

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390390

研究課題名 (和文) 大脳基底核・視床における虚血性脳障害後の神経再生誘導

研究課題名 (英文) Induction of neuronal regeneration following ischemic injury in basal ganglia and thalamus

研究代表者

川原 信隆 (KAWAHARA NOBUTAKA)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：60214673

研究成果の概要：

脳の一過性虚血後には、海馬、線条体、第3脳室近傍にて神経幹細胞の増殖応答が得られ、成長因子投与によってさらに増殖能は更新する。しかし、部位による成長因子応答性は異なることが判明した。線条体においては、成長因子投与によって20%近くの神経再生を得ることが可能であり、電気生理学的、個体機能としても改善が認められた。一方、Notchの発現もこれらの神経前駆細胞で更新し、亜急性期にその情報伝達系を遮断することで神経への分化を促進させることが可能であった。内在性神経幹細胞を用いた様々な神経再生修飾療法の今後の発展への知見を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	0	6,400,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	2,580,000	17,580,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、7304脳神経外科学

キーワード：脳虚血、神経細胞死、神経再生、線条体

## 1. 研究開始当初の背景

内在性神経間細胞が哺乳類成体脳に存在することが広く知られており、脳虚血後の海馬CA1領域においても、成長因子投与によって40%近い神経再生と個体認知機能の改善が得られることが、我々の研究で判明した。これらの神経幹細胞による神経再生が脳の他部位にてどの程度可能であるかについての定量的な解析は充分行われておらず、臨床へもつながる効率的療法となるか否かは不明であった。特に、神経幹細胞の増殖応答に部位特異性があるのか、また増殖期以外の時期、特に分化過程での神経分化を促進させることは可能であるのか、等が今後の効率的治

療法の開発には重要な課題となってきた。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、まず脳虚血後に各部位の神経幹細胞がどのような挙動をするかを、増殖率を指標に検討することを目的の第一とした。第2に線条体に直目して神経幹細胞の挙動を解析し、成長因子による増殖過程の増幅効果、およびその後の神経前駆細胞の遊走、また損傷部位での形態学的な成熟過程を追跡し、本療法でどの程度効率的に神経再生が可能かを定量的に検討することを目的とした。第3には、増殖期以降の神経分化の過

程を得に Notch 受容体に着目して検討し、その阻害薬がどの程度神経分化に影響を与えるかを検討した。

### 3. 研究の方法

ラットの一過性全脳虚血モデルを用い、神経幹細胞の標識として BrdU 腹腔内投与による標識を行った。

(1) 神経幹細胞の部位応答特異性の検討：上記脳虚血モデルにて、海馬 CA1 領域、歯状回、前脳室下帯（線条体）、第 3 脳室壁の 4 カ所に直目して増殖期にある神経前駆細胞の増殖応答を BrdU 標識細胞数として定量的比較を行い、同時に成長因子による効果も検討した。成長因子として IGF-I, EGF, FGF-2, EPO, BDNF, Notch ligand DLL4 を用いた。

(2) 線条体の神経再生：上記モデルを用いて線条体に 95% 以上の強い神経細胞死を誘導するモデルを作成した。EGF, FGF-2 を脳室内に 3 日目より 3 日間投与し、急性期の神経前駆細胞の増殖、損傷部位への BrdU 細胞の遊走、損傷部位での神経細胞数の定量的変化、当該部位での部位特異的神経分化などを形態学的に検討した。また、スライスを用いて電気生理学的検討を行い、個体の行動解析として stair case test を行った。

(3) Notch の発現解析とその阻害薬の神経分化に及ぼす影響：本検討では、一過性全脳虚血モデルを用いて、海馬での Notch 受容体の発現を免疫組織学的に検討した。また、上記と同様の成長因子を投与した場合の Notch 発現への影響、BrdU 陽性細胞数（増殖細胞数）への影響などを急性期に検討した。一方、亜急性期（虚血 7 日目移行）に Notch 受容体を切断して細胞内に情報を伝達する過程の阻害薬（ガンマセクレターゼ阻害薬）の効果、神経分化への過程で存在する neuroblast marker である DCX 陽性細胞数で比較し、最終的成熟神経細胞数として有意な差が有るか否かを定量的に解析した。

### 4. 研究成果

(1) 神経幹細胞の部位応答特異性の検討：脳虚血急性期に各種成長因子を投与し、急性期の各部位での神経幹細胞の増殖応答を、BrdU 陽性細胞数として比較した結果、各部位で特異的応答をすることが判明した。前脳室下帯 (aSVZ) では EGF, FGF-2 が有効であり、DLL との 3 者併用療法にてさらに 2 倍以上の応答が得られた (a)。一方、海馬歯状回で応答はきわめて限局的であり、EGF と FGF の併用にてようやく有意差が出る程度であった (b)。一方、同じ海馬でも CA1 領域に存在する神経幹細胞 (pPV) は、EGF と FGF の単独では効果が出現しないものの、その併用にて突出した増殖応答が得られた (c)。第 3 脳室壁近

傍視床下部 (HT) では、FGF-2 に対してのみ著明な応答をし、DLL4 の併用にてさらに 2 倍近くの相乗効果が得られた (d)。これらの知見から、各部位に有効であった成長因子は EGF, FGF の併用であった、DLL4 の併用効果などを考慮すると、明らかな部位応答特性を有していることが判明した。

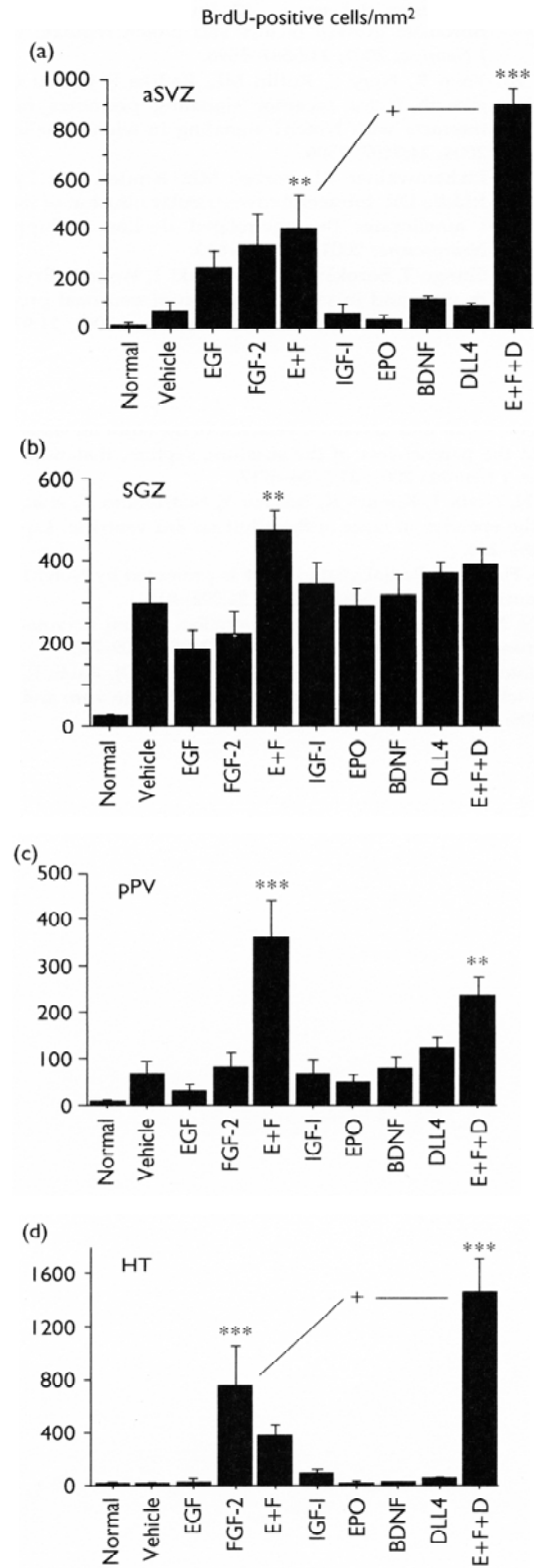


図 1

(2) 線条体の神経再生: 上記所見をもとに、急性期に EGF と FGF-2 併用療法を行い、線条体での神経細胞数の計測を行った。その結果、対照群に比較して3倍の神経細胞が6週後には回復しており、神経再生による効果が強く考えられた。分裂抑制薬である Ara-C を成長因子と同時期に短期間投与すると、これらの50%以上の神経細胞が消失し、急性期に分裂した細胞(神経幹細胞)に由来するものであることが強く示唆された。

そこで、急性期に BrdU にて神経幹細胞を標識したところ、前脳室下帯から外側の損傷部位に DCX を発現してつつ遊走する neuroblast が確認された。遊走後には、6週から12週にかけて ChAT, PV, DARPP-32 陽性細胞など、部位得意的神経分化を遂げていた。

これらの神経細胞を、スライスにて電気生理学的に検討すると、6週頃にはまだ有意な活動電位が観察されなかったが、20週以降にはほぼ成体の成熟投射性神経と同等の特徴を備えた神経細胞へと変化していた。

最後に、個体機能として stair case test にて pellet を取り上げる巧緻運動機能を検討すると、2週後には vehicle, 成長因子投与群の両者にて著明な障害が認められたが、6週後には成長因子投与群でのみ有意な回復が得られた。これらは、短期間の成長因子投与にて、形態学的、電気生理学的、個体行動学的レベルにて、有意な神経再生が線条体にて可能であることを示唆している。

(3) Notch の発現解析とその阻害薬の神経分化に及ぼす影響: Notch 受容体は、胎生期には神経前駆細胞の増殖と促進させる一方で分化を抑制し、前駆細胞のプールを拡大す

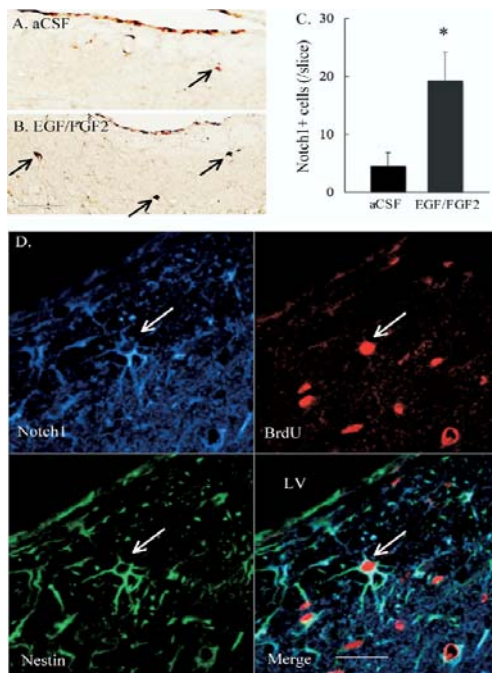


図 2

る作用を有していることが示されてきている。Notch の発現が成体脳虚血後に発現しているか否かについての検討は十分になされていなかった。今回の研究では、まず脳虚血後に成長因子を投与して Notch が発現しているか否かを免疫組織学的に検討した結果、明らかに陽性細胞が増加し(図2, A,B,C)、BrdU および Nestin と共染色されていたことは(図2, D)、神経幹細胞にて Notch 受容体が発現していることを示していた。また、Notch 受容体が活性化された intracellular domain である NICD の発現を Western blot にて検討した結果、Day 5 に明らかな増加が認められた(図3)。

E. NICD levels (% of Control)

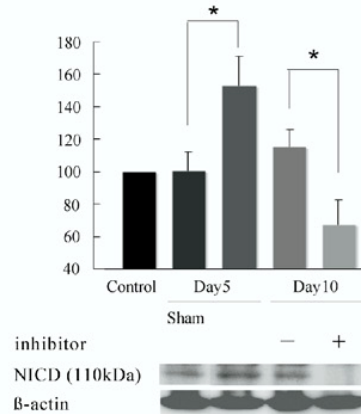


図 3

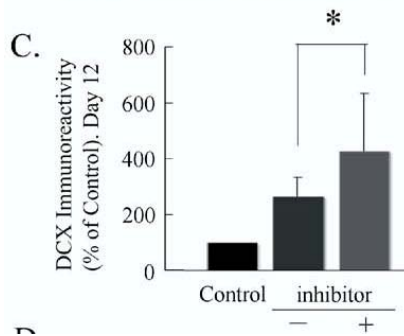
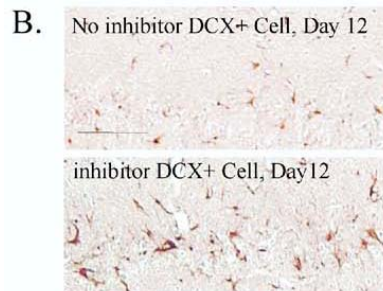
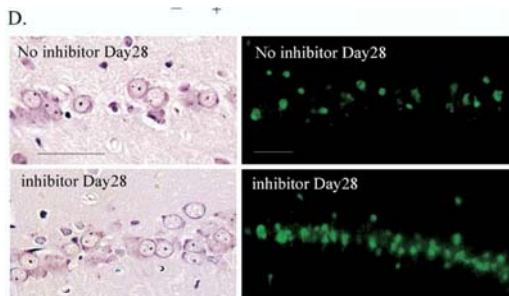


図 4

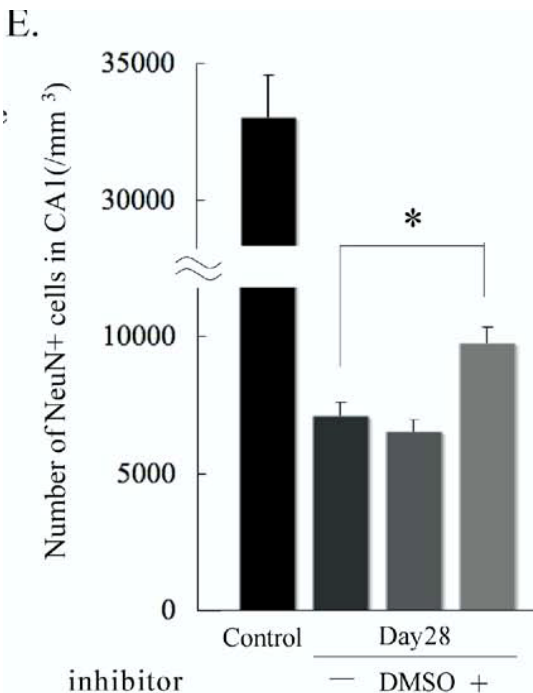
次に、Notch 受容体活性化阻害剤であるガンマセクレターゼ阻害剤を Day5 から投与すると、Day10 には有意に NICD の増加を抑制することができた (図 3)。このことは、同阻害剤が Notch 情報伝達系を亜急性期に有効に抑制可能であることを示している。Day12 には、神経細胞への分化を示す DCX 陽性細胞が明らかに増加していることも、DCX 免疫組織学的検討にて分かった (図 4B, C)。最終的には、Day28 での神経細胞数を海馬 CA1 にて検討した。Paraffin 切片にても NeuN 免疫組織にても明らかな神経細胞の増加が認められた (図 5)。

図 5



統計学的検討でも、有意に成熟神経細胞数の増加が認められた。

図 6



これらの知見は、胎生期だけでなく成体脳においても Notch 受容体が神経幹細胞の増殖、分化に関与していることを示し、さらにその亜急性期における阻害が、神経幹細胞から神経への分化を促進させた。これらの知見は、内在性神経幹細胞を用いた再生療法を考慮するとき、増殖期だけでなく分化の過程も外

因性に制御可能なことを示しており、今後のさらなる発展が期待される。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1) 川原信隆: 神経細胞新生による治療—内在性神経幹細胞賦活化療法. 日本臨床 64(Supp17):655-659, 2006

2) 川原信隆: 脳梗塞への再生医療の将来展望 —内因性神経細胞新生と細胞移植— 血管医学 7(No2): 61-68, 2006

3) Furuya K, Kawahara N, Yamakawa Y, Kishida H, Hachiya NS, Nishijima M, Kirino T, Kaneko K: Intracerebroventricular delivery of dominant negative prion protein in a mouse model of iatrogenic Creutzfeldt-Jacob disease after dural graft transplantation. Neurosci Lett 402:222-226, 2006

4) Yonekura I, Takai K, Asai A, Kawahara N, Kirino T: p53 potentiates hippocampal neuronal death caused by global ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 26:1332-1340, 2006

5) 川原信隆: 内在性神経幹細胞を用いた脳虚血損傷後の再生医療—哺乳類成体脳における神経細胞新生の制御と治療的応用への期待— 脳循環代謝 18:98-103, 2006

6) Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y: Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. Am J Pathol 172:454-469, 2008

7) Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka J, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N: Region-specific proliferative response of neural progenitors to exogenous stimulation by growth factors following ischemia. Neuroreport 19(8):805-809, 2008

8) Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka J, Higashiyama S, Saito N, Kirino K, Kawahara N: Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury. Neuroscience 158:683-692, 2009

[学会発表] (計 7 件)

1) 吉河学史 大宅宗一 高井敬介 田中純一 齊藤延人 桐野高明、川原信隆: 一過性前脳虚血モデルを用いたラット線条体における神経再生について. 第 7 回日本分子脳神経外科学会 2006

2) 大宅宗一、飯島明、齊藤延人、桐野高明、川原信隆: 血管内バルーン閉塞による霊長類一過性全脳虚血モデルの開発. 第 6 5 回

日本脳神経外科学会総会 2006

3) 田中 純一、吉河 学史、桐野高明、川原信隆：若年および加齢ラットハンチントン病モデルにおける、内在性神経再生を介した外因性成長因子の治療効果。第65回日本脳神経外科学会総会 2006

4) 川原信隆：脳卒中後の内因性神経再生の再評価。第32回日本脳卒中学会総会 2007

5) Kawahara N: Ischemic models and their limitations: Cardiac arrest models and global ischemia in mice. 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function 2007

6) Kawahara N, Gakushi Yoshikawa, Soichi Oya, Takaaki Kirino: Regenerative therapy for ischemia by endogenous neural progenitors. 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function 2007

7) 川原信隆：内在性幹細胞による神経再生療法の発展性。第19回日本脳循環代謝学会総会 2007

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川原 信隆 (KAWAHARA NOBUTAKA)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：60214673

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

初山 俊彦 (MOMIYAMA TOSHIHIKO)  
生理学研究所・准教授  
研究者番号：20230055