

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K01483

研究課題名(和文) 脳梗塞後の麻痺回復に関わる翻訳後修飾を基盤とした脳内分子機構の解明

研究課題名(英文) Post-translational modification-based molecular mechanisms in the brain involved in recovery of paralysis after cerebral infarction.

研究代表者

水谷 謙明(Kenmei, Mizutani)

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物に脳梗塞を誘導し、訓練による機能回復が認められた大脳皮質リン酸化プロテオーム解析の結果、cAMP、MAPK signaling pathwayなどの関与が示唆された。これらのpathwayの中でリン酸化修飾に変化があったキナーゼを解析したところ15種類が挙げられ、PKCの活性化剤であるBryostatin-1と運動訓練を併用したところ、PKCの下流に位置するGSK3 Ser9のリン酸化による阻害、さらにCRMP2のリン酸化抑制により、微小管重合による軸索伸張が誘導されることが推測された。この変化が可塑性を誘導し訓練及び薬剤投与による機能回復に関連した分子基盤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

近年、脳卒中後の麻痺や障害に対して、脳の可塑性変化に基づいた新たなリハビリテーション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が、実際、脳内では何が起きて麻痺回復に繋がっているのか不明である。そこで、脳卒中リハビリテーションの麻痺回復に関連した分子機構をタンパク質のリン酸化網羅的解析によりターゲット分子を特定し、さらにProtein kinase C(PKC)の活性化剤を投与することにより、訓練単独より更なる運動機能のが認められた。PKCの下流に位置する分子機構についても解析を行い分子の相互作用についても明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The results of a phospho-proteome analysis of peripheral infarcted cortex, in which functional recovery was observed after training after inducing infarction in rats, suggested the involvement of cAMP signaling pathways, MAPK signaling pathways, and others. The analysis of kinases with altered phosphorylation in these pathways revealed 15 kinases. The combination of bryostatin-1, an activator of PKC, and exercise training resulted in inhibition of GSK3 Ser9 phosphorylation, which is located downstream of PKC, and inhibition of CRMP2 phosphorylation. It was speculated that inhibition of CRMP2 phosphorylation induces axonal elongation by microtubule polymerization. The effect of bryostatin in combination with training appears to be mediated via PKC phosphorylation, with effects on functional recovery occurring through the downstream regulation of GSK3 and CRMP2 phosphorylation.

研究分野：ニューロ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 脳内分子機構 薬剤投与

## 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の一つであるリン酸化を標的としたプロテオミクスの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、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、photothrombotic infarctionモデルによる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。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、麻痺程度を総合的に解析する。

### (3) 訓練効果における脳内リン酸化タンパク質の網羅的解析

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、ショットガンプロテオミクスの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

Pathway解析の結果から、機能回復に関連するリン酸化酵素の推定を行い、その酵素の活性化剤もしくは阻害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、対象となる酵素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、薬剤投与後の運動機能の回復を観察しながら、投与量、投与頻度、投与時期等の検討を行う。

#### 4 . 研究成果

脳梗塞後2日目の歩行持続時間はCNT群  $13.8 \pm 1.6$  sec、EX群  $13.2 \pm 4.0$  sec であり両者に差は認められなかったが、脳梗塞6日後の歩行持続時間はCNT群で  $25.2 \pm 15.0$  sec EX群で  $73.7 \pm 12.7$  sec となり、2日目から6日目の歩行持続時間増加量はEX群で  $60.5 \pm 10.7$ sec, CNT群で  $11.3 \pm 13.9$  sec で、およそ5倍の増加を示し有意な機能回復が認められた。

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。

翻訳後修飾の中で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, RAC-alpha serine/threonine-protein kinase 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。これらのリン酸化酵素の中から Protein kinase C (PKC)に着目し、PKC の活性化剤である Bryostatin-1 の投与と運動訓練を併用し、ロータロッド試験により運動機能の解析を行ったところ、薬剤投与のみでの機能回復効果は期待できず、運動訓練と薬剤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ることが示唆された。さらに、脳梗塞周囲大脳皮質におけるリン酸化タンパクの発現比較では、運動訓練と薬剤併用療法により PKC・ERK などのリン酸化酵素が活性化され、その下流に位置する GSK3 Ser9 のリン酸化による阻害、さらに CRMP2 のリン酸化が抑制されることにより、微小管重合による軸索伸張が誘導されることが推測された。これらリン酸化の変化がシナプス可塑性を誘導し、訓練及び薬剤投与による機能回復に関連した分子基盤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2件（うち査読付論文 2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 Takahashi Y, Wakita H, Mizutani K, Watanabe A, Sonoda S, Tomimoto H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Selective accumulation of adiponectin in the cerebral cortex under chronic cerebral hypoperfusion in the rat.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroreport.	6. 最初と最後の頁 148-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001391.	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 -

1. 著者名 Mizutani K, Sonoda S, Wakita H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Ritanserin, a serotonin-2 receptor antagonist, inhibits functional recovery after cerebral infarction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroreport.	6. 最初と最後の頁 54-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000000930.	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 0件 / うち国際学会 0件）

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回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021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・薬剤併用療法の効果と脳内分子機構について
3. 学会等名 Brain and Rehabilitation 2019 ・第26回脳機能とリハビリテーション研究会学術集会
4. 発表年 2019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・薬剤併用療法と脳内リン酸化タンパクの変動
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水谷 謙明、園田 茂、脇田英明
2. 発表標題 脳梗塞ラットにおける訓練効果と脳内セロトニンの役割
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018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)	藤田医科大学・医学部・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
---------	---------