

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591688

研究課題名（和文） 脳虚血に対する骨髄由来マクロファージの及ぼす効果

研究課題名（英文） The effects of bone marrow derived macrophages on ischemic brain damage

研究代表者

秦 龍二 (HATA RYUJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90258153

研究成果の概要（和文）：

近年脳虚血の病態機構に Toll like receptor (TLR) を中心とする自然免疫機構の関与が示唆されている。そこで本研究では自然機構が脳虚血に及ぼす影響を、TLR4 ノックアウトマウスと骨髄キメラマウスを用いて詳細に検討した。その結果 TLR4 をノックアウトした際の脳虚血障害は著明に改善し、更にその改善効果の 63.4%は骨髄由来マクロファージの TLR4 を除外することで、達成できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Cerebral ischemia triggers acute inflammation, which exacerbates primary brain damage. Activation of the innate immune system is an important component of this inflammatory response. Inflammation occurs through the action of proinflammatory cytokines. Production of these cytokines is initiated by signaling through Toll-like receptors (TLRs). Among them, TLR4 recognizes primarily lipopolysaccharide (LPS) and an increasing evidence points that TLR4 plays a crucial role in the concert mechanism of the cerebra ischemia. In this study, we investigated the effect of targeted disruption of TLR4 on the severity of ischemic brain injury. TLR4 ablation significantly decreased infarct size at 1 day after reperfusion. The amelioration of tissue damage in the absence of TLR4 underscores the importance of innate immunity for the manifestation of ischemic brain injury. Furthermore, TLR4 ablation in the bone marrow derived macrophage significantly decreased infarct size. These results indicate that bone barrow derived macrophages are an important modulator of ischemic brain injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

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：脳虚血、自然免疫、TLR4 (Toll like receptor 4)、マイクログリア

1. 研究開始当初の背景

病原体が生体に侵入すると、免疫系はすみやかにそれを認識し排除する。こうした侵入病原体に対する免疫応答は TLR(Toll like receptor)を中心とする自然免疫受容体が、自己には存在しない病原体特有の分子パターン(pathogen associated molecular pattern: PAMP)を認識することで開始される。TLR がこういった PAMP を認識すると、炎症性サイトカインやケモカインなどが誘導され局所炎症が引き起こされる。加えて抗原提示細胞における副刺激分子の発現上昇も引き起こし、T 細胞、B 細胞を活性化し、獲得免疫系の活性化を誘導する。即ち TLR による病原体認識は、自然免疫・獲得免疫双方の活性化につながり、免疫系発動全体を支配していると考えられる。TLR ファミリーの中で、TLR4 はマクロファージ(中枢神経系ではマイクログリア)等の貪食能を持つ細胞の細胞膜表面に発現し、グラム陰性細菌の細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)を認識し、NF- κ B や MAP kinase の活性化を介して炎症性サイトカインや I 型インターフェロン遺伝子を誘導することが知られている(Exp Mol Med 39:421-38, 2007)。これらの現象は微生物感染の初期防御を担う自然免疫応答に必須のシグナル系ではあるが、LPS がエンドトキシン(内毒素)の本体であることからわかるように、異常に亢進した自然免疫シグナルは慢性の炎症性疾患(例えば RA や潰瘍性大腸炎等)を引き起こす事も知られている(Trends Immunol. 28:74-9, 2007)。

2. 研究の目的

近年脳虚血の病態機構に各種炎症性サイトカインを含む免疫系の及ぼす影響の重要性が認識されるようになってきている(Curr Opin Neurol. 20:334-42,2007)。即ち、脳虚血も炎症の 1 つであり、脳虚血により引き起こされる炎症反応が、その病態機構に重要な影響を及ぼすと考えられるようになってきた。中枢神経系の炎症反応を制御する中心的な細胞はマイクログリアと考えられ、一般の免疫系とは異なる中枢神経系に特異な免疫応答を形成している。マイクログリアは種々の病態下で活性化され、サイトカインをはじめとする様々な液性因子を産生し、自らの細胞障害能・貪食能(スカベンジ作用)と相まって中枢神経系の免疫機構を調節している。近年の研究では、少なくとも活性型のマイクログリア(活性型のマイクログリアの大半はマクロファージそのものであるという説もあるが)は骨髄からの単球・マクロファージ系由来であることが明らかとなってきた(Brain Res Rev 53: 344-354, 2007)。

そこで本研究では骨髄由来単球・マクロファージ系による炎症機構が脳虚血に及ぼす影響を、TLR4 ノックアウトマウスと骨髄キメラマウスを用いて詳細に調べることを目的とした。

3. 研究の方法

[In vivo 実験]

1) 動物

本実験には 16 週齢の TLR4 knockout mice(homo type) とその littermate を用いた。実験動物を一定の明暗サイクル及び温度(22 \pm 1 $^{\circ}$ C)条件下に飼育し、餌と水は自由摂取とした。以下の実験は愛媛大学医学部倫理委員会の承諾を得た後、愛媛大学医学部動物実験指針に則り行われた。

2) 右中大脳動脈の一過性閉塞

ナイロン栓子法により右中大脳動脈起始部を 60 分間閉塞させた後再灌流させた。虚血中及び再灌流後 1 時間は直腸温を 37.0 \pm 0.2 $^{\circ}$ C に保った。その後麻酔から覚醒していることを確認後、室温の飼育ケージに戻した。

3) 骨髄キメラマウスの作成

雄性マウスの大腿骨及び腓骨より骨髄細胞を採取し、NH₄Cl による処理後、500 万/ml となるように PBS で分散し、0.1ml を致死量(9Gy)の X 線を照射された雌性マウスの尾静脈より注入した。骨髄移植が成功しているかどうかを確認する為に 1 ヶ月後に生き残ったマウスの尾部を採取し、DNA を抽出後、PCR にて雄特有の遺伝子パターン(Smcy と Smcx)を確認した。

4) TTC 染色

再灌流 2 4 時間後に断頭し、1 mm 幅の脳スライスを作製した後、2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) にて 30 分間染色した。その後、4% paraformaldehyde 液にて一晩固定した。脳梗塞量は TTC 染色後の脳スライスを画像に取り込み、梗塞量を定量した。

[In vitro 実験]

1) ニューロンの初代培養法

妊娠 17 日齢ラット胎児大脳皮質より神経細胞を分離し、poly-L-lysine で coat した 24 well plate にて、10% 牛胎児血清を含む DMEM 中で培養した。各 well には同数(100 万/ml, 0.5ml)の細胞を撒いた。翌日培養液をインスリン、トランスフェリン、セレナイト等を含む無血清培地に置き換え、培養を維持した。

3) マイクログリアの初代培養法

新生児ラット大脳を摘出後、脳軟膜の剥離、細胞の分散を行い、poly-L-lysine で coat した flask に播種し、CO₂ incubator (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) にて培養した。培地としては 10% 牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を使用した。培養 13-15 日目に flask をシェーカーにて振とう(110 rpm, 37 $^{\circ}$ C, 1 時間)し、上清を 10 cm dish に撒き直した。15 分後、dish 面に接着しているマイクログリアをスクレーパーで掻き取り使用した。

4) 骨髄由来マクロファージの初代培養

マウス的大腿骨及び腓骨より骨髄を採取し、分散後、NH₄Cl 処理を行い、200 万個/ml を 6 cm dish に撒き

直した。培地としては10%牛胎児血清を含むRoswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640)を使用し、同時にMCSF (10ng/ml)を添加した。培養3日目に浮遊細胞を10cm dishに300万個/dishとなるように撒き直し、新たにCSF (10ng/ml)を添加した。その後7日培養し、接着している骨髄由来マクロファージをスクレーパーで掻き取り使用した。

5) 神経細胞への低酸素負荷

初代培養神経細胞を上記2)の方法で24 well plateに用意した2日後に低酸素負荷をGasPak EZ Anaerobe Puch System (BD Cat#260683)を用いて8時間負荷し、その後通常の酸素濃度で培養を維持した。

6) ウェスタンブロット

培養細胞をLaemmliのsample bufferにて細胞を溶解し蛋白定量後、電気泳動を行った。電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写後、抗GFAP抗体(Sigma)と抗MAP2抗体(Sigma)を一次抗体として使用した。その後アルカリフォスファターゼ標識第2次抗体(Promega)を用いて免疫染色を実施し、発色後各バンドの強さをデンシトメーターを用いて定量した (NIH images)。

7) ELIZA assay

培養液を採取し、培養液中のIL-6とTNF-alphaの量をELIZA kit (R&D system Quantikine mouse IL-6, mouse TNF-alpha)を用いて定量した。

8) NO assay

培養液を採取し、培養液中のNO量をGriess reagent [N-(1-naphthyl)-ethylenediamine (0.1%) and sulphanilamide (1%)] (Sigma)を用いて定量した。

3. 統計的処理

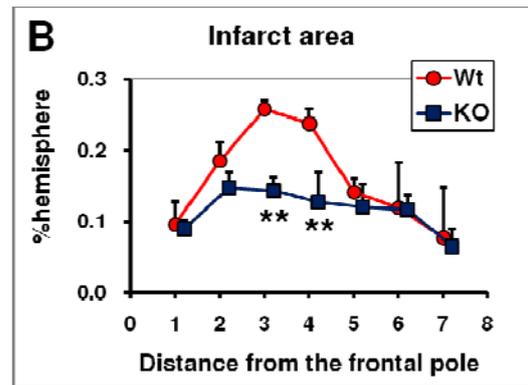
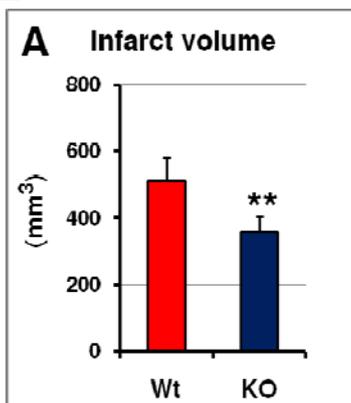
各分析データはOne way analysis of variance followed by Bonferroni's multiple comparison testにて評価し、p値が0.05以下を有意とした。全てのデータはmean±SDにて表記した。

4. 研究成果

1) TLR4による脳虚血障害の増強作用

TLR4 knockout mice (homo type: KO) と wild type (Wt)での脳虚血後24時間目での脳梗塞量をTTC染色にて検討した。その結果、Wtに比してKOでは明らかに脳梗塞量が減少した(図1A、B)

図1



2) TLR4によるマイクログリアでのIL-6, TNF-alpha, 及びNO産生作用

初代培養マイクログリア(Mi)にLipid A(5ug/ml)又はIFN-gamma (200ng/ml)、及びその両方を添加してMiを活性化し、その後経時的に培養液中のIL-6, TNF-alpha, NOの濃度を測定した。その結果Wild type (Wt)のマウスより採取したマイクログリアではIL-6とTNF-alphaはLipid Aを加えた群[Mi+LdA]とLipid A及びIFN-gammaを加えた群[Mi+I+LdA]で、添加後12時間目及び6時間目よりそれぞれ産生されたが、TLR4 knockoutマウス (TLR4KO)より採取したマイクログリアでは添加後24時間までにはIL-6, TNF-alphaともに殆ど産生されなかった。更にNOはWild type (Wt)のマウスより採取したマイクログリア

にてLipid A及びIFN-gammaを加えた群[Mi+I+LdA]のみで添加後24時間目に産生されたが、TLR4 knockoutマウス (TLR4KO)より採取したマイクログリアでは添加後24時間までには全く産生されなかった。

3) TLR4による骨髄由来マクロファージでのIL-6, TNF-alpha, NO産生作用

骨髄由来培養マイクログリア (BMMp)にLipid A(5ug/ml)又はIFN-gamma (200ng/ml)、及びその両方を添加してMBBpを活性化し、その後経時的に培養液中のIL-6, TNF-alpha, NOの濃度を測定した。その結果Wild type (Wt)のマウスより採取したBMMpではIL-6とTNF-alphaはLipid Aを加えた群[Mi+LdA]とLipid A及びIFN-gammaを加えた群[Mi+I+LdA]で、添加後4時間目より産生されたが、TLR4 knockoutマウス (TLR4KO)より採取したマイクログリアでは添加後24時間までにはIL-6, TNF-alphaともに殆ど産生されなかった。更にNOはWild type (Wt)のマウスより採取した骨髄由来培養マイクログリア (BMMp)にてLipid Aを加えた群[Mi+LdA]とLipid AとIFN-gammaを加えた群[Mi+I+LdA]で添加後12時間目から産生されたが、TLR4 knockoutマウス (TLR4KO)より採取したでは添加後24時間までには全く産生されなかった。

4) 神経細胞と共培養したマイクログリアのIL-6, TNF-alpha, NO産生作用にTLR4の及ぼす効果

初代培養神経細胞(N)とマイクログリア(Mi)を共培養後、Lipid A(5ug/ml)又はIFN-gamma (200ng/ml)、及びその両方を添加してMiを活性化し、その後経時的に培養液中のIL-6, TNF-alpha, NOの濃度を測定した。その結果マイクログリア単独群[Mi]、又はニューロン単独群(N)及び両者の共培養群[NMi]では24時間までにはIL-6, TNF-alpha, NOの産生を認めなかった。一方、ニューロンとマイクログリアを共培養した後にLipid A(5ug/ml)を添加した群[NMi+LdA]とLipid A(5ug/ml)

と IFN-gamma (200ng/ml) を添加した群 [NMi+LdA+I]、及びマイクログリアに Lipid A (5ug/ml) と IFN-gamma (200ng/ml) を添加した群 [Mi+LdA+I] では Wild type (Wt) のマウスより採取した Mi では添加後 4 時間目から IL-6 と TNF-alpha が産生され、NO は 12 時間目から [NMi+LdA+I] 群と [Mi+LdA+I] 群で産生された。一方 TLR4 knockout マウス (TLR4KO) より採取したマイクログリアでは神経細胞と共培養後に Lipid A (5ug/ml) 又は IFN-gamma (200ng/ml)、及びその両方を添加して Mi を活性化しても添加後 24 時間までには IL-6, TNF-alpha 及び NO は殆ど産生されなかった。

5) 神経細胞と共培養した骨髄由来マクロファージの IL-6, TNF-alpha, NO 産生作用に TLR4 の及ぼす効果

初代培養神経細胞と骨髄由来マクロファージ (BMP) を共培養後、Lipid A (5ug/ml) 又は IFN-gamma (200ng/ml)、及びその両方を添加して BMP を活性化し、その後経時的に培養液中の IL-6, TNF-alpha, NO の濃度を測定した。その結果骨髄由来マクロファージ単独群 [Mp]、又はニューロン単独群 (N) 及び両者の共培養群 [NMP] では 24 時間までに IL-6, TNF-alpha, NO の産生を認めなかった。一方、ニューロンと骨髄由来マクロファージを共培養した後に Lipid A (5ug/ml) を添加した群 [NMP+LdA] と Lipid A (5ug/ml) と IFN-gamma (200ng/ml) を添加した群 [NMP+LdA+I]、及び骨髄由来マクロファージに Lipid A (5ug/ml) と IFN-gamma (200ng/ml) を添加した群 [MP+LdA+I] では Wild type (Wt) のマウスより採取した Mi では添加後 4 時間目から IL-6 と TNF-alpha が産生され、NO は 12 時間目から [NMP+LdA+I] 群と [MP+LdA+I] 群で産生された。一方 TLR4 knockout マウス (TLR4KO) より採取したマイクログリアでは神経細胞と共培養後に Lipid A (5ug/ml) 又は IFN-gamma (200ng/ml)、及びその両方を添加して BMP を活性化しても添加後 24 時間までには IL-6, TNF-alpha 及び NO は殆ど産生されなかった。

上記の結果は TLR4 はマイクログリア及び骨髄由来マクロファージが活性化し IL-6, TNF-alpha, NO といった炎症因子を産生する為に必修の標的分子であることが明らかとなった、更にニューロンと共培養した場合には、活性化マイクログリアや活性化骨髄由来マクロファージから IL-6, TNF-alpha, NO といった炎症因子の産生作用が増強することも明らかとなった。

6) TLR4 による活性化マイクログリアの神経細胞死促進作用

以上の結果よりマイクログリア及び骨髄由来マクロファージの活性化には TLR4 が不可欠であることが明らかとなった。そこで、実際に活性化マイクログリアによる神経細胞死に TLR4 KO type より得られたマイクログリアと共培養し、Lipid A (5ug/ml) と IFN-gamma (200ng/ml) を添加してマイクログリアを活性化させ、24 時間後の神経細胞死の程度を抗 MAP2 抗体を用いたウエスタンブロットにて検討した。その結果、Wild type より得られた活性化マイクログリアを神経細胞と共培養した場合にのみ神経細胞死が促進され、TLR4 knockout マウス (TLR4KO) より採取した活性化マイクログリアでは神経細胞死を認めなかった。以上の結果は TLR4 は活性化マイクログリアによる神経細胞死機構に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

7) TLR4 による活性化マイクログリアの神経細胞死促進作用

活性化マイクログリアの神経細胞死促進作用に TLR4 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで、初代培養神経細胞に 8 時間の低酸素負荷を与えた後、24 時間目に Wild type (Wt) と TLR4 knockout type のマウス (TLR4KO) より採取したマイクログリアをそれぞれ加え、24 時間後に神経細胞死の程度を抗 MAP2 抗体を用いたウエスタンブロットにて、更にマイクログリアの活性化の程度を NO 活性にて検討した。その結果、低酸素負荷する前に Wt と TLR4KO から採取したマイクログリアを加えても、神経細胞死は誘導されなかった。8 時間の低酸素負荷にて MAP2 免疫原性は約 3 割減少し、その後マイクログリアと共培養すると Wt から採取したマイクログリアと共培養した場合に神経細胞死が促進されたが、TLR4KO から採取したマイクログリアを加えても神経細胞死は誘導されなかった。また NO 活性を調べると、Wt から採取したマイクログリアと低酸素負荷を与えて障害された神経細胞と共培養した場合にのみ、NO 活性を認めた。

以上の結果より、低酸素負荷により障害された神経細胞とマイクログリアを共培養すると Wt から採取したマイクログリアは NO を産生し、神経細胞死を促進した。一方 TLR4KO から採取したマイクログリアでは NO は産生せず、神経細胞死を促進しなかった。以上の結果はマイクログリアは神経損傷時には活性化し、神経細胞死を促進するが、その際に TLR4 が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

8) 骨髄キメラマウスを用いての、骨髄由来マクロファージの脳虚血に及ぼす作用

致死量 (9Gy) の X 線を照射された雌性 TLR4KO マウスに雄性の TLR4KO マウス及び Wt マウスの骨髄細胞を移植し、骨髄キメラマウスを作成した。キメラマウスの作成の成否は移植後一ヶ月目に尾部を採取し、genomic DNA を抽出後、Smc-1, Smc-2 を primer として PCR を施行後、増幅バンドが雌性パターンから雄性パターンに変化していることで確認した。その後、1 時間の中大脳動脈閉塞を行い、24 時間後に脳梗塞サイズの変化を TTC 染色を行うことで評価した。その結果 TLR4KO マウスに TLR4KO マウスの骨髄を移植した場合 ($366.0 \pm 28.5 \text{ mm}^3$ [Mean \pm SD]) に比して Wt マウスの骨髄を移植した場合 ($464.3 \pm 72.6 \text{ mm}^3$) では 26.8% の脳梗塞量の増大効果を認めた。TLR4KO マウスと Wt マウスとでの中大脳動脈閉塞による脳梗塞量はそれぞれ $358.2 \pm 48.8 \text{ mm}^3$ と $509.8 \pm 72.0 \text{ mm}^3$ であり、TLR4KO マウスに比して Wt マウスでは 42.3% の脳梗塞量の増大を認めたことより、TLR4 をノックアウトした際の脳虚血障害改善作用の 63.4% は骨髄由来マクロファージの TLR4 を除外することで、達成できることが明らかとなった。以上の結果より脳虚血障害に骨髄由来マクロファージが重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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 23 件)

1. Taguchi A, Zhu P, Cao F, Kikuchi-Taura A, Kasahara Y, Stern DM, Soma T, Matsuyama T and Hata R.: Reduced ischemic brain injury by partial rejuvenation of bone marrow cells in aged rats. J Cereb Blood Flow Metab. 31: 855-67, (2011) (査読有り).

2. Desaki J, Nishida N. Fine structural study of the regeneration of muscle fibers in the rat soleus muscle during aging. *J Electron Microsc.* 60:191-200, (2011) (査読有り).
3. Cao F, Hata R, Zhu P, Nakashiro K and Sakanaka M: Conditional deletion of Stat3 promotes neurogenesis and inhibits astroglialogenesis in neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 394:843-7, (2010) (査読有り).
4. Cao F, Hata R, Zhu P, Takeda S, Yoshida T, Hakuba N, Sakanaka M and Gyo K.: Delayed neuronal cell death in brainstem after transient brainstem ischemia in gerbils. *BMC Neurosci.* 14:11:115-126, (2010) (査読有り).
5. Sonobe N, Hata R, Ishikawa T, Sonobe T, Matsumoto T, Toyota Y, Mori T, Fukunaga R, Komori K, Ueno S, Tanimukai S and Ikeda M: Risk of progression from mild memory impairment to clinically diagnosable Alzheimer disease in a Japanese community (from the Nakayama Study). *Int Psychogeriatr.* 2010 Dec 16:1-8. [Epub ahead of print] (査読有り).
6. Inoue A, Takahashi H, Harada H, Kohno S, Ohue S, Kobayashi K, Yano H, Tanaka J, Ohnishi T. Cancer stem-like cells of glioblastoma characteristically express MMP-13 and display highly invasive activity. *Int J Oncol.* 37: 1121-31, (2010) (査読有り).
7. Ohue S, Fukushima T, Friedman AH, Kumon Y, Ohnishi T. Retrosigmoid suprafloccular transhorizontal fissure approach for resection of brainstem cavernous malformation. *Neurosurgery.* 66: 306-12, (2010) (査読有り).
8. Ohue S, Kumon Y, Nagato S, Kohno S, Harada H, Nakagawa K, Kikuchi K, Miki H, Ohnishi T. Evaluation of intraoperative brain shift using an ultrasound-linked navigation system for brain tumor surgery. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 50: 291-300, (2010) (査読有り).
9. Ohue S, Fukushima T, Kumon Y, Ohnishi T, Friedman AH. Surgical management of brainstem cavernomas: selection of approaches and microsurgical techniques. *Neurosurg Rev.* 33: 315-22, (2010) (査読有り).
10. Smirkin A, Matsumoto H, Takahashi H, Inoue A, Tagawa M, Ohue S, Watanabe H, Yano H, Kumon Y, Ohnishi T, Tanaka J. Ibal(+)/NG2(+) macrophage-like cells expressing a variety of neuroprotective factors ameliorate ischemic damage of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30:603-15, (2010) (査読有り).
11. Desaki J, Ezaki T, Nishida N. Fine structural study of the innervation of muscle spindles in the internal oblique muscle of the abdominal wall in the adult mouse. *J Electron Microsc.* 59:243-50, (2010) (査読有り).
12. Desaki J, Nishida N. A further observation of muscle spindles in the extensor digitorum longus muscle of the aged rat. *J Electron Microsc.* 59:79-86, 2010(査読有り).
13. Cao F, Hata R, Zhu P, Niinobe M and Sakanaka M: Up-regulation of syntaxin1 in ischemic cortex after permanent focal ischemia in rats. *Brain Res.* 1272:52-61, (2009) (査読有り).
14. Takeda S, Hata R, Cao F, Yoshida T, Hakuba N, Hato N and Gyo K: Ischemic tolerance in the cochlea. *Neurosci Lett.* 462: 263-266, (2009) (査読有り).
15. Desaki J, Nishida N. A small lamellar corpuscle within a small nerve bundle outside the tendon of the rat soleus muscle. *J Electron Microsc.* 58:67-72, (2009) (査読有り).
16. Seno T, Harada H, Kohno S, Teraoka M, Inoue A, Ohnishi T. Downregulation of SPARC expression inhibits cell migration and invasion in malignant gliomas. *Int J Oncol.* 34:707-15, (2009) (査読有り).
17. Takeda S, Hakuba N, Yoshida T, Fujita K, Hato N, Hata R, Hyodo J, and Gyo K: Postischemic mild hypothermia alleviates hearing loss because of transient ischemia. *Neuroreport.* 19:1325-1328, (2008) (査読有り).
18. Zhu P, Hata R, Cao F, Gu F, Hanakawa Y, Hashimoto K and Sakanaka M: Ramified microglial cells promote astroglialogenesis and maintenance of neural stem cells through activation of Stat3 function. *FASEB J.* 22: 3866-3877, (2008) (査読有り).
19. Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Chuai M, Imai Y, Takahashi H, Tanaka J. Accumulation of macrophage-like cells expressing NG2 proteoglycan and Ibal in ischemic core of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28:149-63, (2008) (査読有り).
20. Ohue S, Kumon Y, Kohno K, Watanabe H, Iwata S, Ohnishi T. Postoperative temporary neurological deficits in adults with moyamoya disease. *Surg Neurol.* 69:281-6, (2008) (査読有り).
21. Desaki J. Scanning electron microscopic observation of the sensory region in the frog muscle spindle. *J Electron Microsc.* 57:143-7, (2008) (査読有り).
22. Desaki J. Regeneration of muscle fibers in the extensor digitorum longus muscle of the aged rat. *J Electron Microsc.* 57: 59-66, (2008) (査読有り).
23. Desaki J, Nishida N. Novel muscle spindles containing muscle fibers devoid of sensory innervation in the extensor digitorum longus muscle of aged rats. *J Electron Microsc.* 57:77-82, (2008) (査読有り).

(査読有り).

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 龍二 (HATA RYUJI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：90258153

(2) 研究分担者

大西 丘倫 (ONISHI TAKANORI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70233210

久門 良明 (KUMON YOSHIAKI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80127894

出崎 順三 (DEZAKI JUNZO)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：00036451