

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591119

研究課題名（和文） マウス局所脳虚血モデルへの神経堤由来細胞移植の効果の検討

研究課題名（英文） The investigation of the effect of transplantation of neural crest derived cells to murine focal cerebral ischemia model.

研究代表者

富田 裕 (TOMITA YUTAKA)

慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）

研究者番号：60276251

研究成果の概要（和文）：脳梗塞モデルマウスに、神経堤細胞由来の幹細胞を移植した後、レーザー光スキャン共焦点顕微鏡を用いて、単一細胞レベルで細胞を生きのまま長期間に亘り反復画像化可能であることが確かめられた。移植した幹細胞が虚血および虚血周辺領域へと移動（migration）、分裂（differentiation）、分化（proliferation）し得ることが示された。マウス脳梗塞モデルにて、細胞移植後、生きのまま個々の細胞レベルまで長期間反復観察できる実験系を確立したことは、今後の研究発展に寄与することと考えている。

研究成果の概要（英文）：The aim of the study was to monitor in vivo and noninvasively the fate of neural crest cells transplanted into the ischemic brain of unirradiated mice. In vivo imaging was performed through a closed cranial window following cell transplantation, using laser-scanning confocal fluorescence microscopy. Repeated in vivo imaging revealed that transplanted cells survived within the ischemic and peri-ischemic cortex, migrated significantly towards the lesion, proliferated. This study indicates that confocal fluorescence microscopy is a reliable and unique tool to repeatedly assess with cellular resolution the in vivo dynamic fate of fluorescent cells transplanted into a mouse brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経堤細胞 脳梗塞 Confocal 顕微鏡 Matlab software

1. 研究開始当初の背景

血栓溶解療法（tPA）を除くと脳梗塞に対する完全に有効な治療法はいまだ存在せず、さらなる基礎研究の進歩が期待されている。近年、再生医療として脳虚血後の骨髄幹細胞移植による治療効果が注目され、国内外で盛

んに研究されているが、未だにその移植後の動態、有用性に関しては不明なままである。また、移植する幹細胞の種類（分化・未分化）、移植のタイミング、投与方法などさまざまな課題が残されている。

2. 研究の目的

頭窓を有する wild type マウスに中大脳動脈閉塞モデルを作成、その翌日骨髄由来神経堤細胞を stereotaxic に移植し、その後の移植細胞の動態を頭窓を通して、confocal 顕微鏡を用いて同一動物、同一部位にて長期間反復 in vivo 観察する。同時に微小循環動態、血管のリモデリングへの影響を詳細に解析する。また梗塞体積の測定、組織学的検索をする。これらの過程を通し、骨髄由来神経堤細胞を脳虚血マウスに移植することが、治療効果を有しているか否かを検討する。

3. 研究の方法

インフルレン麻酔下 wild type マウスの左頭頂側頭部に慢性的頭窓を開け FITC ラベル赤血球投与下で stereotaxic apparatus にて頭部を固定し、脳表を観察する。頭窓作成 1 週間後、中大脳動脈遠位虚血モデル、あるいは古典的中大脳動脈近位閉塞モデル、虚血なしの 3 群を作成する。移植する細胞は、神経堤細胞を GFP で標識する P0-Cre/Floxed-EGFP マウスの骨髄より、フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性の神経堤由来細胞を回収する。得られた神経堤由来細胞を stereotaxic に脳表より 1mm の深さに移植する。その後、レーザー光 (488 nm) スキャン共焦点顕微鏡により頭窓を通して移植細胞のその後の動態を移植 2-4 週間まで詳細に in vivo 観察し、migration、proliferation、differentiation の経過を検討する。また FITC ラベルした赤血球を全身投与することにより、この頭窓を通した微小循環動態を confocal 顕微鏡を用いて長期間、虚血前、直後、1 週、2 週、3 週、4 週の各時期において in vivo 観察する。具体的には、脳皮質毛細血管豊富な部分を選び出し、高速 (500 枚/秒) カメラレーザー光 (488 nm) スキャン共焦点顕微鏡により FITC ラベル赤血球の動きをビデオ画像として取り込み保存する。得られた膨大な数の赤血球の変化を Matlab 応用ソフト (KEIO-IS1 & 2) を用いて数値化し、血流速度を定量的に詳細に測定、統計計算を行う。また、Rhodamine-Dextran を注入し血管構造の変化、リモデリング・血管新生の有無につき検討する。組織酸素分圧測定は白金酸素電極を用いて脳表の酸素分圧を測定する。以上によりマウス虚血脳における新生毛細血管網と赤血球密度/速度・酸素分圧を観察する。

上記各群の神経学的所見、行動学的所見の差異について比較検討する。さらに動物実験用の高解像度 MRI を用いて、梗塞体積を各群で比較検討する。In vivo 実験後、ホルマリンにて還流固定、作成した脳切片を組織、免疫組織学的手法を用いた検討 (NeuN、GFAP、Iba-1、CD31 など) を行う。これらにより局所脳虚血モデルへの神経堤由来細胞移植の

効果を多角的に検討する。

また、他の細胞を移植した場合と比較検討する。

4. 研究成果

当実験系において、脳梗塞モデルマウスに green fluorescent protein (GFP) を発現する遺伝子改変マウスから得られた新鮮幹細胞などを移植した後、レーザー光 (488 nm) スキャン共焦点顕微鏡を用いて、単一細胞レベルで細胞を生きのまま長期間に亘り反復画像化可能であることが確かめられた。移植した幹細胞が虚血および虚血周辺領域へと移動 (migration)、分裂 (differentiation)、分化 (proliferation) することが明瞭に示された。

一方、神経堤細胞を GFP で標識する P0-Cre/Floxed-EGFP マウスの骨髄より、フローサイトメトリーを用いて GFP 陽性の神経堤由来細胞を回収し、得られた神経堤由来細胞を同様に脳梗塞モデルマウスに脳表より 1mm の深さに移植した場合には、共焦点顕微鏡により頭窓を通して移植細胞のその後の動態を観察しても、必ずしも個々の細胞レベルまでは移動、分裂、分化の動態が明瞭には観察されないケースもあった。採取され得る移植細胞の数が極端に少ない点が今後の課題として浮かび上がった。また、共焦点顕微鏡では、脳皮質より約 100 μ m の深さまでの観察が可能であるが、より脳深部における細胞の挙動を観察する実験系を今後確立し、さらに詳細に比較検討していく必要性が示唆された。

血栓溶解療法を除くと脳梗塞に対する完全に有効な治療法はいまだ存在せず、さらなる基礎研究の進歩が期待され、近年、再生医療として脳虚血後の骨髄幹細胞移植による治療効果が注目されている。移植する幹細胞の種類 (分化・未分化)、数、移植の時期、投与方法などさまざまな課題が残されているが、今回マウス脳梗塞モデルにて、細胞移植後、生きのまま個々の細胞レベルまで長期間反復観察できる実験系を完全に確立したことは、今後の研究発展に大きく寄与していくことと考えている。

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 10 件)

1. Masamoto K, Tomita Y, Toriumi H, Unekawa M, Takuwa H, Itoh Y, Suzuki N, Kanno I. Repeated longitudinal in vivo imaging of neuro-glio-vascular unit at the peripheral

- boundary of ischemia in mouse cerebral cortex. Neuroscience. 査読有. 2012. in press.
2. Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N. Suppressive effect of chronic peroral topiramate on potassium-induced cortical spreading depression in rats. Cephalalgia. 査読有. 2012. in press.
 3. Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N. Sustained decrease and remarkable increase in red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries associated with potassium-induced cortical spreading depression. Microcirculation. 査読有. 19 (2). 2012. 166-174.
 4. Tomita Y, Pinard E, Tran-Dinh A, Schiszler I, Kubis N, Tomita M, Suzuki N, Seylaz J. Long-term, repeated measurements of mouse cortical microflow at the same region of interest with high spatial resolution. Brain Research. 査読有. 1372. 2011. 59-69.
 5. Toriumi H, Shimizu T, Shibata M, Unekawa M, Tomita Y, Tomita M, Suzuki N. Developmental and circulatory profile of the diploic veins. Microvascular Research. 査読有. 81. 2011. 97-102.
 6. Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Suzuki N. Oscillating neuro-capillary coupling during cortical spreading depression as observed by tracking of FITC-labeled RBCs in single capillaries. NeuroImage. 査読有. 1;56(3). 2011. 1001-1010.
 7. Guo H, Itoh Y, Toriumi H, Yamada S, Tomita Y, Hoshino H, Suzuki N. Capillary remodeling and collateral growth without angiogenesis after unilateral common carotid artery occlusion in mice. Microcirculation. 査読有. 18(3). 2011. 221-227.
 8. Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Miyaki K, Suzuki N. RBC velocities in single capillaries of mouse and rat brains are the same, despite 10-fold difference in body size. Brain Res. 査読有. 1320. 2010. 69-73.
 9. Tomita M, Osada T, Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Suzuki N. Exogenous nitric oxide increases microflow but decreases RBC attendance in single capillaries in rat cerebral cortex. Microvasc Rev Commun. 査読有. 3. 2009. 11-16.
 10. Toriumi H, Tatarishvili J, Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, Suzuki N. Dually supplied T-junctions in arteriolo-arteriolar anastomosis in mice: key to local hemodynamic homeostasis in normal and ischemic states? Stroke. 査読有. 40. 2009. 3378-3383.
- 〔学会発表〕(計 26 件)
1. 畝川美悠紀, 畠田裕, 鳥海春樹, 正本和人, 伊藤義彰, 菅野巖, 鈴木則宏. K⁺による大脳皮質性拡張性抑制誘発時の局所脳血流と軟膜動脈血管口径の変化. 第 23 回日本脳循環代謝学会総会. 2011. 11. 4 (口演) 東京
 2. Guo H, Itoh Y, Toriumi H, Yamada S, Tomita Y, Hoshino H, Suzuki N. マウス一側総頸動脈閉塞後に観察された血管新生を伴わない毛細血管の動脈化と側副血行路の発達: Capillary arterialization and collateral growth without angiogenesis after carotid artery occlusion in mice. 第 36 回日本脳卒中学会総会. 2011. 7. 30. (ポスター) 京都
 3. Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Masamoto K, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Kanno I, Suzuki N. Effect of injection of artificial RBCs on murine hemorrhagic hypotension model. XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics 2011. 7. 29. (ポスター) Boston
 4. Kanno I, Masamoto K, Takuwa H, Kawaguchi H, Tomita Y, Suzuki N, Obata T. Prolonged moderate hypoxia impairs neuro-glia-vascular coupling in the somatosensory cortex accompanied by parenchymal microvessel dilation and

- astroglia swelling in mice. Brain 11. 2011.5. 26. (ポスター) Barcelona
5. Yamada S, Guo H, Itoh Y, Toriumi H, Tomita Y, Hoshino H, Suzuki N. Cerebral blood flow restoration mechanisms after unilateral common carotid artery occlusion in mice. Brain 11. 2011.5. 26. (ポスター) Barcelona
 6. Itoh Y, Toriumi H, Yamada S, Tomita Y, Hoshino H, Suzuki N. Resident endothelial cells surrounding damaged arterial endothelium reendothelialize the lesion without any involvement of foreign progenitor cells. Brain 11. 2011.5. 26. (口演) Barcelona
 7. Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Masamoto K, Kanno I, Suzuki N. Transhemispheric effect of cortical spreading depression: electroencephalogram was suppressed but erythrocyte velocity in intraparenchymal capillaries was not affected in rat. Brain 11. 2011.5. 26. (ポスター) Barcelona
 8. Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Masamoto K, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Kanno I, Suzuki N. The effect of Artificial RBCs injection for hemorrhagic hypotension in mice. Brain 11. 2011.5. 26. (ポスター) Barcelona
 9. Masamoto K, Tomita Y, Takuwa H, Unekawa M, Toriumi H, Itoh Y, Suzuki N, Kanno I. Longitudinal imaging of glio-vascular remodeling induced by chronic hypoxia in mouse somatosensory cortex. Brain 11. 2011.5. 24. (口演) Barcelona
 10. 畝川美悠紀, 富田裕, 鳥海春樹, 正本和人, 伊藤義彰, 菅野巖, 鈴木則宏. Potassium-induced cortical spreading depression suppressed transhemispheric electroencephalogram but did not affect on red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries in rats. 第36回日本微小循環学会総会 2011.2.11. (口演) 名古屋
 11. Tomita Y, Abe T, Unekawa M, Toriumi H, Masamoto K, Kanno I, Suzuki N. In vivo visualization of mouse cerebral microcirculation during middle cerebral artery occlusion induced by the suture method. 7th World Stroke Congress. 2010.10.13. (ポスター) Korea
 12. Itoh Y, Toriumi H, Koizumi K, Yamada S, Guo H, Tomita Y, Hoshino H, Suzuki N. Cilostazol inhibits leukocyte rolling/adhesion onto the cerebral vessel wall after recirculation. 7th World Stroke Congress. 2010.10.13. (ポスター) Korea
 13. Tomita Y, Abe T, Unekawa M, Toriumi H, Masamoto K, Kanno I, Suzuki N. Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation after middle cerebral artery ischemia-reperfusion induced by the suture method. The 9th World Congress for Microcirculation. 2010.9.28. (口演) Paris
 14. Unekawa M, Tomita M, Tomita Y, Toriumi H, Kanno I, Suzuki N. Sustained decrease of red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries against potassium-induced cortical spreading depression in rats. The 9th World Congress for Microcirculation. 2010.9.28. (ポスター) Paris
 15. Toriumi H, Shimizu T, Shibata M, Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, Kanno I, Suzuki N. Significance of arterio-venous shunt in the diploic veins in mice. The 9th World Congress for Microcirculation. 2010.9.28. (ポスター) Paris
 16. 富田裕. Brain microcirculation during cortical spreading depression. 第35回日本微小循環学会総会. 2010.2.27. (シンポジウム; 口演) 埼玉
 17. 畝川美悠紀, 富田稔, 富田裕, 鳥海春

- 樹, 鈴木則宏. Variation of red blood cell velocities in intraparenchymal capillaries on potassium -induced cortical spreading depression in anesthetized rats. 第 35 回日本微小循環学会総会 2010.2.26. (口演) 埼玉
18. 富田稔, 富田裕, 畝川美悠紀, 鳥海春樹, 鈴木則宏. Neuro-capillary coupling during cortical spreading depression. 第 35 回日本微小循環学会総会. 2010.2.26. -27. (特別講演;口演) 埼玉
19. 畝川美悠紀, 富田稔, 富田裕, 鳥海春樹, 鈴木則宏. 麻酔下および覚醒時の K⁺誘発性皮質性拡張性抑制による DC 電位の変化および片麻痺. 第 37 回日本頭痛学会総会. 2009.11.28 -29. (口演) 宇都宮
20. 鳥海春樹, 富田稔, 富田裕, 清水利彦, 畝川美悠紀, 鈴木則宏. 片頭痛発作時の血流変化に関する検討 硬膜動脈と板間静脈の血管構造と A-V シヤント. 第 37 回日本頭痛学会総会. 2009.11.28 -29. (口演) 宇都宮
21. 畝川美悠紀, 富田稔, 富田裕, 鳥海春樹, 鈴木則宏. ラット K⁺による脳皮質性拡張性抑制伝播の際の赤血球速度、DC 電位、脳波、酸素分圧、脳血流の相互関係. 第 21 回日本脳循環代謝学会総会. 2009.11.19 -20. (口演) 大阪
22. 富田裕. マウス局所脳虚血モデルにおける長期皮質微小循環の高空間分解能 in vivo 定量的測定. 第 46 回日本臨床生理学会総会. 2009.10.22. (シンポジウム・口演) 盛岡
23. Tomita Y, Toriumi H, Hattori H, Unekawa M, Tomita M, Itoh Y, Hoshino H, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Suzuki N. Artificial RBCs Transiently improved microcirculatory derangement produced by MCA occlusion or hemorrhagic hypotension in mice. Brain 09. 2009.7.2. (ポスター) Chicago
24. Toriumi H, Tatarishvili J, Tomita M, Tomita Y, Hattori H, Unekawa M, Suzuki N. FITC-Labeled RBC tracking in arteriolo-arteriolar anastomoses in control state and during ischemia after MCA occlusion in mice. Brain 09. 2009.7.2. (ポスター) Chicago
25. Tomita M, Tatarishvili J, Toriumi H, Tomita Y, Unekawa M, Hattori H, Suzuki N. When does angiogenesis accompanied with RBC flow develop in ischemic tissue after permanent MCA occlusion in C57BL/6J mice? Brain 09. 2009.7.2-3. (口演、シンポジウム) Chicago
26. Tomita M, Tomita Y, Unekawa M, Toriumi H, Hattori H, Suzuki N. A hypothesis: Virchow-Robin space as an integrating cleft of cerebrocortical local arteriolar responses. The 10th International Symposium on Vasodilatation. 2009.6.2. (ポスター) 松島
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕
ホームページ等
なし
6. 研究組織
(1)研究代表者
富田 裕 (TOMITA YUTAKA)
慶應義塾大学・医学部・講師 (非常勤)
研究者番号 : 60276251
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし