

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15285

研究課題名（和文）脳梗塞後遺症治療に向けた神経傷害性アストロサイトを誘導する転写調節機構の解明

研究課題名（英文）Research of mechanisms in transcriptional regulation inducing neuroinflammatory astrocytes for treatment of post-stroke symptoms.

研究代表者

喜多 絢海 (Kita, Ayami)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：40881363

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：梗塞脳で出現する反応性アストロサイトには、神経傷害的なA1、神経保護的なA2が存在し、A1アストロサイトは脳梗塞後の神経再生過程における有害因子である。本研究では、新たな脳梗塞後遺症の治療標的の発見を目指して、A1およびA2アストロサイト両者の出現を促進する転写因子STAT3に着目し、A1およびA2アストロサイトの出現過程におけるSTAT3のタンパク質間相互作用を解析し、A1アストロサイトの出現に特異的なSTAT3の相互作用因子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞後遺症は、患者の生活の質を著しく低下させるが、現状、有効な治療法は確立されておらず、治療標的の発見は急務である。本研究では、A1アストロサイトの出現に関するSTAT3の相互作用因子を同定した。これら相互作用はA1アストロサイトの誘導を調節している可能性が考えられるため、新たな治療標的となる可能性がある。また、A1アストロサイトの出現は、脳腫瘍や神経変性疾患、老化による脳機能低下にも関与することが示唆されているため、本研究で得られた成果はこれら疾患の治療法や予防法の開発への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：Reactive astrocytes that appear in the infarcted brain regions include neuroinflammatory A1 and neuroprotective A2 astrocytes, and A1 astrocytes are detrimental factors in neuronal regeneration after stroke. In this study, we focused on STAT3, a transcription factor that promotes the induction of resting astrocytes into both A1 and A2 astrocytes, and analyzed protein-protein interactions of STAT3 during the induction of A1 and A2 astrocytes for the discovery of new therapeutic targets for post-stroke symptoms. We identified STAT3 interactors specific to the induction of A1 astrocytes.

研究分野：生物系薬学

キーワード：反応性アストロサイト タンパク質間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞後遺症は、患者の生活の質を著しく低下させるが、有効な治療法は確立されていない。梗塞脳において、アストロサイトは性質を変化させ、反応性アストロサイトと呼ばれる状態になる。反応性アストロサイトには、神経傷害的な A1 と神経保護的な A2 が存在する。A2 アストロサイトは脳梗塞後の神経再生過程を促進する一方、A1 アストロサイトによる神経再生の阻害は神経再生過程における有害因子のひとつである。このことから、A1 アストロサイトの出現のみを選択的に抑制することは脳梗塞後遺症の治療アプローチとなる。

梗塞脳における A1 および A2 アストロサイトの出現は、サイトカインや成長因子に誘導された複数の転写調節因子によって調節されている。これら転写調節因子は、一方の反応性アストロサイトの出現にのみ関与するわけではなく、両者の出現を調節する働きを有している。例えば、転写因子 STAT3 は A1 アストロサイトと A2 アストロサイトの両者の出現を促進する。このように、1 つの転写調節因子が複数の調節作用を表出するためには、他のタンパク質との相互作用が必要であることが予想される。しかしながら、A1 および A2 アストロサイトが出現する分子機構において、転写調節因子の機能を調節しているタンパク質間相互作用ネットワークの全貌は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、A1 および A2 アストロサイトが出現する分子機構において転写調節因子を取り巻くタンパク質間相互作用はどのように調節されているのか、その機構は脳梗塞後遺症の治療標的となるか、を明らかにすべく、A1 および A2 アストロサイト両者の出現を促進する STAT3 に着目し、A1 および A2 アストロサイトの出現過程における STAT3 のタンパク質間相互作用を網羅的に解析することで A1 アストロサイトの出現に特異的な相互作用を同定、同定した相互作用が A1 アストロサイトの出現を促進する分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトを用いた A1 および A2 アストロサイトへの誘導方法の検討

ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトを、Liddelow らの報告 (*Nature* 2017) に基づき、サイトカイン等を共添加することで、A1 もしくは A2 アストロサイトに誘導し、A1 アストロサイトマーカー遺伝子群 (C3、Serping1、Fkbp5) A2 アストロサイトマーカー遺伝子群 (Ptx3、Clcf1、S100a10) A1 アストロサイト、A2 アストロサイトの両者に共通する反応性アストロサイトマーカー遺伝子群 (Lcn2、Steap4、Osmr) の発現変化を real time RT-PCR で解析した。

(2) A1 アストロサイト誘導過程における STAT3 タンパク質間相互作用の解析

細胞内光クロスリンク法を用いて、A1 アストロサイトへの変化過程における STAT3 のタンパク質間相互作用の経時的な変化を調べた。細胞内光クロスリンク法とは、光クロスリンカーとして機能する人工アミノ酸を解析対象タンパク質に部位特異的に導入し、光を照射することで近傍の相互作用因子と架橋を形成させる手法であり、光照射の瞬間に生細胞内で実際に生じている相互作用を同定することが出来る。光クロスリンカーは  $N\epsilon$ -(*m*-trifluoromethyl diazirinyl benzyloxycarbonyl)-L-lysine (*mTmdZLys*) を使用した。アデノウイルスベクターを用いて、N 末端ドメインに光クロスリンカーを導入した STAT3 を発現させたラット初代培養アストロサイトを A1 アストロサイトに誘導し、誘導開始から 0、0.5、2、4、8、24 時間後の相互作用の変化を Western blotting で解析した。また、2 時間後の相互作用の変化を質量分析によって解析し、定常アストロサイトと比較することで、A1 アストロサイトへの変化に関与している相互作用を同定した。

## 4. 研究成果

(1) ラット大脳皮質由来初代培養アストロサイトを用いた A1 および A2 アストロサイトへの誘導方法の検討

A1 アストロサイトへの誘導のために、ラット由来培養アストロサイトに対して、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) IL-1 (3 ng/mL) C1q (400 ng/mL) を共添加し、24 時間培養後、各マーカー遺伝子の発現量変化を解析した。反応性アストロサイトマーカー遺伝子群および A1 アストロサイトマーカー遺伝子群の mRNA 発現量は増加し、A2 アストロサイトマーカー遺伝子群の mRNA 発現量は変化しなかった。このことから、A1 アストロサイトへの誘導に成功したことが確認できた。また、A2 アストロサイトへの誘導のために、ラット由来培養アストロサイトに対して、TNF- $\alpha$  (10、30、100 ng/mL) および IL-1 (10、30、100 ng/mL) もしくは、C1q (10、30、100 ng/mL) および IL-1 (10、30、100 ng/mL) を共添加し、24 時間培養後、各マーカー遺伝子

の発現量変化を解析したが、反応性アストロサイトマーカー遺伝子群の mRNA 発現量は増加したものの、A1 および A2 アストロサイトマーカー遺伝子群の mRNA 発現量増加は見られなかった。そこで、Tarassishin らの報告 (*Glia* 2014) に基づき、A1 および A2 アストロサイトの両者に誘導することにし、ラット由来培養アストロサイトに対して、poly I:C (10 µg/mL) を添加し、24 時間培養後、各マーカー遺伝子の発現量を解析した。反応性アストロサイトマーカー遺伝子群および A1 アストロサイトマーカー遺伝子群の mRNA 発現量は増加したが、A2 アストロサイトマーカー遺伝子群の mRNA 発現量は変化しなかった。これらから、既報の方法ではラット由来培養アストロサイトを A2 アストロサイトへ誘導出来ないと判断した。よって、以降の実験では、A1 アストロサイトについてのみ解析を行うことにした。

#### (2) A1 アストロサイト誘導過程における STAT3 タンパク質間相互作用の解析

細胞内光クロスリンク法では、解析対象タンパク質に光クロスリンカーを導入する必要がある。光クロスリンカー導入位置は、STAT3 と他転写因子との相互作用に重要だとされている N 末端ドメイン内の 85 番目のアルギニンとした。85 番目のアルギニンを光クロスリンカー *mTmdZLys* に置換した STAT3 (*R85mTmdZLys*) 変異体をラット由来培養アストロサイトに発現させ、細胞内光クロスリンク法によって、STAT3 と R85 近傍で相互作用するタンパク質との複合体を検出したところ、複数の STAT3 と相互作用因子との複合体が検出された。次に、検出された複合体の形成量が A1 アストロサイトへの誘導時に増加または減少するかの検討を行った。STAT3 (*R85mTmdZLys*) 変異体を発現させたラット由来培養アストロサイトを A1 アストロサイトに誘導し、誘導開始から 0、0.5、2、4、8、24 時間後の相互作用の変化を解析した。0.5~2 時間後に増強もしくは減弱する複合体が複数存在することが確認できた。そこで、これら複合体を構成しているタンパク質を同定すべく、STAT3 (*R85mTmdZLys*) 変異体を発現させたラット由来培養アストロサイトを A1 アストロサイトに誘導し、誘導開始から 2 時間後のサンプルを質量分析法で解析した。定常状態アストロサイトと比較して、増強もしくは減弱しているいくつかの相互作用を同定することに成功した。

本研究では、A1 アストロサイトの誘導に関与することが予想される STAT3 のタンパク質間相互作用を同定した。同定した相互作用が A1 アストロサイトの誘導にどのように関与しているかの検討を進めることで、本研究成果が脳梗塞後遺症の治療法の開発へ貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川出佑香, 田村静音, 島岡拓央, 村上明義, 喜多絢海, 荒木良太, 矢部武士
2. 発表標題 トマト由来アルカロイドTomatidineが脳虚血再灌流 障害時のミクログリアの活性化に与える影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 村上明義, 田村静音, 島岡拓央, 川出佑香, 山崎美渚, 喜多絢海, 荒木良太, 矢部武士
2. 発表標題 トマト由来アルカロイドTomatidineが一過性全脳虚血モデルマウスの認知機能低下と神経障害へ与える影響の解析
3. 学会等名 第73回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田村 静音, 島岡 拓央, 梁 亜衣, 喜多 絢海, 荒木 良太, 矢部 武士
2. 発表標題 神経障害性アストロサイトに対するトマト由来アルカロイド Tomatidine の影響の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
---------	---------