

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23773

研究課題名（和文）脳障害後の神経回路再編における時空間的・神経活動依存的な遺伝子発現の包括的解析

研究課題名（英文）Analysis of spatio-temporal gene expression patterns after brain injury

研究代表者

佐藤 時春（Sato, Tokiharu）

新潟大学・脳研究所・特任助教

研究者番号：40542387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳障害は神経回路機能の破綻を引き起こす。その後、再編により代償性の回路が形成され、一定の機能回復を示す。本研究では回路再編にはたらく遺伝子の時空間的発現パターンを解明することを課題とした。梗塞による大脳皮質障害後、残存した皮質脊髄路の経時的な再編パターン、および脊髄内における遺伝子の時空間的発現パターン、さらには、リハビリテーションにより惹起される神経活動依存的な遺伝子発現を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

回路再建・機能回復を促す鍵となる要因を解明することは、脳損傷後の新規治療法開発につながる可能性がある。そのためには、回路再編に関わる細胞の動態を損傷後の時間軸に沿って一つ一つ明らかにすることが重要である。本研究は、回路再編の基盤となる遺伝子発現プロファイルを細胞の種類および時間軸に沿って明らかにしたという学術的意義がある。得られた成果をさらに発展させ、より有効な治療法開発への一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Brain injury damages neural circuits and severely impairs neural functions, however, spared neuronal circuit is often reorganized and partially recovers the functions. In the present study, we examined the gene expression patterns which regulate the process of neuronal reorganization. We revealed spatio-temporal gene expression patterns induced by the injury and neural activity that was evoked by rehabilitative training.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路 再編 脳神経疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

梗塞や外傷により脳が損傷をうけると神経回路が壊れ、機能不全を引き起こす。しかし、一部で代償性の回路を再建し、神経機能を回復させることが近年わかってきた。なかでも、運動をつかさどる皮質脊髄路は、損傷後に軸索側枝を伸ばし新たな回路へと再編し、機能回復に重要であることが報告されている。さらにリハビリテーションは、この回路形成を促すことも示されている。この再編を制御する因子の同定やメカニズムの研究が精力的に行われているが、回路、細胞種ごとにおける時間的・空間的な再編機序は十分に解明されておらず、損傷により失われた運動機能を十分に回復できていない問題がある。特に、どのような因子がいつどこで発現しているのか、再編過程における遺伝子発現パターンは未解明のままである。

2. 研究の目的

回路再編を促す因子群が、どのように時間的・空間的に制御され、リハビリテーションにより惹起される神経活動に依存して発現誘導されるか明らかになっていない。本研究では、再編を制御する要因を同定し、そのメカニズムを明らかにするため、脳損傷後の時間・細胞種に切り分けた遺伝子発現パターンの解析を行い、回路再編の基盤となる遺伝子発現データベースの構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳損傷モデルマウスの作製

本研究では、脳損傷のモデルとして、成体マウス（オス、8週令）の左側大脳皮質に梗塞（Photothrombosis法）を引き起こした梗塞モデルマウスを用いた。

(2) 脳損傷後における代償的な神経回路の評価

損傷後、反対側の運動野に順行性トレーサー（BDA）を注入し、非損傷側の皮質脊髄路を標識した。損傷後経時的に頸髄を採材し、凍結組織より凍結切片を作製し、BDAを染色した。頸髄における軸索発芽の割合を正中線を越える軸索数で定量し、評価した。

(3) 運動トレーニング

神経活動と回路再編を促進するリハビリテーションモデルを確立するため、ローターロードによる運動トレーニングを実施した。損傷後1ヶ月間トレーニングを行った。機能回復の程度を評価するためにローターロードテストを損傷前、および損傷後経時的に行った。

(4) 脳損傷後における遺伝子発現解析

損傷後の脊髄からmRNAを単離した。抽出したmRNAの精製度は、定量的RT-PCR法により、マーカー遺伝子の発現を比較することで評価した。その後、ライブラリーを調整し、次世代シーケンサーにてRNAシーケンスを行った。また、運動トレーニングを実施したマウスからmRNAを単離し、RNAシーケンスを行い、遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

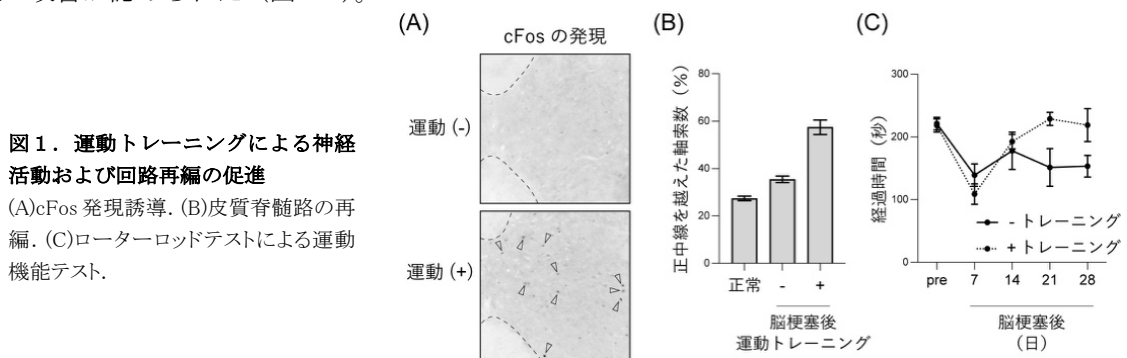
(1) 脳損傷後における代償的な神経回路

健常なマウスでは、右側の皮質脊髄路は、頸髄の左側へ投射する。この軸索が、左側大脳皮質を損傷したマウスにおいて、正中線を越え右側へも投射することが認められた。この正中線を越え

る軸索数は、損傷後経時的に増加することを見出した。

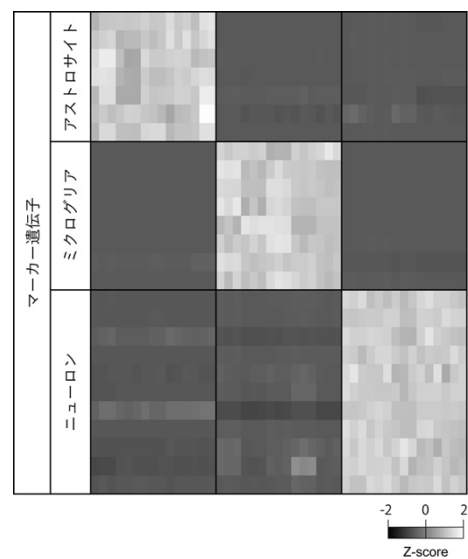
(2) リハビリテーション法の確立

実施した運動トレーニングが神経活動、回路再編さらに機能回復を促進するかどうか検証した。まず、神経活動のマーカーである cFos の発現を免疫組織染色法で観察したところ、ローターロード実施後の頸髄内において cFos の発現が認められた (図 1 A、下段)。一方、トレーニングを施していないマウスでは、cFos の発現はほとんど認められなかった (図 1 A、上段)。次に、回路再編の程度について、(1)と同様に正中線を越える軸索数で評価したところ、トレーニング実施群では、非トレーニング群と比べ損傷側へ侵入する軸索数の増加が認められた (図 1 B)。機能回復の程度をローターロードテストにより評価した。リハビリテーション実施群において、運動機能の改善が認められた (図 1 C)。



(3) 脳損傷後における遺伝子発現パターンの解析

まず、mRNA が単離されているかどうかを定量的 RT-PCR 法を用いて評価した。その後、RNA シークエンスを行い、時系列トランスクリプトームデータを取得した。得られたデータセットからアストロサイト、ミクログリア、ニューロンに特異的な遺伝子群を抽出・比較したところ、サンプルの細胞特異性が高い時系列トランスクリプトームデータであることが認められた (図 2)。次に、非損傷群と比較し、1.5 倍以上の発現変動を示す遺伝子を抽出したところ、特徴的な変動パターンを示した。また、遺伝子オントロジー解析、パスウェイ解析を行い、どのような遺伝子群に変動が認められるかについて解析を行った。その結果、損傷急性期では、炎症関連遺伝子が多く変動していることが認められた。さらに、リハビリテーションを施したサンプルのトランスクリプトームデータを解析したところ、神経活動により発現が制御される遺伝子群の存在を見出した。



本研究により、脳障害後における神経回路再編の機序を理解する上での基盤となる遺伝子発現の情報が得られた。今後、得られた研究成果をもとに、解析を進めることで、再編を促す因子を同定し、回路再建から機能回復を促進させる新たな治療戦略開発への一助となることが期待できる。

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 Sato Tokiharu, Homma Ryota, Nagayama Shin	4. 巻 7
2. 論文標題 Direct Comparison of Odor Responses of Homologous Glomeruli in the Medial and Lateral Maps of the Mouse Olfactory Bulb	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eneuro	6. 最初と最後の頁 0449 ~ 19.2020
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0449-19.2020	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0件

〔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
---------	---------