

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年

受付番号 201960550

氏 名 内野 晴登

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：Stanford university（国名：アメリカ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
光遺伝学と RNA シーケンスを駆使した脳卒中後機能回復に関わる分子機構の解明
3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 9 月 1 日
4. 受入機関名及び部局名
Stanford University, Department of Neurosurgery, Steinberg Lab
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【所期の目的】

光遺伝学技術を利用した脳梗塞実験系を用いることで、従来の脳刺激術の課題を克服し、stroke recovery 促進に関与する分子発現ネットワークを明らかにする。

【研究の背景】

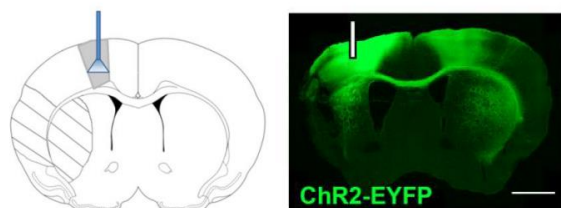
脳卒中後に、神経機能が一定程度回復することは従来から知られている現象である。これは、損傷部位と連絡のあった損傷近傍部位あるいは遠隔部位との神経回路再構築に起因するとされている。しかし、どの神経回路がどのように再構築され神経機能が回復していくのか、その正確な機序は未解明な点が多い。そのため、脳卒中後の神経機能回復 (stroke recovery) の研究領域においては、中枢神経系の機能的連絡の包括的分析に大きな関心が向けられている。

現在、障害された神経機能を回復させる薬剤治療は実用化されておらず、リハビリテーションの効果も限定的なものである。一方で、脳刺激療法は、脳卒中発症後であっても、標的部位の神経興奮性を直接的に制御することで神経機能回復の促進効果が期待できる有望な研究領域の一つである。ただし、これまでの脳刺激手法は、細胞非選択的であり、神経細胞と非神経細胞 (グリア細胞) をまとめて刺激していることに加え、その刺激精度も高くなかった。そのため、複数の臨床治験でも、一定した治療効果が得られていない。加えて、その作用機序の正確な解析も困難であった。

光遺伝学 (optogenetics) は、光受容体蛋白を特定の細胞に強制発現させ、光刺激を加えることで、その細胞の脱分極・過分極をミリ秒単位で高精度に制御することを可能にした技術である。Steinberg 研究室では、神経細胞に光感受性蛋白 channelrhodopsin 2 (ChR2) を発現させた脳梗塞モデルマウス (Thy1-ChR2-YFP mice) において、同側一次運動野 (iM1) 神経細胞への選択的光刺激により、神経栄養因子の発現を増加させ、運動機能回復を有意に促進することを報告している。この運動機能回復促進効果は、運動野皮質第 V 層に存在する興奮性錐体路神経の活動性亢進が関与していると推察される。そこで、本研究では、ウイルス (AAV1-CamkII-ChR2-EYFP) の導入により、興奮性錐体路神経に ChR2 を発現させ、より選択的に光刺激を行うモデルを作成した。このモデルを用いて、皮質脊髄路における stroke recovery 促進に関与する遺伝子発現ネットワークを解析することを試みた。

【進捗状況および成果】

生後 8 週の雄マウスに対し、定位手術にて、iM1 へのウイルス (AAV1-CamkII-ChR2-EYFP) 導入および光ファイバー留置を実施した。定位手術アトラスを参照し、それぞれの座標を (AP = +0.74 mm, ML = -1.5 mm, DV = -0.75 mm)、(AP = +0.74 mm, ML = -1.5 mm, DV = -0.6 mm) と設定した。予備実験で、iM1 付近の十分な ChR2 の発現を免疫染色で確認するとともに(図 1)、iM1 光刺激による反応である対側上肢の振戦が安定して認められることを確認した。

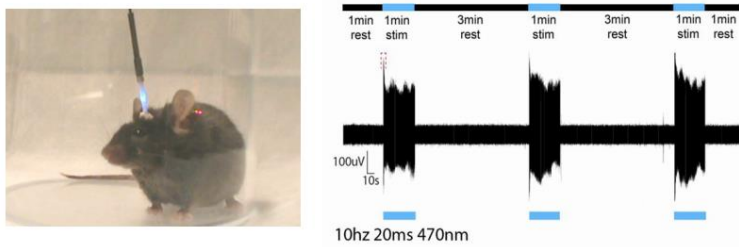


脳梗塞および光ファイバー位置の模式図

iM1におけるChR2-EYFP発現

図 1

ChR2 が十分に発現する定位手術後 5 週目、intraluminal suture を用いた一過性中大脳動脈閉塞により脳梗塞を作成した。術前 1 週間前より、行動学的評価のための pre-training を実施した後、梗塞前 (day -1) の baseline データを得た。梗塞後 5-14 日の期間、留置したファイバーを介し、波長 473 nm の青色レーザーによる iM1 への光刺激を与えた。具体的な光刺激パラダイムは図 2 に示す通り、1 セッションあたり、1 分間の青色レーザーパルス (10 Hz、20 ms) を 3 分おきに 3 回与えた。刺激群と非刺激群の 2 群において、脳梗塞前、脳梗塞後 4・7・14 日の異なる時点で rotating beam test による行動学的試験を行い、経時的な運動機能回復を定量的に評価した (図 3)。



光刺激中のマウス

光刺激パラダイム

図 2

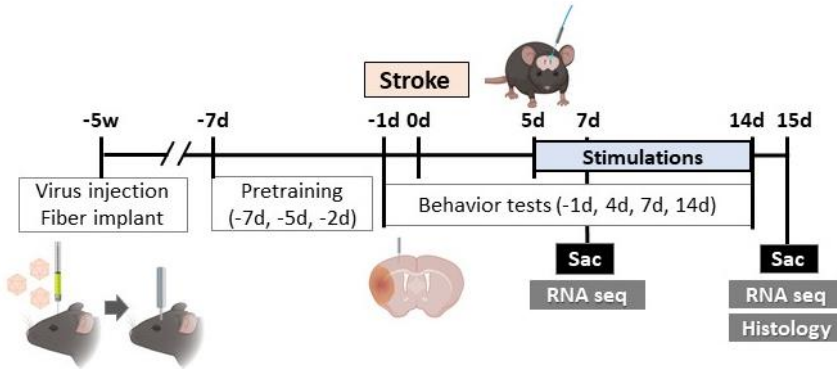


図 3

その結果、脳梗塞後 14 日において、speed、distance とともに、刺激群で有意に回復することが示された (図 4)。なお両群において、脳梗塞サイズ、脳梗塞後の体重減少量に有意差は認めなかった (図 5)。また、PKC- γ 染色にて、脳梗塞により対側頸髄の皮質脊髄路が、両群とも同程度脱落していることを確認した (図 5)。

Stimulation of iM1 excitatory neurons promotes functional recovery after stroke

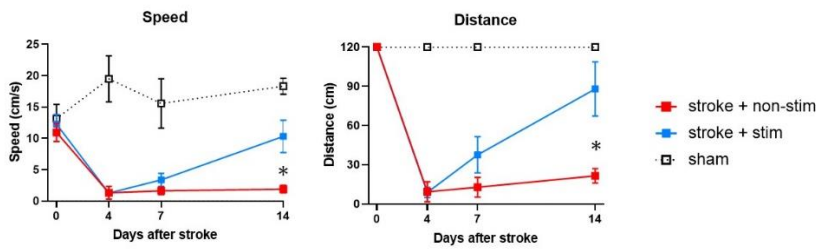
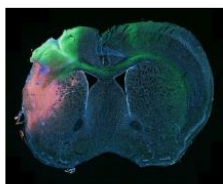
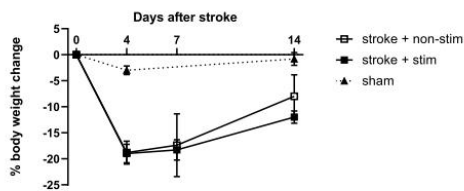
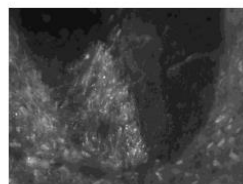


図 4



CD68染色による脳梗塞サイズの確認



PKC- γ 染色による頸髄皮質脊髄路の脱落確認

図 5

刺激早期 (脳梗塞後 5 日) および刺激後期 (脳梗塞後 15 日) の時点で、以下の表に示すグループにおける脳梗塞近傍運動野 (iM1) および対側運動野 (cM1) の脳組織、および同側・対側頸髄 (iSp, cSp) を採取し RNA を抽出した (図 6)。

Group	Day 7	Day 15
Stim	n = 5	n = 5
Non-stim	n = 5	n = 5
Spontaneous recovery		n = 3
Sham		n = 5

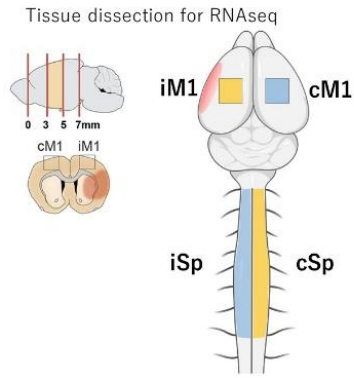


図 6

これら RNA サンプルを用いて、次世代シーケンサー (NovaSeq) による mRNA シーケンシングを実施した。各部位および各時点において、刺激群と非刺激群比較による発現変動遺伝子数を以下に示す (図 7)。Day 15 より Day 7、運動野より頸髄の方が発現変動遺伝子が全体としては多く認められた。これは脳梗塞後早期、頸髄の方がよりダイナミックな遺伝子発現変化が起こっていることを示唆している。

Stim vs No stim
DEGs ($p < 0.05$)

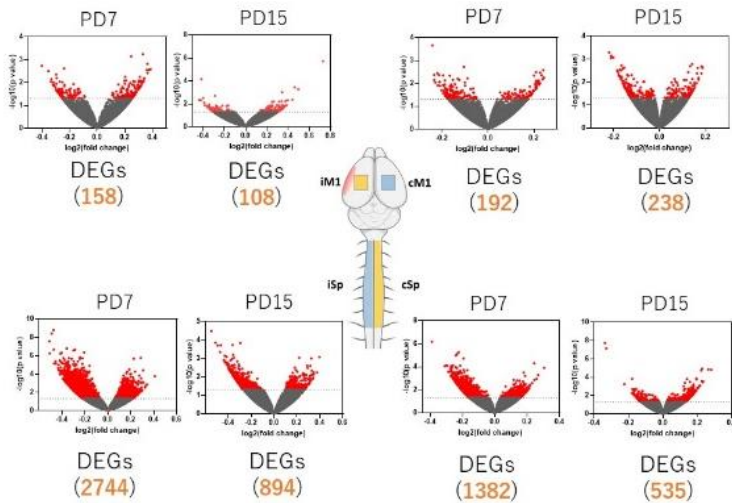


図 7

これら発現変動遺伝子データからパスウェイ解析を行った。iM1 と cM1 の Day 15 において、neuroinflammation pathway が上位に挙げられた (図 8)。iM1 では Day 7 において、neuronal activity に関わる遺伝子の発現増加が見られ、光刺激の効果を示していると考えられた。iSp と cSp では Day 7 において、synaptogenesis signaling pathway が上位に挙げられた (図 9)。一部の遺伝子発現量は rotating beam test における functional recovery と相関を示した。

iM1	Stim vs No stim -log(p value)	
	PD 7	PD 15
Canonical Pathways		
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	0.00	2.13
Neuroinflammation Signaling Pathway	0.54	1.38
Wnt/ β -catenin Signaling	0.32	1.35
TREM1 Signaling	0.00	1.37
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1.51	0.24
Growth Hormone Signaling	1.53	0.00
JAK/Stat Signaling	1.40	0.00

cM1	Stim vs No stim -log(p value)	
	PD 7	PD 15
Canonical Pathways		
Antigen Presentation Pathway	0.00	5.60
Eicosanoid Signaling	1.51	0.00
Neuroinflammation Signaling Pathway	1.86	2.70
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	0.00	3.35
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	0.00	2.55
Inflammasome pathway	0.00	1.52
B Cell Development	0.00	2.37
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	0.00	2.17

iSp	Stim vs No stim -log(p value)	
	PD 7	PD 15
Canonical Pathways		
Synaptogenesis Signaling Pathway	3.81	1.81
PTEN Signaling	1.40	0.30
Axonal Guidance Signaling	2.18	1.37
IL-15 Production	2.06	0.62
CREB Signaling in Neurons	1.31	1.78
Netrin Signaling	1.32	2.56
Wnt/ β -catenin Signaling	0.40	3.46
Synaptic Long Term Depression	0.75	2.68

cSp	Stim vs No stim -log(p value)	
	PD 7	PD 15
Canonical Pathways		
Neuregulin Signaling	0.00	1.64
Signaling by Rho Family GTPases	2.83	0.00
Synaptogenesis Signaling Pathway	2.51	0.00
RhoGDI Signaling	1.90	0.00
Wnt/ β -catenin Signaling	1.93	0.00

図 8

図 9

さらに自然回復 (Spontaneous recovery) 群と非刺激群の比較における発現変動遺伝子数を以下に示す (図 10)。自然回復群では iM1 より cM1 での発現変動遺伝子数が 10 倍程度多く、対側運動野がより重要な役割を果たしていると思われる。また Venn gram においても、iM1 および cM1

で、自然回復群と光刺激群で重複する発現変動遺伝子は、それほど多くなかった (図 11)。一方で、これらの重複する遺伝子が、機能回復に置いて重要な意味を持つ可能性もある。

Spontaneous recovery vs No stim

DEGs (p<0.05)

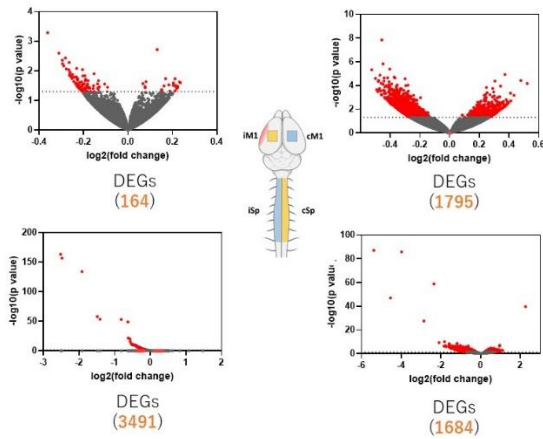


図 10

DEGs (P<0.05)

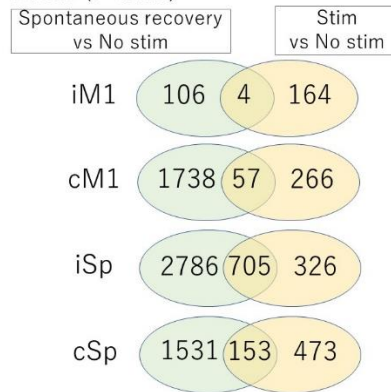


図 11

以上、脳梗塞後光刺激により機能回復が促進されたマウスにおいて、皮質脊髄路（運動野、頸髄）の発現変動遺伝子を RNAseq にて網羅的に解析した。運動野における neuroinflammation pathway が、その機能回復に関わることが示された。さらに皮質脊髄路の終末である頸髄では synaptogenesis に関与するパスウェイおよび遺伝子が、運動野より大きく変化していた。また光刺激による機能回復促進効果は自然回復とは異なる機序が作用している可能性が示された。今後、これらのデータから stroke recovery に関与する重要遺伝子を絞り込み、必要な定量実験を加える予定である。