

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790993
 研究課題名 (和文) 脳梗塞後の嗅球における内因性神経幹細胞による構造修復に関する研究
 研究課題名 (英文) Research on structural repair by neural stem cell after ischemic lesion in the olfactory bulb
 研究代表者
 川岸 久太郎 (KAWAGISHI KYUTARO)
 信州大学・医学部・助教
 研究者番号：40313845

研究成果の概要：中枢神経系においては、幼少期のみでなく、成人(獣)においても神経幹細胞が存在する。本研究ではこの神経幹細胞から常に新生細胞が供給される嗅覚系において、器質的障害時に神経幹細胞がどのような動態を示すのかを明らかにした。結果、Adult ラットでは一度嗅球全体に障害が及ぶと神経幹細胞があっても機能が回復しないことが明らかとなった。一方、幼少期ラットの場合は嗅球全体が除去されても供給された神経幹細胞が断端付近で嗅球の糸球体様構造を新たに構築し、嗅覚機能が再生することが明らかとなった

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	270,000	2,070,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：再生医学、神経科学、脳・神経、神経幹細胞、神経再生、嗅球

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は日本および欧米で死因の第3位を占めている。また、脳血管障害により死亡に至らない場合も、恒久的な神経障害を残し、発症者の生活の質 (QOL) を低下させると共に、急性期の集中治療や慢性期における長期的治療による医療費の増大等、多くの問題を抱えている。

このため、発症の予防研究や、発症後の神経障害の改善に関する多くの研究が行われていた。

一方、中枢神経系において、発生段階や幼少期のみでなく、成人(獣)においても神経幹

細胞が存在しており、持続的に神経再生が起きていることが近年発見された。この神経幹細胞は成人(獣)では海馬および側脳室周囲 (SVZ) に多く存在することが明らかになっていた。

海馬は記憶に関係した脳の領域で、運動や周囲環境で神経幹細胞が増殖することまで知られていた。また、側脳室周囲からは嗅球に向って Rostral Migratory Stream: RMS と呼ばれる神経幹細胞の移動が起きていることも明らかになっていた。

このような背景の下、脳血管障害に関する神経障害の改善のための研究は神経保護作

用薬の開発などが盛んに行われていたが、この神経幹細胞を使った脳血管障害に対する治療への応用研究も盛んに進められており、そのため、神経幹細胞の移植や分化誘導の研究も進められていた。

この結果、脳梗塞モデルにおいては、側脳室周囲から神経幹細胞が梗塞巣周辺に移動していることが明らかとなり、(Arvidsson A. et al. Neuronal Replacement From Endogenous Precursors in the Adult Brain After Stroke. Nature Medicine, 2002)、脳梗塞の治療法の開発につながるのではないかと期待されていた。

しかし、どの様な機序で神経幹細胞、前駆細胞が脳血管障害を察知し、増殖し、移動しているのかは明らかではなかった。

この理由には動物を用いた脳梗塞モデルにおいて一定の梗塞を再現することが難しい点や、通常神経細胞の移動がない部位での細胞移動など多様な因子が存在するため、その解析が難しいためであった。

一方、常に神経幹細胞が移動している嗅球では、細胞移動に関する諸問題は無視することができるが、嗅球に一定の脳血管障害(脳梗塞や出血)を作成することが困難であったため、詳細な研究は、大脳における脳血管障害に比較すると少なかった。

この様な状況下で、我々は嗅球に対し一定の脳血管障害(梗塞)を与えることのできるモデルを開発することに成功した。

2. 研究の目的

研究の大きな目的は、明らかになっていない大脳の脳血管障害に対する神経幹細胞の働きを明らかとするための基礎研究として、嗅球における脳血管障害時に常に移動してきている神経幹細胞がどの様な働きをするのか、また神経幹細胞の働きを規定している因子は何であるのかを明らかにする研究を行おうとしたものである。

具体的にはレーザー光を使用し嗅球に対する微小梗塞モデルを作成し、梗塞時から嗅球の経時的な変化を明らかにする。このため、梗塞作成時から急性期、神経幹細胞到達時、長期生存期の種々の生存期間のグループにおいて、嗅球に対し免疫組織化学法を用い、神経幹細胞の動態、梗塞部位(炎症細胞等)と神経幹細胞の相互影響を形態学的に検討する。

また一定の脳梗塞に対して経時的な検討をくわえると共に種々の大きさの嗅球梗塞における神経幹細胞の反応の相違に関して検討を加える。さらに、われわれは以前より嗅覚機能の測定を行っており、種々の大きさの嗅球梗塞による障害が嗅覚機能に与える影響について検討する

3. 研究の方法

研究方法の特徴について、以下に概説する。

(1)梗塞モデルとして Adult ラット(12 週齢)を用い、嗅球に対して微小梗塞を作成する。

微小梗塞は、ベンガルローズ色素とレーザー光を用いた色素光凝固法(Photo-thrombosis)により作成する。

(2)上記動物に梗塞作成後、BrdU を腹腔内に注入し、急性期に相当する 3 日後、新生神経細胞の嗅球への到達期に相当する 2 週間後、長期生存に相当する 2 ヶ月後、4 ヶ月後と生存期間を変え、4 %パラフォルムアルデヒドを用いて固定し、脳および嗅球を摘出する。

BrdU (bromodeoxyuridin : ブロモデオキシウリジン) はチミジン に代わり細胞周期の S 期の間 DNA に取り込まれるため、増殖中の細胞の標識として利用される。中枢神経系では、神経幹細胞のマーカーの一つとなっている。

(3)摘出した脳および嗅球とパラフィンを用いて包埋し、10 μm の厚さで連続切片を作成する。

(4)免疫組織化学法を用いて神経幹細胞、前駆細胞を明らかにすると共に、炎症性細胞等についても検討を行う。

前述に基本的な実験を以下の応用実験と組み合わせる解析を行う。

(5)梗塞モデルとして Adult ラットを用い、嗅球に対して微小梗塞を作成する。この際にレーザーの照射時間と照射径を変化させることによって種々の大きさの嗅球梗塞を作成し、器質的障害の大きさと機能的障害、回復などの相違を明らかとする。

(6)異なる大きさの嗅球梗塞を持ったラットを用いて、嗅覚検査を実施し嗅球梗塞と嗅覚機能の相違について調べる。

嗅覚機能検査はシクロヘキシミド溶液を用い、水道水とシクロヘキシミド溶液の嗅ぎ分け検査を行う。シクロヘキシミドは蛋白合成阻害剤で、正常ラットでは同溶液を避けるため液体の臭いを嗅ぎ分けて水分を摂取する。嗅覚機能の障害があると嗅ぎ分ける際の実答率が下がる。

(7)幼少期ラットに対して器質的障害を作成し、Adult ラットとの組織障害、機能的障害、回復などの相違を明らかとする。

(8)新生児期ラットの嗅覚機能検査として、Nipple Search 検定法を用いる。

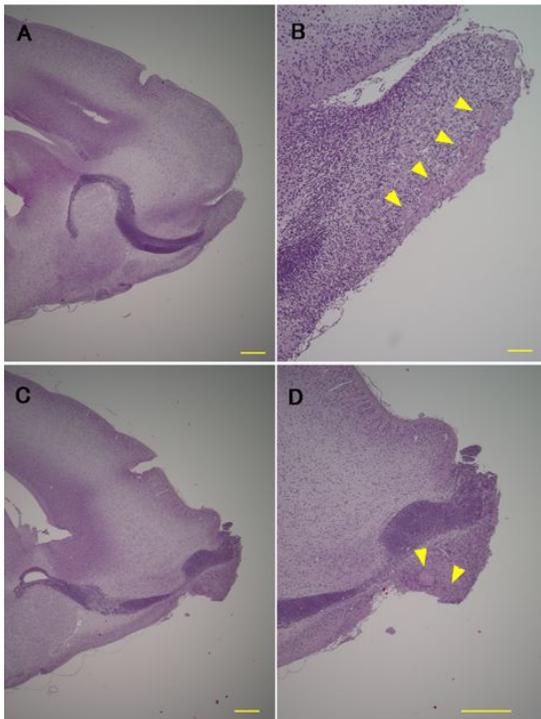
これは新生児期において嗅覚機能を有している場合は母体の乳頭を探し出し哺乳することが出来るが、嗅覚機能が存在しない場合には哺乳できないことを判定する方法である。

4. 研究成果

本研究は神経幹細胞から常に神経が供給される嗅覚系の特徴を利用し、梗塞等の器質的障害時に神経幹細胞がどのような動態を示すのかを明らかにしようとしたものである。実験の結果以下のような知見を得た。

(1)Adult ラットでは一度嗅球全体に障害が及び神経回路が障害を受けると RMS を通じて供給された神経幹細胞があっても機能が回復しないことが明らかとなった。一方、嗅球の微小梗塞モデルで RMS にまで障害が及ばない嗅球一部障害の際には嗅球の他の部位に大きな変化が認められなかった

(2)幼少期ラットでは嗅球に対して一定の梗塞を構成することが難しく、嗅球除去後の神経幹細胞の動態を観察したが、幼少期の場合には嗅球全体が除去されても RMS から供給された神経幹細胞が断端付近で嗅球の糸球体様構造(Newly formed Glomerular like structure)を新たに構築し、嗅覚機能が再生することが明らかとなった。また嗅球除去の際、RMS にまで障害が及ばない不完全除去の場合には、正常と同様の嗅球内構造を示すものがあつた。



OB除去後1wにおけるNewly formed glomerular like structure
(A,C,D Bar=500 μ m, B Bar=100 μ m)

これらのことより、嗅球の微小な部分的障害では嗅球内の構造に大きな変化は認められないが、嗅球全体に障害が及ぶ場合には新生児期のラットでは嗅覚機能が再生する可能性があることが明らかとなった。

ラットの週齢により神経回路の再構築に違いが認められたことにより、どの時期までこの相違が認められるのか、すなわちどの時期まで神経回路の再構築が行われるかが新たな問題点として浮かび上がってきた。

また現在までの研究で、障害を受けた脳が新生神経細胞の供給を受けた後、適切な神経回路が再構築され、機能が回復するとの報告は脳の他の部位では知られていない。

今後この神経回路の再構築の機序が明らかになれば、脳障害の治療に新たな可能性を示すものとなると考えられる。

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4件)

① Kawagishi K, Fukushima N, Yokouchi K, Sumitomo N, Kakegawa A, Moriizumi T. Tyrosine hydroxylase - immunoreactive fibers in the human vagus nerve. *J Clin Neurosci*. 2008 Sep;15(9):1023-6. (査読有り)

② Fukushima N, Yokouchi K, Kawagishi K, Kakegawa A, Ezawa N, Moriizumi T. Neural plasticity of neonatal hypoglossal nerve for effective suckling. *J Neurosci Res*. 2007 Aug;85(11):2518 -26. (査読有り)

③ Guan YJ, Wang X, Wang HY, Kawagishi K, Ryu H, Huo CF, Shimony EM, Kristal BS, Kuhn HG, Friedlander RM. Increased stem cell proliferation in the spinal cord of adult amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *J Neurochem*. 2007 Aug;102(4):1125-38. (査読有り)

④ Yokouchi K, Fukushima N, Kakegawa A, Kawagishi K, Fukuyama T, Moriizumi T. Functional role of lingual nerve in breastfeeding. *Int J Dev Neurosci*. 2007 Apr;25(2):115-9. (査読有り)

[学会発表] (計5件)

① 川岸 久太郎, 横内 久美子, 坂本 道雄, 福島 菜奈恵, 森泉 哲次
新生児ラットにおける哺乳のための嗅覚機能発現に必要な嗅神経細胞数
第114回日本解剖学会 2009. 3. 28 岡山

②横内 久美子、坂本 道雄、川岸 久太郎、
福島 菜奈恵、森泉 哲次
Nipple searchに関連した嗅覚伝導路の同定
第114回日本解剖学会 2009.3.28 岡山

③川岸 久太郎、横内 久美子、坂本 道雄、
福島 菜奈恵、森泉 哲次
哺乳と嗅細胞の相関-新生児ラットにおける
研究-
第42回日本味と匂い学会 2008.9.18 富山

④坂本 道雄、横内 久美子、川岸 久太郎、
福島 菜奈恵、森泉 哲次
新生児ラットにおける外側嗅索切断後の嗅
球投射ニューロンの細胞死の検討
第42回日本味と匂い学会 2008.9.18 富山

⑤横内 久美子、坂本 道雄、川岸 久太郎、
福島 菜奈恵、森泉 哲次
哺乳と嗅球投射ニューロンの相関-新生児ラ
ットにおける研究-
第42回日本味と匂い学会 2008.9.18 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川岸 久太郎 (KAWAGISHI KYUTARO)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：40313845

(4) 研究協力者

森泉 哲次 (MORIIZUMI TETSUJI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：70157874

カーン ゲオルグ (KUH N GEORG)
ヨテボリ大学・精神神経科学研究所・教授
研究者番号：なし