

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350596

研究課題名(和文)脳梗塞リハビリにおける薬剤投与の有効性と神経可塑性を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文)Effectiveness of pharmacotherapy in stroke rehabilitation and identification of functional molecules implicated neuronal plasticity

研究代表者

水谷 謙明 (Mizutani, Kenmei)

藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・講師

研究者番号：30351068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：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。本研究は、脳卒中リハビリテーションの麻痺回復に関連した機能的分子を活性化させる薬剤投与により、脳内の神経可塑性を誘起し、さらなる機能回復を目指すとともに効果規定要因および分子機構の解明を目的とした。運動機能検査において、訓練・薬剤併用療法は訓練単独と比較して有意な機能回復が認められ、薬剤用量依存性にその効果が認められた。更に、脳内の機能的分子の解析においては、種々のタンパクリン酸化やモノアミンの変動が確認された。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has become widely known that neuronal reorganization in the perilesional cortex contributes to some improvement of hemiparesis after stroke. Therefore, various new treatments have been developed to aid in paralysis recovery. Here, we examined in vivo the effects of administration of an activator of protein kinase C (PKC), combined with exercise on functional recovery. The combination of exercise and PKC activator induced further functional recovery compared with exercise alone, and the behavioral effect seen in the administered animals was dose dependent. Moreover, combining exercise with administration led to increased phosphorylated proteins and serotonin in the perilesional cortex.

研究分野：生化学

キーワード：脳梗塞 リハビリテーション 神経可塑性 薬物併用療法 機能回復

1. 研究開始当初の背景

脳卒中に対する従来のリハビリテーション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を捉えていない。そこで我々は、脳梗塞後の運動訓練による機能回復に関与する脳内の分子学的なメカニズムの解明を行った。麻痺回復初期に神経栄養因子、PKC、Calmodulin 等のタンパク発現の変化が確認され、これらは神経可塑性発現及びその麻痺回復に関与しているものと推測された (Mizutani *et al. Brain Res* 1416: 61-68, 2011)。この結果を基に、PKCの活性化剤を用いた訓練・薬剤併用療法への着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、脳卒中リハビリテーションの麻痺回復に関連した機能的分子を活性化させ

る薬剤投与により、脳内の神経可塑性を誘起し、さらなる機能回復を目指すものであり、その効果規定要因・分子機構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運動訓練・薬剤投与を行い、運動機能の経時変化解析及び脳内神経伝達物質の変動、さらに脳梗塞巣辺縁大脳皮質におけるリン酸化タンパク発現の解析により、薬剤・訓練併用療法における効果規定要因・分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1)局所性脳梗塞モデル動物の作製

脳梗塞モデルラットは Watson らの方法に準じて photothrombosis により大脳皮質に脳梗塞を作製した。具体的には、イソフルレン麻酔下にて、ラットを脳定位装置に固定し頭部の皮膚を切開した。次に直径 3mm の光ファイバーの中心を前肢・後肢の領域に固定し、生理食塩水に溶解した Rose Bengal (Sigma, St Louis, MO) 溶液を尾静脈から投与した (30 mg/kg of body weight)。投与直後から、経頭蓋的に波長 540nm の緑色光を照射し、大脳皮質限局性に脳梗塞を作成した。

(2)リハビリ訓練・運動機能評価

脳梗塞導入後 2 日目から Full-time integrated treatment (FIT) program に準じて 1 日 12 時間(暗期)の回転ケージを用いた自発運動訓練(図 1)を毎日行った群を exercise (EX)群、訓練を行わなかった群を control (CNT)群とした。運動機能評価法である rotarod test により、脳梗塞導入前と梗塞後経時的に協調運動の可否、平衡感覚、運動機能障害の程度を総合的に解析した。具体的には初速 3rpm から 5 分後に 30rpm へと加速する直径 3cm の回転棒上にラットを乗せてから落下するまでの歩行持続時間を 3 回計測し、その平均値を用いた。



図 1. 回転ケージによる自発運動訓練の様子

(3)薬剤投与

EX 群、CNT 群に対して脳梗塞後 5 日目に Bryostatin-1 (Enzo Life Sciences, Inc; 15.0, 10.0, 7.5 and 5.0 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ of body surface area) もしくはその溶媒の尾静脈投与を行った。

(4)モノアミン解析

脳梗塞後8日目に梗塞巣辺縁の大脳皮質組織を採取し、0.2M過塩素酸溶液にて除タンパク後、ODSカラムを用いて液体クロマトグラフィーにより分離を行い、電気化学検出器 (ECD-100: Eicom Co.)を用いて、ノルエピネフリン(NE) 及び、セロトニン(5-HT)、ドーパミン(DA)、ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)を検出し組織重量あたりの濃度比較を行った。

(5)脳内タンパク質の比較解析

α -amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA)のサブユニット GluR1 のリン酸化状態を確認する為、bryostatin-1 ($10 \mu\text{g}/\text{m}^2$)もしくは溶媒投与後 24 時間後に脳梗塞辺縁の大脳皮質組織を採取し CNT-vehicle (CNT-vehi) group, CNT-bryostatin-1 (CNT-bryo) group, EX-vehicle (EX-vehi group) group, EX-bryostatin-1 (EX-bryo) group の 4 群にて GluR1 抗体, phosphorylatedSer831-GluR1, phosphorylated-Ser845-GluR1 抗体 (EMD Millipore Corporation, United States)を用い、Western blot 法により比較解析を行った。

4 . 研究成果

(1) 訓練・薬剤併用療法における Rotarod test の経時変化

脳梗塞導入前および、脳梗塞 2 日後では、CNT 群および EX 群の各群ともにその挙動に変化が認められなかった (図 2)。このことは、脳梗塞後に各群が同程度の運動機能障害を有していたことが推測される。さらに、脳梗塞 2 日後より自発運動訓練を開始した EX 群では CNT 群と比較して回転棒上での歩行持続時間が漸次増加し、脳梗塞 6 日後で有意な歩行持続時間の増加が認められ、脳梗塞後の自発運動訓練が運動機能回復に効果的であったことが示唆された。さらに、脳梗塞後 8 日目に溶媒投与 EX 群と比較して、10, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ の濃度にて薬剤投与を行った EX 群において、有意な歩行持続時間の増加が認められた。一方、薬剤投与 CNT 群では、溶媒投与 CNT 群と比較して、有意な歩行持続時間の増加は認められなかった。これらの結果より、薬剤投与のみでの機能回復は得られず、運動訓練と薬物併用療法が運動機能回復に有用であり、さらに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。さらに薬剤用量依存性に歩行持続時間の増加傾向が認められた。

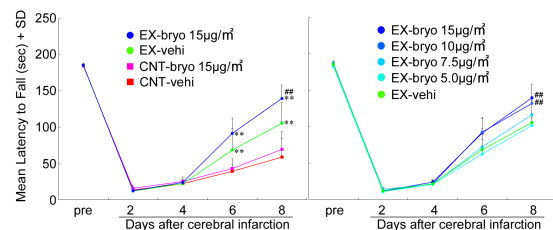


図 2. Rotarod test を用いた運動機能評価における経時変化。

The EX-vehi and EX-bryo groups (●) were compared with the CNT-vehi and CNT-bryo groups (■); significant differences are indicated as ** $P < 0.01$. The EX-bryo 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ and 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ groups were compared with the EX-vehi and EX-bryo 5.0 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ groups; significant differences are indicated as ## $P < 0.01$.

(2) 訓練・薬剤併用療法におけるモノアミン動態における解析

脳梗塞周囲大脳皮質において、NE, DA, 5-HIAA に変化は認められなかったが、5-HT および 5-HT turnover (5-HIAA/5-HT) について有意な変化が認められた(図 3)。具体的には、5-HT は EX 群で有意な増加が認められ、さらに溶媒投与 EX 群と比較して、薬剤投与 EX 群において有意な増加が認められた。turnover は、薬剤投与 EX 群において低値を示したことから、薬剤投与及び訓練の併用により 5-HT 代謝系に影響を与えている可能性が示唆された。

また、5-HT と運動機能評価である rotarod test における歩行持続時間と正相関が認められたことから(図 4)、5-HT が機能回復に対して何らかの関連性を有している可能性が示唆された。すなわち、訓練及び PKC 活性化剤投与による併用療法が、5-HT turnover に作用し大脳皮質内 5-HT 濃度を上昇させている可能性が示唆され、さらに脳内 5-HT が機能回復に関与している可能性が示唆された。

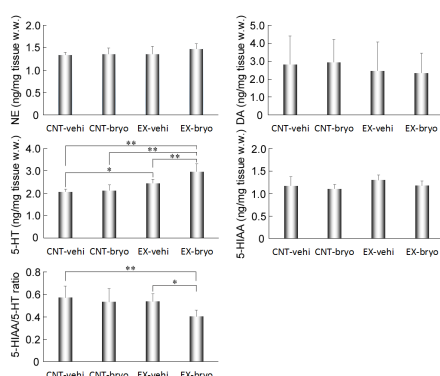


図3. 梗塞巣周囲大脳皮質におけるモノアミンの定量比較

Comparisons of the CNT-vehi group, the CNT-bryo group, the EX-vehi group, and the EX-bryo group in terms of the perilesional cortex monoamine (NE, DA, 5-HIAA, and 5-HT) levels and the 5-HIAA/5-HT ratio. Data are mean \pm SD. Statistically significant

differences between the groups are indicated as * P <0.05, ** P <0.01. bryo, bryostatin; CNT, control; DA, dopamine; EX, exercise; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HT, serotonin; NE, norepinephrine; vehi, vehicle.

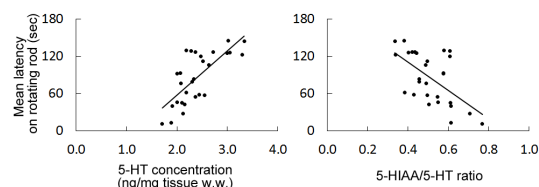


図4. Rotarod test における歩行持続時間と 5-HT, 5-HIAA/5-HT ratio との相関

The correlation between latency in the rotarod test as an index of motor function and monoamine level of 5-HT or 5-HIAA/5-HT ratio in all four groups: CNT-vehi group ($n=7$), CNT-bryo group ($n=7$), EX-vehi group ($n=7$), and EX-bryo group ($n=7$). bryo, bryostatin; CNT, control; EX, exercise; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HT, serotonin; vehi, vehicle.

(3) 訓練・薬剤併用療法における GluR1 リン酸化修飾の発現解析

脳梗塞周囲大脳皮質における GluR1, p-Ser845 GluR1, p-Ser831 GluR1 の発現比較解析を行った(図 5)。PKC の基質である AMPA 型グルタミン酸受容体のサブユニット GluR1 の発現自体に変化は認められなかったが、そのリン酸化に変化が認められた。具体的には、訓練による Ser845 のリン酸化タンパクの増加は AMPA 受容体の後シナプス膜への誘導を、さらに薬剤投与による Ser831 のリン酸化は単一シナプスのコンダクタンス上昇を引き起こしていることが推測された。これら AMPA 型グルタミン酸受容体の刺激伝達効率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の分子基盤である可能性が示唆された。

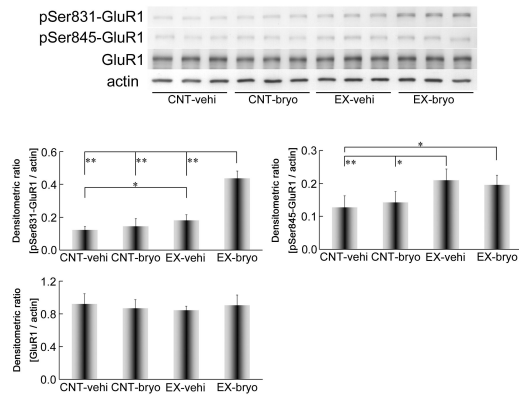


図5. Western blot法による pSer831-GluR1, pSer845-GluR1, GluR1における発現比較
Specific antibodies against pSer831-GluR1, pSer845-GluR1, GluR1, and actin were used to quantify relative levels of protein expression in the analysis of extracts of the perilesional cortex. These graphs show the amounts of pSer831-GluR1, pSer845-GluR1, and GluR1 relative to that of actin. The mean (SD) of six animals is shown. The four groups of CNT-vehi, CNT-bryo, EX-vehi, and EX-bryo are compared; significant differences are indicated as * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

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 7 件)

1. Beppu H, Takeda K, Tomita Y, Orand A, Mizutani K, Tamai I, Takayanagi N, Takahashi H, Sonoda S. Improvement in trunk tremor by forced gait training in cerebellar ataxic Wob/t mice. *Structure and Function*. 2017, 15(2):62-70 査読有
2. Mizutani K, Sonoda S, Wakita H, Okazaki H, Katoh Y, Chihara T, Shimpo K. Effects of exercise and bryostatin-1 on serotonin dynamics after cerebral infarction. *Neuroreport*. 2016;27(9):659-64. doi: 10.1097/WNR.0000000000000592. 査読有
3. Mori D, Miyake H, Mizutani K, Shimpo K, Sonoda S, Yamamoto T, Fujiwara S, Kubo KY. Effects of occlusal disharmony on the

hippocampal dentate gyrus in aged senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Arch Oral Biol*. 2016;65:95-101. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.01.015. 査読有

4. Kondo H, Kurahashi M, Mori D, Inuma M, Tamura Y, Mizutani K, Shimpo K, Sonoda S, Azuma K, Kubo KY. Hippocampus-dependent spatial memory impairment due to molar tooth loss is ameliorated by an enriched environment. *Arch Oral Biol*. 2016;61:1-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.006. 査読有
5. Beppu H, Takayanagi N, Tomita Y, Mizutani K, Orand A, Tamai I, Takahashi H, Sonoda S. Improvement of gait and coordinated movement by forced gait training in cerebellar ataxic B6-wob/t mice. *Jpn J Compr Rehabil Sci*. 2015; 6: 64-70. 査読有
6. Mizutani K, Sonoda S, Wakita H, Shimpo K: Protein kinase C activator, bryostatin-1, promotes exercise-dependent functional recovery in rats with cerebral infarction. *Am J Phys Med Rehabil*. 2015;94(3):239-43. doi: 10.1097/PHM.0000000000000227. 査読有
7. Okazaki H, Beppu H, Mizutani K, Okamoto S, Sonoda S. Changes in Serum Growth Factors in Stroke Rehabilitation Patients and Their Relation to Hemiparesis Improvement. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23(6):1703-8. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis. 2014.01.015. 査読有

[学会発表](計 8 件)

1. 水谷謙明, 園田茂, 別府秀彦. 脳梗塞後の麻痺回復におけるモノアミンの役割. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会, 福島, ビッグパレットふくしま, 2016年3月30日(プログラム・抄録集, p191)
2. 水谷謙明, 園田茂, 武田湖太郎. 脳梗塞ラットへの訓練・薬剤併用療法の可能性

- と脳内変化. 第 23 回脳機能とリハビリテーション研究会学術集会,千葉,千葉県立保健医療大学,2016 年 4 月 24 日(プログラム・抄録集,p20)
3. 水谷謙明, 園田茂, 別府秀彦. 脳梗塞ラットへのリタンセリン投与が機能回復に与える影響. 第 7 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会,神戸,神戸国際会議場,2016 年 5 月 21 日(プログラム・抄録集,p91)
4. 別府秀彦, 水谷謙明, 千原猛, 玉井育子, 園田茂. D 型セリン投与および運動介入による小脳失調マウスの運動失調改善効果. 第 7 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会,神戸,神戸国際会議場,2016 年 5 月 21 日(プログラム・抄録集,p91)
5. 水谷 謙明, 園田 茂, 別府 秀彦. 脳梗塞ラットへの訓練・薬剤併用療法がモノアミン動態に与える影響. 第 6 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会,秋田,秋田ビューホテル,2015 年 2 月 21 日(プログラム・抄録集,p67)
6. 別府 秀彦, 岡崎英人, 玉井育子, 水谷謙明, 宮坂裕之, 谷野元一, 新保寛, 園田茂. 回復期リハビリテーション患者の入院および退院に関連する血中遊離アミノ酸の検索の試み. 第 6 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会,秋田,秋田ビューホテル,2015 年 2 月 21 日(プログラム・抄録集,p69)
7. 水谷 謙明, 園田 茂, 別府 秀彦, 高柳尚貴. 脳梗塞ラットへの訓練・薬剤併用療法による脳内分子の変化. 第 5 回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会, 東京,砂防会館,2014 年 2 月 15 日 (プログラム・抄録集,p97)
8. 別府 秀彦, 水谷 謙明, 新里 昌功, 富田豊, Abbas Orand, 高柳 尚貴, 新保 寛, 園田 茂. 小脳失調マウスへの強制歩行運動

および環境エンリッチメント (Enriched Environment : EE) 飼養が自発的活動量におよぼす影響. 第5回日本ニューロリハビリテーション学会学術集会,東京,砂防会館, 2014年2月15日 (プログラム・抄録集,p99)

〔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〕
ホームページ等
<http://www.fujita-hu.ac.jp/FMIP/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水谷謙明 (MIZUTANI KENMEI)
藤田保健衛生大学・藤田記念七栗研究所・講師
研究者番号：30351068

(2)研究分担者

園田 茂 (SONODA SHIGERU)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：10197022

脇田英明 (WAKITA HIDEAKI)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：80416172

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者

()