

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12579

研究課題名(和文)脳梗塞後に生じる痙縮が麻痺筋の神経筋接合部に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of neuromuscular junction in paralysis spasticity muscle after stroke

研究代表者

李 佐知子(LEE, Sachiko)

名古屋大学・医学系研究科(保健)・准教授

研究者番号：80599316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後の神経筋接合部の形態および受容体などの量的変化が生じるかどうかは不明な点が多い。本研究では、脳梗塞後痙縮発症モデルを用い、脳梗塞後痙縮を発症したの麻痺筋の神経筋接合部において、形態変化の有無と、発現する受容体などの量的変化をmRNAの定量解析を行った。脳梗塞後2～12週間の神経筋接合部は、神経軸索の発芽や終板の断片化などはほとんど観察されなかった。また量的変化について、アセチルコリン受容体サブユニットアルファ1およびイブシロンの発現量がコントロール群と比較して有意に増加していた。麻痺筋の神経筋接合部では形態変化は見られなかったが、機能に関わる受容体の変化が生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is not clear that paralysis spasticity muscle after stroke cause formational and quantitative changes of neuromuscular junction. In this study, we checked the formational changes of neuromuscular junction using histological method and quantitative mRNAs expression change of using spasticity mouse model after stroke. We inspected formational changes of neuromuscular junction from 2 to 12 weeks after stroke, we could not any formational changes in neuromuscular junction compare to control model. Next, we checked quantitative mRNA expression changes between stroke and control models. In this results, mRNA expressions of acetylcholine receptor subunit $\alpha 1$ and ϵ were increased significantly compare to control. In our study, although it did not confirm formational changes in neuromuscular junction after stroke, however, receptor mRNAs, concerned with receptor function, are possibly changed,

研究分野：理学療法学

キーワード：痙縮 神経筋接合部 アセチルコリン受容体

1. 研究開始当初の背景

近年、痙縮の治療に麻痺筋へのボツリヌス毒素注射が盛んにおこなわれ、治療ターゲットとして神経筋接合部が注目されている。ボツリヌス毒素の痙縮治療の作用機序は、亜鉛-エンドプロテアーゼであるボツリヌス毒素が、軸索終末で小胞に貯蔵されたアセチルコリンが細胞外に開口分泌される際に必要になるシナプトプレビン・シンタキシン・SNAP25を分解しアセチルコリンの分泌を抑制し、筋収縮を阻害することで痙縮に伴う筋収縮を抑制している。痙縮による不随運動だけでなく、随意運動をも抑制してしまうため脳梗塞後急性期の利用は運動麻痺の回復を促すリハビリテーション治療を阻害する恐れがあり、ボツリヌス毒素注射は脳梗塞後慢性化した痙縮への治療目的として利用されているのが現状である。

ボツリヌス毒素の作用点である神経筋接合部が、脳梗塞後麻痺や痙縮発症により可塑的变化が生じるか、さらにボツリヌス毒素注射による神経筋接合部の二次的变化が生じるかなど不明な点が多い。

2. 研究の目的

脳梗塞後において神経筋接合部での機能異常が存在する可能性があるが、その詳細は不明である。そこで本申請課題では、脳梗塞後の神経筋接合部を経時的に観察することで、質的な形態変化が生じるか検討し、さらにアセチルコリン受容体の量的変化についても明らかにすることを一つの目的とした。さらにアセチルコリン受容体の発現量増加および受容体のサブユニットの変化について検討するために mRNA の発現量を定量的に解析する。また発現したアセチルコリン受容体がシナプスを形成している可能性を確認するために、神経筋接合部における基底膜に存在するラミニン b2 およびアセチルコリン、ラプシンの mRNA を定量解析することとした。

3. 研究の方法

本研究は名古屋大学動物実験委員会の承認(承認番号 013-046)を得て、名古屋大学における実験動物等に関する取扱規定に従って行った。

実験動物

動物は、運動神経軸索が黄色蛍光タンパク質(yellow fluorescent protein, YFP)で可視できるトランスジェニックマウス C57BL/6J (Thy1-YFP) 雄性 8-10 週齢マウス(The Jackson Laboratory, USA)を用いた。このマウスは、脊髄運動神経細胞に発現している Thy1 プロモーターに YFP を組み込むことで、脊髄運動神経細胞、神経軸索に蛍光タンパク質 YFP が発現するため、黄色に可視することができる。mRNA の定量解析では C57BL/6J 雄性 8-10 週齢マウス(日本 SLC, 静岡, 日本)を用いた。全てのマウスは、通常のゲージ、飼料、水を使用し、室温 25 度、12 時間サイクルの明暗調節された飼育室で飼育した。

痙縮発症脳梗塞モデルの作成

我々は、Photothrombosis 損傷を用い、痙縮発症脳梗塞を作成した。マウスに麻酔薬であるソムノペンチル(50 mg/kg 動物体重, 共立製薬, 東京, 日本)を腹腔内投与し、麻酔下でステレオタキシクに固定した。その後 Rose bengal 液(0.03 mg/g, 0.9%生理食塩水にて 10mg/ml に希釈, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を尾静脈に投与した。頭皮を切開し頭蓋骨を露出させた後、頭蓋骨上から LED 冷光源(CL 6000 LED, Zeiss, Oberkochen, German)を用いて、左補足運動野および上肢運動野に 15 分間光線を照射し脳虚血を生じさせ、その後頭皮を縫合した。コントロール群は、光線の照射を行わない群とした。

神経筋接合部の形態解析

ソムノペンチルで麻酔をした後に、0.2 M phosphate buffer (PB, リン酸緩衝液)で希釈した 4% Paraformaldehyde (PFA, パラホルムアルデヒド)で還流固定した。マウスの前腕を切断し、4% PFA で 1 時間後固定した。その後、マウスの麻痺側手指から小指外転筋を採取し phosphate buffered saline (PBS, 生理的リン酸緩衝液)で洗浄した。室温下にて、PBS 希釈の 5% bovine serum albumin (BSA, ウシ血清アルブミン) / 0.3% Triton (TritonX-100) で 1 時間ブロッキング処理した。その後、アセチルコリン受容体に特異的に結合する Alexa Fluor 594 で標識された 0.2 μl α-bungarotoxin (1 : 5000, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)をブロッキング溶液で希釈したもので反応させた。4°C で 1 日反応させた後、tween 20-phosphate buffered saline (PBS-T)で 5 分間の洗浄を 3 回行い、封入した。画像は全て蛍光顕微鏡(100 倍, BZ-9000 BIOREVO, KEYENCE, 大阪, 日本)で観察し撮影を行った。各サンプルから 25 個の神経筋接合部の画像を撮影し、得られた画像からアセチルコリン受容体の断片化など形態変化のみられたものをカウントし定量評価した。運動神経軸索は YFP により神経が可視できるため、共焦点レーザー顕微鏡(40 倍, A1Rsi, Nikon, 東京, 日本)を使用し観察した。定性評価は、運動神経軸索の発芽、運動神経軸索に対応する受容体の無いものや軸索投射の無いアセチルコリン受容体の観察を行い、その有無を全サンプルで確認をした(図 1)。

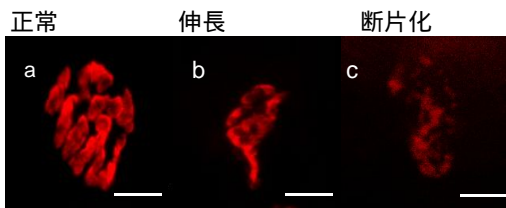


図 1 神経筋接合部のアセチルコリン受容体画像
a: 正常な受容体、b: 伸長した受容体、c: 断片化
α-bungarotoxin: 赤) Scale bar = 10 μm

mRNA 定量解析

脳梗塞後 1 週間でコントロール群、脳梗塞群ともに麻痺側上肢の小指外転筋および、同筋の脊髄神経支配レベルを含む C5 から Th1 までの麻痺側の脊髄前角領域を採取した (コントロール n = 5, 脳梗塞群 n = 5)。採取した組織から total RNA 抽出し、分光光度計 (nanoDrop, Thermo Fisher Scientific, USA) で濃度測定を行った後、相補 DNA に変換した。Real time reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction (real time RT-PCR) は Applied Biosystems StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を用いて行った。解析法は $\Delta\Delta Ct$ 法を使用した。使用したプライマーは、アセチルコリン受容体サブユニット $\alpha 1$ (Chrn1)、 $\beta 1$ (Chrn1)、 γ (Chrn3)、 ϵ (Chrn5) およびラミニン $\beta 2$ (lamb2)、アセチルコリンエステラーゼ (Ache)、ラプシン (rapsyn) を選択した (表 1)。内部標準として高等動物の解糖系に参与し、発現量が一定であるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; gapdh) を用いた。

統計解析

全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差 (means \pm S.E.M.) で示した。コントロール群と脳梗塞群の形態変化、mRNA 発現量の比較として、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行い、事後検定として Tukey-Kramer を用いた。すべての検定で有意水準は 5% 未満とした。

4. 研究成果

脳梗塞後における神経筋接合部の形態変化

神経筋接合部の形態評価は、後シナプスに存在するアセチルコリン受容体を Alexa 594 α -bungarotoxin で標識し、その領域を観察した。脳梗塞後 2, 4, 8, 12 週では、脊髄損傷モデルで報告されている脱神経や断片化、受容体の消失など形態には有意な変化が確認できなかった (図 2)。コントロール群と脳梗塞群では明らかな差はなく、評価した 25 個アセチルコリン受容体以外も、全体的に多くが正常なアセチルコリン受容体であり大きな形態変化はみられなかった。黄色蛍光タンパク YFP を発現している運動神経軸索は、共焦点レーザー顕微鏡で定性評価を行った。受容体と同様に、脊髄損傷後にみられた運動神経軸索の発芽などの形態変化は、脳梗塞後 2-12 週まで経時的にみても確認できなかった。組織全体を観察したが、コントロール群と脳梗塞群に明らかな差は無く、軸索の投射は鮮明に確認できた。また軸索の発芽や複数投射など観察した限りでは見受けられなかった。

受容体発現量増加を示唆する mRNA の発現量増加

脳梗塞後における神経筋接合部の量的検討として、アセチルコリン受容体サブユニット、神経筋接合部の形態マーカーであるラミ

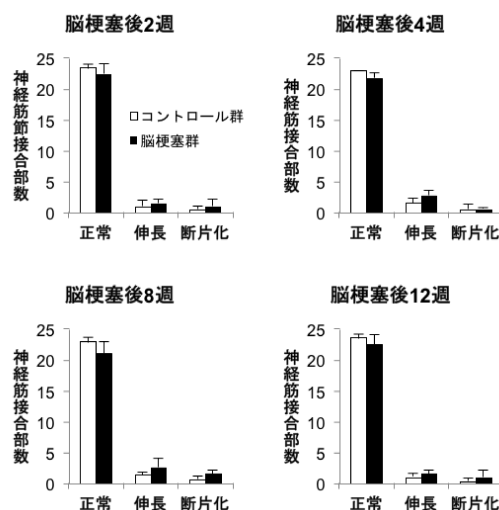


図 2 脳梗塞後における経時的な神経筋接合部の形態変化 (A-D) 脳梗塞後 2, 4, 8, 12 週における形態評価。(A, D: コントロール群, n = 2, 脳梗塞群, n = 2; B, C: コントロール群, n = 2, 脳梗塞群, n = 4; C: コントロール群, n = 10, 脳梗塞群, n = 8). n 数が確保できた脳梗塞群 8 週群のみ統計処理を行った。Means \pm SEM (one way ANOVA)

ニン $\beta 2$ 、AChE やラプシンの mRNA を定量解析した。脳梗塞後 1 週目にアセチルコリン受容体サブユニット $\alpha 1$ 、 ϵ 、の mRNA 発現量がコントロール群に対して有意に増加した (図 3; $p < 0.01$)。一方、アセチルコリン受容体サブユニット γ 、ラプシンの mRNA 発現量には有意差がなかった。

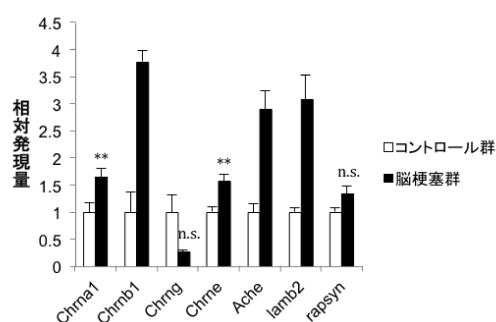


図 3 mRNA 発現変化

Chrn1: アセチルコリン受容体サブユニット $\alpha 1$ 、Chrn1: $\beta 1$ 、Chrn3: γ 、Chrn5: ϵ 、lamb2: ラミニン $\beta 2$ 、Ache: アセチルコリンエステラーゼ、rapsyn: ラプシン Means \pm SEM ** < 0.01 (one way ANOVA, 事後検定: Tukey-Kramer)

脊髄損傷モデルラットを用いた先行研究では、アセチルコリン受容体の消失や断片化、脱神経など形態変化が脊髄損傷 2 週目に最も多く生じ、この現象は損傷後 2 か月まで確認されている。脊髄の完全損傷による運動神経麻痺による神経活動の減弱の影響によりアセチルコリン受容体の断片化や消失が生じ、この構造変化の代償として運動神経軸索が発芽すると考えられている。この現象は、末梢神経損傷や神経遮断薬のボツリヌス毒素を用いた麻痺モデルでも同様の変化が

生じるとも言われている。そして、脊髄損傷後に、トレッドミル運動をした場合には、運動神経軸索の発芽や、アセチルコリン受容体の消失現象が抑制されたとの報告されている。つまり、神経筋活動が神経筋接合部での形態変化に影響を与えると考えられる。本研究では、脳梗塞後早期となる損傷2週間後から慢性期となる損傷12週間にわたって神経筋接合部の大きな形態変化は確認できなかった。脳梗塞後の運動神経麻痺による神経活動の減弱は、脊髄損傷モデルと比較して弱くその結果神経筋接合部の形態変化が見られなかった可能性が考えられる。より詳細な変化を観察できる電子顕微鏡などで観察することを検討している。

脳梗塞後に神経筋接合部の量的変化の可能性が示唆された

脳梗塞後1週間でアセチルコリン受容体サブユニット $\alpha 1$ と ϵ のmRNA発現量がコントロール群に対し有意に増加した。成熟型を構成するアセチルコリン受容体サブユニット ϵ のmRNA発現量が有意に増加しているのに対し、出生間のない未熟な筋や脱神経筋に発現するアセチルコリン受容体サブユニット γ のmRNA発現量に有意な増加はみられない。つまり、脳梗塞後に成熟型のアセチルコリン受容体の発現量が増加する可能性が考えられた。一方、先行研究において末梢神経損傷、不活動や加齢により未熟型アセチルコリン受容体サブユニット γ のmRNAの発現量が増加するという報告が多く存在している。そのため、本研究結果が麻痺による廃用などの影響を反映していない結果と考えられた。また本研究では、シナプスを形成している神経筋接合部の形態マーカーとしてラミニン $\beta 2$ とAChEを用い、脳梗塞後にラミニン $\beta 2$ とAChEのmRNA発現量がコントロール群に対し増加傾向を示しており、脳梗塞後にシナプスを形成している成熟型アセチルコリン受容体の発現量増加が生じる可能性が考えられた。

本研究の結果、脳梗塞後痙縮した骨格筋における神経筋接合部には大きな形態変化はみられない可能性が示唆された。運動麻痺や痙縮などの筋活動変化が生じることから、一部のmRNA発現変化がみられたことから、受容体機能の変化など形態変化では観察されない変化が生じている可能性が考えられる。より詳細な変化の有無を観察する必要があり、今後の検討課題である。

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 0件)
投稿準備中

〔学会発表〕(計 3件)

鹿島崇人、李佐知子「脳梗塞後、脳幹網様体神経細胞にシナプスの恒常的可塑的变化が

生じる」、第52回日本理学療法学会、千葉、2017年

鹿島崇人、李佐知子「脳梗塞後痙縮発症マウスの延髄網様体神経細胞における恒常的可塑的变化の可能性」、第39回日本神経科学学会、横浜、2016年

李佐知子「脳梗塞後痙縮発症マウスの延髄網様体神経細胞の活動性変化および延髄網様体脊髄路切断によるHoffmann反射のRate dependent depressionの再現」、第38回日本神経科学学会、神戸、2015年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0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.lee-lab.com/>

6. 研究組織
(1)研究代表者
李 佐知子 (LEE, Sachiko)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80599316

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()

