

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19690

研究課題名（和文）エピジェネティクスが支える脳卒中再生リハビリテーションの探求

研究課題名（英文）Regenerative rehabilitation of stroke supported by epigenetics

研究代表者

前島 洋（Maejima, Hiroshi）

北海道大学・保健科学研究院・教授

研究者番号：60314746

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）：軸索髄鞘化が期待されるシュワン細胞移植と薬理的エピジェネティクス制御が脳出血後の機能回復に与える効果を検証するため、シュワン細胞を対象とするin vitro実験、脳出血モデルラットを対象とするin vivo実験を実施した。シュワン細胞に対する薬理的エピジェネティクス制御によりミエリン関連因子、成長因子等の発現が持続的に増強され、シュワン細胞の機能化を促進する可能性が示唆された。薬理的エピジェネティクス制御とリハビリテーションを併用により、脳出血モデルラットにおける巧緻的運動機能が相乗的に回復することを示した。損傷域へのシュワン細胞移植により脳梁白質域において生着し、髄鞘化を示唆する所見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医学の進歩に伴い、脳卒中中の運動機能回復を目的とする再生リハビリテーション（リハ）の発展が期待されている。本研究は細胞移植に基づく脳卒中再生リハに対して薬理的エピジェネティクス制御を併用することを最終的に還元することを目的とする研究であり、エピジェネティクス制御によるリハビリテーション効果の促進と移植細胞の遺伝子発現修飾についての基礎的所見を得た。更に軸索再生阻害因子を発現することなく髄鞘化に寄与するシュワン細胞の脳における生着を確認した。将来的にこれらの所見に基づく併用療法が臨床応用され、更なる機能回復が期待される新たな脳卒中リハビリテーションへ貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：We performed in vitro study using Schwann cell and in vivo study using model rat for intracerebral hemorrhage (ICH) to elucidate the therapeutic effects of Schwann cell transplantation and epigenetic regulation using histone deacetylase (HDAC) on rehabilitation following ICH. Pharmacological treatment with HDAC inhibitor enhanced the expression of myelin marker and growth factors sustainably, which could suggest the function of Schwann cells. Combined therapy of HDAC inhibition and rehabilitation recovered the impairment of skilled motor function in a synergic manner in ICH model rats. Schwann cells transplanted to brain lesion survived in the white matter, specifically in the corpus callosum and possibly suggested myelination.

研究分野：リハビリテーション科学

キーワード：リハビリテーション 再生医学 脳卒中 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生医学の進歩に伴い、脳卒中の運動機能回復を目的とする再生リハビリテーション（リハ）の発展が期待されている。再生リハにおいて、移植細胞が残存細胞と相互作用して機能性を獲得するために、単に細胞移植に留まらず、運動療法等のリハビリテーションによる言わば「移植細胞の教育」が必要となる。そのためには、再生リハ効果を最大限に惹起するための「細胞の教育環境」とも云うべき脳内環境の制御が期待される。そこで本研究では、今日、遺伝子発現の調整機構として注目されるエピジェネティクスをこの脳内環境制御に応用が期待された。

代表的なエピジェネティクス制御として、遺伝子情報 DNA が核内で梱包されるヒストンのアセチル化は、DNA のヒストンへの巻き付きを緩ませ、転写因子等の DNA 転写領域へのアクセスを容易にし、遺伝子発現を総じて促進させる。これ促すヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬の投与によるヒストンのアセチル化は遺伝子発現の応答性を亢進し、各種遺伝子発現を増強する。そこで、本研究ではこのエピジェネティクス制御に基づき、HDAC 阻害剤投与により遺伝子発現が増強される可塑的脳内環境を再生リハに対して提供する。

中枢神経の軸索における髄鞘はオリゴデンドロサイトにより形成される。一方、中枢神経損傷に伴う軸索損傷においてオリゴデンドロサイトは Nogo をはじめとする軸索再生阻害因子を発現し、このことが中枢神経における軸索再生を阻害する大きな要因となっている。一方、シュワン細胞は軸索伸長阻害因子を発現することはなく、脊髄・脳における移植後の髄鞘形成も確認されている (Plant GW et al, Brain Res 1995)。また、オリゴデンドロサイトの入手・培養の困難さに比べて、シュワン細胞の分離、培養は容易であり、中枢神経系への代用的移植が期待されている。

2. 本研究の目的

本研究では、内包、線条体出血片麻痺モデルの損傷域にシュワン細胞を移植し、HDAC 阻害による脳内環境制御のもとで機能回復のための運動療法を実施し、軸索再生を伴う機能回復効果の可能性を模索することを目標とした。そのための基礎研究として、以下の培養シュワン細胞を用いた *in vitro* レベルの検証から、脳出血モデルラットを用いた *in vivo* 実験に関して以下の検証を行うことを目的とした。

(1) *in vitro* レベルでのラットシュワン細胞への HDAC 阻害薬投与効果の検証：中枢神経系 (CNS) 損傷に対するシュワン細胞移植は、軸索リモデリング、ミエリン化を伴う機能回復が期待される。酪酸ナトリウム (sodium butyrate, NaB) に代表する HDAC 阻害薬は神経栄養因子の発現増強やミエリン化を促す一方、アポトーシスを誘引する可能性が懸念された。そこで、NaB 投与量に依存したシュワン細胞の細胞生存、神経栄養因子、ミエリン関連因子、アポトーシスマーカーの遺伝子発現に及ぼす影響について培養シュワン細胞を用いて検証することを目的とした。

(2) *in vivo* における脳出血モデルラットを対象とする HDAC 阻害薬とリハビリテーションの併用効果の検証：内包・線条体出血モデルラットを対象に、麻痺前肢を用いた餌把持訓練によるリハビリテーション (skilled reaching training) と薬理的エピジェネティクス制御の複合療法による前肢巧緻運動機能回復への効果とその背景因子となる損傷側運動野の可塑的機能修飾について検証することを目的とした。

(3) 脳出血損傷域における移植シュワン細胞の生着性の検証：蛍光マーカー-GFP を遺伝子導入したラットシュワン細胞を脳出血モデルラットの脳損傷域に細胞移植し、その生着性と機能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* レベルでのラットシュワン細胞への HDAC 阻害薬投与効果の検証：

ラットシュワン細胞の培養細胞を対象に、複数濃度 (0 (Control)、0.1、1.0、5.0、10.0、50.0 mM) の NaB を培地に添加し 24 時間の培養を実施した。細胞生存率は、NaB 添加 24 時間後にテトラゾリウム塩を用いた比色法により計測した。同時に mRNA 相対発現量の計測を目的に NaB 添加 24 時間後に細胞を回収、mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて、アポトーシス関連因子である caspase-3、神経栄養因子である脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、インスリン様成長因子 1 (IGF-1)、ミエリン関連因子であるミエリン塩基性タンパク (MBP) の mRNA 発現量を相対定量した。更に NaB 投与による上記修飾の持続性を検証するため、NaB 添加培養 24 時間後に NaB 無添加培地に交換し、更に 24 時間培養した際の細胞生存率および各 mRNA 発現の定量を実施した。各 NaB 濃度群の群間差について一元配置分散分析法と事後検定により検証した。

(2) in vivoにおける脳出血モデルラットを対象とするHDAC阻害薬とリハビリテーションの併用効果の検証:

雄性Wistarラットを脳出血(intracerebral hemorrhage, ICH)術施行後、NaB投与および麻痺前肢のskilled reach trainingを用いたリハビリテーション(Rehab)の各要因により、雄性WistarラットをSham群(n=8)、ICH群(n=8)、ICH+NaB(n=8)、ICH+Rehab(n=9)、ICH+NaB+Rehab(n=9)の5群に群分けした。ICH術としてステレオタキシックシステムにより線条体・内包部へのコラゲナーゼをマイクロインジェクションし、脳出血片麻痺モデルを作成した。ICH術後4日目より週5日4週間のNaB投与とリハビリテーションを実施した。ICH+NaB、ICH+Rehab+NaB群に対してHDAC阻害薬NaB(300mg/kg)をリハビリテーション施行15分前に投与した。ICH+Rehab群およびICH+NaB+Rehab群においては、麻痺側前肢による15分内のペレット把持練習(single pellet reaching task, SPRT)を実施した。

経時的な行動評価として神経学的評価であるmodified neurological severity score (mNSS)試験とともに、SPRTを評価した。SPRT評価の指標としてTotal success rateおよびFirst trial success rateを用いた。Total success rate = 100% × (total success) / trials、First success trial rate = 100% × (first try success) / trials

4週間の介入後、全脳を採取して2mm切片を作成し、bregmaより前方4-6mmに位置する切片より両側大脳皮質運動野を単離し、生化学、分子生物学的解析に用いた。大脳皮質運動野を対象に脳由来神経栄養因子BDNFとその受容体TrkB、前シナプスマーカーであるSynaptophysin、後シナプスマーカーであるPSD95のmRNA発現についてRT-PCRに基づくリアルタイムPCR法により定量解析した。また、ヒストンのアセチル化レベルの検証としてtotal histone H4のアセチル化についてELISA法に基づき定量解析した。

(3) 脳出血損傷域における移植シュワン細胞の生着性の検証:

移植細胞の作成として、ラットシュワン細胞に対してレンチウイルスベクターを用いてクラゲ蛍光GFP遺伝子およびHygromycine耐性遺伝子を遺伝子導入した。培地へのHygromycine Bの添加した培地によるGFP陽性細胞のセレクションを進め、その後、Hygromycine除去培地で培養、継代して細胞を凍結保存した。移植準備として、凍結保存したシュワン細胞を解凍し、総数が 3.5×10^6 の細胞を24-well plate(蛍光確認用)と60mm dish(5.0×10^5 cells/dish)へ播種、培養し、移植日に約 7.0×10^6 cellsを回収した。 7.0×10^6 cellsを70 μ lの生理食塩水にて溶解し 1.0×10^5 cells/ μ lの細胞懸濁液を作成した。

ラットのICH術としてステレオタキシックシステムを用いたコラゲナーゼの線条体、内内包域へのマイクロインジェクションによりICHを誘導した。ICH術後、細胞移植前に前述(2)同様のmNSSによる行動評価により片麻痺を確認し、細胞移植に処した。

ICH術7日後にICH術同様のステレオタキシックシステムを用いて脳損傷域にGFP陽性シュワン細胞(1.0×10^5 cells/ μ l, 10 μ l)をマイクロインジェクション移植した。ラットを3群に群分けし、移植後3日、7日、14日において灌流固定後に全脳を採取し、組織化学的解析に用いた。脳切片を対象にGFP抗体、アストロサイトマーカーGFAP抗体を用いた免疫染色を行い、シュワン細胞の生着と併せてアストロサイトの動態について検証した。

4. 研究成果

(1) in vitroレベルでのラットシュワン細胞へのHDAC阻害薬投与効果の検証:

細胞生存率に関しては、一元配置分散分析における有意な群間差が認められ、多重比較の結果、Control群と比較して、10 mM群を除く0.1 mM、1.0 mM、5.0 mMおよび50.0 mM群において細胞生存率が有意に減少していた。Caspase-3 mRNA発現量に関しては、一元配置分散分析における有意な群間差が認められ、多重比較の結果、Control群と比較して、10.0 mMおよび50.0 mM群においてcaspase-3 mRNA発現がControl群と比較して有意に増強していた。

BDNF mRNA発現量についても、有意な群間差が認められ、多重比較の結果、Control群と比較して、50 mM群においてBDNF mRNA発現が有意に増強した。GDNF mRNA発現量についても有意な群間差が認められ、多重比較の結果、Control群と比較して1.0 mM、5.0 mMおよび10.0 mM群においてGDNF mRNA発現が有意に増強していた。IGF-1 mRNA発現量に関しては、有意な群間差が認められ、多重比較の結果、Control群と比較して、5.0 mM、10.0 mMおよび50.0 mM群においてIGF-1 mRNA発現が有意に増強していた。

MBP mRNA発現量に関しては、一元配置分散分析における有意な群間差が認められ、多重比較の結果、Control群と比較して、1.0 mM、5.0 mMおよび10.0 mM群においてMBP mRNA発現が有意に増強していた。

以上の所見より、細胞生存について、細胞生存率とcaspase-3 mRNA発現の間に相関性は示されず、NaB処理はcaspase非依存性の細胞死を誘引することが示唆された。神経栄養因子については、NaB処理により神経栄養因子が発現しやすい状態に制御することが示唆された。更に軸索再生におけるシュワン細胞の主要な機能として期待されるミエリン化に関して、1.0~10.0 mMのNaB添加によりミエリン関連因子の遺伝子発現が増強したことから、NaBがシュワン細胞によるミエリン化を促進的に制御することが示唆された。

そこで、24時間の0、1.0 mM、10.0 mMのNaB添加後においてNaB無添加培地に交換し、24時間培養後の各mRNA発現を定量した。細胞生存率は1.0 mM群、10.0 mM群において低下していた

が、1.0 mM 群、10.0 mM 群の両群間の有意差は認められなかった。BDNF は3群間の差は認められなかった。GDNF は1.0 mM、10.0 mM の NaB 添加により増強するが、1.0 mM、10.0 mM の両群間での差は認められなかった。IGF1 は10mM の NaB 添加により増強したが、1.0 mM の NaB 添加による発現増強を認められなかった。ミエリン関連蛋白 MBP の発現は10mM の NaB 添加により増強したが、1.0mM 添加による発現増強は認められなかった。以上より、NaB 投与により細胞生存率の低下が生じる一方で、10.0 mM の NaB 投与により栄養因子 GDNF、成長因子 IGF- 1 に加えてミエリン関連因子 MBP の発現が持続的に増強されることが確認された。

以上の所見は *in vivo* におけるシュワン細胞移植前後の NaB 投与後のリハビリテーションの therapeutic time window を検討する基礎データとしての有用性ととも、移植前におけるシュワン細胞における HDAC 阻害薬による薬理的エピジェネティクス制御の有用性を示唆する所見でもある。

(2) *in vivo* における脳出血モデルラットを対象とする HDAC 阻害薬とリハビリテーションの併用効果の検証 :

ICH 後介入前における行動評価として mNSS および SPRT 評価の何れにおいても Sham 群に対して ICH 術施行4群において有意な機能低下が認められ、ICH 施行4群間における有意差は認められなかった。従って、ICH 術により4群において同程度の機能低下と ICH 術の再現性を確認した。4週間に渡る介入後、SPRT 評価の Total success rate において、ICH+NaB+Rehab のみが ICH 群と比較して有意な機能改善を示し、Sham 群との有意差は認められない改善を示した。一方、ICH+NaB 群、ICH+Rehab 群は ICH 群と比較して有意な機能差は認められなかった。更に First trial success rate においても、ICH+NaB+Rehab のみが ICH 群と比較して機能改善の傾向を示し、Sham 群との有意差は認められなかった。従って、NaB 投与およびリハビリテーション単独での脳出血後の前肢の巧緻的機能に対する効果は乏しいが、NaB 投与とリハビリテーションを併用した介入においてのみ巧緻的機能回復が確認された。以上の所見から、薬理的エピジェネティクス制御を併用したリハビリテーションは脳出血後の巧緻的運動学習を促進し、相乗的に機能回復を促進することが示唆された。

介入4週後の大脳皮質運動野における mRNA 発現に関して、非損傷側における各遺伝子発現の群間差は認められなかった。一方、麻痺側において前シナプスマーカーである synaptophysin の発現に特色的な発現修飾を確認した。ICH 群における synaptophysin 発現は Sham 群、ICH+NaB+Rehab 群の2群よりも低下していた。即ち、ICH により synaptophysin の発現は低下し、NaB 投与とリハビリテーションの併用により Sham 群レベルまで回復しており、ICH 後の併用療法によりシナプス増強が示唆される所見であった。

ヒストンのアセチル化の所見として、損傷側において ICH+NaB 群は Sham 群および ICH+NaB 群と比較してアセチル化レベルが低下していた。即ち、NaB 投与によるアセチル化の低下を示す所見が確認された。先行研究における time course study において、NaB によるヒストンアセチル化レベルの増強は投与後30分程度で投与前に戻り、その後12時間においてはより投与前より低いレベルを持続すると報告されている (Wang T. Epigenetics 2018)。本研究における所見もこれに准ずる現象である可能性が推察され、行動評価、mRNA 発現所見における Na 投与とリハビリテーションの相乗的効果を鑑みると、リハビリテーション実施時の運動学習時においてはアセチル化の増強が生じていた可能性が推察される。

(3) 脳出血損傷域における移植シュワン細胞の生着性の検証 :

ICH 後3日目において ICH 周辺領域において GFAP の反応の増加しており組織損傷が確認された。損傷域における GFP 反応は乏しく、一部 GFP 反応が確認されたが、シュワン細胞の伸長を示す線維状の形態は認められなかった。損傷域においてはほとんどの移植細胞は流出し、一部残存した細胞においても変性の進行が示唆された。一方、興味深いことに、より皮質に近縁した脳梁部において GFP 反応が認められ、シュワン細胞に特徴的な線維状に伸長した形態を観察した。脳梁部における移植シュワン細胞の生着と残存軸索に沿った伸長が示唆された。

その後の ICH 後14日目においても同様に、脳梁部において GFP 反応としてシュワン細胞に特徴的な線維状に伸長した形態が観察された。一方、損傷域周囲においては一部で顆粒状の GFP 反応が確認され、死滅した GFP 陽性シュワン細胞の核の残存が示唆される所見であった。

以上より、移植シュワン細胞は脳出血損傷を呈す線条体、内包域周辺での生着は困難である一方、より皮質近縁の脳梁部に生着し、機能化する可能性が示唆された。脳梁白質域における軸索が残存する領域において移植シュワン細胞が生着する可能性が高く、今後、シュワン細胞によるミエリン化や既存細胞の保護と可塑的修飾を期待するうえで、移植領域の検討に対して有用な所見を得た。即ち、移植域としてより皮質近縁部の白質域へシュワン細胞を移植することにより、残存軸索のミエリン化を促し、軸索再生の促進とその皮質神経細胞の保護、可塑的機能促進に働く可能性が期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Nishio T., Inoue T., Takamatsu Y., Mishima T., Yakamura T., Soma K., Kondo Y., Okamura M., Ikegami R., Maejima H. | 4. 巻 45 (1) |
| 2. 論文標題 Epigenetic modification of histone acetylation in the sensorimotor cortex after intracerebral hemorrhage | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Biomedical Research (Tokyo) | 6. 最初と最後の頁 1-11 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.45.1 | 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 前島 洋 | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 脳卒中リハビリテーションにおける運動効果と脳のヒストン修飾の複合効果 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 体育の科学 | 6. 最初と最後の頁 824-829 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 6件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Maejima H., Nishio T., Ding Y., Tsutsumi K., Takamatsu Y., Masaki T. |
| 2. 発表標題 Gene expressions regulated by pharmacological inhibition of histone deacetylase in rat Schwann cell |
| 3. 学会等名 The Society for Neuroscience 52nd Annual Meeting (Neuroscience 2023) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Liu Y., Chen K., Takamatsu Y., Oka Y., Maejima H. |
| 2. 発表標題 Effects of combined therapy of pharmacological inhibition of histone deacetylases and skilled training on motor recovery after intracerebral hemorrhage |
| 3. 学会等名 The 6th FHS International Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Liu. Y., Chen K., Takamatsu Y., Oka Y., Maejima H. |
| 2. 発表標題 Effects of skilled reaching training and pharmacological inhibition of histone deacetylases on motor recovery after intracerebral hemorrhage |
| 3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2023) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Maejima H., Okamura M., Inoue T., Takamatsu Y. |
| 2. 発表標題 Different epigenetic modifications between ipsilateral and contralateral motor cortex caused by exercise and pharmacological inhibition of histone deacetylases after intracerebral hemorrhage |
| 3. 学会等名 The 44st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2022) (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西尾 太一, 井上 貴博, 高松 泰行, 三島 大雅, 高村 巴菜, 相馬 希帆, 前島 洋 |
| 2. 発表標題 脳内出血後の運動は損傷側大脳皮質におけるヒストンアセチル化を増強する |
| 3. 学会等名 第27回日本基礎理学療法学会学術大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 前島 洋 |
| 2. 発表標題 運動による脳におけるエピジェネティクス調整機構と神経栄養因子発現の修飾 |
| 3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Maejima H., Okamura M., Inoue T., Takamatsu Y. |
| 2. 発表標題 Epigenetic modifications in the motor cortex caused by exercise plus pharmacological inhibition of histone deacetylases (HDACs) after intracerebral hemorrhage. |
| 3. 学会等名 The 44st Annual Meeting of the Japan Neurosciece Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Maejima H., Kitahara M, Takamatsu Y., Mani H., Inoue T. |
| 2. 発表標題 Pharmacological inhibition of histone deacetylases (HDACs) presents an enriched neuronal platform in the brain for neurorehabilitation. |
| 3. 学会等名 The Society for Neuroscience 50th Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2021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 |
|-------|---|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 真先 敏弘 (Masaki Toshihiro) (00585028) | 帝京科学大学・医学教育センター・教授 (33501) | |
| 研究分担者 | 高松 泰行 (Takamatsu Yasuyuki) (40802096) | 北海道大学・保健科学研究院・助教 (10101) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|