

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07266

研究課題名（和文）中枢神経損傷から修復過程におけるゲノム高次構造の変動

研究課題名（英文）Alteration of chromatin structure in neurodegeneration

研究代表者

藤田 幸 (Fujita, Yuki)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：60631215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：外傷などにより障害された中枢神経機能の回復は非常に限られている。失われた神経機能回復のためには、破壊された神経回路の再建が必要である。これまでの研究から、損傷によって破綻した神経回路の再建のためには、神経軸索の伸長やシナプス形成、回路の精密化などのステップが順序正しく進行する必要があるということがわかってきた。中枢神経回路が形成される過程では多数の遺伝子が、時間軸、空間軸に従って変動する。本研究では、中枢神経障害から修復の過程で変動する遺伝子群を包括的に制御する仕組みを明らかにすることを旨とし、研究を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、中枢神経障害動物モデルや、疾患サンプルを用いた研究から、回路の修復の各ステップに関わる多様な遺伝子の研究が進められてきた。一方で、これらの遺伝子群の発現を修復の時間経過と共に順番に制御する仕組みは未だ不明な部分が多く残されている。そこで本研究では、中枢神経損傷から修復の過程における染色体高次構造の変動に着目し、その解析に取り組んだ。本年度は、留学による研究中断後、当該研究を再開し、神経障害モデルの解析を進めてきた。神経障害後の神経回路修復のメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Recovery of central nervous system function impaired by injury is limited. Reconstruction of disrupted neural circuits is necessary to restore lost neural function. Previous studies have shown that the reconstruction of neural circuits disrupted by injury requires the sequential progression of steps such as the elongation of nerve axons, synapse formation, and circuit refinement. During the process of forming the CNS circuit, a large number of genes fluctuate according to temporal and spatial axes. We initiated this study to elucidate a comprehensive regulatory mechanism for the group of genes that fluctuate during the process from CNS injury to repair.

研究分野：神経科学

キーワード：中枢神経 脳

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷や頭部外傷などで障害を受けた神経機能を回復するためには、破綻した神経回路の再構築が必要である (引用文献 1: Fujita et al., 2011, EMBO J)。切断を免れた神経軸索は新しい側枝を伸長し、損傷部を回避した迂回路を形成することで、再び標的細胞への情報伝達を可能にする。このように再編成された神経回路は「代償性神経回路」と呼ばれ、一部の機能回復に寄与することが、近年の研究からわかってきた。代償性神経回路形成過程では発生期の神経回路形成と同様に、はじめに過剰数の側枝が伸長し、標的細胞と結合して回路に組み込まれた側枝のみが残り、余分な側枝は退縮や変性によって取り除かれるというステップを経て神経回路が完成する (引用文献 2: Nakanishi, Fujita et al., 2019, Cell Death Dis)。

中枢神経障害からの機能回復のためには、上述のような幾つかの段階が進行し、中枢神経回路が再建されることが不可欠である。中枢神経回路が形成される過程では、多数の遺伝子が、時間軸、空間軸に従って変動する (引用文献 3: Fujita et al, 2017, J Exp Med)。本研究では、中枢神経障害から修復の過程で変動する遺伝子群を包括的に制御する仕組みを明らかにすることを目的として研究を実施した。

## 2. 研究の目的

外傷などにより障害された中枢神経機能の回復は非常に限られている。失われた神経機能回復のためには、破壊された神経回路の再建が必要である。しかしながら、中枢神経系には再生を阻む機構が存在している。申請者はこれまでに中枢神経軸索の再生を阻害する分子機序の解明に取り組み、再生阻害シグナルを抑制する手法の開発を進めてきた (引用文献 4: Fujita et al., 2013, Cell Death Dis)。

これまでに、損傷によって破綻した神経回路の再建のためには、神経軸索の伸長やシナプス形成、回路の精密化などのステップが順序正しく進行する必要があるということが国内外の研究から報告されている。中枢神経回路が形成される過程では多数の遺伝子が、時間軸、空間軸に従って変動する。本研究では、中枢神経障害から修復の過程で変動する遺伝子群を包括的に制御する仕組みを明らかにすることを目指し、研究を開始した。

## 3. 研究の方法

中枢神経の損傷により障害を受けた神経機能の回復は非常に限定的である。損傷によって破綻した神経回路の再建のためには、神経軸索の伸長と精密化のステップが必要になることがわかってきた。この過程は多数の遺伝子発現変動に応じて進行するが、順序よく変化する遺伝子発現を包括的に制御する機序は不明である。本研究では、中枢神経障害から修復の過程で変動する遺伝子群を包括的に制御する仕組みについて、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC に焦点を当て、解析を進めた (引用文献 5: Zhang, Fujita et al., 2018, Cell Death Dis)。

### (1) 中枢神経障害モデルにおける発現変化の解析

マウス的大脑皮質運動野に由来する皮質脊髄路を、胸部脊髄レベルで部分的に切断したモデルを用いた。このモデルでは、胸部以下、特に顕著に後肢の運動機能障害が観察される。切断を免れた皮質脊髄路が頸髄において分枝を伸ばし、motor neurons に至る代償性神経回路を形成する。野生型マウス (メス) に 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与、マウスの胸部背側を正中皮膚切開し、第 8 胸椎 (T8) を椎弓切除する。露出した脊髄を 1 mm の深さで切断し、胸髄半切断モデルを作成した。

また、マウスの上肢の運動野に該当する部分に損傷を作成した。脳損傷により上肢の運動機能を喪失した状態を人工的に作り出した。Impactor をガス圧により上下させ、目的領域に impactor を落とすことにより損傷を作成した。8 週齢、C57BL/6J マウスに三種混合麻酔をかけ、頭部の皮膚を切開したのち台に固定した。Bregma を同定し、Bregma に接するように左半球側目的部位の脳表面に impactor を接触させ、損傷を作成した。本研究の動物の取扱いについては、所属機関の指針に基づいて、所属機関の動物実験委員会の承認を得たうえで行った。

これらのモデル動物を用いて、大脑皮質、脊髄から RNA を抽出し、中枢神経障害後の遺伝子発現変動の定量解析を行なった。

### (2) 軸索の伸展、炎症反応の解析

マウス中枢神経損傷モデルを作成し、損傷後、大脑皮質運動野に順行性標識剤 BDA を注入し、蛍光標識された streptavidin により染色を行うと、側枝を含めた皮質脊髄路神経細胞の軸索を可

視化することができる。この方法を用いて中枢神経損傷後における軸索の伸展を評価した。また、脊髄損傷部周辺の神経細胞数について、神経細胞マーカーである NeuN に対する抗体を用いて組織免疫染色を行なった。炎症反応について検証するため、好中球のマーカーや、ミクログリア/マクロファージのマーカーに対する抗体を用いて、組織免疫染色を行なった。

### (3) 薬剤投与による運動機能回復への影響

中枢神経損傷後、DMSO (溶媒コントロール)、または HDAC 阻害剤を投与した群を作成した。損傷後、class1HDAC inhibitor (CI-994) 10mg/kg、またはコントロールとして DMSO を 1 日 1 回投与した。

運動機能の評価には single pellet reaching test を用いた。この試験はトレーニング後、皮質脊髄路によって制御される運動機能の評価するものである。C57BL/6J マウスを 10 匹用意し、獣医師のアドバイスの下、食餌制限を 2 日間行った。その翌日から 2 日間 pre-training を行った。これはマウスを透明 BOX に慣れさせ、ペレットを覚えさせるために行い、マウスをチャンバーに入れて三つのスロット (右・左・中央) の前に多めにペレットを置き、経過を観察した。Pre-training 終了後、翌日に利き手決定を行なった。三つのスリットにペレットを置き、マウスが伸ばした方の手を記録した。先に 20 回伸ばした方を利き手と定義した。利き手決定後、2 週間にわたり連日トレーニングを行い、終了後、脳損傷前のデータ (4 段階。評価の詳細については後述) を記録したのち、頭部外傷を行った。その後脳損傷したマウスに対し、損傷後 1 週間から 6 週間まで 1 週間に一度の運動機能の評価を行った。評価基準は以下の 4 通りとした。

success: ペレットを落とさずに口まで運ぶ

drop: ペレットを掴むが途中で落とす

no grasp: 狙いは正確だが掴むことはできない

miss: 空振り

また、中枢神経損傷後、DMSO (溶媒コントロール)、または HDAC 阻害剤を投与したマウスで、BMS, Beam test, ladder walk test による運動機能の評価を行った。BMS では、オープンフィールド内でマウス後肢の運動を 2 分間観察し、BMS スコアに従って評価した。ladder walk test は、マウスに梯子を渡らせ、その際に、利き手側の上肢の ladder を踏み外す回数をカウントするテストである。この実験により、上肢運動機能障害を誘導する脳損傷モデルが作成できているか、評価した。1 匹あたり 3 回 ladder を渡らせ、drop 数にはその平均を用いた。また、ladder に慣らすため、頭部外傷前日、各マウスに ladder を渡らせ、健常時の運動機能の評価した。頭部外傷を行い、その後、1 週間毎に 6 週間目まで評価した。

## 4. 研究成果

これまでに、中枢神経障害動物モデルや、疾患サンプルを用いた研究から、回路の修復の各ステップに関わる多様な遺伝子の研究が進められてきた。一方で、これらの遺伝子群の発現を修復の時間経過と共に順番に制御する仕組みは未だ不明な部分が多く残されている。そこで本研究では、中枢神経損傷から修復の過程における染色体高次構造の変動に着目し、その解析に取り組んだ。留学による研究中断後、当該研究を再開し、神経障害モデルの解析を進めた。

### (1) 中枢神経障害モデルにおける発現変化の解析

頭部外傷後の class1 HDACs (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) の発現変動を検証した。HDAC2 に関しては、sham と比べて、頭部外傷後 5 週間目で発現が上昇している事が分かった。また、脳由来神経栄養因子の発現変化についても検証した。sham と比べて、頭部外傷後 6 週間目で発現が低下していることが分かった。

### (2) 軸索の伸展、炎症反応の解析

中枢神経損傷後における軸索伸展、シナプス形成効率を評価した。コントロール群と比較して HDAC 阻害剤投与群の頸髄において、軸索数が増加した。また、シナプス数も増加した。

### (3) 薬剤投与による運動機能回復への影響

中枢神経損傷後の DMSO (溶媒コントロール)、または HDAC 阻害剤を投与したマウスで、頭

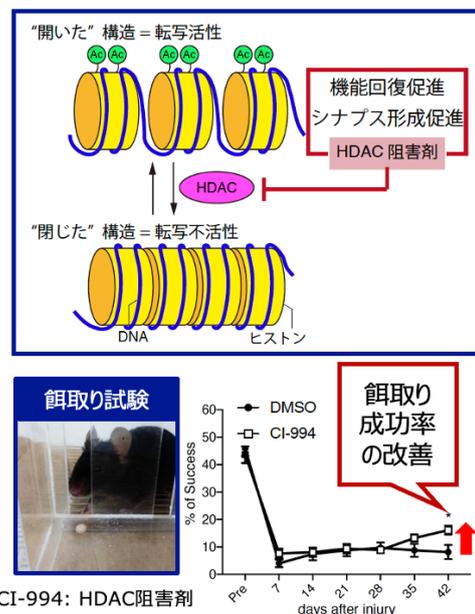


図1. 本研究の成果

HDAC 阻害薬による神経機能回復効果が明らかになった。

部外傷前、day7、day14、day21、day28、day35、day42 のマウスにおける ladder walk テストを行なった。頭部外傷前には、マウスはほぼ踏み外すことなく梯子を渡りきることができる。損傷後 day 7 で、マウスが梯子を踏み外す回数はピークに達し、その後回復していくという経過をたどる。本試験では、コントロール群と HDAC 阻害剤投与群の間で、有意差は検出されなかった。

損傷後のマウスの運動機能回復過程をより詳細に検証するため Reaching test を行なった。この試験では、マウスに小さなペレット状の餌を上肢で取らせるトレーニングを行い、マウス上肢の運動機能を評価した。頭部外傷後には、上肢の機能が低下し、ペレットを落とす回数が増加した (図 1)。中枢神経損傷後の DMSO (溶媒コントロール)、または HDAC 阻害剤を投与したマウスで、損傷前、day7、day14、day21、day28、day35、day42 のマウスにおける reaching テストでの成功率を検証した。HDAC 阻害剤投与群では、control 群と比較して day 42 でペレットを落とす回数が有意に減少した。

以上から、エピジェネティックな制御を介した神経回路修復のメカニズムの一端が明らかになった (引用文献 6: Sada, Fujita et al., 2020, Cell Death Dis)。

#### < 引用文献 >

1. **Fujita, Y.**, Endo, S., Takai, T. and Yamashita, T. (2011) Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. EMBO J. 30, 1389-1401.
2. Nakanishi, T., **Fujita, Y.**, and Yamashita, T. (2019) Neuropilin-1-mediated pruning of corticospinal tract fibers is required for motor recovery after spinal cord injury. Cell Death Dis. 10(2):67.
3. **Fujita, Y.**, Masuda, K., Bando, M., Nakato, R., Katou, Y., Tanaka, T., Nakayama, M., Takao, K., Miyakawa, T., Tanaka, T., Ago, Y., Hashimoto, H., Shirahige, K., and Yamashita, T. (2017) Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. J Exp Med. 214(5):1431-1452.
4. **Fujita, Y.**, Sato, A. and Yamashita, T. (2013) Brimonidine promotes axon growth after optic nerve injury through Erk phosphorylation. Cell Death Dis. 4, e763.
5. Zhang, S., **Fujita, Y.\* (\*Co-corresponding author)**, Matsuzaki, R., and Yamashita, T.\* (2018) Class I histone deacetylase (HDAC) inhibitor CI-994 promotes functional recovery following spinal cord injury. Cell Death Dis. 9(5):460.
6. Sada, N<sup>#</sup>, **Fujita, Y.<sup>#\*</sup> (#Equal contribution, \*Co-corresponding author)**, Mizuta, N., Furukawa, T., and Yamashita, T.\* (2020) Inhibition of HDAC increases BDNF expression and promotes neuronal rewiring and functional recovery after brain injury. Cell Death Dis. 11(8): 655.

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 Fujita Yuki, Yamashita Toshihide	4. 巻 8
2. 論文標題 Alterations in Chromatin Structure and Function in the Microglia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 626541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.626541	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 藤田幸、山下俊英
2. 発表標題 中枢神経回路形成における染色体接着因子コヒーシンの機能解析
3. 学会等名 第95回 日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------