

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700443

研究課題名(和文) 脳梗塞モデル動物の麻痺回復過程における脳内機能的生理活性物質の変動

研究課題名(英文) Alteration of functional molecule related to improvement of motor

performance in the brain of rats with focal cerebral infarction

研究代表者

水谷 謙明 (MIZUTANI KENMEI)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・助教

研究者番号：30351068

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後の麻痺回復に関わる運動制御には、梗塞巣周囲の大脳皮質における機能的変化が推察されるが、その分子変化については不明な部分が多い。そこでまず、脳梗塞モデル動物を用い、自発運動訓練を行った exercise 群と、訓練を行わない control 群の2群間で、運動機能評価である rotarod test の経時変化を検討した結果、訓練開始後5日目以降、control 群と比較して有意な運動機能の改善が認められた。このことは自発運動訓練が協調運動など運動機能の改善に効果的であったと考えられる。さらに、運動機能学的に有意差が認められた訓練開始5日後の大脳皮質 antibody microarray 及び Western blot を用いた解析では、複数のリン酸化酵素、核内タンパク、神経成長因子、ストレス応答、細胞骨格の重合に関連する11種のタンパク質の up-regulation が、また apoptosis に関連したタンパク質などの down-regulation が認められた。麻痺回復に関わる運動制御には神経可塑性の存在が考えられ、増加したタンパク質の中から nerve growth factor (NGF), protein kinase C (PKC), calmodulin (CaM) などの因子に着目した。これらのタンパク質は様々な生理機能に関与しており、可塑性に関与するか否かの確認のため、これらのタンパク質と相互作用を示し神経突起伸展に関与する growth associated protein-43 (GAP43) とそのリン酸化物である phosphorylated serine41 GAP43 (pSer41-GAP43) の発現量を解析し、その両者の発現が有意に増加していた。今回の解析により、脳梗塞後の運動機能回復に関わる大脳皮質の可塑性発現には PKC, NGF, CaM, GAP43 などのタンパク質がその一端に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Identification of functional molecules in the brain related to improvement of the degree of paralysis or increase of activities will contribute to establishing a new treatment strategy for stroke rehabilitation. Hence, protein expression changes in the cerebral cortex of rat groups with/without voluntary exercise after cerebral infarction were examined in this study. In behavioral evaluation, the mean latency until falling from the rotating rod in the group with voluntary exercise for five days was significantly longer than that in the group without voluntary exercise. The protein expression profile was screened by antibody microarray analysis and was confirmed by Western blotting. Fifteen proteins showed significant quantitative changes in the cerebral cortex adjacent to the infarction area after voluntary exercise for five days compared to rats without exercise. Up-regulated proteins were involved in protein phosphorylation, stress response, cell structure and motility, DNA replication and neurogenesis (11 proteins). In contrast, down-regulated proteins were related to apoptosis, cell adhesion and proteolysis (4 proteins). Additional protein expression analysis showed that both growth-associated protein 43 (GAP43) and phosphorylated serine41 GAP43 (pSer41-GAP43) were significantly increased adjacent to the lesion cortex. These results suggest that alteration of these protein expressions may be related to the underlying mechanisms of exercise-induced paralysis recovery, that is, neurite formation, and remodeling of synaptic connections may be through the interaction of NGF, calmodulin, PKC and GAP43. In the present study at least some of the participation of modulators associated with the improvement of paralysis adjacent to the brain lesion might be detected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：リハビリテーション, 脳梗塞モデル, FIT プログラム, Antibody microarray, 神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

(1)脳卒中に対するリハビリテーションは麻痺や障害に対して、残存機能の強化や補助具の使用など、代償的なアプローチによる日常生活動作の改善に主眼が置かれてきた。このことは、脳卒中により失われた神経細胞が再生しないとの仮説に基づいた考えであるが、近年、成熟した脳においても訓練により、非損傷部位の神経細胞が柔軟に役割や構造を変化させ、麻痺や障害が回復することが実証された (Nudo *et al. Science* 272 : 1791-94, 1996)。この脳の可塑性変化に基づいた新たなリハビリという概念が浸透し始め、積極的に麻痺回復を行う治療戦略に関心が高まりつつある。

(2)機能的核磁気共鳴装置 (fMRI) やポジトロン断層撮影 (PET) などの画像解析装置の発展により、脳内の血流動態や代謝の変化を経頭蓋的に観察が可能となり、麻痺回復した後の脳内において活動部位の変化が起こっていることが解明された。(Ward *et al. Brain* 129: 809-819, 2006, R. Pineiro *et al. Stroke* 32:1134-1139, 2001) これらの変化には、梗塞巣周囲もしくは反対側の大脳皮質における神経・シナプス可塑性の存在が考えられるが、その現象に関わる分子の同定

もしくは、分子機構の解明には至っていない。

2. 研究の目的

脳梗塞モデル動物に対して運動訓練を行い、麻痺および運動機能の回復に関与する脳内機能的生理活性物質を特定する。特に訓練の有無による、経時的な運動学的機能評価とともに、脳内タンパク発現の比較解析を行い、神経・シナプス可塑性に関わる分子を特定する。

3. 研究の方法

(1) 局所性脳梗塞モデル動物の作製

Longa ら (1989) の報告に準じて右中大脳動脈閉塞再灌流を行った脳梗塞モデルを作製した。

(2) リハビリ訓練・運動機能評価

脳梗塞導入後2日目から Full-time integrated treatment (FIT) program に準じて、1日12時間の回転ケージによる自発運動訓練 (図1) を2週間毎日行った群を exercise 群、訓練を行わなかった群を control 群とし、脳梗塞導入前、訓練開始前と開始後3、5、7、10、14日目に障害状態の評価を行った。運動学的機能評価法である rotarod test により、協調運動の可否および平衡感覚を総合的に解析した。具

体的には、初速 3rpm から 5 分後に 30rpm へと加速する直径 3cm の回転棒上にラットを乗せてから落下するまでの歩行持続時間を 3 回計測してその平均値を用いた。



図 1. 回転ケージによる自発運動訓練の様子

(3) 脳内タンパク質発現の比較解析

運動学的機能評価において有意差が現れた時点における脳梗塞巣辺縁の大脳皮質のタンパク質を抽出し、antibody microarray を用いて、control 群と exercise 群とのタンパク発現の比較解析を行った。その中で、発現量が 2 倍以上、もしくは 1/2 以下のタンパク質について確認のため、Western blot 法を用いて比較解析を行った。さらに、antibody microarray に含まれない抗体種である GAP43, pSer41-GAP43 についても同様に Western blot 法を用いてタンパク発現の比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) Rotarod test の経時変化

脳梗塞導入前および、訓練開始前である脳梗塞 2 日後では、control 群および exercise 群の両者ともに歩行持続時間は約 1/5 に低下した(図 2)。このことは、脳梗塞後に両群が同程度の運動機能障害を有していたことが推測される。さらに、脳梗塞 2 日後より自発運動訓練を開始した exercise 群では control 群と比較して回転棒上での歩行持続時間が漸次増

加し、脳梗塞 7 日後(訓練期間 5 日間)では exercise 群 104.1 ± 55.4 sec, control 群 52.3 ± 48.9 sec で有意な回復傾向が認められ、脳梗塞後の自発運動訓練が運動機能回復に効果的であったことが示唆された。

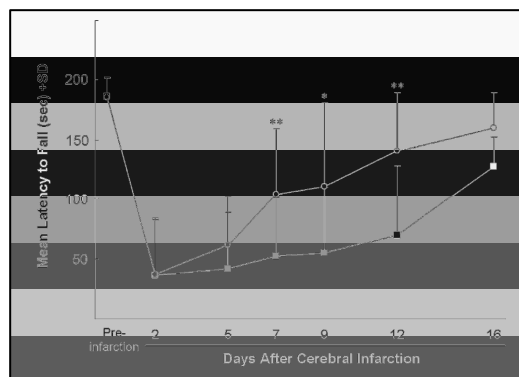


図 2. Rotarod test を用いた運動機能評価における control 群(■)、exercise 群(○)の経時変化。

(**; $P < 0.01$, *; $P < 0.05$)

(2) 大脳皮質タンパク発現の比較解析

Antibody microarray および Western blot 法を用いたタンパク発現解析において、脳梗塞 7 日後の control 群と比較して、同時期の exercise 群で 15 種類のタンパク質発現に有意な変化が認められた (表 1)。

具体的には、細胞増殖核抗原、神経栄養因子、ストレス応答タンパク、リン酸化酵素などの他、微小管やアクチンなど細胞骨格の重合や細胞遊走に関連するタンパク質、カルシウムシグナリングに係るタンパク質など 11 種の up-regulation が、また、apoptosis、細胞接着などに関連した 4 種の down-regulation が認められた。

これらのタンパク質のうち、最も大きな変化を示したのは、細胞増殖マーカーとして知られている proliferating cell nuclear antigen (PCNA) であり、この PCNA の増加は運動訓練による細胞増殖と皮質運動野の血流増加に伴う血管形成を反映している可能性が示唆された。次に、apoptosis 関連タンパク質で

ある Apaf1, Bmf の減少と、ストレス応答タンパク質である HSF, HSP70 の増加との関連性に着目した。転写因子 HSF1 による HSP70 の誘導が、脳虚血に対して神経保護的に機能することはよく知られている。この HSP70 が、アダプター分子 Apaf1 依存性の apoptosis を阻害することにより、虚血後の神経細胞の損失を抑制していると考えられるが、本研究におけるこれらの解釈には更なる検討が必要である。

Protein name	Gene symbol	Biological process	fold change
Up-regulated			
PCNA	Pcna	DNA replication	2.45
NGF- β	Ngfb	Neurogenesis	2.07
HSP 70	Hspa1a, Hspa1b	Stress response	1.88
HSF 1	Hsf1	Stress response	1.71
FAK (pSer722)	Ftk2	Protein phosphorylation	1.69
SAPK 3	Mapk12	Protein phosphorylation	1.67
PKC	Prkcb1, Prkcc	Protein phosphorylation	1.64
Casein kinase 2 α	Cank2A1	Protein phosphorylation	1.57
Zyxin	Zyx	Cell structure and motility	1.56
LIS 1	Pafah1b1	Cell structure and motility	1.52
Calmodulin	Calm1	Calcium mediated signaling	1.50
Down-regulated			
Apaf 1	Apaf1	Apoptosis	0.54
ADAM 17	Adam17	Proteolysis	0.58
Bmf	Bmf	Apoptosis	0.64
SynCAM	IGSF 4	Cell adhesion	0.66

表 1. 脳梗塞後の自発運動訓練による大脳皮質タンパク質の発現変化

本研究の目的は、訓練による麻痺および運動機能回復に関連した、神経・シナプス可塑性に係る分子を特定することであり、そのため、Up-regulation した大脳皮質タンパク質の中から、nerve growth factor β (NGF), protein kinase C (PKC), calmodulin (CaM)に着目した。

NGF については神経栄養因子として広く知られており、神経突起伸展など神経可塑性に関与していることは想像に難くない。しかしながら PKC, CaM はカルシウム結合タンパクであり、さまざまな生体現象の分子機構や、代謝の調節因子として関与しているため、これらのタンパク質が神経可塑性に関連しているか否かの確認が必要となった。そこで、PKC, CaM, NGF と直接的もしくは間接的に相互作用を示し、神経可塑性に関与すること

が知られている growth-associated protein 43 (GAP43), phosphorylated serine41 GAP43 (pSer41-GAP43)の発現解析を行った。

(3) GAP43, pSer41-GAP43 の発現比較解析

Western blot 法を用いて control 群と exercise 群における GAP43, pSer-GAP43 の発現量を内部標準である actin 発現の相対比で算出した。その結果、GAP43 の発現は、control 群 1.04 ± 0.25 , exercise 群 1.69 ± 0.55 であり、pSer41-GAP43 の発現は、control 群 0.29 ± 0.06 , exercise 群 0.51 ± 0.11 であった。つまり、control 群と比較して、exercise 群での発現比はそれぞれ GAP43 で 1.62 倍、pSer41-GAP43 で 1.75 倍であり、それぞれ有意な増加を示した。

GAP43 は神経突起の成長円錐に局在し、神経突起伸展およびシナプス形成に関与するタンパク質であり、neuromodulin と呼ばれ CaM と結合性を有し、CaM と GAP43 の両者は量的相同性を示すことが知られている。GAP43 はまた、PKC の代表的な基質であり serine 残基に特異的にリン酸化を受け、その反応は NGF により活性化される。つまり、GAP43, pSer41-GAP43 の発現が exercise 群で有意に増加していたことにより、脳梗塞後に運動機能回復に関わる大脳皮質の可塑性発現には PKC, NGF, CaM, GAP43 などのタンパク質がその一端に関与している可能性が示唆された。

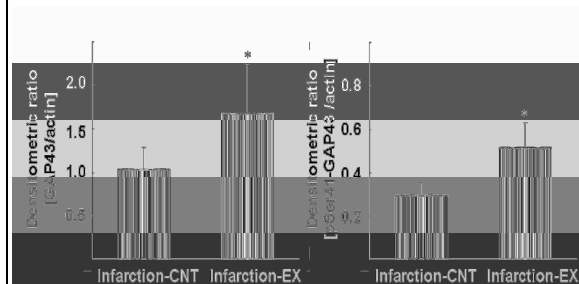


図 3. Western blot 法による GAP43, pSer41-GAP43 発現解析. (* $P < 0.05$)

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 1 件)

Mizutani K, Sonoda S, Hayashi N, Takasaki A, Beppu H, Saitoh E, Shimpo K; Analysis of Protein Expression Profile in the Cerebellum of Cerebral Infarction Rats After Treadmill Training. *Am J Phys Med Rehabil*. 2010; 89(2):107-14. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

①水谷謙明, 園田茂, 別府秀彦, 岡崎英人, 山口久美子, 高柳尚貴. 脳梗塞モデルラットの運動機能回復に関わる脳内機能的生理活性物質の解析. 第2回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 名古屋, 2011年2月12日 (プログラム・抄録集, p53)

②別府秀彦, 水谷謙明, 新里昌功, 近藤和泉, 岡崎英人, 山口久美子, 園田茂, 高橋久英. 運動失調マウス B6-wob¹ の行動観察と病因解析(4)小脳変性症のモデル動物として有用か? 第2回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 名古屋, 2011年2月12日 (プログラム・抄録集, p63)

③岡崎英人, 別府秀彦, 水谷謙明, 山口久美子, 近藤和泉, 才藤栄一, 園田茂. ラットにおける肝細胞増殖因子と筋萎縮. 第2回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 名古屋, 2011年2月12日 (プログラム・抄録集, p54)

④別府秀彦, 水谷謙明, 岡崎英人, 山口久美子, 園田茂. リハ患者の運動療法評価に利用可能な血液・尿中成分検索条件の検討(7)回復期リハ訓練患者と脳梗塞ラットの血中遊離アミノ酸の測定. 第65回日本体力医学会大会, 千葉県, 2010年9月16日 (体力科学 Vol.59 No.6 p938)

⑤別府秀彦, 水谷謙明, 新里昌功, 山口久美子, 近藤晶子, 林宣宏, 近藤和泉, 高橋久英. B6-wob¹ の

行動解析と病因解析 協調運動と小脳組織の経時的観察. 第9回コ・メディカル形態機能学会学術集会, 新潟, 2010年9月11日 (形態・機能, Vol.9 No.1 p27)

⑥岡崎英人, 別府秀彦, 水谷謙明, 山口久美子, 近藤和泉, 才藤栄一, 園田茂. 筋萎縮ラットにおける肝細胞増殖因子の運動による変化第47回日本リハビリテーション医学会学術集会, 鹿児島市, 2010年5月20-22日 (The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine Vol.47 Suppl. Page S157)

⑦水谷謙明, 園田茂, 山田敬喜, 別府秀彦, 岡崎英人, 新保寛. 脳梗塞ラットへのリハビリ効果および脳内機能的生理活性物質の変動. 第115回日本解剖学会総会全国学術集会, 岩手県, 2010年3月28-30日 (解剖学雑誌 Vol.85 Suppl. Page 194)

⑧別府秀彦, 園田茂, 岡崎英人, 水谷謙明, 山口久美子. リハ患者の運動療法評価に利用可能な血液・尿中成分検索条件の検討(6)回復期リハ訓練患者のUPLC-PDAを用いた血中遊離アミノ酸の測定. 第20回生物試料分析科学会学術集会, 東京都, 2010年3月13・14日 (生物試料分析, Vol.33 No.1 p88)

⑨岡崎英人, 別府秀彦, 水谷謙明, 山口久美子, 近藤和泉, 才藤栄一, 園田茂. ラットにおける肝細胞増殖因子の運動による変化. 第4回リハビリテーション科専門医会学術大会, 下諏訪町, 2009年10月16日 (プログラム・抄録集, p62)

⑩別府秀彦, 園田茂, 岡崎英人, 水谷謙明, 山口久美子. リハビリテーション患者の運動療法評価に利用可能な血液・尿中成分検索条件の検討(5)回復期リハ訓練患者の血中遊離アミノ酸の測定. 第64回日本体力医学会大会, 新潟県, 2009年9月18-20日 (体力科学 Vol.58 No.6 p970)

⑪別府秀彦, 水谷謙明, 林宣宏, 中村政志, 長岡俊

治, 新里昌範, 山口久美子, 高崎昭彦, 園田茂, 新保 寛, 高橋久英. 運動障害モデルマウス B6-wob Takahashi の行動観察と病因解析(1)第8回コ・メディカル形態機能学会学術集会, 京都, 2009年9月12日 (形態・機能 Vol.8 No.1 p41)

⑫岡崎英人, 園田 茂, 別府秀彦, 水谷謙明, 山口久美子, 近藤和泉, 才藤栄一. ラットにおける血清肝細胞増殖因子の日内変動. 第25回日本リハビリテーション医学会中部・東海地方会, 名古屋市, 2009年9月5日 (The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine Vol.46 No.12 Page 811)

⑬岡崎英人, 別府秀彦, 山口久美子, 水谷謙明, 近藤和泉, 岡本さやか, 前田博士, 水野志保, 名護健, 平野 哲, 成田 渉, 才藤栄一, 園田 茂. 筋萎縮マウス作製のためのギブス固定方法. 第46回日本リハビリテーション医学会学術集会, 静岡市, 2009年6月4日 (The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine Vol.46 Suppl. Page S182)

⑭水谷謙明, 園田茂, 山田敬喜, 別府秀彦, 新保寛. 脳梗塞ラットへのリハビリ効果および可塑性関連物質の変動第114回日本解剖学会総会全国学術集会, 岡山, 2009年3月28-30日 (解剖学雑誌 Vol.84 Suppl. Page 247)

⑮別府秀彦, 林宣宏, 岡崎英人, 山口久美子, 水谷謙明, 高崎昭彦, 園田茂. リハビリテーション患者の運動療法評価に利用可能な血清・尿中成分検索条件の検討(4) Ultra Performance Liquid Chromatography を用いた尿および血清中の遊離アミノ酸の測定. 第19回生物試料分析科学会学術集会, 名古屋, 2009年2月21日 (生物試料分析, Vol.32 No.1 p79)

[その他]
ホームページ等
<http://www.fujita-hu.ac.jp/FMIP/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 謙明 (MIZUTANI KENMEI)
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・助教
研究者番号 : 30351068