

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700642

研究課題名(和文) 脳梗塞リハビリにおける機能回復を誘起する薬物併用療法とその分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of functional molecules in stroke rehabilitation and pharmacotherapy for movement disorders

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・講師

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、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脳梗塞後のリハビリにおいて、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が、脳内の分子機構などについては未だ不明な点が多い。そこで、脳梗塞モデル動物における訓練後の大脳皮質プロテオーム解析を行った。その結果、NGF、PKC、calmodulinなどのタンパク発現の増加が確認された。次に、脳梗塞モデル動物の運動訓練とPKC活性化剤投与の有無による機能回復を運動学的解析により評価を行った。Rotarod testによる評価では、運動訓練・薬物併用療法が運動機能回復に有用であり、訓練単独よりもその回復が増強された。さらにその効果は薬剤用量依存性であった。

研究成果の概要(英文)：It has become widely known that rehabilitation after stroke brings about some improvement of paralysis; however, not much is known about the detailed molecular pathway in the brain. Therefore, identification of molecules related to improvement of paralysis will contribute to establishing a new treatment strategy for stroke rehabilitation. First of all we examined protein expression changes in the cerebral cortex of rat groups with/without exercise after stroke. In the alteration of protein expression profile, NGF, calmodulin and PKC proteins were increased by exercise. Secondly we examined the effects of administration of an activator of PKC, combined with exercise on functional recovery after infarction. In behavioral evaluation using rotarod test, the combination of voluntary exercise and PKC activator administration induced further functional recovery compared with exercise alone, and the behavioral effect seen in administrated animals was dose-dependent.

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：脳梗塞 リハビリテーション 薬物併用療法 神経可塑性 機能回復

1. 研究開始当初の背景

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)。現在では、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。

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、麻痺回復に関連した脳内機能的分子および、神経・シナプス可塑性に関わる分子を特定する。さらに検出された脳内機能的分子を活性化させる薬剤投与により、運動機能障害に対して、どのような影響を与えるかについても解析を行い、訓練・薬剤併用療法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および、Watson ら (1985) の方法に準じて Photo-thrombosis による大脳皮質限局性の脳梗塞モデルを用いた。

(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) を毎日行った群を exercise (EX) 群、訓練を行わなかった群を control (CNT) 群とした。脳梗塞導入前、および梗塞後経時的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、運動機能障害の程度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) 脳内タンパク発現の比較解析

右中大脳動脈閉塞再灌流による脳梗塞導入後 7 日目の梗塞巣辺縁大脳皮質タンパク質を抽出し、antibody microarray を用いて、CNT 群と EX 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。

(4) 大脳皮質における PKC の局在解析
CNT 群・EX 群とも、脳梗塞 6 日後に灌流固定を行い、脳組織を採取、薄切後、抗 PKC 抗体を用いて免疫組織化学染色を実施、その局在について解析を行った。

(5) 訓練・PKC 活性化剤投与併用による効果
Photothrombosis による脳梗塞導入後、EX 群および、CNT 群のそれぞれの群に対して、脳梗塞後 5 日目に PKC 活性化剤 (5~15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$) もしくはその溶媒の尾静脈投与を行った。運動学的機能評価には rotarod test を用い、脳梗塞前と梗塞後 2、4、6、8 日後に評価を行った。

4. 研究成果

(1) 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 CNT 群と比較して、同時期の EX 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)	Ptk2	Protein phosphorylation	1.69
SAPK 3	Mapk12	Protein phosphorylation	1.67
PKC	Prkcb1, Prkcc	Protein phosphorylation	1.64
Casein kinase 2 α	Cskn2A1	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 (NGF), protein kinase C (PKC), calmodulin (CaM)に着目した。

(2) 大脳皮質における PKC の局在解析

抗 PKC 抗体を用いた免疫組織化学染色では、CNT 群と比較して EX 群において、大脳皮質第 III 層での免疫反応性の増加および、梗塞巣近傍の大脳皮質神経細胞においてトランスロケーションが観察され、PKC の活性化が示唆された

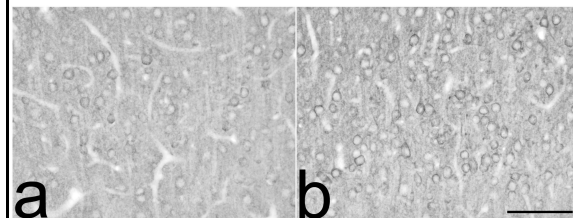


図 2. 大脳皮質第 III 層における PKC の局在
a: CNT group, b: EX group. Scale bar 100 μm

(3) 訓練・薬剤併用療法における 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、CNT 群および EX 群の各群ともにその挙動に変化が認められなかった (図 3)。このことは、脳梗塞後に各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 EX 群では CNT 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 6 日後で有意な歩行持続時間の増加が認められ、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。さらに、脳梗塞後 8 日目に非投与 EX 群と比較して、10, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ の濃度にて薬剤投与を行った EX 群において、有意な歩行持続時間の増加が認められた。一方、薬剤投与 CNT 群では、非投与 CNT 群と比較して、有意な歩行持続時間の増加は認められなかった。これらの結果より、薬剤投与のみでの機能回復は得られず、運動訓練と薬物併用療法が運動機能回復に有用であり、さらに訓練単独よりもその回復が増強されることが示唆された。さらに、薬剤用量依存性に歩行持続時間の増加傾向が認められた。

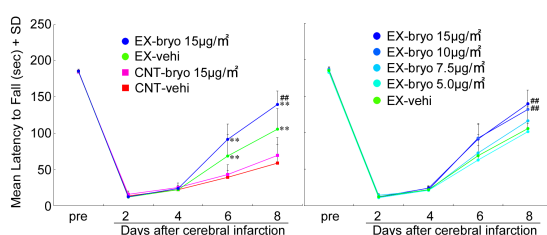


図 3. Rotarod test を用いた運動機能評価における経時変化。

(The EX-vehi and EX-bryo groups (●) were compared with the CNT-vehi and CNT-bryo groups (■); significant differences are indicated as ** $P < 0.01$. The EX-bryo 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ and 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ groups were compared with the EX-vehi and EX-bryo 5.0 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ groups; significant differences are indicated as ## $P < 0.01$.)

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 7 件)

1. Mizutani K, Sonoda S, Wakita H, Katoh Y, Shimpo K. Functional recovery and alterations in the expression and localization of protein kinase C following voluntary exercise in rat with cerebral infarction. *Neurol Sci*. 2014 Jan;35(1):53-9. doi: 10.1007/s10072-013-1477-7. (査読有)
2. Okazaki H, Beppu H, Mizutani K, Sonoda S. Changes muscle and plasma hepatocyte growth factor levels under casting immobilization. *Jpn J Compr Rehabil Sci*. 2013;4:84-87 (査読有)
3. Takayanagi N, Beppu H, Mizutani K, Tomita Y, Nagao S, Suzuki S, Orand A, Takahashi H, Sonoda S. Pelvic axis-based gait analysis for ataxic mice. *J Neurosci Methods*. 2013 Sep 30;219(1):162-8. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.07.011. (査読有)
4. Masanori Shinzato, Hidehiko Beppu, Kenmei Mizutani, Shigeru Sonoda, Toshihiko Katafuchi, Masataka Ifuku, Mami Hanada, Naoki Takayanagi, Kumiko Yamaguchi, Hiroyuki Nakagawa, Youzi Watanabe, Hisahide Takahashi. Analysis of motor ataxia in relation to cerebellar morphology in the B6-wob/t mouse. *Structure and Function*. 2013; 12(1):10-19 (査読有)
5. Hidehiko Beppu, Kenmei Mizutani, Naoki Takayanagi, Masanori Shinzato, Shigeru Sonoda, Hisahide Takahashi. Characterization of ataxia shown by an abnormal behavior mouse derived from the C57BL/6-cpk mouse with infantile cystic kidney disease. *Structure and Function*. 2013; 11(2): 92-101 (査読有)

6. Mizutani K, Sonoda S, Karasawa N, Yamada K, Shimpo K, Chihara T, Takeuchi T, Hasegawa Y, Kubo KY. Effects of exercise after focal cerebral cortex infarction on basal ganglion. *Neurol Sci*. 2013 Jun;34(6):861-7. doi: 10.1007/s10072-012-1137-3. (査読有)

7. Mizutani K, Sonoda S, Yamada K, Beppu H, Shimpo K. Alteration of protein expression profile following voluntary exercise in the perilesional cortex of rats with focal cerebral infarction. *Brain Res*. 2011 Oct 6;1416:61-8. doi: 10.1016/j.brainres.2011.08.012. (査読有)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 水谷謙明, 園田 茂, 別府秀彦, 高柳尚貴. 脳梗塞ラットへの訓練・薬剤併用療法による脳内分子の変化. 第 5 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 東京, 2014 年 2 月 15 日 (プログラム・抄録集、p97)

2. 別府秀彦, 水谷謙明, 新里昌功, 富田豊, Abbas Orand, 高柳尚貴, 新保 寛, 園田 茂. 小脳失調マウスへの強制歩行運動および環境エンリッチメント (Enriched Environment : EE) 飼養が自発的活動量および歩行影響. 第5回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 東京, 2014年2月15日 (プログラム・抄録集、p99)

3. 別府秀彦, 岡崎英人, 玉井育子, 水谷謙明, 尾関保則, 井谷功典, 富田 豊, 宮坂裕之, 谷野元一, Orand Abbas, 千原 猛, 新保 寛, 園田 茂. 回復期リハビリテーション患者の入院および退院時 FIM運動評価に関連する血中遊離アミノ酸の検索. 第24回生物試料分析化学会年次学術集会, 三重鈴鹿, 2014年3月1-2日.

4. 水谷謙明, 園田 茂, 別府秀彦, 高柳尚貴. 脳梗塞ラットへの薬剤投与による訓練効果.

第4回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 岡山, 2013年2月17日 (プログラム・抄録集、p177)

5. 高柳尚貴, 園田 茂, 別府秀彦, 水谷謙明, 山口久美子, 富田 豊, Abbas Orand. 運動失調マウスの歩行解析(3): 運動負荷が失調歩行に及ぼす影響. 第 4 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 岡山, 2013 年 2 月 17 日 (プログラム・抄録集、p178)

6. 別府秀彦, 富田 豊, 園田 茂, 高柳尚貴, 水谷謙明, Abbas Orand, 山口久美子, 新里昌功. 小動物用重心動揺計の開発および運動失調マウスの振戦の測定. 第 4 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 岡山, 2013 年 2 月 17 日 (プログラム・抄録集、p178)

7. 別府秀彦, 水谷謙明, 玉井育子, 山口久美子, 高柳尚貴, 園田茂. UPLC-SQD を用いた小脳変性マウス大脳、小脳、橋・延髄内遊離アミノ酸量の検討. 第 23 回生物試料分析科学会, 大阪市, 2013 年 2 月 10-11 日

8. 別府秀彦, 富田豊, 園田茂, 高柳尚貴, 水谷謙明, 山口久美子, Abbas Orand, 新里昌功, 高橋久英. 小動物用重心動揺計の開発および運動失調マウス B6-wob/t の振顫の測定. コ・メディカル形態機能学会第 11 回学術集会・総会, 東京, 2012 年 9 月 22 日

9. 高柳尚貴, 園田 茂, 別府秀彦, 水谷謙明, 山口久美子, 富田 豊, Abbas Orand, 新里昌功, 高橋久英. 運動失調マウス B6-wob/t の歩行解析: 運動負荷が失調歩行に及ぼす影響. コ・メディカル形態機能学会第 11 回学術集会・総会, 東京, 2012 年 9 月 22 日

10. 別府秀彦, 水谷謙明, 園田 茂, 高柳尚貴, 山口久美子, 高橋久英. 運動失調マウス

B6-wob^t の行動解析 (8) 強制歩行運動が運動協調性に与える影響. 第67回日本体力医学会大会, 岐阜県, 2012年9月14-16日 (体力科学 (2012) 61(6) pp.740)

11. 新里昌功, 別府秀彦, 水谷謙明, 山口久美子, 中村政志, 高柳尚貴, 園田 茂, 高崎昭彦, 高橋久英. 運動失調マウス B6-wob/t の幼若期の組織細胞学・免疫組織化学染色の観察および LMD による小脳タンパク成分の同定. 第 7 回日本臨床検査学教育学会, 名古屋, 2012 年 8 月 22-24 日

12. Mizutani K, Sonoda S, Yamada K, Beppu H, Shimpo K. **IDENTIFICATION OF PROTEINS RELATED TO FUNCTIONAL RECOVERY IN THE PERILESIONAL CORTEX OF RATS WITH CEREBRAL INFARCTION.** 7th World congress neurorehabilitation 16-19 May, 2012 at Melbourne

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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・
講師
研究者番号：30351068

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：