

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17799

研究課題名（和文）ダイレクトリプログラミングによる脳梗塞モデルマウスの海馬神経細胞と認知機能の再生

研究課題名（英文）Direct reprogramming of hippocampal astrocytes ameliorates recognition memory in mice with cerebral ischemia.

研究代表者

福井 裕介（Fukui, Yusuke）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：60824802

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）：ノックダウンすることでグリア細胞から神経系細胞を誘導できるPtpb1遺伝子の発現を阻害するプラスミドを、経静脈的投与により血液脳関門を通過し感染が可能なカプシドでパッケージングしたアデノ随伴ウイルスベクターを脳梗塞モデルマウスに投与した。投与8週目の新奇物体探索試験において、Ptpb1 KD群では新奇物体に対する接触時間の有意な延長を認め、認知機能の改善が見られた。また、海馬mCherry陽性細胞で、mCherry/NeuN二重陽性ニューロン様細胞が確認された。この海馬における新しい神経系細胞は神経回路のより多くの構築に寄与することで認知機能の改善につながると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳梗塞の治療はリハビリを除くと急性期に限られていることから、in vivoダイレクトリプログラミングにより神経系細胞を誘導し、脳梗塞で失われた神経機能を再生することは、新たな治療戦略を提示する重要な役割を持つ。本研究では、海馬領域において神経細胞新生を亢進し、脳梗塞後のマウスの認知機能障害の改善に成功したことから本手法による治療介入の可能性が示された。また、経静脈的投与による遺伝子導入技術の確立は、研究面では、これまで樹立されていなかった遺伝性疾患モデル動物の作成を可能にし、治療面では、正常遺伝子導入による治療介入の礎となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The therapeutic potential of suppressing polypyrimidine tract-binding protein 1 (Ptpb1) messenger RNA by viral transduction in a post-stroke dementia mouse model has not yet been examined. In this study, 3 days after cerebral ischemia, we injected a viral vector cocktail containing adeno-associated virus (AAV)-pGFAP-mCherry and AAV-pGFAP-CasRx (control vector) or a cocktail of AAV-pGFAP-mCherry and AAV-pGFAP-CasRx-SgRNA-Ptpb1 (1:5,  $1.0 \times 10^{11}$  vg) into post-stroke mice via the tail vein. mCherry/GFAP double-positive astrocyte-like glia were converted into new mCherry/NeuN double-positive neuron-like cells with morphological changes in the hippocampus 56 days after cerebral ischemia. The new cells integrated into the dentate gyrus and recognition memory was significantly ameliorated. These results demonstrated that the in vivo conversion of hippocampal astrocyte-like glia into functional new neurons by the suppression of ptpb1 might be a therapeutic strategy for post-stroke dementia.

研究分野：神経再生

キーワード：脳梗塞 in vivo ダイレクトリプログラミング 神経細胞新生

## 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた本邦では、脳梗塞は死因の一つというだけでなく、後遺症を引き起こし、要介護の原因となることから重要な社会問題の一つである。脳梗塞に起因する後遺症の一つに脳梗塞後の認知機能障害がある。これは脳梗塞による直接的な認知機能に関わる領域の損傷によるものと、治療による血流再開によって生じた活性酸素や神経細胞内  $Zn^{2+}$ ホメオスタシスの破綻などで生じた海馬の神経細胞死によるものに分けることができる。後者の緩和のために抗酸化剤エダラボンが臨床現場ですでに用いられているが、依然として脳梗塞後の認知機能障害はなくなっていない。そこで申請者らは、リン脂質の一種で強い抗酸化作用と認知機能低下に改善作用を示すプラズマローゲンを事前投与したマウスに脳梗塞をおこし、その効果について検討した。その結果、プラズマローゲンは、

- ・ 血中酸化ストレス値を減少させ、DNAや脂質の過酸化を抑制すること
- ・ 梗塞巣およびその周辺部に現れる傷害性ミクログリア細胞数を抑制すること
- ・ 脳梗塞後の体重減少を抑制し、脳梗塞体積を減少させること

を明らかにした(Fukui, et al., Brain Suppl, 2021)。しかし、このような抗酸化作用や抗炎症作用による脳保護的な治療では、脳梗塞により失われた神経細胞はそのままであり、十分な機能回復のためには異なる方法が必要となる。そこで所属研究室では、脳内のグリア細胞に転写因子を強制発現させることで神経系細胞を誘導するダイレクトリプログラミング法と呼ばれる手法に着目し、機能回復を目指して研究を行ってきた。レトロウイルスベクターに搭載した転写因子群 (Ascl1, Sox2, NeuroD1)を虚血脳実質内に投与し、脳内に神経系細胞を誘導することに成功した (Yamashita et al., Sci Rep, 2019)。しかし、ウイルスベクターを直接脳内の梗塞巣周辺部に打つため侵襲性が高いこと、神経系細胞の発現は局所的であったこと、発現させた神経系細胞が機能回復に至るには発現量が十分ではなかったことが課題として残った。

これらの結果は、脳虚血・再灌流により失われた認知機能を神経系細胞の誘導によって取り戻すためには、新しい低侵襲かつ高効率な方法が必要であることを示唆している。そこで申請者は、「ダイレクトリプログラミングによって低侵襲かつ高効率に神経細胞を誘導し、脳虚血・再灌流後の認知機能再生を可能にするにはどのような条件を満たす必要があるのか？」について検討を行った。

## 研究の目的

本研究は、低侵襲な経静脈的 AAV ベクター投与による海馬アストロサイトの *ptbp1* 遺伝子ノックダウンによって、海馬アストロサイトから神経細胞を誘導し、脳梗塞モデルマウスの認知機能回復を目指すことを目的とする。

## 研究の方法

### 1. AAV-PHP.eB ベクターは BBB を通過し脳内に感染することができるのか？

これまでのウイルスベクターは血液脳関門(BBB)により中枢神経系への感染効率が悪い、ウイルス感染による細胞傷害性があるなどの問題があった。そこで BBB を高効率に通過し、GFAP プロモーターにより脳内アストロサイトに感染することができ、細胞傷害性が少ない AAV ベクター AAV-PHP.eB-pGFAP (Chan et al., Nat Neurosci, 2017)に mCherry 遺伝子を搭載した AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry を作成する。この AAV ベクターをマウス尾静脈より投与して、海馬アストロサイト特異的に赤色蛍光タンパク質が発現するか各種グリア細胞マーカーと mCherry タンパク質の蛍光二重染色により検討する。

### 2. AAV投与タイミングと感染効率

これまでの所属研究科の研究で脳梗塞モデルマウスに神経系細胞を誘導する際に、ウイルスベクターの投与のタイミングが重要であることがわかっている。そこで脳梗塞モ

デルマウスを作成し、術後 3,7,14 日後にそれぞれ AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクターと AAV(PHP.eB)-pGFAP-CasRx-ptbp1 ベクターのカクテルを投与する。3 週間後に取り出した脳から切片を作成し、上記の mCherry タンパク質の染色により投与タイミングによる違いはあるか検討する。

### 3. 神経系細胞の誘導により認知機能の回復は可能か？

先行研究においてアストロサイトの *ptbp1* 遺伝子をノックダウンすることで神経系細胞を誘導できることが報告された。本研究ではこの *ptbp1* 遺伝子と CRISPR-Cas 遺伝子編集システムの一つで、転写産物を標的とする標的遺伝子のノックダウンが可能な Cas13d(CasRx)を AAV(PHP.eB)-pGFAP に搭載し、AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry と一緒に尾静脈より投与して海馬に神経系細胞誘導が可能かどうか検討する。投与のタイミングで感染効率が異なる場合、投与に適した日数が経過した脳梗塞モデルマウスを以下の 3 群に分け投与を行う。①AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクターと AAV(PHP.eB)-pGFAP-CasRx-ptbp1 ベクター、②AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクターと AAV(PHP.eB)-pGFAP-CasRx ベクター（コントロールベクター）、③同量の溶媒 HBSS。脳梗塞作成後より体重、認知機能の評価のために新奇物体探索試験、神経症状の評価のために Bederson's test, Corner test, Foot-Fault test, を週 1 回測定する。2 ヶ月後に屠殺し、梗塞体積（Nissl 染色）及び mCherry 陽性成熟神経細胞(NeuN)に群間差が見られるかどうか評価する。

### 研究成果

#### 1. AAV-PHP.eB ベクターは BBB を通過し脳内に感染することができるのか？

9 週齢 C57BL/6J マウスの尾静脈より AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry を  $4.6 \times 10^{10}$  vg 投与した。対照群には溶媒である HBSS を 150 $\mu$ L 投与し、ともに 3 週間の経過観察後に屠殺した。AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクター投与マウスでは、mCherry 陽性細胞は脳全体に検出され、主にアストロサイトマーカーである GFAP と二重陽性を示した(57.5% = 163 cells/283 mCherry positive cells)。ミクログリアマーカー Iba1 およびオリゴデンドロサイトマーカー Olig2 陽性細胞では mCherry 陽性細胞はほぼ確認できなかった(Iba1; 0.4% = 1 cells/274 mCherry positive cells, Olig2; 0% = 0 cells/201 mCherry positive cells)。しかしながら、神経細胞マーカーと mCherry の二重陽性細胞が存在しており、本ベクターの神経細胞へのリークが確認された(Tuj1; 8.5% = 17 cells/200 mCherry positive cells, MAP2; 13.7% = 32 cells/232 mCherry positive cells, NeuN ; 13.9% = 48 cells/345 mCherry positive cells) (図 1)。

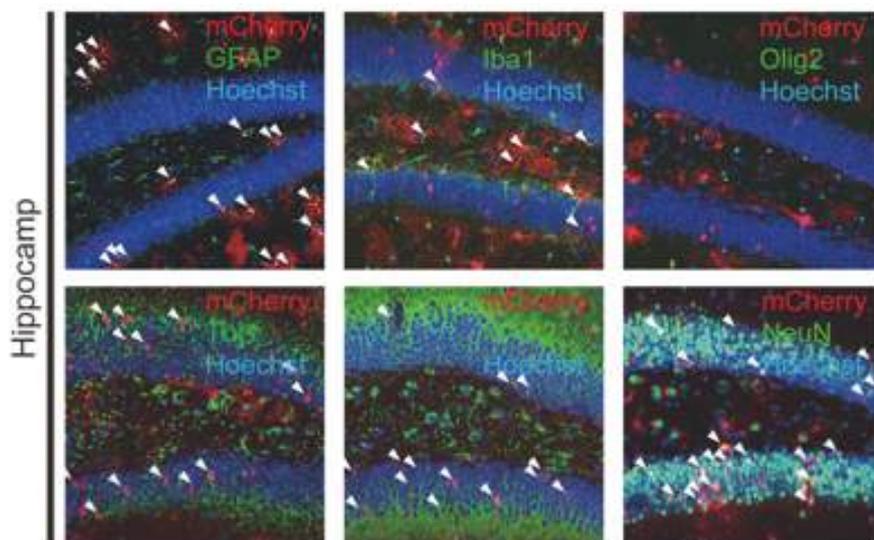


図 1 mCherry と各種グリア細胞マーカーおよび神経細胞マーカーの染色

## 2. AAV投与タイミングと感染効率

一過性中大脳動脈塞栓術により脳梗塞を作成後、3,7,14 日後にそれぞれ AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクターと AAV(PHP.eB)-pGFAP-CasRx-ptbp1 ベクターのカクテルを投与し、3 週間後に屠殺した。mCherry の発現強度は時間経過に伴い低下しており、脳梗塞後 3 日目が至適投与タイミングであった(day 7 ; $0.74 \pm 0.06$  pixels fold change to day 3, day 14;  $0.31 \pm 0.09$  pixels fold change to day 3) (図 2)。

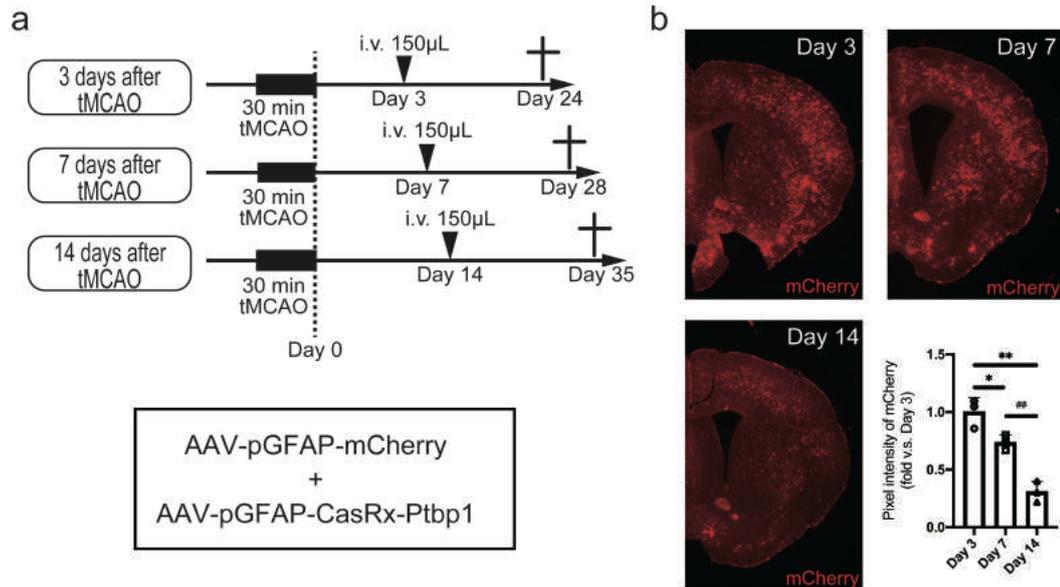


図 2 脳梗塞後の AAV ベクター投与タイミング

## 3. 神経系細胞の誘導により認知機能の回復は可能か？

アストロサイトから神経系細胞が誘導されているかどうか確認するため AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクターと AAV(PHP.eB)-pGFAP-CasRx-ptbp1 ベクターのカクテル(1:5, total  $1.2 \times 10^{10}$  vg)または、AAV(PHP.eB)-pGFAP-mCherry ベクターとコントロールベクターのカクテルをマウス尾静脈より投与した。体重、神経症状、脳梗塞体積に有意差は見られなかった。しかし、新奇物体探索試験(NORT)において CasRx-ptbp1 群では新奇物体に対する接触時間の有意な延長を認め、認知機能の改善が見られた(HBSS:  $55.8 \pm 74.4$  sec, CasRx:  $8.0 \pm 6.6$  sec, CasRx-Ptp1:  $112.2 \pm 95.5$  sec, \* p < 0.05) (図 3a)。また、海馬 mCherry 陽性細胞で、mCherry/NeuN 二重陽性ニューロン様細胞の有意な増加が確認された(CasRx:  $47.1 \pm 30.1$  cells/mouse, CasRx-Ptp1:  $117.6 \pm 70.9$  cells/mouse, \* p < 0.05) (図 3b)。この海馬における新しい神経系細胞は神経回路のより多くの構築に寄与することで認知機能の改善につながると考えられた。

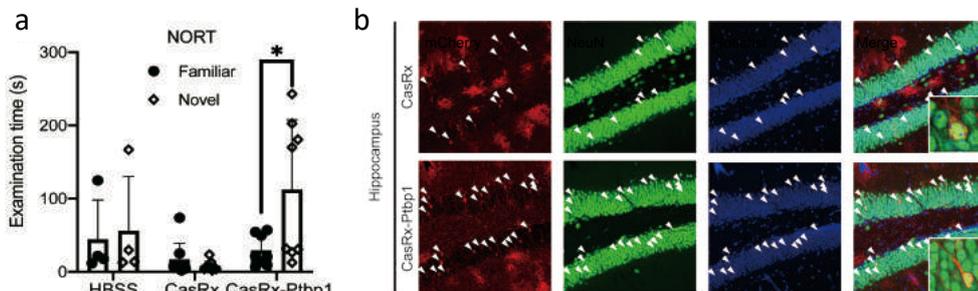


図 3 新奇物体探索試験(a)と海馬歯状回の蛍光染色(b)

## 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 0件）

1. 著者名 Zhai Yun, Morihara Ryuta, Feng Tian, Hu Xinran, Fukui Yusuke, Bian Zhihong, Bian Yuting, Yu Haibo, Sun Hongming, Takemoto Mami, Nakano Yumiko, Yunoki Taijun, Tang Ying, Ishiura Hiroyuki, Yamashita Toru	4. 巻 1828
2. 論文標題 Protective effect of scallop-derived plasmalogen against vascular dysfunction, via the pSTAT3/PIM1/NFATc1 axis, in a novel mouse model of Alzheimer's disease with cerebral hypoperfusion	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148790 ~ 148790
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2024.148790	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 Ota-Elliott Ricardo Satoshi, Fukui Yusuke, Bian Yuting, Bian Zhihong, Hu Xinran, Sun Hongming, Yu Haibo, Morihara Ryuta, Ishiura Hiroyuki, Yamashita Toru	4. 巻 1827
2. 論文標題 Neuroprotective effect of, a flavonoid, sudachitin in mice stroke model	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148745 ~ 148745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2023.148745	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 Hu Xinran, Fukui Yusuke, Feng Tian, Bian Zhihong, Yu Haibo, Morihara Ryuta, Hu Xiao, Bian Yuting, Sun Hongming, Takemoto Mami, Nakano Yumiko, Yunoki Taijun, Abe Koji, Yamashita Toru	4. 巻 447
2. 論文標題 Neuroprotective effects of carnosine in a mice stroke model concerning oxidative stress and inflammatory response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 120608 ~ 120608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2023.120608	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
---------	---------