

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K10706

研究課題名（和文）脳梗塞後の痙縮出現と脳幹網様体での恒常的シナプス可塑性変化の関係についての研究

研究課題名（英文）The relationship between spasticity after stroke and homeostatic synaptic plasticity in the reticular formation.

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：脳梗塞後に一定期間が経過のち痙縮が発症する。そのメカニズム解明のため一つは、痙縮発症に関連する脳領域をマンガン造影MRIを用いて明らかにすること、2つ目はそのメカニズムとして恒常的可塑的变化が関連するかを確認した。研究1としてshamマウスと比較して脳梗塞マウスの延髄網様体腹側核(MdV)で脳梗塞後1週間に有意な神経活動量の高まりを確認した。MdVはshamマウスでは末梢神経の電気刺激で一時的に活動が抑制されるが、脳梗塞後2、4週ではその活動抑制が観察されなかった。次に脳梗塞後1週のMdVで恒常的可塑的变化で確認されるGluR1の発現増加、および脳梗塞後2週でGluR2へのシフトを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痙縮発症メカニズム研究は脊髄レベルでの解析であり、脊髄より上位の脳領域における研究は行われていない。本研究で初めて痙縮発症脳梗塞マウスにおける脳幹網様体MdV領域における一過性の脳活動の高まりと、末梢神経からの電気刺激によるMdVの活動抑制が痙縮発症後2~4週間時点で消失していることが明らかになった。また脳梗塞後1週間のMdV神経活動の高まりには、恒常的可塑的变化が関連していることが明らかになった。痙縮治療は脊髄運動神経細胞の活動抑制を中心とする対処療法しかない。さらにその治療は慢性化した時点で実施される。発症メカニズムの一端の解明から、次の治療戦略への開発につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：The spasticity develops after a certain period following stroke. We examined to confirm brain regions associated with spasticity using activation induced manganese-enhanced MRI. We found that neuronal activity at contralesional medullary reticular formation ventral part (MdV) in 1 week stroke mice was significantly upregulated compared with sham. Although the neuronal activity in MdV was showed significantly lower by electric stimulation of ipsi-afferent nerve, however, the inhibition of neuronal activity in 2 or 4 weeks after stroke did not confirm. Next, we confirmed whether the mechanisms of homeostatic plasticity after stroke show at contralesional MdV. We checked to change of subunits expression of AMPA receptors. We found GluA1 subunit density increased in stroke from 3 to 7 days, and with a shift toward increased GluA2 density at 14 days. This switch has previously been observed and the expression of GluA2-lacking AMPAR is needed for the induction of homeostatic plasticity.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：痙縮 脳梗塞 可塑的变化

### 1. 研究開始当初の背景

痙縮は、脊髄反射の亢進として出現し、対象となる骨格筋の速度依存的な伸張により、不随意的に筋が収縮する症状をさす。脳梗塞患者の痙縮発症は、脳梗塞後6ヶ月の時点で約4割とされる。痙縮を有する患者は、痙縮が見られない患者と比べ上肢、特に手指の効果的なりハビリテーション治療法はなく、さらに運動機能回復も悪く、関節拘縮のリスクも高く、さらにQOL(人生の質)も低いことが知られている。脊髄反射が亢進する原因については、脊髄反射を抑制する機構の低下や、脊髄運動神経細胞の興奮性亢進や反射弓を形成する神経細胞ネットワークの強化など脊髄レベルでの報告はあるが、痙縮が発症する詳細なメカニズムは不明な点が多く、さらに脊髄より上位脳領域における痙縮との関連は現時点においてほとんど報告がない。

痙縮は、脳梗塞直後には出現しない。脳梗塞から一定期間(約1ヶ月〜)が経過したころから徐々に出現する。このことから、脳梗塞による神経細胞機能の喪失が原因ではなく、損傷の回復過程で生じる神経可塑的变化の結果、痙縮が出現すると考えられているが、どのような神経可塑的变化が関与しているかの報告はない。神経可塑的变化にはヘップの神経可塑的变化と恒常的可塑性がよく知られている。我々は恒常的可塑的变化について着目した。恒常的可塑的变化は投射を受ける神経細胞が投射先のシグナル量や強度をモニターし、それに变化が生じると一定に維持しようとするシステムである。先行研究ではAMPA(alpha-amino-3 hydroxy-5 methyl -4 isoxazolepropionic acid)受容体のサブタイプであるGluA1およびGluA2の発現量が変化することが報告されている<sup>1)</sup>。

そこで我々は上記より、以下の研究を実施した。はじめに痙縮発症マウスにおける全脳の神経活動をリアルタイムで確認するために、神経活動依存的マンガン造影MRI(activation-induced manganese-enhanced MRI: AIM-MRI)<sup>2)</sup>を用いて神経活動量の履歴を確認し、さらに痙縮と恒常的可塑的变化の関連について確認することとした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、研究1として痙縮の発症に関連する脳領域を明らかにすることと、研究2としてその領域に存在する痙縮発症メカニズムとして恒常的可塑的变化が関連するかを明らかにすることとした。

### 3. 研究の方法

本研究には我々の研究室で発表した脳梗塞後痙縮発症モデルマウスを用いて実施した<sup>3, 4)</sup>。マウス左側の補足運動野および一次運動野を含む前肢運動野に photothrombosis 法を用いて虚血損傷を作成した(図1 a, b)。痙縮の発症には Hoffman's 反射(H反射)の刺激頻度依存的の反射振幅の減弱(Rate dependent depression; RDD)を用いた。右小指外転筋に記録電極を、尺骨神経を含む神経束に電気刺激針を設置した。電気刺激は0.1, 0.5, 1, 2, 5 Hzの頻度で23回の刺激を実施し、電気刺激は2分間のインターバルを設けた。0.1 Hzに対するH反射の振幅の減弱率を計算し、shamマウスと比較することで確認した。

(1) 脳梗塞後1, 2, 4週でAIM-MRIを実施した。MRI(AV400WB 9.4 T, Bruker, USA)撮像の48時間前にMnCl<sub>2</sub>溶液を投与し、痙縮の誘発としてH反射測定に用いる電気刺激を実施する群を設けた。電気刺激群はMnCl<sub>2</sub>溶液投与の2時間後に電気刺激を実施した。取得した画像からT1マップ及びR1マップを作成し、各群における神経活動量を定量的に解析した。統計解析はR(R Ver 4.0.0), MATLAB, SPM12ソフトウェアを使用した。2群間の比較にはMann-WhitneyのU検定を、多群の比較には一元配置分散分析(H反射のRDD)やKruskal-Wallis検定を行い、多重比較検定としてTukey-Kramer検定やSteel-Dwass検定を行った。有意水準を0.05未満に設定し検定を実施した。

(2) 脳梗塞後、皮質網様体路を標識するためにBiotinylated Dextran Amine (BDA)を補足運動野および一次運動野を含む前肢運動野に投与した。その後、Photothrombosis法を用いて同領域に虚血を発生させた。損傷後3日にH反射のRDDで痙縮発症の評価指標とした。シナプスの恒常的可塑性を確認するために脳卒中後3-14日の脳幹組織の冠状断切片を作成した。前シナプスマーカーとして小胞グルタミン酸輸送体1(Vesicular Glutamate Transporter 1; VGluT1)、BDA、およびGluA1もしくはGluA2との三重染色像を共焦点レーザー顕微鏡観察により解析した。統計解析はR(R Ver 4.0.0)を用い、多群の比較では一元配置分散分析を行い、多重比較検定としてTukey-Kramer検定を、シナプスの解析にはMann-WhitneyのU検定を用いた。すべての検定の統計的有意水準は0.05未満とした。

#### 4. 研究成果

(1) 研究1: AIM-MRI を用いた脳梗塞痙縮発症マウスにおける全脳の神経活動量の定量的解析

マウス脳梗塞作成部位は、左側の補足運動野および一次運動野を含む前肢運動野に再現性よく作成されていた(図1 c)。損傷後のH反射測定では脳梗塞群に有意なRDDの弱화를観察し、痙縮の発症を確認した(図2)。

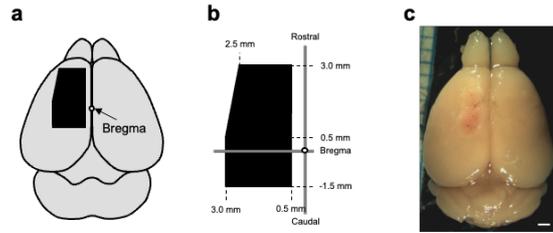


図1 損傷領域および損傷部染色像

a, b マウス補足運動野および一次運動野を含む前肢運動野, c マウス損傷脳実体顕微鏡像 スケール 2mm

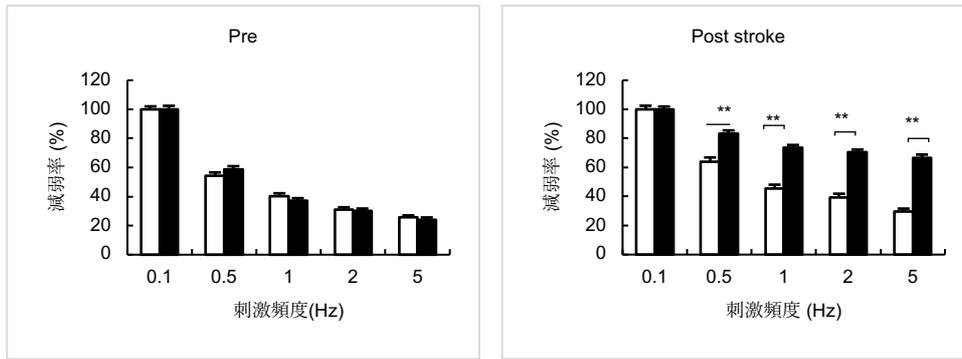


図2 H反射RDD

Pre: 脳梗塞作成前のH反射RDD

Post stroke: 脳梗塞後1週間のH反射RDD

白 sham 群, 黒 stroke 群, 0.1 Hz の平均振幅の%表示、平均±標準偏差、\*\*  $P < 0.01$

AIM-MRI による脳神経活動累積量の解析では、損傷後 1w の脳梗塞群で非損傷側に延髄網様体腹側核 (medullary reticular nucleus ventral part: MdV) において sham 群と比較し、有意な R1 値の高まりが確認された。電気刺激群では損傷後 2w でも MdV の R1 値増加がみられた(図3)。損傷後 1w の電気刺激の有無で比較した場合、電気刺激あり群で有意な低下が観察された。この現象は sham 群でも観察された(data not shown)が、損傷後 2, 4w では観察されなかった。

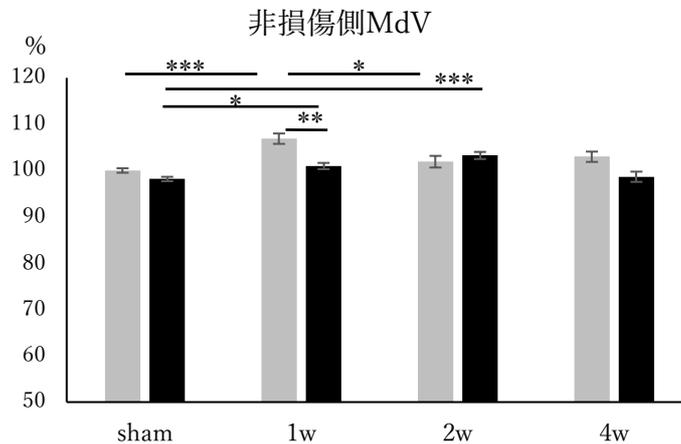


図3 MdV 領域における R1 値の比較

sham R1 値を基準に%表示した。グレー: 刺激なし、黒: 刺激あり、エラーバー: 標準誤差

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  Kruskal-Wallis 検定, post-hoc Steel-Dwass 検定

これらのことから、脳梗塞後の非損傷側 MdV において一過性の神経活動量の増加を観察し、電気刺激によってその活動量は抑制される一方で、脳梗塞後 2w, 4w では電気刺激による活動量の抑制は消失もしくは、低下することが明らかになった。大脳皮質運動野領域における虚血損傷は、その投射先である神経領域における神経活動量に影響を及ぼしていることが明らかになった。さらに、末梢神経への電気刺激により延髄網様体における MdV 神経活動の変化を初めて確認した。

(2) 研究2 脳梗塞後痙縮発症マウスを用いた延髄網様体 MdV 領域における恒常的可塑性の関与  
 研究1 で明らかになった延髄網様体 MdV 領域の神経活動の変化が、恒常的可塑性により生じているかを確認するために、AMPA 受容体のサブタイプである GluA1 および GluA2 の発現量を定量的に解析した。損傷領域の神経細胞からの投射を受けていることを確認するために、順行性トレーサーである BDA を、シナプス前終末のマーカースとして vGluT1 で標識し、GluA1 および GluA2 の発現数および面積などを解析した。

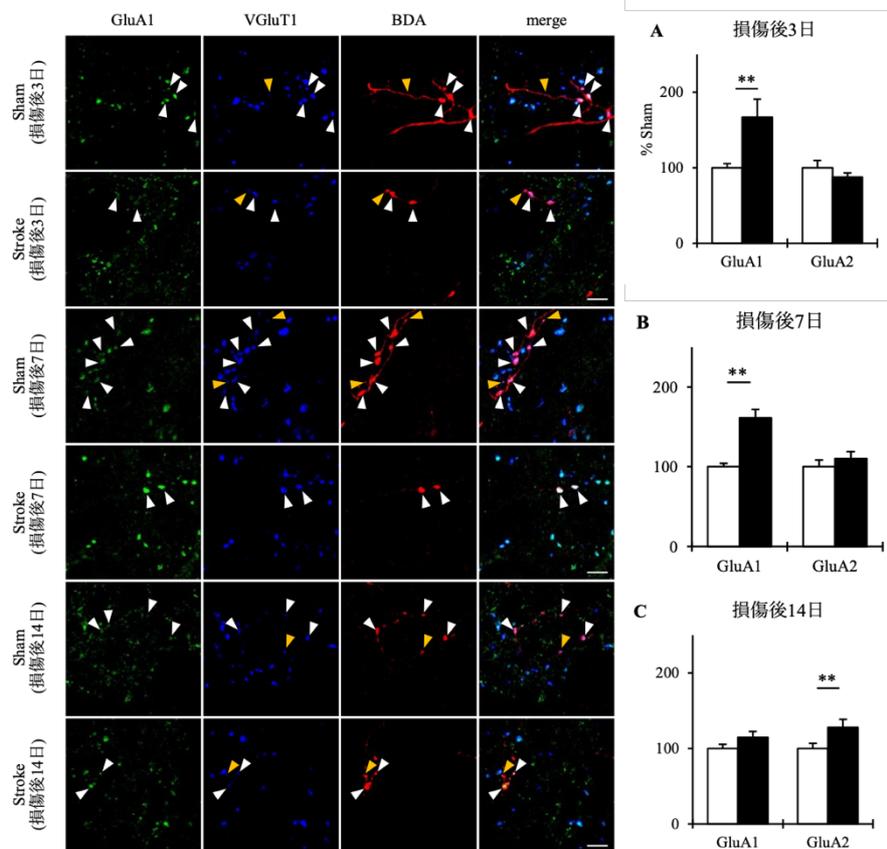


図4 MdV 領域における染色像および GluA1 および GluA2 面積比率の変化  
 A-C 各シナプス形成部位における vGluT1 の陽性面積に対する GluA1 および GluA2 の重複する陽性部位の面積比率。データは sham 群に対する%表示。平均±標準誤差 白: sham 群、黒: stroke 群, \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney の U 検定。

その結果、脳梗塞によって大脳皮質からの軸索投射数は減少するが (data not shown)、投射が残るシナプス形成部位における GluA1 および GluA2 の発現面積において、損傷後 3 日、7 日で GluA1 の発現比率が有意に高くなり、損傷後 14 日でその発現比率は GluA2 が有意に高くなった (図 4 A-C)。GluA1 から GluA2 への切り替えは、恒常的可塑的变化を確認した先行研究でも複数確認される現象であり、この GluA1 の高まりが恒常的可塑的变化を誘導するシグナルになっていると考えられている<sup>1</sup>。

本研究において、脳梗塞後痙縮発症マウスを用いて延髄網様体の神経活動量の高まりと、神経活動の変化が恒常的可塑性の誘導によって生じている可能性を見出した。

1. Liu, S.Q., et al. *Nature* **405**, 454-458 (2000).
2. Tanihira, H., et al. *Front Neural Circuits* **15**, 787692 (2021).
3. Lee, S., et al. *Cell Death Dis* **5**, e1007 (2014).
4. Toda, T., et al. *Plos One* **9** (2014).

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 Lee-Hotta Sachiko, Uchiyama Yasushi, Kametaka Satoshi	4. 巻 128
2. 論文標題 Role of the BDNF-TrkB pathway in KCC2 regulation and rehabilitation following neuronal injury: A mini review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 32 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.04.003	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 Isobe Mari, Lee Sachiko, Waguri Satoshi, Kametaka Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Correction: Clathrin adaptor GGA1 modulates myogenesis of C2C12 myoblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0209441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0209441	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 二村太基、花崎拓人、李佐知子
2. 発表標題 脳梗塞後痙縮発症マウスの皮質網様体路シナプス終末における恒常的可塑的变化
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二村太基、李佐知子
2. 発表標題 脳梗塞後痙縮発症マウスの皮質網様体路終末に梗塞後早期から恒常的シナプス可塑性が生じる
3. 学会等名 第4回日本リハビリテーション医学会秋季学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉浦健司、能城裕哉、山下雄大、李佐知子
2. 発表標題 脳梗塞後痙縮を発生した骨格筋の神経筋接合部における変化
3. 学会等名 第23回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李佐知子、伊住祥吾、菅博人、小山内実
2. 発表標題 活動依存性マンガン造影MRIを用いた脳梗塞後痙縮発症マウスにおける脳幹神経活動累積の定量解析
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------