

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11366

研究課題名(和文)脳出血後のリハビリテーション効果を促進するタンパク質の同定

研究課題名(英文)Proteins that help promote neural repair in rehabilitation-aided recovery from brain hemorrhage

研究代表者

西部 真理子(Mariko, Nishibe)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：50638757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳出血後の運動リハビリテーション特異的な効果として、転写因子や血管修復作用物質の上昇をマウス大脳皮質組織の遺伝子網羅的解析で検出した。転写因子Atf3の発現上昇については、リハビリ依存的に、出血部位である線条体に投射する皮質V層ニューロンと、線条体出血部位周辺神経細胞で確認された。一方で血管内皮細胞数と周皮細胞数を定量した結果、これらの細胞数について出血による上昇は認められたが、リハビリ介入による変動は確認されなかった。従い、脳出血後の運動リハビリテーションにより、大脳皮質の神経機能回復は、血管機能レベル(分子制御)と神経での転写因子またその特定タンパク質発現制御により促進される事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レンズ核線条体動脈の出血による被殻出血は、全脳出血の40%を占め、上位運動ニューロンと感覚ニューロンに障害をきたし、片麻痺・麻痺側の感覚障害を引き起こす。線条体出血のマウスモデルを使い、脳神経の分子学・生理学データ、また回復期の巧緻運動機能へのリハビリ効果を示した。さらなるメカニズム解明により、脳神経機能回復を完結に近づけるために行うリハビリについて多面的にアプローチする事が可能である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed molecular regulation of the cortical cells following a hemorrhage induced to the ipsilateral striatum. Rehabilitation-specific effects on cortical molecular profile were found to be the upregulation of various promoters, molecules related to blood-vessel repair. We determined that Atf3 protein to be highly expressed in rehabilitation-manner in the cortical layer 5 projection neurons (of which send reciprocal connection with the injured striatum), as well as peri-injury area. The number of pericytes and endothelial cells, that contribute to blood-vessel repair did not significantly change rehabilitation-dependently, though the numbers were significantly higher after hemorrhage. The study suggests that cortical neuro-functional recovery is associated with the upregulation of repair-activity of neurons and molecular levels of blood-vessel repair. We provide evidence of how rehabilitation facilitates the gene/protein expression of injured neurons in a mouse hemorrhagic model.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：Stroke Hemorrhage Gene expression Cortex

### 1. 研究開始当初の背景

2018年の本国脳血管疾患の総患者数は117万人を超える。脳血管障害は神経の細胞死や機能低下を引き起こし、多くは中枢神経回路網の途絶に至る。損傷の場所や広がりによっては重度の後遺症が残る事になり、随意性の高い細かな動作の機能障害などにより生活の質は低下する。その結果、高次運動機能障害は患者の復職を困難にする。しかし、損傷を免れた神経領域の可塑的变化により損傷領域の機能を代償する事が知られており、失われた機能回復を神経可塑性により制御できれば、患者の生活再建が可能と期待されている。

申請者はラットの一次運動野上肢領域限定的に障害を起こす脳挫傷モデルと脳卒中モデルを確立した。損傷後に、intracortical microstimulation を用いて大脳皮質に電気刺激を送り、同側の二次運動野の体部領域マップを作成した。その結果、1. 二次運動野での上肢領域マップの再構築(運動野可塑性)と、2. その可塑性に比例する上肢運動機能回復が起きる事を明らかにした。さらに、パレットを把握する反復運動訓練により、その二次運動野上肢領域の再構築と運動機能回復が共に増強された(Nishibe et al., 2015)。この様に、運動リハビリテーション(リハビリ)は脳損傷亜急性時、慢性時の運動機能回復において脳の可塑性の促進効果をもたらす。しかし、完全な損傷以前の体(特に手先)の動きを取り戻すのは困難である。その要因として、代償的に働く神経領域の再構築のメカニズムや促進方法は解明されておらず、中枢神経の再形成(Neuro-repair)または、新回路形成(Neural sprouting)が不十分であり、神経可塑性の代償性が不完全である事があげられる。このような背景のもと、本研究課題ではリハビリ依存的な、分泌性の神経可塑性タンパク質を明らかにする。脳血管障害回復期のリハビリ効果をつかさどる神経可塑性に直接働く因子が同定できれば、神経可塑性の制御・促進が可能となり運動機能回復に大いに寄与する事が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳損傷後の高次運動機能回復の促進に働く神経可塑性分子の同定・解明を目的とする。本課題で損傷を誘発する背外側線条体は線条体の中でも皮質運動野と相互に投射神経でつながっており高次運動機能をつかさどる領域である。また、線条体は中大脳動脈から前外側中心動脈により血液が供給されている。レンズ核線条体動脈の出血による被殻出血は、全脳出血の40%を占め、上位運動ニューロンと感覚ニューロンに障害をきたすため、片麻痺・麻痺側の感覚障害を引き起こす。高次運動機能をつかさどる皮質脊髄路が通っている内包後脚に血腫が認められる場合は、機能予後の不良が考えられる。本研究計画では、皮質-線条体回路(cortico-striatal pathway)に着目し、大脳皮質の生理学的変化と、上肢の行動結果によりこの回路の回復を評価する。脳卒中動物モデルでの出血効果を示したRNA解析は報告が存在するが、リハビリ効果と関連付けた網羅的なRNA解析は未だ無い。非出血群と出血+自発的回復群の遺伝子発現解析で病態を悪化させる機序、また非出血群と出血+リハビリ群の遺伝子発現量解析でリハビリ効果をそれぞれ並行して調べる。リハビリ効果がどの細胞で特に顕著かも検討する。

### 3. 研究の方法

背外側線条体にcollagenase 65 nLを投与し、血管基底膜を溶解することで局所的出血を誘発し、マウス出血モデルを作成した。非出血群、出血+自発的回復群、出血

+リハビリ群を、それぞれの群より脳出血側の大脳皮質組織より RNA を抽出し、次世代 RNA sequence 解析を行った。Clustvis・gene ontology・統計学を用いて、特に神経に作用する分泌タンパク質または、神経分泌タンパク質に焦点をあて、同定因子を 10 個程度に絞り込んだ。Quantitative PCR を用いて、非出血群と出血+自発的回復群の遺伝子発現解析で病態を悪化させる機序、非出血群と出血+リハビリ群の遺伝子発現解析でリハビリ効果をそれぞれ並行して調べた。脳切片の免疫染色により、どの細胞で特に、病態機序、またリハビリ効果が現れるかを調べた。

また、大脳皮質機能の生理学的評価を行うため、運動野領域再構築は麻酔下のマウスで intracortical microstimulation を用いて電気刺激を行い、体部局在位置と面積、電流刺激閾値を記録した。また、皮質 5 層ニューロンの excitatory post-synaptic potential (EPSP) を patch-clamp recordings により測定した。

#### 4. 研究成果

背外側線条体にコラゲナーゼを投薬し、血管基底膜を溶解することで局所的出血を誘発した。その結果、同側の大脳皮質運動野では出血の影響で体部局在面積が減少した。これは、皮質-線条体回路の神経軸索が損傷したためと考えられる。また、把握運動機能の顕著な低下も観察された。損傷後 1 週間後にペレット把握反復運動を 10 日間施した結果、そのリハビリにより巧緻運動機能回復とそれに伴う運動野体部局在面積の回復が得られた。前肢からの感覚入力依存的に、皮質上層ニューロン間での神経入力・機能に変化が引き起こされる事が予想された。そこで、patch-clamp recordings により、皮質上層ニューロンのシナプス興奮性伝達を検討したところ、リハビリ介入依存的な神経伝達効率の上昇を示す結果を得た。

この生理学的リハビリ効果をさらに調べるために行った遺伝子網羅的解析では、脳出血後の運動リハビリ特異的な効果として、血管修復作用物質や転写因子の上昇を含む血管発達制御、細胞移動、血管新生制御、血管新生、内皮細胞移動などの pathway upregulation をマウス皮質組織で検出した。この結果を受けて、血管内皮細胞数と周皮細胞数が出血、またはリハビリ介入により変化するかを Flow cytometry により調べた。血管内皮細胞数と周皮細胞数は、出血により増加する事が示され、二次的機能・代謝の低下を補う結果であると考察される。ただし、出血後のこれらの細胞数についてはリハビリ介入による有意差を伴う変動は認められなかった。そこで、免疫染色法を用いて血管内皮細胞と周皮細胞の密度・分布を、出血自発的回復群とリハビリ群で検討したが、顕著な差は観察されなかった

遺伝子解析で示された転写因子 Atf3 の発現上昇については、出血部位である線条体に投射する皮質 V 層ニューロンと、線条体の出血部位周辺神経細胞でリハビリ依存的な上昇を確認した。従い、脳出血後の運動リハビリテーションにより、大脳皮質の神経機能回復は、血管機能レベル(分子制御)と神経での特定タンパク質発現制御により促進される事を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishibe Mariko, Toyoda Hiroki, Hiraga Shin-ichiro, Yamashita Toshihide, Katsuyama Yu	4. 巻 32
2. 論文標題 Synaptic and Genetic Bases of Impaired Motor Learning Associated with Modified Experience-Dependent Cortical Plasticity in Heterozygous <i>Reeler</i> Mutants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 504 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhab227	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 Hiraga Shin-ichiro, Itokazu Takahide, Hoshiko Maki, Takaya Hironobu, Nishibe Mariko, Yamashita Toshihide	4. 巻 5
2. 論文標題 Microglial depletion under thalamic hemorrhage ameliorates mechanical allodynia and suppresses aberrant axonal sprouting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e131801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.131801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Erkhembaatar Munkhsoyol, Yamamoto Iroha, Inoguchi Fuduki, Taki Kosuke, Yamagishi Satoru, Delaney Leanne, Mariko Nishibe, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Hanashima Carina, Naka kaneda Hayato, Ihara Dai, Katsuyama Yu	4. 巻 64
2. 論文標題 Involvement of strawberry notch homologue 1 in neurite outgrowth of cortical neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 379 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hiraga Shin-ichiro, Itokazu Takahide, Nishibe Mariko, Yamashita Toshihide	4. 巻 42
2. 論文標題 Neuroplasticity related to chronic pain and its modulation by microglia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 5~15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00199-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西部真理子、豊田博紀、平賀慎一郎、山下俊英、勝山裕
2. 発表標題 Reelinは運動学習における大脳皮質地図の可塑性に関わる
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 (Editor: Morten F. Thorsen) Mariko Nishibe and Yu Katsuyama	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Nova Science Publishers, Inc.	5. 総ページ数 130
3. 書名 The Forebrain: Development, Physiology and Functions	

〔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
---------	---------