



Title	High-resolution transcriptome analysis on a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using single-nucleus RNA-seq
Author(s)	涌井, 菜央
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/103127
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	涌井 菜央
論文題名 Title	High-resolution transcriptome analysis on a mouse model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using single-nucleus RNA-seq (単一核RNA-seqを用いた新生児低酸素虚血性脳症モデルマウスの高分解能トランскルiptオーム解析)
論文内容の要旨	
〔目的(Objective)〕	
<p>新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE) には、出生前、出生中、出生直後の脳への酸素や血流の調節障害に起因する脳障害が含まれる。急性期には、興奮毒性によって神経細胞障害が引き起こされ、その後数時間かけて永続的な障害が現れる。現在確立されている治療法は低体温療法のみであり、治療可能期間が短いことや適応となる患者は中等症以上のHIEに限られることなど制限は多く、その有用性も限定的である。新たな治療法創出のため、特に亜急性期以降でのHIEの発症機序について、詳細な解明が求められている。</p>	
<p>最近のシングルセルRNA配列決定の進歩により、多様な疾患の分子学的研究が可能になった。しかし、神経細胞のようなサイズの大きい細胞種では解析が困難であり、この点は神経細胞の損傷が中心的な病態を研究する上での課題となっている。そこで我々は神経細胞を含めたHIE病態のトランスクルiptオーム解析を行うことを目的とした研究を行った。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>【方法】生後7日目のB6マウスの左頸動脈を結紮したのち8%低酸素環境に曝露することで、HIEモデルマウスを作成した。加えて3つの対照群（頸動脈結紮単独群、低酸素曝露単独群、偽手術実施群）を作成し、受傷7日目に脳組織の採取を行った。まず横断面において患側脳組織の萎縮を評価した。さらに4群のマウスの大脳皮質及び海馬組織をそれぞれ採取し、神経細胞を含めた単一細胞情報の解析を行うため、単一核RNAシーケンスを行った。最後にミクログリアの挙動を評価するため、免疫蛍光染色を追加した。</p>	
<p>【成績】HIE群では健側と比較し、患側海馬の著明な萎縮（面積比40%）及び患側大脳半球の軽度萎縮（面積比90%）を認めたが、大脳皮質についてその差は殆ど認められなかった。単一核RNAシーケンスの結果、神経細胞に注目すると、HIE群の患側海馬ではCA1領域の細胞割合が著明に減少していた。大脳皮質ではHIE群と対照群の差はわずかであり、HIEによる障害は細胞の種類と解剖学的部位に非常に特異的であることが示唆された。さらに、この変化はいずれの対照群でも認められず、HIEに特異的な神経細胞変化を引き起こすには、低酸素状態と虚血状態の組み合わせが必須であることが示された。</p>	
<p>神経細胞以外にHIE群で著明な変化を認めたミクログリアについて追加解析を行った。神経細胞と同様に海馬での細胞分布に明瞭な変化を認めた。HIE群、頸動脈結紮単独群、低酸素曝露単独群と偽手術実施群を比較して発現遺伝子差 (Differential expression gene: DEG) 分析を行ったところ、HIE群の海馬サンプルが最も多くのDEGを示し、HIE群の大脳皮質サンプルがこれに続いた。海馬と大脳皮質のDEGパターンは一部で類似性を持つものの、海馬での変化が著明であった。さらにHIE群の海馬DEGに対してGene Ontology解析を行ったところ、インターフェロン活性化に関連のあるウイルス応答経路に関する遺伝子の濃縮が明らかになった。この海馬におけるミクログリアの活性化は、HIE群の患側海馬におけるイオン化カルシウム結合アダプター分子1 (Iba-1) の免疫染色によっても確認された。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>HIEにおける神経細胞障害は細胞型および部位特異的に起こることが明らかになった。単一核RNAシーケンスによって観察された障害の重症度は、組織学的所見と密接に相關しており、HIEを研究するための単一核RNAシーケンスの有用性が示された。さらに、神経細胞に加えてミクログリアもHIEに反応して同様の変化を示し、脳の萎縮と遺伝子発現の変化が海馬で最も顕著であることがわかった。これらの知見は、HIEの分子的・解剖学的影響に関する貴重な洞察を与えるとともに、海馬が疾患メカニズムの解明と治療法の開発にとって重要な焦点であることを示唆するものである。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 涌井 菜央		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	主 査 大阪大学教授	小玉 美智子
	副 査 大阪大学教授	北島 康司
副 査 大阪大学教授	望月 透樹	
論文審査の結果の要旨		
<p>新生児低酸素性虚血性脳症（HIE）とは、出生前または分娩前後の新生児の脳への酸素または血流供給の低下により発症する病態である。現在確立された標準治療は低体温療法のみであり、治療可能期間が短いこと等から、更なる病態生理の解明及び新規治療法の開発が期待されている。</p> <p>近年単一細胞解析技術を用いた研究は多いが、神経細胞のような大きな細胞の解析は困難であり、HIE病態に関する知見は限定的である。そこで本研究ではHIEモデルマウスを用いて受傷後1週間の患側海馬及び大脳皮質を採取し、単一核RNAシークエンスを行った。その結果、本解析方法によって観察される脳組織障害の重症度は組織学的所見と密接に相関し、特に海馬での脳萎縮及び遺伝子発現の変化が著明であることがわかった。神経細胞に加えてミクログリア細胞もHIEに反応して同様の変化を示し、モデルマウスの患側海馬におけるミクログリア細胞ではインターフェロン活性化に関連のあるウイルス応答経路に関する遺伝子の発現が濃縮していた。これらの結果は、単一核RNA-seqの手法によりHIE病態を一細胞レベルで解析できることを証明し、海馬が疾患メカニズムの解明と治療法の開発にとって重要な焦点であることを示唆するものであり、学位論文に値する。</p>		