

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16496

研究課題名(和文)アストロサイトによる神経回路修復制御機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of regulatory mechanisms of neural circuit repair by astrocyte

研究代表者

辻岡 洋(Tsujioka, Hiroshi)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20803505

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)：哺乳類の中枢神経系の損傷後には、代償的な神経回路が形成されることで部分的な機能回復が見られる。神経回路修復能は新生児の方が成体よりも高い。申請者はこれまで、マウス延髄錐体切断後に新生児と成体でアストロサイトに関連する遺伝子等の発現が異なることを発見した。本研究では、候補遺伝子の解析を中心に、アストロサイトと神経回路修復の関係を調べた。モノクローナル抗体の作製やノックアウトマウスを用いた解析、データベースを用いた解析等により、候補遺伝子は神経回路修復に関与する可能性のある、従来にはない特徴を持った新規アストロサイトマーカーとして有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アストロサイトと神経回路可塑性の関係は、視覚野の発生の研究等で近年着目されており、特異的なマーカー等、より詳細な解析を進めるために必要な基盤の開発が求められている。本研究では、候補遺伝子が神経回路可塑性に関与するアストロサイトのマーカーとなり得ることを発見し、解析に重要なツールを開発した。本研究で開発したツールはアストロサイトと神経回路可塑性の関係を解明するためのブレークスルーにつながる可能性がある。また、本研究を基盤としてアストロサイトと神経回路修復の関係の研究が進めば、将来的に、中枢神経系損傷の新規治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：After central nervous system injury, neural function is partially recovered by formation of compensatory neural circuit in mammals. The ability to form compensatory neural circuit is higher in neonate compared to adult. We previously found that astrocyte-related genes are differentially expressed between neonatal mice and adult mice after corticospinal tract injury by pyramidotomy. Here we investigated relationship between astrocyte and neural circuit repair focusing on analysis of candidate we found in the previous study. We created monoclonal antibodies against the candidate. By combining analyses using the antibodies, knock out mice we created, and dataset downloaded from database, the candidate is suggested to be useful as a novel unique astrocytic marker, which might be related to neural circuit repair.

研究分野：神経病態科学

キーワード：アストロサイト 神経回路修復

1. 研究開始当初の背景

哺乳類では中枢神経系損傷後に神経回路の再構築により、部分的な機能回復が見られる。例えばマウス延髄錐体切断後には非損傷側の皮質脊髄路から除神経側の脊髄固有ニューロンへと新たな軸索が伸長することで代償的な神経回路が形成され、麻痺が部分的に回復する。上記能力は新生児の方が成体より高い。神経回路修復の分子機構及び週齢による軸索伸長能の差を規定する要因を解明することは、新規中枢神経系治療法開発につながる可能性があり、重要である。

これまで申請者はマウス延髄錐体切断モデルを用い、頸髄の遺伝子発現プロファイルを成体と新生児で比較した。その結果、両者でミクログリアやアストロサイトに関わる遺伝子の発現が大きく異なっていた。アストロサイトが神経回路の再構築を制御する可能性はこれまでも指摘されてきたが、詳しい分子機構に関してはよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

申請者は上記遺伝子発現プロファイリングの結果から、候補遺伝子がアストロサイトによる神経回路の再構築の制御に関与する可能性を考えた。本研究では、候補遺伝子の解析を中心に、アストロサイトと神経回路修復の関係を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

単純化した系で候補遺伝子の解析を行うため、アストロサイトの培養細胞を用いた解析を行った。

生体での候補遺伝子の機能を解析するため、アデノ随伴ウイルスベクターによる発現系の検討や、ノックアウトマウスを用いた解析を行った。ノックアウトマウスを用いた解析では、軸索トレーサーを用いた軸索発芽の評価や、行動実験による機能回復による評価を行い、神経損傷後の神経回路修復に与える影響を調べた。

候補遺伝子のより詳細な解析を行うため、モノクローナル抗体を作製し、解析を進めた。

他のモデルでの候補遺伝子の関与を調べるため、データベースのトランスクリプトームデータを用いた再解析を行った。

より神経回路修復が顕著なモデルとして、小型魚類の脊髄再生時のアストロサイトの挙動についても調べた。

4. 研究成果

アストロサイトの初代培養細胞や細胞株では候補遺伝子の発現が大きく低下し、候補遺伝子の発現には培養系で再現できていない要素が必要であることが示唆された。アデノ随伴ウイルスの感染によっても候補遺伝子の発現は大きく低下した。また、データベースの解析でも候補遺伝子の発現は神経系損傷後に低下しており、候補遺伝子の発現は損傷と関連して制御されることが示唆された。

ノックアウトマウスを用いた解析では、神経損傷後の軸索発芽や機能回復が変化する傾向が

見られた。更に詳細に候補遺伝子の解析を行うため、候補遺伝子のモノクローナル抗体の候補を95クローンから選別し(図)、免疫組織化学、ウェスタンブロッティング、免疫沈降に利用可能な高品質なモノクローナル抗体が得られた。解析を進めた結果、候補遺伝子は特徴的な発現パターンを示し、従来にはない特徴を持つ新規アストロサイトマーカーとして使用できることが示唆された。

小型魚類を用いた解析では、特定条件下で小型魚類の脊髄再生能が異なり、アストロサイトの反応も異なることを発見した。

クローン	免疫組織化学	ウェスタンブロッティング	免疫沈降
1	-	-	n.a.
2	-	-	n.a.
3	-	-	n.a.
4	-	-	n.a.
5	-	-	n.a.
6	-	-	n.a.
7	++	-	+
8	-	-	n.a.
9	-	-	n.a.
10	-	-	n.a.
11	-	-	n.a.
12	-	-	n.a.
13	-	-	n.a.
14	++	-	+
15	-	-	n.a.
16	-	-	n.a.
17	-	-	n.a.
18	+	-	+
19	-	-	n.a.
20	+	-	+
21	+	-	+
22	-	-	n.a.
23	-	-	n.a.
24	+	-	+
25	-	-	n.a.
26	-	-	n.a.
27	-	-	n.a.
28	-	-	n.a.
29	++	-	++
30	+	-	++
31	-	-	n.a.
32	-	-	n.a.
33	-	-	n.a.
34	-	-	n.a.
35	-	-	n.a.
36	-	-	n.a.
37	-	-	n.a.
38	-	-	n.a.
39	-	-	n.a.
40	-	-	n.a.
41	-	-	n.a.
42	-	-	n.a.
43	+	-	+
44	-	-	n.a.
45	-	-	n.a.
46	++	-	++
47	+	-	++
48	-	-	n.a.
49	-	-	n.a.
50	++	-	+++
51	-	-	n.a.
52	+	-	+
53	-	-	n.a.
54	-	-	n.a.
54A	-	-	n.a.
54B	-	-	+
54C	-	-	+
54A1	-	-	+
54A2	-	-	+
54A3	-	-	+
55	-	-	n.a.
56	-	-	n.a.
57	+	-	+
58	-	n.a.	n.a.
59	-	-	n.a.
60	-	-	n.a.
61	-	-	n.a.
62	-	-	n.a.
63	++	+	+++
64	-	-	n.a.
65	-	-	n.a.
66	-	-	n.a.
67	-	-	n.a.
68	-	-	n.a.
69	-	-	n.a.
70	-	-	n.a.
71	-	-	n.a.
72	-	-	n.a.
73	-	-	n.a.
74	+	-	+
75	-	-	n.a.
76	+	-	++
77	-	-	n.a.
78	-	-	n.a.
79	-	-	n.a.
80	-	-	n.a.
81	-	-	n.a.
82	-	-	n.a.
83	-	-	n.a.
84	+	-	+++
85	-	-	n.a.
86	-	-	n.a.
87	-	-	n.a.
88	-	-	n.a.
89	-	-	n.a.
90	-	-	n.a.
91	-	-	n.a.
92	-	-	n.a.
93	-	-	n.a.
94	+	++	++
95	-	-	n.a.

図 候補遺伝子のモノクローナル抗体の選別 免疫組織化学に適した#63, ウェスタンブロッティングに適した#94, 免疫沈降に適した#50 を選別した。

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 Tsujioka Hiroshi, Yamashita Toshihide	4. 巻 33
2. 論文標題 Neural circuit repair after central nervous system injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 301-309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa077	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 依藤依代、辻岡洋、坂田泰史、山下俊英
2. 発表標題 単一核RNAシーケンスを用いた成体と新生児で異なる脊髄損傷後の修復機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻岡洋、山下俊英
2. 発表標題 延髄錐体切断後の新生児と成体の遺伝子発現プロファイルの比較
3. 学会等名 第96回 日本解剖学会近畿支部学術集会
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
---------	---------