

## 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：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19966

研究課題名(和文)脳梗塞後の上肢運動機能回復に伴う皮質可塑性においてリーリンは必要か?

研究課題名(英文)The involvement of reelin in the cortex-dependent skilled learning after a stroke

研究代表者

西部 真理子(Nishibe, Mariko)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：50638757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リーリンは大脳皮質6層形成に必須のタンパクである。大脳皮質可塑性におけるこのリボタンパク質(リーリン: reelin)の機能に注目した。実験により、ヘテロ結合型(r1/+)の学習効果は、コントロール群ほど起きないことが分かった。大脳皮質での脳可塑性変化(Microtubule associated proteinsやsynaptophysin)はWT群の方が高い様である。皮質上肢運動野マップ領域も運動学習により変化が顕著であった。学習行動により起こる大脳皮質での変化には、リーリンが関与していると示唆される。脳梗塞後のリーリンの関与に関して再現実験等を行い結果をまとめている段階である。

研究成果の概要(英文)：The physiological functions of reelin in vivo during adulthood remain controversial. We tested if there is a behavioral phenotype in the adult heterozygous reeler mice on the skilled reach task. The heterozygous reeler mice could learn to reach and grasp singly presented pellets, but the successfully retrieved number of pellets was lower than that achieved by the WT. We then assessed the physiological integrity of the motor cortex in HRM and WT littermates, before and after the training on skilled reach, using intracortical microstimulation. We found that this forelimb training exerted bilateral effects on the cortical forelimb map constitution. The level of synaptophysin and neurofilament expression levels heighten in the WT post-training. We are currently summarizing the results for post-stroke learning outcome measures.

研究分野：神経科学

キーワード：Motor Learning Reelin

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管障害の運動後遺症に対する治療効果は不十分であり、患者の QOL 向上には根本的治療法の開発が必要とされている。その鍵を握るのが、随意性の高い動作習得を可能にする皮質運動野の代償的可塑性である。皮質運動野損傷部の働きを残った領域で代償的に再構築することができれば、障害後の運動機能を回復出来ると期待されるが、皮質可塑性分子メカニズムは解明されていない。申請者は想定する複数の可塑性に関わる因子の中で、リーリン (reelin) に特に着目する。本申請書では、リーラーヘテロモデル (hetero-reeler: rl/-) を使い、行動機能制御に伴う皮質運動野可塑性変化でのリーリンの役割解析を通じて、脳血管障害後の新たな回復機序の解明を目的とする。

外傷や血管障害による中枢神経損傷は、神経細胞死・神経細胞機能低下を引き起こし、中枢神経回路網を断ち、損傷の場所や広がりによって、後遺症としてさまざまな障害をきたす。後遺症により、介護が必要となる場合など、患者さんは社会生活や私生活の低下を強いられるのが現状である。現在、後遺症に対するリハビリなどの治療効果は不十分であり、より効果的治療法の開発が必要とされている。

申請者は、controlled cortical impact (CCI) 脳損傷モデル (Nishibe et al 2010) と Endothelin-1 薬剤を使った脳卒中モデル (Nishibe et al., 2014) でラットの一次運動野を損傷した。損傷後に、intracortical microstimulation (大脳皮質の刺激) で、ラット同側の皮質二次運動野の領域マップを作成した。結果、a.二次運動野での上肢領域マップの機能代償的可塑と、b.その可塑性に比例する機能回復を示した。皮質運動野領域の再構築は、運動機能回復を促進する脳細胞可塑的变化である。リハビリトレーニングを施すと、遠位上肢領域「指や手先の動作をつかさどる上肢領域部」の再構築が広範囲にわたり、手先運動機能の回復もある程度観察できた。しかし、損傷前の回復度には至らなかった。本研究では、回復メカニズムをさらに検証し、機能回復を助ける細胞変化の促進方法解明を長期目標とする。

本研究は大脳皮質での代償的可塑性に関与するタンパク質を特定する。特定する事により、回復促進方法解明につながる。神経回路の再構築や機能代償的可塑に関与するタンパク質として、申請者はリーリン (reelin) に着目した。リーリンは、発達中の脳に発現し、大脳皮質 5 層形成に必要な糖脂蛋白である。リーリンが全く欠如すると脳回欠損が起きる。成体においても

GABA 抑制介在ニューロンから放出されるシナプス形成の調整など重要な役割がある。ヘテロリーラーマウス (reeler: rl/-) はリーリン発現と抑制神経 GABA parvalbumin (パルブアルバミン) の発現が半分に落ちる。

脳損傷後の回復メカニズムを解明するためには、無傷時でのリーリンの働きを明らかにすることもまず重要である。予備実験で、申請者はマウスがペレットを手のひらで掴んで食べる運動課題 (skilled reach task) で、無傷ヘテロリーラー (rl/-) マウスではワイルドタイプリーラーマウス (rl/rl) に比べ課題成功率が劣ることを示した (研究計画参照)。本予備実験で得た (rl/-) と (rl/rl) の運動学習能力の違いは、リーリンが可塑性に関与すると示唆し、リーラー半不全 (ヘテロ) モデルが、神経可塑性を引き起こす行動変化の評価に適切だと示す。

次に、(rl/-) リーラーと (rl/rl) リーラーでは皮質運動野領域マップに違いがあるかを検証する。さらに、運動学習後に運動領域マップ (i.e. 「指や手の動作をつかさどる上肢領域部」「顔の筋肉の動きを反映している顔面領域部など」) が再配置されるかを調べる。またその再配置に伴うタンパク質の種類を特定し定量する。

## 2. 研究の目的

(a).  
本研究で、リーラーヘテロ結合型モデル (hetero-reeler: rl/-) を使い、行動機能制御に伴う皮質運動野可塑性変化でのリーリンの役割解析を通じて、脳血管障害後の新たな回復機序の解明を目的とした。

(b).  
リーラー欠損モデルを用いて、ホモ結合型 (rl/rl) の層構造が逆転する事から、大脳皮質層構造の運動機能制御における役割を検討した。

## 3. 研究の方法

1  
運動学習前後 (rl/-) と (rl/rl) の皮質運動野領域マップを検証し、運動野領域マップが再構築されるかを調べることで、上肢運動学習におけるリーリンの役割を検討する。

2  
内包梗塞モデルを樹立する。モデルの適正に関しては、梗塞範囲定量、梗塞周囲部位・遠隔部位での組織的变化と、運動機能により評価を行う。

01. (rl/-) と (rl/rl) の運動学習能力の差を示す。

02. 運動野領域マップの大きさと運動機能とは必ずしも評価時によって比例するとは限らないことが近年の研究で明らかになってきた(領域マップエリアが大きければ機能が高いとは限らない)(Neurobiol learn mem, 98(3):291-302, 2012)。そこで、運動学習前の時点で運動機能レベルがリーリンの発現量により領域エリアに反映されるのかを(rl/-)と(rl/rl)を用いて明らかにする。さらに、運動学習後、能力向上に伴い上肢領域マップの再構築があるのかを明らかにする。
03. 運動野領域の再構築に伴う解剖的变化と分子的变化(i.e.可塑性タンパク質)をWestern blotと免疫染色で明らかにする。
04. 運動野 2-3 層の電場電位を評価する。更に、運動学習によってリーラーヘテロ(rl/-)でもシナプスの長期増強(LTP)が起こるか明らかにする。
05. 内包でのフォーカル梗塞モデルをEndothelin 注入方法を使い確立する。内包での損傷範囲とその影響(リーリン発現量、GABA 神経死、グリア反応、炎症反応)を急性回復時と慢性回復時に免疫組織化学的手法により検討する。また、Biotinylated dextran amines (BDA) 順行性トレーサーでの皮質脊髄経路の損傷定量も行う。
06. (rl/-)と(rl/rl)でそれぞれ、自発的回復グループとリハビリテーショングループの運動回復と脳可塑的变化を解明する。

#### 4. 研究成果

01. ヘテロ結合型(rl/+)の学習効果は、コントロール群ほど起きないことが分かった。上肢運動機能パフォーマンスはヘテロ結合型(rl/+)で、WTを下回る結果になった。
02. 運動学習後、能力向上に伴い上肢領域マップの再構築がヘテロ結合型(rl/-)でもおこったが、特にWT群においては学習された上肢側と反対肢側でも上肢マップ領域が広範囲に及んだ。運動学習前の時点ではヘテロ結合型(rl/-)とコントロール(rl/rl)群では上肢運動野マップには差が見られなかった。
03. 両群でWestern blotと免疫染色は運動学習後、synaptophysinとMicrotubule associated proteinsの発

現強化された。

04. 運動学習によってリーラーヘテロ(rl/-)でもシナプスの長期増強(LTP)が起こる。
05. 内包でのフォーカル梗塞モデルをEndothelin 注入方法を使い確立した。内包での損傷範囲から反対側でも細胞死、apoptosisは確認されたBiotinylated dextran amines (BDA) 順行性トレーサーでの皮質脊髄経路の損傷を定量した。
06. (rl/-)と(rl/rl)でそれぞれ、自発的回復グループとリハビリテーショングループの運動回復と脳可塑的变化の結果をまとめている。
07. 加えて、末梢神経異常の有無を調べるために神経筋接合部の形態・アセチルコリン受容体の構成成分とコリナージック神経細胞活動レベルの比較結果は、WTとヘテロ結合型リーラーマウスで違いは認められなかった。
08. 薬剤を使用した内包梗塞モデルは、当初考えられた様に、再現性が高くマウスの死亡率も低い結果が得られた。損傷後の運動機能障害は顕著なものであり自発的回復も限界がある。従って、皮質脊髄路の経路再形成を調べていくのに非常に適したモデルといえる。
09. さらに、大脳皮質運動野梗塞モデルphotothrombosis 手技に関して rose Bengal 薬剤直接投与を用いて作成し、モデルを当教室で立ち上げた。Photothrombosis では大脳皮質の上肢と下肢の運動制御をつかさどるエリアに損傷を局限させる事が可能である。自発的回復も少ないので脳損傷後の回復過程を調査するモデルとして適している。

実験により、ヘテロ結合型(rl/+)の学習効果は、コントロール群ほど起きないことが分かった。運動制御をつかさどる大脳皮質運動野マップをIntracortical microstimulation (ICMS)を用いて検討した所、両群で、学習された上肢側はトレーニング反対肢側の大脳皮質においてマップ領域に再構築があった。ただし、WT群においてはトレーニング上肢同側大脳皮質においてもマップ領域が広がった。

また、大脳皮質での脳可塑性変化(Microtubule associated proteins や synaptophysin)に関してWT群の方が高い事が分かった。学習行動により起こる大

脳皮質での変化には、リーリンが関与していると示唆される。ただし、コリナージック末端神経や神経筋接合部では違いが見られなかった。

(4)研究協力者

なし

( )

#### 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 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

01.

第 93 回日本生理学会大会 招待講演  
2016 年 03 月 22 日-2016 年 03 月 24 日、札幌 「ラットモデルでの検証報告: 上肢運動機能回復と上肢運動マップ再構築に及びリハビリの時間的効果、西部真理子、山下俊英

02.

第 10 回 Motor Control 研究会 ポスター発表 2016 年 09 月 01 日-09 月 03 日、東京慶應義塾大学日吉キャンパス 「Reeler Motor Control」西部真理子、山下俊英

03.

第 5 回骨格筋生物学研究会 ポスター発表 2017 年 03 月 03 日-03 月 05 日、東京大学駒場キャンパス、東京、「リーラーマウスの骨格筋評価」、西部真理子、山下俊英

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等  
教室ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

西部 真理子 (Mariko Nishibe)  
大阪大学・医学系研究科 招へい教員  
研究者番号 : 50638757

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3)連携研究者 ( )

研究者番号 :