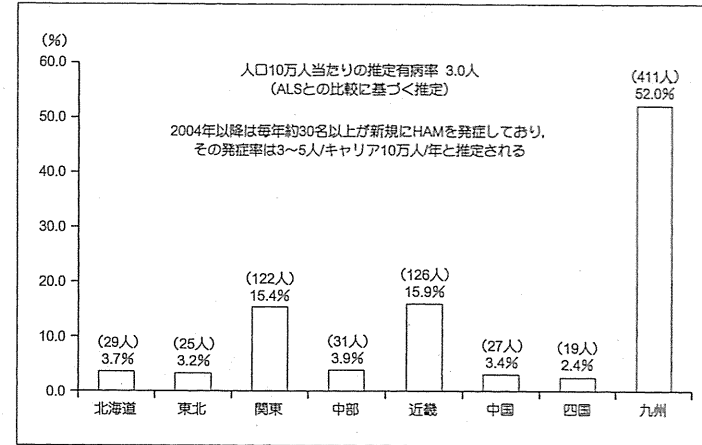


図1 第三次 HAM 全国調査で登録された HAM 患者 790 名の地域分布

HTLV-1 感染者は全国で約 108 万人存在し、関東、関西などの都市圏で HAM 患者が増加している。

HAM : HTLV-1 関連脊髄症, HTLV : ヒト T 細胞白血病ウイルス, ALS : 筋萎縮性側索硬化症 (文献 3 より)

陽性 T リンパ球との相互作用により種々のサイトカインが持続的に放出され、神経組織を傷害していると想定されている (by stander 効果)。

HAM では、HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ), IFN (インターフェロン)- $\gamma$  + CD4 + CD25 + CCR4 + T 細胞 (T<sub>HAM</sub>), FoxP3 + CD4 + T 細胞, CXCL10 (IP10) などがその病態に関与している。HTLV-1 感染細胞が IFN- $\gamma$  を産生し、IFN- $\gamma$  がアストロサイトに作用して CXCL10 を分泌させ、CXCL10 が CXCR3 を介して感染細胞を脊髄にさらに誘導する “positive feedback loop” が、HAM における慢性炎症を惹起していることが示唆されている<sup>4)</sup>。

### 3. HAM の臨床症状

HAM は緩徐に進行する対称性の錐体路障害所見が前景に立つミエロパチーであり、両下肢近位筋優位の筋力低下と痙性による歩行障害が特徴的である。膝蓋腱反射・アキレス腱反射が亢進し、腹壁反射が消失し、明瞭なバビンスキー反射がみられる。下顎反射の亢進例は 27% に過ぎない。内反尖足を高率に認める。HAM の末期には腱反射が低下し、著明な筋萎縮を示すこともある。通常、両上肢は筋力低下などの自覚症状を欠いているが、腱反射は亢進していることが多い。重症例では呼吸障害に加えて上肢の著明な脱力をきたした例もある。約 7 割の症例に下肢優位の感覚障害を認めるが、運動障害に比して軽度であることが多

HTLV (ヒト T 細胞白血病ウイルス)

ATL (成人 T 細胞白血病)

HAM (HTLV-1 associated myelopathy ; HTLV-1 関連脊髄症)

ALS (筋萎縮性側索硬化症)

HBZ (HTLV-1 basic leucine zipper factor)

IFN (インターフェロン)

\*京都府立医科大学附属北部医療センター 病院長 / 京都府立医科大学大学院医療フロンティア展開学 教授 Masanori Nakagawa

い。胸髄に感覚障害のレベルを認めることがあるが、境界は不鮮明であることが多い。まれに、感覚障害が主症状である例もある。

一方、自律神経症状は高率にみられ、排尿困難、頻尿、便秘などの膀胱直腸障害は病初期より顕著であることが多い。下半身の発汗障害、起立性低血圧、インポテンツなども認められる。手指振戦、運動失調、眼球運動障害を示す例もある。まれに軽度の認知機能低下を占める例もある。若年発症例では低身長傾向がある。その他の HTLV-1 関連症候として、大脳白質変性症、肺炎炎、関節症、ぶどう膜炎、Sjögren 症候群、慢性甲状腺炎、糖尿病、偽性副甲状腺機能低下症、筋炎、魚鱗癬、末梢神経障害や、ATL の合併例も報告されている<sup>1) 5)</sup>。

抗 HTLV-1 抗体は、血清、髄液ともに陽性であり、診断上重要である。健常キャリアや ATL 患者に比して抗 HTLV-1 抗体価が高値である。また、HAM では HTLV-1 キャリアと比較して、末梢血リンパ球中の HTLV-1 プロウイルス量が增加していることも特徴である。末梢血所見では白血球数は軽度減少する傾向にあり、核の分葉化を示す異型リンパ球が散見される例があるが、ATL でみられるフラワー細胞はまれで、典型的なフラワー細胞の出現は ATL の合併を考える必要がある。

脳脊髄液では、軽度のタンパク、細胞数の増加がみられ、核の分葉化した異型リンパ球がみられる例もある。髄液中のネオプテリンや CXCL10 (IP10) は高く、活動性炎症を反映していると考えられ、その変動は病勢の把握に重要である<sup>4)</sup>。

脊髄 MRI では脊髄の局所的な病変を指摘できる例は比較的少ないが、脊髄の腫大や脊髄内異常信号を示す場合もある。長期経過例では胸髄全体が萎縮していることが多い。頭部 MRI T2 強調画像で大脳白質や橋に強信号域が散在してみられる例がある<sup>6)</sup>。電気生理学的検査では、下肢体性感覚

誘発電位 (SSEP) の中枢伝導障害の所見、傍脊柱筋の針筋電図で軽度の脱神経所見がみられるのが特徴的である。

#### 4. HAM の診断上の注意点

多発性硬化症、視神経脊髄炎、頸椎性脊髄症などとの鑑別に注意を要する。抗 HTLV-1 抗体価、HTLV-1 プロウイルス量、抗アクアポリン 4 抗体、電気生理学的検査所見が参考となる<sup>6) 7)</sup>。一般的に緩徐進行性であるが、ときに急速に進行する例がある。急速進行を示す HAM 患者の定義は、発症 2 年以内に両杖歩行レベル以上に悪化、または、3~6 カ月以内に納の運動障害重症度 (Osame's Motor Disability Score: OMDS) が 1 段階以上の悪化としている。

#### 5. 治療

HAM の治療として、副腎皮質ステロイド、IFN- $\alpha$  注射などが行われるが根治的な治療法はない。前述の急速進行例では副腎皮質ステロイド大量静注投与が有効な場合がある<sup>8)</sup>。痙攣に対してバクロフェン髄注 (ITB) 療法が保険適応となっているが、我々は HAM 患者 4 例に ITB 療法用ポンプの埋め込み術を行い、継続的リハビリを施行した。4 例ともに下肢痙攣および歩行の改善を認めた。ロボットスーツ HAL は CYBERDYNE 株式会社により開発された装着型動作支援機器で、OMDS 5 度以上の HAM 症例が HAL 装着歩行練習に適応していると考えている。現在、医師主導治療が進行中である。

HAM の治療において継続的リハビリは必須である。痙攣のコントロールと体幹筋の再教育・強化を行うことで体幹を円筒状に強化保持し、骨盤周囲筋の再教育・強化を行うことで足の振り出しがスムーズになり、リハビリ効果の向上に役立つと考えられる (図 2)<sup>9)</sup>。

ATL に対するヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体が認可されたが、CCR4 は HAM における感染細胞のマーカーとしても重要である。現在、ヒ

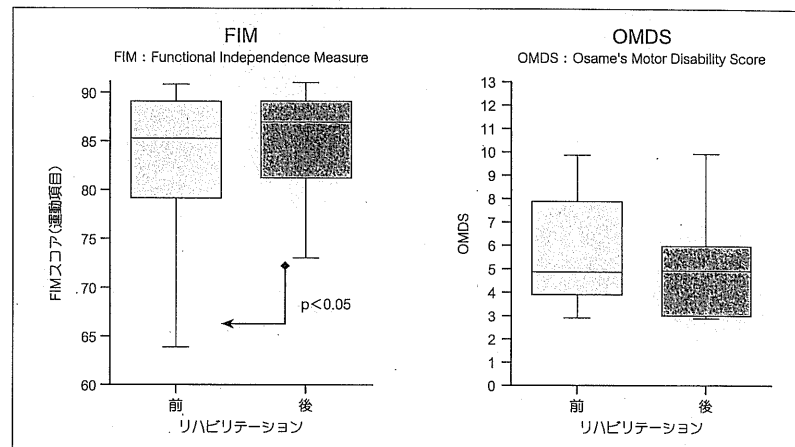


図2 HAM に対するリハビリ効果

HAM 症例 15 例 (男性 3 例, 女性 12 例) に 4 週間の集中リハビリを行った。FIM の有意な改善を認めた。HAM : HTLV-1 関連脊髄症, HTLV : ヒト T 細胞白血病ウイルス

(文献 9 より)

ト化抗 CCR4 モノクローナル抗体の HAM に対する安全性・有効性の医師主導治療が進行中である。HTLV-1 対策強化のひとつとして新たな厚生労働省研究班が組織され、全国的な HAM 患者登録事業 (HAM ねっと : HAM 患者登録サイト) がスタートし、すでに 460 名以上が登録されている (図 3)。

#### II HIV 感染症

厚生労働省エイズ動向委員会の報告では、2013 年の HIV (ヒト免疫不全ウイルス) 感染者と AIDS 患者をあわせた新規報告数は 1,590 件 (新規 HIV 感染者報告数 1,106 件, 新規 AIDS 患者報告数 484 件) で過去最多となっている。東京、大阪、名古屋の三大都市を含む地域からの報告数が多数 (約 83%) を占めている。凝固因子製剤によ

る感染例を除いた 2013 年末までの累計は、HIV 感染者 15,812 件, AIDS 患者 7,203 件で計 23,015 件となり、依然として増加傾向が続いている (図 4)。新規報告数の約 3 割が AIDS 発症時にはじめて HIV に感染していることが判明しており、AIDS 発症前に HIV 感染を早期発見することが重要である。

HIV 感染によって引き起こされる神経障害は NeuroAIDS と総称される。Combined antiretroviral therapy (cART) により全 NeuroAIDS の発症は大幅に減少したが、HIV 感染者の長期生存により HIV 関連神経認知障害 (HIV-associated neurocognitive disorders : HAND) のリスクが高まることが指摘されている<sup>10)</sup>。

#### 1. HIV 関連神経認知障害 (HAND)

これまで AIDS-dementia complex (ADC) と言

HIV (ヒト免疫不全ウイルス)

cART (combined antiretroviral therapy)

HAND (HIV-associated neurocognitive disorders ; HIV 関連神経認知障害)

ADC (AIDS-dementia complex)

SSEP (下肢体性感覚誘発電位)

OMDS (Osame's Motor Disability Score ; 運動障害重症度)

ITB (バクロフェン髄注)

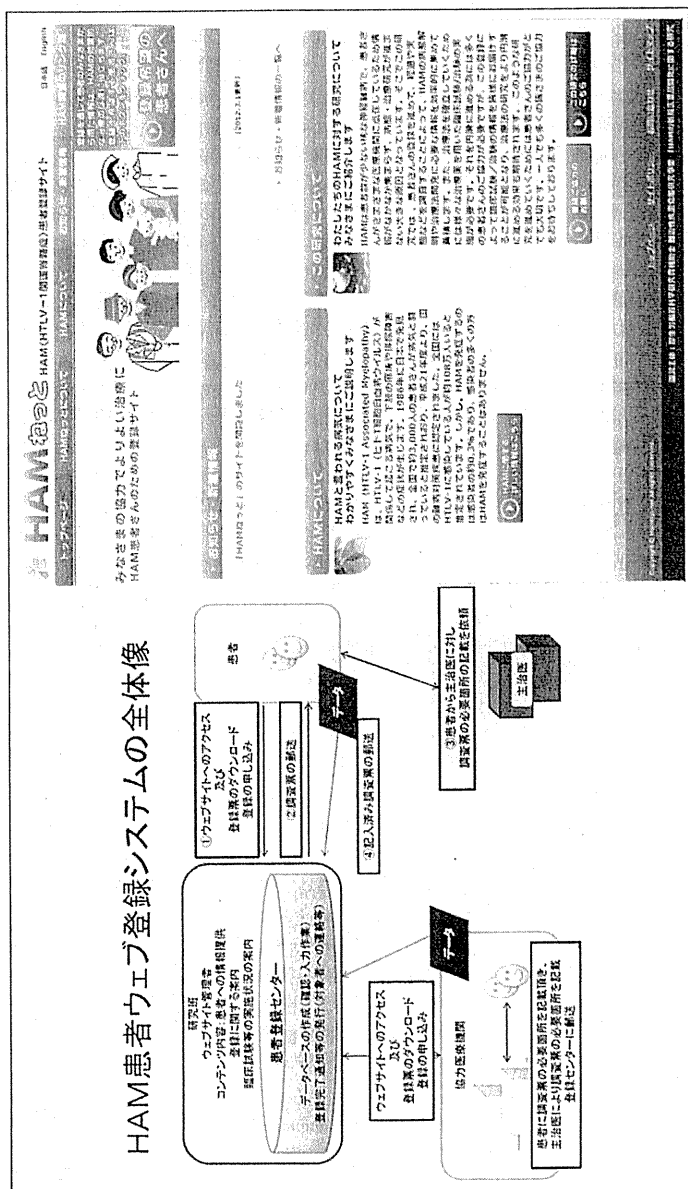


図3 HAM患者登録システム(左)とHAMねっと(右)  
このシステムは「HTLV-1関連症候群(HAM)の新規医薬品開発に関する研究」班(研究代表者聖マリアンナ医科大学・山野嘉久先生)によって運営されている。HAMねっと事務局は聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターにある。全国各地から460名以上の申込みあり。(HAMねっと事務局ウェブサイト<http://hamisp-net.com/>より筆者作成)

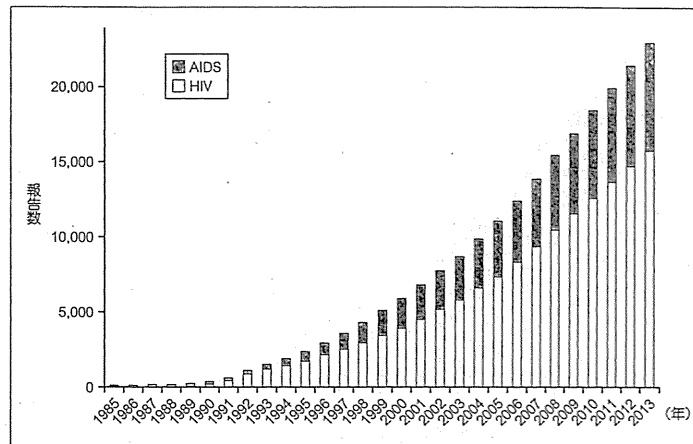


図4 HIV感染者およびAIDS患者の累計報告数

わが国では依然として、HIV感染者、AIDS患者ともに増加傾向が続いている。新規報告数の約3割がAIDS発症時にはじめてHIVに感染していることが判明しており、AIDS発症前にHIV感染を早期発見することが重要である。  
HIV：ヒト免疫不全ウイルス

(厚生労働省エイズ動向委員会ホームページより)

わけていたが、より広い概念としてHANDが提唱されている(図5)<sup>14)</sup>。HANDは、無症状のHIV感染者の約30%、AIDS患者の約50%にみられると言われ、European AIDS Clinical Society (EACS)がHIV-associated neurocognitive impairment (NCI)のガイドラインを2011年に発表している(<http://www.eacsociety.org/>)。HANDは、2つ以上の認知領域の機能低下(<1SD)はあるが日常生活に支障はない無症候性神経心理学的障害(asymptomatic neurocognitive impairment: ANI)、2つ以上の認知領域の機能低下(<1SD)と日常生活に軽度の障害がある軽度神経認知障害(HIV-associated mild neuro-

cognitive disorder: MND)、および、2つ以上の認知領域の顕著な低下(<2SD)と著しい機能障害を認めるHIV関連認知症(HIV-associated dementia: HAD)に分類される。HANDの発症要因として、HIV感染後の長期生存、中枢神経におけるHIV増殖と炎症反応の持続、抗ウイルス薬等の治療薬への累積曝露量、慢性炎症反応による血管障害の悪化、加齢にともなう疾患(高血圧症、脂質異常症など)、神経変性疾患の影響などが指摘されている。また、cARTの早期開始と認知機能の長期的な予防効果が問題となっている。

- EACS (European AIDS Clinical Society)
- NCI (HIV-associated neurocognitive impairment)
- ANI (asymptomatic neurocognitive impairment; 無症候性神経心理学的障害)
- MND (HIV-associated mild neurocognitive disorder; 軽度神経認知障害)
- HAD (HIV-associated dementia; HIV関連認知症)

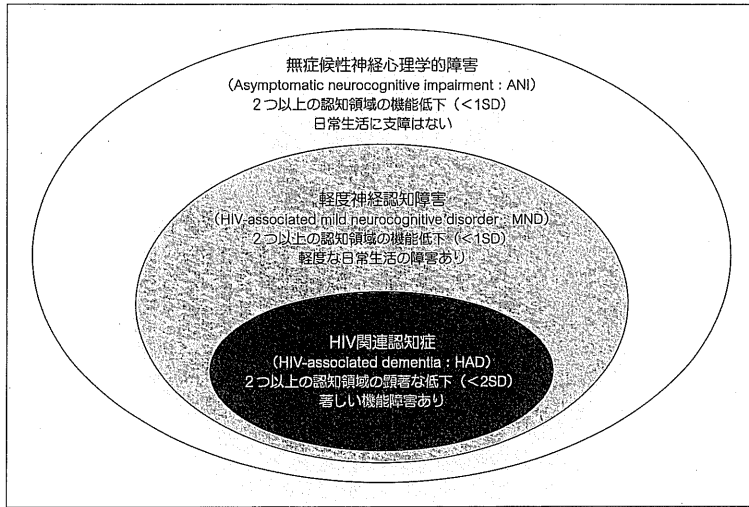


図5 HIV関連神経認知障害 (HIV-associated neurocognitive disorders: HAND) の概念図  
 Combined antiretroviral therapy (cART) により HIV 感染者の免疫機能は改善し, HAD は減少したが, ANI, MND が大きな問題として残っている。  
 HIV: ヒト免疫不全ウイルス

(文献 11 より筆者作成)

2. AIDS 脳症の病態

AIDS 脳症の病態には脳内血管周囲に存在する HIV-1 感染マクロファージとミクログリアが重要な役割を担っている。AIDS 脳症の脳より検出される HIV ウイルスは CCR5 をコレセプターとするマクロファージ指向性 HIV であり, 神経細胞やオリゴデンドログリアへの直接の感染増殖はなく, 間接的細胞障害がその病態の中心であると考えられている (図 6)<sup>10)</sup>。血管周囲にみられるマクロファージは, CD163, CD68, CD387 陽性であり, HIV を産生している細胞もある。これらのマクロファージからアストロサイトへ HIV が感染していくと考えられる。

AIDS 脳症の病理像として, 多核巨細胞をとまなう HIV 脳炎と大脳皮質の神経変性病態が知ら

れている<sup>19)</sup>。HIS (human immune system)-HIV マウスモデル(ヒト-マウスキメラモデル)などのエイズ脳症マウスモデルの開発を通じた病態説明が期待される<sup>12)</sup>。

3. HAND の臨床症状

初期症状として, 注意力・集中力の低下, 健忘, 思考・問題処理能力の低下, 無気力, 興味の喪失, 気分障害などがみられる。症状の進行にともない, 幻覚, 妄想, 気分の変動などの多様な精神症状を合併することもある。さらに, 歩行障害, 振戦, 巧緻運動障害などがみられるようになり, 末期には広範な認知機能障害を示し, 植物状態となる<sup>14)</sup>。

4. 高次脳機能評価バッテリーと神経画像所見  
 HIV 感染者の高次脳機能評価法として国際的

HIS (human immune system)

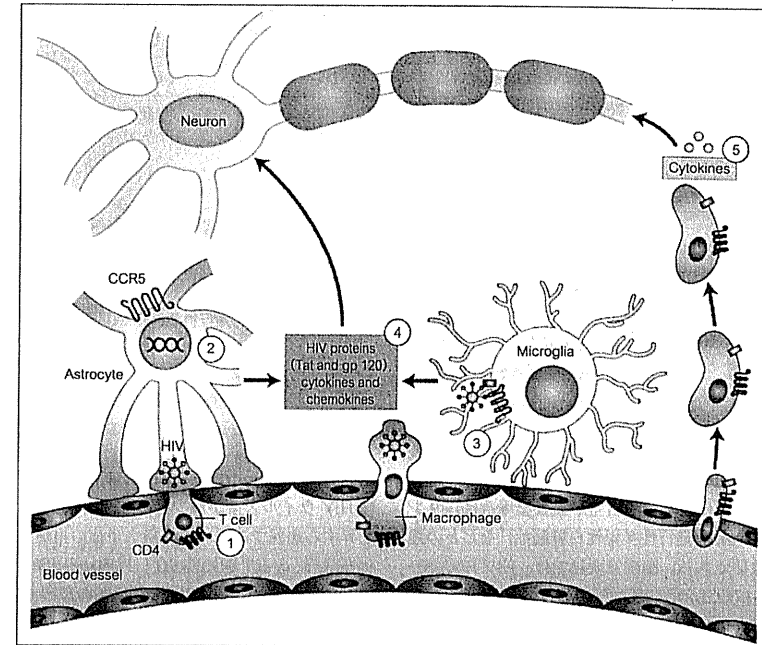


図6 推定される HAND の発症メカニズム

①感染 T 細胞とアストロサイトの直接的接触によるウイルスシナプスを介した HIV の感染, ②アストロサイトに感染した HIV はゲノムに取り込まれ潜在化, ③ HIV 感染マクロファージは感染初期に脳内に侵入し, HIV は CD4/CCR5 複合体に結合し, 血管周囲のマクロファージやミクログリアに感染, ④ HIV 感染マクロファージやアストロサイトは神経障害性物質 (Tat, gp120, サイトカイン, ケモカイン) を放出し, 間接的に神経細胞を傷害, ⑤中枢神経における持続的な HIV の増殖は活性化された T 細胞の侵入を促進する。侵入した T 細胞から神経障害性の炎症性サイトカインが放出される。

HAND: HIV 関連神経認知障害, HIV: ヒト免疫不全ウイルス

(文献 12 より改変)

HIV 認知症スケール (IHDS) があるが, HAND の初期状態を評価するには難点がある。

我々は IHDS に, 遂行機能, 注意, 視空間能力, 言語機能, 総合認知機能を評価する検査法を組み合わせた評価バッテリーを作成した (表 1)<sup>10)</sup>。自験例での検討では, HIV 感染者群では, RCMT,

ROCFT (Raven's Matrices, Rey-Osterrieth complex figure test) の再生, 数唱, 符号問題で低下が目立ち, 記憶, 注意, 遂行機能の障害が示唆された。

頭部 MRI では, 進行性の全般的な脳萎縮, 左右対称性の白質病変を認める。脳血流 SPECT では,

IHDS (国際的 HIV 認知症スケール)

RCMT (Raven's Matrices)

ROCFT (Rey-Osterrieth complex figure test)

表1 HIV感染者用の高次脳機能評価バッテリー (所要時間 約50分間)

① IHDS (国際的 HIV 痴呆スケール)
② Raven's Matrices (遂行機能)
③ Rey-Osterrieth complex figure test (記憶)
④ 数唱 (記憶, 注意)
⑤ 符号問題 (複雑注意能力)
⑥ Draw a Clock Test (視空間能力)
⑦ Word Fluency Test (言語機能)
⑧ Mini Mental State Examination (MMSE) (総合認知機能)

HIV感染者の高次脳機能評価法として、IHDSに遂行機能、注意、視空間能力、言語機能、総合認知機能を評価する検査法を組み合わせた評価バッテリーを作成した。HIV感染者群では、記憶、注意、遂行機能の障害が示唆された。

HIV: ヒト免疫不全ウイルス

(文献15より)

前頭葉、頭頂葉の軽度血流低下を認めることが多い。神経画像所見の左右差が顕著な場合は、リンパ腫、PML (進行性多巣性白質脳症) などとの鑑別が重要である。脳髄液所見では、HIV RNA 量、MCP-1 (CCL2), CXCL2 (IP10), ネオプテリン,  $\beta$ 2ミクログロブリン, キノリン酸, 腫瘍壊死因子, マトリックスメタロプロテアーゼなどがHANDの重症度に応じて上昇する。ニューロフィラメント軽鎖, タウタンパク, 14-3-3タンパクなども上昇しており、治療効果の指標として利用できる<sup>19)</sup>。

#### 5. HANDの治療法

病初期からの治療開始が必要であり、CD4陽性Tリンパ球数が $350/\mu\text{L}$ より多い段階での治療開始が推奨されている。服薬率100%を目標に基本的に生涯にわたって継続する。中枢神経系(CNS)への移行度と有効性(CPE: CNS penetration-effectiveness)に基づいて抗HIV薬の分類がなされている(表2)<sup>17)</sup>。

#### 6. 免疫再構築症候群とAIDS脳症

免疫再構築症候群 (immune reconstitution in-

flammatory syndrome: IRIS) は、cART開始後にHIVウイルス量が減少し、CD4陽性T細胞が上昇する過程で見られる感染・炎症の再燃・顕在化を言う。cART開始後60日以内にIRISを発症することが多い。cART中の35%の患者がIRISを発症し、中枢神経系のIRISは1.0%弱のcART中患者にみられるとの報告がある。IRISに対して副腎皮質ステロイドの投与が有効な場合もあるが死に至ることも多く、IRISの病態解明がNeuroAIDSの治療において重要な課題である<sup>18)</sup>。

#### 7. 神経系日和見感染症

HIV感染者の神経系日和見感染症は1/千人程度の頻度で見られ、PML: 0.7/千人、トキソプラズマ脳炎: 0.4/千人、クリプトコックス髄膜炎: 0.2/千人との報告がある(重複感染あり)。HIV関連の神経系日和見感染症はCD4陽性T細胞数が200細胞/ $\mu\text{L}$ 以下になった場合に顕在化しやすいが、IRISとの鑑別などに難渋することもまれではない。その診断と治療に関するアルゴリズムが提案されている<sup>19)</sup>。

PML (進行性多巣性白質脳症) CNS (中枢神経系)  
CPE (CNS penetration-effectiveness)  
IRIS (immune reconstitution inflammatory syndrome; 免疫再構築症候群)

表2 中枢神経系への移行度と有効性 (CPE: CNS penetration-effectiveness) に基づく抗HIV薬のランク付け

CPE スコア	0	0.5	1
核酸系逆転写酵素阻害剤	ジダノシン テノホビル ザルシタピン アデホビル	エムトリシタビン ラミブジン サニルブジン	アバカビル ジドブジン
非核酸系逆転写酵素阻害剤		エファビレンツ	テラビルジン ネビラピン
プロテアーゼ阻害剤 /r	ネルフィナビル リトナビル サキナビル サキナビル/r チプラナビル/r	アンブレナビル アタザナビル ホスアンブレナビル インジナビル	アンブレナビル アタザナビル/r ホスアンブレナビル/r インジナビル/r ロピナビル/r
エントリー阻害薬	エンフュービルタイド T-1249		マラビロク ビクリビロク
インテグラーゼ阻害剤		ラルテグラビル エルビテグラビル	

/r: リトナビル含有

抗HIV薬の化学特性、髄液中濃度、治療効果などに基づいて、抗HIV薬のランク付け(CPEスコア)がなされている。CPEスコア: 0 (low), 0.5 (intermediate), 1 (high)。

CNS: 中枢神経系, HIV: ヒト免疫不全ウイルス

(文献17より改変)

#### 8. HIV関連脊髄症

HIV関連脊髄症はvacuolar myelopathyとも言われ、側索・後索にマクロファージの活性化と空胞変化が顕著である。臨床的には緩徐進行性の痙性対麻痺で、感覚性運動失調、神経因性膀胱を合併することが多い。海外ではAIDS患者の5~10%に臨床症状が認められ、剖検例の50%に認めると言われている<sup>20)</sup>。わが国のAIDS患者ではその頻度は低く、剖検例でも10%以下である。HTLV-1, 梅毒, 結核, サイトメガロウイルス, ヘルペスウイルスなどによる脊髄炎との鑑別が必要である。

#### 9. HIV関連末梢神経障害

HIV感染にともなう末梢神経障害として、多発

脳神経炎, 慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP), 感覚優位多発神経炎などがある。HIV関連感覚優位多発神経炎 (HIV-SN) はHIV自体に関連した多発神経炎とHIV治療にともなう薬剤性末梢神経障害が含まれるが、両者の鑑別は困難なことが多い。

HIV-SNは“痛み”または“不快な異常感覚”が特徴であり、歩行時や夜間に悪化する。神経伝導検査では軸索性感覚神経障害を認める。現時点ではHIV-SNに対する有効な治療法はないが、適切なcARTの使用と免疫療法 (IVIg [免疫グロブリン大量点滴静注療法], 副腎皮質ステロイドなど) が有効な場合がある<sup>21)</sup>。

CIDP (慢性炎症性脱髄性多発根神経炎)  
IVIg (免疫グロブリン大量点滴静注療法)

HIV-SN (HIV関連感覚優位多発神経炎)

## &lt;謝 辞&gt;

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(エイズ研究事業)「NeuroAIDSの発症病態と治療法の開発を目指した長期フォローアップ体制の構築に関する研究(H18-エイズ-一般-009)」, 同(難治性疾患克服研究事業)「重症度別治療指針作成に資すHAMの新規バイオマーカー同定と病因細胞を標的とする新規治療法の開発」班, および, 同「HTLV-1関連脊髄症(HAM)の新規医薬品開発に関する研究」班の助成を受けて行われた。

## 文 献

- 1) Osame M, Matsumoto M, Usuku K, et al: Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to HTLV-I and adult T-cell leukemia-like cells. *Ann Neurol* 21:117-122, 1987.
- 2) Satake M, Yamaguchi K, Tadokoro K: Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. *J Med Virol* 84: 327-335, 2012.
- 3) 出雲周二, 松崎敏男, 久保田龍二: HAMの新しい展開. *神経内科* 75: 369-373, 2011.
- 4) Ando H, Sato T, Tomaru U, et al: Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain* 136 (Pt 9): 2876-2887, 2013.
- 5) 納光弘, 宇宿功市郎, 梅原藤雄ほか: HAMの病態と治療. *日本内科学会雑誌* 92:1673-1682, 2003.
- 6) 梅原藤雄: HAMの臨床的多様性. *神経内科* 75: 374-379, 2011.
- 7) Koga M, Takahashi T, Kawai M, et al: Neuro-myelitis optica with HTLV-1 infection: different from acute progressive HAM? *Intern Med* 48: 1157-1159, 2009.
- 8) 山野嘉久, 佐藤知雄: 免疫性神経疾患—基礎・臨床研究の最新知見—HTLV-1関連脊髄症(HAM)の病態・治療とバイオマーカー. *日本臨床* 71 (5): 870-875, 2013.
- 9) 武澤信夫, 奥田求己, 中川正法: HAMのリハビリテーション. *神経内科* 75: 393-401, 2011.
- 10) Croucher A, Winston A: Neurological complications of HIV. *Medicine* 41 (8) 450-455, 2013.
- 11) Antinori A, Arendt G, Becker JT, et al: Updated research nosology for HIV-associated neurocognitive disorders. *Neurology* 69: 1789-1799, 2007.
- 12) Jaeger LB, Nath A: Modeling HIV-associated neurocognitive disorders in mice: new approaches in the changing face of HIV neuropathogenesis. *Dis Models Mechanisms* 5:313-322, 2012.
- 13) Xing HQ, Hayakawa H, Gelpi E, et al: Reduced expression of excitatory amino acid transporter 2 and diffuse microglial activation in the cerebral cortex in AIDS cases with or without HIV encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 68: 199-209, 2009.
- 14) 三浦義治, 岸田修二: HIV感染に伴う神経疾患. *Brain and Nerve* 65: 275-281, 2013.
- 15) 中川正法: HIV感染と神経合併症. *Clinical Neuroscience* 28: 331-334, 2010.
- 16) Schouten J, Cinque P, Gisslen M, et al: HIV-1 infection and cognitive impairment in the cART era: a review. *AIDS* 25:561-575, 2011.
- 17) Spudich S, González-Scarano F: HIV-1-related central nervous system disease: current issues in pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a007120, 2012.
- 18) Zaffiri L, Verma R, Struzzi K, et al: Immune reconstitution inflammatory syndrome involving the central nervous system in a patient with HIV infection: a case report and review of literature. *New Microbiologica* 36: 89-92, 2013.
- 19) Tan IL, Smith BR, von Geldern G, et al: HIV-associated opportunistic infections of the CNS. *Lancet Neurol* 11: 605-617, 2012.
- 20) McArthur JC, Brew BJ, Nath A: Neurological complications of HIV infection. *Lancet Neurol* 4: 543-555, 2005.
- 21) Centner CM, Bateman KJ, Heckmann JM: Manifestations of HIV infection in the peripheral nervous system. *Lancet Neurol* 12: 295-309, 2013.

# 幹細胞研究と神経変性

大原 亮<sup>a)</sup> 水野敏樹<sup>b)</sup> 中川正法<sup>c)</sup> 井上治久<sup>d)</sup>

a) OHARA Ryo/京都大学 iPS 細胞研究所, 京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学  
 b) MIZUNO Toshiki/京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学  
 c) NAKAGAWA Masanori/京都府立医科大学大学院医学研究科神経内科学, 京都府立医科大学附属北部医療センター  
 d) INOUE Haruhisa/京都大学 iPS 細胞研究所, JST CREST

2006年, ES細胞と同様に多分化能を持つ人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) とその作製技術が発見されて以来, 患者自身の iPS 細胞による, 神経変性疾患病態モデル研究が多数報告されている。これまで困難であった患者自身の中枢神経などの疾患細胞を得ることが可能となり, 神経変性疾患の病態解明, 創薬研究において非常に有用なツールとして期待される。

## はじめに

2006年にマウス<sup>1)</sup>, 2007年にヒト<sup>2)</sup>で, 胚性幹細胞 (embryonic stem cells: ES 細胞) に発現する遺伝子 *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の皮膚線維芽細胞への導入によって, ES 細胞と同様に, 無限に増殖し, 多分化能を有する人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) が誕生した。iPS 細胞を経ることにより, 患者自身の中枢神経系の細胞を得ることが可能となり, 患者 iPS 細胞は神経変性疾患の病態解明, 創薬研究において新たな疾患解析ツールとして期待されている。本稿では, 現在までの iPS 細胞とその作製技術を用いた神経変性疾患研究を紹介し, 今後の展望, 可能性について述べる。

**Key words**  
 ● iPS 細胞  
 ● 神経変性疾患  
 ● 病態解明  
 ● 創薬研究

## 1 IPS 細胞技術の歴史

1998年にヒト胚盤胞の内部細胞塊より, 多分化能を有し, かつ無限に増殖するヒト ES 細胞が初めて樹立された<sup>3)</sup>。ES 細胞はさまざまな細胞, 組織に分化誘導させることができ, 神経細胞など, これまでヒトの生体から得ることが困難であった試料を得ることが可能となった。これにより, 従来治療困難であった難治性疾患が将来的に治療可能になることが期待された。しかし, ES 細胞は受精卵から作製すること, 移植においては拒絶反応を生じ得る, という課題を有していた。山中伸弥博士らは, 2006年にマウス<sup>4)</sup>, 2007年にヒトで<sup>5)</sup>, ES 細胞に発現している4つの遺伝子 *Oct3/4* (POU domain, class5, transcription factor 1: *Pou5f1*), *Sox2* (SRV-related HMG box 2), *c-Myc*, *Klf4* (Krüppel-like

# 8

family of transcription factor 4) を体細胞に導入することで, ES 細胞のように無限に増殖し, 多分化能を有する iPS 細胞を樹立した。また, ES 細胞研究で確立されていた神経細胞, 心筋細胞などさまざまな細胞への分化誘導方法が, iPS 細胞にも適用できることが判明した<sup>6)</sup>。脳, 脊髄などの中枢神経は一般に再生が困難であり, 剖検例のサンプル以外に患者自身の神経系細胞は入手困難で, 神経変性疾患研究において疾患に罹患する細胞の入手は大きな障壁であった。そのため, 神経変性疾患の生化学的研究においては, 従来, 細胞株・動物モデルを用いた病態解析が行われてきたが, 必ずしも神経変性疾患の病態を反映していない場合があることが知られている<sup>7)</sup>。神経変性疾患の患者自身の体細胞から作製した iPS 細胞由来の神経系細胞を用いることで, 患者の遺伝情報を有した神経

細胞を用いた病態解析が可能となった。このように, iPS 細胞とその作製技術は, 神経変性疾患の病態解明, 創薬研究, 再生医療への重要なツールとして期待されている (図1)。

## 2 神経分化誘導

神経変性疾患病態を培養皿の中で再現するには, 各疾患における病変部位となる標的細胞への iPS 細胞からの分化誘導法の確立が重要である。以前から PA6 細胞などのストローマ細胞 (骨髄支持細胞) との共培養<sup>8)</sup> や, 胚様体 (embryoid body: EB) と呼ばれる凝集体から, ES 細胞を用いたさまざまな種類の神経細胞への分化誘導法がある<sup>9)</sup>。さらに, フィーダーを用いない feeder-free 培養で, 骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein:

BMP) シグナルの抑制因子である Noggin や SB431542 を用いることにより, ES 細胞や iPS 細胞からより効率的に神経前駆細胞へ分化誘導できる<sup>10)</sup>。現在, より簡便で高効率な神経分化誘導法の開発が進んでいる。また, 各疾患の標的細胞への分化については, レチノイン酸や sonic hedgehog (Shh) の添加により, 神経前駆細胞から脊髄運動神経細胞<sup>11)</sup>, Shh や Wnt8 の添加により中脳ドパミン神経細胞<sup>12)</sup> へ, そのほか, 前脳型コリン作動性神経細胞<sup>13)</sup>, 神経嗅細胞<sup>14)</sup>, アストロサイト<sup>15)</sup>, オリゴデンドロサイト<sup>16)</sup> などへの分化が報告されている。このように, さまざまな種類の神経系細胞への分化誘導法が確立され, 培養皿の中で神経変性疾患病態を再現する疾患モデルが構築されるようになった。

## 患者 iPS 細胞を用いた神経変性疾患病態モデル

2007年にヒト iPS 細胞樹立の報告がされた後, 2008年に Dimos らによって, 初めて患者由来 iPS 細胞が樹立された。彼らは, *SOD1* (Cu/Zn superoxide dismutase) 変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) の患者の皮膚線維芽細胞から, 患者自身の遺伝情報を保持した iPS 細胞を樹立し, 運動神経細胞へ分化誘導した<sup>17)</sup>。また, 同年, Park らは孤発性パーキンソン病, Duchenne 型・Becker 型筋ジストロフィー, ハンチントン病などの多種の患者由来 iPS 細胞を樹立した<sup>18)</sup>。

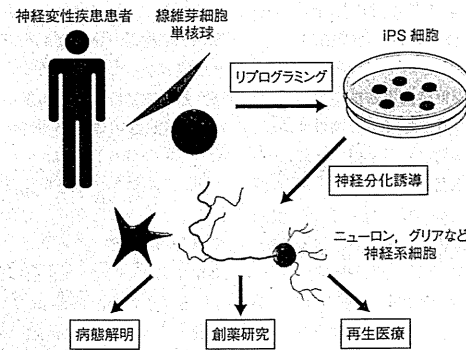


図1 iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究

その後、2009年にEbertらは、遺伝性神経変性疾患である脊髄性筋萎縮症(spinal muscular atrophy:SMA)の患者からiPS細胞を作製し、運動神経細胞に分化し、その表現型を解析し、iPS細胞を用いた初めての薬剤効果評価系を示した<sup>19)</sup>。彼らは、SMNI遺伝子異常が原因であるSMA患者由来のiPS細胞ではSMN(survival motor neuron)蛋白質の低下を、また分化誘導した運動神経細胞では、運動神経細胞の数が減少し、その細胞体サイズが小さいこと、バルプロ酸の投与により回復することを示した。この結果から、患者由来iPS細胞がこれまで採取困難であった難治性神経疾患患者自身の生体試料として、難治性疾患の病態解明、薬効評価に有用なツールになり得ることが初めて示された。

その後、さまざまな神経変性疾患で患者由来iPS細胞を用いた研究結果が報告されている。これまで、アルツハイマー病、ALS、パーキンソン病、SMA、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、Rett症候群、ダウン症候群、統合失調症、Dravet症候群、Cockayne症候群、脆弱X症候群、家族性自律神経失調症、Machado-Joseph病、副腎白質ジストロフィーなどが報告されている(表1)。これらのうち代表的なALS、アルツハイマー病、パーキンソン病に関する研究について述べる。

1. 筋萎縮性側索硬化症(ALS)

2011年にNetoらが、VAPB(vesicle-associated membrane protein-associated protein B)遺伝子変異の家族

性ALSの患者由来のiPS細胞を樹立し、運動神経細胞に分化誘導し、運動神経細胞を含む細胞群でVAPBの発現低下を確認した<sup>19)</sup>。2012年、われわれやBilicanらがTDP-43(transactive response DNA binding protein 43kDa)遺伝子変異のALS患者由来のiPS細胞を樹立し、運動神経細胞を分化誘導し、培養皿の中で病態再現を行った<sup>19,20)</sup>。われわれは、異なる3種類のTDP-43変異を有する3名のALS患者からiPS細胞を作製したところ、ALS iPS細胞の運動神経細胞への分化能力の低下は認めなかったが、フローサイトメトリーを用いて純化したALS iPS細胞由来運動神経細胞(ALS運動神経細胞)は、形態学的に神経突起が短縮することを示した。また、ALS運動神経細胞では細胞骨格に関する遺伝子群の発現低下、RNA代謝に関する遺伝子群の発現上昇を認めた。さらにアナカルジン酸の投与により、いくつかの表現型が改善した。生化学的にはALSでは不溶性TDP-43量が増加し、ハイコンテントアナリシスで細胞質内でのTDP-43の凝集体の数の増加を見出した。

AlamiらはALS運動神経細胞を用い、TDP-43がmRNP(messenger ribonucleoprotein)顆粒を形成し、微小管依存性の軸索輸送により特定のmRNAを軸索遠位部に運搬することを示した。また、異なる3種類のTDP-43変異を有する3名のALS患者からiPS細胞を樹立し、運動神経細胞へ分化誘導を行い、健康者運動神経細胞と比べ、mRNAの順行性軸索輸

送が障害されることを示した。この結果からTDP-43によるmRNAの軸索輸送障害がALS発症の一因である可能性が考えられた<sup>20)</sup>。

また、Kiskinisらは、遺伝子修復技術やRNAシーケンスなどの新たな技術を用い、SODI変異を有する家族性ALS運動神経細胞の詳細な解析を行った<sup>20)</sup>。この実験においては、コントロールと比較し、SODI変異を有するALS運動神経細胞は細胞死を生じやすいこと、細胞体サイズが小さいこと、プロテアソーム阻害薬であるMG132投与下で不溶性SODIを認めること、免疫染色でSODIの凝集体が観察されることが示された。

さらに、RNAシーケンス解析で、細胞骨格、転写調節、モーター蛋白に関連する遺伝子群の発現上昇、またミトコンドリア機能および形態、蛋白翻訳に関連する遺伝子群の発現低下が認められた。小胞体ストレス応答(unfolded protein response:UPR)の経路であるpEIF2 $\alpha$ (phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 2 subunit  $\alpha$ )やXBP1(X-box binding protein 1)の発現がSODI変異運動神経細胞では有意に上昇しており、小胞体ストレスがSODI変異ALSの病態の一因である可能性が示された。また、Waingerらは、SODI変異を有するALS運動神経細胞では電気生理学的な興奮性が亢進している<sup>20)</sup>ことを明らかにした。これらの結果から、SODI変異ALSの病態として、小胞体ストレスによりUPRが活性化し、細胞死が生じ、また小胞体ストレ

表1 患者iPS細胞を用いた神経変性疾患関連モデル研究

疾患	原因遺伝子	表現型	文献
アルツハイマー病	APP 孤発例	細胞内A $\beta$ オリゴマー蓄積 $\uparrow$ 、細胞外A $\beta$ 42/40 $\uparrow$ 、小胞体ストレス $\uparrow$ ・酸化ストレス $\uparrow$ 、神経細胞死	Kondo T et al : Cell Stem Cell 12 : 487-496, 2013
アルツハイマー病	APP 孤発例	細胞外A $\beta$ 40 $\uparrow$ 、タウリン酸化 $\uparrow$ 、GSK-3 $\beta$ 活性化	Isreali MA et al : Nature 482 : 216-220, 2012
アルツハイマー病	PS1 PS2	細胞外A $\beta$ 42/40 $\uparrow$	Yagi T et al : Hum Mol Genet 20 : 4530-4539, 2011
ダウン症候群	Trisomy 21	細胞外A $\beta$ 42/40 $\uparrow$ 、線維状A $\beta$ 沈着、タウリン酸化 $\uparrow$	Shi Y et al : Sci Transl Med 4 : 124ra29, 2012
ダウン症候群	Trisomy 21	大脳皮質神経細胞でシナプス活動性 $\downarrow$	Weick JP et al : Proc Natl Acad Sci U S A 110 : 9962-9967, 2013
筋萎縮性側索硬化症	SODI C9orf72	運動神経細胞細胞体の小型化、細胞死 $\uparrow$ 、SODI凝集 $\uparrow$ 、細胞骨格、転写調節、モーター蛋白関連遺伝子発現 $\uparrow$ 、ミトコンドリア形態・機能、蛋白翻訳関連遺伝子発現 $\downarrow$ 、小胞体ストレス $\uparrow$ 、UPR活性化(リン酸化ELF2 $\alpha$ $\uparrow$ 、XBP1 $\uparrow$ )	Kiskinis E et al : Cell Stem Cell 14 : 781-795, 2014
筋萎縮性側索硬化症	TDP-43	TDP-43によるmRNA軸索輸送障害	Alami NH et al : Neuron 81 : 536-543, 2014
筋萎縮性側索硬化症	SODI	運動神経細胞での電気生理学的興奮性 $\uparrow$	Wainger BJ et al : Cell Rep 7 : 1-11, 2014
筋萎縮性側索硬化症	TDP-43	TDP-43凝集体数 $\uparrow$ 、TDP-43不溶性 $\uparrow$ 、運動神経細胞神経突起の短縮、運動神経細胞脆弱性 $\uparrow$	Egawa N et al : Sci Transl Med 4 : 145ra104, 2012
筋萎縮性側索硬化症	TDP-43	TDP-43不溶性 $\uparrow$ 、神経細胞死	Bilican B et al : Proc Natl Acad Sci U S A 109 : 5803-5808, 2013
筋萎縮性側索硬化症	TDP-43	TDP-43不溶性 $\uparrow$ 、アストロサイト細胞死	Serio A et al : Proc Natl Acad Sci U S A 110 : 4697-4702, 2013
筋萎縮性側索硬化症	孤発性	運動神経細胞・大脳皮質神経細胞でTDP-43核内凝集体	Burkhardt MF et al : Mol Cell Neurosci 56 : 355-364, 2013
筋萎縮性側索硬化症	SODI	樹立のみ	Dimos JT et al : Science 321 : 1218-1221, 2008
筋萎縮性側索硬化症	C9orf72	運動神経細胞細胞質内にGGGGCCの反復配列を持つRNA凝集体、細胞質内にrepeat-associated non-ATG initiated translation (RAN)翻訳産物p62の活性 $\uparrow$ 、オートファジー阻害薬による細胞ストレス過敏性の亢進	Almeida S et al : Acta Neuropathol 126 : 385-399, 2013
筋萎縮性側索硬化症	C9orf72	運動神経細胞細胞質内にGGGGCCの反復配列を持つRNA凝集体、細胞質内にRAN翻訳産物ADAR2がRNA凝集体に結合、反復配列に対するアンチセンスオリゴゴにより運動神経細胞のグルタミン脆弱性 $\downarrow$	Donnelly CJ et al : Neuron 80 : 415-428, 2013
筋萎縮性側索硬化症	C9orf72	運動神経細胞細胞質内にGGGGCCの反復配列を持つRNA凝集体、DPP6など膜興奮性に関する遺伝子群の発現が変化、持続性spike発火 $\downarrow$ 、反復配列に対するアンチセンスオリゴゴにより表現型が改善	Sareen D et al : Sci Transl Med 5 : 208ra149, 2013
脊髄性筋萎縮症	SMNI	運動神経細胞誘導効率低下、神経細胞体の小型化	Ebert AD et al : Nature 457 : 277-280, 2009
脊髄性筋萎縮症	SMNI	運動神経細胞細胞体の小型化、神経突起の短縮、細胞数の減少、神経細胞死 $\uparrow$	Sareen D et al : PLoS One 7 : e39113, 2012



疾患	原因遺伝子	表現型	文献
球脊髄性筋萎縮症	androgen receptor CAG repeat	アンドロゲン受容体凝集亢進 (dihydrotestosterone 負荷時)	Nihei Y et al : J Biol Chem 288 : 8043-8052, 2013
パーキンソン病	LRRK2 孤発例	$\alpha$ -シヌクレインの蓄積 ↑, 神経突起の短縮, 活性型カスパーゼ3 ↑, オートファジークリアランスの障害	Sánchez-Danés A et al : EMBO Mol Med 4 : 380-395, 2012
パーキンソン病	PINK1 Parkin	プロジェリン強制発現により細胞死 ↑, 神経突起の短縮化, リン酸化 Akt ↓	Miller JD et al : Cell Stem Cell 13 : 691-705, 2013
パーキンソン病	SNCA	細胞内・外で $\alpha$ -シヌクレイン ↑	Devine MJ et al : Nat Commun 2 : 440, 2011
パーキンソン病	SNCA	$\alpha$ -シヌクレイン ↑, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 負荷時 活性型カスパーゼ3 ↑	Byers B et al : PLoS One 6 : e26159, 2011
パーキンソン病	Parkin	酸化ストレス ↑, ドパミン放出 ↑, 取り込み ↓	Jiang H et al : Nat Commun 3 : 668, 2012
パーキンソン病	Parkin	$\alpha$ -シヌクレインの蓄積, 酸化ストレス ↑, ミトコンドリア形態異常, ミトコンドリア恒常性の障害	Imaizumi Y et al : Mol Brain 5 : 35, 2012
パーキンソン病	PINK1	Parkinのミトコンドリア局在変化, ミトコンドリアコピー数 ↑, PGC1- $\alpha$ の発現 ↑	Seibler P et al : J Neurosci 31 : 5970-5976, 2011
パーキンソン病	PINK1	バリノマイシン誘発性, マイトファジー障害	Rakovic A et al : J Biol Chem 288 : 2223-2237, 2013
パーキンソン病	PINK1 LRRK2	ROS ↑ (バリノマイシン投与時), ミトコンドリア呼吸機能異常, ミトコンドリアプロトンリーク ↑ (PINK1 変異), ミトコンドリア軸索輸送障害 (LRRK2 変異)	Cooper O et al : Sci Transl Med 4 : 141ra90, 2012
パーキンソン病	LRRK2	神経突起の短縮, $\alpha$ -シヌクレイン ↑, タウ ↑, リン酸化 ERK ↑, 活性型カスパーゼ3 ↑ (6-OHDA, ロレノン負荷時)	Reinhardt P et al : Cell Stem Cell 12 : 354-367, 2013
副腎白質ジストロフィー	ABCD1	オリゴデンドロサイトで極長鎖脂肪酸 ↑	Jang J et al : Ann Neurol 70 : 402-409, 2011
家族性自律神経失調症	IKBKAP	神経細胞でスライニング変化, 遊走能低下	Lee G et al : Nature 461 : 402-406, 2009
家族性自律神経失調症	IKBKAP	IKBKAP 発現低下	Lee G et al : Nat Biotechnol 30 : 1244-1248, 2012
ハンチントン病	Huntingtin CAG repeat	細胞死 ↑	Zhang N et al : PLoS Curr 2 : RRN1193, 2010
ハンチントン病	Huntingtin CAG repeat	ライソソーム活性 ↑	Camnasio S et al : Neurobiol Dis 46 : 41-51, 2012
ハンチントン病	Huntingtin CAG repeat	活性型カスパーゼ3 ↑, ミトコンドリア最大呼吸 ↑, 細胞死 ↑ (神経栄養因子除去)	An MC et al : Cell Stem Cell 11 : 253-263, 2012
ハンチントン病	Huntingtin CAG repeat	リピート数の増加で細胞死 ↑, 活性型カスパーゼ3 ↑ (神経栄養因子除去)	The HD iPSC Consortium : Cell Stem Cell 11 : 264-278, 2012
マシヤド・ジョセフ病	ATXN3 CAG repeat	ATXN3 不溶性凝集 (グルタミン酸刺激過剰興奮時)	Koch P et al : Nature 480 : 543-546, 2011
コケイン症候群	ERCC6	iPS 細胞で ROS 産生 ↑, 細胞死 ↑	Andrade LN et al : Hum Mol Genet 21 : 3825-3834, 2012
ドラベ症候群	SCNA1A	GABA 神経発火頻度低下	Higurashi N et al : Mol Brain 6 : 19, 2013
脆弱X症候群	FMRI CGG repeat	FMRI 遺伝子座メチル化, FMRI 発現 ↓, 神経突起の短縮	Sheridan SD et al : PLoS One 6 : e26203, 2011

スにより運動神経の電気生理学的な興奮性が亢進することを示した。さらに *C9orf72* (chromosome 9 open reading frame 72) リピート伸長を有する家族性 ALS 運動神経細胞においても, *SOD1* 変異 ALS 運動神経細胞と, 部分的に同様の遺伝子群の発現変化が共通して認められ, ALS 全般に共通する病態メカニズムがある可能性を示した。

## 2. アルツハイマー病

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD) の病理学的特徴である老人斑の主成分であるアミロイド前駆蛋白 (amyloid precursor protein : APP) から2段階の酵素切断により切り出されるアミロイド $\beta$ 蛋白 (amyloid beta : A $\beta$ ) の沈着が, 神経細胞死を引き起こすと考える「アミロイドカスケード仮説」がADの病態メカニズムとして知られている。また, ADのバイオマーカーの研究により, A $\beta$ が認知症を発症する数十年前から髄液中で, 15年前から脳内で蓄積し始めていることが明らかにされている<sup>20</sup>。それゆえ, 発症前の神経細胞を解析できる患者 iPS 細胞を用いた研究は非常に有用と考えられる。

2012年にYagiらは, プレセニリン1 (presenilin 1 : *PS1*), プレセニリン2 (presenilin 2 : *PS2*) 遺伝子変異<sup>20</sup>を有する家族性AD患者由来のiPS細胞から大脳皮質神経細胞へ分化誘導を行い, A $\beta$ 42/40の比率の上昇を示した。またIsraelらは, 2名の*APP* 遺伝子重複を有する家族性AD患者および1

名の孤発性AD患者のiPS細胞由来大脳皮質神経細胞を作製し, 細胞内A $\beta$ 40の産生亢進, リン酸化タウ, 活性型 glycogen synthase kinase-3 $\beta$ の上昇を示した<sup>20</sup>。

その後われわれは, 森啓博士らが発見した<sup>21</sup>*APP* E693delta変異を有する家族性ADの患者からiPS細胞を樹立, 大脳皮質神経細胞 (AD大脳皮質神経細胞) およびアストロサイトに分化誘導し, その細胞内にA $\beta$ が蓄積することを証明した<sup>20</sup>。E693delta変異を有する家族性AD大脳皮質神経細胞およびアストロサイトでは, 細胞外に分泌されるA $\beta$ 量が著しく少なく, 細胞内にA $\beta$ がオリゴマーとして蓄積することを認めた。また, A $\beta$ オリゴマーの蓄積が小胞体ストレスや酸化ストレスを生じ, ある培養条件下では, 細胞死が生じることを示した。さらに複数の化合物の薬剤評価にて, ドコサヘキサエン酸投与にて小胞体ストレスが改善, 細胞死が抑制された。また, 1名の孤発性AD大脳皮質神経細胞においても, 細胞質内にA $\beta$ オリゴマーの蓄積を認めた。

この結果から, 臨床症状で規定された孤発性ADの病態は単一ではなく, 個々の患者の病態を正確に理解する必要性が示唆された。

## 3. パーキンソン病

パーキンソン病 (Parkinson's disease : PD) は $\alpha$ -シヌクレインが大脳黒質に異常蓄積し, ドパミン神経細胞が変性・脱落することにより発症する。過去の研究から, PD患者では, 運動

障害を発症する以前から $\alpha$ -シヌクレインが蓄積することが明らかとなり, ADと同じく患者自身のiPS細胞由来ドパミン神経細胞の解析は, 発症前の病態解明に有用と考えられる。

現在まで, 家族性PD患者のiPS細胞を樹立し, ドパミン神経細胞を分化誘導し, 解析を行った多数の報告を認める。2011年, Nguyenらが*LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) 遺伝子変異の家族性PD患者iPS細胞由来ドパミン神経細胞 (PDドパミン神経細胞) を解析し,  $\alpha$ -シヌクレインの細胞内蓄積や, 酸化ストレス関連遺伝子の発現上昇を示した<sup>20</sup>。さらに過酸化水素, MG-132, 6-ヒドロキシドパミンの投与によって, カスパーゼ3の活性化や細胞死が増加することを示した。同年, Devineらは $\alpha$ -シヌクレイン ( $\alpha$ -synuclein : *SNCA*) 遺伝子重複を有する家族性PDドパミン神経細胞を解析し,  $\alpha$ -シヌクレインの細胞内外での上昇や, 神経突起の短縮化を示した<sup>20</sup>。2012年にCooperらは, *PINK1* (PTEN-induced putative kinase 1) 遺伝子変異1名, *LRRK2* 遺伝子変異2名, 計3名の家族性PDドパミン神経細胞を用いて, 個々の変異タイプでの酸化ストレスとミトコンドリア機能の解析を行い比較検討している<sup>20</sup>。この結果, *PINK1* 変異でバリノマイシン投与時にミトコンドリア活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) の産生が上昇し, ミトコンドリア呼吸機能では*PINK1* 変異で基礎呼吸およびプロトンリークが上昇した。*LRRK2* 変異では基礎呼吸が低下し, ミトコンド

リアの軸索輸送障害を認めた。さらにいずれのPD患者由来神経細胞においても、コントロールと比べ、バリノマイシンやコンカナマイシン投与時の細胞脆弱性が上昇したが、コエンザイムQ10、ラバマイシン、GW5074(LRRK2阻害薬)の薬剤投与により、その脆弱性が回復することを示した。このように、患者iPS細胞を用いることで神経変性疾患のさらなる病態理解、新たな治療薬候補の発見をもたらしている。

### 孤発性神経変性疾患への応用

iPS細胞を用いた神経変性疾患病態再現モデルは、従来原因遺伝子が明確な家族性疾患が中心であったが、近年iPS細胞を用いた孤発性神経変性疾患研究の報告が散見される。2012年にSánchez-Danésらは孤発性PD患者7名とLRRK2遺伝子変異を有する家族性PD患者4名からiPS細胞を樹立し、ドパミン神経細胞に分化誘導を行い解析検討している<sup>30)</sup>。この研究では、LRRK2遺伝子変異PDのみならず、孤発性PDドパミン神経細胞においても、コントロールと比べ神経突起の数、長さが有意に低下し、さらにオートファジーのクリアランスも障害されていることを示した。

また、ADに関する研究でも、前述したように、われわれは1名の孤発性AD患者由来神経細胞において、家族性と同様に神経細胞・アストロサイトにAβオリゴマーが蓄積することを示した<sup>30)</sup>。従来の細胞、動物モデルで

は孤発性神経変性疾患の病態モデルの再現が不可能であったが、このように患者由来iPS細胞を用いることで孤発性神経変性疾患の病態再現が徐々に示されつつある。また、孤発性神経変性疾患は遺伝的要素だけでなく、外的環境因子や加齢が影響する可能性も考えられている。

iPS細胞における加齢性変化の短縮化に関しては、以下の研究がある。2013年にMillerらは、遺伝性早老症であるハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群(Hutchinson-Gilford progeria syndrome: HGPS)の原因蛋白であるプロジェリンをiPS細胞由来神経細胞に強制発現させ、老化を促進させる加齢モデルを構築した<sup>30)</sup>。この研究では、PINK1やParkin遺伝子変異を有する家族性PDドパミン神経細胞にプロジェリンを強制発現させると、細胞死の増強、神経突起の短縮化、リン酸化AKT (serine/threonine-specific protein kinase: protein kinase B)活性化の低下などのPD特異的な表現型を呈することを示した。

さらに、レンチウイルスを用い、神経特異的プロモーター制御下にプロジェリンを発現させたPDドパミン神経細胞のPDモデルマウスの基底核への移植実験において、TH (tyrosine hydroxylase: チロシン水酸化酵素)陽性細胞の減少、細胞質内ニューロメラニンの凝集、ミトコンドリアの巨大化、Lewy小体の前駆体である細胞質内多量重層封入体などのPD患者に特異的な病理学的変化を確認した。この結果、プロジェリンの強制発現により、iPS

細胞から分化誘導した細胞の加齢を促進させることが可能であると示された。

今後、社会の高齢化は益々促進し、神経変性疾患患者の増加が予想される。孤発性神経変性疾患の病態解明は社会的に非常に重要な問題であり、患者iPS細胞は、孤発性神経変性疾患の病態解明、創薬研究に有用なツールとして期待される。

### iPS細胞研究の課題と展望

患者iPS細胞を用いた研究において、いくつかの課題が残されている。そのひとつがiPS細胞間でのクローナルバリエーションである。従来の研究では、複数のコントロール群と疾患群のクローンを解析することで、この課題に切り組んできた。近年、患者の性、年齢が相応する健常者由来のiPS細胞をコントロールとして選択されてきたが、ある遺伝子に関連した病態を解析するうえで、より精密なコントロールが新たな技術によって作製可能になった。

すなわち、人工ヌクレアーゼを用いたzinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), clusters of regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR-Cas9 system)などのゲノム編集技術<sup>30)</sup>の進歩により、単一の配列レベルで遺伝子修復が可能となった。これらの技術により、患者iPS細胞の遺伝子変異の修復、あるいは健常者iPS細胞に遺伝子変異を挿入することで、より精度の高いコントロ

ールが作製されている<sup>22)23)30)</sup>。

また、疾患iPS細胞を用いた創薬研究のための大規模な薬剤スクリーニングには、患者自身のiPS細胞由来神経細胞が大量に必要であり、多大な努力と時間を必要とする。従来の分化誘導法では体細胞からiPS細胞を樹立し、神経細胞に分化させるまでに数ヶ月を要する。しかし、転写因子を線維芽細胞などの体細胞に導入することで、iPS細胞を経ることなく、直接神経細胞(induced neuronal cells: iN細胞)を誘導できるダイレクトリプログラミング法の開発<sup>30)</sup>により、作業の短期間化が期待される。このような新たな技術の開発により、患者由来の神経細胞をさらに短期間で作製し、分化効率を改善することで大規模な薬剤スクリーニングが可能となり、難治性神経変性疾患の創薬研究の進展が期待される。

### おわりに

マウスiPS細胞の登場からわずか8年で、さまざまな患者由来iPS細胞を用いた研究が報告されている。神経変性疾患領域では、これまで困難であった患者自身の神経系細胞を得ることができる点で非常に画期的である。今後、iPS細胞技術を用いることにより、難治性神経変性疾患の病態解明・治療法開発のさらなる進展が期待される。

### ●文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S: Cell 126: 663-676, 2006
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al: Cell 131: 861-872, 2007
- 3) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al: Science 282: 1145-1147, 1998
- 4) Jucker M: Nat Med 16: 1210-1214, 2010
- 5) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S et al: Neuron 28: 31-40, 2000
- 6) Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, Okano H: Dev Biol 275: 124-142, 2004
- 7) Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A et al: Nat Neurosci 8: 288-296, 2005
- 8) Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP et al: Nat Biotechnol 27: 275-280, 2009
- 9) Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED et al: Nat Biotechnol 23: 215-221, 2005
- 10) Kriks S, Shim JW, Piao J et al: Nature 480: 547-551, 2011
- 11) Bissonnette CJ, Lyass L, Bhattacharyya BJ et al: Stem Cells 29: 802-811, 2011
- 12) Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, Studer L: Nat Protoc 5: 688-701, 2010
- 13) Krencik R, Weick JP, Liu Y et al: Nat Biotechnol 29: 528-534, 2011
- 14) Kang SM, Cho MS, Seo H et al: Stem Cells 25: 419-424, 2007
- 15) Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK et al: Science 321: 1218-1221, 2008
- 16) Park IH, Arora N, Huo H et al: Cell 134: 877-886, 2008
- 17) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr et al: Nature 457: 277-280, 2009
- 18) Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC et al: Hum Mol Genet 20: 3642-3652, 2011
- 19) Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K et al: Sci Transl Med 4: 145ra104, 2012
- 20) Bilican B, Serio A, Barmada SJ et al: Proc Natl Acad Sci U S A 109: 5803-5808, 2012
- 21) Alami NH, Smith RB, Carrasco MA et al: Neuron 81: 536-543, 2014
- 22) Kiskinis E, Sandoe J, Williams LA et al: Cell Stem Cell 14: 781-795, 2014
- 23) Wainger BJ, Kiskinis E, Mellin C et al: Cell Rep 7: 1-11, 2014
- 24) Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL et al: Dominantly Inherited Alzheimer Network: N Engl J Med 367: 795-804, 2012
- 25) Yagi T, Kosakai A, Ito D et al: PLoS One 7: e41572, 2012
- 26) Israel MA, Yuan SH, Bardy C et al: Nature 482: 216-220, 2012
- 27) Tomiyama T, Nagata T, Shimada H et al: Ann Neurol 63: 377-387, 2008
- 28) Kondo T, Asai M, Tsukita K et al: Cell Stem Cell 12: 487-496, 2013
- 29) Nguyen HN, Byers B, Cord B et al: Cell Stem Cell 8: 267-280, 2011
- 30) Devine MJ, Ryten M, Vodicka P et al: Nat Commun 2: 440, 2011
- 31) Cooper O, Hallett P, Isacson O: Parkinsonism Relat Disord 18 Suppl 1: S14-S16, 2012
- 32) Sánchez-Danés A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I et al: EMBO Mol Med 4: 380-395, 2012
- 33) Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S et al: Cell Stem Cell 13: 691-705, 2013
- 34) Wei C, Liu J, Yu Z et al: J Genet Genomics 40: 281-289, 2013
- 35) Reinhardt P, Schmid B, Burbulla LF et al: Cell Stem Cell 12: 354-367, 2013
- 36) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP et al: Nature 463: 1035-1041, 2010

症例報告

Vol.30 No.2 2014

転移性脊髄腫瘍による対麻痺患者に対するロボットスーツ Hybrid Assistive Limb 福祉用を用いた理学療法の経験

西尾 大祐<sup>1,2)</sup> 前島伸一郎<sup>3)</sup> 大沢 愛子<sup>4)</sup> 平野 恵健<sup>1,5)</sup>  
木川 浩志<sup>1)</sup> 丸山 仁司<sup>2)</sup>

キーワード | ロボットスーツ, 理学療法, 転移性脊髄腫瘍

抄録

転移性脊髄腫瘍による対麻痺例に対してロボットスーツ Hybrid Assistive Limb 福祉用 (HAL) を用いた理学療法を行い、その運用方法や治療効果を検討した。症例は47歳、女性で、疾患は乳癌・転移性脊髄腫瘍であった。HALを用いた理学療法を在宅復帰前に5日間連続して行い、在宅復帰後に週1回の頻度で行った。経過として、在宅復帰3カ月後の歩行能力の向上を認めたが、移乗・移動能力・日常生活活動・生活の質には変化がなかった。本例より、HALを用いた理学療法を継続して施行するには、長時間の端座位・立位保持能力と下肢筋力が欠かせず、患者がHALの操作を習熟することが重要と考えられた。また、HALを用いた理学療法は、歩行能力の向上に役立つ可能性があるものの、通常の理学療法との違いや適切な訓練量・期間などについては更なる検討が必要であると考えられた。

1. はじめに

ロボットスーツ Hybrid Assistive Limb 福祉用 (HAL) は、ヒトの腰部・下肢に装着する外骨格型ロボットで、筋活動電位・足圧分布・関節角度を感知して股・膝関節のモーターが駆動するため、装着者の意思で下肢運動を補助できる<sup>1)</sup>。HALによる理学療法 (HAL 理学療法) は、神経・筋疾患における筋力低下の進行抑制や脳卒中における歩行能力の改善に期待されている<sup>2,3)</sup>。また、ポリオ、脳性麻痺、脊髄損傷等により下肢に不全麻痺を有する患者に対して、HAL 理学療法が試みられている<sup>4-7)</sup>。しかし、理学療法の詳細な報告<sup>8)</sup>は少なく、臨床での効果的な運用方法や治療効果は不明である。今回我々は、脊髄腫瘍による対麻痺患者に対し HAL 理学療法を行い、その運用方法や治療効果について検討した。

なお、本研究は患者の同意と当院倫理委員会の承認 (承

認番号: 120107) を得て行った。

2. 症例

47歳、女性。  
疾患: 乳癌, 転移性脊髄腫瘍  
主訴: 両下肢の脱力感  
既往歴: 平成11年9月 乳癌に対し切除術施行。平成19年1月 小脳の腫瘍転移。平成19年10月 脊髄膜播種により対麻痺となった。その後も頭蓋骨、胸壁などへの転移を繰り返し、化学療法・放射線療法を施行され、主治医から生命予後の告知を受けていた。  
生活歴: 夫、子どもとの6人暮らし。移動は4点杖歩行と車いすを併用して自立し、その他の日常生活活動 (Activities of Daily Living: ADL) は入浴を除き自立していた。家事全般を行いながら事務員としてパート勤務していた。

現病歴: 平成23年12月に対麻痺の増悪を自覚し、転移性脊髄腫瘍を指摘され放射線療法を施行された。第33病日に当院回復期リハビリテーション (リハ) 病棟へ転院した。

神経放射線学的所見: MRIにてTh7~10レベルの脊髄内にT2強調画像上、高信号を呈する不整形腫瘍を認めた (図1a)。また、左小脳外側にも以前から治療されていた腫瘍の残存を認めた (図1b)。

3. 転院後経過 (表)

転院時から体幹・下肢の筋力強化訓練、起立訓練、移乗を中心としたADL訓練を行い、第37病日から歩行訓練を行った。第38病日に移乗とトイレ動作が手すりを用いて自立し、第43病日に両プラスチック型短下肢装具を用いた歩行器歩行が軽介助で可能となった。転院時には膝伸展筋力・体重比が右0.08左0.07、移乗・移動能力の指標である Rivermead Mobility Index<sup>9)</sup>(RMI) が3点、基本的ADLの指標である Functional Independence Measure<sup>10)</sup>(FIM) の指標である

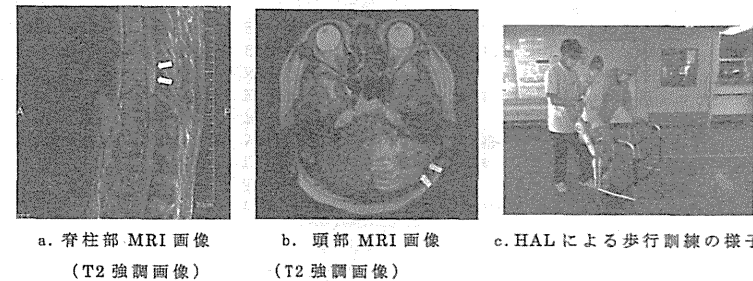


図1 症例紹介

a, b: 第33病日のMRI画像。Th7~10レベルの脊髄内に不整形腫瘍を認めた。また、左小脳外側に腫瘍を認めた (令: 病変部位)。c: HAL 理学療法の様子。両プラスチック型短下肢装具を併用して歩行訓練を行い、開始5日目に歩行器歩行が軽介助で可能となった。

表1 転院後の理学療法と各リハ評価の経過

	転院時 (第33病日)	在宅復帰前5日 (第48病日)	在宅復帰時 (第52病日)	在宅復帰後3か月 (第142病日)
通常の理学療法 起立・移乗・歩行訓練 120分/日	第33~51病日、毎日			
HAL理学療法 起立・歩行訓練 40分/日	第48~52病日、毎日 第58~142病日、週1回			
膝伸展筋力・体重比 (kg/kg)	右0.08 左0.07	右0.11 左0.10	右0.19 左0.14	右0.19 左0.15
歩行速度(m/分)		5.7	6.9	8.2
RMI(点)	3 (起立・移乗: 不明)	5 (立位保持・歩行: 不明)	5 (立位保持・歩行: 不明)	5 (立位保持・歩行: 不明)
FIM(点)	運動項目58 認知項目35 (移動: 車椅子で軽介助)	運動項目77 認知項目35 (移動: 車椅子で修正自立)	運動項目77 認知項目55 (移動: 車椅子で修正自立)	運動項目77 認知項目35 (移動: 車椅子で修正自立)
IADL(点)			5	5
EuroQol			効用値0.730 視覚評価法70/100	効用値0.730 視覚評価法70/100

HAL 理学療法開始時から在宅復帰後3カ月にかけて歩行速度が増加したが、歩行介助量は減少せず、在宅で歩行は行われなかった。

が93点であったが、第48病日には膝伸筋力・体重比が0.11左0.10、RMIが5点、FIMが112点と、下肢筋力の向上と移乗・移動能力をはじめとするADLの向上を認めた(表)。第48病日のカンファレンスで第52病日に自宅退院することが決定され、患者が外来リハでのHALによる歩行訓練を希望した。そこで、HAL理学療法が可能であるかを判断するために、第48-52病日に通常の訓練に加えてHAL理学療法を行った(図1c)。

HAL理学療法開始時には、感覚検査で第11胸髄節レベル以下の表在覚鈍麻・痛覚脱失を認め、徒手筋力検査法で体幹屈曲：3、股関節屈曲：右3左3、膝関節伸展：右3左3、足関節背屈：右3左3、母趾伸展：右2左3、足関節底屈：右2左3と体幹・下肢の筋力低下を認めた。なお、左上肢に軽微な協調運動障害を認めたが、ADL上の問題にはならなかった。ASIA Impairment Scaleでは、運動スコア78点、触覚スコア90点、痛覚スコア68点、機能障害スコアDであった。1日あたりのHAL理学療法時間(HAL着脱は含まず)は40分で、両プラスチック型短下肢装具を併用して起立・歩行訓練を行った。HAL着脱では介助と転倒予防のために理学療法士2名を要し、作業に計40分を要した。しかし、患者はHAL着脱時の端坐位・立位保持で疲労を訴えることはなかった。実際のHAL理学療法では介助と転倒予防のために理学療法士2名を要したが、日ごとに歩行介助量が減少した。1・2日目は平行棒歩行が

中等度介助レベルであったが、立脚側への重心移動を図るためにHALの骨盤帯を介助することによって、3日目は監視レベルとなった。3・4日目は歩行器歩行が中等度介助レベルであったが、HALの骨盤帯を介助することに加え、左足クリアランスを改善するために右靴底を5mm補高することによって、5日目は軽介助レベルとなった。HAL理学療法の感想を聴取したところ、「うまく歩けるようになったので、HAL理学療法を続けたい」とのことであった。患者がHALによる歩行器歩行に慣れ、HAL理学療法の継続を希望したことから、在宅復帰後もHAL理学療法を週1回の頻度で行うことにした。

第52病日に在宅復帰し、第58病日に職場復帰した。なお、パート勤務は週4回の頻度でボランティアによる自動車送迎サービスを利用しながら行われた。在宅復帰後1週目にはHALによる歩行器歩行が10m×4回までしか行えなかったが、在宅復帰後2週目には20m×4回が可能となった。以後には歩行訓練による疲労のため歩行距離や訓練頻度の増加を認めなかった。患者のHALに対する満足感を毎回の訓練後に「大いに満足・やや満足・普通・やや不満・大いに不満」の5段階で評価したところ、毎回「大いに満足」で、その理由は「HALによる歩行は普通の歩行より足を出しやすい」であった。HAL理学療法実施時期の膝伸筋力・体重比、10m歩行での歩行速度・両側の平均歩幅(歩幅)・歩行率の経過を表と図2に示す。なお、これ

らの計測はHALを装着せずに行われた。膝伸筋力・体重比は一時低下傾向を示したが、その後増加傾向を示し、外来リハ開始時のレベルとなった。10m歩行では歩幅が増加傾向を示した一方で歩行率は減少傾向を示し、歩行速度は外来リハ開始時に比べて増加した。

HAL理学療法実施時期のRMI、FIM、応用的ADLの指標であるLawton's Instrumental ADL<sup>11)</sup>(IADL)、生活の質(Quality of Life: QOL)の指標であるEuroQol<sup>12)</sup>を表に示す。HAL理学療法開始時から在宅復帰後3か月にかけて、FIMの「移動」は一貫して歩行の場合に4点と歩行介助量の減少はなく、移乗・移動能力、ADLは外来リハ開始時に比べて変わらなかった。また、QOLは外来リハ開始時に比べて変わらなかった。第170病日から発熱や倦怠感のため外来リハの実施が断続的となり、第191病日に体調不良のためHAL理学療法を終了した。

4. 考察

HAL理学療法では、長時間の端坐位・立位保持で疲労する場合に訓練量の確保が困難<sup>9)</sup>であり、麻痺や筋力低下が重度の場合にHALの作動が困難である<sup>4,13)</sup>。また、HALは歩容を制約する<sup>14)</sup>ため、あらかじめHALによる歩行に慣れる必要があると思われる。すなわち、HAL理学療法を継続するには、HALの装着に必要な長時間の端坐位・立位保持能力とHALの作動に必要な下肢筋力を確保した上で、患者がHALの操作を習熟するための訓練を設けることが重要と考えられる。本症例は退院前のHAL理学療法において訓練の支障となる疲労はなく、歩行介助量の減少を認めた。患者が筋力強化訓練や起立訓練などの通常の理学療法でHALを作動させるための下肢筋力や移乗・移動能力を獲得し、HALの操作を習熟したことが、退院後もHAL理学療法を継続して行えた要因と考えられる。

外来での治療継続により歩行能力が向上したことには様々な要因が関与しており限定することはできないが、患者からは下肢の遊脚運動が楽にできたとの感想があり、HALが下肢の遊脚運動の学習に効果的であったことが考えられる。また、歩行速度の増加は歩幅の拡大によるものであり、HALによる歩行訓練は歩幅の拡大による歩行速度の向上に役立った可能性がある。しかし、歩行速度の向上は実用的な水準には程遠く、歩行介助量は軽減しなかったため、患者が在宅でHALを付せず歩行することはできなかった。このように、本症例では機能・能力の向上が軽微でADLの改善に反映されなかったが、このことは訓練が非常に限られた環境で行えない現状のロボットを用いた訓練の問題点かもしれない。症例を重ねてゆく必要があるが、在宅で使用可能なロボットの開発や、ロボットを用いた訓練からロボットを取り外した際の実用的な動作にいかにつなげていくかが、今後の課題になるのではないだろうか。

ただ、本症例で特筆すべきことは、進行性の腫瘍転移にもかかわらずQOLが維持されたことであり、早期の家庭・

職場復帰を行ったことと満足度の高い歩行訓練を実現したことが要因と考えられる。悪性腫瘍の進行によってADLが急速に低下した場合にADLや歩行にアプローチすることは、潜在的な能力を引き出し、QOLの向上が期待できる<sup>15)</sup>とされている。本症例では、HALを用いることで患者にとって満足度の高い歩行訓練が行え、それが身体機能や活動量を保つことにつながり、QOLの維持に寄与したものである。

HAL理学療法の効果について、歩行能力やADL、QOLの観点から検討した。ただし、本研究は通常の理学療法との比較がなされておらず、訓練量が時期によって異なることや外来での訓練期間が限られたことから、通常の理学療法との違いや適切な訓練量・期間については更なる検討が必要であると考えられる。

貴重な臨床記録とデータを提供していただき、かつ論文作成の同意をいただきました患者様とご家族に、心から感謝の気持ちと御礼を申し上げ、患者様のご冥福をお祈りいたします。

文 献

- 1) Sankai, Y.: HAL: Hybrid Assistive Limb based on cybernetics. Springer Tracts in Advanced Robotics, 66: 25-34, 2011
- 2) 中島 孝: 神経・筋維病者が装着するロボットスーツ HAL の医学応用に向けた進捗、期待される臨床効果。保健医療科学, 60: 130-137, 2011
- 3) Maeshima, S. et al.: Efficacy of a hybrid assistive limb in post-stroke hemiplegic patients: a preliminary report. BMC Neurol, 11: 116, 2011
- 4) 新宮正弘ほか: バイオフィードバックを用いたポリオ経験者の筋神経系制御能力の改善とロボットスーツ HAL による麻痺肢動作支援。日本機械学論文集(C 編), 76: 3630-3639, 2010
- 5) 有安隆平ほか: 脊髄損傷不全麻痺患者に対するロボットスーツ HAL を用いたリハビリテーションの試み、国立大学法人リハビリテーション科・メディカル学術大会誌, 33: 63-65, 2012
- 6) 武宮卓三ほか: ロボットスーツ HAL による脳性麻痺患者の歩行支援に関する研究。生体工医学, 50: 105-110, 2012
- 7) 林 知宏ほか: 自力運動困難な麻痺患者に対するロボットスーツを用いた新しい随意運動訓練—重度脊髄損傷患者への臨床適用—. 生体工医学, 50: 117-123, 2012
- 8) 西尾大祐ほか: 脳卒中片麻痺に対する両脚型ロボットスーツ HAL 福祉用装着の実践に関する一考察。義装会誌, 28: 53-56, 2012
- 9) 前島伸一郎ほか: Rivermead Mobility Index 日本語版の作成とその試用について。総合リハビリテーション, 33: 875-879, 2005
- 10) 千野直一ほか: 機能的自立度評価法(FIM)。脳卒中の

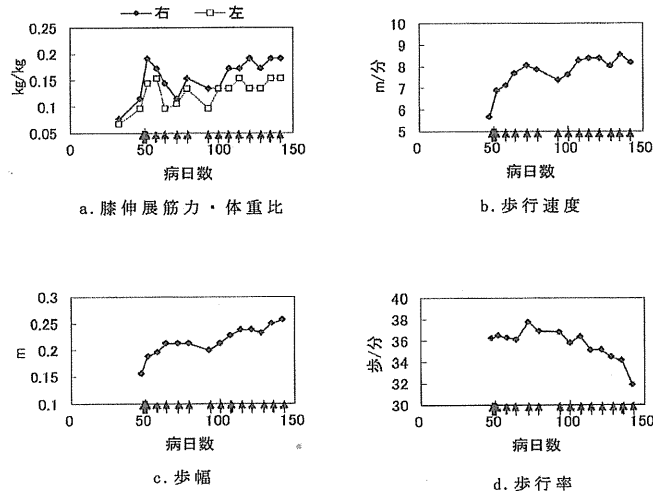


図2 下肢筋力評価と10m歩行評価の経過

膝伸筋筋力は膝伸筋筋力測定器「計足君」(有蘭製作所(株)製)を用いて2回計測し、値の大きい方を採択した。10m歩行は2回計測し、歩行時間の短い方を採択した。膝伸筋筋力は増減があるものの維持されており、10m歩行では歩幅の拡大による速度の増加を認めた。(↑: HAL理学療法実施日)。

- 機能評価 SIAS と FIM (基礎編), 78-138, 金原出版, 2012
- 11) 江藤文夫: IADL の評価法, 高齢者の生活機能評価ガイド, 23-32, 医歯薬出版, 1999
- 12) 池田俊也ほか: 選好に基づく尺度 (EQ-5D を中心に), 臨床のための QOL 評価ハンドブック, 45-49, 医学書院, 2002
- 13) 股 祥洙: 先進的リハビリテーション医療技術への応用—歩行分析のロボット支援リハビリテーションへの応用—, 総合リハビリテーション, 40: 983-990, 2012
- 14) 西尾大祐ほか: ロボットスーツ Hybrid Assistive Limb 福祉用が健常成人のバランス能力および歩行能力に及ぼす影響, 義装会誌, 27 (特別号): 135, 2011
- 15) 辻 哲也: 緩和ケアにおけるリハビリテーション 進行がん・末期がん患者におけるリハビリテーションの概要, 辻 哲也 (編) がんのリハビリテーションマニュアル, 第1版, 254-266, 医学書院, 2011

**Abstract:** We examined the method and effect of rehabilitation using a Robot Suit Hybrid Assistive Limb (HAL) through the physiotherapy of a metastatic spinal cord tumor patient with paraplegia. The case was a 47-year-old woman and the diseases were breast cancer and a metastatic spinal cord tumor. The patient was provided with physiotherapy using HAL for five consecutive days before hospital discharge and once per week after hospital discharge. As a result, although the patient's ambulatory ability improved at three months after the return home, the mobility, activities of daily living and quality of life did not change. We think that it is important that a patient can sit and stand still for long periods of time and master the operation of HAL in order to continue the physiotherapy using HAL. Although the physiotherapy using a Robot Suit HAL may be useful for improvement in ambulatory ability, we consider further examination about the difference from the usual physiotherapy, the appropriate amount and the period of training to be necessary.

**Key words:** robot suit, physiotherapy, metastatic spinal cord tumor



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/neures](http://www.elsevier.com/locate/neures)



## Task-specific brain reorganization in motor recovery induced by a hybrid-rehabilitation combining training with brain stimulation after stroke

Satoko Koganemaru<sup>a,b,\*</sup>, Nobukatsu Sawamoto<sup>c</sup>, Toshihiko Aso<sup>b</sup>, Akiko Sagara<sup>d</sup>, Tomoko Ikkaku<sup>d</sup>, Kenji Shimada<sup>d</sup>, Madoka Kanematsu<sup>d</sup>, Ryoosuke Takahashi<sup>c</sup>, Kazuhisa Domen<sup>d</sup>, Hidenao Fukuyama<sup>b</sup>, Tatsuya Mima<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Brain Integrative Science, Kyoto University School of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>b</sup> Human Brain Research Center, Kyoto University School of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>c</sup> Department of Neurology, Kyoto University School of Medicine, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

<sup>d</sup> Department of Physical and Rehabilitation Medicine, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Hyogo 663-8501, Japan

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 15 May 2014  
Received in revised form 3 October 2014  
Accepted 6 October 2014  
Available online xxx

**Keywords:**  
Stroke  
Transcranial magnetic stimulation  
Hemiparesis  
Neuroplasticity  
Task specificity  
Rehabilitation

### ABSTRACT

Recently, we have developed a new hybrid-rehabilitation combining 5 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation and extensor motor training of the paretic upper-limb for stroke patients with flexor hypertonia. We previously showed that the extensor-specific plastic change in M1 was associated with beneficial effects of our protocol (Koganemaru et al., 2010). Here, we investigated whether extensor-specific multi-regional brain reorganization occurred after the hybrid-rehabilitation using functional magnetic resonance imaging. Eleven chronic stroke patients were scanned while performing upper-limb extensor movements. Untrained flexor movements were used as a control condition. The scanning and clinical assessments were done before, immediately and 2 weeks after the hybrid-rehabilitation. As a result, during the trained extensor movements, the imaging analysis showed a significant reduction of brain activity in the ipsilesional sensorimotor cortex, the contralateral cingulate motor cortex and the contralateral premotor cortex in association with functional improvements of the paretic hands. The activation change was not found for the control condition. Our results suggested that use-dependent plasticity induced by repetitive motor training with brain stimulation might be related to task-specific multi-regional brain reorganization. It provides a key to understand why repetitive training of the target action is one of the most powerful rehabilitation strategies to help patients.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

### 1. Introduction

Use-dependent plasticity is a neurophysiological basis of functional recovery in neuro-rehabilitation (Butefisch et al., 1995; Dimyan and Cohen, 2011; Hummelsheim, 1999; Masiero and Carraro, 2008; Nudo and Milliken, 1996; Nudo et al., 1996a,b; Richards et al., 2008). Repeating a specific motor training induces use-dependent plasticity in the primary motor cortex (M1) through long-term potentiation (LTP)-like changes of specific corticospinal motoneurons for the trained task (Butefisch et al., 2000; Classen et al., 1998; Rossini and Pauri, 2000).

Patients with chronic stroke, with moderate-to-severe hemiparesis, often suffer from motor deficits associated with flexor hypertonia, as well as motor weakness. In order to facilitate use-dependent plasticity for extensor function which counteracts flexor hypertonia, we have developed a new hybrid-rehabilitation combining 5 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS)

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; AOU, Amount of Use; CMC, cingulate motor cortex; EDC, extensor digiti communis; FCR, flexor carpi radialis; FMA, Fugl-Meyer Assessment; fMRI, functional MRI; LTP, long-term potentiation; M1, primary motor cortex; MAL, Motor Activity Log; mAS, Modified Ashworth Scale; MEP, motor evoked potentials; MCP, metacarpophalangeal; MNI, Montreal Neurological Institute; MT, motor threshold; PMC, premotor cortex; QOM, Quality of Movement; ROI, region of interest; ROM, range of movement; rTMS, repetitive transcranial magnetic stimulation; RSC, percentage signal change; SIAS, Stroke Impairment Assessment Set; SMC, sensorimotor cortex; SPM, Statistical Parametric Mapping; TMS, transcranial magnetic stimulation.

\* Corresponding author at: Brain Integrative Science, Kyoto University Graduate School of Medicine, Sakyo-ku, Yoshida Konoe-cho, Kyoto 606-8501, Japan.  
Tel.: +81 75 753 4481; fax: +81 75 751 3202.

E-mail address: [kogane@kuhp.kyoto-u.ac.jp](mailto:kogane@kuhp.kyoto-u.ac.jp) (S. Koganemaru).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.004>  
0168-0102/© 2014 Elsevier Ireland Ltd and the Japan Neuroscience Society. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Koganemaru, S., et al., Task-specific brain reorganization in motor recovery induced by a hybrid-rehabilitation combining training with brain stimulation after stroke. *Neurosci. Res.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.004>

**Table 1**  
Characteristics of the patients.

Patient	Age (years)	Gender	Months after stroke	SIAS (shoulder, arm-fingers)	Hemorrhage (H)/infarct (I)	Hemiparetic side	Lesioned site	Sensory disturbance
1	57	M	6	3.1c	I	Right	Posterior limb of internal capsule, corona radiata	None
2	64	M	12	5.1c	H	Right	Thalamus, Posterior limb of internal capsule	None
3	54	M	16	3.1c	H	Left	Posterior limb of internal capsule	None
4	68	M	7	5.3	I	Right	Posterior limb of internal capsule	None
5	68	M	6	1.0	I	Left	Posterior limb of internal capsule	Mild
6	60	F	16	3.1c	I	Left	Posterior limb of internal capsule, corona radiata	None
7	58	F	20	4.2	I	Left	Posterior limb of internal capsule	None
8	56	M	64	2.1a	H	Left	Posterior limb of internal capsule	None
9	62	M	66	3.1c	I	Right	Posterior limb of internal capsule	None
10	67	F	96	2.1c	H	Left	Putamen, Posterior limb of internal capsule	Moderate
11	55	M	33	2.1c	I	Right	Posterior limb of internal capsule, corona radiata	None

In the Stroke Impairment Assessment Scale (SIAS), proximal sites of paretic upper-extremities, such as a shoulder and an arm, are evaluated by Knee-Mouth test and distal sites such as fingers are evaluated by the Finger-function test. The lower the value is, the more severe the impairment is. A score of 0 = total paralysis, score of 1–2 = incompleteness of a task, score of 3–4 = completion of a task with clumsiness and the maximum score of 5 = normal status.

given over the ipsilesional M1 area and extensor motor training aided by electrical neuromuscular stimulation for the paretic upper-limb. It led to a functional recovery with reduction of flexor hypertonia, attributable to the extensor-specific change in M1 (Koganemaru et al., 2010). In our previous study, neuromuscular stimulation of our protocol had little influence on hypertonia (Koganemaru et al., 2010). In previous reports, its effects are still controversial on reduction of hypertonia of paretic upper limbs (Dewald et al., 1996; Fujiwara et al., 2009; Hines et al., 1993; Hummelsheim et al., 1997).

Neuroimaging studies demonstrated that multi-regional brain reorganization occurred in several motor-related regions including bilateral M1, premotor cortices (PMC), cingulate motor cortex (CMC), basal ganglia and cerebellum in process of recovery after stroke insults (Carey et al., 2002; Jang et al., 2003, 2005; Johansen-Berg et al., 2002a; Luft et al., 2004; Nelles et al., 2001; Ward et al., 2003a,b, 2004; Ward and Cohen, 2004). Over-activity of non-M1 regions in an acute stage was progressively decreased with an improvement of motor performance of the hemiparetic limbs (Calautti et al., 2001; Small et al., 2002; Ward et al., 2003a,b). In a chronic stage, the magnitude of brain activity in the non-M1 regions was negatively correlated with the clinical outcome (Ward et al., 2003a,b) and positively correlated with the extent of damage in corticospinal function (Ward et al., 2006) probably due to the compensatory mechanism of secondary motor areas (Feydy et al., 2002; Ward et al., 2003a,b). However, if any repetitive motor training could induce task-specific enhancement of the ipsilesional M1 function, a compensatory drive from secondary motor areas would be reduced when the trained task was performed.

In order to investigate whether extensor-specific multi-regional brain reorganization was induced by the hybrid-rehabilitation, we performed the fMRI scanning in chronic subcortical stroke patients. We hypothesized that the hybrid-rehabilitation would reduce brain activity of non-M1 regions specific for an extension-related task if it could recover residual corticospinal function from the ipsilesional M1 involved in paretic extensor function. Furthermore, we expected that extensor-specific activity change would be related to functional improvement of the paretic upper-limbs.

### 2. Subjects and methods

#### 2.1. Subjects

We investigated 11 post-stroke patients (eight men and three women) aged 54–68 years (mean ± standard deviation, 60.8 ± 5.3),

who were all right-handed according to the Edinburgh Handedness Inventory (Oldfield, 1971), and had experienced their first-ever subcortical stroke (seven with infarction and four with hemorrhage) >6 months ago (31.0 ± 30.5). The lesions were documented by MRI (T<sub>1</sub>- and T<sub>2</sub>-weighted images). All of the patients had no pharmacological treatment of spasticity, epilepsy, depression and other drugs which could interfere with cortical excitability. They were hemiparetic, six in the left and five in the right hand. The paretic state of the affected upper limb was evaluated by the upper-extremity motor scores of the Stroke Impairment Assessment Set (SIAS) (Chino et al., 1994; Sonoda et al., 1997; Tsuji et al., 2000) (Table 1).

#### 2.2. Ethics statement

The study protocol was approved by the Committee of Medical Ethics of the Graduate School of Medicine, Kyoto University, Japan (E-1065), and written informed consent was obtained from all subjects.

#### 2.3. EMG recording

Subjects were seated in an armchair with their forearms pronated on an armrest and with the shoulder joint in resting position and the elbow joint flexed at a right angle, in order to prevent synchronized movements of extensors of the paretic upper limb. Surface EMGs were recorded from the right and left flexor carpi radialis (FCR) muscles, and the right and left extensor digiti communis (EDC) muscle, using a pair of silver electrodes in belly-tendon montage. The EMG was amplified, filtered (bandpass, 5–1000 Hz) and digitized at a sampling rate of 10 kHz using the Map1496 system (Nihon-Santeku Co., Osaka, Japan).

#### 2.4. Intervention: hybrid-rehabilitation

Patients participated in the hybrid-rehabilitation protocol of 6 weeks at the outpatient clinic, which consisted of a motor task for extensors of the paretic upper limb and 5 Hz high-frequency rTMS given over the ipsilesional M1 based on our previous study (Koganemaru et al., 2010) (Fig. 1). They performed 15 cycles of exercises for the extensors of the wrist and fingers. Each cycle consisted of exercises for the extensors for 50 s followed by a train of 5 Hz repetitive TMS for 8 s, which was both preceded and followed by a resting period of 1 s (total time = 1 min). The motor task comprised of 50-time repeats of 1 Hz rhythmic voluntary

Please cite this article in press as: Koganemaru, S., et al., Task-specific brain reorganization in motor recovery induced by a hybrid-rehabilitation combining training with brain stimulation after stroke. *Neurosci. Res.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.004>

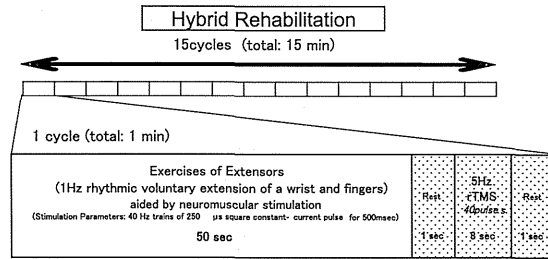


Fig. 1. The hybrid-rehabilitation. Fifteen cycles of focal extensor exercises ("Ex"), consisting of 1 Hz rhythmic voluntary movements of the wrist and fingers aided or triggered by neuromuscular stimulation of the EDC muscles, were combined with high-frequency rTMS. Each cycle consisted of exercises for the extensors for 50 s followed by a train of 5 Hz repetitive TMS for 8 s, which was both preceded and followed by a resting period of 1 s (total time = 1 min).

extension of the wrist and metacarpophalangeal (MCP) joints of the five digits triggered by electrical neuromuscular stimulation across the EDC muscle, followed by brief relaxation. For neuromuscular stimulation, the surface electrode pads (5 × 5 cm) were applied to the EDC muscle belly and distal tendon. The stimulation comprised a 40 Hz train of 0.25 ms constant current pulses, lasting for 500 ms (20 pulses). The intensity was fixed at the level that produced 10 degrees of extension of the paretic wrist in the relaxed state, so that the neuromuscular stimulation could assist the exercises for the extensors. rTMS was performed using a Magstim Super Rapid Magnetic Stimulator (Magstim Co., Whitland, Dyfed, UK) with an air-cooled figure-of-eight coil composed of two loops (outer diameter, 9 cm). The coil was placed in the optimal position to elicit the best motor response in the target EDC muscle. If motor-evoked potentials (MEPs) were not elicited with the maximal intensity of the stimulator output, the optimal positions were determined as those bilateral-symmetrically opposite to that of EDC muscles in the healthy side from the midline through the Cz position of the international 10–20 EEG system. The active motor threshold (MT) was defined as the lowest stimulus intensity required to elicit MEPs with a peak-to-peak amplitude of >150 µV in the tonic contracting muscles with 40–50% of the maximal contraction measured by EMG activity in 5 out of 10 trials for each individual patient (Croppa et al., 2012; Rossini et al., 1994). The intensity of rTMS was fixed at 100% of the active MT, and was kept constant throughout the intervention. If the active MT could not be determined in patients, we used the maximum intensity of the stimulator output. We performed 12 hybrid-rehabilitation sessions with one session per day, on two separate days per week, for 6 weeks in total. Further details have been described in our previous study (Koganemaru et al., 2010).

The assessments were done before (pre), at the end (post-0) and 2 weeks after the intervention (post-1).

## 2.5. Behavioral assessments

To assess effects of the intervention on behavioral parameters, and particularly to differentiate effects of the training on agonist and antagonist muscles, clinical assessments were performed on active range of movement (ROM) in extension and flexion for the wrist joint and the MCP joints of the thumb, index finger and middle finger in the paretic side. Additionally, we assessed changes of the Modified Ashworth Scale (mAS) scores (Ashworth, 1964; Bohannon and Smith, 1987) to evaluate hypertonia. The scores of active ROM and mAS for the fingers (thumb, index finger and middle finger) were averaged as a parameter of finger function. Pinch and grip power of the paretic hand were measured using a force

transducer (range, 0–20 kg; diameter of contact surface area, 2 cm) with the thumb and index finger and a custom handgrip dynamometer, respectively. The upper-limb subscale of the Fugl-Meyer Assessment (FMA) (66 scores in total) and Motor Activity Log was also measured to evaluate motor impairments (Fugl-Meyer et al., 1975) and daily use of the paretic upper-limbs (Uswatte et al., 2005, 2006; van der Lee et al., 2004). In Motor Activity Log, each participant rated how well (6-point Quality of Movement [QOM] scale) and how much (6-point Amount of Use [AOU] scale) the paretic arm was used spontaneously in 30 activities of daily life (Uswatte et al., 2006; van der Lee et al., 2004). As a baseline, we measured pinch and grip power of the healthy hand before the intervention.

## 2.6. Neurophysiological assessments

The optimal scalp positions to induce the best motor response for the paretic EDC and FCR muscles were determined separately. To assess the changes of corticospinal excitability, we measured the active MTs from each of the paretic EDC and FCR muscles.

To assess effects of the intervention at the spinal level, the H-reflex in the paretic FCR muscle was measured in resting state. The median nerve of the paretic side was stimulated at the elbow by an electric pulse of 1-ms duration with arm and wrist muscles relaxed. The stimulus intensity was gradually increased from a level below the H-wave threshold to a level at which a stable maximum M-wave was elicited. The spinal excitability was assessed by ratio of the maximum H-reflex amplitude (Hmax) to the maximum M-wave amplitude (Mmax) (Hmax/Mmax).

In order to prevent the examiner bias, we recorded the subjects' behavior and the assessments of the examiner during the experiments by a video camera. Another examiner who did not know those of the pre- or the post-intervention checked carefully that the evaluation was always performed in the same way.

## 2.7. fMRI scanning

Data acquisition was performed on a 3.0-T Trio MRI system (Siemens, Erlangen, Germany) using a T2\*-weighted echoplanar image sequence (TR = 3000 ms, TE = 30 ms, voxel dimensions 3 mm × 3 mm × 3 mm, field of view 192 mm × 192 mm, matrix size 64 × 64, flip angle 90°). Functional runs were acquired on 3 occasions using identical scanning parameters and the same paradigm (pre: first scanning on inclusion, post-0: second scanning 30 min after the last session, post-1: third scanning 2 weeks after the last session). A high-resolution T1-weighted structural image also was acquired for each subject at baseline to assess the topography

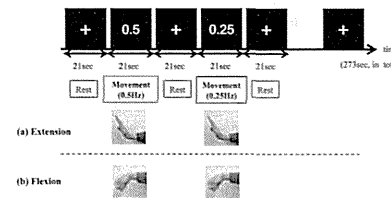


Fig. 2. Motor task during fMRI scanning. Using an fMRI block design, 2 conditions were scanned: (a) active extensor contraction and (b) active flexor contraction of a wrist and five digits in the paretic side paced by a visual cue (3 times of 0.5 Hz and 3 times of 0.25 Hz in a pseudorandom order). Active movement blocks of 21 s alternated with interspersed rest blocks of 21 s. Each experimental session included 6 active movement blocks and 7 resting blocks. The scanning time of one session was 273 s in total. The total 4 sessions were performed (2 sessions including the blocks of extensor contraction and 2 sessions including the blocks of flexor contraction, in a randomized order).

of structural brain damage caused by the infarcts (TR = 2000 ms, TE = 4.38 ms, voxel dimensions 1 mm × 1 mm × 1 mm, field of view 176 mm × 192 mm, flip angle 8°, 160 slices). An fMRI "block" design was used with 2 conditions: active extensor contraction or active flexor contraction of a wrist and five digits in the paretic side paced by a visual cue (3 times of 0.5 Hz and 3 times of 0.25 Hz in a pseudorandom order). Active movement periods (blocks) of 21 s alternated with interspersed periods of absolute rest (21 s). Each experimental session included 6 active movement blocks and 7 resting blocks. The scanning time of one session was approximately 4.5 min (Fig. 2). The total 4 sessions were performed (2 sessions including the blocks of extensor contraction and 2 sessions including the blocks of flexor contraction, in a randomized order). The subjects were instructed to perform the movements with two-third of the maximum effort in the first fMRI session. To achieve a similar level of EMG output across 3 fMRI sessions for each patient, the task performance was continuously monitored by the EMG peak amplitudes of both EDC and FCR muscles (BrainAmp system, Brain Products GmbH, Germany). The EMG peak amplitudes were targeted to those shown by two-third of the maximum effort in the first fMRI session. Before each scanning, they practiced the movements until their movements were stably maintained with the targeted EMG peak amplitudes. During the scanning, we checked whether their movements were performed with the targeted amplitudes by the EMG monitoring without any instruction given. The position of EMG electrodes of the post-0 and post-1 scanning was confirmed to be identical with that of the pre-scanning by checking the photos of the electrodes put on the bilateral forearms.

## 2.8. Data analysis

Imaging data were analyzed using Statistical Parametric Mapping (SPM5, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>) implemented in Matlab 2008b (The Mathworks Inc., USA) (Friston et al., 1995a,b; Worsley and Friston, 1995). All volumes were realigned to the first volume in order to correct for interscan movement. No subject moved >3 mm in any direction. The resulting volumes were then normalized to a standard echo planar imaging template based on the Montreal Neurological Institute reference brain in Talairach space (Talairach and Tournoux, 1998) and resampled to 2 mm × 2 mm × 2 mm voxels. All normalized images were smoothed with an isotropic 8 mm full-width half-maximum Gaussian kernel to account for intersubject differences and allow valid statistical inference according to Gaussian random field theory (Friston et al., 1995b). The time-series in

each voxel were high-pass filtered at 1/128 Hz to remove low frequency confounds and scaled to a grand mean of 100 over voxels and scans within each session. Images from patients with right-sided lesions were flipped around the midsagittal plane, so that all patients were assumed to have left hemispheric lesions. Statistical analysis was performed in voxel-based whole brain approach, separated by two stages. In the first stage, a single subject fixed effects model was used. Extensor and flexor movements were defined as different event types. Effects of the active movement blocks vs. rest were determined for each subject, session, and movement (extension and flexion). Second-level (random effects) analyses were run to calculate differences between activation patterns from sessions of the pre, post-0 and post-1 scanning by ANOVA using full-factorial design of SPM5. A post hoc *t*-test was used to evaluate group differences activation for movement of paretic upper-limbs before and after the intervention (pre vs. post-0 and pre vs. post-1).

In previous studies, it has been reported that the motor-related network of the brain including bilateral SMC, PMC, CMC and SMA was changed in the process of motor learning in healthy subjects (Floyer-Lea and Matthews, 2005) and of motor recovery in stroke patients (Ward et al., 2003a,b, 2006). Therefore, we set a priori hypothesis that the motor-related network would be changed in association with the motor recovery of stroke patients induced by our intervention protocol. We reported results of the second level analysis in a priori region of interests within the motor-related network at the significance threshold of  $p < 0.001$  ( $Z > 3.10$ ) uncorrected for multiple comparisons combined with cluster-wise threshold of 10 voxels. All these analyses were run for both extensor and flexor movements.

### 2.8.1. Functional region of interest (ROI) analysis

In order to further investigate whether the changes of clinical parameters can be explained by the change in brain activation patterns before and after the intervention, multiple linear regression analysis was performed using the percentage signal change (%SC) of ROIs which were selected from activation clusters acquired by second-level analyses during active extension movements and were estimated by MarsBaR-Toolbox (Brett et al., 2002) for each patient. We analyzed the post-0 and the post-1 conditions independently, because the short-term and long-term plastic changes of the motor-related network associated with recovery should represent the early- and late-phase of the consolidation process (Boyd and Lindsell, 2009; Floyer-Lea and Matthews, 2005; Kantak et al., 2012; Karni et al., 1998).

Firstly, we investigated the relationship between the %SC and the change of motor performance measured by active ROM in finger extension by using multiple linear regression analysis. In addition, to investigate the relationship between the %SC and the change of physiologic parameter of M1 measured by active MT, we also performed multiple linear regression analysis. Each difference between pre and post conditions ("post-0 – pre" and "post-1 – pre") of active ROM or active MT was used as an objective variable, and that of %SC in each brain area showing differences between pre and post-0/post-1 activation patterns in the previously described second-level analysis was used as an explanatory variable. Predictors were introduced in an ordinary square least method and retained in the model only if  $p < 0.05$  was achieved. Multiple linear regressions were assumed to be satisfied, as judged by testing for linearity, normality assumptions of the residues, outliers, independence of errors, homoscedasticity and multicollinearity (Chan, 2004).

## 2.9. Statistics

The behavioral and physiological parameters of the targeted upper limb were subjected to repeated measures ANOVA with time

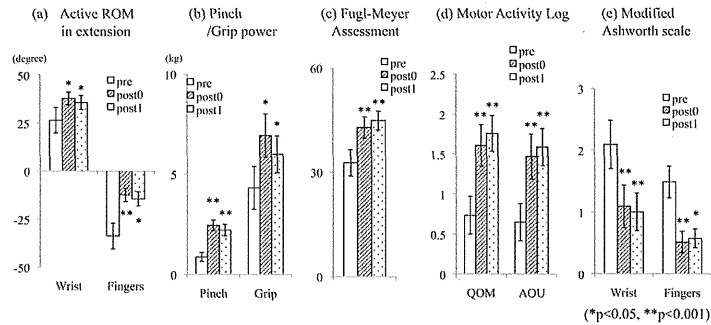


Fig. 3. Behavioral parameters before and after the hybrid-rehabilitation. After the hybrid-rehabilitation, the active ROMs in extension for the wrist joint and the MCP joints of the fingers (a), pinch and grip power (b), FMA (c) and MAL scores (d) were significantly increased and the mAS scores were significantly reduced (e) in the paretic upper-limbs in the post-conditions (\*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$ ). The negative scores in the active ROM meant that some patients could not do minimal extension (=0°) of their fingers.

(pre, post-0 and post-1) as a within-subject factor. The Bonferroni correction for multiple comparisons was used for post hoc t-test. The normal distribution was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. Effects were considered significant at  $p < 0.05$ . All data are given as the mean  $\pm$  SEM.

3. Results

No patients experienced side effects during the experiments. The stimulus intensity was  $21.9 \pm 1.47$  mA for electrical neuromuscular stimulation. The behavioral and neurophysiological assessments were confirmed to be performed in the same way in the pre- and post-intervention.

3.1. Effects of the hybrid-rehabilitation on motor performance

Significant performance gains in active ROM in extension, pinch power, grip power, FMA, MAL and mAS scores were observed after the intervention. Repeated measures ANOVA showed significant changes in the active ROM in extension for the wrist joint ( $F_{(2,20)} = 3.73, p = 0.042$ ) and for the MCP joints of fingers ( $F_{(2,20)} = 11.61, p < 0.001$ ), pinch power ( $F_{(2,20)} = 28.62, p < 0.001$ ), grip power ( $F_{(2,20)} = 14.60, p < 0.001$ ), FMA ( $F_{(2,20)} = 41.84, p < 0.001$ ), QOM ( $F_{(2,20)} = 23.43, p < 0.001$ ) and AOU ( $F_{(2,20)} = 16.28, p < 0.001$ ) of MAL and mAS scores for the wrist joint ( $F_{(2,20)} = 12.20, p < 0.001$ ) and for the MCP joints of fingers ( $F_{(2,20)} = 15.54, p < 0.001$ ). The post hoc t-test revealed significant increases in the post-0 and post-1 conditions compared with the pre-condition (Fig. 3). There was no significant difference in active ROM in flexion between those of the pre and post conditions. The pinch and grip power in the healthy side were  $4.7 \pm 0.6$  kg and  $27.9 \pm 3.2$  kg at baseline.

3.2. Effects of the hybrid-rehabilitation on physiological parameters

Active MTs of both the paretic EDC and FCR muscles were measured in nine of the eleven patients. Two patients did not show any apparent MEPs with the maximal intensity of the stimulator output during tonic contraction of the EDC or FCR muscles. Significant reduction of active MTs from the paretic EDC muscles was observed after the intervention (Fig. 4a). Repeated measures ANOVA showed a significant change ( $F_{(2,20)} = 6.25, p = 0.01$ ) and the post hoc t-test revealed significant reduction in the post-0 and post-1 conditions

compared with the pre-condition (pre vs. post-0,  $p = 0.01$  and vs. post-1  $p = 0.025$ ). There was no significant difference in active MTs from the paretic FCR muscles between those of the pre, post-0 and post-1 conditions ( $F_{(2,20)} = 1.51, p = 0.250$ ).

The H-latency was  $16.99 \pm 0.43$  ms. The Hmax/Mmax ratio was not significantly changed in the pre, post-0 and post-1 conditions ( $F_{(2,20)} = 1.20, p = 0.322$ ) (Fig. 4b).

3.3. Effects of the hybrid rehabilitation as assessed by fMRI

We confirmed that the subjects' movements were performed with the targeted EMG peak amplitudes during scanning. The EMG peak amplitudes during scanning were  $0.66 \pm 0.15, 0.77 \pm 0.15$  and  $0.65 \pm 0.13$  mV in the EDC muscles, and  $0.84 \pm 0.23, 0.91 \pm 0.14$  and  $0.82 \pm 0.18$  mV in the FCR muscles in the pre, post-0 and post-1 condition, respectively. There was no significant difference across the 3 fMRI experiments (EDC muscles:  $F = 1.62, p = 0.222$ ; FCR muscles:  $F = 0.190, p = 0.828$ ). In the pre-condition, active extensor movements of the paretic upper limb were associated with the large areas of activation including the ipsilesional sensorimotor cortex (SMC), the bilateral PMC, CMC, and the parietal and occipital areas. In the post-condition, the activation map showed the ipsilesional dominance for M1 and PMC. For flexor movements of the paretic upper limb, the general pattern of brain activation during the

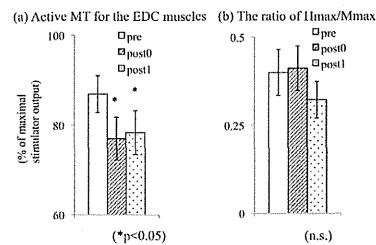


Fig. 4. The active motor threshold and the ratio of Hmax/Mmax before and after the hybrid-rehabilitation. After the hybrid-rehabilitation, the active MT for the paretic EDC muscles was significantly reduced in the post-conditions (\* $p < 0.05$ ) and the ratio of Hmax/Mmax was not changed ( $p > 0.05$ ).

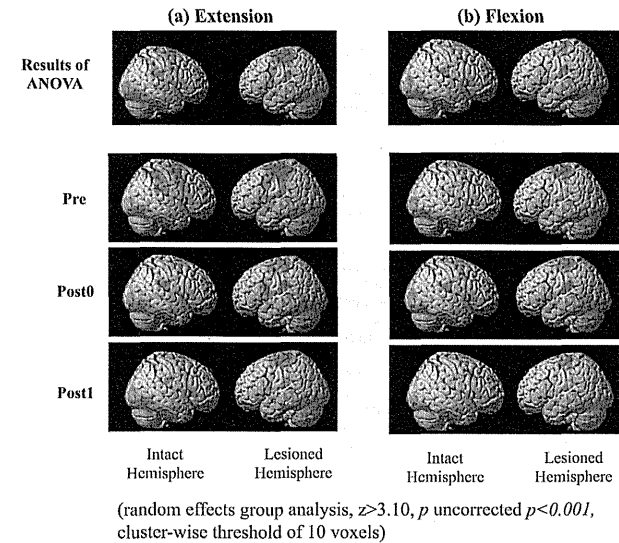


Fig. 5. Brain regions with activation during the extensor movement and the flexor movement. Brain regions with activation during the extensor movement (a) and the flexor movement (b) with the paretic upper-limb (vs. rest) before and after the hybrid-rehabilitation. Results are overlaid on the SPM rendered structural template (random effects group analysis,  $Z > 3.10, p$  uncorrected  $p < 0.001$ , cluster-wise threshold of 10 voxels).

pre-condition was similar to that for extensor movements, but the amount of activation was smaller in size. Brain activation associated with flexor movements during the post-condition was similar to that during the pre-condition (Fig. 5).

For extensor movements, a group level comparison between the pre and post-0 conditions showed a significant reduction of activation in the ipsilesional SMC and the contralateral CMC and the comparison between the pre and post-1 conditions showed a significant reduction of activation in the contralateral PMC (Fig. 6 and

Table 2). In contrast, there was no significant difference for flexor movements between the pre, post-0 and post-1 conditions.

To further delineate the relationship between changes of regional brain activation and functional gains induced by the hybrid-rehabilitation, we performed ROI analyses. For the multiple linear regression analysis just after the intervention (post-0 - pre), changes of active ROM in extension of fingers were not significantly associated with those of the %SC, while changes of active MT were significantly related to the changes of the %SC of the ipsilesional SMC ( $p = 0.017$ ) and the contralateral CMC ( $p = 0.009$ ) (Fig. 7). For the difference between pre- and post-1-condition, changes of active ROM in extension of fingers were significantly related to those of the %SC in the contralateral PMC ( $p = 0.020$ ) (Fig. 8). However, the change of active MT was not explained by the %SC in the contralateral PMC.

4. Discussion

The present study showed that the hybrid-rehabilitation combining 5 Hz-rTMS and extensor motor training of the paretic upper-limb induced a functional recovery such as an increase of active ROM in extension and grip power with reduction of spasticity, resulting in an improved daily use of the affected upper-limbs in chronic subcortical stroke patients as our previous study reported (Koganemaru et al., 2010). In a neurophysiological assessment, the active MT from the paretic EDC muscles was reduced without increase of spinal excitability measured by H-reflex, suggesting an increase of excitability of the ipsilesional M1 neurons involved in the paretic extensor muscles. Furthermore, our protocol induced a task-specific change of brain activity in the motor-related

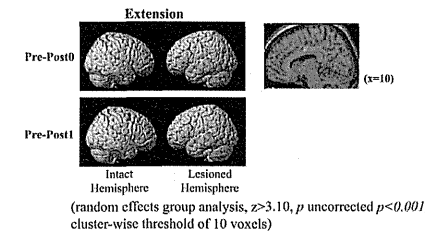


Fig. 6. Brain regions with reduced activation during the extensor movement after the hybrid-rehabilitation. Brain regions with reduced activation during the extensor movement with the paretic upper-limb after the hybrid-rehabilitation (pre- vs. post-intervention). Results are overlaid on the SPM rendered structural template (group level comparison between the pre- and post-conditions,  $Z > 3.10, p$  uncorrected  $p < 0.001$ ).



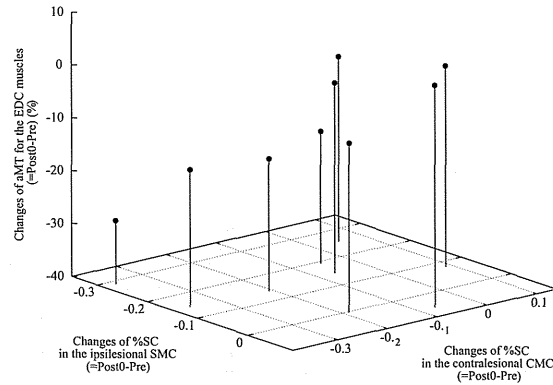


Fig. 7. The changes of %SC and the active motor threshold. The changes (=post-0 – pre) of %SC in the ipsilesional SMC (shown along the x-axis) and in the contralesional CMC from each individual patient (shown along the y-axis) plotted against the changes (=post-0 – pre) of active MT (%) for the paretic EDC muscles from each patient (shown along the z-axis).

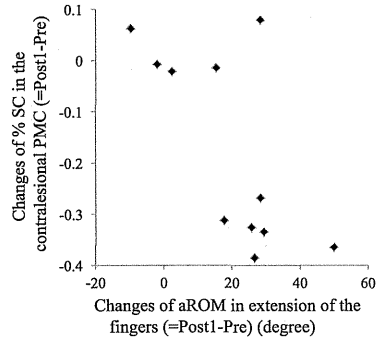


Fig. 8. The changes of %SC and the degree of the functional improvements. The changes (=post-1 – pre) of %SC in the contralesional PMC from each individual patient (shown along the y-axis) plotted against the degree of improvement (=post-1 – pre) of active ROM in extension of the fingers (shown along the x-axis).

**Table 2**  
Coordinates (in MNI standard space) and activation significance (Z statistics) of local maxima with extensor movements of the paretic upper-limb in the pre- vs. post-0- and post-1- condition.

Region	Side	Maximum Z-score	Clustering value (voxels)	MNI coordinates of maximum Z-score (mm)		
				x	y	z
Pre-post-0	L	3.67	29	-36	-20	40
	R	3.75	43	10	-6	38
Pre-post-1	R	3.35	51	32	6	56

R indicates right (intact) side; L, left (lesioned) side (random effects group analysis,  $Z > 3.10$ ,  $p$  uncorrected  $p < 0.001$ , cluster-wise threshold of 10 voxels).

Please cite this article in press as: Koganemaru, S., et al., Task-specific brain reorganization in motor recovery induced by a hybrid-rehabilitation combining training with brain stimulation after stroke. *Neurosci. Res.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.004>

et al., 1998). While over-activity was progressively decreased with an improvement of motor performance in the hemiparetic limbs (Calautti et al., 2001; Small et al., 2002; Ward et al., 2003a,b), some over-activity still remained, especially in patients with severe deficits in a chronic period (Feydy et al., 2002; Ward et al., 2003a,b).

Secondary motor areas such as PMC and CMC have dense corticocortical connections to M1 and direct corticospinal connections to the alpha-motoneurons in the anterior horn of the spinal cord. The PMC and the medial wall motor areas including the CMC have in part projections to the reticular formation which gives rise to bilateral reticulospinal projections, as well as SMC (Benecke et al., 1991; Dum and Strick, 1991; Lawrence and Kuypers, 1968a,b; Ohara et al., 2001). Over-activity of the non-M1 regions after stroke suggests a compensatory mechanism of the parallel motor pathway to the musculature instead of the damaged major motor pathway from M1 (Bestmann et al., 2010; Johansen-berg et al., 2002b). However, activation of secondary motor areas alone might not be sufficient to achieve a full motor recovery, because those projections to spinal cord motoneurons are less numerous to generate a sufficient excitatory response in the spinal cord than those from M1 (Ward et al., 2003a,b).

In accordance with previous studies, the present study showed the wide-spread brain activity in secondary motor areas of both hemispheres, in particular, during extensor movements of the paretic upper-limb probably due to a more pronounced damage to the corticospinal tract from the M1 involved in the paretic extensor function. However, after the hybrid rehabilitation, brain activity in contralesional secondary motor areas such as CMC and PMC was reduced during extensor movements of the paretic upper-limb. The functional gains of the paretic extensor finger movements were associated with degree of reduction of the contralesional PMC activity.

Previous studies showed enhanced executive properties of the contralesional PMd in patients with greater corticospinal damage (Bestmann et al., 2010; Johansen-berg et al., 2002b; Ward et al., 2006). Paired-pulse TMS showed a less inhibitory/more facilitatory effect of the contralesional PMC over the ipsilesional SMC in more severely impaired patients, which was state dependent, stronger during a motor task with the paretic hand than at rest (Bestmann et al., 2010). However, when the major motor pathway regained its function by a spontaneous recovery or an effective rehabilitative approach, a role of the parallel motor pathway would be reduced, leading to decreased brain activity in both secondary motor areas (Kantak et al., 2012; Ward et al., 2003a,b, 2004; Ward and Cohen, 2004). The finding of reduced activity in the contralesional PMC during the extensor movements suggests that motor drive would be state-dependently shifted from the parallel motor pathway to the major motor pathway associated with the recovered extensor functions after the hybrid rehabilitation.

Non-invasive brain stimulation does not only change activation in a cortical site underneath the stimulation coil, but also in brain regions interconnected with the stimulated site (Chouinard et al., 2003; Lee et al., 2003). Nowak et al. (2008) showed that parietal activity in non-M1 regions such as contralesional PMC and parietal cortex was reduced after 1 Hz-rTMS was given over the contralesional M1 area in subcortical stroke patients. In the present protocol combining rTMS and motor training, activity change of the contralesional PMC specifically occurred during the trained movements and correlated with improvement of the trained hand function.

Shortly after the hybrid-rehabilitation, we found reduced brain activity in the ipsilesional SMC, which was situated deeply and posteriorly from the stimulated site, and contralesional CMC during the paretic EDC muscles was associated with the degree of reduction of brain activity in those areas. Repetitive motor training was

reported to change neuronal properties within M1. A recent animal study showed that repetitive practices to develop a new motor skill profoundly reduced a metabolic activity in M1 with little difference of neuron firing during the internally generated tasks in monkeys (Picard et al., 2013). The area showing activity change in the CMC situated caudally (Picard and Strick, 1996, 2001). The caudal CMC is activated during continuous execution of a relative simple (Paus, 2001; Paus et al., 1993; Playford et al., 1992), rather proximal upper-limb movement (Grafton et al., 1993), and more ventrally, activated during somatosensory stimulation in normal subjects (Kwan et al., 2000). It has large pyramidal-shaped neurons with morphological features of a primordial motor area, which project to the spinal cord (Picard and Strick, 1996). We speculate that reduction of the contralesional CMC activity in concurrence with reduction of the ipsilesional SMC activity might have reflected a decrease of compensatory activation for insufficient motor outputs and load of the sensorimotor processing along with increased excitability of the ipsilesional M1 neurons.

In the present study, the hybrid-rehabilitation reduced activity of the ipsilesional SMC and contralesional CMC as a short-term effect, and the contralesional PMC as a long-term effect. Therefore, effects of the hybrid-rehabilitation seemed temporally and contextually different in each brain area. The process of motor learning consisted of a fast learning stage during and shortly after practice, and a slow learning stage days after practice for retention of an acquired motor skill. Specific neural representations are known in each stage (Kantak et al., 2012; Karni et al., 1998). Shortly after the motor learning was established, activity in the M1 and CMC decreased due to more efficient motor pathway (Floyer-Lea and Matthews, 2005). Meanwhile, the dorsal PMC was reported to modify post-practice consolidation phase for retention of an acquired skill (Boyd and Lindsell, 2009). The activity changes in the ipsilesional SMC and the contralesional CMC might have shown combined effects of a fast and a slow learning stage due to the final installment of the hybrid rehabilitation just before the scanning. The activity change in the contralesional PMC might have been involved in a consolidative process of a slow learning stage.

Based on a priori hypothesis, we have adopted the significance threshold of uncorrected  $p$  values combined with clustering value of 10 voxels in our imaging analysis. While the threshold of uncorrected  $p$  values combined with minimum voxel clustering value of 10 voxels has been practically used in various neuroimaging analyses (Absher et al., 2000; Ahmed et al., 2012; Bartos et al., 2009; Busatto et al., 2000; Gizewski et al., 2006; Havel et al., 2006; Matsumoto et al., 2010; Pinto et al., 2011; Schacter et al., 1996; Scheuercker et al., 2009; Wolf et al., 2012; Yoo et al., 2005), it is still controversial due to less rigorous control of false positive errors (Bennett et al., 2009). To confirm our findings, a further investigation would be necessary in future.

The beneficial effects of neuromuscular stimulation have been reported on hypertonia of paretic upper limbs in some studies (Dewald et al., 1996; Fujiwara et al., 2009; Hummelshelm et al., 1997), while not in others (Hines et al., 1993). Neuromuscular stimulation of our protocol had little influence on hypertonia in our previous study (Koganemaru et al., 2010). However, by pairing the peripheral sensory stimulation and the stimulation of M1 governing the same target muscle, the inhibitory or facilitatory effects could be induced in the sensorimotor cortex depending on their relative timing (Marianenzi et al., 1991; Stefan et al., 2000). Proprioceptive inputs from neuromuscular stimulation might have enhanced the facilitatory effects of rTMS.

Our hybrid-rehabilitation induced an enhancement of pinch and grip power with functional improvement of extensors in the paretic wrist and hand. In previous studies, wrist position has a great influence on hand function (Ciriello et al., 2001; Fong and Ng, 2001; Louis and Hankin, 1986; Mathur et al., 2004; Suzuki et al., 2012). Ability

Please cite this article in press as: Koganemaru, S., et al., Task-specific brain reorganization in motor recovery induced by a hybrid-rehabilitation combining training with brain stimulation after stroke. *Neurosci. Res.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.004>

to hold the position of wrist extension enables to exert larger force of pinch and grip than that of wrist flexion, probably due to appropriate tension of flexor tendons with wrist extension (Louis and Hankin, 1986; Mathur et al., 2004; Suzuki et al., 2012). Our results suggested that extensors improvements of the parietic wrist might have resulted in improvements of grip and pinch power involving flexion movements.

Effective rehabilitative intervention such as intensive motor training and additional brain stimulation might induce task-specific brain reorganization. If task-specificity of multi-regional brain reorganization is the general principle in neuro-rehabilitation, the activity-dependent brain stimulation using TMS or transcranial direct current stimulation with the repetitive training of target action including our protocol might be a fast lane to stroke recovery.

Acknowledgements

This study was partly supported by Grant-in-Aid for JSPS Fellows (25–5251), by Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (26870321), by the Shimizu Foundation for Immunology and Neuroscience Grant for 2013 (203130600051), by Research Grant-in-Aid from the Magnetic Health Science Foundation (203130600054) (to S.K.), by Grant-in-Aid for Scientific Research (B) (24300192) and for Exploratory Research (24650226) (to T.M.) from the Japan Society for the Promotion of Science and by Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, “Glia assembly” a new regulatory machinery of brain function and disorders” (25117008) (to H.F.).

References

Absher, J.R., Hart, L.A., Flowers, D.L., Dagenbach, D., Wood, F.B., 2000. Event-related potentials correlate with task-dependent glucose metabolism. *NeuroImage* 11, 517–531.

Ahmed, F., Spottiswoode, B.S., Carey, P.D., Stein, D.J., Seedat, S., 2012. Relationship between neurocognition and regional brain volumes in traumatized adolescents with and without posttraumatic stress disorder. *Neuropsychobiology* 66, 174–184.

Ashworth, B., 1964. Preliminary trial of carisoprodol in multiple sclerosis. *Practitioner* 192, 540–543.

Bartos, R., Jech, R., Vymazal, J., Petrovicky, P., Vachata, P., Hejda, A., Zolal, A., Sames, M., 2009. Validity of primary motor area localization with fMRI versus electrical cortical stimulation: a comparative study. *Acta Neurochir. (Wien)* 151, 1071–1080.

Benecke, R., Meyer, B.U., Freund, H.J., 1991. Reorganization of descending motor pathways in patients after hemispherectomy and severe hemiparesis lesions demonstrated by magnetic brain stimulation. *Exp. Brain Res.* 83, 419–426.

Bennett, C.M., Wolford, G.L., Miller, M.B., 2009. The principled control of false positives in neuroimaging. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 4, 417–422.

Bestmann, S., Swagney, O., Blankenburg, F., Ruff, C.C., Teo, J., Weiskopf, N., Driver, J., Rothwell, J.C., Ward, N.S., 2010. The role of contralateral dorsal premotor cortex after stroke as studied with concurrent TMS-fMRI. *J. Neurosci.* 30, 11926–11937.

Bohannon, R.W., Smith, M.B., 1987. Intra-rater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. *Phys. Ther.* 67, 206–207.

Boyd, L., Lindsell, M., 2009. Excitatory repetitive transcranial magnetic stimulation to left dorsal premotor cortex enhances motor consolidation of new skills. *BMC Neurosci.* 10, 72.

Brett, M., Anton, J.L., Valabregue, R., Poline, J.B., 2002. Region of interest analysis using a SPM toolbox. *NeuroImage* 16 (2).

Busatto, G.F., Zanjanani, D.R., Buchpiguel, C.A., Carrido, G.E., Glabus, M.F., Rocha, E.T., Maia, A.F., Rosario-Campos, M.C., Campi Castro, C., Furlie, S.S., Gutierrez, M.A., McGuire, P.K., Miguel, E.C., 2000. A voxel-based investigation of regional cerebral blood flow abnormalities in obsessive-compulsive disorder using single photon emission computed tomography (SPECT). *Psychiatry Res.* 99, 15–27.

Butefisch, C., Hummelshelm, H., Denzler, P., Mauritz, K.H., 1995. Repetitive training of isolated movements improves the outcome of motor rehabilitation of the centrally parietic hand. *J. Neurol. Sci.* 130, 59–68.

Butefisch, C.M., Davis, B.C., Wise, S.P., Sawaki, L., Kopylev, L., Classen, J., Cohen, L.G., 2000. Mechanisms of use-dependent plasticity in the human motor cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3661–3665.

Calautti, C., Baron, J.-C., 2003. Functional neuroimaging studies of motor recovery after stroke in adults: a review. *Stroke* 34, 1553–1566.

Calautti, C., Leroy, F., Guineestre, J.Y., Baron, J.C., 2001. Dynamics of motor network overactivation after striatocapsular stroke: a longitudinal PET study using a fixed-performance paradigm. *Stroke* 32, 2534–2542.

Carey, J.R., Kimberley, T.J., Lewis, S.M., Auerbach, E.J., Dorsey, L., Rundquist, P., Ugurbil, K., 2002. Analysis of fMRI and finger tracking training in subjects with chronic stroke. *Brain* 125, 773–788.

Please cite this article in press as: Koganemaru, S., et al., Task-specific brain reorganization in motor recovery induced by a hybrid-rehabilitation combining training with brain stimulation after stroke. *Neurosci. Res.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.004>

Koganemaru, S., Mima, T., Thabit, M.N., Ikkaku, T., Shimada, K., Kanematsu, M., Takahashi, K., Fawi, G., Takahashi, R., Fukuyama, H., Domen, K., 2010. Recovery of upper-limb function due to enhanced use-dependent plasticity in chronic stroke patients. *Brain* 133, 2373–2384.

Kwan, C.L., Crowley, A.P., Mikulis, D.J., Davis, K.D., 2000. An fMRI study of the anterior cingulate cortex and surrounding medial wall activations evoked by noxious cutaneous heat and cold stimuli. *Pain* 85, 359–374.

Lawrence, D.G., Kuypers, H.G., 1988a. The functional organization of the motor system in the monkey I. The effects of bilateral pyramidal lesions. *Brain* 91, 1–14.

Lawrence, D.G., Kuypers, H.G., 1988b. The functional organization of the motor system in the monkey II. The effects of lesions of the descending brain-stem pathways. *Brain* 91, 15–36.

Lee, L., Siebner, H.R., Rowe, J.B., Rizzo, V., Rothwell, J.C., Frackowiak, R.S., Friston, K.J., 2003. Acute remapping within the motor system induced by low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. *J. Neurosci.* 23, 5308–5318.

Louis, D.S., Hankin, F.M., 1986. Arthrodesis of the wrist: past and present. *J. Hand Surg. Am.* 11, 787–789.

Luft, A.R., McCombe-Waller, S., Whital, J., Macko, R., Sorokin, J.D., Schulz, J.B., Goldberg, A.P., Hanley, D.F., 2004. Repetitive bilateral arm training and motor cortex activation in chronic stroke: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* 292, 1853–1861.

Maniorenzi, R., Zarola, F., Caramia, M.D., Paradiso, C., Rossini, P.M., 1991. Non-invasive evaluation of central motor tract excitability changes following peripheral nerve stimulation in healthy humans. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 81, 90–101.

Masiero, S., Carraro, E., 2008. Upper limb movements and cerebral plasticity in post-stroke rehabilitation. *Aging Clin. Exp. Res.* 20, 103–108.

Mathur, K., Pyssnet, P.B., Vohra, S.B., Thomas, B., Deshmukh, S.C., 2004. Effect of wrist position on power grip and key pinch strength following carpal tunnel decompression. *J. Hand Surg. (Br. Eur. Vol.)* 29, 390–392.

Matsumoto, R., Ito, H., Takahashi, H., Ando, T., Fujimura, Y., Nakayama, K., Okubo, Y., Obata, T., Fukui, K., Suhara, T., 2010. Reduced gray matter volume of dorsal cingulate cortex in patients with obsessive-compulsive disorder: a voxel-based morphometric study. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 64, 541–547.

Nelles, G., Jentzen, W., Jueptner, M., Miller, S., Diener, H.C., 2001. Arm training-induced brain plasticity in stroke studied with serial positron emission tomography. *NeuroImage* 13, 1146–1154.

Neumann-Haefelin, T., Staiger, J.F., Redeker, C., Zilles, K., Fritschy, J.M., Mohler, H., Witte, O.W., 1998. Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilaterally to photoelectrically induced cortical infarcts in rats. *Neuroscience* 87, 871–879.

Nowak, D.A., Grefkes, C., Dafotakis, M., Eickhoff, S., Kust, J., Karbe, H., Fink, G.R., 2008. Effects of low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of the contralateral primary motor cortex on movement kinematics and neural activity in subcortical stroke. *Arch. Neurol.* 65, 741–747.

Nudo, R.J., Milliken, G.W., 1996. Reorganization of movement representations in primary motor cortex following focal ischemic infarcts in adult squirrel monkeys. *J. Neurophysiol.* 75, 2144–2149.

Nudo, R.J., Milliken, G.W., Jenkins, W.M., Merzenich, M.M., 1996a. Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J. Neurosci.* 16, 785–807.

Nudo, R.J., Wise, B.M., SiFuentes, F., Milliken, G.W., 1996b. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science* 272, 1791–1794.

Ohara, S., Mima, T., Baba, K., Ikeda, A., Kunieda, T., Matsumoto, R., Yamamoto, J., Matsushashi, M., Nagamine, T., Hirasawa, K., Hori, T., Mihara, T., Hashimoto, N., Salenius, S., Shibasaki, H., 2001. Increased synchronization of cortical oscillatory activities between human supplementary motor and primary sensorimotor areas during voluntary movements. *J. Neurosci.* 21, 9377–9386.

Oldfield, R.C., 1971. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 9, 97–113.

Paus, T., 2001. Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 417–424.

Paus, T., Petrides, M., Evans, A.C., Meyer, E., 1993. Role of the human anterior cingulate cortex in the control of oculomotor, manual, and speech responses: a positron emission tomography study. *J. Neurophysiol.* 70, 453–469.

Picard, N., Matsuzaka, Y., Strick, P.L., 2013. Extended practice of a motor skill is associated with reduced metabolic activity in M1. *Nat. Neurosci.* 16, 1340–1347.

Picard, N., Strick, P.L., 1996. Motor areas of the medial wall: a review of their location and functional activation. *Cereb. Cortex* 6, 342–353.

Picard, N., Strick, P.L., 2001. Imaging the premotor areas. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 663–672.

Pinto, S., Mancini, L., Jahanshahi, M., Thornton, J.S., Tripoliti, E., Yousry, T.A., Limousin, P., 2011. Functional magnetic resonance imaging exploration of combined hand and speech movements in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 26, 2212–2219.

Please cite this article in press as: Koganemaru, S., et al., Task-specific brain reorganization in motor recovery induced by a hybrid-rehabilitation combining training with brain stimulation after stroke. *Neurosci. Res.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2014.10.004>

特集1 経頭蓋磁気刺激の臨床応用update

反復経頭蓋磁気刺激と運動訓練のハイブリッド法による脳卒中の治療と感覚性運動失調への応用\*

美馬達哉\*\*  
小金丸聡子\*\*

Key Words : repetitive TMS, use-dependent plasticity, hybrid rehabilitation

はじめに

私たちは、高頻度反復経頭蓋磁気刺激(rTMS)と反復伸展運動を繰り返すプロトコル(ハイブリッド・リハビリ)を新しく考案し、屈曲拘縮を伴う中等度以上の片麻痺患者に適用すると上肢の運動機能が改善することを報告し<sup>1)</sup>、症例を積み重ねるとともに、その脳内機構について検討を進めている。本稿では、このハイブリッド・リハビリを紹介するとともに、視床出血で体性感覚障害の強い症例でも、巧緻運動の改善がみられた2例を報告する。

使用依存的可塑性 (use-dependent plasticity) とは

成人の運動障害の主要な原因の一つが脳卒中の後遺症であることはよく知られている。そして、脳卒中後に生じる機能的回復には脳可塑性つまり、残存神経細胞でのシナプス結合の強化や新たなシナプス結合の創出を通じて起きる脳機能マップの再組織化が関与しているとされる<sup>2)3)</sup>。

急性期・亜急性期に特に集中的に行われる反復運動によるリハビリの有効性の神経科学的基

礎には、使用依存的可塑性 (use-dependent plasticity) があると考えられる<sup>4)5)</sup>。特定の運動や課題を集中的に繰り返すことは特定の神経回路を繰り返し活性化することになり、シナプス長期増強 (long-term potentiation : LTP) を一次運動野 (primary motor cortex : M1) での可塑性を生じさせるからである。

ただし、こうしたプロセスはおおむね脳卒中後数か月以内に生じるもので、6か月以上を経た慢性期においては、脳可塑性による変化はわずかになる<sup>6)7)</sup>。そのため、慢性期でのリハビリを効果的な治療へと高めていくためには、なんらかの手法で使用依存的可塑性を増強することが必要となる。その一つは慢性期の上肢機能改善をもたらす手法として知られるCI療法 (constraint-induced movement therapy) である<sup>8)~10)</sup>。これは、健側上肢を固定して患側を集中的に動かすことで、慢性期でも運動機能を改善させることができる。ただし、重度の麻痺の場合には、患側を使用することが極度に困難であるため、CI療法の適応になりづらいという限界があった。

集中的な運動トレーニング以外で、使用依存的可塑性を強化する治療戦略としては、rTMSや経頭蓋的直流刺激法 (transcranial DC stimulation : tDCS) のような脳刺激法がある<sup>11)~13)</sup>。とくにrTMSについては、M1刺激を行うことで皮質内のシナ

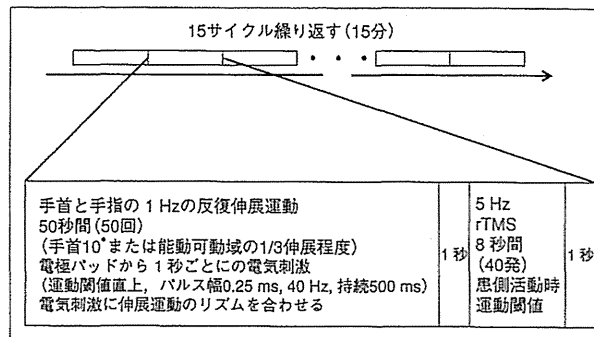


図1 ハイブリッド・リハビリの介入手法  
1 Hzで50秒の手首と手指での反復伸展運動と8秒の高頻度rTMS(5 Hz)を1秒の間を置いて15回繰り返す(合計15分)。

プス結合にLTPやシナプス長期抑制 (long-term depression : LTD) を生じさせて、可塑性を誘導することで治療効果が生じると考えられている。単純な反復刺激の場合には、刺激頻度によってLTPかLTDかが決まり、一般的に5~20 Hzの高頻度刺激ではLTP、1 Hzの低頻度刺激ではLTDが生じる。患側M1の機能促進が目標であるため、高頻度刺激を患側M1に与えるか、健側M1に低頻度刺激を与えることが行われる。両側M1は脳梁を介して抑制的に結合しているため、健側M1を抑制することは、患側M1への脳梁を介する抑制性投射を減少させて、結果として患側M1促進を生み出すと考えられている。高頻度刺激に比べて、低頻度刺激の場合は、TMSによっててんかん発作を生じるリスクがきわめて低いため、臨床上、健側低頻度刺激が治療的介入としては好まれる。また、脳卒中患者での治療的効果を患側高頻度刺激と健側低頻度刺激で比較した研究では、同じく健側低頻度刺激の方が有効性が高いとの報告がある<sup>14)~16)</sup>。

また、それ以外に、たんなる反復刺激ではなく、特定のパターンの刺激を繰り返すパターン刺激(たとえばtheta burst刺激<sup>17)</sup>やquadripulse stimulation(本特集号))も臨床応用が試みられている。

rTMSと反復運動を組み合わせたハイブリッド・リハビリ

中等度から重度の脳卒中後麻痺の患者では、

脱力に加えて屈曲拘縮を生じている場合が多い。こうした場合は、患側の筋力が全体的に改善したとしても、そのために拘縮も強くなってしまい、うまく患側上肢を機能させることができない場合がある。したがって、上肢伸筋群を選択的に増強することができれば、脱力と同時に屈曲拘縮をも改善させることができ、上肢機能をより効率的に改善させることが予測される。

そこで、たんにrTMSによってM1にLTPをひき起こすことで脱力の改善を図るのではなく、rTMSに伸筋群の反復運動を組み合わせることで、伸筋群を支配するM1部位で選択的に使用依存的可塑性を増強させることを目指すのが本ハイブリッド・リハビリの特徴である。具体的には、手首と指の反復伸展運動と高頻度rTMSを交互に繰り返すというプロトコルによる介入である。ただし、中等度から重度の片麻痺患者の場合で、とくに屈曲拘縮を伴う際には一つ問題があった。それは、患者の自発運動としては、拘縮のために反復伸展運動を十分に行えないという限界である。そこで、十分な大きさの伸展運動を実現するために、本ハイブリッド・リハビリでは、伸筋群に対して電気刺激 (electrical neuromuscular stimulation) を与えている。

すでに報告した通りのプロトコルであり、具体的には下記のようにして実施する<sup>1)</sup>(図1)。

rTMSは8の字型コイルを用いて、患側M1での総指伸筋支配部位(運動誘発電位が得られない

\* Hybrid rehabilitation for stroke patients combining repetitive TMS and motor training—Possible application to sensory ataxia.

\*\* Tatsuya MIMA, M.D., Ph.D. & Satoko KOGANEMARU, M.D., Ph.D.: 京都大学大学院医学研究科附属脳機能総合研究センター(〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町54); Human Brain Research Center, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto 606-8507, Japan.

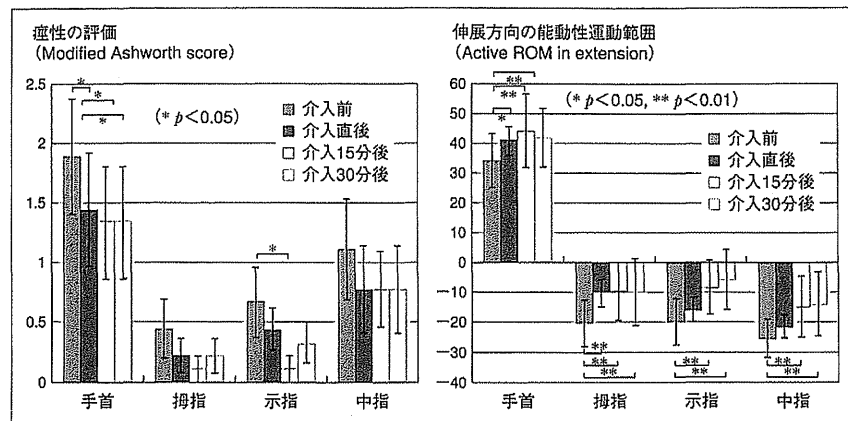


図2 ハイブリッド・リハビリの短期効果(15分介入1回後)

屈曲拘縮の減少, 伸展方向の能動運動範囲拡大が, 介入直後から30分程度は持続していた。なお, 反復運動訓練のみ, 高頻度rTMSのみでは改善はみられなかった。

場合は健側M1での総指伸筋支配部位に対応する部位)に与えた。刺激強度は, 活動時の運動閾値(active motor threshold)あるいは運動誘発電位がみられない場合は機器出力の100%とした。rTMSは5 Hzで8秒(40発)与えた。

反復伸展運動は, 患側上肢の手首と指を1 Hzのリズムで伸展してはリラックスする運動を50秒繰り返させるものであった。おおよそ手首が10°または能動可動域の1/3伸展することを目安とした。患側総指伸筋には電極パッド(5×5 cm)を添付して, 1秒ごとに運動閾値直上の電気刺激(パルス幅0.25 ms, 40 Hz, 持続500 ms)を与え, 電気刺激に伸展運動のリズムを合わせるように教示した。麻痺が強い場合には, 手首の10°伸展を目安に電気刺激の強度を上げている。この手法によって, 患者自身の自発運動を活かしつつ, 麻痺の重症度にかかわらずほぼ同じ大きさの反復伸展運動を行うことが可能となった。

この50秒の反復運動と8秒の高頻度rTMSを1秒の間を置いて15回繰り返すのが1回の介入である(15分間)。この15分の介入を, 外来通院で, 週に2回, 6週間行うことで, ハイブリッド・リハビリが慢性期片麻痺の上肢運動機能を改善させるかどうかを評価した。

最初の検討としては, クロスオーバーで, 皮

質下に病変を持つ慢性期脳卒中患者9名(平均51歳, 男性4名, 発症から5か月以上経過)を対象として1回の介入(15分間)を行い, その直後の運動機能を観察した。ハイブリッドで行う方が, 高頻度rTMS単独や反復運動単独の場合と比較して, 相乗的に効果的であるかどうかを確認するのが目的である。主要な評価項目としては, 痙性の評価としてmodified Ashworthスコア(mAS), 運動評価として能動的可動域(active ROM: aROM)と握力を評価した。

その結果, この介入プロトコルの条件では, 反復運動訓練のみ, 高頻度rTMSのみでは改善はみられず, 運動訓練とrTMSを組み合わせた場合のみ, 介入直後から少なくとも30分程度は持続する改善が得られた(図2)。具体的には, 屈曲拘縮の減少(mAS: 0.2~0.5減少), 伸展運動の範囲拡大(aROM: 3~12°), 握力の改善(2~3 kg)が認められた。この結果は, ハイブリッド・リハビリが反復運動訓練と高頻度rTMSの相乗効果によって屈曲拘縮を改善させていることを示すものであった。

そこで, さらにこの生理機構を解明するために, 高齢健常者9名を対象として, ハイブリッド・リハビリと同じ介入を1回だけ行い, 今度はTMSによる運動誘発電位の変化を詳細に検討

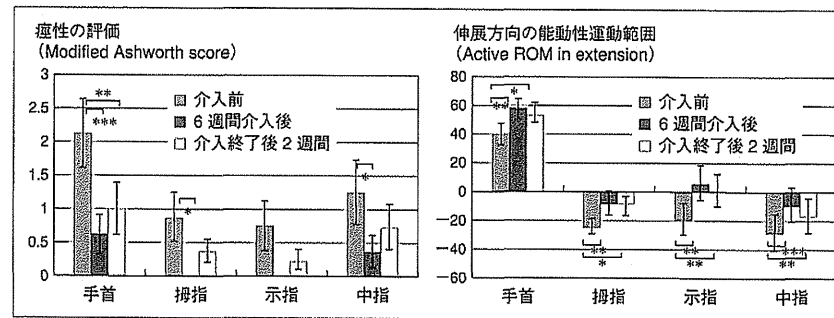


図3 ハイブリッド・リハビリの長期効果(6週間後)

屈曲拘縮の減少, 伸展方向の能動運動範囲拡大が6週間の介入後には認められ, 介入を終えて2週間後まで持続していた。

した。これは, 脳卒中後患者では錐体路障害のために運動誘発電位の記録困難な症例が多く, 詳細な生理学的検討が困難なためである。結果の詳細は原著として発表しているので省くが, まとめて, ハイブリッド・リハビリ後に前腕伸筋群でのみ, 介入30分後までの錐体路興奮性の増大(運動誘発電位増大, 活動時運動閾値低下など)が認められた。一方, 前腕屈筋群では介入による変化はみられなかった。この結果は, 介入後に患側M1で, 伸筋群に選択的に, より多くの錐体細胞がリクルートされていること, すなわち運動マップの機能的再組織化が生じていることを示唆している。

以上の基礎実験から, ハイブリッド・リハビリがたんなる反復運動やrTMS単独よりも有効性が高いことが示唆されたので, 同じ患者群で, 外来通院で15分の介入を週に2回で連続6週間行って, その長期効果を評価した。評価は, 介入前, 6週間終了後とその2週間後に再度運動機能を測定した。その結果, 屈曲拘縮の減少(mAS: 0.7~1.0減少), 伸展運動の範囲拡大(aROM: 16~19°), 握力の改善(3~4 kg)の改善が認められ, 2週間後も持続していた(図3)。

こうした検討から, 反復伸展運動トレーニングと高頻度rTMSを組み合わせたハイブリッド・リハビリは, 使用依存的可塑性を増強する有効なりハビリ手法と考えられた。

また, rTMSでは頭皮上から大脳皮質までの距離があるために, 十分に脳に刺激を与える強度

にする磁場の分布も拡大し, 刺激される脳領域が広がってしまい, 空間的分解能が損われるという限界がある。本手法は, 特定の筋群(この場合は前腕伸筋群)の反復運動とrTMSを組み合わせることで, 前腕伸筋群を支配する錐体細胞に選択的に可塑的变化をひき起こすことを可能とした点でも, 今後の臨床的応用性が広いと考えられる。

#### 感覚性運動失調への応用

こうしたハイブリッド・リハビリの手法を, 私たちは, 麻痺の程度は比較的軽い感覚障害が強いためにADLが損われている症例に関しても応用できるかを検討している。その理由は複数ある。一つは, 高度の感覚障害を伴う症例では, 体性感覚フィードバックの低下による運動障害や異常運動や失調を生じており, そのリハビリとしては, 視覚などの感覚フィードバックを利用した反復訓練などが試みられているが, その有効性には限界があるということである。もう一つは, 私たちの考案したハイブリッド・リハビリの手法は, 反復運動と高頻度rTMSを組み合わせたものであるため, 使用依存的可塑性をひき起こす反復運動には運動遂行に加えて, (障害されているとしても)残存した体性感覚フィードバックの要素も含まれているからである。実際のrTMSはおそらくM1だけではなく隣接した体性感覚野にも波及していると推定され, 残存した感覚フィードバックに対しても, 運動機能