

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390413

研究課題名（和文） 脳虚血後神経再生過程の機構解明と修飾療法

研究課題名（英文） Elucidation of neuronal regenerative mechanism after ischemia and its modulation therapy

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（和文）：脳虚血後の選択的神経細胞死を線条体に生じさせるモデルを用い、脳室内に成長因子を投与して内在性神経幹細胞からの神経再生誘導が可能か否かを検討した。その結果、2%程度まで減少した神経細胞が6週で12-15%程度にまで回復していた。神経幹細胞をBrdUにて標識して追跡したところ、これらの神経細胞は線条体特異的投射神経、介在神経細胞に分化していた。また、電気生理学的にも20週以降で成熟し、個体レベルでも運動機能の改善が有意に得られた。本研究の結果は、内在性神経幹細胞からの再生過程を成長因子にて修飾することで、電気生理学的、個体行動学的レベルで機能再建が可能であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Here we explored whether neuronal regeneration can be augmented by administration of exogenous growth factors by using rat global ischemia model, which induced selective neuronal death in the striatum. As a result, neuronal density in the striatum decreased to 1% by 2 days after ischemia, that was finally increased to 12-15% by the growth factor treatment. When dividing neural progenitors were labeled by BrdU, the progeny of these cells were distributed in the striatum, differentiated into region specific projection and inter-neurons. In addition, these cells matured electrophysiologically after 20 weeks of ischemia. Motor performance also improved significantly. Collectively, these results suggested that the modulation of endogenous neuronal regeneration can be potentiated by the treatment, and finally leads to functional recovery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

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

内在性神経幹細胞の存在が成体脳で示されて以来、中枢神経系損傷後の神経再生による機能回復が得られるかが注目された。我々の研究で、海馬の虚血性損傷後に成長因子の投与によって神経細胞が再生して記憶が回復することが、初めて示された。しかし、内在性神経幹細胞は部位特異性が高く、他部位でも広く神経再生が得られるか否かは分かっていなかった。北欧の研究グループが、脳梗塞後に若干の再生が得られることを報告はしていたが、その程度は極めて低く 1%以下であった。このような中で、我々は線条体においても成長因子投与による治療で機能回復まで得られる再生を誘導可能か否かについて、研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

全脳虚血モデルにて線条体に選択的神経細胞死を誘導し、成長因子投与によって、形態学的な神経再生がどの程度得られるかを定量的に解析し、その後の電気生理学的成熟過程も追跡して、最終的な個体の機能回復が得られるか否かを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

雄性ラット (8 週齢, Wistar) を用い、頸部 4 血管閉塞モデルによる一過性全脳虚血を作成した。虚血時間は 9 分間とした。虚血後 48 時間で線条体背外側部の神経細胞数の計測して、神経細胞死の程度を定量的に評価した。次に、48 時間後より両側の側脳室にカニューレを留置して浸透圧ポンプにて bFGF および EGF を 7 日間持続的に投与した。6 週後に脳を灌流固定し、線条体での神経細胞の密度を計測した。

また、48 時間後より 3 日間 BrdU を腹腔内

投与して増殖神経幹細胞 DNA をラベルし、6 週後に免疫組織学的にこれらの細胞の表現系を検討した。

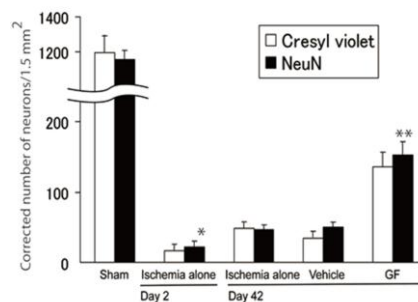
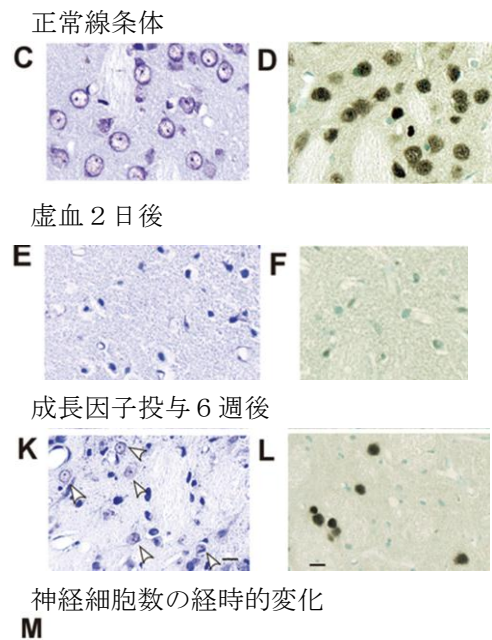
電気生理学的には、6 週以降に線条体のスライスを作成して whole cell recording を行って静止膜電位、voltage clamp による活動電位の発火パターン、シナプス後電位の有無などを検討した。

最後に、stair case test にて前肢の運動能力の評価を行った。

## 4. 研究成果

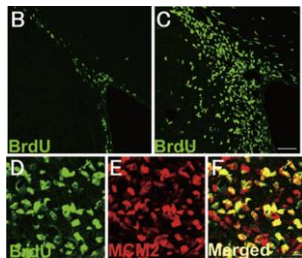
9 分虚血によって、線条体背外側部の神経細胞数は 2.0%まで減少し、成長因子の投与によって 6 週後には 12%まで神経細胞数が回復しており、これは vehicle 群の 4.4%と比較して有意に多かった。

### 図 1 線条体の神経細胞



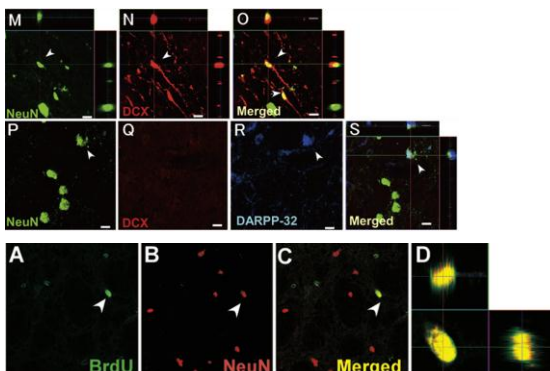
BrdU 投与後には、前脳室下帯にて分裂細胞が標識され、外側の線条体に向かって遊走を始めていた。

図 2 前脳室下帯での BrdU の取り込み



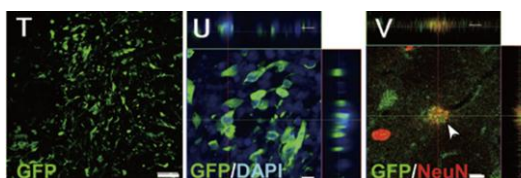
6 週後に、BrdU を取り込んだ細胞を検討したところ、DCX 陽性、NeuN 陽性であり、一部では DARPP32 陽性（線条体投射神経細胞マーカー）であった。

図 3 6 週後の神経細胞



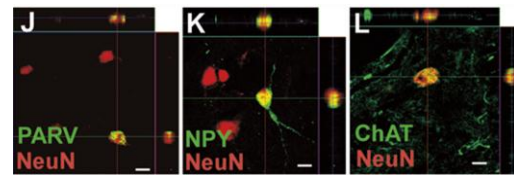
また、虚血 2 日後に脳室内に GFP retrovirus を投与して追跡した結果、線条体にて NeuN 陽性となっており、脳室壁に存在した神経幹細胞が線条体にて成熟神経細胞へと分化したことが分かった。

図 4 GFP 陽性神経細胞



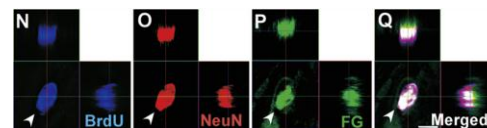
さらに、線条体では PARV 陽性、NPY 陽性、ChAT 陽性などの介在神経細胞への分化も認められた。

図 5 介在神経細胞への分化



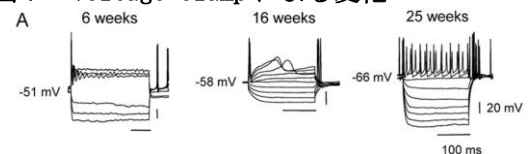
逆行性輸送物質 FG を globus pallidus に注入したところ、これらの再生神経細胞に輸送されており、再生神経細胞が globus pallidus に軸索を伸展させていることが伺われた。

図 6 FG を取り込んだ再生神経細胞



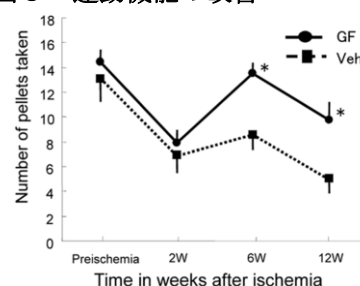
電気生理学的には、6 週では活動電位が見られず、25 週以降に正常な活動電位がみとめられた。また、静止電位も 20 週以上で正常化することが分かり、電気生理学的にはより長期の時間を要することが判明した。

図 7 voltage clamp による変化



運動機能の評価では、vehicle 群に比較して有意に治療群で機能の改善が得られ、個体レベルでも再生神経細胞によると思われる機能改善が認められた。

図 8 運動機能の改善



以上の結果は、脳虚血による選択的神経細胞死において、bFGF および EGF の投与で、線条体に内在性神経幹細胞からの神経再生を誘導可能であることを示している。また、これらの神経細胞は、形態学的に成熟し、かつ電気生理学的にも成熟することが示された。

## 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 8 件)

- ① Higurashi M, Iketani M, Takei K, Yamashita N, Aoki R, Kawahara N, Goshima Y: Localized role of CRMP1 and CRMP2 in neurite outgrowth and growth cone steering: Dev Neurobiol (in press) 2012
- ② Yamada S, Kanno H, Kawahara N: Trans-membrane peptide therapy for malignant glioma by use of a peptide derived from the MDM2 binding site of p53. J Neurooncol (in press) 2012
- ③ Abe K, Yamashita T, Takizawa S, Kuroda S, Kinouchi H, Kawahara N: Stem cell therapy for cerebral ischemia: from basic science to clinical applications. J Cerebral Blood Flow Meta (in press) 2012
- ④ 川原信隆: 神経幹細胞で海馬を守る. アーチ・エイジング医学 6:28-33, 2010
- ⑤ 川原信隆: Top Journal Up To Date 「皮質第 I 層神経前駆細胞による虚血後神経新生」 分子脳血管病 9(No3):342-343, 2010
- ⑥ Yoshikawa G, Momiyama T, Oya S, Takai K, Tanaka J, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N: Induction of striatal neurogenesis and generation

of region-specific functional mature neurons after ischemia by growth factors. J Neurosurg 113:835-850, 2010

- ⑦ 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

- ⑧ 川原信隆: 総説: 脳虚血と神経再生. 脳神経外科 37:1165-77, 2009

[学会発表] (計 3 件)

- ① 川原信隆: 脳虚血と再生に関する研究. Expert Meeting in Kanagawa, 2011 横浜
- ② Kawahara N: Intrinsic neurogenesis in cerebral ischemia, 25th International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism & 10th International Conference on Quantification of Brain Function with PET, 2011 Barcelona 教育講演
- ③ 川原信隆: 虚血性脳血管障害に対する神経再生療法. テレビ東京一話題の医学, 2010

## 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