

令和元年6月6日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12941

研究課題名(和文)小脳変性マウスにリハビリ運動とD型アミノ酸投与で抗運動失調効果を示す機序の研究

研究課題名(英文) Study on the mechanism of the anti-ataxia effect of rehabilitation exercise and D-type amino acid administration in cerebellar degeneration mice

研究代表者

別府 英博(別府秀彦)(Beppu, Hidehiko)

藤田医科大学・医療科学部・准教授

研究者番号：30142582

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文):我々が発見した歩行異常の小脳変性マウス(Wob/t)は小脳プルキンエ細胞の変性である。その原因の遺伝子候補を特定し、免疫抗体を用いWild Typeと比較したところ明らかにタンパク発現量が少なかった。一方、Wob/tマウスに種々の脳機能活性成分を投与する試験において、多数の食品機能性成分の中から、D型セリン、えごま実混餌投与群が非投与群に対しロータロッド試験など評価から、歩行異常の軽減が有意に認められた。また、病理組織から小脳細胞の変性の細胞数が減少が観察された。以上の成果からのWob/tは小脳変性細胞の賦活を探るマウスとして有用であり、小脳失調症患者のモデルマウスとして有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が発見した新奇の小脳変性マウスの原因遺伝子の候補が確定した。現在、遺伝子のノックイン遺伝子改変試験で証明をするところである。このマウスは、難病のひとつである、脊髄小脳変性症と類似することから、研究意義は大きい。

一方、このマウスは生後間もなくから小脳神経細胞変性を発症し、四肢の運動障害を起こしながらも、2年の寿命を全うする個体が多くみられる。よって、このマウスの歩行障害を改善させる方法を探求することは、小脳失調症の患者や、高齢者の歩行障害の改善を研究するモデル動物として期待できる。

研究成果の概要(英文):The cerebellar degenerative mice (Wob/t)of the abnormal gait we have found are degeneration of the cerebellar Purkinje cells. To identify the gene candidate for the cause, clearly the protein expression level was small compared to Wild Type using the immune antibody. On the other hand, in the test of administering a variety of brain function active ingredients Wob/t mice, from among a number of food functional ingredients, D-type serine, from the evaluation such as rotor rod test to the non-administered group of sesame seed real-mixed bait Administration Group, reduction of gait abnormality was significantly observed. In addition, the number of cells of degeneration of cerebellar cells from the pathological tissue was observed decreased. Wob/T from the above results is useful as a mouse to explore the activation of cerebellar-modified cells, it is useful as a model mouse for cerebellar ataxia patients.

研究分野：リハビリテーション医学・病態生化学領域

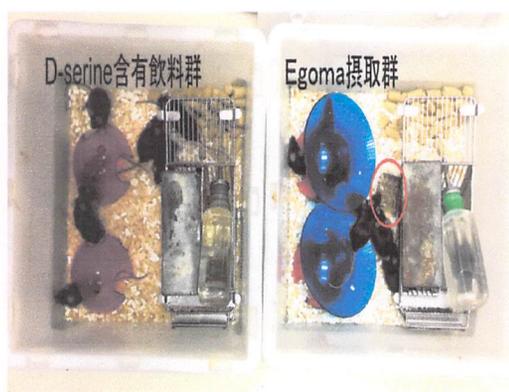
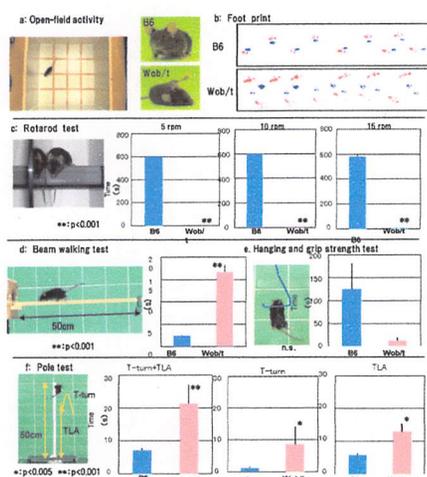
キーワード：小脳失調症 リハビリ運動訓練 プルキンエ細胞変性 運動失調 歩行解析 環境エンリッチメント飼育
原因遺伝子解析 高齢者歩行障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症 (SCD) 患者の運動機能改善を高める有効なリハビリ訓練法が未だ確立されていない。医療現場では、脊髄小脳系以外の運動機能を保つリハビリ訓練が優先され、当該疾患で損なわれていく協調運動や平衡機能などが失速するのを経過観察するしかない。

申請者らは、SCD に類似する病態を示す小脳失調マウス (Wob/t) を維持している。平成 22-24 年科研費助成事業 (挑戦的萌芽研究) の支援により『脊髄小脳変性症患者のリハビリ訓練の効果を小脳失調モデルマウスで評価する技術の確立』の研究を進めた。また、平成 25-28 年同助成事業 (基盤研究 B) では、『SCD 患者のリハビリ訓練を小脳変性マウスに対し模擬訓練を代替し評価する研究』を推し進めた。



図左：四肢の歩行失調測定法

図右：脳機能成分の投与試験

これまでの研究は行動監視装置による、Wob/t マウスと健常対照 (B6 マウス) の運動量の測定および行動解析法による協調運動機能、平衡運動機能、歩行異常の解析の評価法を確立した。さらに回転ホイールによる強制歩行訓練前後の運動能力改善評価法を作成した。これらの研究段階を経て、小脳変性の原因遺伝子を探ること、変性過程の病態を観察し、脳神経の変性を保護あるいは賦活する脳機能性成分の介入試験を行うこととした。

2. 研究の目的

これまでの研究成果から Wob/t は、小脳プルキンエ細胞の変性脱落による小脳萎縮である。よって、小脳失調性運動障害のマウスとして SCD 患者や小脳変性症に類似する病態を示す有望なモデルマウスの候補であると考えられる。

本研究の目的は、

- 1) 運動介入試験による四肢の運動機能低下を防ぐ運動療法の確立。
- 2) これらの運動負荷運動による、小脳、大脳の遺伝子産物 (タンパク質) および遊離アミノ酸の解析の試み。
- 3) 次世代シーケンサーを用い遺伝子解析を行い原因遺伝子の特定。
- 4) 脳機能賦活成分を、混餌投与や飲水投与を行い、神経細胞変性の保護作用、賦活再生作用を試験する。

3. 研究の方法

1) 模擬リハ訓練開始

週齢層別段階の各群の当該マウスに、模擬リハ訓練歩行負荷試験をおこなう。強制歩行訓練や補助具（下肢重錘負荷、膝装具、バンテージ処方）装着行動解析をおこなう。

2) 病理標本および遺伝子解析

Wob/t と B6 マウスの運動介入、食餌介入後に、脳を摘出後 UPLC-MS 解析など、病態生化学的解析、遺伝子産物の特定およびその原因遺伝子の解析を行う。

3) 脳機能活性に関与する、食品、薬品由来の成分を投与介入する。機能性成分は D 型セリン、えごま種子が予備試験で他の 5 種よりも効果が見られたので、本試験を行った。

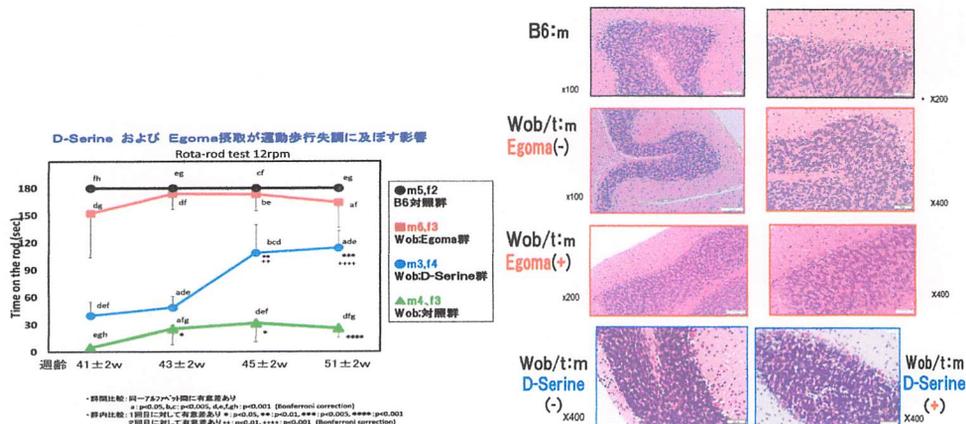
実験 1 ; 試験① : D 型 Serine 群に 1.5% 水溶液を F₀ 雌雄交配出産後まで自由摂取させた。F₁ 乳仔は 4 週齢で雌雄をそれぞれ飼育し 3~5ml/匹を 52 週目まで与えた。試験② : えごま群に種子を同様に F₀ 雌雄交配出産後まで自由摂取させた。F₁ 乳仔は 4 週齢で雌雄をそれぞれ飼育し成長に合わせ 0.3~3 g /匹を 53 週目まで与えた。試験③ : Wob 対照群と試験④ : B6 群には F₁ 乳仔に通常の飼料と水を 53 週目まで与えた。

実験 2 : 運動評価 Rota-rod 試験①全群に対し生後 41~53 週の間 5~15rpm の Rota-rod test、Beam walking test で歩行失調を評価した。

4) 原因遺伝子の特定解析は、Wob/t 兄妹交配を 2 回繰り返すホモ表現型有、ヘテロ（表現型無）を作出し、野生型の 3 群の DNA から次世代シーケンサー（NSG）を用いてエクソンの解析をおこなった。

4. 研究成果

- 1) 飲水に溶解した D-Cycloserine を摂取させ運動失調を評価する Rota-rod 試験で、歩行持続時間の向上を認めた。安価で易溶性である D 型 Serine (DS) の摂取と強制歩行訓練との併用試験で、D-Cycloserine よりも短期に運動失調の改善が示された。しかしながら DS の脳機能への作用は投与依存性で神経細胞修復ではない可能性が考えられた。
- 2) えごま群は B6 群に対し有意差を認めず、他群に対し有意な差が認められた。B6 群の小脳プルキンエ細胞層は正常で変性・脱落している組織像は見当たらなかった。



図左 : D-セリン、えごま実摂取介入試験結果。黒線健全 B6 マウス、緑線は Wob/t 未介入群、赤線はえごま投与群、青線は D-セリン投与群のロータロッド試験で経時的に歩行上達度を測定した結果。えごま摂取群は他群に対し有意に向上が見られた。

図右 : 歩行機能測定後、小脳プルキンエ細胞を観察。えごま摂取群は、正常な細胞顆粒が温存されていた。

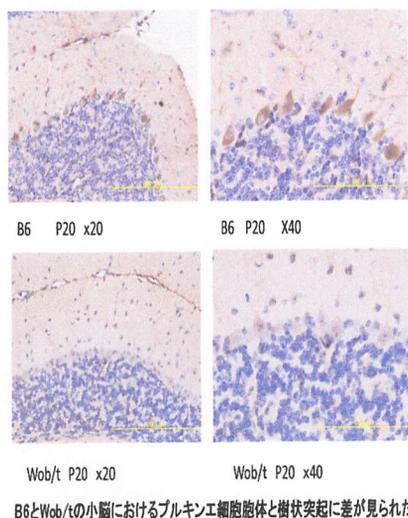
3) Wob 対照群、DS 群では、細胞層に脱落が散見された。一方 Egoma 群は、変性・脱落がわずかにみられたが、ほとんどが正常であった。

4) ①Wob/t の homo, hetero, Wild type (B6) の遺伝子型サンプルを NSG で全 Exome 解析し 6 つの候補を同定した。しかし遺伝子の機能と表現型と関係が一致せず近接した別の遺伝子に原因があると推測された。

②染色体構造異常変化を明らかにするため、全 Genome NGS を実施した。homo および B6 の Matepair library を作成し精査したところ染色体上に 143kb の欠失が発見され Gene X が同定された。さらに候補遺伝子に 10 以上もの Splicing variant が存在していることが分かった。③それらの証明のために小脳切片を Gene X 抗体を用い ABC 法で比較したところ、Wob/t の小脳内 Gene X タンパクは B6 よりも弱く検出された。これらの結果から Wob/t において Gene X は小脳内欠失遺伝子候補であり、Gene X タンパクが抗体に対し反応性が低いことが示唆された

以上、えごま種子がプルキンエ細胞の神経細胞変性を抑制した可能性が考えられた。今後 Gene X および遺伝子産物に関する遺伝子シグナルに影響を与える機能因子がえごま種子に含まれているか精査を続けていきたい。これまでの実験は Wob/t の脳内 EPA、DHA 濃度が高まり Gene X が未成熟残余 PJ 細胞の脳機能代謝を亢進させ神経細胞の変性を抑え運動失調が改善された可能性が考えられる。

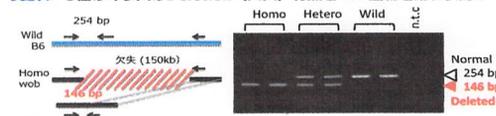
実験5-1



B6とWob/tの小脳におけるプルキンエ細胞胞体と樹状突起に差が見られた。

●小脳切片標本のGeneXの染色：VECTASTAIN Elite ABC Kit 法を用いた免疫染色（ABC法）・蛍光抗体法

実験4 3種のマウスのDeletion (欠失) 有無をPCR産物を用い検討:



結果：表現型と一致した結果を得た

仮説：Wob/t マウスで見つかった欠失がもたらす脳での作用



●小脳2 GeneXを欠失するWob/tはヒト脳神経細胞変性の重要なモデルとして期待できる。

図左：原因遺伝子候補の抗体を用い小脳を観察。Wob/t のプルキンエ細胞顆粒層、樹状突起の染色性が極めて弱かった。
図右：原因遺伝子候補の Wob/t の遺伝子欠失の確認。PCR 産物での 3 種のマウスのバンドを示す。Homo 群に 146bp の欠失が確認された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

①Beppu H, Takayanagi N, Tomita Y, Mizutani K, Orand A, Tamai I, Takahashi H, Sonoda S ; Improvement of gait and coordinated movement by forced gait training in cerebellar ataxic B6-wob/t mice Jpn J Compr Rehabil Sci, 2015 ; 6 : 64-70 (2015/4/20) (IF=0)

②Kan SHIMPO, Takeshi CHIHARA, Hidehiko BEPPU, Takaaki KANEKO, Masanori SHINZATO, Kazumasa WAKAMATSU, Takashi HIGASHIGUCHI, Shigeru SONODA : Inhibitory effects of emodin on intestinal tumor development in Min mice. Clinical Pharmacology and Therapy. 26 (2) (2016) (IF=0)

③Orand A, Miyasaka H, Takeda K, Tanino G, Chihara T, Beppu H, Sonoda S. Reliability of stiffness measurement device during passive isokinetic spastic wrist movements of healthy subjects and hemiplegics. Biocybern Biomed Eng. 2017;173:1-10

④Beppu H, Takeda K, Tomita Y, Orand A, Mizutani M, Tamai I, Takayanagi N, Takahashi H, Sonoda S., Improvement of trunk tremor by forced gait training in cerebellar ataxic Wob/t mice. Structure and Function. 2017. Vol. 15, 2

⑤別府秀彦：新奇の小脳変性マウスの特性と運動失調モデルマウスとしての活用ーリハビリテーション医学領域での運動・薬理療法評価の確立ー，薬理と臨床； Vol. 27. No. 4. 11月., 2017(総説)

[学会発表] (計 7 件)

①別府秀彦、新里昌功、水谷謙明、玉井育子、千原猛、園田茂、高橋久英：小脳変性マウス(wob/t)のD型Serine経口投与および強制歩行訓練がRota-rod試験に及ぼす影響；第15回コ・メディカル形態機能学 2016 9. 17；京都・京都大学医学部・芝蘭会館

②別府秀彦、新里昌功、水谷謙明、千原猛、稲垣秀人、園田茂：小脳変性マウスへのD型セリン投与および強制歩行訓練による運動失調改善の検討とその機序；第48回藤田学園医学会 2016 10, 6-10. 7 豊明・藤田保健衛生大学

③別府秀彦、千原猛、水谷謙明、新里昌功、玉井育子、高橋久英、園田茂：小脳変性マウスへのD型セリン投与および強制歩行訓練による運動失調改善の検討とその機序；第14回日本機能性食品医用学会 2016 12 10-12 11；東京・順天堂大学

④別府秀彦、新里昌功、千原猛、水谷謙明、玉井育子、稲垣秀人、園田茂、高橋久英：小脳変性マウスへのD型セリンおよび強制歩行訓練の単独・併用介入が運動失調改善を示す機序の検討；第27回生物試料分析科学会 2017 2. 11-2. 13；新潟・朱鷺メッセ

⑤別府秀彦、新里昌功、千原猛、西井一宏、金子千之、毛利彰宏、高橋久英、齋藤邦明

D型セリンおよびえごま種子経口投与が小脳変性マウスの運動失調におよぼす影響；第15回日本機能性食品医学会 2017 12 9-12 10：東京・慈恵医科大学

⑥別府秀彦、新里昌功、千原 猛、金子千之、西井一宏、稲垣英人、毛利 彰、斎藤邦明、高橋久英：D型セリンおよびえごま種子の経口投与が小脳変性マウス（Wob/t）の運動失調におよぼす影響；第28回生物試料分析科学会 2018. 3.3-3.4：山形テルサ

⑦別府秀彦、稲垣秀人、西井一宏、新里昌功、千原 猛、毛利彰宏、斎藤邦明、高橋久英、倉橋浩樹；NGSを用いた小脳変性マウスの Exome 解析および原因遺伝子候補の神経栄養因子との関連：脳機能改善素材開発試験の応用を目指して；第16回日本機能性食品医学会総会 2018. 12. 15～12. 16：新潟 朱鷺メッセ

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/FMIP/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 新里昌功

ローマ字氏名： Shinzato masanori

所属研究機関名： 藤田医科大学

部局名： 保健学研究科

職名： 准教授

研究者番号（8桁）： 80148288

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。