

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19720

研究課題名(和文) エピジェネティクス制御に基づく新たな脳卒中運動療法の探索

研究課題名(英文) Novel kinesiotherapy for stroke based on epigenetic regulation

研究代表者

前島 洋(Maejima, Hiroshi)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号：60314746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の長期投与はマウスの大脳皮質運動野におけるHDAC活性を抑制し、ヒストンH4、H3のアセチル化レベルを増強し、神経栄養因子、最初期遺伝子等の可塑的遺伝子発現を増強した。更に脳卒中モデルラットにおいて、脳卒中後により損傷側大脳皮質運動野におけるヒストンH4アセチル化レベルは減少し、同側海馬におけるHDAC活性を増強した。これに対し、HDAC阻害剤の長期投与は大脳皮質運動野におけるヒストンH4アセチル化を増強し、海馬におけるHDAC活性を抑制することが確認され、脳卒中後の複数の脳領域におけるエピジェネティクス環境を回復させる所見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中後の機能回復を目的とするリハビリテーションにおいて、運動療法は中枢神経系の可塑的变化を誘導し機能回復を促進する中心的な治療介入であるが、その効果を促進するための脳内環境のコンディショニングが期待される。本研究はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の投与による脳内エピジェネティクス環境の調整が可塑的遺伝子発現を増強すること、更に脳卒中によるエピジェネティクス変化を回復させる所見を得た。従って、エピジェネティクス制御が脳卒中リハビリテーション効果を増強するための有益な中枢性コンディショニングとなり得ることを示唆する基礎研究として本研究は学術的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：Repetitive administration of histone deacetylase (HDAC) inhibitor inhibited HDAC activity and acetylated histone H4 and H3 in the murine motor cortex, accompanying the increase of gene expression related to neuronal plasticity including neurotrophins and immediate-early genes. In the stroke model rats, acetylation level of histone H4 in the ipsilateral motor cortex decreased and HDAC activity in the ipsilateral hippocampus increased following stroke, whereas repetitive administration of HDAC inhibitor acetylated histone H4 in the motor cortex and inhibited HDAC activity in the hippocampus, suggesting that HDAC inhibition could recover the epigenetic condition in brain regions altered by stroke and beneficially present neuronal platform for stroke rehabilitation.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：リハビリテーション 脳卒中 運動 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

脳卒中のリハビリテーションにおいて、理学療法とりわけ運動療法による運動機能再学習が期待される。そこで、限られた運動療法の機会を有効に用いるため、運動療法による機能回復効果を最大限に惹起しうる可塑性に富んだ脳内環境に対するコンディショニングの上で運動療法を実施することが期待される。brain derived neurotrophic factor (BDNF) に代表する神経栄養因子は神経細胞の生存、保護、分化、可塑性を惹起し、中枢神経系疾患の機能回復を促進する重要な因子である。BDNF は神経細胞において活動依存的に発現するとともに、運動によって活性化される大脳皮質運動関連領域における神経細胞の可塑的修飾を増強し、機能回復を促進する。従って、神経栄養因子が最大限に発現する神経細胞の可塑性に富んだ脳内環境を制御することは運動療法のコンディショニングとして極めて有効であると期待される。

代表的なエピジェネティクス制御としてヒストンのアセチル化はクロマチン構造における DNA の梱包を緩め、当該領域の遺伝子発現を増強する。更にヒストンのアセチル化レベルはヒストンアセチル基転移酵素 (HAT)、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の活性により調整される。従って、HDAC の活性を阻害する HDAC 阻害剤の投与によりヒストンのアセチル化は促進され、概して遺伝子発現を増強することが期待される。そこで、脳卒中の機能回復において HDAC 阻害剤投与 (薬理的中枢性コンディショニング) は、脳内における運動依存的な神経栄養因子の発現増強を促進されることが期待され、脳卒中運動療法に対して可塑的脳内環境を惹起し、リハビリテーション効果を促進することが期待された。従って、本研究の目的は、脳卒中モデル動物に対して、HDAC 阻害下における運動療法が大脳皮質 BDNF 発現と運動学習効果の増強することを検証し、新たな運動療法の可能性に対して、基礎研究として資することにある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HDAC 阻害剤と運動が相乗的に脳における可塑的遺伝子発現を修飾し、脳卒中の機能回復に対して有効に働くことについて実験動物を用いて検証することである (1) 予備的な研究として正常 ICR マウスを用いた両介入が脳領域 (大脳皮質運動野、海馬) における HDAC 活性、ヒストンアセチル化、各種遺伝子発現に与える所見について精査した後、(2) 脳卒中モデル動物を対象に HDAC 阻害と運動の両要因が損傷側の脳領域における修飾と機能回復に与える効果について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 健常 ICR マウスにおける HDAC 阻害およびトレッドミル運動の効果の検証

対象

13 週齢の雄性 ICR マウス 42 匹を HDAC 阻害、運動の有無の 2 要因により、Control 群 (Con, n=10)、運動のみを行う運動群 (Ex 群, n=10)、HDAC 阻害剤である sodium butyrate (NaB, n=12) を投与する NaB 群、運動および NaB 投与を行う NaB&Ex 群 (n=10) に群分けした。

HDAC 阻害剤投与

NaB 群および NaB&Ex 群を対象に、HDAC 阻害剤として HDAC クラス I、IIa を阻害対象とする sodium butyrate (NaB) 1.2g/kg を 1 日 1 回、週 5 回、4 週間の投与を行った。運動との相乗効果を検証するため NaB&Ex 群においては運動開始の 20 分前に投与を行った。

運動介入

Ex 群および NaB&Ex 群を対象に 1 日 1 回、週 5 日間、4 週間のトレッドミル運動 (10m/s, 60 分) を行った。

行動評価

4 週間の介入後、運動機能、認知機能評価を行った。運動機能評価として、Rotarod test、Wire hang test に加えて 3 分間の自由走行軌跡長 (locomotor activity) を計測した。認知機能評価として新規物体認識試験、ステップスルー受動回避試験を実施した。

組織採取

4 週間の介入後に全脳を採取し、大脳皮質運動野、海馬を単離し、生化学的分析 (HDAC 活性定量、ヒストンアセチル化レベル定量、定量的 RT-PCR による mRNA 発現レベル定量) のための試料とした。

生化学的分析

採取した大脳皮質運動野、海馬より核抽出を行い、HDAC 1-11 を対象とする Epigenase™ HDAC Activity/Inhibition kit (EpiGentek) を用いて HDAC 活性を定量した。採取試料よりヒストン抽出を行い、ヒストン H3, H4 におけるアセチル化レベルを EpiQuik™ Total Histone H3/H4 Acetylation Detection Kit (EpigenTek) を用いて定量した。RNeasy® Liquid Tissue Mini Kit (QIAGEN, ドイツ) を使用し、総 RNA を抽出した。RNA サンプルは High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。続いて、リアルタイム PCR システムを用いた定量的 PCR を行った。TaqMan® Fast Advanced Master Mix と TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) を用いてターゲット遺伝子

として、最初期遺伝子 *c-fos*、*Arc*、神経栄養因子 BDNF、NT-4、神経栄養因子受容体 TrkB、p75 の cDNA をそれぞれ増幅し、内部標準遺伝子として β -actin を用いた比較 Ct 法 (Ct 法) に基づき、それぞれの mRNA 発現量を相対定量した。

統計解析

HDAC 阻害および運動を 2 要因とする 2 元配置分散分析による主効果、交互作用を検定し、有意な交互作用が確認された際には post-hoc test として同水準内における群間差を検定した。

(2) 脳卒中モデル動物を対象とする HDAC 阻害およびトレッドミル運動の効果の検証

当初、脳卒中モデルとしてマウスを対象とする中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを検討していたが、モデル作成再現性の問題から、再現性のあるラット線状体内包域出血モデルに変更して介入研究を進めた。

対象

7 週齢 wistar ラット 40 匹を 5 群に群分けした。無作為に偽手術群 (SHAM, n=8)、脳出血後に NaB 投与および運動介入を行わない群 (CON, n = 8)、脳出血後に NaB 投与のみを行う群 (NaB, n=8)、脳出血後に運動介入のみを行う群 (EX, n=8)、脳出血後に NaB 投与と運動介入を行う群 (NaBEX, n=8) の 5 群に分けた。

脳出血術

脳出血モデルは、深麻酔下状態でラットの頭部を脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨を露出した後、ドリルで頭蓋骨に小孔を開け、左線条体～内包域 (ブレグマより後方 2 mm, 正中線から左方 3.7 mm, 脳表から下方 6 mm) に血管基底膜を破壊する酵素であるコラゲナーゼ (Type I, 0.24 U, 1.2 μ l, Sigma-Aldrich, USA) を微量注入した。SHAM 群には、同部位に同量の生理食塩水を注入した。疼痛管理のため術後に鎮痛剤を皮下投与した。

HDAC 阻害剤投与

NaB 群および NaB&Ex 群を対象に、先行研究を参考に HDAC 阻害剤として sodium butyrate (NaB) 300mg/kg を 1 日 1 回、週 5 回、4 週間の投与を行った。運動との相乗効果を検証するため NaB&Ex 群においては運動開始の 15 分前に投与を行った。

運動介入

Ex 群および NaB&Ex 群を対象に 1 日 1 回、週 5 日間、4 週間のトレッドミル運動 (10m/s, 60 分) を行った。先行研究に基づき、EX 群と NaBEX 群は術後 3 日目から術後 28 日目までの 4 週間、週 5 日、走行速度 11 m/min の低負荷強度で 30 分間のトレッドミルによる有酸素運動を 1 日 1 回実施した。運動環境に対する適応のため、術前に合計 3 日間、走行速度 5 m/min で 5 分間の走行練習を行った。術前の運動介入による影響を統一するため、走行練習は全てのラットを対象に実施した。

行動評価

神経学的評価として 5-point scale、Cylinder test、Ladder test を用いて片麻痺による運動機能障害について、介入前の脳出血術 3 日目、1 介入後の術後 4 日、21 日、28 日目に評価した。また、認知機能評価として object location test を術後 27 日目に実施した。

組織採取

4 週間の介入後に全脳を採取し、大脳皮質運動野、海馬を単離し、生化学的分析 (HDAC 活性定量、ヒストンアセチル化レベル定量、定量的 RT-PCR による mRNA 発現レベル定量) のための試料とした。

生化学的分析

(1) に準じて採取した大脳皮質運動野、海馬を対象に生化学的分析を実施した。採取試料より核抽出を行い、HDAC 1-11 を対象とする Epigenase™ HDAC Activity/Inhibition kit (EpiGentek) を用いて HDAC 活性を定量した。採取試料よりヒストン抽出を行い、ヒストン H3、H4 におけるアセチル化レベルを EpiQuik™ Total Histone H3/H4 Acetylation Fast Detection Kit (EpiGentek) を用いて定量した。RNeasy® Liquid Tissue Mini Kit (QIAGEN, ドイツ) を使用し、総 RNA を抽出した。mRNA サンプルは High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA) を用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。続いて、リアルタイム PCR システムを用いた定量的 PCR を行った。TaqMan® Fast Advanced Master Mix と TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA) を用いてターゲット遺伝子として、最初期遺伝子 *c-fos*、*Arc*、神経栄養因子 BDNF、神経栄養因子受容体 TrkB、p75、シナプスマーカー PSD95 の cDNA をそれぞれ増幅し、内部標準遺伝子として β -actin を用いた比較 Ct 法 (Ct 法) に基づき、それぞれの mRNA 発現量を相対定量した。

統計解析

脳出血の影響を検証するため、SHAM および CON の 2 群を対象に群と時間を 2 要因とする 2 元配置分散分析を行った。更に介入効果の検証のため SHAM 群を除く脳出欠術施行 4 群を対象に群と時間を 2 要因とする 2 元配置分散分析を行った。HDAC 阻害および運動を 2 要因とする 2 元配置分散分析による主効果、交互作用を検定し、有意な交互作用が確認された際には post-hoc test として同水準内における群間差を検定した。

4 . 研究成果

(1) 健常 ICR マウスにおける HDAC 阻害およびトレッドミル運動の効果の検証

行動評価

運動機能評価である Rotarod test、Wire hang test に加えて3分間の自由走行軌跡長 (locomotor activity) における介入効果は認められない一方、認知機能評価である新規物体認識試験にける NaB 投与の主効果として認知機能向上が確認された ($p < 0.05$)。また、ステップスルー受動回避試験において運動の主効果として認知機能向上が認められ ($p < 0.05$)。NaB&Ex は Ex 群、NaB と比較して認知機能が高く ($p < 0.05$)。NaB 投与と運動による相乗的認知機能向上を示す所見が得られた。

大脳皮質運動野におけるエピジェネティクス修飾

4週間のNaB投与の主効果として、大脳皮質運動野におけるHDAC活性の増強が確認された ($p < 0.05$, 図1A)。ヒストンH4のアセチル化レベルにおいてもNaB投与の主効果として、ヒストンH4のアセチル化が増強されるとともに ($p < 0.05$, 図1B) NaB投与と運動の相互作用が確認された (図1B, $p < 0.01$)。post hocテストの結果、運動およびNaB投与それぞれ単独介入によるヒストンH4アセチル化レベルの増強が確認された ($p < 0.05$, $p < 0.001$)。ヒストンH3においても運動とNaB投与の相互作用が確認され ($p < 0.01$)。運動およびNaB投与それぞれ単独介入によるヒストンH4アセチル化レベルの増強が確認された ($p < 0.05$, $p < 0.05$)。一方、海馬における介入によるエピジェネティクス修飾に対する有意な所見は認められなかった。

大脳皮質運動野、海馬における可塑的遺伝子発現の修飾

大脳皮質運動野において、NaB投与の主効果として最初期遺伝子 c-fos、Arc、神経栄養因子 BDNF、NT-4 の NaB 投与による発現増強が確認された ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.001$, 図2A-D)。海馬においても NaB 投与の主効果として、最初期遺伝子 c-fos、神経栄養因子 NT-4 の発現増強が確認された。

以上を総括すると、長期的なNaB投与により、大脳皮質運動野におけるHDAC活性は抑制され、ヒストンH4、H3のアセチル化レベルの増強を惹起した。併せてNaB投与による大脳皮質運動野における神経栄養因子、最初期遺伝子等の可塑的遺伝子発現が増強された一方、行動評価所見からNaB投与による副反応は認められなかった。従って、NaB投与はエピジェネティクス修飾を伴う可塑的脳内環境を大脳皮質運動野に提供し得る運動療法に対する中枢性コンディショニングとして期待される所見を得た。更にNaB投与は記憶の中枢における海馬における最初期遺伝子、神経栄養因子の発現を増強した。更に行動評価において認知機能を向上させ、特にHDAC阻害と

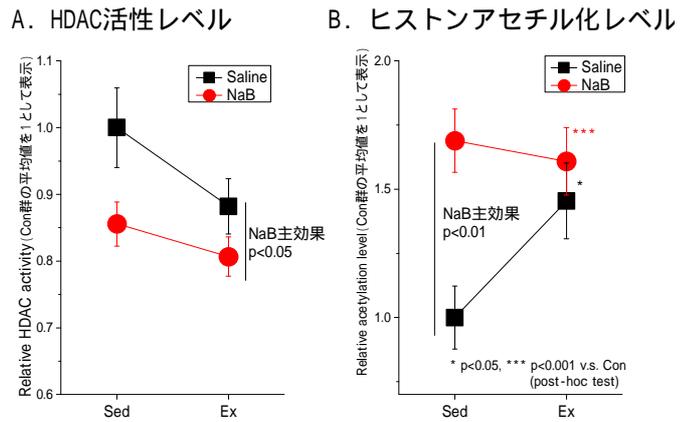


図1. 大脳皮質におけるヒストン修飾

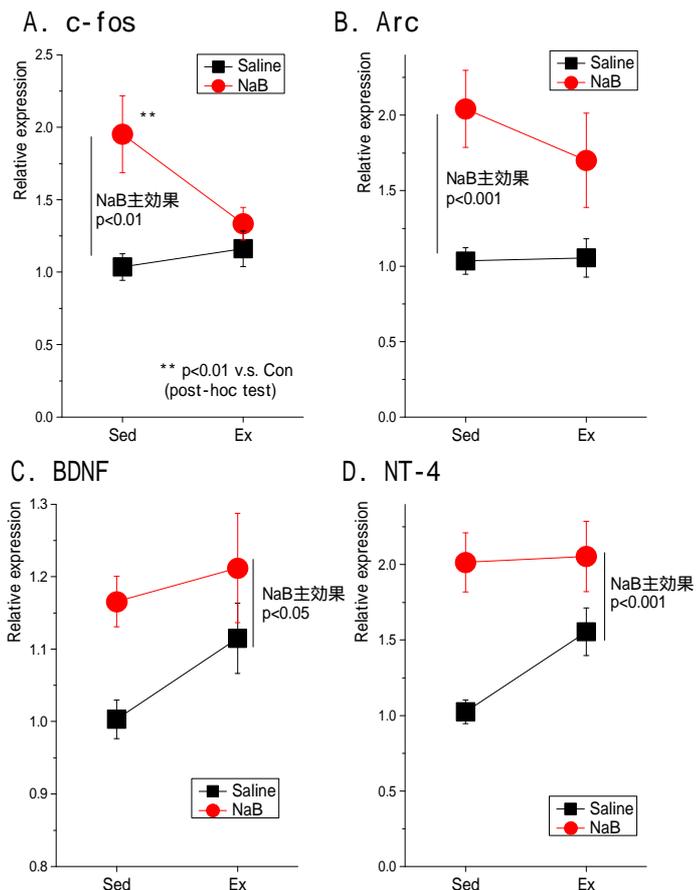


図2. 大脳皮質運動野における遺伝子発現

運動が相乗的に認知機能を向上させる所見を得た。このことは、運動療法に限らず認知機能も動員する中枢神経系疾患のリハビリテーションに対する中枢性コンディショニングとして HDDAC 活性の抑制が有益であることを示唆する研究成果を得た。

(2) 脳卒中モデル動物を対象とする HDAC 阻害およびトレッドミル運動の効果の検証 行動評価

神経学的評価として 5-point scale、Cylinder test、Ladder test を用いて片麻痺による運動機能障害において、SHAM 群と Con 群の比較において ICH 術による運動機能障害を認めたが、介入による運動機能評価所見への有意な主効果および交互作用は認められなかった。一方、認知機能評価に関して、object location test において ICH 術による認知機能の低下が生じたが ($p < 0.001$)、NaB 投与の主効果として認知機能の SHAM 群と同レベルまでの改善が確認された ($p < 0.05$)。運動による有意な主効果および交互作用は認められなかった。

大脳皮質運動野および海馬におけるエピジェネティクス修飾

大脳皮質運動野に対する SHAM 群と Con 群の比較による ICH 術の効果として、ICH 術によりヒストン H4 のアセチルレベルの低下が生じた ($p < 0.05$)。これに対し、NaB 投与の主効果として ICH 術により低下した H4 アセチル化レベルを増強し ($p < 0.05$)。また、運動によってもヒストン H4 増強の傾向が認められた ($p = 0.079$)。一方、有意な交互作用は認められなかった。大脳皮質運動野における HDAC 活性、ヒストン H3 の ICH 術、介入による効果は確認されなかった。

一方、海馬に対する SHAM 群と Con 群の比較による ICH 術の効果として、ICH 術により HDAC 活性の低下が生じた ($p < 0.05$)。これに対し、NaB 投与の主効果として ICH 術により低下した HDAC 活性は増強された ($p < 0.001$)。運動による有意な主効果、交互作用は認められなかった。海馬における ICH 術および介入によるヒストン H4、H3 アセチル化レベルの修飾は何れも確認されなかった。

大脳皮質運動野、海馬における可塑的遺伝子発現の修飾

SHAM 群と Con 群の比較による ICH 術の影響として、大脳皮質運動野における BDNF 発現の低下 ($p < 0.05$) および Arc の減少傾向 ($p = 0.063$)、海馬における Arc の発現減少 ($p < 0.05$) が確認された。介入による遺伝子発現の修飾として、NaB 投与の主効果として大脳皮質における神経栄養因子受容体 TrkB に対する p75 の発現比 ($p75/TrkB$) 減少が確認された ($p < 0.05$)。

一方、海馬における介入による遺伝子発現修飾として、NaB 投与によるシナプスマーカー PSD95 の発現減少が確認された ($p < 0.001$)。その他のターゲット遺伝子における、運動の主効果、相互作用は認められなかった。

以上を総括すると、脳出血により損傷側大脳皮質運動野におけるヒストン H4 のアセチル化レベルは減少するが、NaB 投与により SHAM レベルにまで増強されることから、HDAC 阻害は脳卒中により惹起される損傷側皮質のエピジェネティクス環境を回復させる働きがあることを示唆する所見を得た。更に、神経可塑性シグナルを誘導する神経栄養因子受容 TrkB に対してアポトーシスシグナル誘導も含む p75 受容体発現の比 ($p75/TrkB$) が HDDAC 阻害により抑制される所見を得た。一方、NaB 投与は損傷側海馬における HDAC 活性を減少させ、脳卒中後に生じる認知機能低下を回復させることを示す所見を得た。以上、運動機能および認知機能の中核としてはたらく複数の脳領域における包括的な所見より、HDAC 阻害によるエピジェネティクス制御は、脳卒中後に生じるエピジェネティクス変化を回復させ、脳卒中リハビリテーションにおける運動機能・認知機能の回復に対して可塑的脳内環境を惹起する中枢性コンディショニングとしてはたらく可能性を示唆する研究成果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maejima H., Kitahara M., Takamatsu Y., Mani H., Inoue T.	4. 巻 1751
2. 論文標題 Effects of exercise and pharmacological inhibition of histone deacetylases (HDACs) on epigenetic regulations and gene expressions crucial for neuronal plasticity in the motor cortex.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 14791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.147191. Epub 2020 Nov 2.	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 Kitahara M., Inoue T., Mani H., Takamatsu Y., Ikegami R., Tohyama H., Maejima H.	4. 巻 749
2. 論文標題 Exercise and pharmacological inhibition of histone deacetylase improves cognitive function accompanied by an increase of gene expressions crucial for neuronal plasticity in the hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.135749.	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 北原美佳, 井上貴博, 萬井太規, 高松泰行, 前島 洋
2. 発表標題 エピジェネティクス制御を伴う有酸素運動が海馬における脳由来神経栄養因子の発現に与える影響
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maejima H., Kitahara M., Inoue T., Takamatsu Y.
2. 発表標題 Exercise combined with repetitive inhibition of histone deacetylases modulates the expression of neurotrophin in the cerebral cortex.
3. 学会等名 The 42st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maejima H., Li X., Inoue T., Hayashi M.
2. 発表標題 Exercise habit enhances the expression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus accompanied by epigenetic changes in senescence-accelerated mice prone 8.
3. 学会等名 FENS Regional Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡村未里, 井上貴博, 萬井太規, 高松泰行, 前島 洋
2. 発表標題 脳出血モデルラットに対するトレッドミル走行が認知機能に与える影響
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ikegami R., Kitahara M., Inoue T., Mani H., Takamatsu Y., Tohyama H., Maejima H.
2. 発表標題 Exercise and pharmacological inhibition of histone deacetylase improves cognitive function in normal mice
3. 学会等名 The 98th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maejima H., Okamura M., Inoue T., Yakamatsu Y.
2. 発表標題 Epigenetic modifications in the motor cortex caused by exercise plus pharmacological inhibition of histone deacetylases (HDACs) after intracerebral hemorrhage
3. 学会等名 The 44st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------