

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20023

研究課題名(和文)脳静脈虚血における内因性神経幹細胞応用の基盤研究

研究課題名(英文)endogenous neural stem cell expression and cerebral venous ischemia

研究代表者

竹島 靖浩 (Takeshima, Yasuhiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60510203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳静脈虚血のラット実験モデルを利用し、脳皮質静脈閉塞における局所の内在性神経幹細胞の発現の有無とその分布を調べる事で、神経幹細胞をこの脳静脈虚血分野へ応用・展開するための研究基盤を確立する事を目的として実施した。免疫組織学的検討の結果、脳皮質静脈閉塞による脳静脈梗塞では、虚血35日目には虚血巣周囲領域に新生神経細胞の発現を認め、虚血15日目には虚血巣周囲領域に神経幹細胞の誘導が確認できた。脳動脈虚血の報告で指摘された、脳室周囲からの内在性神経幹細胞の誘導現象は認められず、局所的な脳静脈虚血である本モデルでは、異なる発現メカニズムの存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳静脈虚血において局所神経幹細胞の誘導と新生神経細胞の出現が確認できた。動脈虚血とは異なる分布であり、その誘導・発現メカニズムにも差異があると考えられる。脳静脈虚血の特殊性を示す結果であり、さらなる研究により神経幹細胞の修飾を利用した新規治療の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cerebral venous ischemia is a rare but potentially significant complication of neurosurgical procedures. However, it is still unclear how intraoperative sacrifice of cerebral veins affects regional neural cell activations: especially endogenous neural stem cell. To elucidate its pathophysiology, we examine this in vivo study. Two cortical veins were occluded photochemically using rose Bengal dye in male Wister rats. BrdU was intermittently administered intraperitoneally after the venous occlusion for several days. Immunohistochemical examination showed double positive (BrdU+NeuN+) cell was expressed around ischemic core at day 35 after the ischemia, and double positive (BrdU+Dcx+) cell was also expressed around ischemic core at day 15 after the ischemia. However, double positive (BrdU+Dcx+) cell was not observed at the periventricular zone. This study demonstrated new findings of the expression of regional endogenous neural stem cells after cortical venous ischemia.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳静脈虚血 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳虚血と脳静脈虚血

脳虚血は主要な疾患群であり、一般的にその病態により動脈虚血と静脈虚血に分類される。脳静脈虚血は近年の高齢者手術症例の増加や頭蓋底外科技術の発達により注目されており、我々のグループではこれまで、脳静脈還流障害の基礎的研究を進めてきた。

脳虚血治療では虚血性神経細胞死を抑えることのみならず、損傷した神経細胞のネットワークを回復・再構築により機能的予後を改善させることも大切である。急性期治療の可能性追求と同等にこの慢性期の神経の回復・再生等の研究も望まれている。

(2) 脳静脈虚血の特徴

脳静脈虚血は、比較的軽度の虚血が長時間持続することで緩徐に進行することを特徴とする。急速完成する動脈虚血と異なり、緩徐な虚血がゆえに虚血巣や周辺組織にはその際に様々な修飾が加えられている可能性がある。また、臨床では長期の経過で神経症状に持続的な改善が見られることがあり、これらの病態解明に新しい治療開発の可能性があると考えられる。

(3) 脳虚血研究における神経幹細胞

近年、各医学研究の分野で種々の栄養因子や血管内皮細胞増殖因子などを分泌することで神経の再生や可塑性を促す神経幹細胞が注目され、神経医学研究の分野でも発展している。

脳虚血における研究では神経幹細胞の移植の報告が増えているが、基礎研究と臨床研究結果との乖離を示唆する報も見受けられ、まだまだ発展途上である。また、神経幹細胞移植以外に、内在性神経幹細胞を用いた脳虚血研究も行われている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳静脈虚血動物実験モデルを利用して内因性神経幹細胞の発現動態を明らかにし、脳静脈虚血治療へ応用・展開するための研究基盤を確立する事である。

3. 研究の方法

脳静脈虚血における局所の内在性神経幹細胞の発現を調べるため以下の実験を施行した。

(1) 脳皮質静脈閉塞モデル作成

Wistar ラットを脳静脈虚血群・コントロール群の2群に分けた。脳静脈虚血は以下の方法で施行した。抱水クロラール腹腔内投与で麻酔し、静脈・動脈ラインを確保した。腹臥位として頭部をフレームに固定し、左頭頂部を開頭(8x16mm)した。ローズベンガル色素の静脈内投与と緑色光を用いた光凝固法で2本の隣接する脳表静脈を閉塞された。コントロール群では開頭のみを行った。

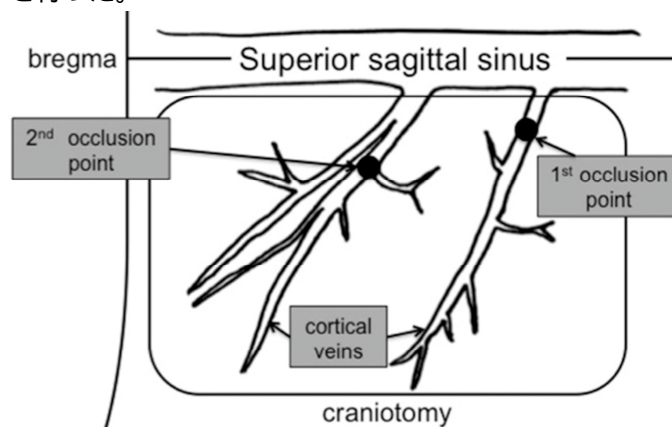


図 1. 脳皮質静脈閉塞モデル

(2) 組織学的検討

本研究で用いた BrdU (ブロードベニチン) はチジンアナログであり、細胞周期 S 期において新たに合成された DNA に取り込まれる。故に BrdU がとりこまれた DNA は抗 BrdU 抗体で検出可能となる。よって梗塞作成後に BrdU を投与し、成熟神経細胞特異的マーカーである NeuN や、遊走する未熟ニューロン特異的マーカーである Dcx との共発現を確認することで、新生神経細胞や新規に誘導された神経幹細胞の発現動態を確認することができる。以下の2つの実験を行った。

静脈閉塞後の4・5・6日目の3日間、BrdUを1日2回腹腔内投与した。静脈梗塞後35日目に脳を摘出し、4%PFAに固定して脳凍結切片を作成した。免疫組織学的手法で、梗塞巣の確認と、抗BrdU抗体・抗NeuN抗体の蛍光二重染色を行い、二重陽性細胞発現とその分布を確認した。

静脈閉塞後の1～14日目までの14日間、BrdUを1日2回腹腔内投与した。静脈梗塞後15日目に脳を摘出し、4%PFAに固定して脳凍結切片を作成した。免疫組織学的手法で、梗塞巣の確認と、抗BrdU抗体・抗Dcx抗体の蛍光二重染色を行い、二重陽性細胞発現とその分布を確認した。

4. 研究成果

実験(2) 共に、全例でヘマトキシリン・エオジン染色にて脳皮質に局限した脳静脈梗塞が確認された。

抗BrdU抗体・抗NeuN抗体の免疫染色では、脳静脈虚血coreの辺縁において、共陽性細胞の発現が見られた。一方で、対側大脳半球やコントロール群での開頭直下の脳実質には、共陽性細胞の発現は認められなかった。

抗BrdU抗体・抗Dcx抗体の蛍光二重染色では、共陽性細胞が脳静脈虚血coreの辺縁に共陽性細胞は認められるも、対側大脳半球やコントロール群での開頭直下の脳実質には認められなかった。また、脳室周囲軟膜領域はその辺縁にも共陽性細胞の発現は確認できなかった。

以上の結果より、脳皮質静脈虚血における局所神経幹細胞誘導とそれによる神経細胞新生が示唆された。その分布は脳虚血core周囲に局限しており、対側大脳半球や脳室周囲軟膜領域には発現が認められなかった。脳動脈虚血にて指摘されている脳室周囲軟膜領域に存在する内在性神経幹細胞からの遊走とは異なる、皮質脳静脈虚血特有のメカニズムが存在する可能性が示唆された。発現分布における時間的・空間的広がりについて検討の余地が残っており、さらなる研究が望まれる。

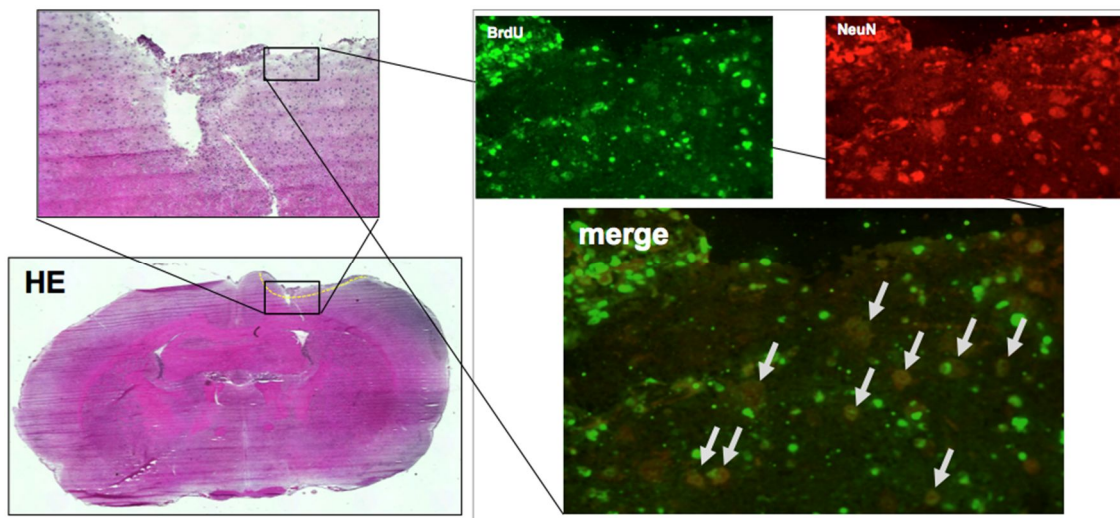


図2. 抗BrdU・NeuN抗体の免疫組織学的評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeshima Y, Hanakita J, Takahashi T, Nakase H.	4. 巻 95
2. 論文標題 Multiple Osseous Loose Bodies Associated with Lumbar Isthmic Spondylolisthesis.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 World Neurosurg	6. 最初と最後の頁 623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2016.06.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima T, Takeshima Y, Kim TK, Nakagawa I, Motoyama Y, Park YS, Nakase H.	4. 巻 162(5)
2. 論文標題 C2 extradural schwannoma compressing the dominant internal jugular vein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neurochir (Wien)	6. 最初と最後の頁 1181-1185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00701-020-04294-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nakase H, Nakagawa I, Nishimra F, Takeshima Y, Wajima D, Motoyama Y, Park YS
2. 発表標題 Neurosurgical strategy in consideration of cerebral venous circulation
3. 学会等名 International Mt.BANDAI Symposium for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金 泰均、竹島靖浩、輪島大介、中川一郎、本山靖、朴永銖、中瀬裕之
2. 発表標題 ラット脳皮質静脈閉塞モデルを用いた脳静脈灌流障害の基礎的研究の成果と今後の展望
3. 学会等名 日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金 泰均、竹島靖浩、中川一郎、本山靖、朴永鉢、中瀬裕之、王寺幸輝.
2. 発表標題 脳静脈虚血における内在性神経幹細胞発現動態 新生成熟神経細胞の発現分布について
3. 学会等名 日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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