

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23700598

研究課題名（和文）

大脳皮質損傷後に生じる筋緊張の亢進機構の解明

研究課題名（英文）

Investigation of mechanism for spasticity after cortical injury

研究代表者

李 佐知子 (SACHIKO LEE)

名古屋大学・医学系研究科（保健）・助教

研究者番号：80599316

研究成果の概要（和文）：

マウス大脳皮質の上肢運動野および前運動野である吻側および尾側上肢運動領域を損傷させることで痙縮発症モデルを作成し、H 反射の刺激頻度依存性反射強度弱化(RDD)の有意な弱화를脳卒中後 3 日から 8 週間で観察し、脊髄運動神経細胞の活動性亢進を細胞活動亢進マーカーを用いて測定したところ、脳卒中後活動亢進している運動神経細胞は増加していた。このことから、吻側および尾側上肢運動領域の損傷により脳卒中後痙縮発症マウスが確立した。

研究成果の概要（英文）：

We made photothrombotic injury in rostral and caudal forelimb motor areas in mice. We employed the rate dependent depression (RDD) of the Hoffman reflex as a reliable measurement of spasticity and we examined expression of the mRNA for c-fos and c-Fos immunoreactivity for motoneuron excitability. The RDD in the affected muscles of infarcted animals were significantly weakened 3 days after stroke until 8 weeks after the stroke, except at 3 weeks after the stroke, compared to sham-operated mice. The c-fos expression was significantly increased in stroke animals. These results revealed that lesions of the rostral-caudal forelimb areas induced spasticity as evidenced, which was due to the weakened RDDs of the Hoffman reflexes and increased motoneuron excitability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：理学療法学

1. 研究開始当初の背景

これまでの脳卒中痙縮研究は、ヒト脳卒中患者を用いた電気生理学的研究が行われており、alpha 運動神経細胞の抑制低下および活動亢進などが報告されているが、痙縮発症メカニズムについては詳細は不明である。分子生物学的手法を用いた研究はほとんどなく、動物モデルがないことから病態機序の解明が遅れていると考えられる。

2. 研究の目的

そこで我々は、①新たに脳卒中後痙縮発症マウスを作成することを第一の目的とし、②そのモデルを用いて痙縮発症メカニズムの解明を試みた。脊髄損傷モデルを用いた痙縮研究から K-Cl 共輸送体 2 発現減少により神経細胞の脱抑制が生じて痙縮が発症しているとの報告があり、本モデルにおいても関与

しているかを検討した。

3. 研究の方法

①損傷モデル作成

1930年代に Fulton et al.はサルを用いて運動野および前運動野切除によって、痙縮様行動が観察されるとの報告をしている。我々は Fulton らの報告を参考に、マウス大脳皮質の上肢運動野および前運動野である吻側および尾側上肢運動領域を損傷させることで痙縮発症モデルを作成した。

②痙縮評価

(1)Hoffman 反射(H 反射)の刺激頻度依存性反射強度弱化学(Rate Dependent Depression: RDD)の抑制: Rate-Dependent Depression は一般的に spasticity 測定に使用され、刺激頻度依存的減弱する H 反射が痙縮によってその減弱が弱化学することで評価する。尺骨神経に電気刺激(刺激頻度 0.1, 0.5, 1, 2, 5 Hz、各 23 回刺激)を行い、H 反射の記録を小指外転筋で行った。

(2)脊髄運動神経細胞の活動性亢進: 脊髄α運動神経細胞の興奮性の増大を確認するために、逆行性トレーサーを用いて小指外転筋を支配する運動神経細胞を標識し、レーザーマイクロダイセクションによって標識運動神経細胞だけを採取し、活動依存的に発現が増加する c-fos の mRNA 発現変化を real time RT-PCR によって解析した。さらに免疫組織染色法を用いて、c-Fos 陽性運動神経細胞数の数の変化を確認した。

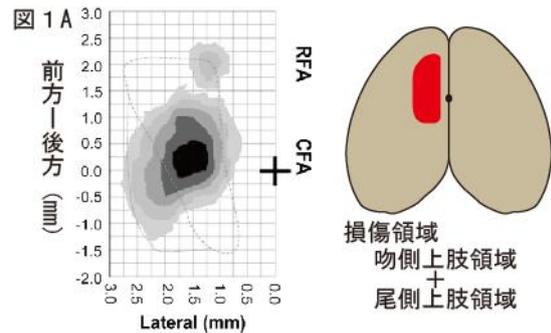
③KCC2 発現変化: 免疫組織染色法を用い、運動神経細胞マーカーである ChAT(Choline Acetyltransferase)と KCC2 を二重染色し、KCC2 陽性運動神経細胞の KCC2 陽性面積を測定した。

4. 研究成果

①マウスの運動野および前運動野領域である吻側および尾側運動野領域は先行研究を参考に決めた(図 1A)。損傷方法は、光感受性血栓法をもちいて行い、脳卒中 12 週間後の組織では吻側および尾側運動野組織が欠如しているのが観察された(図 1B)。

②脳卒中モデルを作成後、マウス小指外転筋の H 反射 RDD は有意に弱化学していることから、痙縮様反応が確認された(図 2)。また H 反射の RDD を経時的に観察したところ、脳卒中後 3 日~8 週間まで RDD がコントロール群と比較して有意に弱化学していることから長期間にわたって痙縮が観察された(図 3)。

③H 反射で痙縮を確認した骨格筋から逆行性トレーサーを注入し支配運動神経細胞を標識し、レーザーマイクロダイセクション

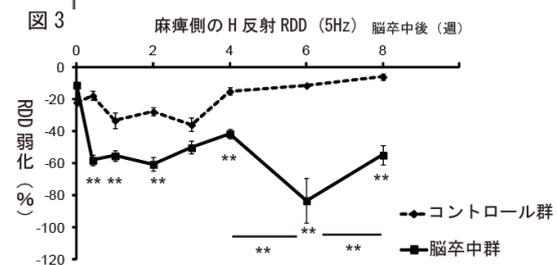
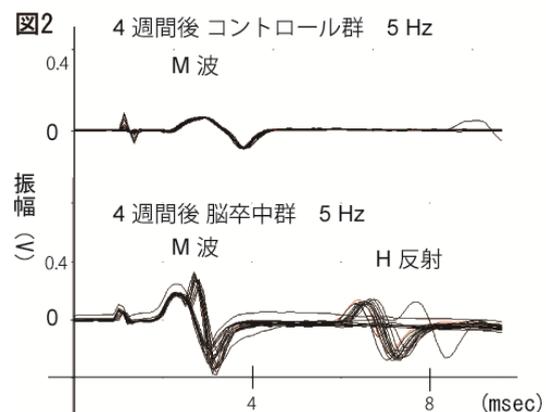
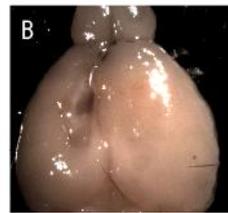


□5-20% □20-40% □40-60% □60-80% ■80-100%

Tennant et al. Cereb. Cortex. 2011.

RFA=吻側上肢領域 (上肢補足運動野)

CFA=尾側上肢領域 (上肢運動野)



法によって標識運動神経細胞を採取(図 4, 5a, b)、mRNA 抽出により、c-fos mRNA (活動依存的発現増加) 発現の定量的解析をおこなったところ、c-fos mRNA 発現が有意に増加していた(図 6)。

また c-Fos の免疫組織染色を行い、運動神経細胞マーカーである ChAT(Choline Acetyltransferase) の二重染色を行い(図 7A)、c-Fos 陽性運動神経細胞の数を数えてところ、同様に脳卒中 1 週間後に有意に増加していた(図 7B)。

④脊髄損傷研究から、痙縮メカニズムの1つに運動神経細胞の脱抑制に関与するK-Cl共輸送体2 (KCC2) 発現減少が報告されており、本モデルにおいて検討を行っている。麻痺側運動神経細胞の KCC2 免疫組織染色

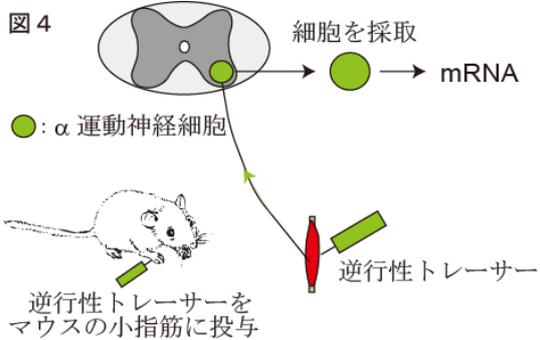
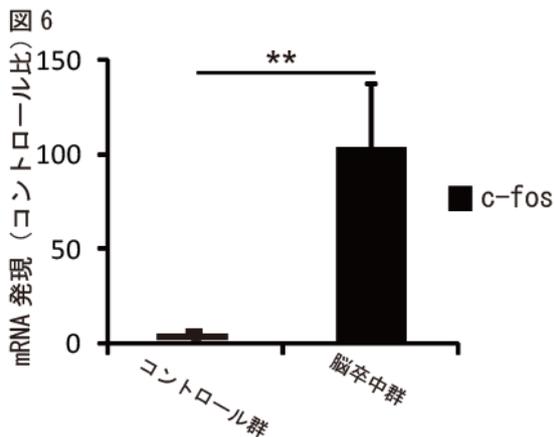
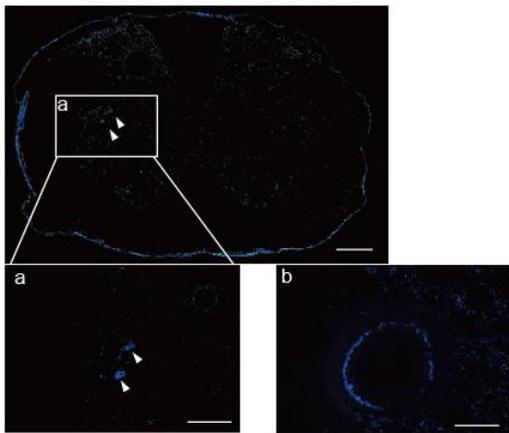
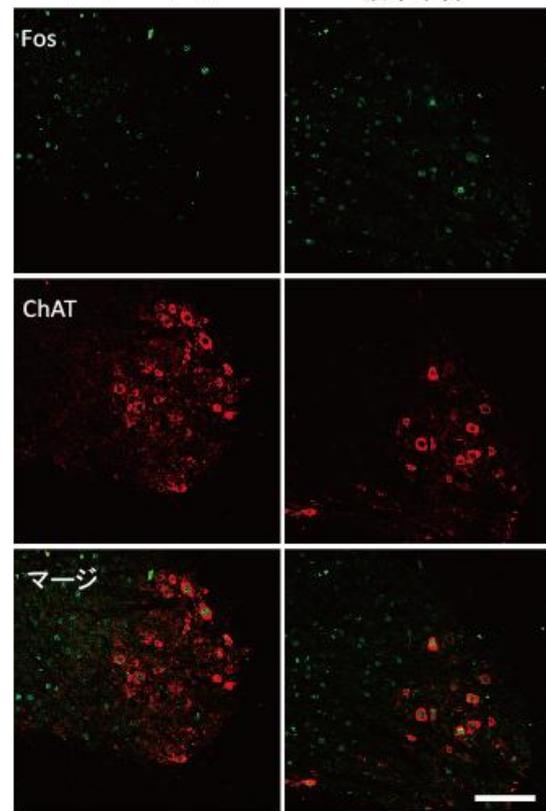


図5 レーザーマイクロダイセクションによる標識運動神経細胞を採取



の結果、運動神経細胞マーカーで染色された運動神経細胞膜に局在している KCC2 はコントロール群ではシグナルは強く、膜状に連続して陽性シグナルが観察される。一方、脳卒中 1 週間後の脳卒中群では細胞膜上の KCC2 シグナルは不連続となりシグナル面積を定量的に測定する約 5 割(図 8A, B)、3 週間後では約 4 割の陽性染色面積がコントロール群と比較して有意に減少していた(図 8C)。

図7A 脳卒中後 1 週間 (C6 レベル前角) コントロール群 脳卒中群



スケールバー = 100 μm

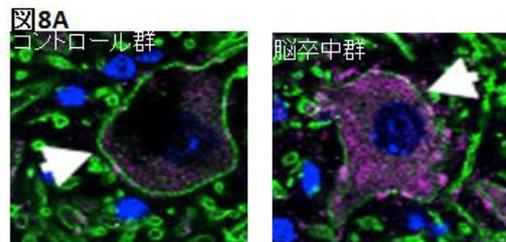
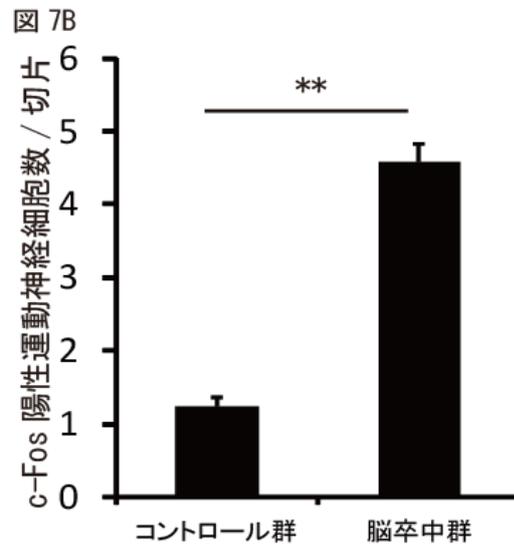
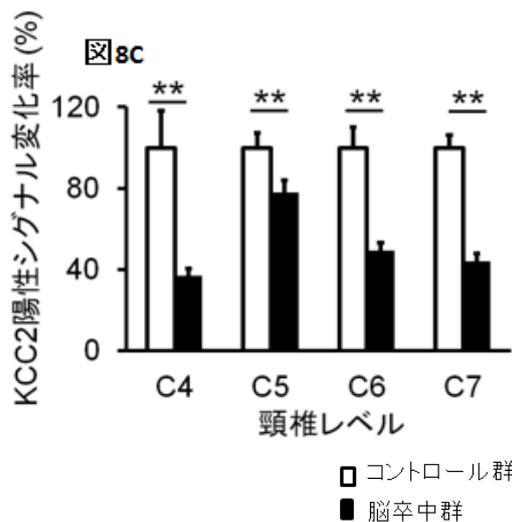
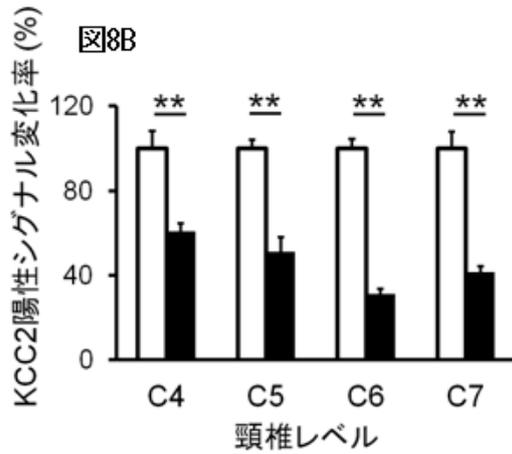


図8A ChAT (運動神経細胞) / KCC2 / DAPI



本研究の結果、脳卒中後の痙縮発症においても KCC2 発現減少による運動神経細胞の脱抑制が関与している可能性がみられた。今後は、KCC2 発現変化を定量的に解析する予定である。さらに KCC2 発現増加を促す方法を検討し、新規痙縮治療開発に着手する予定である。

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 1 件)

- ① Mishra M, Lee S, Lin MK, Yamashita T, Heese K. (2012) Characterizing the neurite outgrowth inhibitory effect of Mani. FEBS Lett. 21;586(19):3018-23. doi: 10.1016/j.febslet.2012.06.043. 査読有

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 李佐知子 新規脳卒中 spasticity 発症マ

ウスの確立 第 48 回日本理学療法学会大会、愛知、2013.5.24-26、口頭発表

- ② 戸田拓弥、李佐知子 脳卒中後痙縮出現筋の脊髄運動神経細胞膜上 KCC2 発現は減少する 第 48 回日本理学療法学会大会、愛知、2013. 5. 24-26、口頭発表
- ③ Takuya Toda, Sachiko Lee, Interaction between down-regulation of KCC2 expression in plasma membranes of spinal motoneuron and spasticity after stroke in mice. Nagoya-Yonsei University Research Exchange Meeting on Health Sciences 2012, Nagoya, 2012.11.22-24, 口頭発表 (English)
- ④ Lee S. A novel spasticity model for stroke in mice. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 2012.9.18-21, ポスター発表(English)
- ⑤ Toda T, Lee S. Interaction between down-regulation of KCC2 expression in plasma membranes of spinal motoneuron and spasticity after stroke in mice. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 2012.9.18-21, ポスター発表(English)
- ⑥ Lee S. A novel spasticity model for cerebral cortex injury in mice. 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, Spain, 2012.7.14-18, ポスター発表(English)

〔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

<http://www.lee-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李佐知子 (Sachiko Lee)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80599316

(2) 研究分担者なし

()

(3) 連携研究者なし

()