

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82404

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19583

研究課題名(和文) グリア細胞シングルセル解析に基づくリハビリテーション効果促進薬開発の分子基盤構築

研究課題名(英文) The development of drugs that promote neurorehabilitation effects based on glial cell single cell analysis.

研究代表者

越智 広樹(Ochi, Hiroki)

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・研究員

研究者番号：30582283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グリア細胞のシングルセル解析を通じて、リハビリテーションによる神経回路再構築メカニズムを解明することを目的として、研究を行った。そのために、まず脊髄からグリア細胞を効率よく単離する方法を検討した。また、脊髄損傷モデルに対して効果的かつストレスの少ないリハビリテーションの方法を検討した。さらに、これらの検討を通して、リハビリテーションを施した脊髄損傷モデルから単離したグリア細胞のシングルセル解析を実施すべく一連の予備検討を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経障害後のリハビリテーション介入が、神経機能の回復に促進的に働くことは、広く認識されるに至ったものの、未だにその分子メカニズムを明らかにした報告はなく、リハビリテーション医学として更に発展するためには、明確な分子メカニズムの解明が喫緊の課題である。本研究において、グリア細胞に着目し、リハビリテーションの効果を分子レベルで明らかにすることで、リハビリテーションによる神経回路の再構築メカニズムを明らかにするだけでなく、これまではなかった、リハビリテーションの効果を促進する薬剤の開発へ繋げるための、分子基盤構築ができるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of neural circuit reconstruction by rehabilitation through single-cell analysis of glial cells. We first investigated methods to efficiently isolating glial cells from the spinal cord. Additionally, we examined effective and minimally stressful rehabilitation methods for spinal cord injury models. Furthermore, through these investigations, and various preliminary preparations were performed for single-cell analysis of glial cells isolated from spinal cord injury models with rehabilitation.

研究分野：整形外科

キーワード：グリア細胞 脊髄損傷 リハビリテーション

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経損傷後のリハビリテーション (以下、リハビリ) 介入により運動機能の回復が得られることはよく知られており、ニューロンの可塑性が亢進することで、神経回路の再構築が促され機能回復に繋がると考えられているが、その分子メカニズムは不明である。リハビリテーションによる神経回路の再構築には、周囲細胞、特にグリア細胞や血管による支持が重要と考えられるが、リハビリがグリア細胞に及ぼす影響に関しては全く不明である。グリア細胞のうち、アストロサイトは、グリア細胞の中で最も数が多い細胞群であるにも関わらず、これまではニューロンを支持するだけのサイレントな細胞だと考えられてきた。しかしながら近年の研究により、アストロサイトが中枢神経系の恒常性維持において本質的な役割を果たしていることが明らかとなってきており、このことは、神経損傷後の再生や神経回路の再構築においても重要な役割を担っていることは想像に難くない。しかしながら、そもそもアストロサイトが、リハビリ介入においてどのような役割を担っているかについて情報は皆無である。興味深いことに、ごく最近の研究において、アストロサイトは存在する神経領域によってその特性が極めて異なることが明らかとなった (Nature Neuroscience 2020)。このことは、神経損傷部位に集積するアストロサイトも同様に、必ずしも均一ではなく、多種多様な特性・機能を有した集団である可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

本検討では、シングルセル解析に基づき、リハビリ介入に応答し形成される新たなアストロサイトのサブポピュレーションを発見し、検出された細胞集団特異的なバイオマーカーを探索することで、リハビリによる神経回路の再構築メカニズムを目的とし研究を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では以下の方法に基づいて研究を実施した。

### 1) 脊髄アストロサイトの単離方法の確立

脊髄からアストロサイトを単離する方法として MACS 法を用いて検討した。

### 2) 効果的なリハビリテーション方法の検討

脊髄損傷後のリハビリテーションの方法を、様々な運動負荷器具を用いて検討した。

### 3) 脊髄損傷モデルにおける脊髄アストロサイト特異的遺伝子の探索

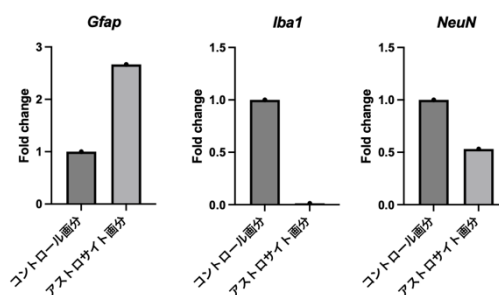
脊髄損傷後、アストロサイトにおいて発現が変動する遺伝子群を、経時的に探索した。

## 4. 研究成果

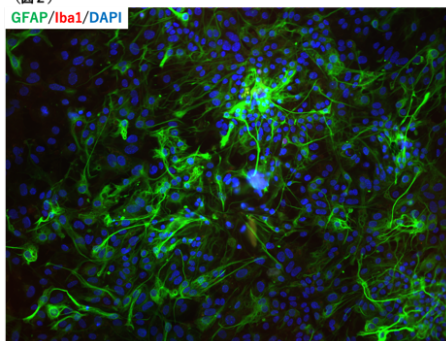
### 1) 脊髄アストロサイトの単離方法の確立

マウス脊髄は、脳組織と比較して髄鞘が多く、細胞単離が困難であるとされている。実際、脳組織から細胞を単離する方法を用いて、脊髄からの細胞単離を行った場合、髄鞘の混合が多く、細胞の回収率が低かった。そこで本検討では、磁気ビーズを用いた MACS 法により脊髄の細胞成分を単離することを試みた。加えて、組織から髄鞘を除去する方法に独自の改良を加え、効率よく細胞が採取可能であるか検討した。単離した細胞画分における既知の特異的マーカー遺伝子発現を分子生物学的に解析した結果、各細胞画分において特異的マーカー遺伝子が高発現していることを確認した (図1)。加えて特異的マーカーを用いて、細胞の免疫染色を実施した。その結果、多くの細胞がアストロサイトのマーカータンパク質を発現していた一方で、他の細胞のコンタミネーションも確認された (図2)。現在さらに採取方法を改良し、より純度の高い単離方法を検討中である。

(図1)



(図2)

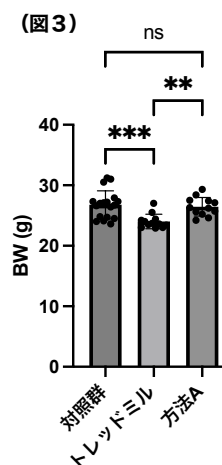


## 2) 効果的なリハビリテーション方法の検討

マウス脊髄損傷モデルに対するリハビリテーションの方法として、トレッドミルを用いた方法が従来から使用されている。しかしながら、動物へのストレスが大きいことから適切なリハビリテーション介入方法であるとは言い難い。そこで本研究では、他の介入機器を用いて、動物のストレスを最小限とし、効果的なリハビリテーション効果を得られる方法を評価した。リハビリテーション介入後の体重変化ならびにリハビリの効果を経時的に評価し、トレッドミルと同定度（あるいはそれ以上）の効果でストレスの少ない方法を検討した（図3）。現在検討した方法による脊髄損傷モデルに対する効果を詳細に検討中である。

## 3) 脊髄損傷モデルにおける脊髄アストロサイト特異的遺伝子の探索

脊髄損傷モデルに対してリハビリテーションを実施し、脊髄アストロサイトの単離を試みた。今後、アストロサイトのシングルセル解析を実施予定である。加えて、*in silico*において、脊髄損傷を生じさせた後、アストロサイト特異的に発現が経時的に変化する遺伝子の探索を実施した。現在、数種類の遺伝子を候補として挙げ、それらの実際の発現パターンならびに機能解析を検討している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------