

中枢神経回路修復のメカニズム解明と治療戦略の開発

所属：大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学

助成対象者： 藤田 幸

共同研究者：

概要

脳血管障害や脊髄損傷などによって中枢神経が損傷されると、細胞間の連絡を担う神経軸索が切断され、細胞間の連絡が途絶えてしまう。運動機能を司る皮質脊髄路が一度損傷を受けると、著しい運動機能障害を生じ、麻痺などが残り続けることがある。しかしながら、中枢神経障害に対する有効な治療法はいまだ確立していない。このような現状から、中枢神経損傷に対する新たな治療の開発が強く求められている。本研究で申請者は脊髄損傷モデル動物をもちいて運動機能回復を促す手法について検討した。その結果、ヒストン脱アセチル化阻害剤 CCI-994 が、損傷後の免疫反応を抑制し、神経細胞の生存を促すことが示唆された。

abstract

Spinal cord injury causes severe and long-lasting neurological disability. It has been reported that histone deacetylase (HDAC) inhibitors exert neuroprotective effects against various insults and deficits in the central nervous system. In this study, we assessed the effect of the class I HDAC inhibitor *N*-acetyldinaline (CI-994) in a mouse model of SCI. Following SCI, mice were treated with either DMSO (control vehicle) or CI-994, which is a benzamide-based HDAC inhibitor. Level of acetylated-histone H3 expression was increased in the motor cortex of CCI-994-treated

mice at 14 days after SCI. Although it did not appear to contribute to CST axonal reorganization, intraperitoneal injection of CI-994 promoted behavioural recovery following SCI. Furthermore, administration of CI-994 suppressed neutrophil accumulation and neuronal loss as early as 3 days following injury. These results suggest that HDAC inhibitors may improve functional recovery following SCI, especially during the early stages of the disease.

研究内容

「背景」

中枢神経損傷の治療のためには、切断された皮質脊髄路神経の軸索が再び伸長し、神経回路を再構築する必要がある。しかし、中枢神経細胞は脆弱であり、軸索は再生能力が弱い。そのため、損傷を受けた回路が元通りに修復されることはほとんどない。これは損傷を受けた中枢神経細胞周囲に、軸索再生を阻む機構が存在するためである。申請者はこれまでに中枢神経再生阻害の分子機序を明らかにしてきた（引用文献 1-5）。これらの研究に基づき、中枢神経再生阻害因子を抑制することで、軸索の再伸長を促す手法を開発してきた。しかし、神経細胞自身の軸索再生能力の弱さから、これらの手法による運動機能回復効果は限定的であった。中枢神経細胞の再生能力を高める方法については、申請者のグループのみならず国内外で多くの研究がなされてきたが、切断された神経回路を元通りにするという治療戦略には限界があった。

「目的」

本研究では、神経損傷後の運動機能回復を促す手法として、ヒストン脱アセチル化阻害剤に着目した。ヒストン脱アセチル化酵素（Histone deacetylase, HDAC）は、クロマチンの主要な構成因子であるヒストンの脱アセチル化を担う酵素で、構造に基づきクラス 1-クラス 4 に分類されている。クロマチンはヒストンに DNA が巻き付いたヌクレオソーム構造から構成される。遺伝子の発現は DNA の塩基配列のみならず、ヒストンに対するアセチル化やメチル化などの修飾によって制御されることが知られている。ヒストンアセチル基転移酵素（Histone acetyl transferase, HAT）によるヒストンアセチル化は、ヒストンと DNA の結合を緩めるため、転写因子や RNA ポリメラーゼなどが DNA に結合しやすい状態を誘導

する。従って、ヒストンアセチル化は転写活性化を誘導し、ヒストン脱アセチル化は転写抑制に働くと考えられている。このようなエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は、中枢神経回路形成が活発に行われている発生期だけでなく、損傷後の回路修復にも関わる事が示唆されている。これまでに、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が、中枢神経障害後に神経保護的な作用を示すことが報告されてきた。本研究では、特にクラス 1HDAC に親和性の高い HDAC 阻害剤 CI-994 に着目し、中枢神経障害後の神経保護作用について検証を行った。

「結果」

1) 脊髄損傷後における HDAC の発現変化

申請者は、脊髄損傷モデルマウスを作製し、損傷後の脳、脊髄における HDAC の発現変化を検証した。Real-time PCR の結果、損傷後 14 日目に HDAC1, HDAC3 の発現が減少することがわかった。また、ウエスタンブロットにより、脊髄損傷後、ヒストンアセチル化レベルが増加することがわかった。HDAC1, HDAC3 は HDAC2, HDAC8 と共にクラス 1HDAC に分類されている。そこで、

クラス 1HDAC に高い親和性を示すことが知られている HDAC 阻害剤 CI-994 に着目した。

CI-994 の腹腔内投与により、投与量依存的にヒストンアセチル化レベルが増加した。

さらに、免疫染色により、脊髄損傷後の脊髄における HDAC 発現細胞を検証した。HDAC1, 3 は脊髄の神経細胞と共に、MPO 陽性細胞に発現することが示された。また、CD68 陽性細胞（ミクログリア/マクロファージ）のヒストンアセチル化レベルを検証した結果、CI-994 投与群ではコントロール群（DMSO 投与群）と比較してヒストンアセチル化レベルが亢進することが示された。これらの結果から、CI-994 は脊髄損傷後の脊髄において、ヒストンアセチル化レベルを亢進させることが示唆された。

2) HDAC 阻害剤による免疫反応抑制と神経保護作用

これまでに様々な HDAC 阻害剤の神経保護作用が報告されている。そこで申請者は、脊髄損傷モデルを用いて、HDAC 阻害剤 CI-994 投与による神経保護作用について検証した。脊髄損傷後、CI-994 10 mg/kg を投与し、損傷 1, 3, 5, 7 日後の脊髄を採取し、免疫染色、及び FACS を行い、浸潤した免疫細胞について検証した。その結果、コントロール群と比較して、CI-994 投与群では、損傷 3 日後における MPO 陽性好中球の割合が減少していることが

わかった。さらに、損傷後の脊髄を用いて、サイトカインアレイを行った。その結果、コントロール群と比較して CI-994 投与群では、tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interferon- γ (IFN- γ) などのサイトカイン発現が減少する傾向が見られた。

さらに、脊髄損傷後の脊髄の免疫染色を行い、NeuN 陽性細胞数を検証した。損傷部より吻側、尾側共に、CI-994 投与群ではコントロール群と比較して多くの NeuN 陽性細胞数が検出された。以上の結果から、HDAC 阻害剤 CI-994 により、脊髄損傷後の免疫反応が抑制され、神経細胞の生存・維持が促されることが示唆された。

3) HDAC 阻害剤による損傷後の運動機能回復促進作用

HDAC 阻害剤 CI-994 が、脊髄損傷後の運動機能回復に寄与するか、検証した。胸髄半切断による脊髄損傷モデルでは、マウスの下肢の機能が主に障害を受ける。損傷後、1, 2, 3, 4, 5, 6 週目まで、マウスの運動機能について評価した。BMS score, Beam walk, ladder walk test による運動機能評価の結果、CI-994 投与群ではコントロール群と比較して、有意に運動機能回復が促された。

「今後」

本研究により、脊髄損傷後に HDAC 阻害剤を投与することで、神経細胞保護、運動機能回復の促進が示唆された。今後は HDAC 阻害剤によるこれらの作用のメカニズムを明らかにする。脊髄損傷後における HDAC の標的遺伝子を同定し、それらの発現を制御することで、より効果的な運動機能回復作用が得られるか検証する。

引用文献

1. Kawakami, Y., Kurihara, Y., Saito, Y., **Fujita, Y.**, Yamashita, T., Takei, K. (2018) The soluble form of LOTUS inhibits Nogo receptor-mediated signaling by interfering with the interaction between Nogo receptor type 1 and p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci.* 38 (10) 2589-2604.
2. van Battum, E.Y., Verhagen, M., Vangoor, V., **Fujita, Y.**, Derijck, A., O'Duibhir, E., Giuliani, G., de Gunst, T., Adolfs, Y., Lelieveld, D., Egan, D., Schaapveld, R., Yamashita, T., and Pasterkamp, R.J. (2017) An Image-Based miRNA screen identifies miRNA-135s as regulators of CNS axon growth and regeneration by

targeting Krüppel-like factor 4. J Neurosci. 38(3):613-630.

3. **Fujita, Y.**, Sato, A. and Yamashita, T. (2013) Brimonidine promotes axon growth after optic nerve injury through Erk phosphorylation. Cell Death Dis. 4, e763.
4. Tanaka, T., **Fujita, Y.**, Ueno, M., Shultz, L.D. and Yamashita, T. (2013) Suppression of SHP-1 promotes corticospinal tract sprouting and functional recovery after brain injury. Cell Death Dis. 4, e567.
5. **Fujita, Y.**, Takashima, R., Endo, S., Takai, T. and Yamashita, T. (2011) The p75 receptor mediates axon growth inhibition through an association with PIR-B. Cell Death Dis. 2, e198.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

1. Zhang, S., **Fujita, Y.* (*Co-corresponding author)**, Matsuzaki, R., and Yamashita, T.* (2018) Class I histone deacetylase (HDAC) inhibitor CI-994 promotes functional recovery following spinal cord injury. Cell Death Dis. 9(5):460.

[ポスター発表]

佐田直基、山下俊英、藤田幸 (2018) 脳損傷後の機能回復に対するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の効果、第 41 回日本神経科学学会、ポスター、神戸 (2018.7.26)

Junior Investigator Poster Award