

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19390292

研究課題名 (和文) 脳微細環境分子を用いたオリゴデンドロサイトの機能制御と
未熟児脳障害治療法の開発研究課題名 (英文) Effects of brain niche constituents on differentiation and
survival of neural cells containing oligodendrocytes

研究代表者

大平 敦彦 (OOHIRA ATSUKO)

愛知医科大学・客員教授

研究者番号：20101074

研究成果の概要 (和文)： 未熟児脳障害の克服を最終目標として、その障害モデル実験系として、子宮内胎仔発育遅延ラットを作製した。このラットの新生仔では、脳の代表的な細胞環境分子であるコンドロイチン硫酸の減少、大脳皮質原基で死細胞が増加、及び反射行動の発達遅延が認められた。培養条件下で、神経幹細胞から分化した様々な神経系細胞の混合物を低酸素処理したところ、オリゴデンドロサイトに比べて、神経細胞が多く死滅した。この細胞死は、培養液に増殖因子 FGF-2 および EGF を添加することにより抑制された。これらの増殖因子は、大脳皮質原基に見られた細胞死の抑制にも、効果を発揮することが期待できる。

研究成果の概要 (英文)： The final goal of our research is to conquer brain injuries often found in the premature newborn. As the experimental model, we produced fetal growth retardation (FGR) model rats. The FGR pups exhibited a significant delay in postnatal neurological development, a high density of apoptotic cells in the cortical plate, and a reduced amount of brain chondroitin sulfate proteoglycans that is a major brain niche constituent. Hypoxic treatment of a neural cell mixture which differentiated from neural stem cells in culture revealed that neuronal cells were more sensitive to hypoxia than oligodendrocytes. Addition of fibroblast growth factor-2 or epidermal growth factor to the hypoxic culture reduced cell death, suggesting that these growth factors are promising to prevent cell death found in the cortical plate of the FGR rat newborn.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード： 未熟児、脳障害、子宮内胎児発育遅延、低酸素、コンドロイチン硫酸、増殖因子、オリゴデンドロサイト、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、全出生数に対する低出生体重児の数が顕著に増加しており、それに伴う脳性麻痺児や行動異常児、学習障害児の増加が危惧されている。

(2) 満期産児では、出生時に起きる脳障害の原因は、主に神経細胞死である。一方、未熟児（早期産児）脳障害では、主にオリゴデンドロサイト（ODC）前駆細胞の変性が原因であると考えられている。

(3) 未熟児脳障害のモデル実験系として、生後 2~3 日齢のラットやマウスを不可逆的な低酸素虚血条件下に置く方法が多用されているが、この方法では母体要因が欠落することになる。したがって、子宮内の胎児に脳障害を惹起する実験系が求められる。

(4) 未熟な脳は、神経幹細胞をはじめとして様々な分化段階にある神経細胞やグリア系細胞を含むが、それぞれの細胞の低酸素感受性の程度は不明である。

(5) 脳の細胞微細環境分子（ニッチ構成物質：細胞外マトリックス高分子や増殖因子群）が神経細胞に対して保護効果を示すことが明らかになりつつあるが、ODC に対しての効果は明らかになっていない。

2. 研究の目的

上述の背景をもとに、未熟児脳障害の克服を最終目的として、本研究では次の諸点の解明を目指す。

(1) 未熟児脳障害モデルとして子宮内胎仔発育遅延ラットを作製し、その病態を解析する。

(2) 神経幹細胞の分化誘導培養により、様々な分化段階にある神経系細胞の混合培養系を作り、以下の解析を行う。

① 各細胞種の周囲におけるコンドロイチン硫酸（主要な脳微細環境分子）の局在を確認する。

② 脳の微細環境分子（各種のコンドロイチン硫酸と増殖因子群）が、神経幹細胞の分化に及ぼす影響を明らかにする。

③ 低酸素負荷に対して、どの細胞種の感受性が高いのか（死滅しやすいか）を調べる。

④ 脳の微細環境分子のなかに、低酸素負荷による細胞死を防ぐ活性（細胞保護活性）を持つものがあるのかを調べる。

(3) (2)-(4)項の研究で得られるであろう細胞保護活性を示す微細環境分子を、未熟児脳障害モデルラットの脳内に投与（あるいは脳内で発現増強）することにより、脳障害を軽減できるのかを調べる。

3. 研究の方法

(1) 子宮内胎仔発育不全モデルラットの作製： 妊娠 13 日齢の SD ラットに、合成トロンボキササン A₂ を含むミニ浸透圧ポンプを埋め込み、連続的に薬物を投与した後、自然分娩させる。

(2) 新生仔ラット脳の組織学的観察： 新生仔ラットを、麻酔下で 4%パラホルムアルデヒドにより灌流固定後、組織切片を作製する。

(3) コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの免疫ブロット分析： 新生仔ラット脳の破砕物を、コンドロイチナーゼ ABC で処理したのち、3%/6%ゲルを用いた SDS-PAGE にかける。タンパク成分を PVDF 膜に転写したのち、各種のプロテオグリカン特異的抗体を用いて、それぞれのプロテオグリカンバンドを染色する。各バンドの濃度は、コンピュータ上で Image J program により測定する。

(4) 新生仔及び幼若期ラットの行動解析：

① 立ち直り反射

② 回転踏み車試験

③ 逃避学習試験： 自動逃避学習装置 (Med Associates Inc.) を用い、学習能力は MED-PCIV program により定量化する。

(5) 神経幹細胞の調製： 胎生 14 日齢ラット胎仔の脳を機械的に破砕し、細胞浮遊液を調製する。得られた細胞を、浮遊培養用培養皿に移し、増殖因子を含む DMEM/F-12 培養液中で 7 日間培養する。この方法により、神経幹/前駆細胞は、浮遊細胞塊（ニューロスフェア）として回収される。

(6) 神経幹細胞の分化誘導培養と低酸素/無グルコース培養： (5)で得られたニューロスフェアを、機械的に破砕して単一細胞浮遊液を調製する。この細胞を、オルニチン/ラミン塗布培養皿を用いて、増殖因子を含まない DMEM/F-12 培養液で培養する。培養 1 週間、神経幹細胞、神経細胞およびその前駆細胞、オリゴデンドロサイト及びその前駆細胞、そしてアストロサイトを含む混合細胞培養系ができる。

この混合細胞培養系の培養液を、無グルコース塩溶液に置換し、低酸素（1%）状態で2～6時間培養する。その後、培養液を DMEM/F-12 に戻し、通常の気相で 24 時間培養する。生存細胞の数は、WST-1 生細胞測定キット（Wako）を用いて推定した。

(7) 免疫染色： (2)の方法で灌流固定した新生仔ラット脳のパラフィン切片や凍結切片、および 3%パラホルムアルデヒドで固定した単層培養細胞を、各種の神経系細胞に特異的な抗体や抗コンドロイチン硫酸抗体により、免疫染色する。使用した主な抗体とその特異性は、次のとおりである。

- ① CS-56 抗体：コンドロイチン硫酸糖鎖
- ② 1G2 抗体：抗ニューロカン（脳特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）抗体
- ③ 6B4 抗体：抗ホスファカン（脳特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）抗体
- ④ 抗ネスチン抗体：神経幹細胞
- ⑤ 抗βIII チューブリン抗体：神経細胞
- ⑥ 抗 MBP 抗体：成熟オリゴデンドロサイト
- ⑦ O4 抗体：オリゴデンドロサイト前駆細胞
- ⑧ 抗 GFAP 抗体：アストロサイト

(8) アポトシス細胞の検出： 新生仔ラット脳におけるアポトシス細胞（死細胞）の検出は、パラフィン組織切片を、Apoptosis in situ detection kit（Wako）を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 子宮内胎児発育遅延モデルラット新生仔の行動異常：

① 立ち直り反射： 対照群では、反射反応は生後 1 日目から急速に発達し、8 日齢でほぼ成獣の水準に到達した。しかし、発育遅延ラットでは、反射反応の発達が有意に遅れ、生後 12 日齢でようやく成獣の水準に到達した。この結果は、発育遅延ラットでは神経回路の成熟が遅れていることを示している。

② 回転踏み車試験： 生後 22 日齢のラットを用いて、2 日間、1 日 2 回の回転踏み車試験を行った。初回の試行では、対照群（control）と発育遅延群（FGR）との間で、成績に差はなかった。しかし、対照群では、その後 3 回の試行を重ねるごとに成績が向上したのに対して、発育遅延群では、成績の向上は僅かであった。その結果、両者間で、2 回目以降の成績に有意（ $p < 0.01$ ）な差が認められた（図 1）。この結果から、発育遅延ラットでは、運動学習能力が劣っていると考えられる。

③ 逃避学習試験： 自動逃避学習装置を用いて、発育遅延ラットの危険予測学習能力を、

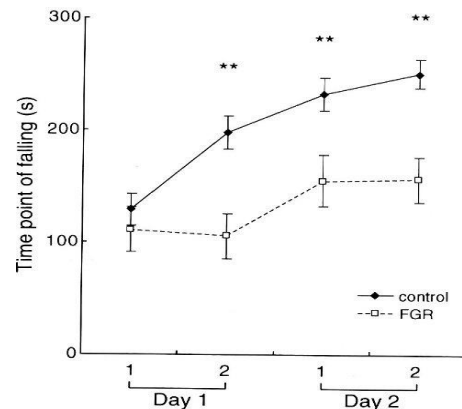


図 1 回転踏み車試験

生後 35 日から 4 日間調べた。危険回避の成功率を測定すると、対照群に比較して発育遅延群では、測定初日から有意に劣っていた。その後、発育遅延群でも成功率は上昇するが、4 日目でも対照群の成功率よりは低かった。以上の結果から、発育遅延ラットには学習障害があることが確認された。

(2) 発育遅延モデルラット脳の形態異常： 生後 0 日齢 (P0) の発育遅延ラットの大脳では、将来灰白質となる領域の細胞数が有意に少ないことがわかった。灰白質は神経細胞が密に存在する領域であるから、この知見は、発育遅延ラット新生仔では、神経細胞の数が少ないことを示唆している。生後 7 日齢で、大脳の対応する領域の細胞数を測定したところ、もはや細胞数に有意な差は認められなかった。

大脳灰白質原基の細胞数が少ないということから、発育遅延ラット新生仔ではこの領域で細胞死が活発に起きていることが予想される。そこで、この領域を TUNEL 染色して、アポトシス細胞の数を調べた。全細胞数における TUNEL 陽性細胞の割合は、対照群（control）が 5%以下であったのに対して、発育遅延群（FGR）では 15%を超えていた（図 2）。生後 7 日齢 (P7) で、大脳の対応する領域の TUNEL 陽性細胞を調べたところ、もはや両群間に有意差は認められなかった。

以上の結果は、発育遅延ラットでは、出生直後まで、大脳灰白質原基で細胞死（おそらく神経細胞死）が活発に起きており、細胞数が少ないものと思われる。

(3) 脳におけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの量： 発達期の脳の主要な細胞環境分子は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであり、中でもニューロカンとホスファカンが主なものである。これらは、脳の形態形成や機能維持に深く関わっている。そこで、

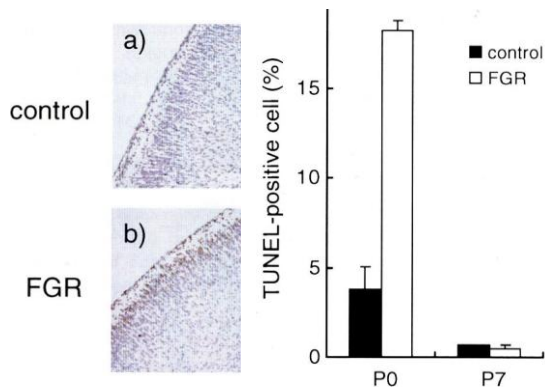


図2 大脳原基におけるアポトシス細胞の分布

発育遅延ラットの行動異常や脳の形態異常に、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが関与している可能性を調べるため、新生仔ラット脳のコンドロイチン硫酸プロテオグリカン量を、免疫ブロット法により調べた。その結果、出生直後の脳において、対照群と比較して発育遅延群では、ニューロカンとホスファカンの両分子とも、有意に少ないことがわかった。

(4) 神経幹細胞の分化誘導培養： 神経幹細胞の調製には、通常、増殖因子として FGF-2 と EGF を同時添加するが、オリゴデンドロサイトの増殖や分化に関わるとされる CNTF や PDGF の効果について、比較検討した。その結果、CNTF は神経幹細胞の増殖促進効果が弱いが、PDGF には強い効果があることがわかった。

そこで、FGF-2/EGF 存在下で調製した神経幹細胞と FGF-2/PDGF 存在下で調製した神経幹細胞では、その後の分化に違いがあるのかを、それぞれを分化誘導培養系に移して調べた。7 日間培養後に、ネスチン陽性細胞（神経幹/前駆細胞）、βIII チューブリン陽性細胞（神経細胞）、GFAP 陽性細胞（アストロサイト）、O4 陽性細胞（オリゴデンドロサイト前駆細胞）および無標識細胞の割合を調べた。その結果、PDGF 共存下では、神経幹細胞の割合が減り、オリゴデンドロサイトへの分化が促進されることが明らかとなった（図3）。そこで、本研究では、FGF-2/PDGF 存在下で神経幹細胞の調製を行うこととした。

(5) 各種神経系細胞の低酸素負荷感受性： 図3に示した神経系細胞混合物の培養液を、無グルコース塩溶液に変えて、1%酸素という低酸素条件下で4時間培養し、どの細胞が死滅しやすいのかを調べた。その結果、GFAP 陽性細胞の数は、低酸素培養の前後で変化しなかったが、O4 陽性細胞は約 1/3 に減少し、

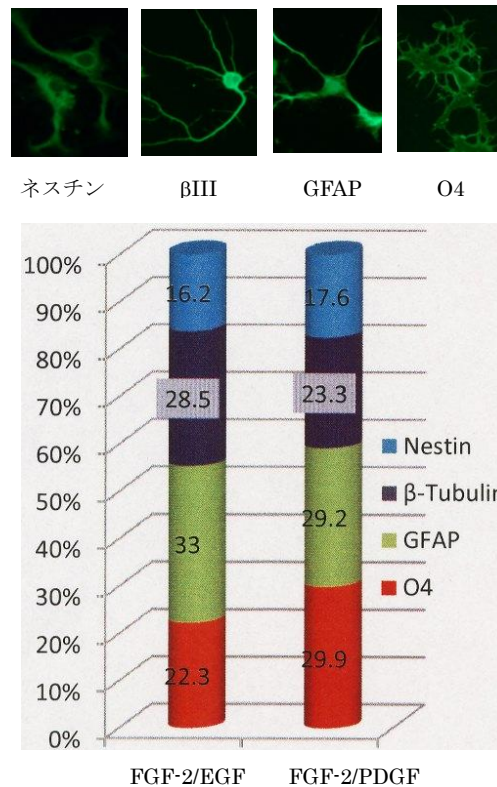


図3 増殖因子が神経幹細胞の分化に及ぼす効果

またβIII チューブリン陽性細胞は 1/10 程度に激減していた。この結果から、アストロサイトはこの程度の低酸素負荷に対しては死滅しないこと、および神経細胞はオリゴデンドロサイトに比べて低酸素負荷で変性・死滅しやすいことがわかった。

(6) 低酸素負荷による細胞死を防ぐ活性を持つ分子の検索： 脳の細胞微細環境分子の中に、低酸素負荷に対する細胞保護効果を示すものがあると考え、種々のグリコサミノグリカンや増殖因子を低酸素培養系に添加してみた。7 日間分化誘導した神経系細胞混合物を、2 時間 1%酸素中で培養後、再び通常の酸素分圧下で 24 時間培養した。微細環境分子の添加は、次の 3 群に分けて行った。

- (i) 低酸素負荷 24 時間前と、負荷時、及び負荷直後の 3 回添加 (24h 前・直前・直後)
- (ii) 低酸素負荷時のみ (直前投与)
- (iii) 低酸素負荷直後のみ (直後投与)

コンドロイチン硫酸群やヘパラン硫酸を添加した試料では、細胞の遊離が顕著であるからか、いずれも生き残った細胞数は、対照とした無添加群より少なかった。

増殖因子群では、ミッドカインや GDNF のみならず、オリゴデンドロサイトの分化や生存に関わるとされている PDGF と CNTF についても、生存維持活性は認められなかつ

た(図4)。しかし、FGF-2には、低酸素負荷と同時に1回添加するだけで、顕著な生存維持効果が認められた。また、EGFにも、弱いながらも生存維持効果があった。ただ、低酸素負荷後に添加した場合には、効果はなかった。

FGF-2を(i)の条件で3回添加した試料では、細胞数が対照(7日間分化誘導培養した試料:負荷前)の約1.5倍となったが、その理由は、FGF-2が神経幹細胞やグリア系の細胞分裂を促進したためと考えられる。

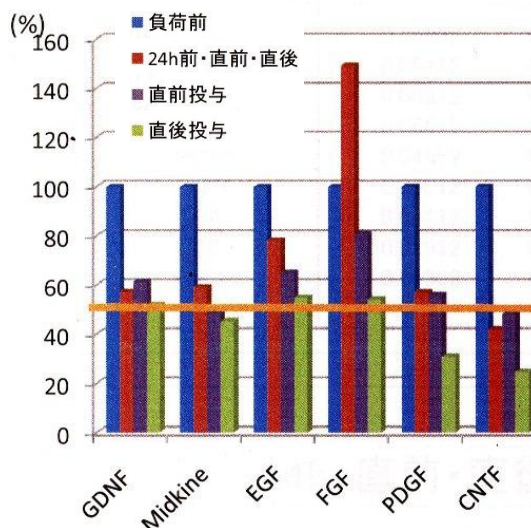


図4 増殖因子による細胞保護効果
(オレンジ色の横棒は、無添加時の残存細胞数)

(7) 考察:

① 子宮内胎児発育遅延モデルラットの有用性: 母体要因も含む未熟児脳障害モデルとして、子宮内循環障害に基づく胎児発育遅延モデルラットを作製した。行動学的解析により、本モデルラット新生仔には、ヒトの未熟児や低出生体重児にしばしば見られる神経学的発達遅延や学習障害が認められた。したがって、未熟児脳障害モデルとして、ある程度有効であると考えられる。しかし、ヒトでは学齢期に多動を示す例があることから、このモデルラットについて open-field 試験をしたが、多動の傾向は認められなかった。

② 神経系細胞間の低酸素感受性比較: 未成熟脳には、神経幹細胞をはじめ神経細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイト及びそれらの前駆細胞が存在する。本研究で用いた神経幹細胞の分化誘導培養系は、これらの細胞をすべて含むと考えられる。この培養系を低酸素状態に置いたとき、オリゴデンドロサイトと比較して神経細胞のほうが変性・死滅しやすいことがわかった。発育遅延モデルラットでは、出生直後の大脳皮質原基に多く

のアポトーシス細胞が検出された(図2)。この時期の大脳皮質原基に存在する細胞は、ほとんどが神経細胞であることを考えると、子宮の循環障害により、胎仔脳の神経細胞が変性したのであろう。

③ 低酸素負荷による細胞死を抑制する因子: コンドロイチン硫酸は、未熟脳の主要な細胞微細環境分子であり、興奮性神経細胞死を抑制する活性を持つ。しかし、本研究の結果から、低酸素負荷による神経細胞死には効果が無いことがわかった。

神経幹細胞の分化誘導培養系を低酸素状態に移したとき、PDGFやCNTFを共存させても、ほとんど細胞死抑制効果が認められなかったが、FGF-2存在下では効果が認められた。これは、本研究の低酸素条件下で変性・死滅する主要な細胞が神経細胞であることによると思われる。

④ 今後の研究課題: ヒトの子宮内胎児発育遅延においても、本研究で用いたモデルラットと同様に、新生児期の大脳皮質原基において神経細胞死が起きているかは不明である。しかし、ヒトにおいて、胎児期の脳障害の多くが、オリゴデンドロサイト前駆細胞の変性に起因すると考えるのは行き過ぎであるように思われる。もし、子宮内発育遅延に伴う行動障害や学習障害が、主に大脳皮質原基の神経細胞死に起因するとすれば、その治療戦略として、オリゴデンドロサイト前駆細胞の保護を考えるよりは、神経細胞の保護を目指す方が効果的であろう。そのために、FGF-2の脳内濃度を上昇させる方策を考えることも一案である。

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15件)

- ① Keiko Nakanishi, Yoshihito Tokita, Sachiko Aono, Michiru Ida, Fumiko Matsui, Yoichiro Higashi, Atsuhiko Oohira. Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, interacts with pleiotrophin, a heparin-binding growth factor. *Neurochemical Research*, 査読有, in press.
- ② Yoshiaki Sato, Atsuhiko Oohira. Chondroitin sulfate, a major niche substance of neural stem cells, and cell transplantation therapy of neurodegeneration combined with

niche modification. Current Stem Cell Research and Therapy, 査読有、Vol. 4, No. 3, 2009, 200-209.

- ③ Akiko Saito, Fumiko Matsui, Kanako Hayashi, Mimi Watanabe, Yuko Ichinohashi, Yoshiaki Sato, Masahiro Hayakawa, Seiji Kojima, Atsuhiko Oohira. Behavioral abnormalities of fetal growth retardation model rats with reduced amounts of brain proteoglycans. Experimental Neurology, 査読有、Vol. 219, No. 1, 2009, 81-92.
- ④ Yoshiaki Sato, Keiko Nakanishi, Yoshihito Tokita, Hiroko Kakizawa, Michiru Ida, Hiroshi Maeda, Fumiko Matsui, Sachiko Aono, Akiko Saito, Yoshiyuki Kuroda, Masahiro Hayakawa, Seiji Kojima, Atsuhiko Oohira. A highly sulfated chondroitin sulfate preparation, CS-E, prevents excitatory amino acid-induced neuronal cell death. Journal of Neurochemistry, 査読有、Vol. 104, No. 6, 2008, 1565-1576.
- ⑤ Yoshiaki Sato, Keiko Nakanishi, Masahiro Hayakawa, Hiroko Kakizawa, Akiko Saito, Yoshiyuki Kuroda, Michiru Ida, Yoshihito Tokita, Sachiko Aono, Fumiko Matsui, Seiji Kojima, Atsuhiko Oohira. Reduction of brain injury in neonatal hypoxic-ischemic rats by intracerebroventricular injection of neural stem/progenitor cells together with chondroitinase ABC. Reproductive Sciences, 査読有、Vol. 15, No. 6, 2008, 613-620.
- ⑥ Takuya Shuo, Sachiko Aono, Keiko Nakanishi, Yoshihito Tokita, Yoshiyuki Kuroda, Michiru Ida, Fumiko Matsui, Hiroko Maruyama, Toshiyuki Kaji, Atsuhiko Oohira. Ectodomain shedding of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, by TIMP-2- and TIMP-3-sensitive proteolysis. Journal of Neurochemistry, 査読有、Vol. 102, No. 5, 2007, 1561-1568.

[学会発表] (計10件)

- ① Keiko Nakanishi et al., Search for the binding protein of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan. 36th International Congress of Physiological Sciences,

2009.7.28, Kyoto

- ② 大平敦彦、中枢神経組織の損傷修復と細胞環境分子コンドロイチン硫酸 (特別講演)、新生児慢性肺疾患研究会学術集会、2008.11.15, 名古屋
- ③ 伊田みちる、他、神経幹細胞を用いた新生児低酸素性虚血性脳症治療の可能性 (シンポジウム「脳性麻痺は防止できるか」)、日本周産期・新生児医学学術集会、2008.7.14, 横浜

[図書] (計3件)

- ① 大平敦彦、(株)クバプロ、脳の損傷修復の鍵となる糖鎖、古川鋼一編「第3の生命鎖：糖鎖の謎が今、解る」2009, pp. 22-29.
- ② Atsuhiko Oohira. Springer. Chondroitin sulfate proteoglycans: a key substance for central nervous system injury repair. In "Experimental Glycoscience" ed. by N. Taniguchi et al. 2008, pp. 195-198.
- ③ Atsuhiko Oohira. Elsevier. Multiple species and functions of proteoglycans in the central nervous system. In "Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to System Biology" Vol. 4 "Cell Glycobiology and Development" ed. by J. P. Kamerling. 2007, pp. 297-322.

[その他]

- ① 新生児脳障害に新治療法：細胞死防止の効果. 中日新聞、2008.5.10.
- ② 脳損傷修復：高硫酸化CS-Eが興奮性神経細胞死を抑制 (疾患に対する糖鎖の生物学的役割に関する最新知見) Medical Tribune, 2008.4.10.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 敦彦 (OOHIRA ATSUIHIKO)
愛知医科大学・客員教授
研究者番号：20101074

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中西 圭子 (NAKANISHI KEIKO)
愛知県心身障害者コロニー・
発達障害研究所・主任研究員
研究者番号：50280813