

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：82404

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19741

研究課題名（和文）反応性アストロサイトの臨界期アストロサイト転換による慢性期脳卒中治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a treatment for chronic stroke by converting reactive astrocytes into astrocytes in the critical period.

研究代表者

長尾 元史（Nagao, Motoshi）

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・研究部長

研究者番号：00359671

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：生後臨界期のアストロサイトはシナプス形成と刈り込みを制御し、高い神経回路再編能を持つ。脳卒中慢性期には、反応性アストロサイトの神経回路再編能が低いため、リハビリテーションによる機能回復が困難であると考えられる。本研究では臨界期、成体期、回復期、慢性期のアストロサイトの網羅的遺伝子発現解析を行い、神経回路再編能の高い臨界期アストロサイトの性質を規定する候補分子を抽出した。今後、これらの分子を慢性期の反応性アストロサイトで発現させて臨界期アストロサイト様細胞に転換することで、臨界期のような高い神経可塑性を持つ脳内環境に変えて、リハビリテーションによる機能回復が促進するかを検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳卒中の急性期治療の進歩により一命を取りとめる患者の数は増加しているが、その後の重篤な後遺症（麻痺、運動・意識障害、疼痛、失語）に対してはリハビリテーション以外に有効な治療法がないのが現状である。しかし、そのリハビリテーションも受傷後6ヶ月以内の神経可塑性が高い回復期に行わなければ、十分な機能改善が望めない。現在、脳卒中患者の多くは回復期を過ぎた慢性期患者であり、リハビリテーションでさえ有効な治療法とはなり得ない。本研究の成果は、慢性期の脳内環境を神経可塑性が高く、リハビリテーションに再度、応答する状態に変えることのできるリハビリテーション効果促進薬の開発につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：Astrocytes in the postnatal critical period control synapse formation and pruning, possessing a high capacity to reorganize neural circuits. It is believed that in the chronic phase of stroke, the reduced capacity for neural circuit reorganization in reactive astrocytes makes functional recovery through rehabilitation difficult. In this study, I performed a comprehensive gene expression analysis of astrocytes in the critical period, adulthood, and the recovery and chronic phases of stroke, and identified candidate molecules that define the properties of astrocytes in the critical period. In subsequent research, these molecules will be overexpressed in reactive astrocytes in the chronic phase of stroke to convert them into cells similar to those in the critical period. I plan to examine whether this conversion can enhance functional recovery after stroke through rehabilitation by changing the brain environment into one with high neural plasticity.

研究分野：神経科学 リハビリテーション医学

キーワード：グリア細胞 アストロサイト 反応性アストロサイト 脳卒中 リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳卒中は我が国の総患者数 112 万人と頻度の高い疾患であり、死亡原因の第 4 位を占める。また、運動障害をはじめとした罹患後の後遺症も多くみられ、ADL (activities of daily living) 低下の大きな要因であり、医学的にも社会的にも新たな治療法の開発が期待されている。脳卒中は主に脳梗塞・脳出血・くも膜下出血に分類され、発症患者数では脳梗塞が 75-80 % を占め最多である。現在、rt-PA を用いた血栓溶解療法やカテーテルによる急性血行再建術が行われているが、これらの急性期治療を除くと、リハビリテーション以外に有効な脳卒中治療法はない。しかし、リハビリテーションも回復期(ヒトの場合、受傷後 6 ヶ月以内)を過ぎると効果が減少し、慢性期でのリハビリテーションによる機能回復は困難である。慢性期脳卒中患者数は非常に多いが、現在のところ、慢性期脳卒中に対する有望な治療薬はない。

(2) 生後、神経回路の可塑性が高く、外界からの刺激により神経回路再編が起きる臨界期に、アストロサイト(本研究では、この時期のアストロサイトを臨界期アストロサイトと呼ぶ)はシナプス形成と刈り込みを制御し、神経回路再編に関与する。脳卒中後、アストロサイトは反応性アストロサイトへと変化し、シナプス形成因子分泌などにより回復期の神経回路再編とリハビリテーションによる機能回復に関与していると考えられる。しかし、反応性アストロサイトは同時に、炎症、軸索再生阻害因子の分泌、グリア瘢痕形成にも関与し神経回路再編を阻害する脳内環境を作り出すため、回復期には臨界期ほど十分な神経回路再編が行われていない可能性がある。さらに、慢性期には反応性アストロサイトによる神経回路再編はほとんど起こらず、そのことがリハビリテーションにตอบสนองせず、機能回復が困難な状態を作り出していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性期の脳内環境をリハビリテーションにตอบสนองする状態に変えることが可能か、あるいはリハビリテーションにตอบสนองする回復期の期間延長は可能かを検討し、慢性期脳卒中の治療法開発の基盤を構築することである。本研究では臨界期・成体アストロサイト、回復期・慢性期反応性アストロサイトの遺伝子発現を網羅的に解析し、神経回路再編能が高い臨界期アストロサイトの性質を規定する分子を同定する。そして、その分子を回復期または慢性期反応性アストロサイトで発現させ、臨界期アストロサイト様細胞に転換することで臨界期のような神経可塑性が高く、神経回路再編が起きる脳内環境に変えて、リハビリテーションによる機能回復が促進するかを検討する。本研究の成果は、患者数は多いが有望な治療薬のない慢性期脳卒中に対する新しいリハビリテーション効果促進薬の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法(図 1 研究の流れ)

(1) 遺伝子改変マウスを用いた脳梗塞モデル(片側麻痺モデル)の作製
アストロサイト特異的 Cre マウス(GFAP-Cre)と RiboTag マウス(Rpl22-HA)をかけ合わせ、GFAP-Cre;Rpl22-HA マウスを作製した。光塞栓法(光感受性色素ローズベンガル(30 mg/kg)を腹腔内投与後、Bregma より側方 1.75 mm を中心とした直径 2.5 mm の円形領域に波長 562 nm の光を 10 分間当り脳内血管に血栓を作製する方法)により、GFAP-Cre;Rpl22-HA マウスの片側の大脳皮質運動野に脳梗塞を誘導した。

(2) RiboTag 法を用いた遺伝子発現解析
GFAP-Cre;Rpl22-HA マウスでは、アストロサイトのリボソーム Rpl22 サブユニットが HA-Tag の付いたものに置き換わる。このマウスから大脳皮質または梗塞巣周囲の組織を単離しライセートを調整後、HA 抗体を用いて免疫沈降(IP)し、アストロサイトのリボソームを回収して mRNA を単離した。また、Input サンプルとして、HA 抗体を加える前のライセートから mRNA を単離した。RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、臨界期アストロサイト(生後 7 日及び 12 日(P7, P12)の新生仔大脳皮質由来)、成体アストロサイト(生後 10 週(adult)の成体大脳皮質由来)、回復期反応性アストロサイト(損傷後 7 日及び 14 日(7 dpi, 14 dpi)の梗塞巣周囲由来)、慢性期反応性アストロサイト(損傷後 21 日(21 dpi)の梗塞巣周囲由来)の遺伝子発現を比較した。発現変動遺伝子(発現上昇遺伝子: ratio ≥ 1.50 、発現減少遺伝子: ratio ≤ 0.66)の抽出は、Expression Miner 2.0 (Takara)を用いて行なった。Gene Ontology(GO)解析は、Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)を用いて行なった。

(3) 臨界期アストロサイトを規定する候補分子の絞り込み

脳卒中後の機能回復には神経回路の再編が必要であるが、その神経回路再編能は成体アストロサイトや慢性期反応性アストロサイトと比べ、回復期反応性アストロサイトでは高く、臨界期アストロサイトではさらに高いと考えられる。そのため、臨界期アストロサイトを規定する候補分子として、成体アストロサイトや慢性期反応性アストロサイトでの発現と比較して、回復期反応性アストロサイトで発現が高く、臨界期アストロサイトではさらに発現が高い分子が候補とし

て考えられる。そこで、7 dpi、14 dpi、P7、P12 で TPM (Transcripts Per Million) の平均値 ≥ 1 、FC (Fold Change) (IP/Input) ≥ 1.5 、FC (7 dpi/adult, 14 dpi/adult, P7/adult, P12/adult) ≥ 1.5 、FC (7 dpi/21 dpi, 14 dpi/21 dpi, P7/21 dpi, P12/21 dpi) ≥ 1.5 、FC (P7/7 dpi, P7/14 dpi, P12/7 dpi, P12/14 dpi) ≥ 1.5 の条件を満たす分子を候補とした。さらに、成体アストロサイトでの発現と比較して、回復期反応性アストロサイトで発現が低く、臨界期アストロサイトでは発現が高い分子も候補とした (TPM (adult, 7 dpi, 14 dpi, P7, P12) ≥ 1 , FC (IP/Input) ≥ 1.5 , FC (7 dpi/adult, 14 dpi/adult) ≤ 0.66 , FC (P7/adult, P12/adult) ≥ 1.5)。

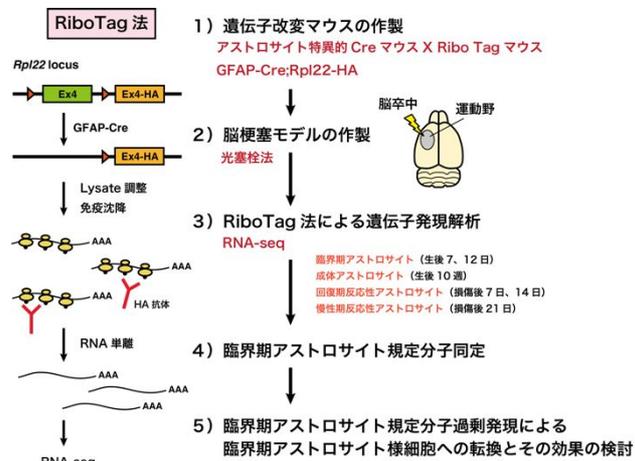


図 1 研究の流れ

4. 研究成果

(1) 神経回路再編能の高い臨界期アストロサイトを規定する分子を同定するために、RiboTag 法を用いてアストロサイトの遺伝子発現解析を行った。アストロサイトの mRNA を単離するために、アストロサイト特異的 Cre マウス (GFAP-Cre) と RiboTag マウス (Rpl22-HA) をかけ合わせ、GFAP-Cre;Rpl22-HA マウスを作製した。このマウスの大脳皮質において、Rpl22-HA を発現している細胞がアストロサイトであることを確認するために、HA とアストロサイトマーカーである S100 β の免疫染色を行なった。HA 陽性細胞のおよそ 90% が S100 β 陽性であり、HA 陽性細胞のほとんどがアストロサイトであることが確認された (図 2A)。次に、成体大脳皮質 (生後 10 週 (adult))、脳卒中後 7 日、14 日、21 日 (7 dpi, 14 dpi, 21 dpi) の梗塞巣周囲の組織、生後 7 日と 12 日 (P7, P12) の新生仔大脳皮質を単離しライセートを調整後、HA 抗体を用いて免疫沈降 (IP) し、アストロサイトのリボソームを回収して遺伝子発現解析を行なった。アストロサイトマーカー (Gfap, Aldh111) の発現を調べたところ、Input 画分と比較して IP 画分でエンリッチされていることが確認された (図 2B)。

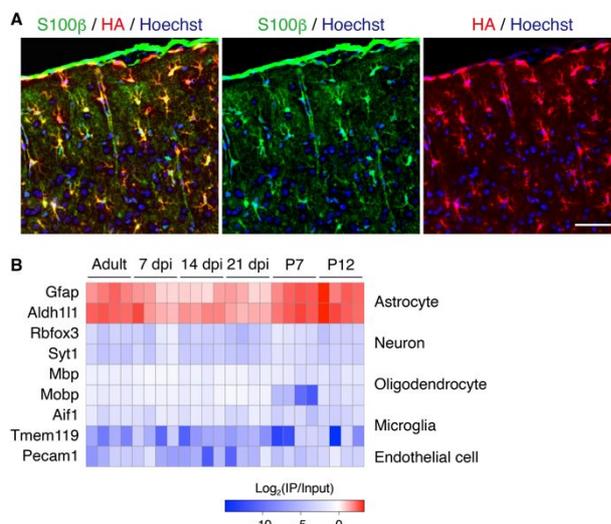


図 2 アストロサイト RiboTag マウスの特性評価

(A) アストロサイト RiboTag マウスの大脳皮質における HA とアストロサイトマーカー S100 β の免疫蛍光染色。
(B) アストロサイト特異的な mRNA のエンリッチメントを示すヒートマップ。アストロサイトマーカー (Gfap, Aldh111)、ニューロンマーカー (Rbfox3, Syt1)、オリゴデンドロサイトマーカー (Mbp, Mobp)、ミクログリアマーカー (Aif1, Tmem119)、内皮細胞マーカー (Pecam1)。
dpi, days postinjury; P, postnatal; IP, immunoprecipitation. Scale bar, 50 mm.

(2) IP 画分の遺伝子発現解析結果を用いて発現変動遺伝子の抽出と GO 解析を行った。正常な成体アストロサイトと比較して、回復期反応性アストロサイト (7 dpi) では細胞移動、サイトカイン応答、細胞増殖、シナプスの刈り込み、軸索ガイダンス、シナプス構築などに関連する遺伝子群の発現が上昇し (図 3A)、コレステロール合成、アセチル CoA 代謝、酸化リン酸化、脂肪酸代謝、解糖系などに関連する遺伝子群の発現が減少していた (図 3B)。損傷後 14 日の回復期反応性アストロサイト (14 dpi) でも同様の遺伝子群の発現変動が見られた。回復期反応性アストロサイト (7 dpi) と比較して、慢性期反応性アストロサイト (21 dpi) では細胞移動や軸索伸長を抑制する遺伝子群の発現が上昇し (図 3C)、細胞移動、細胞増殖、シナプスの刈り込み、軸索ガイダンス、シナプス構築に関連する遺伝子群の発現が減少しており (図 3D)、慢性期反応性アストロサイトでは細胞増殖・移動が停止し、神経回路再編能も減少していることが示唆された。さらに、臨界期アストロサイト (P7) では回復期反応性アストロサイト (7 dpi) とは異なり、細胞移動、サイトカイン応答、シナプスの刈り込みに関連する遺伝子群の発現上昇は見られなかったが、細胞増殖、軸索ガイダンス、シナプス構築に関連する遺伝子群の発現上昇は見られた (図 3E)、回復期反応性アストロサイトは一部、臨界期アストロサイトと類似の機能を持つことが示唆された。生後 12 日の臨界期アストロサイト (P12) でも、細胞増殖、軸索ガイダンス、シナプス構築に関連する遺伝子群の発現上昇が見られた。興味深いことに、臨界期アストロサイト (P7) では回復期反応性アストロサイト (7 dpi) と同様に、成体アストロサイトと比較して、酸化リン酸化、脂肪酸代謝、解糖系などに関連する遺伝子群の発現が減少していた (図 3F)。

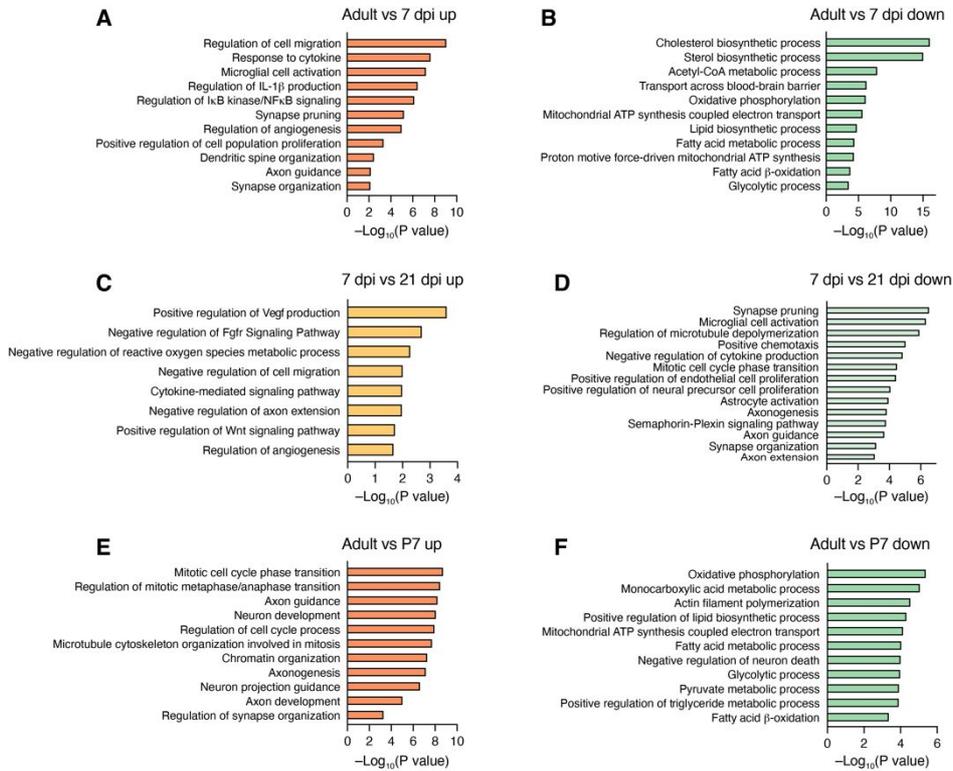


図3 発現変動遺伝子のGO解析

(A, B) 成体アストロサイトと比較して、回復期反応性アストロサイト (7 dpi) において、発現が上昇している遺伝子群 (A) と減少している遺伝子群 (B) のGO解析。(C, D) 回復期反応性アストロサイト (7 dpi) と比較して、慢性期反応性アストロサイト (21 dpi) において、発現が上昇している遺伝子群 (C) と減少している遺伝子群 (D) のGO解析。(E, F) 成体アストロサイトと比較して、臨界期アストロサイト (P7) において、発現が上昇している遺伝子群 (E) と減少している遺伝子群 (F) のGO解析。

(3) 神経回路再編能が高い臨界期アストロサイトを規定する候補分子として、成体アストロサイトや慢性期反応性アストロサイトでの発現と比較して、回復期反応性アストロサイトで発現が高く、臨界期アストロサイトではさらに発現が高い分子に着目した。実験方法のところで記載した条件を満たす分子は50個あり(図4A)、これらの分子に対してGO解析を行ったところ、細胞増殖、神経新生、軸索ガイダンスに関連する遺伝子群がエンリッチしていた(図4B)。さらに、

成体アストロサイトでの発現と比較して、回復期反応性アストロサイトで発現が低く、臨界期アストロサイトでは発現が高い分子にも着目し、37個の分子を抽出した(図4C)。GO解析を行ったところ、コレステロール合成、EGFRシグナル経路、アセチルCoA代謝、神経新生などに関連する遺伝子群がエンリッチしていた(図4D)。今後、これらの分子の中から、さらに候補を絞り込み、その候補分子を回復期または慢性期反応性アストロサイトで過剰発現させ、神経回路再編能の高い臨界期アストロサイト様細胞に転換することができるかを検討する予定である。そして、これにより、臨界期のような神経可塑性が高く回路再編が起きる脳内環境に変えて、リハビリテーションによる機能回復が促進するかを検討する。

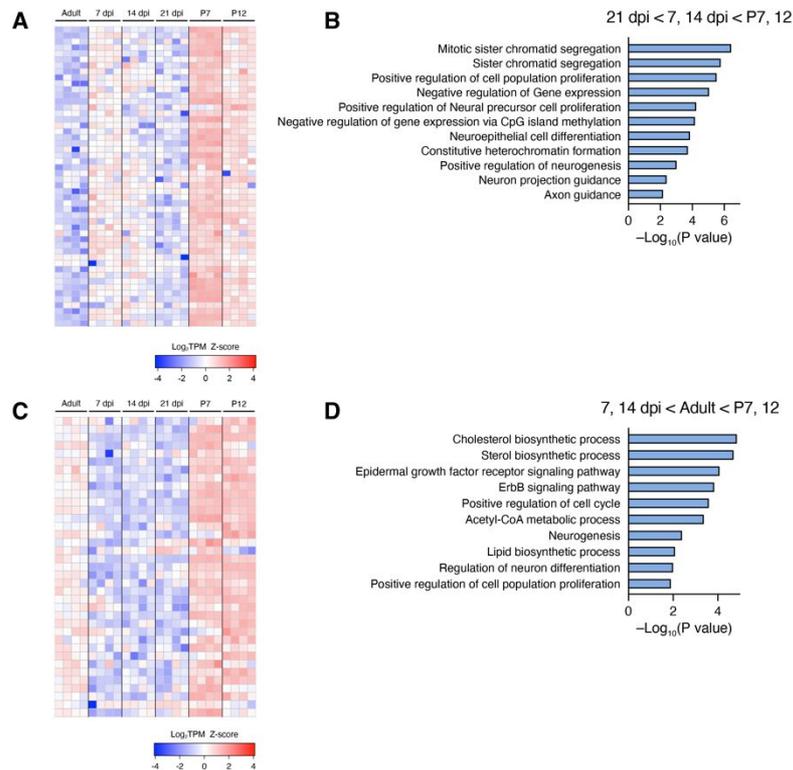


図4 神経回路再編能が高い臨界期アストロサイトを規定する候補分子

(A, B) 成体アストロサイトや慢性期反応性アストロサイトでの発現と比較して、回復期反応性アストロサイトで発現が高く、臨界期アストロサイトではさらに発現が高い分子の遺伝子発現のヒートマップ (A) とその遺伝子群に対するGO解析 (B)。(C, D) 成体アストロサイトでの発現と比較して、回復期反応性アストロサイトで発現が低く、臨界期アストロサイトでは発現が高い分子の遺伝子発現のヒートマップ (C) とその遺伝子群に対するGO解析 (D)。

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〕

国立障害者リハビリテーションセンター研究所 運動機能系障害研究部 http://www.rehab.go.jp/ri/departj/undou/

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
---------	---------