

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05096

研究課題名（和文）脳梗塞を治癒に導く修復開始因子の同定

研究課題名（英文）Identification of the molecule initiating neural repair after ischemic stroke

研究代表者

七田 崇 (SHICHITA, Takashi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：00598443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳卒中は本邦における寝たきり、死亡の主な原因であり、まだ十分な治療法が確立していない。脳卒中の約7～8割を脳梗塞が占めており、脳梗塞における神経修復の詳細な分子メカニズムを解明することによって、脳卒中に対する新たな治療剤の開発を目指した。本研究では、脳梗塞組織における炎症と修復を制御する内在性の脳内因子を探索した。脳組織における新規の炎症惹起因子としてDJ-1タンパク質の同定に成功し、このような脳内因子を治療標的として、脳梗塞に対する治療薬開発が可能であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中は本邦や先進国における主な死因、寝たきりの原因となっている。有効な治療薬の開発によって、脳卒中を起こした場合でも回復が見込めるような次世代の医療を創り出す必要がある。我々は本研究において、脳梗塞後の炎症を惹起させる新規の脳内因子の同定に成功し、このような因子を治療標的として、新たな脳卒中治療薬の開発が可能となることを証明した。さらに詳細な分子メカニズムの解明により新たな治療剤開発につなげ、次世代に脳卒中医療を創り出したいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Stroke is one of the common diseases which causes the disability and death, whereas therapeutic methods for stroke have not been sufficiently established. In this study, we tried to clarify the molecular and cellular mechanisms underlying sterile inflammation and neural repair after ischemic stroke. We focused on the endogenous brain factors to initiate the inflammation or neural repair. We successfully identified these molecules and next tried to develop therapeutic drugs.

研究分野：内科学

キーワード：脳卒中 炎症 神経修復

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は寝たきりの原因の第1位、死因の第4位であり、脳卒中の総患者数(150~200万人)は悪性新生物や心血管疾患に並ぶほど多いと考えられている。脳卒中は認知症を進行させ、患者の社会復帰に大きな支障となり、健康寿命を損なう主要因の1つである。脳卒中に対する治療法はまだ十分に確立されていない。高齢化社会を迎えた本邦において脳卒中患者は今後も増加すると考えられ、医療経済を逼迫させる主要因となることから緊急的に対策が必要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、脳卒中の8割弱を占める脳梗塞において、梗塞後の脳における治療標的となる分子を探索する。脳卒中の約7~8割を脳梗塞が占めており、脳梗塞の病態における詳細な分子メカニズムを解明することによって、新たな治療剤の開発を目指す。

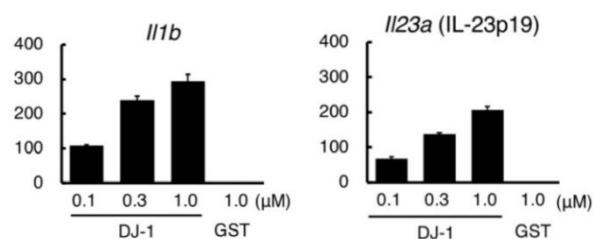
3. 研究の方法

脳組織の抽出液を作製し、生化学的に分画して免疫細胞やグリア・神経細胞に添加することによって炎症や修復に関わる活性を持つ画分を同定する。このような画分を質量分析によって解析し、得られた候補分子の中から活性分子を決定し、脳梗塞の病態における役割を解析する。病態解析においては、脳虚血モデルマウスを作製して脳梗塞体積や神経症状を評価する。脳内炎症、修復の程度をFACS、mRNA定量解析、免疫組織染色などの解析法によって解析し、脳梗塞の病態を分子レベルで解明する。

4. 研究成果

脳抽出液をマクロファージやミクログリアに添加すると炎症性サイトカインの産生を誘導することが判明した。一方で、その他のグリア細胞や神経細胞に添加した場合には有意な変化は認められなかった。そこで、脳抽出液をさらに生化学的に画分して炎症を誘導する活性を持つ画分を絞り込んだ。質量分析によってこのような画分を解析した結果、炎症を誘導する活性を持つ画分にはDJ-1タンパク質が含まれることが判明した。

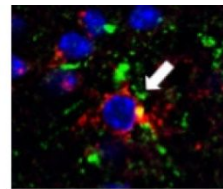
リコンビナント DJ-1 タンパク質をマクロファージに添加すると、IL-1 β やIL-23などの炎症性サイトカインの発現を濃度依存的に強く誘導した。マクロファージを活性化する受容体はパターン認識受容体として知られているが、DJ-1を認識するパターン認識受容



DJ-1タンパク質は、濃度依存的に骨髄由来マクロファージを活性化して炎症性サイトカインの発現を誘導する

体を、HEK293細胞を用いたレポーターアッセイによって検索したところ、Toll様受容体(Toll-like receptor: TLR)のうちTLR2とTLR4が同定できた。TLR2とTLR4の両方を欠損したマクロファージにDJ-1タンパク質を添加すると炎症性サイトカインの産生が認められなくなった。DJ-1タンパク質はTLR2、TLR4を活性化する脳内因子であると考えられた。

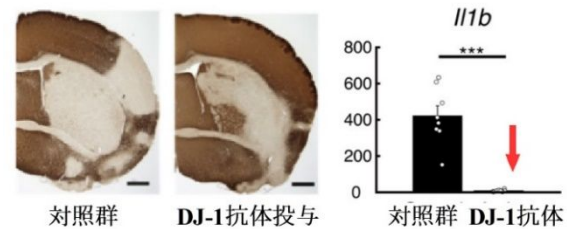
次に、DJ-1 タンパク質を発現する脳内の細胞を免疫組織染色によって調べたところ、脳梗塞の発症に伴って神経細胞が強く DJ-1 タンパク質を発現することが判明した。これらの神経細胞が虚血壊死に陥った脳梗塞巣においては、DJ-1 タンパク質が壊死細胞の周囲において細胞外に放出されていた。細胞外に見られた DJ-1 タンパク質を含む組織の残骸は、脳梗塞巣に浸潤したマクロファージと細胞表面上で接触しており、特に TLR2 と TLR4 と近接して存在することが証明できた。したがって、脳梗塞においては DJ-1 タンパク質が、虚血壊死に陥った神経細胞より放出され、脳内の免疫細胞を活性化して炎症を惹起すると考えられた。



脳梗塞巣ではDJ-1を含む残骸がマクロファージと接して炎症を惹起する

DJ-1 欠損マウスを用いて脳梗塞モデルを作製したところ、脳梗塞体積は変化が認められなかったが、脳組織の炎症の程度が軽減していた。DJ-1 タンパク質は脳細胞内において抗酸化作用を持つことが知られていることから、DJ-1 欠損マウスでは DJ-1 タンパク質の細胞内における抗酸化作用による神経保護効果と、細胞外における炎症を誘導することによる神経毒性とが、相殺されたと考えられた。そこで脳組織における細胞外に放出された DJ-1 タンパク質の役割を調べるため、ウサギを免疫することによって抗 DJ-1 抗体を作製した。

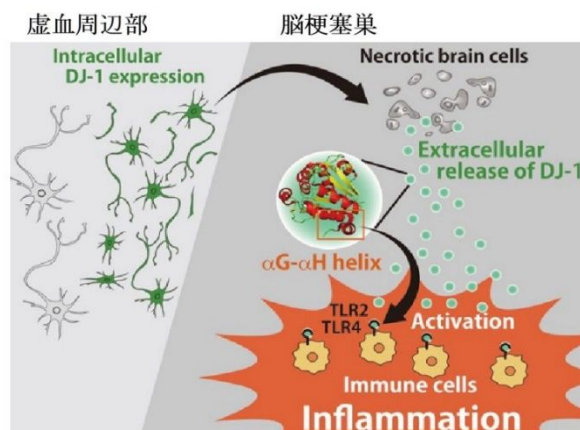
このような抗 DJ-1 抗体を脳購読モデルマウスに投与して、脳組織における炎症や梗塞体積、神経症状を評価した。抗 DJ-1 抗体を投与した脳梗塞モデルマウスでは、脳梗塞後の炎症が軽減しており、脳梗塞体積が縮小して神経症状が改善することが明らかとなった。



DJ-1に対する抗体を投与すると脳梗塞の体積が有意に縮小し、脳梗塞巣における炎症の惹起が抑えられる

DJ-1 タンパク質は、家族性パーキンソン病の原因遺伝子として知られており、神経細胞における活性酸素種を消去することによって神経保護効果を持つと考えられていた。我々の研究成果によって、DJ-1 タンパク質が従来の脳保護効果を持つだけでなく、細胞傷害が起こった場合には細胞外に放出されて炎症惹起因子としての機能を持つことが明らかとなった。

DJ-1 タンパク質の抗酸化作用には 106 番目のシステインが重要な役割を担うが、DJ-1 タンパク質の炎症誘導活性には 160~189 番目のアミノ酸が構成する 2 つの α -helix 構造が重要であった。DJ-1 タンパク質の抗酸化作用を阻害せずに、炎症誘導活性を阻止する薬剤を見出すことによって、脳梗塞の治療剤を開発することが可能であると考えられた。以上のような脳梗塞後の炎症は、組織修復にも重要な役割をもつことが明らかとなりつつある。



DJ-1は虚血周辺部の神経細胞で産生誘導され、抗酸化作用を持つが神経細胞の虚血壊死に伴って細胞外に放出され、周囲の免疫細胞に炎症性因子の産生を誘導することにより脳梗塞後の炎症を惹起する

引用文献

Nakamura K, Sakai S, Tsuyama J, Nakamura A, Otani K, Kurabayashi K, Yogiashi Y, Masai H, Shichita T. Extracellular DJ-1 induces sterile inflammation in the ischemic brain. *PLOS Biol.* 19(5):e3000939 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Nakamura Koutarou, Sakai Seiichiro, Tsuyama Jun, Nakamura Akari, Otani Kento, Kurabayashi Kumiko, Yogiashi Yoshiko, Masai Hisao, Shichita Takashi	4. 巻 19
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 Otani K, Shichita T	4. 巻 40
2. 論文標題 Cerebral sterile inflammation in neurodegenerative diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00137-4	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 A, Otani K, Shichita T	4. 巻 32
2. 論文標題 Lipid mediators and sterile inflammation in ischemic stroke	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Immunol.	6. 最初と最後の頁 719-725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa027	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 Ito Minako, Komai Kyoko, Mise-Omata Setsuko, Iizuka-Koga Mana, Noguchi Yoshiko, Kondo Taisuke, Sakai Ryota, Matsuo Kazuhiko, Nakayama Takashi, Yoshie Osamu, Nakatsukasa Hiroko, Chikuma Shunsuke, Shichita Takashi, Yoshimura Akihiko	4. 巻 565
2. 論文標題 Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 246 ~ 250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-018-0824-5	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 Koutarou, Shichita Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Cellular and molecular mechanisms of sterile inflammation in ischaemic stroke	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	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) 10.1093/jb/mvz017	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 Tsuyama Jun, Nakamura Akari, Ooboshi Hiroaki, Yoshimura Akihiko, Shichita Takashi	4. 巻 40
2. 論文標題 Pivotal role of innate myeloid cells in cerebral post-ischemic sterile inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Seminars in Immunopathology	6. 最初と最後の頁 523 ~ 538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00281-018-0707-8	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 Sakai Seiichiro, Shichita Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Inflammation and neural repair after ischemic brain injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	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) 10.1016/j.neuint.2018.10.013	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 Shichita Takashi, Ito Minako, Morita Rimpei, Komai Kyoko, Noguchi Yoshiko, Ooboshi Hiroaki, Koshida Ryusuke, Takahashi Satoru, Kodama Tatsuhiko, Yoshimura Akihiko	4. 巻 23
2. 論文標題 MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 723 ~ 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nm.4312	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 Komai Kyoko, Shichita Takashi, Ito Minako, Kanamori Mitsuhiro, Chikuma Shunsuke, Yoshimura Akihiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Role of scavenger receptors as damage-associated molecular pattern receptors in Toll-like receptor activation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 59~70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxx010	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16件(うち招待講演 11件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 Damage-associated molecular patterns in ischemic stroke.
3. 学会等名 Brain 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞における炎症の分子・細胞メカニズム
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 The role of innate immunity and lipid metabolism in ischemic stroke.
3. 学会等名 Neuro2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞における炎症と神経修復の関連性について
3. 学会等名 第62回日本脳循環代謝学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 Relationships between cerebral post-ischemic inflammation and neural repair
3. 学会等名 第48回日本免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞における無菌的炎症のメカニズム
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞と炎症 ～炎症は敵か？味方か？～
3. 学会等名 第61回日本神経化学大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shichita T
2. 発表標題 Sterile inflammation in ischemic stroke.
3. 学会等名 Australia-Japan Meeting on Cell Death (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 Sterile inflammation induced by ischemic brain cell death
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 七田 崇、津山淳、酒井誠一郎
2. 発表標題 脳と無菌の炎症
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shichita T, Ooboshi H, Yoshimura A
2. 発表標題 Mafb prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of danger signals through MSR1
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shichita T, Ooboshi H, Takahashi S, Kodama T, Yoshimura A
2. 発表標題 Mafb prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of danger signals through MSR1
3. 学会等名 Brain 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 七田 崇
2. 発表標題 脳梗塞後の炎症とミクログリア・マクロファージ
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 七田 崇、大星博明、吉村昭彦
2. 発表標題 転写因子MafbはMSR1の発現を誘導して炎症惹起因子を排除し、脳梗塞後の炎症を収束させる
3. 学会等名 第60回脳循環代謝学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 七田 崇、吉村昭彦
2. 発表標題 転写因子MafbはMSR1の発現を誘導して炎症惹起因子を排除し、脳梗塞後の炎症を収束させる
3. 学会等名 第60回日本神経化学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Shichita
2. 発表標題 Regulation of cerebral post-ischemic inflammation by DAMPs
3. 学会等名 第40回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所 脳卒中ルネサンスプロジェクト http://www.igakuken.or.jp/stroke-renaiss/
--

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