

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09764

研究課題名(和文) Semaphorin3Aを標的とした脳虚血後軸索再生の分子病態解明と治療応用

研究課題名(英文) An inhibition of Semaphorin 3A enhances axonal outgrowth and stroke recovery

研究代表者

上野 祐司 (Ueno, Yuji)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00349002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞ラット脳peri-infarct areaにおいて、亜急性期の神経細胞内においてに発現上昇するSemaphorin3Aを機能阻害することで、軸索再生や脳梗塞ラットの機能回復が促進された。虚血後神経細胞において、Semaphorin3A阻害がRnd1/R-Ras/Akt/GSK3シグナル、軸索に発現するpGSK3を介して軸索再生を調節し、また、Semaphorin3A阻害は虚血後のアストロサイトの活性化、アストロサイト由来のエクソソームにおけるmicroRNAを制御し、そして軸索に取り込まれたエクソソームがptgdsを介して虚血後の軸索再生を促進させる作用機構が明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は軸索伸長阻害因子であるSemaphorin3Aに着目し、脳梗塞再生治療の新たな分子標的として見出した。Semaphorin3A阻害薬は、脳梗塞後の神経細胞内情報伝達系を制御し、アストロサイトの活性化を抑制、軸索伸展効果を有するエクソソームを分泌する現象がみられた。今日では急性期治療が主体となっている脳梗塞治療において、Semaphorin3A阻害薬は慢性期神経再生や機能回復をターゲットとした脳梗塞新規治療薬となる可能性がある。脳梗塞患者のQOLを高めるといふ高い社会的ニーズに答えるのみならず、脳卒中医療を大きく変革させる治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In rats subjected to MCA occlusion, we administered a Semaphorin 3A inhibitor into the peri-infarct area from 7 to 21 days after occlusion. We found that phosphorylated NFH-immunoreactive axons were increased, GFAP-immunoreactive astrocytes were decreased, and functional recovery was promoted at 28 days after MCAO. In cultured neurons, the Semaphorin 3A inhibitor decreased Rnd1, increased R-Ras, which phosphorylates Akt and GSK-3, selectively increased phosphorylated GSK-3 in axons, and thereby enhanced phosphorylated NFH-immunoreactive axons after OGD. In cultured astrocytes, the Semaphorin 3A inhibitor suppressed activation of astrocytes induced by OGD. Exosomes secreted from ischemic astrocytes treated with the Semaphorin 3A inhibitor regulated expression of microRNAs, and further promoted axonal elongation together with an increase of ptgds. GSK-3⁺ and PTGDS⁺ neurons were robustly increased after treatment with the Semaphorin 3A inhibitor in the peri-infarct area.

研究分野：神経学

キーワード：脳梗塞 セマフォリン3A エクソソーム microRNA 軸索再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患の総患者数は約 118 万人であり、脳血管疾患に関わる医療費は高齢者の総医療費の第 1 位である。特に、多くの患者が運動麻痺等の重度の後遺症に苦慮し、それに対する介護費用が大部分を占める。脳梗塞後の機能回復において「軸索再生」は重要な役割を担うが、軸索再生や機能回復を標的とした治療法の実現には至っていない。脳梗塞の軸索再生を標的とし、機能回復に有用な脳梗塞新規治療薬の開発、実用化は喫緊の課題であると考えられる。

2. 研究の目的

我々は軸索伸長阻害因子である Semaphorin3A に着目し、脳梗塞再生治療の新たな分子標的として見出した。脊髄損傷モデルでは Semaphorin3A 阻害剤による治療効果が報告されている。脳梗塞後の軸索再生における Semaphorin3A が作用する新規分子病態機構を明らかにし、選択的 Semaphorin3A 阻害薬の軸索再生並びに機能回復作用を検証した。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞動物モデルとして 9 週雄性 Wistar ラットを用いて永久的中大脳動脈閉塞モデル(Middle cerebral artery occlusion: MCAO)を作成し、梗塞巣の辺縁より 300 μ m を peri-infarct area と定義した。MCAO 後 3~56 日目における Semaphorin3A と pNFH(軸索マーカー)、MAP2(神経細胞体マーカー)の発現を解析した。MCAO 後 7 日目に Alzet pump を用いて peri-infarct area に 0.01、0.1、1、3mg/ml の Semaphorin3A 阻害剤を 14 日間投与した。MCAO 後、modified Neurological Severity Score(mNSS) と Rotarod で神経学的所見と運動機能を評価した。

(2) In vitro では、妊娠 17 日 Wistar ラットの胎児前頭葉皮質神経細胞から初代培養神経を作成し、培養 7 日目に 3 時間の無糖無酸素負荷(Oxygen-glucose deprivation: OGD)を行った。OGD 後、0.1、1nM の recombinant Sema3A(rSema3A)、0.1、1 μ M の Semaphorin3A 阻害剤を投与した。OGD 後 96 時間目に培養神経細胞を回収し、Western blot にて pNFH、Sema3A シグナル蛋白の発現を解析した。Microfluidic chamber を用いて OGD 後軸索伸長の長さを解析した。生後 0-2 日の Sprague-Dawley 系ラットのの前頭葉皮質細胞から初代アストロサイト培養を行い、OGD 後 Semaphorin3A 阻害剤を投与し 96 時間後の培地からエクソソームを抽出した。活性化アストロサイトマーカーである GFAP を測定し、エクソソームを培養神経細胞に投与し軸索伸長を解析した。OGD 後の培養アストロサイトから放出されるエクソソームにおいて、Semaphorin3A 阻害剤が制御する microRNA、軸索伸長に関わる mRNA を microarray にて網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) 脳虚血後 peri-infarct area において Semaphorin3A は MAP2 と共発現し、Sema3A/MAP2 陽性細胞は MCAO 後 7 日より 14 日までの急性期から亜急性期にかけて上昇し、その後 56 日目の慢性期において減少した。

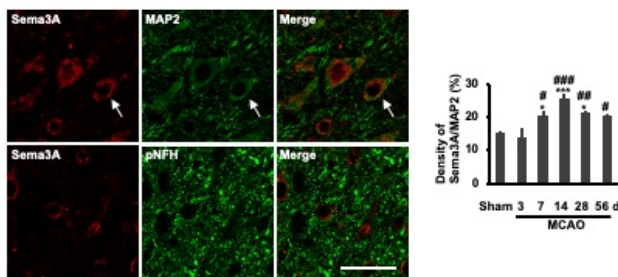


図1. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ versus 3 day group.

(2) OGD 後の初代培養神経細胞において、Semaphorin3A 阻害剤投与では軸索マーカーの pNFH は増加した。同時に、Rnd1 の減少、R-Ras、pAkt、pGSK3 β の増加がみられた。rSema3A 投与では逆の現象が見られた。

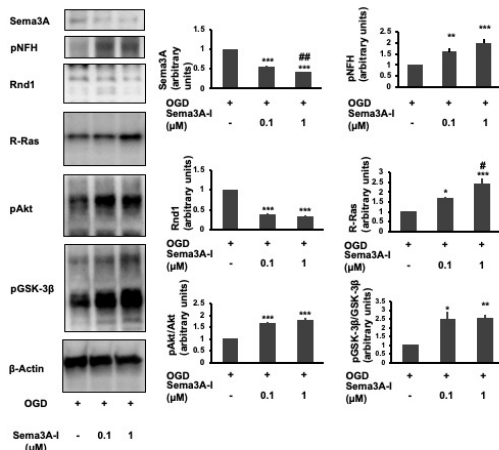


図 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus OGD neurons; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus OGD neurons treated with 0.1 μ M Sema3A inhibitor.

(3) Microfluidic chamber を用いた軸索伸長の検討では、Semaphorin3A 阻害剤投与は OGD 後非投与、OGD 後 recombinant Sema3A(1nM)投与に比して軸索伸展がみられた。

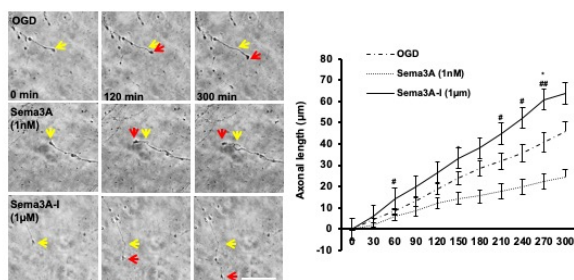


図 3. * $p < 0.05$ versus OGD; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ versus OGD neurons treated with 1 nM recombinant Sema3A.

(4) 蛍光免疫染色において、OGD 後に伸展した軸索に発現する pGSK3 β や、pGSK3-pNFH の共発現は Semaphorin3A 阻害剤投与において増加した。

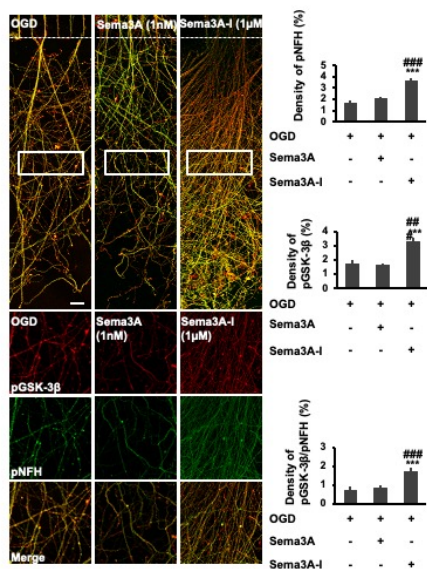
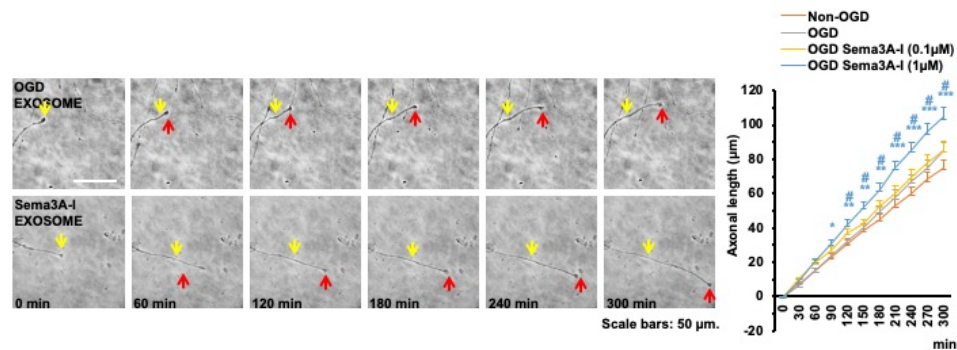


図 4. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus OGD; ### $p < 0.001$ versus OGD neurons treated with 1 nM recombinant Sema3A.

(5) 初代アストロサイト培養において、GFAP は OGD 後有意に増加し、Semaphorin3A 阻害剤投与で減少した。Sema3A も Semaphorin3A 阻害剤で減少した(図 5)。アストロサイト内と培養液中から抽出されたエクソソーム中の CD63、TSG101 は non-OGD 群、OGD 群、OGD 後 Semaphorin3A 阻害剤投与群で変化なかった。

(6) Semaphorin3A 阻害剤投与の虚血アストロサイトから分泌されたエクソソームを神経細胞に投与したところ、non-OGD 群、OGD 群に比して軸索伸長効果が得られた。Microarray では、Semaphorin3A 阻害剤(1 μ M)投与の虚血アストロサイトから分泌されたエクソソームでは、阻害剤非投与に比較して、rno-miR-30c-2-3p、rno-miR-326-5p の有意な発現低下が見られた。Semaphorin3A 阻害剤投与の虚血アストロサイトから分泌されたエクソソームを投与した培養神経細胞では、prostaglandin D2 synthase(ptgds)の発現が上昇していた。

図 5. $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus exosomes derived from non-OGD astrocytes, # $p < 0.05$, versus exosomes derived from OGD astrocytes.



(7) ラット MCAO モデルにおいて、Semaphorin3A 阻害剤投与の脳内投与では、mNSS は 14 日以降で 1mg/ml 群、3mg/ml 投与群で改善した($p < 0.05$ vs vehicle)。Rotarod では 28 日後において 3mg/ml 投与群では、vehicle に比して改善がみられた($p < 0.05$ vs vehicle)。梗塞巣の面積は 5 群間で差異はなかった。蛍光免疫染色では、peri-infarct area において Sema3A/MAP2 細胞は Semaphorin3A 阻害剤投与にて減少し、pGSK3 β /MAP2 細胞は増加した。pNFH の発現は Semaphorin3A 阻害剤投与で増加した。

<総括>脳虚血後 peri-infarct area において、神経細胞に発現する Sema3A は亜急性期に上昇し慢性期で低下した。亜急性期に上昇する Semaaphorin3A に対して機能阻害することで、軸索再生や脳梗塞ラットの機能回復が促進された。In vitro では、OGD 後の培養神経細胞において Semaphorin3A の機能調節が Rnd1/R-Ras/Akt/GSK3 β シグナル、軸索に発現する pGSK3 β を介して pNFH 発現を調節した。Semaaphorin3A 阻害薬は OGD 後のアストロサイトの活性化を抑制し、軸索伸展効果を有するエクソソームを分泌する現象がみられた。Semaaphorin3A 阻害薬は、虚血アストロサイト由来のエクソソームにおける rno-miR-30c-2-3p、rno-miR-326-5p の発現を制御し、また、軸索に取り込まれたエクソソームは ptgds を介して虚血後の軸索再生を促進させる作用機構が明らかにされた。

引用文献

1. Ueno Y, Chopp M, Zhang L, Buller B, Liu Z, Lehman NL, et al. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke*. 2012;43:2221-2228
2. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:146-156
3. Zhang ZG, Chopp M. Exosomes in stroke pathogenesis and therapy. *J Clin Invest*. 2016;126:1190-1197
4. Dickson BJ. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*. 2002;298:1959-1964
5. Pasterkamp RJ, Giger RJ. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2009;19:263-274
6. Ueno Y, Koike M, Shimada Y, Shimura H, Hira K, Tanaka R, et al. L-carnitine enhances axonal plasticity and improves white-matter lesions after chronic hypoperfusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35:382-391
7. Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, et al. A selective sema3a inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med*. 2006;12:1380-1389

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 26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 Hira Kenichiro, Ueno Yuji, Tanaka Ryota, Miyamoto Nobukazu, Yamashiro Kazuo, Inaba Toshiki, Urabe Takao, Okano Hideyuki, Hattori Nobutaka	4. 巻 49
2. 論文標題 Astrocyte-Derived Exosomes Treated With a Semaphorin 3A Inhibitor Enhance Stroke Recovery via Prostaglandin D 2 Synthase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 2483 ~ 2494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/STROKEAHA.118.021272	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 Magami Shunsuke, Miyamoto Nobukazu, Ueno Yuji, Hira Kenichiro, Tanaka Ryota, Yamashiro Kazuo, Oishi Hidenori, Arai Hajime, Urabe Takao, Hattori Nobutaka	4. 巻 406
2. 論文標題 The Effects of Astrocyte and Oligodendrocyte Lineage Cell Interaction on White Matter Injury under Chronic Cerebral Hypoperfusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 167 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.03.004	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 Kamakura Chisako K?der, Ueno Yuji, Sakai Yuzuru, Yoshida Hisao, Aiba Saiko, Hayashi Akito, Shimura Hideki, Takeda Katsuhiko, Kamakura Keiko, Hattori Nobutaka, Urabe Takao	4. 巻 379
2. 論文標題 White matter lesions and cognitive impairment may be related to recovery from unilateral spatial neglect after stroke	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 241 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2017.06.021	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 Ueno Yuji, Tanaka Ryota, Yamashiro Kazuo, Miyamoto Nobukazu, Hira Kenichiro, Kurita Naohide, Sakurai Mayu, Urabe Takao, Shimada Kazunori, Miyazaki Tetsuro, Daida Hiroyuki, Hattori Nobutaka	4. 巻 25
2. 論文標題 Age Stratification and Impact of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid to Arachidonic Acid Ratios in Ischemic Stroke Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 593 ~ 605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.40691	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 Inaba Toshiki, Miyamoto Nobukazu, Hira Kenichiro, Ueno Yuji, Yamashiro Kazuo, Watanabe Masao, Shimada Yoshiaki, Hattori Nobutaka, Urabe Takao	4. 巻 414
2. 論文標題 Protective Role of Levetiracetam Against Cognitive Impairment And Brain White Matter Damage in Mouse prolonged Cerebral Hypoperfusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 255 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.07.015	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 Nakano Fumi, Ueno Yuji, Suda Akimitsu, Takanashi Masashi, Yamashita Atsushi, Abe Yoshiyuki, Kon Takayuki, Miyamoto Nobukazu, Yamashiro Kazuo, Tanaka Ryota, Naito Toshio, Yao Takashi, Tamura Naoto, Hattori Nobutaka	4. 巻 391
2. 論文標題 Fatal ischemic stroke caused by cerebral small arteritis in a patient with giant cell arteritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 22 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2018.05.010	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 Inaba Toshiki, Miyamoto Nobukazu, Hira Kenichiro, Ueno Yuji, Yamashiro Kazuo, Watanabe Masao, Shimada Yoshiaki, Hattori Nobutaka, Urabe Takao	4. 巻 414
2. 論文標題 Protective Role of Levetiracetam Against Cognitive Impairment And Brain White Matter Damage in Mouse prolonged Cerebral Hypoperfusion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 255 ~ 264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.07.015	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 Ueno Yuji, Miyamoto Nobukazu, Yamashiro Kazuo, Tanaka Ryota, Hattori Nobutaka	4. 巻 20
2. 論文標題 Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Stroke Burden	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5549 ~ 5549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225549	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 Kurita Naohide, Yamashiro Kazuo, Kuroki Takuma, Tanaka Ryota, Urabe Takao, Ueno Yuji, Miyamoto Nobukazu, Takanashi Masashi, Shimura Hideki, Inaba Toshiki, Yamashiro Yuichiro, Nomoto Koji, Matsumoto Satoshi, Takahashi Takuya, Tsuji Hirokazu, Asahara Takashi, Hattori Nobutaka	4. 巻 7
2. 論文標題 Metabolic endotoxemia promotes neuroinflammation after focal cerebral ischemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 271678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X19899577	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 Shojima Yuri, Ueno Yuji, Tanaka Ryota, Yamashiro Kazuo, Miyamoto Nobukazu, Hira Kenichiro, Kurita Naohide, Nakajima Sho, Urabe Takao, Hattori Nobutaka	4. 巻 23
2. 論文標題 Eicosapentaenoic-to-Arachidonic Acid Ratio Predicts Mortality and Recurrent Vascular Events in Ischemic Stroke Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.52373	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 Miyamoto Nobukazu, Magami Shunsuke, Inaba Toshiki, Ueno Yuji, Hira Kenichiro, Kijima Chikage, Nakajima Sho, Yamashiro Kazuo, Urabe Takao, Hattori Nobutaka	4. 巻 1
2. 論文標題 The effects of A1/A2 astrocytes on oligodendrocyte lineage cells against white matter injury under prolonged cerebral hypoperfusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23814	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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ueno Y, Hira K, Tanaka R, Miyamoto N, Yamashiro K, Inaba T, Urabe T, Okano H, Hattori N
2. 発表標題 Astrocyte-derived exosomes enhance stroke recovery via prostaglandin D2 synthase expression
3. 学会等名 4th European Stroke Organization Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平健一郎, 上野祐司, 田中亮太, 宮元伸和, 山城一雄, 卜部貴夫, 岡野栄之, 服部信孝
2. 発表標題 Inhibition of Semaphorin 3A enhances axonal outgrowth and improves functional recovery after stroke
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kurita N, Yamashiro K, Kuroki T, Tanaka R, Ueno Y, Urabe T, Yamashiro Y, Hattori N
2. 発表標題 Modulation of gut microbiota improves outcomes after stroke by reducing lipopolysaccharide-induced inflammation in the ischemic brain in diabetic mice
3. 学会等名 4th European Stroke Organization Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島翔, 田中亮太, 山城一雄, 千葉麻子, 能登大介, 志村秀樹, 栗田尚英, 平健一郎, 宮元伸和, 上野祐司, 卜部貴夫, 三宅幸子, 服部信孝
2. 発表標題 脳梗塞急性期におけるMAIT細胞制御と脳保護効果
3. 学会等名 第61回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田尚英, 山城一雄, 黒木卓馬, 田中亮太, 上野祐司, 宮元伸和, 卜部貴夫, 山城雄一郎, 服部信孝
2. 発表標題 腸内細菌叢の異常と脳虚血急性期におけるLPSを介した炎症
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島翔, 田中亮太, 山城一雄, 千葉麻子, 能登大介, 志村秀樹, 栗田尚英, 平健一郎, 宮元伸和, 上野祐司, 卜部貴夫, 三宅幸子, 服部信孝
2. 発表標題 脳梗塞急性期におけるMAIT細胞制御と脳保護効果
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞上俊亮, 宮元伸和, 上野祐司, 山城一雄, 服部信孝, 大石英則, 新井一
2. 発表標題 慢性脳虚血に対し白質保護作用を有するBrain Derived Neurotrophic Factorと成熟アストロサイトの関係
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平健一郎, 上野祐司, 田中亮太, 宮元伸和, 山城一雄, 卜部貴夫, 服部信孝
2. 発表標題 Semaphorin 3Aを介した脳虚血後軸索再生の病態機構に関する検討
3. 学会等名 第43回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueno Y, Hira K, Tanaka R, Miyamoto N, Yamashiro K, Inaba T, Urabe T, Okano H and Hattori N
2. 発表標題 Astrocyte-Derived Exosomes Treated with a Semaphorin 3A Inhibitor Enhance Stroke Recovery via Prostaglandin D2 Synthase
3. 学会等名 29th Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 脳梗塞に関する治療薬	発明者 上野祐司，服部信 孝，平健一郎，岸野 晶祥，山口亮，岡野	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-032671	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----