

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750201

研究課題名(和文) spasticity発症マウスの運動神経細胞過興奮の機序とリハビリテーション効果

研究課題名(英文) Mechanism of hyper activity of motoneuron and effect of rehabilitation in spasticity post-stroke mouse.

研究代表者

李 佐知子 (Lee, Sachiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80599316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞後の患者の約4割に見られる痙縮は、日常生活動作能力を大きく低下させる。我々が作成した痙縮マウスを用いて、痙縮発症時に生じる運動神経細胞の過度な活動の機序について調べたところ、痙縮発症マウスの脊髄運動神経細胞のカリウムクロライド共輸送体2(K-Cl cotransporter 2: KCC2)発現減少を確認した。KCC2発現減少は脊髄損傷後の痙縮発症メカニズムの1つとして報告されており、脳梗塞後の痙縮発症についても同様のメカニズムが生じていることが分かった(T Toda, S Lee, et al. PLOS One, 2014)。

研究成果の概要(英文)：An estimated 42.6% of post-stroke patients exhibit spasticity 6 months post-stroke, and this disrupts their ability to perform activities of daily living and decrease their quality of life. In this study, we uncovered that significant reduction of KCC2 (potassium-chloride cotransporter 2) at 7 d post-stroke and phosphorylation of KCC2 serine residue 940 (S940) at 3 and 7 d post-stroke in motoneuron plasma membranes, since this is the main chloride extruder that affects neuronal excitability. In addition, at 7 and 42 d post-stroke, experimental mice exhibited a significant increase in vGluT1 (vesicular glutamate transporter 1)-positive boutons (almost Ia afferent fibers) compared with sham mice. Our findings suggest that both the down-regulation of KCC2 and increases in Ia afferent fibers are involved in post-stroke spasticity.

研究分野：physical therapy

キーワード：spasticity stroke KCC2 Ia afferent fibers

1. 研究開始当初の背景

これまでのspasticity 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、その結果脊髄α運動神経細胞の興奮性増大 (Higashi et al. Arch Phys Med Rehabil. 2001)、相反性Ia 抑制の減弱(Kagamihara et al. J Clin Neurophysiol. 2005)などの報告があるのみで、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。そこで、申請者はこれまでspasticity モデル動物の作成に取り組み、新規脳卒中後のspasticity 発症マウスの作成に成功した(Sachiko Lee et al. 2014. Cell Death Dis.5, e1007)。

2. 研究の目的

本研究では、痙縮マウスを用いて痙縮発症メカニズムの解明として、以下3つのことを明らかにすることを目的とした。

spasticity による骨格筋の可塑的变化の分子生物学的機序

spasticity 発症の分子生物学的機序

脳卒中マウスの上肢 spasticity 症状の軽減を促す協調的運動の分子生物学的作用機序

3. 研究の方法

spasticity による骨格筋の可塑的变化の分子生物学的機序

アセチルコリン受容体の発現変化：ニコチン性アセチルコリン受容体に特異的に結合するα-bungarotoxin により定量的に調べる (Valdez G et.al. PLoS One. 2012)。

神経筋シナプス数の変化：運動神経軸索をYFP 蛍光タンパク質で標識されるトランスジェニックマウスを使用しシナプスである神経筋接合部を後シナプスマーカーとしてα-bungarotoxin を二重染色し共染したシナプスにより形態および数を数えることで解析する。

spasticity 発症の分子生物学的機序

脳卒中後spasticity が出現する筋と出現しない筋に着目し、spasticity 出現の有無をH 反射RDD で確認する。

spasticity の出現・非出現筋それぞれに逆行性トレーサー(True Blue)を注入し、運動神経細胞を標識し、その運動神経細胞の興奮性の有無をc-fosの免疫組織化学染色法により解析する。さらに逆行性トレーサー脊髄に注射し、中脳～延髄に投射している二次ニューロンの神経細胞の同定を行う。脊髄に投射している中脳～延髄の神経細胞の神経活動性などの解析をレーザーマイクロダイセクションにより採取し、その神経細胞のmRNA 発現変化をreal time RT-PCRにより定量的解析を試みる。

脳卒中マウスの上肢 spasticity 症状の軽減を促す協調的運動の分子生物学的作用機序

4 週間の協調的運動介入を実施し、小指外転筋のH 反射RDD を測定し、spasticityの軽減効果を確認する。

協調的運動介入によるspasticity の軽減効果が確認されたならば、その軽減効果が脊髄運動神経細胞の興奮性の抑制に作用しているかをc-fos やKCC2 など免疫組織化学染色法で確認する。

4. 研究成果

spasticity による骨格筋の可塑的变化の分子生物学的機序 (山下雄大、能城裕哉)

【アセチルコリン受容体の発現変化】 Alexa Fluor 594標識α-Bungarotoxinを用いてアセチルコリン受容体 (Acetylcholine Receptor, AChR) を標識し、ImageJを用いて処理して神経筋接合部の面積を測定した。損傷1, 3週間後ともに神経筋接合部の面積は損傷群とコントロール群の間に有意な変化や傾向は見られなかった。また損傷側、非損傷側を比較した場合にも有意な変化や傾向は見られなかった。神経筋接合部の形態的な印象としても、群間に差がある印象は感じられなかった。

【神経筋シナプス数の変化】

脳梗塞後の損傷側小指外転筋の神経筋接合部に投射する運動神経軸索の変化

運動神経軸索の投射を組織像観察によって定性的に評価した。損傷1週間後の骨格筋像及び、軸索全体を観察したところ、コントロール群は神経束から放射状に神経が走行し、神経軸索は直線的な印象で、神経束から終末部までの大きな分岐の数は、約3分岐と思われる(図1A)。

一方、脳梗塞マウスの麻痺側の骨格筋像は、大きな神経束からの神経走行は樹状様を呈し、軸索走行は分岐を繰り返す、直線性は保たれていなかった。神経束から終末部までの大きな分岐の数は、コントロールと比較すると多い印象を受けた(図1B)。神経筋接合部の軸

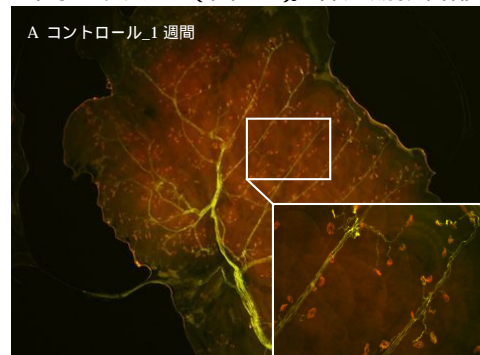


図 1A 損傷1週間後の神経筋接合部及び、運動神経軸索の投射
神経筋接合部のアセチルコリン受容体(Acetylcholine Receptor, AChR、赤)に投射する運動神経軸索(黄)。コントロール群(A)、損傷群(B)の全体像。

索投射に関しては損傷1週間後では、コントロ

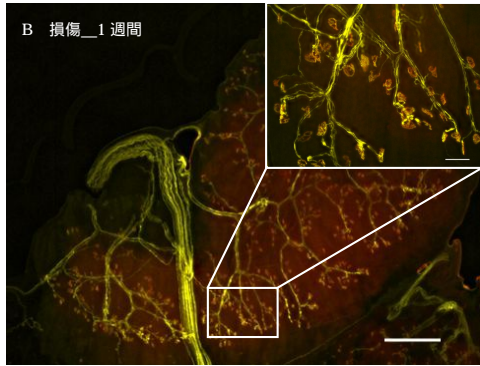


図 1B 損傷 1 週間後の神経筋接合部及び、運動神経軸索の投射

ール群と比較して、損傷麻痺側においても大きな変化はなく、神経筋接合部への複数軸索投射は観察されなかった。損傷3週間後のコントロール群では1週間後の像と比較して変化は見られなかった。一方損傷群の全体像では、損傷1週間後と同様に分岐の数が多い印象があった。

さらに詳しく解析するために、脳梗塞後 2, 4, 8, 12 週で脱神経や断片化、受容体の消失などを調べたところ形態には有意な変化が確認できなかった。コントロール群と脳梗塞群では明らか差はなく、評価した 25 個アセチルコリン受容体以外も、全体的に多くが正常なアセチルコリン受容体であり大きな形態変化はみられなかった。

spasticity 発症の分子生物学的機序

【脳卒中後 spasticity が出現する筋と出現しない筋】(岩城景子)

Spasticity を測定するには誘発電位により出現する Hoffman 反射を利用した rate dependent depression を観察する。Hoffman 反射はヒトでは幼児期に出やすく、成人では全ての骨格筋で出現することはなく四肢遠位の骨格筋で出現しやすいと言われている。今回 spasticity を確認するために、マウスの上腕および前腕の骨格筋において、Hoffman 反射の観察を行ったが上腕および前腕の骨格筋において出現を確認することができなかった。このことから、目的とする痙縮を出現の有無を確認することはできなかった。

【中脳～延髄での脊髄投射神経細胞の神経活動性の変化】(金子葵)

脊髄に投射する延髄網様体神経細胞の可塑的变化を観察するため、逆行性トレーサーであるコレラトキシン B (Cholera toxin B: CTB) を麻痺側脊髄に注入し、損傷 7 日後の延髄において CTB が存在する細胞の活動性変化を c-Fos を用いて観察した (図 2)。非損傷側延髄網様体腹側核 (Medullary reticular nucleus; MdV) でコントロール群と比較して損傷群の細胞数が有意に増加していた (図 2: $p < 0.05$)。しかし損傷側ではコントロール群

との間に有意差は見られなかった。

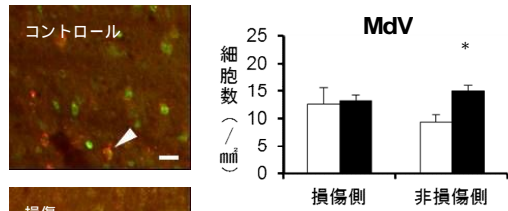


図 2 大脳皮質損傷後の延髄網様体神経核における脊髄に投射する細胞の活動性変化
免疫染色 緑: c-Fos、赤: CTB
MdV における c-Fos 陽性細胞数のグラフ

その他の神経核では、損傷側においても非損傷側においても損傷群とコントロール群の間に差は観察されなかった。

脳卒中マウスの上肢 spasticity 症状の軽減を促す協調的運動の分子生物学的作用機序 (戸田拓弥)

【4 週間の協調的運動介入を実施し、小指外転筋の H 反射 RDD を測定し、spasticity の軽減効果を確認する】

協調性運動として Wheel running exercise を導入し、脳卒中後の運動介入が脳卒中後の H 反射の RDD 弱화에及ぼす影響を検討するために手術前と手術後 7 日に H 反射を計測した。損傷前の H 反射計測では群間に有意な差はなく、H 反射の RDD が観察できた。手術後 7 日において stroke + ex 群と比較して stroke + no-ex 群で有意な H 反射の RDD 弱화가み

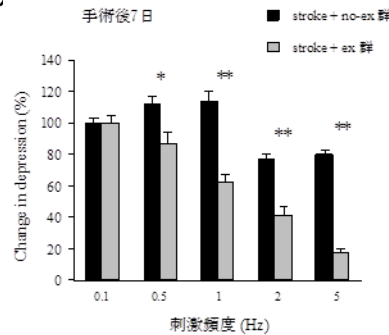


図 3 脳卒中後の H 反射の RDD 弱化に対するホイールランニング運動の影響

【軽減効果が脊髄運動神経細胞の興奮性の抑制に作用しているかを c-fos や KCC2 など免疫組織化学染色法で確認する】

運動介入による運動神経細胞膜上の KCC2 発現量の変化を検討するために手術後 8 日の脊髄を採取し、免疫組織化学染色により検討した。stroke + ex 群の染色像は stroke + no-ex 群で見られる膜上の KCC2 の不連続な様子を示す運動神経細胞が少なく、膜上に連続的に KCC2 が発現している様子が観察できた。さらに膜上の KCC2 を半定量的に検討した結果、stroke + no-ex 群は stroke + ex 群と比較して運動神経細胞膜上の KCC2 発

現が有意に減少していた (図 4)。

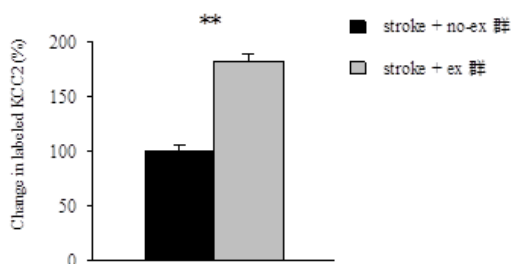


図 4 脳卒中後の運動神経細胞膜上の KCC2 発現減少に対するホイールランニング運動の影響

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 2 件)

Lee S*, Toda T, Kiyama H, and Yamashita T. (2014) Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice. *Cell Death & Disease*. Jan 16;5:e1007. doi: 10.1038/cddis.2013.544. (* corresponding author)

Toda T, Ishida K, Kiyama H, Yamashita T, and Lee S*. Down-Regulation of KCC2 Expression and Phosphorylation in Motoneurons, and Increases the Number of in Primary Afferent Projections to Motoneurons in Mice with Post-Stroke Spasticity. *PLoS ONE*. Published: December 29, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0114328 (* corresponding author)

〔学会発表〕(計 8 件)

Sachiko Lee, Hiroaki Kato. (2013) Descending fibers from cortical neurons in contralesional supplemental motor area are spouted and increased in the red nucleus, reticular nucleus, and cervical spinal cord in spastic mice after the stroke. *Neuro2013 Kyoto*

Takuya Toda, Kazuto Ishida, Sachiko Lee. (2013) Wheel running exercise may improve spasticity and recover the KCC2 expression levels in plasma membrane of motoneuron in spastic mice after the stroke. *Neuro2013 Kyoto*

李佐知子 (2013) 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) 口頭発表

戸田拓弥、李佐知子 (2013) 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) 口頭発表

李佐知子 脳梗塞後痙縮発症マウスの延髄網様体脊髄路切断による Hoffmann 反射 Rate dependent depression の再現. 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会合同学会 平成 26 年 11 月 15 日・16 日

金子葵、李佐知子 痙縮発症マウスの延髄網様体神経核は細胞活動性が亢進する 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会合同学会 平成 26 年 11 月 15 日・16 日

李佐知子 「理学療法士女性研究者の現状と今後の発展 - 多様なロールモデル - 」女性を取り巻く現状 - キャリア形成を目指して - (シンポジスト及びシンポジウム座長) 第 1 回日本基礎理学療法学会学術集会・日本基礎理学療法学会第 4 回学術大会合同学会 愛知県、名古屋平成 26 年 11 月 15 日・16 日

李佐知子 Development of animal model of post-stroke spasticity and study of its mechanisms. CREST 合同成果報告会(犬山、京都大学霊長類研究所) 平成 26 年 9 月 26 日・26 日

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.lee-lab.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李佐知子 (LEE Sachiko)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：80599316