

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15367

研究課題名(和文) マウス皮質脊髄路損傷後に神経回路修復を開始する因子の探索

研究課題名(英文) Exploration of the factor that initiate axonal sprouting after corticospinal tract injury

研究代表者

辻岡 洋 (Tsujioka, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20803505

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)：中枢神経系損傷後には損傷を受けていない軸索が代償的な神経回路を形成することによって部分的な機能回復が見られることがある。上記能力は新生児の方が成体より高い。神経回路修復を開始する因子を探索する目的及び新生児と成体の神経回路修復早期の反応の違いを調べる目的で、マウス延髄錐体切断モデルを用い、切断3日後の頸髄からRNAを抽出してRNA-seqを行った。成体では新生児と比べて切断後に炎症関連遺伝子がミクログリアで高発現しており、神経回路修復能を規定する要因の一つである可能性が示唆された。上記結果はBMC Genomics誌に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児と成体の神経回路修復能の差を規定する要因を解明することは、中枢神経系損傷後の新規治療法につながる可能性があり、重要な課題である。本研究は上記解析の基盤となる遺伝子発現プロファイルを明らかにしたという意義がある。損傷部から離れた部位での過剰な炎症反応が神経回路修復に悪影響を与える可能性や、まだほとんど機能を解析されていない遺伝子Etnpplが新生児と成体で大きく異なる発現を示すことも今回明らかとなった。今後これらの解析を進めることで、冒頭の課題の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：After central nervous system injury, compensatory neural circuit is formed, and neural function is partially recovered. This ability is higher in neonate compared to adult. To explore the factors that initiate the sprouting, and to elucidate the difference of initial response after central nervous system injury between neonate and adult, we extracted RNA from cervical cord of neonatal or adult mice 3 days after pyramidotomy, and performed RNA-sequencing. Inflammatory related genes such as Ccl6 or Cd52 are upregulated in adult after pyramidotomy compared to sham group or neonatal group. The inflammatory related genes are expressed in microglia in denervated side of dorsal column in adult mice, whereas no microglial accumulation is observed in neonatal mice. It is possible that severe inflammatory response in microglia is related to low sprouting ability in adult. The above research is published in BMC Genomics.

研究分野：神経再生

キーワード：神経回路修復 延髄錐体切断 RNA-seq ミクログリア アストロサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では中枢神経系損傷後に損傷した軸索が再生することはほとんどない。しかしながら、損傷していない神経細胞の軸索が伸長して代償的な神経回路を形成することによって、部分的な機能回復が見られることがある。上記神経回路修復の能力は新生児の方が成体よりもはるかに高い。神経回路修復の分子機構及び神経回路修復能を規定する要因を解明することは中枢神経系損傷に対する新規治療法の開発につながる可能性があり、重要な課題である。マウスでは皮質脊髄路損傷後に頸髄の脊髄固有ニューロンから放出される BDNF が神経回路修復に必要であることが知られているが、神経回路修復を開始する因子についてはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、新生児では神経回路修復の開始に関与する遺伝子が高発現する一方、成体では同遺伝子の発現量が低いという仮説を立てた。その上で、新生児と成体で延髄錐体切断後早期の頸髄での遺伝子発現プロファイルと比較することにより、神経回路修復を開始する要因を明らかにするとともに、神経回路修復能を規定する要因を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

新生児(7日齢)と成体(8週齢)マウスに対して延髄錐体切断術を行った。損傷2週間後に軸索トレーサーを注入し、損傷4週間後に組織学的解析を行うことで、新生児の方が成体より神経回路修復能が高いことを確認した。また、皮質脊髄路のマーカーである PKC γ のシグナルの消失により、延髄錐体切断術の成功を確認した。

延髄錐体切断3日後に頸髄から RNA を抽出し、RNA-sequencing (RNA-seq)を行った。新生児もしくは成体で延髄錐体切断後に選択的に発現変動している遺伝子を調べた。その結果成体で炎症関連遺伝子の発現上昇がみられたため、当該遺伝子の発現細胞を調べるため、当該遺伝子とミクログリアマーカー Iba1 の二重染色を行った。

RNA-seq の結果新生児と成体で最も発現量に差が見られたのは *Etnppl* であったため、*Etnppl* の解析を進めた。先行研究で *Etnppl* がアストロサイトで発現することが示唆されていたため、MACS を用いて新生児と成体の脊髄からアストロサイトを単離し、定量的 RT-PCR で発現量を比較した。組織学的に *Etnppl* 発現細胞を確認するため、RNA scope を用いて *Etnppl* と様々な細胞マーカーとの多重染色を行った。ETNPPL の細胞内局在を調べるため、抗 ETNPPL 抗体を受託作製し、免疫染色を行った。

4. 研究成果

新生児、成体ともに除神経側で PKC γ のシグナルが消失しており、延髄錐体切断術の成功が確認された。また、除神経側への軸索伸長は新生児の方が成体よりも有意に増加しており、先行研究の再現性が確認された。

RNA-seq のデータをもとに、新生児もしくは成体で延髄錐体切断後に選択的に上昇もしくは低下する遺伝子を調べたところ、両比較で2倍以上の発現変動を示したのは *Ccl6* と *Cd52* だけ

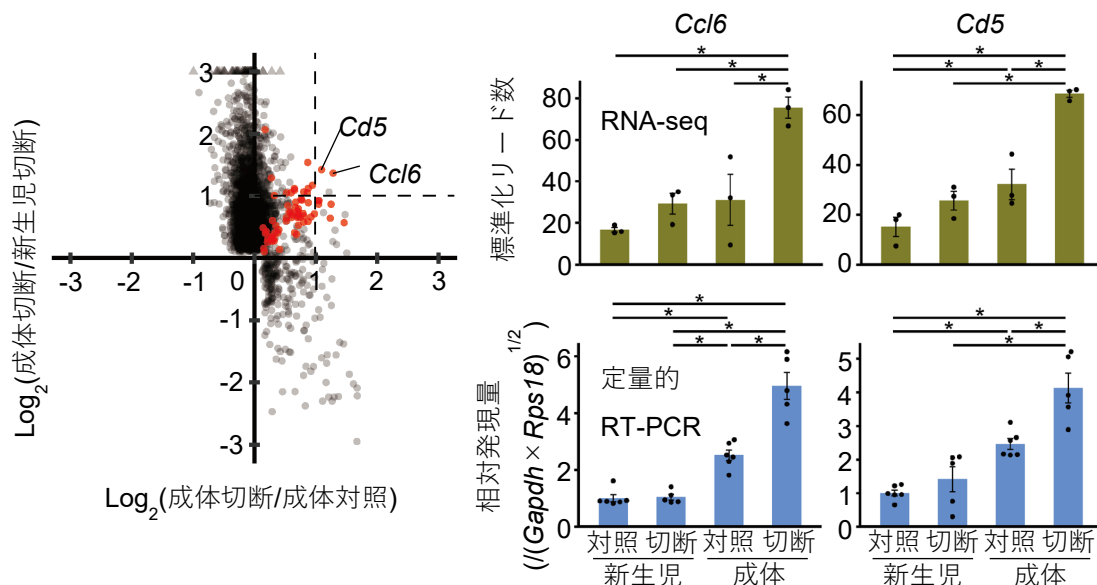


図1 成体切断群選択的に発現上昇する遺伝子 左：両比較で補正 P 値 <0.05 となる遺伝子を赤で示す。破線は2倍。右：* $P<0.05$, Wald or Tukey's HSD test, $n=3$ or $5-6$, 平均 \pm 標準誤差。

であった(図1)。Ccl6とCd52は成体延髄錐体切断群で選択的に発現上昇していた。Ccl6とCd52を含め、成体延髄錐体切断後に選択的に発現上昇する遺伝子の中には炎症関連遺伝子が多くみられ、パスウェイ解析でも炎症関連のパスウェイの上昇が確認された。

上記遺伝子がどの細胞で発現しているのか調べるため、中枢神経系の免疫細胞であるミクログリアのマーカー遺伝子Iba1と上記遺伝子の二重染色を行った。上記遺伝子のうちLy86等いくつかの遺伝子でシグナルが検出でき、上記遺伝子がIba1陽性細胞で発現することが明らかとなった(図2)。また、上記細胞は成体では延髄錐体切断後に皮質脊髓路が通る後索の除神経側に集

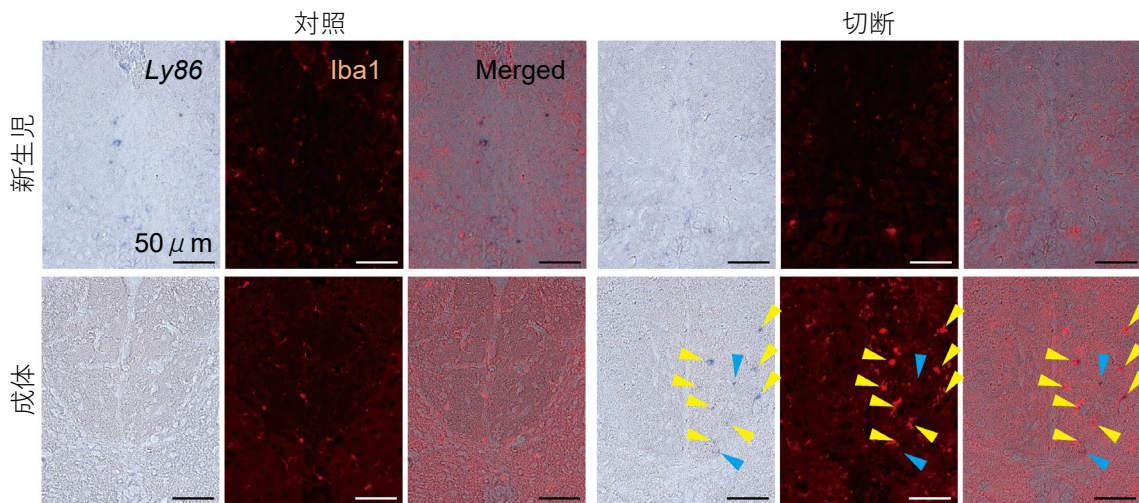


図2 成体切断群に選択的に発現上昇する遺伝子のミクログリアでの発現 頸髄後索の拡大像を示す。Ly86のin situ hybridization(青紫)とIba1の免疫組織化学(赤)の二重染色。Ly86⁺Iba1⁺細胞を黄色の鋸で、Ly86⁺Iba1⁻細胞を青の鋸で示す。

簇していたが、新生児では上記集簇は見られなかった。上記結果より、成体では変性軸索を貪食するミクログリアの活性化が生じることで神経回路修復が阻害される可能性がある。

延髄錐体切断後の発現変動よりも新生児と成体の対照群での発現変動の方が大きかった。中でもEtnpplは最も大きな発現変動を示した(図3)。Etnpplは新生児ではほとんど発現しておらず、

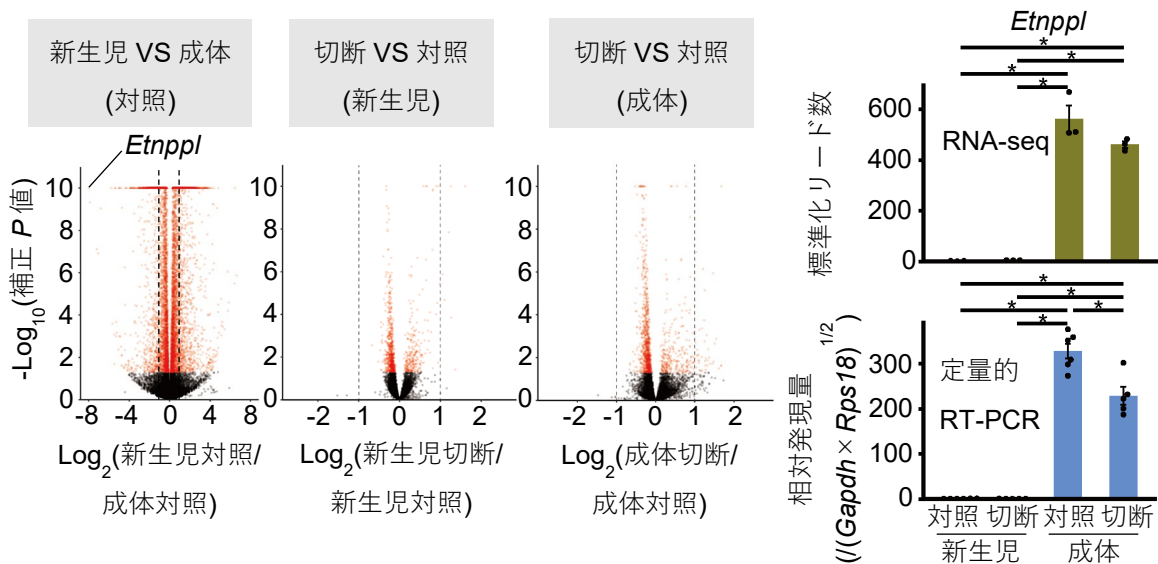


図3 新生児と成体で発現量が異なる遺伝子 左：補正P値<0.05を赤で示す。破線は2倍。右：*P<0.05, Wald or Tukey's HSD test, n=3 or 5-6, 平均±標準誤差。

成体では延髄錐体切断後に発現低下したことから、軸索伸長に阻害的に働く可能性がある。アストロサイトを単離して遺伝子発現を調べたところ、Etnpplは成体アストロサイト特異的に発現していた。組織学的解析ではEtnpplが成体の灰白質のアストロサイト特異的に発現すること、ETNPPLが核局在することが明らかとなり、ETNPPLはアストロサイトによる神経回路の制御に関与する可能性がある。また、小型魚類脊髄でもetnpplは発現しており、種を越えて保存されている可能性がある。

今回の研究によって、神経回路修復能を規定する要因を解明する上での基盤となる遺伝子発現の情報が得られた。また、損傷後早期の成体での強い炎症反応が神経回路修復を阻害する可能

性、*Etnppl* が軸索伸長を阻害する可能性が明らかとなった。今後解析を続けることで、損傷早期に神経回路修復能を規定する要因の解明につながることを期待される。

なお、本成果の一部は BMC Genomics 誌に掲載された。(Hiroshi Tsujioka & Toshihide Yamashita, Comparison of gene expression profile of the spinal cord of sprouting-capable neonatal and sprouting-incapable adult mice. BMC Genomics. 2019;20(1):619. 図 1-3 は同論文の図を一部改変した)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroshi Tsujioka, Toshihide Yamashita	4. 巻 20
2. 論文標題 Comparison of gene expression profile of the spinal cord of sprouting-capable neonatal and sprouting-incapable adult mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12864-019-5974-9	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 辻岡洋、山下俊英
2. 発表標題 新生児マウス延髄錐体切断後の脊髄のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----