

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591290  
 研究課題名 (和文) 神経幹細胞・コンドロイチナーゼ併用投与による周生期脳損傷修復機構の解明  
 研究課題名 (英文) Analyses of reduced brain injury by treatment with neural stem /progenitor cells together with chondroitinase.  
 研究代表者  
 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・周生期学部・主任研究員  
 研究者番号：50280813

## 研究成果の概要 (和文)：

低酸素虚血モデルラットでは神経幹細胞(NSPC)移植/コンドロイチナーゼ(CHase)併用投与により脳梗塞が軽減する。この分子機構を簡便に探索するため、GFPラットニューロンを培養して低酸素無グルコース処理を行うin vitroモデル系を確立した。そして、野生型ラットNSPCおよびChABC投与による神経保護効果について検討し、in vivoと同様に神経細胞死が抑制される傾向が観察できた。現在この系を用いて新規神経保護因子を探索中である。

## 研究成果の概要 (英文)：

Administration of neural stem / progenitor cells (NSPCs) with chondroitinase (CHase) reduced brain injury in a neonatal hypoxic-ischemic rat model. To investigate its mechanism, we established in vitro hypoxic-ischemic model. GFP-transgenic rat neurons were cultured and exposed to oxygen-glucose depletion (OGD). Treatment with NSPCs combined with CHase was tended to reduce OGD-induced neuronal cell death. We are currently trying to find the factors regulating neuroprotection using this model.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2008年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 2009年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：神経科学、新生児学、

科研費の分科・細目：胎児・新生児学

キーワード：新生児低酸素性虚血性脳症、神経幹細胞、oxygen-glucose depletion,

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

損傷をうけた中枢神経系ニューロンは死滅し再生しないとこれまで考えられてきたが、近年、特殊な条件下では再生できることがわかってきた。また、自己複製能・多分化能をもつ神経幹細胞の分化・増殖機構も明らかになりつつあり、幹細胞を用いた中枢神経疾患の治療法への応用が期待されている。

一方、新生児医療技術の進歩により、低出生体重児や病的新生児の生存率は著明に改善しているものの、出生時における低酸素性虚血性脳症 (hypoxic ischemic encephalopathy; HIE) など周産期脳障害による神経学的後遺症の克服は、新生児医療にとって残された課題である。脳性マヒの主な原因のひとつである HIE に対して、脳低温療法はあるものの、重症例には効果がなく、HIE などの周産期脳障害に対する新規治療法の開発は急務となっている。

私たちはこれまでに、ラット HIE モデルを用いて、神経幹細胞を用いた新規治療法の開発を検討してきた。そして、神経幹細胞と同時にコンドロイチナーゼという糖分解酵素を投与すると HIE による脳梗塞巣が軽減することを発見した(特許出願; 特願 2006-139843 号、Sato Y, et al., *Reprod. Sci.*, 2008)。しかしながら、その梗塞を軽減する機序は未だ不明である。

2. 研究の目的

神経幹細胞/コンドロイチナーゼ併用療法を臨床的に応用するためには、その機構の解明は不可欠である。

本研究では、神経幹細胞/コンドロイチナーゼ併用療法による神経障害軽減の分子機構を明らかにし、神経幹細胞由来神経保護因子を同定し、周産期脳損傷の新たな治療法として応用することを目的としている。

3. 研究の方法

神経幹細胞由来神経保護因子の検索を簡便に行うために、まず hypoxia-ischemia in vitro モデル系を確立した。

1) hypoxia-ischemia in vitro モデル系の確立。

胎生 16 日齢の GFP-transgenic ラット大脳皮質神経細胞を、前もって単層培養しておいた SD ラット由来アストロサイト上に 2 週間培養し、低酸素無グルコース (Oxygen

glucose depletion; OGD) 処理を行った。具体的には、無グルコース培地に置換した後、1%酸素下で 3~15 時間培養した。OGD 処理 1 時間後あるいは 2 4 時間後に、あらかじめ neurosphere 培養し増殖させておいた SD ラット由来神経幹細胞 (NSPC) をコンドロイチナーゼ (ChABC) とともに投与し、3 日後あるいは 1 週間後に固定して比較した。神経細胞死の評価は GFP 陽性細胞数の測定、あるいは MAP2 免疫染色を行い MAP2 陽性細胞数を測定することにより行った。

2) 興奮性神経細胞死評価系による神経保護因子の探索。

ラット胎仔神経細胞を 2 週間培養した後、既知の神経栄養因子などを前投与し、2 4 時間後に NMDA などの興奮性アミノ酸を投与し神経細胞死を誘発した。神経細胞死の評価は、障害を受けた細胞から遊離してきた LDH 量を測定することにより、比較した。

4. 研究成果

1) hypoxia-ischemia in vitro モデル系の確立。

ニューロン・アストロサイト共培養系で 2 週間培養した後、OGD 暴露を 3、6、9、15 時間行った。OGD 3 時間の暴露では障害は軽度であったが、6 時間以上の暴露では明らかな神経細胞死が観察された (図 1)。

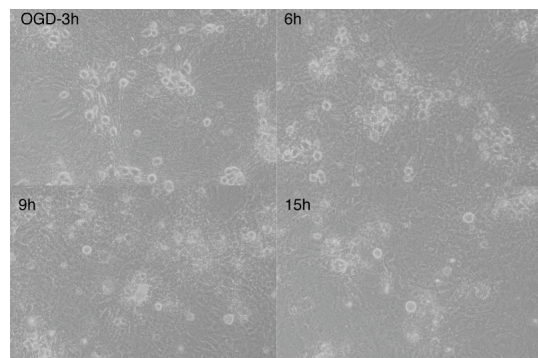


図 1 OGD 3, 6, 9, 15 時間後の位相差顕微鏡写真。

また、NSPC による神経細胞死抑制効果を in vitro でも確認するために、投与した NSPC から分化した細胞を判別できるように、GFP ラット由来ニューロン・SD ラット由来アストロサイト共培養系を用いて OGD 処理を 4 時間行った後、SD ラット由来 NSPC あるいは ChABC を投与した。NSPC+ChABC 群において、対照群と比較して神経細胞死が軽減されている傾

向が観察された（図2）。

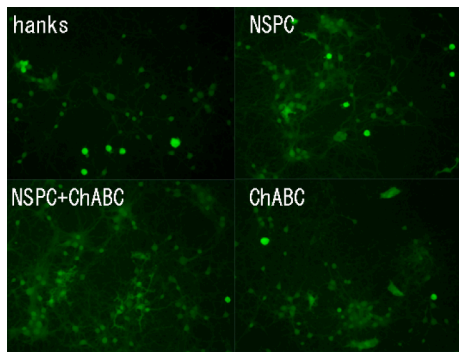


図2: OGDによる神経細胞死の比較。

このとき、短い突起を持った MAP2 陰性の細胞が著明に観察され、この細胞が神経細胞死抑制効果に何らかの関与をしている可能性が示唆された（図3）。

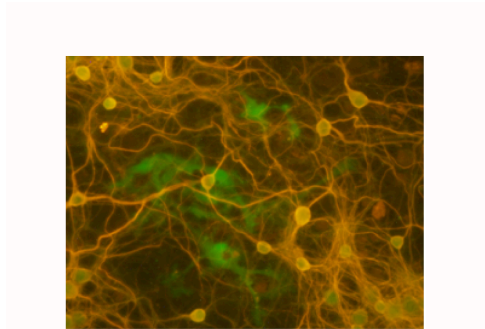


図3: OGD後NSPC+ChABC群での細胞の二重染色像。  
短い突起を持ったMAP2(赤色)陰性のGFP(緑色)陽性細胞が観察された。

現在、本評価系を用いて神経幹細胞由来神経保護因子の探索や神経保護機構について検討している。

2) 興奮性神経細胞死評価系による神経保護因子の探索。

これまでに高硫酸化コンドロイチン硫酸 CS-E に神経保護効果があることがわかっている。そこで、胎生期のほ乳類中枢神経系で発現し、コンドロイチン硫酸と結合することが知られている midkine, pleiotrophin などの神経栄養因子について NMDA による興奮性神経細胞死に対する保護効果を調べた。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) には若干神経保護効果が認められたものの、この評価系において、調べた範囲では、有意に保護効果を

示すものは見つかっていない（図4）。

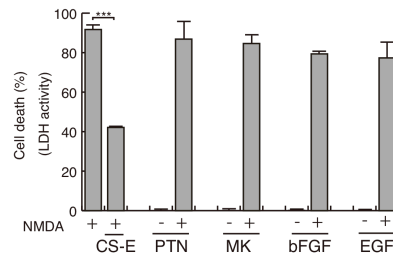


図4: 既知の神経栄養因子の神経保護効果。  
調べた範囲では CS-E と同等の神経保護効果を示すものはなかった。

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 6 件)

- ① Nakanishi K, Tokita Y, Aono S, Ida M, Matsui F, Higashi Y, and Oohira A. Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, interacts with pleiotrophin, a heparin-binding growth factor. *Neurochem. Res.*, in press. (査読有)
- ② Sato Y, Nakanishi K, Hayakawa M, Kakizawa H, Saito A, Kuroda Y, Ida M, Tokita Y, Aono S, Matsui F, Kojima S, and Oohira A. Reduction of brain injury in neonatal hypoxic-ischemic rats by intracerebroventricular injection of neural stem/progenitor cells together with chondroitinase ABC. *Reproductive Science*, 15: 813-820, 2008. (査読有)
- ③ Sato Y, Nakanishi K, Tokita Y, Kakizawa H, Ida M, Maeda H, Matsui F, Aono S, Saito A, Kuroda Y, Hayakawa M, Kojima S and Oohira A. A highly sulfated chondroitin sulfate preparation, CS-E, prevents excitatory amino acid-induced neuronal cell death. *J Neurochem.* 104: 1565-1576, 2008. (査読有)

- ④ Shuo T, Aono S, Nakanishi K, Tokita Y, Kuroda Y, Ida M, Matsui F, Maruyama H, Kaji T, and Oohira A. Ectodomain shedding of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, by TIMP-2- and TIMP-3-sensitive proteolysis. *J Neurochem.*102: 1561-1568, 2007. (査読有)
- ⑤ Kakizawa H, Matsui F, Tokita Y, Hirano K, Ida M, Nakanishi K, Watanabe M, Sato Y, Okumura A, Kojima S, and Oohira A. Neuroprotective effect of nipradilol, an NO donor, on hypoxic-ischemic brain injury of neonatal rats. *Early Human Development* 83: 535-540, 2007. (査読有)
- ⑥ Nakanishi K, Yamada J, Takayama C, Oohira A, and Fukuda A. NKCC1 activity modulates formation of functional inhibitory synapses in cultured neocortical neurons. *Synapse* 61: 138-149, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

- ① Nakanishi K, Tokita Y, Aono S, Matsui F, Oohira A. Search for the binding protein of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan. The 36<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sciences (Kyoto). 2009.7.29.
- ② 佐藤義朗、中西圭子、早川昌弘：未熟児無呼吸治療／予防薬の神経幹細胞への影響。日本周産期・新生児医学会学術集会（名古屋）、2009.7.13.
- ③ 時田義人、青野幸子、中西圭子、松井ふみ子、大平敦彦：Neuroglycan C による神経突起の形態制御。日本生化学会・日本分子生物学会合同大会（神戸）2008.12.9.
- ④ Tokita Y, Aono S, Matsui F, Nakanishi K, Oohira A: Role of Neuroglycan C, a

Brain-specific Proteoglycan, in Neuronal Development. The 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (Jeju, Korea) 2008.11.4.

- ⑤ 山田恭聖、中西圭子、逸見勇人、岸本泰明、会津研二、齋藤明子、寺澤かずみ、水野敦子：NICU 退院児に対する広汎性発達障害早期発見プログラムの開発—第3報—日本未熟児新生児学会学術集会（札幌）2008.11.1.
- ⑥ 中西圭子、丹伊田浩行、武内恒成、島田昌一、松崎文雄、大平敦彦、中西真：SAD-A knock out mice は生後早期に死亡する。日本神経科学大会（東京）2008.7.11.
- ⑦ 中西圭子、佐藤義朗、齋藤明子、青野幸子、山田恭聖、逸見勇人、岸本泰明、会津研二、寺澤かずみ：高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経細胞死抑制効果に関する検討。日本未熟児新生児学会学術集会（高松）2007.11.26.
- ⑧ 水野敦子、山田恭聖、逸見勇人、岸本泰明、会津研二、佐藤義朗、齋藤明子、寺澤かずみ、中西圭子：中等度脳性麻痺児に対する運動機能改善を目的としたボツリヌス毒素（Botox）治療の経験—理学療法士の立場から。日本未熟児新生児学会学術集会（高松）2007.11.26.
- ⑨ 山田恭聖、中西圭子、逸見勇人、岸本泰明、会津研二、齋藤明子、寺澤かずみ、水野敦子：NICU 退院児に対する広汎性発達障害早期発見プログラムの開発—チェックリストによる社会性発達評価。日本未熟児新生児学会学術集会（高松）2007.11.26.
- ⑩ 会津研二、岸本泰明、逸見勇人、山田恭聖、齋藤明子、寺澤かずみ、中西圭子、水野敦子、二村真秀：極低出生体重児における尿中アニオンギャップの検討。日本未熟児新生児学会学術集会（高松）2007.11.25.

⑪ 逸見勇人, 会津研二, 岸本泰明, 齋藤明子, 水野敦子, 中西圭子, 寺澤かずみ, 山田恭聖: 光線療法中における保育器内温度、湿度、体温管理の検討—LEDによる光線治療器を用いての比較—日本未熟児新生児学会学術集会(高松) 2007.11.24.

⑫ 青野幸子, 鈴木敦史, 時田義人, 中西圭子, 伊田みちる, 松井ふみ子, 大平敦彦: The fifth splice variant of neuroglycan C, a CNS-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan. 日本神経科学・神経化学・神経回路学合同大会(横浜) 2007.9.12.

[図書] (計 3 件)

① Nakanishi K, Sato Y, Oohira A. Biological activities of highly sulfated chondroitin sulfate polysaccharides on neural cells. Research Advances in Neurochemistry 1, pp1-10, Global Research Network, Kerala, India, 2010.

② Nakanishi K, Oohira A. Stem cell transplantation combined with niche modification: A novel strategy for treatment of neurodegeneration. Electronic Journal of Biology 4: 88-92, 2008.

③ 中西圭子, 大平敦彦: 中枢神経系に特異的に発現するコンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ニューログリカン C の機能、生化学 79 : 370-374, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 脳損傷改善剤  
発明者: 大平敦彦、佐藤義朗、中西圭子、前田浩、  
権利者: 愛知県、生化学工業  
種類: PCT 出願  
番号: PCT/JP2007/060388  
出願年月日: 2007. 5. 21.  
国内外の別: 国際

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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・周生期学部・主任研究員  
研究者番号: 50280813

(2) 研究分担者; なし

(3) 連携研究者; なし

研究協力者;

大平敦彦 (愛知医科大学・先端医学医療研究  
拠点・客員教授)

佐藤義朗 (名古屋大学・周産母子センター・  
病院助教)

山田恭聖 (愛知県心身障害者コロニー中央病  
院・新生児科・医長)

伊藤美春 (愛知県心身障害者コロニー中央病  
院・新生児科・医師)

青野幸子 (愛知県心身障害者コロニー発達障  
害研究所・周生期学部・主任研究員)

時田義人 (愛知県心身障害者コロニー発達障  
害研究所・周生期学部・主任研究員)

松井ふみ子 (愛知県心身障害者コロニー発達  
障害研究所・研究員)