

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18381

研究課題名（和文）mRNA医薬による脳梗塞後遺症機能再生-皮質機能局在可塑性の強制発現-

研究課題名（英文）Functional regeneration after ischemic stroke with mRNA therapy: Enhancement of cortical plasticity

研究代表者

福島 雄大（Fukushima, Yuta）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：40837895

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）：mRNA医薬による神経機能再生治療を開発するための基礎研究として、脳梗塞による神経機能後遺症に対するリハビリテーションの効果が発症後早期に限られる点に着目し、以下の研究成果を得た。

ラット運動野皮質梗塞モデルを作成し、運動機能リハビリテーションの早期開始群と慢性期開始群を比較したところ、機能改善に大きな差が認められ、ヒト臨床像を反映する良好な動物モデルを確立した。当モデルにおいて、astrocyteが脳梗塞慢性期の機能再生阻害に関与するデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、長く待ち望まれる神経再生医療にmRNA医薬を応用することで革新的な治療法開発を目指す、その端緒を開くものである。mRNA医薬は、タンパク質を、生理的に、生体内で産生することが可能であるが、これは生体に潜在する能力を一時的に増強し、医療に応用できることを意味する。本研究で運動機能リハビリテーションの臨床像を反映する動物モデルを確立できたことは、神経再生医療を実現し社会に大きく還元するための礎を築いたものであると考える。

研究成果の概要（英文）：The animal model that mimics the difference between the early and late rehabilitation in human ischemic stroke patients well was established. It was elucidated that astrocytes were related to the obstruction of functional improvement with late rehabilitation in the model. These findings support the future application of mRNA therapeutics to functional regeneration therapy after ischemic stroke.

研究分野：虚血性中枢神経疾患、神経科学、mRNA医薬、DDS

キーワード：脳梗塞 mRNA医薬 神経再生 アストロサイト リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は、ただ一度発症するだけで生涯にわたり神経学的機能障害を後遺する。この神経学的後遺症に対する有効性が示されている唯一の治療法は、患者本人によるリハビリテーションである。しかし、長い時間をかけて行われるリハビリテーションの結果、発症前の機能を全て取り戻せるわけではない。

脳梗塞による損傷を受けた梗塞巣周囲の脳皮質は、一部でその機能局在が変化し、いわゆる“機能代償野”として機能改善に寄与することが知られており、これはリハビリテーションのメカニズムの一つとされる。近年、この『脳皮質機能局在の可塑性』には深淵な可能性が潜在することが明らかとなっている。後天的に視力機能を喪失した人の中に、長年の訓練によりエコーロケーション(自らの舌打ちクリック音の反響音による外界知覚)による近傍の障害物までの距離やその性状を正確に把握する能力を獲得する人が存在することが知られるようになり、このメカニズムとして、通常であれば視覚中枢としての機能局在を有する後頭葉が、エコーロケーションの機能中枢となることが示されている。これはヒト中枢神経系において、皮質機能局在の可塑性が驚くべき柔軟な適応力を内在することを明確に示す事例である。しかし、この驚くべき柔軟な適応力が脳梗塞後の患者で十分に発揮されることはない。

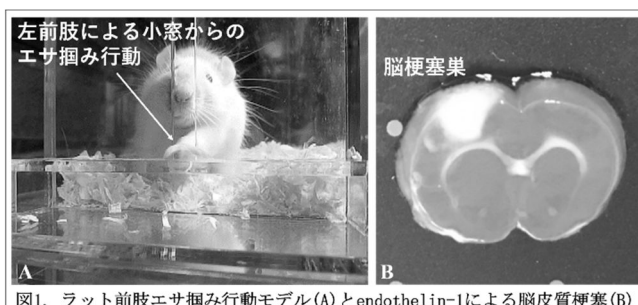
2. 研究の目的

脳梗塞後のリハビリテーションによる機能改善は、発症後早期に開始することでより高い効果が得られるが、時間の経過とともにその改善効果が減弱する。つまり、脳梗塞発症後の時間経過により、脳皮質機能局在の可塑性を制限するメカニズムが働くことが予測される。そこで、脳梗塞モデル動物を作成し、発症後早期と慢性期の梗塞巣周囲皮質を比較解析することで、この脳皮質機能局在の可塑性を制限するメカニズムを明らかにし、更にこの解析結果に基づいて、当研究室独自の技術であるナノミセル型キャリアを用いた mRNA 医薬による治療法開発を行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

3 - 1. 脳梗塞機能代償野解析に用いるモデル動物の確立

本研究では、モデル動物における再現性の高い脳梗塞巣作成と、生じた機能障害に対するリハビリテーション、更にその機能代償野の解析が必要となる。この目的を満たすモデル動物として、ラット運動野皮質梗塞発症後前肢エサ掴み行動リハビリテーションモデルの確立を目指した。これは、小窓の外に置かれたエサを、前肢を伸ばし獲得する行動を予め習熟させた後(図 1A)、血管収縮薬 endothelin-1 を運動野皮質に投与することで脳梗塞を発症させ(図 1B) 前肢エサ掴み行動に対する機能障害を生じさせる。リハビリテーションとして前肢エサ掴み行動を継続して行い、エサ獲得の成功確率を指標としてリハビリテーションによる機能改善を評価する。



3 - 2. 血管収縮薬 endothelin-1 によるラット脳皮質梗塞巣の免疫組織染色解析

血管収縮薬 endothelin-1 により皮質脳梗塞を発症させた脳サンプルを用いて、各中枢神経系細胞標識抗体による免疫組織染色を行う。同モデルの脳梗塞巣で形成されるグリア瘢痕(グリア細胞が形成する脳梗塞巣の瘢痕組織)の経時変化や、梗塞巣を形成する各中枢神経系細胞の挙動を解析する。

3 - 3. ラット脳皮質梗塞巣におけるグリア細胞の反応性変化に関わる遺伝子発現変動解析

血管収縮薬 endothelin-1 により皮質脳梗塞を発症させた脳組織から抽出した RNA サンプルを用いて、RT-PCR 法による遺伝子発現変動解析を行う。

4 . 研究成果

4 - 1 . ラット運動野皮質梗塞発症後前肢エサ掴み行動リハビリテーションモデルの作成

前肢エサ掴み行動は、1 ヶ月間の訓練により 70%程度の成功確率が得られるまでの習熟が認められた。この個体を用いて血管収縮薬 endothelin-1 による運動野皮質梗塞を発症させたところ、発症翌日には前肢によるエサ掴みが全く成功しなくなる運動機能障害が確認された。尚、このような運動機能障害をもたらす脳梗塞を高い再現性で発症させるためには、正確な前肢運動中枢の同定が必須であるが、本研究では 35 極剣山電極を用いた皮質電気刺激により前肢運動野局在の同定を行った。

当モデルにおいて脳梗塞発症翌日から前肢エサ掴み行動リハビリテーションを開始した個体では、3 週間程のリハビリテーションにより、発症前の 80%程度までエサ掴み行動の機能改善が得られることが分かった。一方で、脳梗塞発症 1 ヶ月後よりリハビリテーションを開始した個体では、8 週間の継続的なリハビリテーションを行っても、発症前の 30%程度の機能改善に留まる結果が得られた。この結果は、ヒト臨床における脳梗塞発症後早期リハビリテーションの優位性と相関する良好な動物モデルが得られたことを示すものである。

4 - 2 . ラット脳皮質梗塞モデルにおけるグリア瘢痕の免疫組織染色解析

エサ掴み行動リハビリテーションの結果を踏まえ、梗塞巣のグリア瘢痕を形成する主要な細胞種である astrocyte と microglia に特に着目し、免疫組織染色による解析を行った。Microglia は脳梗塞発症後早期に高い反応性変化と梗塞巣への集簇を示す傾向にあった。一方、astrocyte では、反応性変化と梗塞巣への集簇がやや遅れて認められ、さらにその傾向が長期に遷延することを示す結果が得られた。

4 - 3 . ラット脳皮質梗塞巣におけるグリア細胞の反応性変化の定量解析

皮質脳梗塞を発症させた脳サンプルを用いて、RT-PCR 法によるグリア細胞の反応性変化を定量した。Microglia の反応性変化の指標とされる AIF-1 (Iba-1) は脳梗塞発症後 1 週間に上昇のピークが認められたが、astrocyte 反応性変化の指標である GFAP は発症 8 週間後においてもその上昇が持続する結果が得られた。これらの結果は、astrocyte が、脳梗塞発症後の時間経過により脳皮質機能局在の可塑性を制限するメカニズム形成に強く関与することを示唆するデータであるといえる。

4 - 4 . ナノミセルを用いた mRNA 導入による神経細胞死に対する神経保護

研究代表者の前採択課題である日本学術振興会特別研究員 DC2 研究課題 (16J04127) 「ナノミセルを用いた mRNA 導入による神経細胞死に対する神経保護」では、研究室独自の技術であるナノミセル型キャリアによる mRNA 医薬を用いて、脳由来神経栄養因子 (BDNF) mRNA による、虚血性神経細胞死モデルに対する神経保護治療効果を検証し、有望な神経保護薬となりうることを報告しているが、投与した BDNF mRNA を発現する細胞が astrocyte であることを詳細に追加検証し、Biomaterials 誌 (2021 年) に論文発表した。

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 1件）

1. 著者名 Crowley Samuel T., Fukushima Yuta, Uchida Satoshi, Kataoka Kazunori, Itaka Keiji	4. 巻 17
2. 論文標題 Enhancement of Motor Function Recovery after Spinal Cord Injury in Mice by Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 465 ~ 476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2019.06.016	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 -

1. 著者名 Fukushima Yuta, Uchida Satoshi, Imai Hideaki, Nakatomi Hirofumi, Kataoka Kazunori, Saito Nobuhito, Itaka Keiji	4. 巻 270
2. 論文標題 Treatment of ischemic neuronal death by introducing brain-derived neurotrophic factor mRNA using polyplex nanomicelle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120681 ~ 120681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2021.120681	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 3件）

1. 発表者名 Fukushima Y, Uchida S, Kataoka K, Itaka K.
2. 発表標題 mRNA therapeutics for ischemic neuronal death: Intraventricular administration of BDNF mRNA using polyplex nanomicelles.
3. 学会等名 19th Symposium for Gene Design and Delivery. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島 雄大, 内田 智士, 片岡 一則, 位高 啓史.
2. 発表標題 mRNA医薬の脳神経保護薬への展開: BDNF mRNAのナノミセルによる脳室内投与
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukushima Y, Uchida S, Kataoka K, Itaka K.
2. 発表標題 BDNF mRNA therapeutics for ischemic neuronal death.
3. 学会等名 7th International mRNA Health Conference. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福島 雄大, 位高 啓史.
2. 発表標題 mRNA医薬による虚血性中枢神経疾患神経保護治療
3. 学会等名 第4回日本遺伝子細胞治療学会若手研究会セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukushima Y, Crowley TS, Itaka K.
2. 発表標題 BDNF-expressing mRNA medicine for central nervous system disorders.
3. 学会等名 第6回COINSシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukushima Y, Itaka K.
2. 発表標題 Intraventricular BDNF mRNA administration prevents ischemic neuronal death with the uptake predominantly by astrocytes.
3. 学会等名 8th International mRNA Health Conference (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------