

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16231

研究課題名（和文）脳梗塞におけるミクログリアの神経修復能獲得機構の解明

研究課題名（英文）Identification of the mechanism governing microglial acquisition of reparative function in ischemic stroke

研究代表者

津山 淳（Tsuyama, Jun）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20760101

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）：脳梗塞後の脳組織においてミクログリアは脳梗塞後に応答して劇的な遺伝子発現の変化を伴う。本研究においては、インスリン様成長因子（Igf1）などの神経栄養因子を発現する特定のミクログリア集団が機能回復において重要な役割を持つことを見出した。またエンハンサー解析から修復終了時に働く因子を同定し、その阻害剤を開発した。本研究では、修復を終わらせず持続させることによって脳梗塞後の神経症状を改善させるというこれまでにない治療法を確率させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中は本邦における主な死因、寝たきりの原因を占めており、健康寿命の延伸を阻害する要因となっている。脳卒中の約7～8割を占める脳梗塞では、発症後の約半年間は神経機能に改善が見られるが、それ以降は機能回復がほとんど見られなくなる。本研究においては脳機能回復をもたらす修復性ミクログリア集団を同定し、それらをより長期間に渡って脳内に存在させることに成功している。脳梗塞後に修復性ミクログリアを脳梗塞後により長期間維持することができれば、脳梗塞後の機能回復の促進と延長をもたらすことが可能となる。すなわち、機能回復を諦めない画期的な治療法の確立につながる意義を持つ研究である。

研究成果の概要（英文）：Following ischemic stroke, microglia in the brain tissue undergo dramatic changes in gene expression. This study identified specific microglial populations expressing neurotrophic factors, such as insulin-like growth factor 1 (IGF1), which play a crucial role in functional recovery. Through enhancer analysis, we identified a transcription factor crucial for terminating the repair process in microglia and developed an antisense oligonucleotide (ASO) inhibitor targeting this factor. This research has established a novel therapeutic approach that improves neurological symptoms following ischemic stroke by prolonging the repair phase.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：脳梗塞 ミクログリア エピジェネティクス アンチセンスオリゴ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脳にも修復メカニズムが備わっていると考えられるようになってきているが、その分子機構については未だに謎が多い。ミクログリアや末梢由来マクロファージは、壊死した細胞から放出されたダメージ分子関連パターン (DAMPs) に活性されることで炎症を引き起こし、脳梗塞後の二次的な細胞死を誘導する (Shichita et al., *Nat Med*, 2012)。一方で、脳梗塞亜急性期以降では、炎症を収束させ、神経栄養因子を放出する修復性のミクログリアおよびマクロファージが脳内に現われる (Shichita et al., *Nat Med*, 2017; Tsuyama et al., *Semin Immunopathol*, 2018)。そのような修復性細胞の出現に伴い、炎症の収束や神経回路の再編が起こり、徐々に神経機能の回復が見られるようになる。実際に、脳梗塞後にミクログリアを選択的に除去すると、神経栄養因子である Insulin like growth factor 1 (Igf1) の脳内での発現量が低下し、予後が低下することが知られている (Lalancette-Hébert M et al., *J Neurosci*, 2007)。しかしながら、脳梗塞のような虚血障害後の脳において、修復性のミクログリア/マクロファージが誘導される機構についてはほとんど明らかになっていない。しかしながら、修復性ミクログリアが脳組織内で誘導される機構および、どのような機構で修復が終了されるのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳梗塞後のミクログリアにおいて神経修復能を規定している因子を同定し、脳梗塞治療へ応用することである。

3. 研究の方法

(1) 我々は中大脳動脈背側による脳虚血後に *Igf1* を発現するミクログリアサブpopulationに着目し、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、*Igf1-IRE5-CreER* マウスを開発し、それらを iDTR マウスとかけ合わせることで *Igf1* 発現細胞を脳梗塞後の組織内から除去し、脳梗塞後の機能回復に与える影響を検討した。また *Igf1-EGFP* マウスを用いて *Igf1* 発現ミクログリアに特徴的な修復期関連遺伝子群を同定した。

(2) 脳梗塞後 1,6,14,28 日後の脳組織よりミクログリアを Fluorescence-activated cell sorting (FACS) により単離し、Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC)-seq により脳梗塞後ミクログリアのステージ依存的なクロマチンアクセシビリティ領域と各ステージにおいて働いていると思われる主要な転写因子群を同定した。また、修復終了期に働いていると思われた転写因子を *Igf1* の発現が常に活性しているミクログリア細胞株の BV2 に過剰発現させることで *Igf1* の発現を抑制可能な因子の探索を行った。

(3) 修復終了因子の flox マウスを CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により開発し、脳梗塞後にミクログリア特異的にノックアウトすることで脳梗塞後の神経症状回復に効果があるかを調べた。

(4) 修復終了因子の阻害剤を開発し、脳梗塞後マウスに投与し、脳梗塞後の神経症状に与える影響を検討した。また投与後に全脳細胞を用いた 1 細胞 RNA-seq を行い、修復終了阻害剤が脳細胞に与えている効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 脳梗塞後にタモキシフェンの腹腔内投与およびジフテリア毒素の脳室内投与によって *Igf1* 発現細胞を脳組織内から除去することにより脳梗塞マウスの神経症状が悪化すること

が示された。これらの結果から *Igf1* 発現ミクログリアは脳梗塞後の機能回復に寄与する修復性の細胞であることが示された。また、*Igf1*-EGFP レポーターマウスの解析結果から *Igf1* 発現ミクログリアは脳梗塞後 6—14 日後にその数がピークを示し、脳梗塞後 28 日目にかけて失われていくことが明らかとなった。また、脳梗塞後の *Igf1* 発現ミクログリアに特徴的な 391 遺伝子を修復機関連遺伝子と定義した。これらの修復機関連遺伝子は神経形成や血管形成に関わる遺伝子が濃縮されており、脳梗塞後 14 日目までは高発現しているが、28 日目にかけてその発現が失われていくことを見出した。

(2) ATAC-seq の結果からミクログリアは脳梗塞により 1000 ヶ所以上の新規クロマチンアクセシビリティ領域が誘導されることが明らかとなった。また修復期関連遺伝子群の発現の終了が見られる脳梗塞 14 日目から 28 日目にかけて新たに出現するクロマチンアクセシビリティ領域が存在することを見出した。これら修復後期に出現するクロマチンアクセシビリティ領域に濃縮されている転写因子結合配列をモチーフ解析によって同定し、修復終了遺伝子候補 (RTG) を BV2 に過剰発現させたところ RTG-4 が *Igf1* の発現を強く抑制することが明らかとなった。この RTG-4 がミクログリアの修復能を脳梗塞後に失わしている遺伝子である可能性が示された。

(3) RTG-4 flox/flox マウスと Cx3cr1-CreER マウスを掛け合わせ、脳梗塞後にタモキシフェンを投与し、神経症状および遺伝子発現解析を実施した。その結果、RTG-4 cKO マウス群ではコントロール群と比べ、脳梗塞後の神経症状が有意に改善していることを見出した。また、遺伝子発現解析の結果、脳梗塞後 28 日目の時点においてもミクログリアの修復機関連遺伝子群の発現が持続していることが示された。

(4) RTG-4 の発現を阻害剤が開発されれば、脳梗塞の新たな治療薬として応用可能性があると考え、アンチセンスオリゴによる RTG-4 阻害薬の開発を行った。その結果、RTG-4 の抑制が可能なアンチセンスオリゴを取得することに成功した。RTG-4 阻害薬を脳梗塞後のマウスに脳室内投与したところ、脳梗塞後の神経症状の著しい改善が見られた (図 1)。また、1 細胞 RNA-seq の結果、脳梗塞後 28 日目においては RTG-4 阻害薬投与群由来のミクログリアにおいては修復機関連遺伝子の発現が持続しており、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトにおいて神経系の発生、修復に関わる遺伝子群の発現が上昇していることが明らかとなった。以上の結果から、修復の終了を阻害するという新規戦略により、これまででない脳梗塞治療法の開発につながりうる成果を得ることができた。

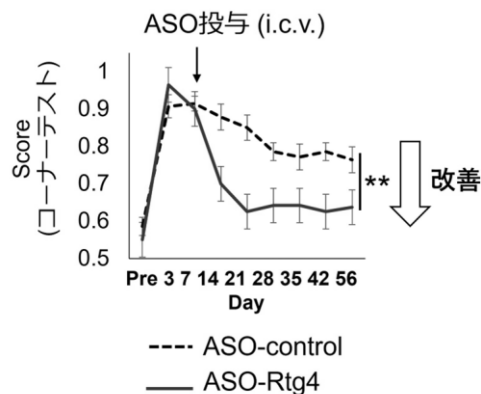


図 1. 脳損傷後 8 日目における ASO-Rtg4 の脳室内投与は神経機能予後を改善した。

5. 主な発表論文など

[雑誌論文]

Sustaining microglial reparative function enhances stroke recovery

Jun Tsuyama, Seiichiro Sakai, Kumiko Kurabayashi, Ryuki Koyama, Yuichiro Hara, Ito Kawakami, Hideya Kawaji, Takashi Shichita

2024 年 4 月 13 日 査読なし

PLA2G2E-mediated lipid metabolism triggers brain-autonomous neural repair after ischemic stroke

Akari Nakamura, Seiichiro Sakai, Yoshitaka Taketomi, Jun Tsuyama, Yoshimi Miki, Yuichiro Hara, Nobutaka Arai, Yuki Sugiura, Hideya Kawaji, Makoto Murakami, Takashi Shichita

Neuron 111(19) 2995-3010.e9 2023 年 7 月 査読有り

Extracellular DJ-1 induces sterile inflammation in the ischemic brain

Koutarou Nakamura, Seiichiro Sakai, Jun Tsuyama, Akari Nakamura, Kento Otani, Kumiko Kurabayashi, Yoshiko Yogiashi, Hisao Masai, Takashi Shichita

PLOS Biology 19(5) e3000939-e3000939 2021 年 5 月 20 日 査読有り

脳梗塞後の炎症と修復における免疫細胞の役割

津山淳, 七田崇

炎症と免疫 31 巻 3 号 査読有り

ミクログリアによる 機能回復を持 させる治療法の開発

津山 淳

第 66 回日本脳循環代謝学会学術集会 口頭発表（招待講演）, 2023 年 11 月

Role of innate myeloid cells in functional recovery after ischemic stroke

津山 淳, 七田 崇

第 51 回日本免疫学会学術集会 査読有り ポスター発表

[特許]

脳損傷の治療用の医薬組成物

特願 2023-44551, 津山淳, 七田崇

2023 年 3 月 27 日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 津山 淳, 七田 崇 | 4. 巻 Vol.31 No.3 |
| 2. 論文標題 脳梗塞後の炎症と修復における免疫細胞の役割 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 炎症と免疫 | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| 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 Koutarou Nakamura, Seiichiro Sakai, Jun Tsuyama, Akari Nakamura, Kento Otani, Kumiko Kurabayashi, Yoshiko Yogiashi, Hisao Masai, Takashi Shichita | 4. 巻 19(5) |
| 2. 論文標題 Extracellular DJ-1 induces sterile inflammation in the ischemic brain | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLOS BIOLOGY | 6. 最初と最後の頁 e3000939 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3000939 | 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 Nakamura K, Sakai S, Tsuyama J, Nakamura A, Otani K, Kurabayashi K, Yogiashi Y, Masai H, Shichita T | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Extracellular DJ-1 induces sterile inflammation in the ischemic brain | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.09.16.299420 | 査読の有無 無 |
| 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 津山 淳, 七田 崇 |
| 2. 発表標題 Role of innate myeloid cells in functional recovery after ischemic stroke. |
| 3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|