

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13053

研究課題名(和文)脳血管障害後の回復機序検証：リーリン欠損モデルおよび中枢-骨格筋の相互的作用

研究課題名(英文)Cortical Motor Regulation in Reeler Mutants

研究代表者

平賀 真理子 (Mariko, Hiraga)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：50638757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質運動領域による高次運動機能制御を検討するため、皮質6層の形成に必要な分子であるリーリンを欠損したマウスを用い、その運動野領域を調べた。ホモ接合型リーラーマウスでは、皮質で上肢を動かす際に必要な電流閾値がWTよりも3倍高い事が分かった。ただし、pyramidal投射ニューロンが、発達段階では逆転してII層に位置しているにも関わらずV層で閾値が低く骨格筋収縮を誘発しやすい、という傾向はWTマウスのそれに類似していた。さらにリーリン欠損は骨格筋に直接影響しない事を明らかにした。ヘテロ接合型リーラーマウスでは、運動依存的な領域マップ再構築の低下及び皮質II/III層でLTPの減少が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋-神経接合部位ではなく、大脳皮質や小脳でのリーリンの高次運動機能への関与が示された。ヒトの小脳萎縮では、骨格筋のatrophyが確認されていたが、reelinの発現低下から起こるのではなく、小脳萎縮に関連する運動機能障害による例えばdisuseから起こる二次的な結果だという事が明らかになった。リーリン発現の減少が起きる精神分裂症患者においても細かな高次運動機能の制限が認められているが、マウスモデルでは運動による運動野領域マップ再構築の低下及び、II/III層のLTP欠損を確認した。本成果はリーリンの高次機能可塑性への関与を示し、中枢神経運動機能疾患のさらなる原因解明が今後期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism that underlies cortical reorganization in motor map of cerebral cortex, we tested the possibility that reelin signaling contributed to behavior-related cortical reorganization. Reelin, a lipoprotein released by Cajal Retzius cells, is required for the normal development of cerebral cortical layers. We first found that a higher current threshold to evoke a muscle movement was two-three times higher in the homozygous reeler mice than in the WT. The tendency in homozygous mutants that required a higher threshold in upper layers than in lower cortical layers was similar to that found in the WT, even though the neural-type distribution is reversed across the cortical layers in the homozygous. We also found the lack of reelin did not directly affect the innervation terminals to the skeletal muscles. We finally showed that a reduction in cortical reorganization and impairment in behavior-related cortical LTP in the heterozygous reeler mice.

研究分野：運動リハビリテーション

キーワード：運動制御 リーラーマウス

1. 研究開始当初の背景

Cajal Retzius 細胞から分泌されるリポタンパク質であるリーリンは、正常な脳形成、特に大脳皮質 6 層の形成に必要な分子である。ホモ結合型 (rl/rl) リーリン欠損マウス(リーラー)では発達時に大脳皮質 6 層の構造が逆転することから、皮質機能解析に用いられてきた。また、成体でもリーリンの発現量は減少せず、皮質神経機能に寄与し得るタンパク質と考えられている。

高次運動機能の多くは皮質領域によりその働きが可能となる。例えば、運動学習では、運動野領域で神経可塑的变化(マップの再構築)が起こりその動作・能力に寄与すると考えられている。ただし、運動野領域可塑性のメカニズムは明らかではない。そこで私たちはこれまでに、無処置のホモ接合型、ヘテロ結合型リーラー (+/-rl)、wild type (WT) マウスの皮質運動野領域マップを検討した。その結果、運動マップを調べるため骨格筋を動かす皮質電気刺激閾値が、ホモ接合型では WT より高い事が明らかとなった。この皮質からの電気刺激閾値の差は層構造異常と考えられたが、例えばヒトの小脳萎縮では、骨格筋の萎縮 (atrophy) も報告されている (Neuropediatrics 24 (1): 43-46. 1993; Nature genetics 26 (1): 93-96. 2000)。従い、それは reelin の発現量から発達異常で起きるのか、または小脳萎縮に関連する運動機能障害による二次的な影響によるものかは不明であった。そのため、ホモ結合型での骨格筋収縮に必要な皮質からの電気刺激閾値の差は層構造異常の他にも、骨格筋の神経支配の違いによる可能性が考えられた。

さらに、ホモ結合型リーラーと異なり発達時に層構造が逆転しないヘテロ結合型リーラーを用いリーリン発現が半減する事による運動学習への影響を調べた。その結果、ヘテロ結合型での上肢把握運動学習は WT に比べて遅い事、また運動学習によって引き起こされる大脳皮質可塑性が制限されている事を明らかにした。ヘテロ結合型リーラーでは前頭葉の抑制性神経活動が半減する。ヒトの精神疾患患者でのリーリン発現および抑制性神経数が半減する事 (PLoS ONE 6(5): e19955, 2010) に類似するため、ヘテロ結合型リーラーは精神分裂症のモデルとしても使用されてきた。興味深いことに精神分裂症・躁鬱患者において、細かな高次運動機能に制限が見られる事は多数報告されている (e.g. Cognitive neuropsychiatry 11, 47-64, 2006) ため、これまでの実験結果を含めリーリンと高次機能可塑性に関連性が予想された。

2. 研究の目的

運動学習には、運動野領域マップの再構築が起こる事が知られているが、その運動野領域可塑性のメカニズムは、明らかではない。リーリンは発達期の大脳皮質 6 層形成に必須のタンパクであり、またその発現は成体においても一定量認められる事から神経可塑性との関連も指摘されている。ホモ結合型リーリン欠損マウスを用いて、大脳皮質刺激閾値の解析を通して、大脳皮質層構造の運動制御における役割を解明する。さらに、ヘテロ結合型リーラーでは、上肢把握運動学習によって引き起こされる運動野領域マップの再構築に伴う神経可塑性におけるリポタンパク質リーリンの役割の解明を目的とした。

3. 研究の方法

I. ホモ接合型リーラーで観察された高い皮質電気刺激閾値の原因の解明

ホモ接合型で観察された高い皮質電気刺激閾値の原因の解明において、「層構造の異常」、「末梢神経の異常」の可能性を生理学的手法と神経筋接合部異常・筋組織解析を用い検討する。

層構造

- 電気閾値は V 層投射ニューロンに電極が近ければ、神経活動を誘発しやすいと考えられるので、層の逆転により、V 層に限って観察される現象かを調べた。層依存性かを調べるために、硬膜 50 μm (1 層) から 1300 μm (6 層)まで、骨格筋収縮を起こすのに必要な皮質電気刺激閾値を 50 μm 毎に示す皮質のそれぞれの層での誘発に必要な閾値を調べた。小脳異常によるものか、皮質依存的なものかを示すために大脳皮質特異的にリーリンの発現を抑えた floxed Dab1 マウスも用いて生理学手法で刺激閾値を検討した。

末梢神経

- Western blot で筋—神経筋接合部のアセチルコリン受容体 α subunit と γ subunit のタンパク質発現量を比較し、両群の神経支配比を示した。
- 除神経によりアセチルコリン受容体の構成成分が変化することが知られている。末梢神経異常の可能性を調べるために、前肢筋肉を採取し、神経筋接合部の形態・アセチ

ルコリン受容体の構成成分を比較した。

- Electromyography を用いて、筋細胞での神経伝達電力活動を測定した。麻酔下で、electrode を総指伸筋に挿入し、ICMS で一定量の神経活動を起こした時の筋内神経伝達反応（電量）を測定した。

II. ヘテロ結合型リーラー (Heterozygous *Reeler* Mutant: HRM) で運動学習によって引き起こされる皮質運動野領域可塑性が制限される原因の解明

抑制性神経

- 大脳皮質の抑制性神経異常の可能性を調べるために、運動学習によって WT と同じ様に HRM ではシナプスの長期増強が起こるか検討した。学習前および運動学習終了後 2~3 日以内の *ex vivo* 脳切片を用意し、皮質上肢領域の 2-3 層（抑制性神経）の電場電位（field potential: シナプスの強度）を定量した。Long-term potentiation を誘導させて、通常時と運動学習でのシナプスの強度変化を比較した。
- リーリンは抑制性神経から分泌され、興奮性神経に作用することが報告されている。興奮性神経細胞内シグナルが落ちて、領域マップ再構築に影響している可能性を検討するため NMDA 神経受容体のリン酸化と CREB のリン酸化を Western blot で示した。

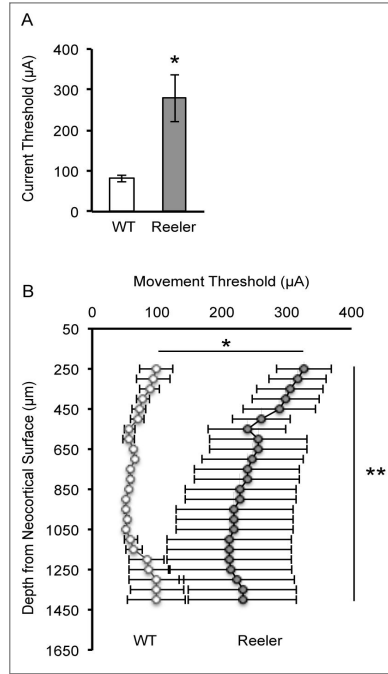
4. 研究成果

- I. ホモ接合型リーラーでは、大脳皮質で上肢を動かす際に必要な電流閾値が WT よりも 2-3 倍高い事が分かった。硬膜 50 μm (1 層) から 1300 μm (6 層)まで、骨格筋収縮を起こすのに必要な皮質電気刺激閾値を 50 μm 毎に調べた。ホモ接合型では、大脳皮質 II/III 層では、V 層/VI 層に比べて、電気刺激閾値は高かった。これは、V 層 pyramidal 投射ニューロンが、発達段階で II 層に逆転して位置しているにも関わらず、WT マウスの V 層ニューロンで閾値が低く骨格筋収縮を誘発しやすいという傾向に類似した。従って樹状突起の方向、またシングルニューロン自体の発火性に差がある可能性を示唆した。大脳皮質の各層において、ホモ接合型の必要電流閾値は WT に比べて高かった。リーラー錐体ニューロンの位置はすでに報告されていて (J of Comp Neurol, 461(1), 61-75, 2003) また、解剖学的に皮質脊髄路投射先は正常である事が分かっている (Kobe J Med Sci, 61(3), E71-81, 2015)。これまでのホモ接合型の大脳皮質の解剖学的分析を生理学手法で示した。

この生理学的手法で得られた結果は、皮質特異的にリーリン下流をノックアウトした floxed *Dab1* マウスでも同じく得られた。floxed *Dab1* マウスでもまた、電流閾値は層構造特異的である事を示した。皮質で必要な電流閾値は小脳異常がない floxed *Dab1* マウスでも有意に高かった事から、ホモ接合型特有の小脳異常によるものではなく、皮質層構造異常によるものと確認した。

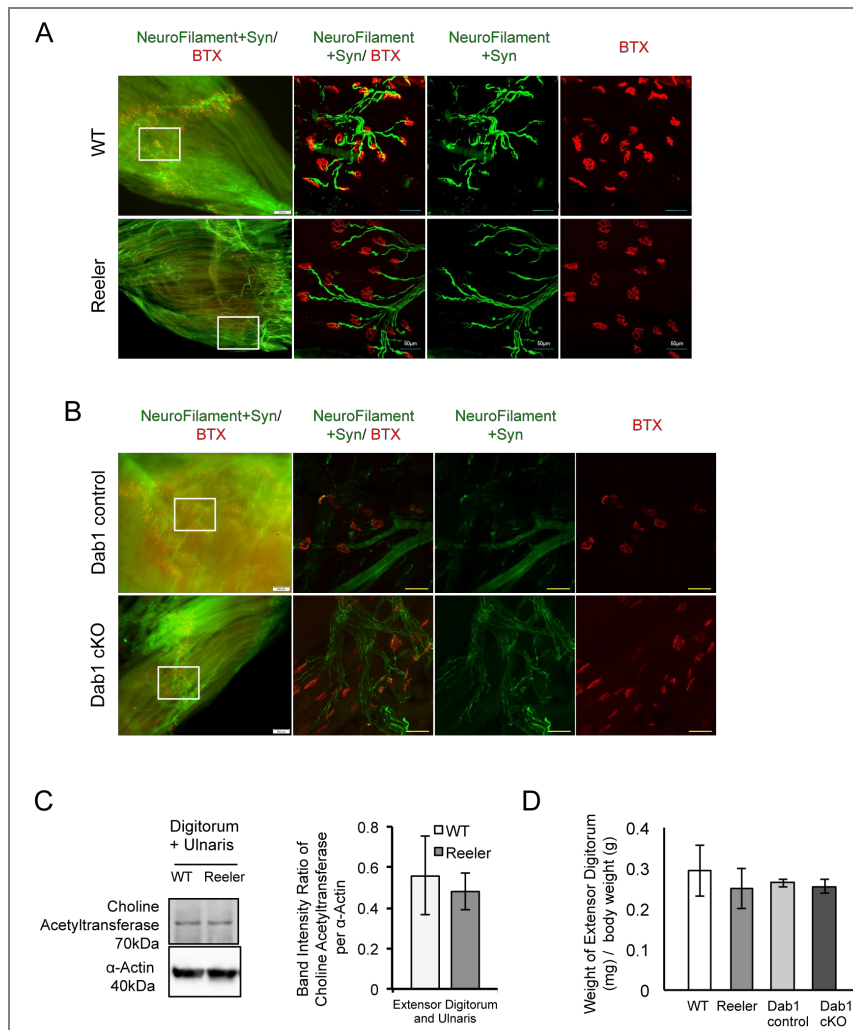
前肢筋肉を採取し、神経筋接合部の形態・アセチルコリン受容体の構成成分を比較したところ、ホモ接合型と WT では構成成分の差は認められなかった。Western blot で筋—神経筋接合部のアセチルコリンの活動量を反映する酵素 Choline acetyltransferase の量を比較したところ、ホモ接合型の神経支配に差は認められなかった。総指伸筋の重さを WT, *reeler*, *Dab1* cKO, *Dab1* control の群で測ったところ、違いは認められなかった。最後に Electromyography を用いて、筋細胞での神経伝達電力活動にリーラー^{-/-}と WT で差は示されなかった (Data not shown)。以上、筋電図と上肢筋の神経筋接合部の形態・アセチルコリン受容体の構成成分と筋組織を調べた結果、末梢神経には異常がない事が明らかになった。ヒトの小脳萎縮ケースでは、骨格筋の atrophy が確認されているが (Neuropediatrics 24 (1): 43-46, 1993; Nature genetics 26 (1): 93-96, 2000)。それは、*reelin* の発現量からくるのではなく、小脳萎縮に関連する運動機能障害による例えば disuse から起こる 2 次的な結果だということ事が明らかとなった。

図 1



A. WT と *Reeler* の骨格筋収縮を起こすのに必要な皮質電気刺激閾値 (μA). $*p < 0.001$, paired t-test B. ヘテロ結合型は WT の 2-3 倍高かった。硬膜 50 μm (1 層) から 1300 μm (6 層) を通して、電気刺激閾値はヘテロ結合型の方が高かった ($*p < 0.01$, repeated measures ANOVA)。II/III 層の方が V/VI 層よりも高かった ($**p < 0.01$, repeated measures ANOVA)。

図 2



A. WT と *reeler* の上肢筋の末梢神経軸索 (Neurofilament) とアセチルコリン受容体 (BTX) を染色し形態を確認した。B. *Dab1* cKO と *Dab1* control での比較でも、受容体形態に違いは認められなかった。C. Choline acetyltransferase の定量では差が見られなかった。D. 総指伸筋の重さは WT, *reeler*, *Dab1* cKO, *Dab1* control で違いが認められなかった。

II. パッチクランプ法を用いて、まず WT と HRM の fEPSP (興奮性神経活動電位)を比べたところ有意差は認められなかった。把握反復練習をしたところ、WT に比べて HRM の II/III 層フィールドは同じシナプスインプットに対して fEPSP が低い事を検出した。また、把握運動反復練習による LTP への影響について検討した。WT では、LTP を theta burst stimulus や high frequency stimulus を用いて誘発したところ、反復練習によりすでに神経細胞間の long-term potentiation は上がっており、反復練習をしていない WT に比べて、人工的に誘発可能なシナプス強度は限られていた。これは、マウスの自発的運動により、potentiation level が上がり誘発 LTP が下がったと考えられる。WT に比べて HRM では、運動をしても ceiling effect は低く非運動群のマウスと同じ様に LTP を誘発することができた。この結果は、HRM による運動では potentiation の底上げが起こらなかったためと考えられる。以上の結果は、WT と HRM では皮質 II/II 層神経の potentiation に差が存在し、それにより運動領域マップの再構築に差が出る事を示した。

Western blot を用いて皮質組織の NMDA 受容体のリン酸化を GluN2B (Tyr1472) 抗体で定量した。WT, HRM では違いが認められず、把握運動後も、どちらの群でも増加・減少は認められなかった。さらに CREB リン酸化を Ser133 抗体で検討したが、有意差は認められなかった。本実験の結果は、層依存的、細胞特異的な差の検出は運動野組織を用いるのでは難しい事を示した。今後は Micro laser dissection など手法を検討する必要がある。

これらの研究を通して、リーラーにおける運動学習疾患が確認された。上肢把握運動モデルでは、骨格筋-神経接合部位に異常はなく、大脳皮質や小脳でのリーリンの働きが運動制御に関わっている事が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Mariko Nishibe, Yu Katsuyama, Toshihide Yamashita
Cortex-dependent motor impairment and higher intracortical current requirement in the *reeler* homozygous mutants.
Brain Structure and Function. 2018 March; 223(6):2575-2587
2. Shin-ichiro Hiraga, Takahide Itokazu, Maki Hoshiko, Hironobu Takaya, Mariko Nishibe, Toshihide Yamashita
Microglial depletion under thalamic hemorrhage ameliorates mechanical allodynia and suppresses aberrant axonal sprouting of the thalamo-cortical projection in mice
eLIFE under review April 2019

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 西部真理子 山下俊英
リーラーマウスの大脳皮質出力
第 40 回日本神経科学大会
2017 年
2. 西部真理子 山下俊英
リーラーマウスの骨格筋評価
第 5 回骨格筋生物学研究会
2017 年
3. 西部真理子 山下俊英
Reeler motor control
第 10 回 Motor control 研究会
2017 年
4. Mariko Nishibe, Yu Katsuyama, Toshihide Yamashita
Cortical motor control of *reeler* mice.
The annual meeting for the society for Neuroscience 2017
5. Mariko Nishibe, Yu Katsuyama, Toshihide Yamashita
Behavioral and cortical abnormalities in homozygous *reeler* mice.
Oral Neuroscience 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。