

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03139

研究課題名(和文) グリア・トランスクリプトーム解析によるリハビリ後の運動機能回復メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms of motor function recovery after rehabilitation using glial transcriptome analysis.

研究代表者

長尾 元史 (Nagao, Motoshi)

国立障害者リハビリテーションセンター(研究所)・研究所 運動機能系障害研究部・研究部長

研究者番号：00359671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中後、グリア細胞の一種であるアストロサイトは反応性アストロサイトになり、運動機能回復に関与すると考えられているが、そのメカニズムは不明な点も多い。本研究では、損傷後、反応性アストロサイトで発現が上昇するクロマチンリモデリング因子Chd7を同定した。アストロサイト特異的Chd7ノックアウトマスをを用いた解析から、Chd7は反応性アストロサイトの増殖を制御し、脳卒中後の運動機能回復を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、反応性アストロサイトの増殖を制御しているクロマチンリモデリング因子は報告されていない。本研究で、反応性アストロサイトの増殖を制御するクロマチンリモデリング因子としてChd7が同定され、反応性アストロサイトの増殖のエピジェネティックな制御メカニズムの一端が明らかとなった。Chd7の発現や活性を抑制することができれば、脳卒中後の運動機能回復を促進させられる可能性があり、アストロサイトを標的とした新しい治療薬の開発に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：After stroke, astrocytes, a type of glial cell, become reactive astrocytes and are thought to be involved in the recovery of motor function, but the mechanism is still unclear. In this study, I identified a chromatin remodeler, Chd7, whose expression is upregulated in reactive astrocytes after injury. Analysis using astrocyte-specific Chd7 conditional knockout mice revealed that Chd7 regulates proliferation of reactive astrocytes and inhibits motor function recovery after ischemic stroke.

研究分野：神経科学 リハビリテーション医学

キーワード：グリア細胞 アストロサイト リハビリテーション 運動機能回復

1. 研究開始当初の背景

脳卒中は我が国の総患者数 112 万人と頻度の高い疾患であり、死亡原因の第 4 位を占める。また、運動障害をはじめとした罹患後の後遺症も多くみられ、ADL (activities of daily living) 低下の大きな要因となっており、医学的にも社会的にも新たな治療法の開発が期待される分野である。脳卒中は主に脳梗塞・脳出血・くも膜下出血に分類され、発症患者数では脳梗塞が 75-80 % を占め最多である。脳梗塞は脳血管が閉塞することで脳組織の虚血・障害が引き起こされる病態である。現在、急性期治療としては rt-PA を用いた血栓溶解療法やカテーテルによる急性血行再建術が行われているが、これらはいずれも脳血管の閉塞を解消する治療であり、すでに脳組織の虚血が進行した病態下で 2 次的損傷を治療するものではない。2 次的損傷治療を目的とした薬剤で、現在保険適用となっているのはフリーラジカル捕捉剤であるエダラボンのみであり、これらを除くと、リハビリテーション以外に有効な治療法がないのが現状である。そのため脳卒中に対する新たな治療薬の開発が切望されている。

脳卒中による運動麻痺がリハビリテーションを行うことにより一定の回復を示すことはよく知られている。脳卒中後の運動機能回復には損傷部周囲の残存領域の神経回路再構築が必要であると考えられている。発生期にはグリア細胞の一種であるアストロサイトが、シナプス形成と刈り込みを制御し神経回路構築に関与する。しかし、損傷後の反応性アストロサイトは、トロンボスポンジンなどのシナプス形成因子を分泌し神経回路再構築を促進する可能性がある一方、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなどの軸索再生阻害因子を分泌し、神経回路再構築を阻害することも報告されており、脳卒中後の運動機能回復における反応性アストロサイトの役割は未だ不明な点も多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳卒中後の運動機能回復における反応性アストロサイトの役割を明らかにし、その機能制御を通じて脳卒中後の運動機能回復を促進することである。本研究の成果は、反応性アストロサイトを標的とする新しい脳卒中治療薬の開発に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

- (1) 脳卒中後の反応性アストロサイトの役割を明らかにするために、マウス脳卒中モデル (片側麻痺モデル) の系を用いた。光塞栓法 (光感受性色素ローズベンガルを腹腔内投与後、波長 562nm の光を頭部に当て、脳内血管に血栓を作製する方法) により、このマウスの片側の大脳皮質運動野に脳梗塞を誘導した。
- (2) アストロサイトで EGFP を発現する Aldh1L1-EGFP マウスを用いて脳卒中モデルマウスを作製し、脳卒中後の反応性アストロサイトで発現する分子をトランスクリプトーム解析と免疫組織染色で探索した。
- (3) 脳卒中モデルマウスの梗塞巣周囲において、反応性アストロサイトで発現が上昇する新しいエピジェネティック制御因子としてクロマチンリモデリング因子 Chd7 を見出し、Chd7 の発現パターンを免疫組織染色で解析した。反応性アストロサイトで発現する転写因子との共染色を行った。
- (4) 脳卒中後の反応性アストロサイトにおける Chd7 の役割を明らかにするために、アストロサイト特異的 Chd7 欠損マウス (Aldh1L1-CreER; Chd7^{flox/flox}; 以下、Chd7^{ck0}) を作製した。さらに、このマウスを用いて脳卒中モデルマウスを作製した。
- (5) 上記マウスを用いて、損傷後の反応性アストロサイトの増殖、生存に対する Chd7 の役割を検討した。
- (6) Chd7^{ck0} マウスの脳卒中後の運動機能評価を行った。脳卒中を誘導する 1 日前 (Pre) 脳卒中誘導後 1 日、1 週間、2 週間で Cylinder test と Grid walking test を行った。左半球の運動野に脳卒中を誘導しているため、右手が麻痺肢となる。マウスを透明の筒に入れると rearing という立ち上がり行動を取り、その際、壁に手を着く。Cylinder test では右手のみ着いていた時間、左手のみ着いていた時間、両手を着いていた時間を計測し、どれくらい非麻痺肢を使用したかを調べた (左右均等に使うと 0% となる)。Grid walking test では、マウスに金網の上を歩かせて、何回、麻痺肢を踏み外したかを計測し、その割合を調べた。

- (7) アストロサイトの培養系とレンチウイルスを使った発現系を用いて、Chd7 をアストロサイトでノックダウンし、アストロサイトの増殖、生存に対する影響を検討した。
- (8) 免疫沈降法を用いて、Chd7 と相互作用する分子を検討した。
(結合分子として、転写因子 Olig2 を同定)
- (9) アストロサイトの培養系とレンチウイルスを使った発現系を用いて、Olig2 をアストロサイトでノックダウンし、アストロサイトの増殖、生存に対する影響を検討した。

4. 研究成果

本研究では、脳卒中後の反応性アストロサイトで発現するクロマチンリモデリング因子 Chd7 が損傷後の反応性アストロサイトの増殖を制御することを明らかにした。損傷後3日目で、Chd7 は損傷部と反対側のアストロサイトでは発現していないが、梗塞巣周囲の反応性アストロサイトの一部 (~40%) で発現していた。(図1、2)。脳卒中後、増殖している反応性アストロサイトでは転写因子 Olig2 や細胞増殖マーカーである Ki67 の発現が見られるが、Olig2 または Ki67 陽性の反応性アストロサイトのほとんどが (90%以上) が Chd7 を発現しており、Chd7 は Olig2 と共に増殖している反応性アストロサイトで発現していることが明らかとなった(図2)。

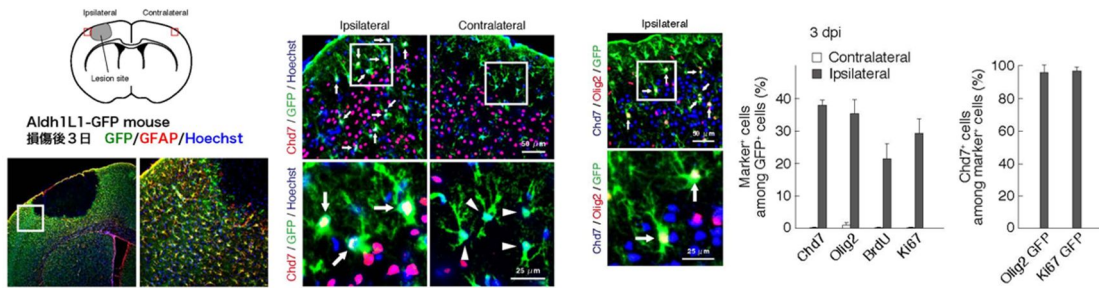


図1 脳卒中後の反応性アストロサイトにおけるChd7の発現 図2 反応性アストロサイトにおけるChd7とOlig2の発現

Chd7 の発現パターンから、Chd7 は反応性アストロサイトの増殖に関与する可能性が考えられ、次にそれを検討した。アストロサイト特異的 Chd7 欠損マウス(Chd7cKO マウス)を用いて、脳卒中モデルマウスを作製し解析した(図3)。1日1回、5日間タモキシフェンを投与し、4日後に脳卒中を誘導し、損傷後3日目に損傷部周囲の反応性アストロサイトでの Chd7 の発現を調べ、Chd7 がノックアウトされているか確認した (~75%のノックダウン効率)(図3)。

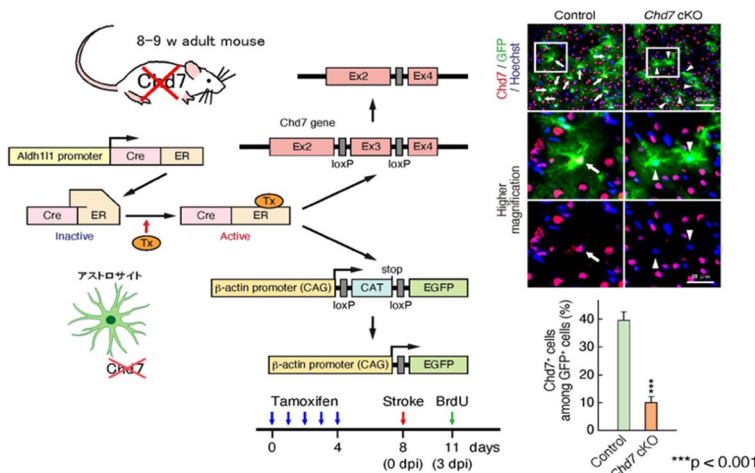


図3 アストロサイト特異的Chd7ノックアウトマウス

損傷後3日目で、損傷部周囲の GFP 陽性アストロサイトの細胞数を調べたところ、コントロールと比較して、Chd7cKO ではその数が減少していた(図4)。一方、反対側の GFP 陽性細胞数は両者で差はなかった(図4)。このことから Chd7 ノックアウト細胞は、損傷後、細胞死を引き起こすかあるいは増殖できないという可能性が考えられ、次にそれを検討した。cleaved Caspase3 染色による細胞死の評価では、コントロールと Chd7cKO で有意な差は観察されなかった。BrdU の取り込みと増殖マーカーである Ki67 の免疫染色で、反応性アストロサイトの増殖を見てみた

ころ、Chd7cK0 マウスではその増殖が抑制されていることが分かった (図4)。この結果から、Chd7 は損傷後の反応性アストロサイトの増殖に必要であることが明らかとなった。さらに Chd7^{flox} マウスの大脳皮質由来の培養アストロサイトに Cre ウイルスを感染させて、培養アストロサイトで Chd7 をノックダウンし、増殖と生存に対する影響を検討した。マウス個体での解析と一致して、Chd7 のノックダウンにより EdU および Ki67 陽性細胞の割合の低下が観察された (図5)。一方、Chd7 のノックダウンは生存には影響しなかった (図5)。これらの結果からも、Chd7 はアストロサイトの増殖に必要なことが示唆された。増殖している反応性アストロサイトにおいて Chd7 は Olig2 と共発現しているので、次に培養系を用いて、Olig2 のノックダウンの効果も検討した。Chd7 のノックダウンの結果と同様に、Olig2 のノックダウンはアストロサイトの生存には影響がないが、増殖を顕著に抑制した (図6)。さらに、免疫沈降法により Chd7 と Olig2 の相互作用を検討したところ、両分子は複合体を形成することが明らかとなった (図6)。以上の結果より、Chd7 と Olig2 は反応性アストロサイトにおいて複合体を形成し、協調してその増殖を制御していると考えられる。今後は、Chd7 と Olig2 がどのように反応性アストロサイトの増殖を促進するのか明らかにするために増殖制御に関わる標的分子の同定が必要である。

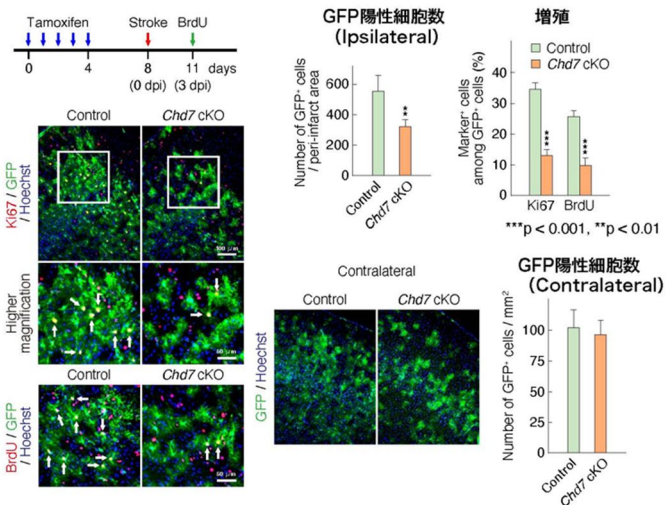


図4 反応性アストロサイトの増殖におけるChd7の関与

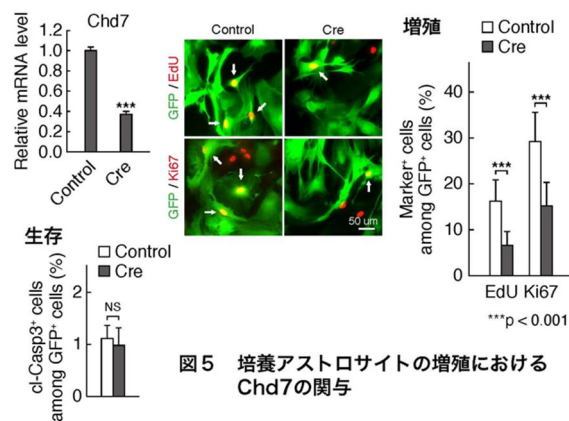


図5 培養アストロサイトの増殖におけるChd7の関与

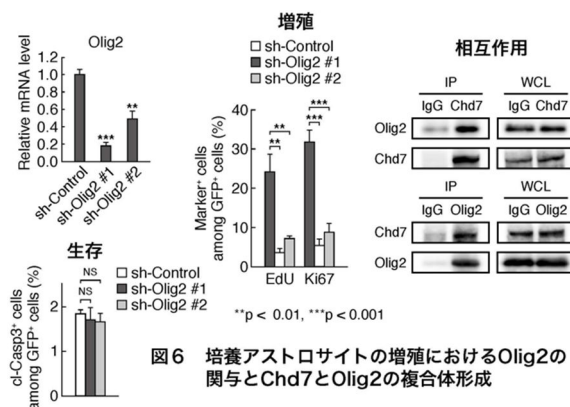


図6 培養アストロサイトの増殖におけるOlig2の関与とChd7とOlig2の複合体形成

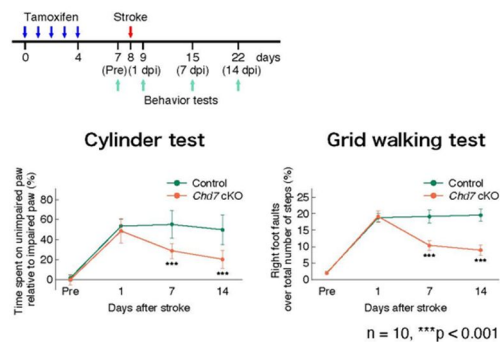


図7 運動機能評価

最後に、Cylinder test と Grid walking test を行い、Chd7cK0 マウスの脳卒中後の運動機能を調べた。Cylinder test では、損傷後1日で、コントロールと Chd7cK0 マウスで差がないことから、損傷の程度は両者で同じくらいであると考えられた。1週間後、2週間後のテストでは、コントロールと比較して、Chd7cK0 マウスは非麻痺肢のみを使う割合が有意に低下した。Grid walking test でも同様に、損傷後1日では差がないが、1週間、2週間目では、Chd7cK0 マウスは麻痺肢を踏み外す割合が減少した。この2つの行動解析により、Chd7cK0 マウスは、コントロールマウスと比較して、脳卒中後の運動機能回復が良好であることが明らかになった。この結果より、反応性アストロサイトで発現している Chd7 は脳卒中後の運動機能回復を阻害することが示唆された。本研究により、Chd7 は脳卒中後の反応性アストロサイトの増殖を制御し、運動機能回復を阻害することが明らかとなった。反応性アストロサイトにおける Chd7 の発現または活性を抑制することができれば、脳卒中後の機能回復を促進させられる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ryu Y, Ogata T, Nagao M, Sawada Y, Nishimura R, Fujita N	4. 巻 11
2. 論文標題 Early escitalopram administration as a preemptive treatment strategy against spasticity after contusive spinal cord injury in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-85961-5	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 Ryu Y, Maekawa T, Yoshino D, Sakitani N, Takashima A, Inoue T, Suzurikawa J, Toyohara J, Tago T, Makuuchi M, Fujita N, Sawada K, Murase S, Watanave M, Hirai H, Sakai T, Yoshikawa Y, Ogata T, Shinohara M, Nagao M, Sawada Y	4. 巻 23
2. 論文標題 Mechanical Regulation Underlies Effects of Exercise on Serotonin-Induced Signaling in the Prefrontal Cortex Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	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.isci.2020.100874	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 Ryu Y, Ogata T, Nagao M, Sawada Y, Nishimura R, Fujita N	4. 巻 35
2. 論文標題 Effects of Treadmill Training Combined with Serotonergic Interventions on Spasticity after Contusive Spinal Cord Injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurotrauma	6. 最初と最後の頁 1358-1366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/neu.2017.5400	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長尾元史
2. 発表標題 反応性アストロサイトにおけるクロマチンリモデリング因子Chd7の役割
3. 学会等名 第6回日本ミエリン研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長尾元史
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子Chd7 のグリア細胞における役割
3. 学会等名 第5回日本ミエリン研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立障害者リハビリテーションセンター研究所 運動機能系障害研究部 http://www.rehab.go.jp/ri/departj/undou/

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