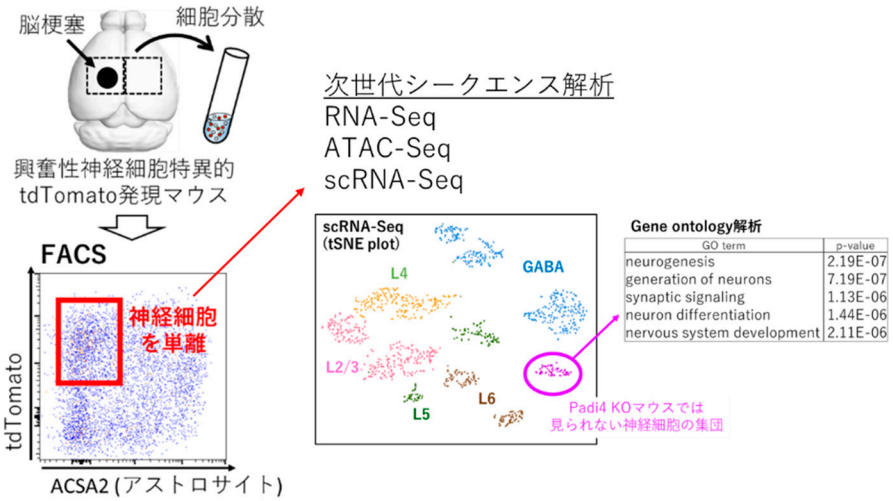
142　細胞タイプ特異的回路再構築による脳卒中治療法の開発	酒井　誠一郎

【目的】脳卒中後の機能回復には、失われた機能を代償する神経回路の再構築が必要であると考えられているが、具体的にいつ、どのような神経回路が構築されることが機能回復に必要であるのかは分かっていなかった。また、神経回路再構築の分子メカニズムに関しても未解明であった。そこで我々は、脳梗塞モデルマウスを用いて、大脳新皮質の局所的な脳梗塞後にどのような神経回路が再構築されるのか、皮質領野間の神経回路構造変化を明らかにすることを目指した。また、神経回路再構築が起こる際に働く遺伝子を解析することで、神経回路再構築の分子メカニズム解明を目指した。分子メカニズムとしては、神経回路再構築において中心的役割を担うマスター転写因子の同定と、脳梗塞後の炎症から神経修復への切り替えにおいて重要な役割を担うと考えられる細胞外の脂肪酸代謝物に注目して研究を行った。

【方法】Photothrombosis 法による大脳新皮質の局所的な脳梗塞あるいは中大脳動脈の閉塞による脳梗塞モデルマウスを用いて実験を行った。大脳新皮質の興奮性神経細胞特異的にカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6f を発現するマウスを用いて、大脳新皮質全域の広域カルシウムイメージングを行った。イソフルラン麻酔下の自発神経活動を計測し、神経活動の相関から皮質領野間の機能的結合強度を見積もった。脳梗塞周囲の組織から FACS によって単離した神経細胞から RNA あるいはゲノム DNA を抽出し、次世代シークエンスによって遺伝子発現やオープンクロマチン領域の解析を行った。

【結果】広域カルシウムイメージングによる皮質領野間の機能的結合解析の結果、脳梗塞によって低下した皮質領野間の機能的結合は、脳梗塞 2〜3 週間後に回復が見られ、梗塞巣周囲をハブとする結合に増強が見られた。リハビリテーションによって機能的結合の増強が起こったことから、脳梗塞後に活動依存的に皮質領野間の結合が強化されることが機能回復に重要であることが示唆される。脳梗塞後に発現増加する遺伝子を RNA-Seq によって解析した結果、および脳梗塞後にクロマチンがオープンになるゲノム領域を ATAC-Seq によって解析した結果から、脳梗塞後の神経修復で働く転写因子を複数同定した。それら転写因子を Neuro2a 培養細胞に強制発現させた結果から、神経修復で中心的役割を担っている転写因子の候補を見出した。脳梗塞後におけるホスホリパーゼの発現および *Pla2* ノックアウトマウスの解析から、Pla2g2e によって産生される脂肪酸代謝物が脳梗塞後の機能回復に重要であることが示された。この脂肪酸代謝物によって発現誘導される *Padi4* 遺伝子の役割を次世代シークエンス解析によって検証したところ、Padi4 が修復性の神経細胞サブタイプの誘導に重要である可能性が示された。

単離した神経細胞から次世代シークエンス解析を実施



142. 細胞タイプ特異的回路再構築による脳卒中治療法の開発

酒井　誠一郎

東京都医学総合研究所 脳・神経科学研究分野 脳卒中ルネサンスプロジェクト

Key words：脳梗塞，大脳新皮質，神経回路，カルシウムイメージング，次世代シークエンス解析

緒　言

本邦の脳卒中患者は 100 万人を超え、高齢化の進む社会において脳卒中後の機能回復予後が重要な課題となっている。脳卒中のうち脳梗塞が 7～8 割を占めるが、早期の血栓除去以外に有効な治療法が確立されていないのが現状である。我々は、神経修復を誘導する分子メカニズムと神経回路再構築の原理を解明し、神経修復を促進させることで機能回復を図る新たな脳卒中治療法の開発を目指して研究を行った。

脳卒中からの機能回復には損傷した神経回路を代償する新たな神経回路の再構築が重要であると考えられており、脳卒中患者や脳卒中モデル動物の梗塞巣周囲や正常側半球において軸索伸長や新たな神経活動が生じることが報告されている［1］。しかし、具体的にどのような神経回路が再構築され、それがどのように機能回復に寄与するのかは分かっておらず、脳卒中後に神経回路の再構築が起こる分子メカニズムに関してもほとんど分かっていなかった。そこでまず我々は、大脳新皮質の領野間を繋ぐ神経回路に注目して脳梗塞後にどのような神経回路が再構築されるのか経時的な変化を解析した。また、脳梗塞後の神経修復で働く転写因子を探索し、神経修復の誘導で中心的な役割を担うマスター転写因子の同定を目指した。マスター転写因子を同定することができれば、マスター転写因子をターゲットとして、神経修復を促進させることで機能回復を図る非常に効果的な脳卒中治療薬を開発することができる。

脳梗塞組織に含まれる脂質を質量分析で網羅的に解析した結果から、リン脂質の動態が脳梗塞によって劇的に変化することが分かっていた［2］。虚血壊死によって破壊された細胞膜から放出された脂質は炎症惹起因子として働くことが知られている。この細胞膜破壊による脂質放出を担う代表的な酵素としてホスホリパーゼ A2（PLA2）が挙げられる。炎症惹起に関わる脂質は既に多数知られているが神経修復の誘導に関わる脂質についてはほとんど分かっておらず、我々は神経修復を誘導する脂質の探索を行った。脂質によって誘導される神経修復のメカニズムを研究することによって、脳梗塞後に炎症から修復へと脳内環境が転換する分子メカニズムが明らかになると期待される。

方　法

1.　脳梗塞モデルマウス

大脳新皮質の局所的な脳梗塞作製は、ローズベンガル色素をマウスに血中投与し 561 nm レーザーを照射することで血栓を生じさせる photothrombosis 法により行った。脂質の研究では、中大脳動脈を閉塞する MCAO モデルマウスを作製し、神経症状のスコアリングと MAP2 抗体染色による脳梗塞体積の評価を行った。

2.　広域カルシウムイメージング

大脳新皮質の興奮性神経細胞特異的にカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6f を発現するマウス（Ai93:CaMK2a-tTA:Slc17a7-IRES-Cre）を用いて、マクロズーム顕微鏡（オリンパス、MVX-10）で大脳新皮質全域の経頭蓋蛍光観察を行った。1%イソフルラン麻酔下の自発神経活動を計測し、GCaMP6f 蛍光輝度変化の相関係数を計算し皮質領野間の機能的結合強度を見積もった。

3.　次世代シークエンス解析

興奮性神経細胞特異的に tdTomato 蛍光タンパク質を発現するマウス（Ai14:Slc17a7-IRES-Cre）を用いて、あるい

は野生型マウスの神経細胞を蛍光標識 Thy1 抗体で染色し、FCAS セルソーター（BD AriaⅢ）で神経細胞を単離した。RNA-Seq は Ovation Solo キット（TECAN）を用いて、ATAC-Seq は Tn5 transposase を用いてライブラリを作製し、次世代シークエンサー（Illumina HiSeq）でシークエンスを読んだ。シングルセル RNA-Seq は Chromium 3' GEX キット（10x Genomics）を用いてライブラリを作製し、Cellranger ソフトウェア（10x Genomics）で解析した。

結果および考察

1. 脳梗塞後における大脳新皮質領野間の機能的結合の再編

皮質一次体性感覚野に脳梗塞を作製して機能的結合強度の継時変化を解析した結果、脳梗塞 1 週間後まで皮質全体で機能的結合の低下が見られたが、2〜3 週間後には梗塞巣周囲や正常側一次体性感覚野を中心として広い範囲で機能的結合が脳梗塞前より増強していた（図 1）。梗塞巣周囲の体性感覚野と両半球の運動野を繋ぐ機能的結合および梗塞巣周囲の頭頂連合野と視覚野を繋ぐ機能的結合は 8 週間後まで継続して脳梗塞前より増強していた。この結果は、脳梗塞によって減弱した皮質領野間の神経接続が 2〜3 週間後に皮質の広い範囲で一旦増強した後に、神経修復の起点となる梗塞巣周囲の神経回路が強化される神経回路再構築の過程を示した新たな発見である。また、一次運動野に脳梗塞を作製したマウスにおいても同様に 2〜3 週間後に機能的結合の回復が見られた。さらにこのマウスに麻痺足を強制使用させるリハビリテーションを行わせたところ、皮質領野間の機能的結合の回復が向上した。この結果は、リハビリテーションが神経回路再構築を促進することを示しており、皮質領野間の神経回路再構築が活動依存的に起こることを示唆する（論文投稿準備中）。

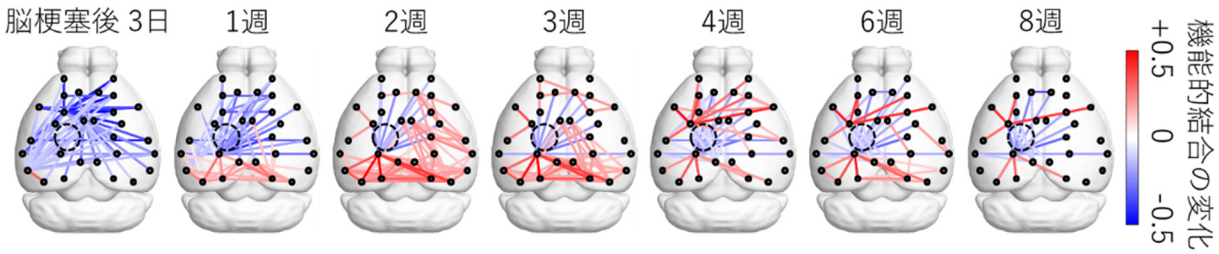


図 1. 大脳新皮質一次体性感覚野の脳梗塞後に起こる皮質領野間の機能的結合変化
広域カルシウムイメージングによって計測した麻酔下自発神経活動から皮質領野間の機能的結合強度を見積もり、脳梗塞前と比較した結合強度変化を図示した。脳梗塞 4 週間後以降に梗塞巣周囲をハブとした結合の増強が見られた。

2. 脳梗塞後の神経修復を誘導する転写因子の探索

脳梗塞前後の大脳新皮質から神経細胞を FACS で単離し、RNA-Seq で遺伝子発現を解析したところ、脳梗塞 1〜2 週間後の梗塞巣周囲の神経細胞で軸索伸長や成長因子シグナルといった神経修復に関わる遺伝子群（神経修復遺伝子）の顕著な発現増加が見られた。次に、脳梗塞巣周囲の神経細胞においてこれら神経修復遺伝子の発現で働く転写因子を同定するため、転写因子の結合しているオープンクロマチン領域を ATAC-Seq で解析し、神経修復遺伝子近傍のオープンクロマチン領域に濃縮している DNA 結合モチーフを調べた。その結果、脳梗塞後の神経細胞で発現増加が見られた転写因子のうちいくつかの転写因子の結合モチーフが濃縮しており、これら転写因子が神経修復で働いていることが示唆された。

Neuro2a 細胞にこれら転写因子を遺伝子導入したところ、強制発現により他の転写因子の発現を増加させる転写因子があり、これら転写因子の最も上流で働く転写因子である可能性が示された。そこでその転写因子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを作製し、マウス脳梗塞巣周囲の神経細胞に強制発現させて FACS で単離し遺伝子発現を解析したところ、*in vivo* でも他の転写因子の発現増加が見られた。さらに転写因子を強制発現させた神経細胞の遺伝子発現を RNA-Seq で網羅的に解析し、強制発現によって増加した遺伝子の gene ontology 解析を行ったところ、神経発達

や軸索伸長といった神経修復に関連した gene ontology が濃縮していた。以上の結果から、この転写因子が脳梗塞後の神経修復で中心的役割を担うマスター転写因子である可能性が示され、脳梗塞後の転写因子発現増加によって神経修復遺伝子の発現が誘導されることが示唆される。現在、他の転写因子の強制発現に関しても同様に網羅的な遺伝子発現解析を行うとともに、転写因子の強制発現による神経細胞の機能変化を電気生理記録および in vivo カルシウムイメージングによって解析している。

3. 脳梗塞における神経修復的な脂質の探索

脳梗塞組織におけるホスホリパーゼの発現を調べた結果、炎症期にあたる脳梗塞 3 日後から修復期にあたる 6 日後にかけて PLA2g2d、g2e、g4e、g5、g12a の 5 種類の PLA2 で顕著に発現が変化していた。これら *PLA2g* の欠損マウスに脳梗塞を作製し、梗塞体積および神経症状を野生型マウスと比較したところ、*PLA2g2e* 欠損マウスで脳梗塞体積の拡大と神経症状の悪化が起こることを発見した（図 2）。PLA2g2e は脳梗塞によって発現が誘導され、脳梗塞 3 日後に梗塞巣周囲で生き残った神経細胞で発現していた。このことから PLA2g2e は脳梗塞による神経細胞死を阻止して梗塞巣の拡大を抑制する働きがあると示唆される。

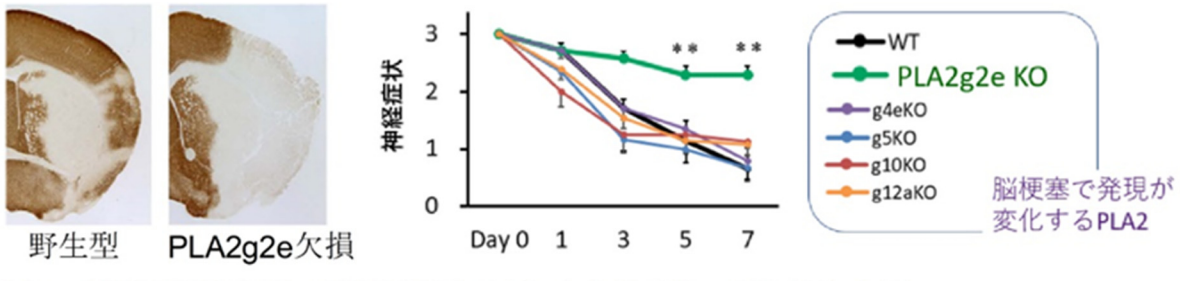


図 2. *PLA2g2e* 欠損マウスは脳梗塞が悪化していた

PLA2g2e 欠損マウスでは脳梗塞体積が拡大し、神経症状が悪化していたことから、PLA2g2e によって産生される脂肪酸代謝物が神経修復に寄与することが示唆された。

Two-way ANOVA following Tukey's test、** $P<0.01$。

PLA2g2e の機能を調べるため、脳梗塞 3 日後の遺伝子発現をマイクロアレイによって網羅的に解析した結果、*PLA2g2e* 欠損マウスではシトルリン化酵素 Padi4（peptidyl arginine deiminase 4）の発現が顕著に低下していた。免疫組織染色では、Padi4 は梗塞巣周囲で生き残った神経細胞に強い発現が見られた。そこで神経細胞特異的 *Padi4* 欠損マウスを作製し、脳梗塞体積と神経症状を調べたところ、*Padi4* 欠損マウスでは脳梗塞体積の拡大と神経症状の悪化が起きていた。また、*Padi4* 遺伝子下流に P2A-tdTomato をノックインしたマウスを作製し、脳梗塞 3 日後に Padi4 を発現する神経細胞を FACS で単離して RNA-Seq 解析を行ったところ、Ngfr 等の神経修復で働く遺伝子の発現が増加していた。シングルセル RNA-Seq 解析で野生型マウスと *Padi4* 欠損マウスの遺伝子発現を解析した結果、神経修復に関連した遺伝子を発現する神経細胞の集団が欠損マウスでは消失していた（図 3）。以上の結果より、Padi4 は脳梗塞後の神経細胞死を抑制し神経修復に働くことが示唆される。

PLA2g2e 欠損マウスでは脳梗塞組織におけるリノレン酸やジホモγリノレン酸の含有量の低下が見られた。そこでこれら不飽和脂肪酸およびその代謝物を Neuro2a 培養神経芽腫細胞に添加して、Padi4 の発現を誘導する脂肪酸を探索した。その結果、ジホモγリノレン酸とその代謝物で Padi4 の発現誘導活性が見られ、特に 15-HETrE（15-hydroxyeicosatrienoic acid）が強い発現誘導活性を有することを発見した。実際に 15-HETrE を脳梗塞モデルマウスに投与すると神経症状が改善した。以上の結果から、15-HETrE が Padi4 の発現を誘導することによって神経細胞死の抑制と神経修復の促進をさせる脳梗塞の新規治療薬になる可能性が示された（論文投稿中）。

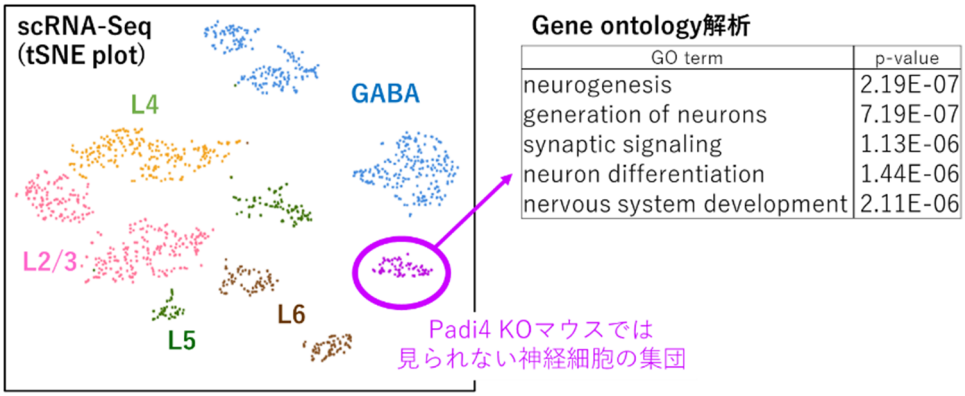


図 3. *Padi4* ノックアウトマウス scRNA-Seq 解析の結果
遺伝子発現パターンに基づいて神経細胞サブタイプを分類した結果、脳梗塞後の野生型マウスでは見られるが *Padi4* ノックアウトマウスにはほとんど見られない神経細胞のサブタイプが存在した。このサブタイプでは神経修復に関わる遺伝子の発現が顕著に見られた。

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門の村上誠教授、武富芳隆講師、および慶應義塾大学医学部医化学教室の杉浦悠毅特任講師との共同研究により行った。

文　献

1) Sakai S, Shichita T. Inflammation and neural repair after ischemic brain injury. Neurochem Int. 2019 Nov 130:104316. Epub 2018 Oct 19. PMID: 30342960 DOI: 10.1016/j.neuint.2018.10.013.
2) Nakamura A, Otani K, Shichita T. Lipid mediators and sterile inflammation in ischemic stroke. Int Immunol. 2020 Oct 20 32(11):719-725. PMID: 32300780 DOI: 10.1093/intimm/dxaa027.