

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14824

研究課題名（和文）脊椎動物における成体脳の再生能力を制御する分子機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of Molecular Mechanisms Regulating the Regenerative Capacity of the Adult Vertebrate Brain

研究代表者

清水 勇気 (Shimizu, Yuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：30778064

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）：本研究課題では、中枢神経系における再生能力が異なるマウスとゼブラフィッシュを用いて損傷後の発現遺伝子の比較を行い、ゼブラフィッシュが有する高い再生能力に寄与する分子機構の解明を目指したものである。脳損傷後に網羅的な遺伝子発現の比較を行い、ゼブラフィッシュのみで発現上昇する分泌因子を同定し、ヒト神経幹細胞およびゼブラフィッシュ脳損傷モデルにおいて、神経幹細胞の増殖を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は再生能の異なる生物種間の比較解析により、神経再生促進因子の同定を目指したものであるが、ゼブラフィッシュとマウスの比較解析により既知の再生促進因子の抽出に成功し、さらに神経幹細胞の増殖を促す新規因子を同定した。本研究による成果は、比較生物学的なアプローチが再生を制御する分子機構の解明および再生促進因子の同定に効果的であるということを示唆していると考えられる。神経再生を促すためには、神経新生、血管新生、抗炎症など多岐にわたる作用を有する因子が効果的であると考えられており、小型魚類-マウス間比較による探索の拡充および哺乳類での機能評価系を確立し、有望な因子の同定を目指す。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we compared gene expression after injury in mice and zebrafish because of their different regenerative abilities in the central nervous system, in order to elucidate the molecular mechanisms that contribute to the high regenerative ability of the zebrafish. Comprehensive comparison of gene expression after brain injury identified secreted factors that are increased only in zebrafish and confirmed that one of secreted factors regulates neural stem cell proliferation in human neural stem cells and zebrafish brain injury models.

研究分野：発生生物学、神経科学

キーワード：神経再生 ゼブラフィッシュ ラジアルグリア

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトは中枢神経系の再生能力が乏しく、脳卒中や神経変性疾患などで失われた神経機能を再生させる手法が求められている。ヒトを含む哺乳類は中枢神経系の再生能に乏しいが、一方、小型魚類のゼブラフィッシュは中枢神経系や様々な組織・器官で高い再生能力を持つことが報告されている。ゼブラフィッシュを用いた神経損傷モデルおよび再生制御機構に関する研究が盛んに行われており、中枢神経系における高い再生能力の制御機構の解明や哺乳類への応用が期待されている。

近年、次世代シーケンサーや情報解析技術の発展に伴い、網羅的な遺伝子発現の定量化や比較解析が容易となり、遺伝子レベルでの生命現象の解読が盛んに進められている。組織再生において、心筋再生の分野では、再生能が異なるマウスとゼブラフィッシュを用いて、心筋損傷後の遺伝子発現を比較することでゼブラフィッシュが有する高い心筋再生能の分子機構の解明が試みられている。一方、脳損傷モデルを用いた遺伝子発現比較はこれまで報告はないが、再生能が異なるマウス-ゼブラフィッシュ間で脳損傷後の遺伝子発現を比較することで再生促進因子の探索が可能になるのではないかと考えた。申請者はこれまでに、ゼブラフィッシュを用いた脳損傷モデルを確立し、再生を制御する分子機構の解析を進めており、ゼブラフィッシュ脳損傷モデルにおける遺伝子発現変化と公共データベースに登録されているマウス脳梗塞モデルにおける遺伝子発現変化を比較することで、再生促進因子の探索を行なった。さらに、絞り込んだ遺伝子について、ゼブラフィッシュおよびヒト神経幹細胞を用いて神経幹細胞の増殖に与える影響を解析した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、再生能の異なるマウスとゼブラフィッシュを用いて脳損傷後の遺伝子発現変化を比較することでゼブラフィッシュが有する高い再生能に寄与する分子機構を明らかにすることである (図 1)。ゼブラフィッシュ脳損傷モデルを用いて、損傷初期における遺伝子発現変化の解析およびマウス脳損傷モデルとの比較解析を行い、損傷初期における応答の違いの探索を行なった。さらに、探索により抽出された因子の機能を明らかにするために、ヒト神経幹細胞やゼブラフィッシュ脳損傷モデルに対して、組換え蛋白や阻害剤を投与し、神経幹細胞の増殖に関して機能解析を行なった。

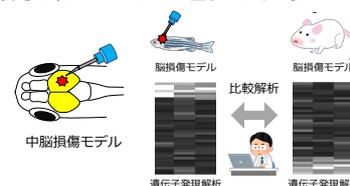


図1 ゼブラフィッシュ脳損傷モデルおよび遺伝子発現の比較解析

### 3. 研究の方法

#### 3. 1 ゼブラフィッシュ脳損傷モデルにおける網羅的な遺伝子発現解析

申請者はこれまでに、ゼブラフィッシュ成魚の中脳領域に対して 30G の針を用いて物理的な損傷を与える手法を確立している。脳損傷後の遺伝子の発現変化を網羅的に解析するため、損傷 6, 12, 24 時間後に損傷脳から RNA を抽出し、非損傷脳と比較を行い、損傷による発現変動遺伝子を探索した。発現解析を行うため、Hisat2 によりマッピングおよび Feature count によりリードカウントの定量化を行なった。リードカウントのデータを元に DESeq2 を行い、2 倍以上に有意に発現変動した遺伝子を発現変動遺伝子として抽出した。さらに、抽出された発現変動遺伝子に対して、GO 解析によるパスウェイ解析を行なった。

#### 3. 2 ゼブラフィッシュ-マウス間での遺伝子発現比較

データベース Ensembl の BioMart を用いて、ゼブラフィッシュ-マウス間で保存されているオーロログのリストを作成し、発現変化の比較を行う遺伝子の絞り込みを行なった。NCBI の SRA に登録されているマウス脳梗塞のデータ (損傷 6, 12, 24 時間および非損傷脳に関する RNA-seq) を用いて、マウス脳梗塞後の発現変動遺伝子の抽出を行なった。作成したオーソログリストにある遺伝子について、発現変動の有無を比較し、特徴的な発現変化の抽出を試みた。

#### 3. 3 ヒト神経幹細胞を用いた増殖促進作用の解析

ヒト神経幹細胞の培地 (EGF・FGF2 含有) に解析候補のリコンビナント蛋白 (ヒト由来) を添加し、神経幹細胞の増殖に与える影響を評価した。培養 1 日後に EdU により分裂細胞を標識し、神経幹細胞マーカーと共染色し、増殖している神経幹細胞の割合を評価した。

### 3. 4 ゼブラフィッシュ脳損傷モデルを用いた増殖促進作用の解析

解析候補因子の標的である受容体の阻害剤を脳損傷ゼブラフィッシュに投与し、阻害剤が脳損傷後の神経幹細胞の増殖に与える影響を評価する。損傷2日後に固定し、神経幹細胞マーカーおよび増殖細胞マーカーを用いた免疫染色を行い、2重陽性の細胞を増殖している神経幹細胞として定量化を行なった。

## 4. 研究成果

### 4. 1 ゼブラフィッシュ脳損傷モデルにおける網羅的な遺伝子発現解析

脳損傷6, 12, 24時間後および非損傷脳を用いてRNA-seqを行い網羅的な遺伝子発現解析を行ない、発現変動遺伝子の抽出およびGO解析によるパスウェイ解析を行なった(図2)。発現上昇遺伝子に着目したところ、ゼブラフィッシュ脳損傷後にIL6-Stat3パスウェイが活性化していることが示唆された。脳損傷後に阻害剤を投与したところ、ラジアルグリアの増殖が抑制され、非損傷脳にIL6リコンビナント(ヒト)を投与したところ、ラジアルグリアの増殖が誘導されたことから、IL6-Stat3シグナル経路が脳損傷後のラジアルグリアの増殖誘導に寄与することが明らかとなった。また、損傷初期には分泌因子の発現変化が顕著であり、マウス脳損傷モデルでの損傷初期の発現解析の公共データと比較することで、再生に重要な分泌因子の探索を試みた。

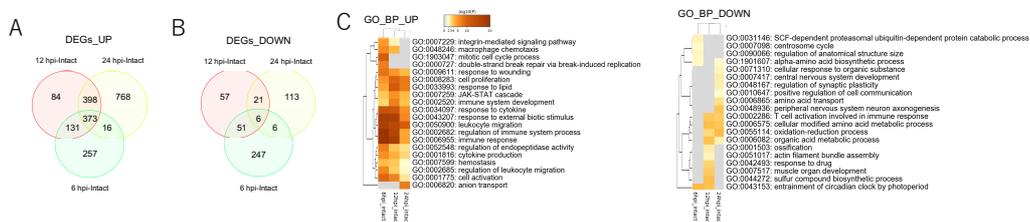


図2 ゼブラフィッシュ脳損傷後の発現変動遺伝子およびパスウェイ解析

### 4. 2 ゼブラフィッシュ-マウス間での遺伝子発現比較

BioMartにより、ゼブラフィッシュ-マウス間に対応関係のあるオースログは17,357個であった。これらの遺伝子の中で、発現上昇した遺伝子に着目したところ、図3のような結果となり、ゼブラフィッシュのみで発現上昇した遺伝子は508個であった。さらに、UniProtKBにおいて分泌因子として登録されている遺伝子に着目したところ、50個の”secreted”に分類される遺伝子が抽出され、再生促進的な働きを持つことが報告されている”Igf2”や”Manf”などが含まれていることが明らかとなった。一方、神経幹細胞が受容体を発現するものの増殖・分化に関わる作用が未知な因子が抽出された。再生能が異なる生物種間での遺伝子発現比較により、再生促進的に働く因子が抽出されたことから、機能が未知な抽出因子の中にも促進的に働く因子が含まれていることが期待される。

	ゼブラフィッシュのみ	マウスのみ	共通
発現上昇	508	267	137

図3 ヒト神経幹細胞を用いた増殖促進作用の評価

### 4. 3 ヒト神経幹細胞を用いた増殖促進作用の解析

4.2により抽出された50個の分泌因子のうち、神経幹細胞が受容体を発現し、神経幹細胞の増殖・分化に関わる機能が未知である因子について、ヒト神経幹細胞を用いて増殖促進作用について評価を行なった。EGFおよびFGF2を含む培地に解析候補因子を添加し、添加1日後の増殖率をEdU陽性率により定量化した。1遺伝子について、神経幹細胞の増殖促進作用を確認した(図4)。

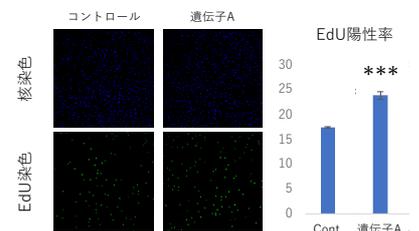


図4 ヒト神経幹細胞を用いた増殖促進作用の評価

### 4. 4 ゼブラフィッシュ脳損傷モデルを用いた増殖促進作用の解析

4.3により増殖促進作用が確認された分泌因子の受容体の阻害剤を、ゼブラフィッシュ脳損傷モデルに投与し、損傷後のラジアルグリアの増殖誘導に与える影響を評価した。損傷2日後において、増殖細胞マーカー陽性のラジアルグリアを定量化したところ、阻害剤は損傷後のラジアルグリアの増殖を有意に抑制することが明らかとなった(図5)。今後、神経分化に関連する作用の検証やマウス脳損傷モデルにおける機能解析による、神経再生促進的な作用の検証が必要である。

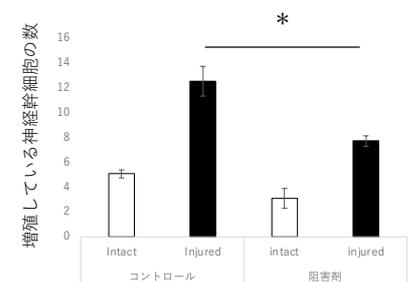


図5 阻害剤による脳損傷後のラジアルグリアの増殖抑制

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 1件）

1. 著者名 Kiyooka Mariko, Shimizu Yuki, Ohshima Toshio	4. 巻 529
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibition promotes regenerative neurogenesis after stab wound injury in the adult zebrafish optic tectum	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 366 ~ 371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.025	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 Shimizu Yuki, Kiyooka Mariko, Ohshima Toshio	4. 巻 9
2. 論文標題 Transcriptome Analyses Reveal IL6/Stat3 Signaling Involvement in Radial Glia Proliferation After Stab Wound Injury in the Adult Zebrafish Optic Tectum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 668408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.668408	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 Ueda Y, Shimizu Y, Shimizu N, Ishitani T, Ohshima T.	4. 巻 526
2. 論文標題 Involvement of sonic hedgehog and notch signaling in regenerative neurogenesis in adult zebrafish optic tectum after stab injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 2360-2372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24489.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 清水勇気
2. 発表標題 Comparative analysis of brain injury models using small fish with different regenerative abilities
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水勇気
2. 発表標題 小型魚類を用いた脳損傷モデルの作製および 組織再生を制御する分子機構の探索
3. 学会等名 第5回 ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会(ZMDD2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu Y, Kiyooka M and Ohshima T
2. 発表標題 Analysis of molecular mechanisms regulating proliferation of radial glia after stab injury in adult optic tectum.
3. 学会等名 The 14th international zebrafish conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimizu Y, Ueda Y, Ohshima T.
2. 発表標題 Analysis of Shh signaling on radial glia proliferation and differentiation after stab injury in the adult zebrafish optic tectum
3. 学会等名 11th Zebrafish Disease Models Conference (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------	---------