

平成 22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19500464

研究課題名 (和文) 小脳変性症に対するリハビリテーション効果の分子機構解明

研究課題名 (英文) Investigation on the molecular alternations and behavioral recoveries after cerebellar degeneration with reference to rehabilitation.

研究代表者

久寶 真一 (KYUHO SHINICHI)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60195394

研究成果の概要 (和文)：小脳の主要構成細胞であるプルキンエ細胞が徐々に死んでいく小脳変性症マウスでは、運動障害が加齢とともに進行する。ミノサイクリンにより神経炎症を抑えると、神経細胞死と運動機能低下をある程度防げた。小脳出血モデルとして小脳半球を片側吸引切除したマウスでは、小脳以外に大脳皮質運動野でも脳由来神経栄養因子が産生されて運動機能の回復を助けていることがわかった。脳由来神経栄養因子をうまく引き出せる物質と適切なリハビリテーションを組み合わせにより、将来、より効率的な運動療法が期待できる。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the restorative processes after the chronic and acute cerebellar damages. Firstly, the restorations after chronic cerebellar damages were assessed in the cerebellar neurodegenerative mutant mice. We found that neurodegeneration of cerebellar cells was partially prevented by inhibition of inflammation, using an antibiotic, minocycline. Secondly, the restoration after acute cerebellar damage was examined by ablation of unilateral cerebellar hemisphere in mice and rats. Acute cerebellar damage resulted in severe ataxia just after the lesion. However, prominent functional recoveries were observed within two weeks after the lesion. During the recovery period, marked upregulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was observed in motor cortex and remaining cerebellar hemisphere. Blocking the BDNF neurotransmission delayed the functional recoveries. Since it is generally accepted that BDNF is upregulated after rehabilitation (exercise) in the brain, BDNF expression in the cerebellum and motor cortex facilitated by some appropriate rehabilitations may promote the recoveries from the cerebellar damages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション医学

1. 研究開始当初の背景

分子生物学の目覚ましい進歩により、遺伝性脊髄小脳変性症の原因遺伝子が次々に同定され、神経細胞死のメカニズムも明らかになってきた。このように原因の究明は進歩しているにもかかわらず、遺伝性脊髄小脳変性症に対する根本的な治療法が確立されていない現在、運動療法は最も重要な治療手段の1つである。しかし、国内国外ともに小脳障害後のリハビリテーションに関する基礎的研究は少なく、データの蓄積が望まれている。規則的な運動刺激により、遺伝性脊髄小脳変性症の症状が改善することが報告されている。小脳性運動失調は、特定の動作について反復練習することで改善が得られ、日常動作が減少すると憎悪することが、運動療法の経験からわかっている。本申請研究者らは、協調運動の神経制御に小脳と大脳皮質の相互投射が関係しており、小脳破壊により協調運動が失われ運動失調になることをサルやラットを用いて電気生理学的に探索し報告してきた。一方、分子レベルの研究では定期的運動により BDNF や IGF などの神経栄養因子の分泌が海馬で上昇し、シナプス可塑性に関与していることがわかってきた。小脳障害後の運動機能回復には大脳皮質による代償機構が存在することが、電気生理学的に観察していたので (Gemba, Nakao, Matsuzaki (2005))、その代償機構の分子メカニズムを明らかにし、リハビリテーションの効果を最大限引き出すための研究の着想に至った。

2. 研究の目的

小脳障害後の運動機能回復には大脳皮質による代償機構が存在することが、電気生理学的に観察されているので、その代償機構の分

子メカニズムを明らかにし、リハビリテーションの効果を最大限に引き出すための研究を行う。われわれは、ラットやマウスの小脳半側破壊後に運動機能が徐々に回復し、その過程において運動皮質における神経栄養因子の発現が上昇していることを観察した。この神経栄養因子の発現上昇がもたらす運動機能回復への寄与に関して調べる。

3. 研究の方法

(1)小脳変性マウス(pcd: Purkinje Cell Degeneration) マウスにおける変性ニューロンの同定。Fluoro-Jade法により変性ニューロンを染色し蛍光顕微鏡で観察する。神経変性がアポトーシスによるものであることを活性化カスパーゼ3に対する抗体で染めることで確認した。

(2)pcdマウスからの大脳皮質フィールド電位の記録

大脳皮質投射の病態を電気生理学的に解明するために、生後20日目のpcdマウスをペンタバルビタール麻酔し、大脳皮質聴覚野、運動野、視覚野の皮質表面と表面から1.0mmの深さに慢性記録電極を埋め込んだ後、歯科用レジンで固定した。手術1週間後より大脳皮質フィールド電位を、覚醒下で記録した。皮質表面のフィールド電位から皮質深部のフィールド電位を差し引くことにより遠隔電場電位の影響を取り除いた。

(3)運動トレーニング (リハビリテーション)

マウスに直径20cmの回転かごで、自発性の回転かごによる運動も1日30分間行い回転ケージの回転数を計測する。回転かごによる自発運動30分/日は3週間おこなう。一部のマウスでは、強制歩行 (初日: 1回転/分を20分から初め、2日目から2回転/分を30分間行う。) 小脳破壊後は、運動機能が低下しているので、1回転/分での強制運動を5分間1セッションとして1日3セッション3週間行った。

(4)運動機能評価

ロタロッドテスト: 加速 (3回転/分から30回転/分まで5分間に加速) しながら回転する

直径 30 ミリの丸棒にマウスを乗せ、落下するまでの時間を計測。

グリッド歩行: ワイヤーの間隔が 15 ミリのグリッド (18cm 四方) 上にマウスをのせ、自由に探索行動を行わせる、マウスが 3 分間にグリッドから足を踏み外す回数をカウントする。

(5) 遺伝子発現プロファイリング

麻酔下でマウスを断頭し、大脳皮質の RNA を RN easy mini kit (QIAGEN) により、抽出する。RNA は逆転写酵素で cDNA を調整し、

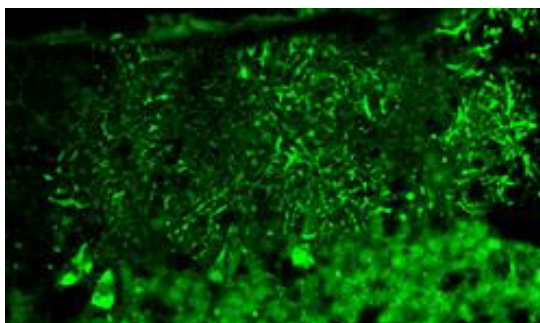
神経栄養因子 (BDNF, NGF, GDNF, IGF-1, EGF, FGF-1, PDGF, NT-3, NT-4, CNTF) の発現量をリアルタイム PCR 法により定量化する。

(6) Western blotting 法でのタンパク質解析
遺伝子発現プロファイリングで変化のあった神経栄養因子が、タンパク質レベルでも変化しているのかマウスの大脳皮質を取り出し、神経栄養因子に特異的な抗体を用いた Western blotting 法により、確認する。

4. 研究成果

(1) 小脳変性マウスにおける大脳皮質の分子変化と電気生理学的変化。

小脳変性マウスとして Purkinje cell degeneration (pcd) マウスという脊髄小脳変性症のモデルとして従来使用されてきたミュータントマウスを用いた。変性した神経細胞を鋭敏に検出する Fluoro-Jade 染色により形態学的に調べた結果、pcd マウスでは小脳プルキンエ細胞が変性しているのが認められた (写真下)。



このような変性神経細胞は活性型カスパーゼ 3 抗体によっても染まったので神経細胞死はアポトーシスによるものと考えられた。視床の神経細胞の変性も認められた。

大脳皮質聴覚野から大脳皮質フィールド電位を記録すると、生後 50 日頃より、20-40Hz の周波数をもつ自発脳波が聴覚野と運動野で著明に増加する現象が認められた。このような速波は、視覚皮質では認められなかった。

大脳皮質聴覚野、視覚野、運動野から mRNA を抽出し、グルタミン酸受容体の遺伝子発現をプロファイリングした結果、聴覚野と運動野の NMDA 型受容体の発現が神経変性前後で増加していたのに対し、AMPA 型グルタミン酸受容体については、変化は認められなかった。NMDA 型受容体阻害剤の MK801 を全身投与すると聴覚野の速波が消失した。これらの結果より pcd マウスの運動野と聴覚野における NMDA 型受容体の増加が速波の発生に関与していることが示唆された (Kyuhou et al. (2007) Biochem Biophys Res Commun. 356: 187-192.)。

(2) ミノサイクリンによる小脳変性マウスの神経変性の遅延化と機能回復。

小脳変性症マウスでは、単にプルキンエ細胞が小胞体ストレスによりアポトーシスを起こしているだけではなく、ミクログリアの活性化が神経炎症をおこしてプルキンエ細胞の細胞死を加速していた。その証拠に、ミノサイクリンにより活性化したミクログリアによる一酸化窒素の産生を抑制することで神経変性を一時的であるが抑制した。その結果、運動機能の軽度回復も認められた。

これまでアルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患においてミクログリアの活性化による神経炎症が病気の進行に関与しているという国内外の報告がある。今回のわれわれのデータは、神経炎症の抑制が細

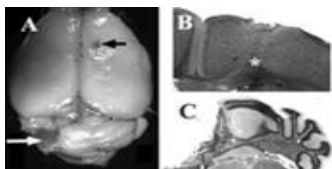
胞死と運動機能回復に役立つ可能性が脊髄小脳変性症においてもあることを示唆したという点でインパクトがある。この成果は第8回日本抗加齢医学学会総会(2008)で発表した。

(3)小脳半球切除に伴う大脳皮質運動野の変化について

マウスの小脳の破壊は小脳中位核と歯状核を含む半側の小脳を吸引により除去した。破壊により影響の大きい「破壊と反対側」の大脳皮質運動野における分子の変化を主に探索した。

小脳破壊後にリハビリテーション効果を、もたらす分子の同定する目的で、遺伝子発現プロファイリングを中心に研究した。

小脳半側切除後の大脳皮質運動野における神経栄養因子(NGF, BDNF, NT3, NT4/5, EGF, PDGF, CNTF, GDNF, IGF-1, FGF-1, FGF-2)の遺伝子発現を調べた。小脳半側切除後4日から14日にかけて破壊と反対側の運動野において、BDNFとNT-3の遺伝子発現の増加を認めた。たん白質レベルでのBDNFの増加もWestern Blot法により確認した(NT-3の増加はごく僅かであった)。

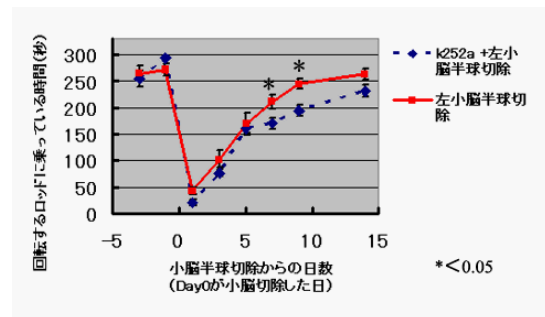


A: 右運動野における薬物注入部位(黒矢印)と左小脳半球の切除部位(白矢印)。

B. C. は、運動野と小脳の前額断切片。

小脳半球切除後の運動野におけるBDNFの増加が運動機能回復に寄与しているかどうか調べるために、BDNFやNT-3からTrk受容体を介する情報伝達系を阻害するk252aを小脳切除と切除から5日後に大脳皮質運動野に埋め込んだ慢性注入カニューレにより投与した。その結果、ロタロッドテスト(下図)において、小脳半球切除のみの群(左小

脳半球切除)のマウスに比べて、k252a投与群(k252a + 左小脳半球切除)の運動機能の回復が小脳切除7日後と9日後では有意($p < 0.05$)に悪化していることが判明した。



グリッドテストにおいても、K252a投与群では小脳切除後1週後に運動機能の低下が認められた。以上より、大脳皮質運動野におけるBDNFやNT-3の上昇が小脳切除後の機能回復にBDNFの発現増加が少なくとも一部関与していることが示唆された。これまでの国内外での研究では、運動により海馬におけるBDNFの上昇がおり、認知機能の改善に寄与するという報告は多数あるが、運動野におけるBDNFやNT-3の上昇に関する報告は極めて少ない。小脳半側切除マウスにおいてリハビリテーション(回転かごにおける自発運動を1日30分)を行わせた。小脳切除後において残存小脳と大脳皮質運動野において、リハビリテーションを行った群と行わなかった群におけるBDNFとNT-3遺伝子の発現の違いを観察した。その結果から、リハビリテーションにより、BDNF遺伝子発現増加が高い傾向にあったが、ばらつき多く、有意な発現増加は認められなかった。NT-3については変化が認められなかった。強制運動では、BDNF発現の有意な低下が認められ。回転かごに出し入れの操作でストレスが付加された影響と考えられた。

(4)小脳半球切除に伴う大脳皮質運動野のエピジェネティックな変化。(この実験は、

BDNFのプロモーター領域の情報が豊富なラットを用いて実験した。)

BDNF遺伝子のexon4の発現がラットの小脳破壊の反対側の運動皮質で上昇していたので、BDNF遺伝子のexon4の遺伝子発現上昇に関与するエピジェネティックな解析を行った。すなわち、BDNF遺伝子のexon4のプロモーター領域に関与するヒストンのアセチル化をクロマチン免疫沈降法で調べた。その結果、小脳破壊後にヒストン1のアセチル化が約4倍に上昇していることが分かった。このことから、小脳破壊という効果が脳皮質の細胞内のヒストンのアセチル化にまで影響をおよぼしてBDNF遺伝子発現を増強していることがうかがわれた。

(5)小脳半球切除に伴う残存小脳の変化。小脳半球部切除後に残存した小脳半球のBDNF遺伝子の発現を計測したところ、小脳破壊3日ごろから有意に増加しており、脳皮質運動野より早期に可塑的に変化がおきていた。残存小脳も運動機能回復に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

①Kyuhou S, Amaya Y, Nakao K, Matsuzaki R, Upregulation of neurotrophic factors in the motor cortex and functional recoveries after cerebellar lesion in mice. *J. Physiol. Sci.* 59 (suppl 1) pp. 283 (2009) 査読の有無：なし

②Kyuhou S, Amaya Y, Matsuzaki R, Nakao K, Molecular alternations in the motor cortex and behavioral recoveries after hemicerebellectomy in mice. *Neurosci Res* 61(S1):S237 (2008) 査読の有無：なし

③Kyuhou, S. Gemba, H., Fast cortical oscillation after thalamic degeneration: pivotal role of NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 356: 187-192 (2007) 査読の有無：あり

④久寶 真一, 視床神経変性マウスにおける脳高頻度振動波の発生機構の解明、「臨床神経生理学」 35(5):357-358 (2007) 査読の有無：なし

[学会発表] (計 4件)

① Kyuhou S, Amaya Y, Nakao K, Matsuzaki R, Upregulation of neurotrophic factors in the motor cortex and functional recoveries after cerebellar lesion in mice. The 36th International Congress of Physiological Sciences. (IUPS2009), 2009年7月29日、京都。

② 久寶 真一, 雨夜 勇作, 松崎 竜一, 中尾 和子, マウス小脳半側切除後の脳皮質運動野における分子変化と運動機能回復について. 第31回日本神経科学学会大会、2008年7月11日、東京。

③ 久寶 真一, 小脳変性モデルマウスにおける神経細胞死のメカニズムと運動機能についての研究、第8回抗加齢医学学会総会、2008年6月6日、東京。

④ 久寶 真一, 視床神経変性マウスにおける脳高頻度振動波の発生機構の解明、第37回日本臨床神経生理学会・学術大会、2007年11月23日、宇都宮。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久寶 真一 (KYUHO SHINICHI)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60195394

(2) 研究分担者

松崎 竜一 (MATSUZAKI RYUICHI)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：70239002

中尾 和子 (NAKAO KAZUKO)
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：60351540

(3) 連携研究者

雨夜 勇作 (AMAYA YUSAKU)
四条畷学園大学・
リハビリテーション学部・講師
研究者番号：50353008