

令和 6 年 9 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11197

研究課題名（和文）脳梗塞後の麻痺回復とO-GlcNAc修飾を基盤とした脳内分子機構の解明

研究課題名（英文）Recovery of paralysis after cerebral infarction and analysis of molecular mechanisms based on O-GlcNAc modification in the brain

研究代表者

水谷 謙明（Mizutani, Kenmei）

藤田医科大学・医療科学部・准教授

研究者番号：30351068

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞後の麻痺や障害に対して、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。本研究は麻痺回復に関連した脳内分子機構の解明を目指す。脳梗塞モデルを用いて、歩行訓練の有無による有意な運動機能の回復が確認された時点において、脳梗塞巣辺縁大脳皮質におけるタンパク質O-GlcNAc・リン酸化修飾動態の解析を行った。cAMP・MAPK signaling pathwayに関連した受容体作動薬の投与と運動訓練を併用することにより、投与量依存性に運動機能回復が認められた。これらのpathwayに関連した脳内リン酸化タンパクの変化が脳梗塞後の機能回復に関連した分子基盤の一つである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞後のリハビリテーションによる麻痺回復については、脳内の神経可塑性の関与が示唆されるが、その分子機構や生理活性物質についてはほとんどが不明なままである。今回の研究において、タンパク質の翻訳後修飾であるリン酸化・O-GlcNAc修飾を基盤として、プロテオーム解析の手法を用いその分子機構の一端が解明され、薬剤投与・訓練を併用することにより更なる機能回復が認められたことにより、新規治療法の開発という点において重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：There is growing interest in treatment strategies that actively improve paralysis and disability after stroke. This study aims to elucidate the molecular mechanisms in the brain related to paralysis recovery. We analyzed the dynamics of protein O-GlcNAc and phosphorylated modification in the peripheral cortex of the infarcted area when significant recovery of motor function was observed with or without training in a cerebral infarction model. Dose-dependent recovery of motor function was observed in combination therapy with exercise training and administration of receptor agonists related to the cAMP and MAPK signaling pathways. These pathway-related changes in brain phosphoproteins may be one of the molecular bases for functional recovery after cerebral infarction.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：脳梗塞 リハビリテーション 麻痺回復 神経可塑性 分子機構

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脳卒中に対する従来のリハビリで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手法が浸透し始め、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。

現在、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可能となり、麻痺回復した後の脳内で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)。しかし、これらの研究は可塑性変化が起こった後の状態を捉えており、どのようなメカニズムで可塑性が起こっているのか、また直接可塑性に関わる分子が何であるかは現在のところ不明なままである。

## 2. 研究の目的

本研究は脳卒中リハビリの麻痺回復に伴う脳内機能的生理活性物質の変化について、基礎医学面から裏付けることを目的とする。具体的には脳梗塞モデル動物に訓練を行い、麻痺および運動機能の経時変化を解析するとともに、脳内の分子的な変化を翻訳後修飾であるO-GlucNAc修飾及びリン酸化修飾を標的としたプロテオミクス的手法を用いて網羅的解析を行い、脳内における効果規定要因を特定する。また分子機構の解明および薬物療法の開発を行うことによりさらなる機能回復を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 局所性脳梗塞ラットの作製

Watsonら(1985)の報告に準じ、photothrombotic infarctionによる大脳皮質に局所性脳梗塞を作製する。具体的には、ラット(Sprague-Dawley、12週齢、雄)を1週間馴化飼育後、Rose Bengal を尾静脈に投与し、頭蓋骨上から540 nmの光源を20分間照射した大脳皮質限局性脳梗塞動物を実験に用いる。

### (2) 運動訓練方法・リハビリ訓練効果の検討

脳梗塞モデルラットについて虚血手術後2日目から毎日訓練を行う。訓練方法としては、1日12時間のランニングホイールを用いた自発運動訓練を行う(EX群)。これらの訓練方法は以前に検討を行っており、訓練を行わない群(CNT群)と比較して有意な麻痺回復が認められている。麻痺評価は、脳梗塞前、手術後2日(訓練前)から経時的にロータロッド試験により、協調運動の可否、平衡感覚、随意運動の左右差など、麻痺および回復程度を総合的に解析する。

### (3) 訓練効果における脳内O-GlucNAc修飾・リン酸化修飾の動態解析

麻痺評価および運動機能検査にて得られた結果との関連性を裏付けるために、運動訓練の有無により運動機能に有意差が生じた時点での脳梗塞周囲の大脳皮質組織からタンパク質を抽出し、レクチン親和性ゲル電気泳動を用いてO-GlucNAc修飾の検出を行い、さらにショットガンプロテオミクス的手法を用いてリン酸化タンパクに特化した発現

の比較解析を行い、運動訓練により増強される分子の特定を行う。具体的には、現有機器である質量分析装置(サーモフィッシャー社製 Orbitrap Fusion)によりタンパク質およびリン酸化タンパクを同定する。上記解析による結果から、運動訓練の有無による比較を行い、発現の有意差が得られたリン酸化タンパク質の同定し、データベースを用いて pathway 解析を行う。

#### (4) 薬剤投与量・時期・頻度の検討

上記解析の結果から、機能回復に関連する signaling pathway の推定を行い、その pathway に関連した活性化剤を用いて機能回復に対する影響を検討する。主たる目的は、対象となる pathway が麻痺回復に関わる脳内のリン酸化シグナリングに関与しているか否かを決定づけることであり、運動訓練の有無および、0.0, 0.2, 1.0, 5.0 mg/kg の濃度にて G-protein coupled receptor (GPCR) agonist の投与を組み合わせ実施し、運動機能の回復の程度を解析する。

## 4 . 研究成果

脳梗塞後2日目の rotarod における歩行持続時間は CNT 群・EX 群間で有意差は認められなかったが、脳梗塞6日後の EX 群において歩行持続時間の増加が認められ、CNT 群と比較して有意な機能回復が確認された。

GlcNAc の結合はリン酸化と修飾部位が類似していることから、リン酸化修飾の調節を行っていることが知られている。そこで、訓練の有無による脳梗塞後6日目の脳梗塞巣辺縁大脳皮質におけるレクチン親和性ゲル電気泳動を用いて O-GlcNAc 修飾の検出を行った。EX 群・CNT 群との比較において、PKA および MAPK で高分子量側にシフトしたシグナルの相違が確認された。EX 群と CNT 群の比較による大脳皮質リン酸化プロテオーム解析の結果 702 種類のリン酸化タンパクで有意な変化が観察された。変動のあったタンパクについて DAVID による KEGG pathway 解析を行ったところ、cAMP signaling pathway、Glutamatergic synapse、Long-term potentiation、MAPK signaling pathway、などの関与が示唆された。

最も一般的なリン酸化は、セリン、スレオニンまたはチロシン残基上で認められ、タンパク質機能調節を担っている。プロテインキナーゼにおいても同様に、リン酸化による機能調節が行われ、例外はあるものの、基底状態で脱リン酸化・不活性化され、リン酸化により活性化される。そのため前述の pathway の中でリン酸化修飾に変化があったプロテインキナーゼを解析したところ、Calcium/calmodulin-dependent protein kinase, Protein kinase C, cAMP-dependent protein kinase, Mitogen-activated protein kinase, 5'-AMP-activated protein kinase, Rho-associated protein kinase 2 など 15 種類のプロテインキナーゼが直接もしくは間接的に機能回復に関与可能性が示唆された。さらに EX 群において MAPK 8、MAPK 10 の活性化サイトへリン酸化修飾が確認された。

cAMP signaling pathway や MAPK signaling pathway に関連した GPCR の agonist 5.0 mg/kg 濃度の尾静脈投与と運動訓練を併用することにより、rotarod test での歩行持続時間が  $82.5 \pm 11.1$  sec となり、溶媒投与-EX 群  $47.3 \pm 13.5$  sec と比較しての有意な増加が示され、さらに投与量依存性に運動機能回復が認められた。これらの pathway に関連した脳内タンパクの変化が脳梗塞後の機能回復に関連した分子基盤の一つである可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizutani K, Sonoda S, Wakita H, Takahashi Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Effects of exercise and bryostatin-1 on functional recovery and posttranslational modification in the perilesional cortex after cerebral infarction.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroreport	6. 最初と最後の頁 267-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001887.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷謙明
2. 発表標題 脳梗塞モデル動物の機能回復とリン酸化プロテオーム解析による脳内分子機構について
3. 学会等名 脳機能とリハビリテーション第29回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷謙明、園田茂
2. 発表標題 脳梗塞モデル動物の機能回復における脳内分子機構を基盤とした訓練薬剤併用療法の有用性について
3. 学会等名 第15回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷謙明、園田茂、脇田英明、高橋雄
2. 発表標題 脳梗塞モデルラットの訓練による脳内変化と薬剤投与の有効性
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷謙明 園田茂 脇田英明
2. 発表標題 脳梗塞ラットへの訓練効果と脳内リン酸化プロテオーム解析による分子機構の解明
3. 学会等名 第127回日本解剖学会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	脇田 英明  (Wakita Hideaki)  (80416172)	三重大学・医学系研究科・プロジェクト研究員   (14101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	園田 茂  (Sonoda Shigeru)  (10197022)	藤田医科大学・医学部 リハビリテーション医学 ・教授   (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------