

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 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591577

研究課題名（和文） 虚血白質障害に関する多角的病態解析と軸索再生のための基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research for the comprehensive analysis of selective white matter injury and the axonal regeneration

研究代表者

今井 英明（IMAI HIDEAKI）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：70359587

研究成果の概要（和文）：ラット大脳白質（内包）へ定位的にエンドセリンを注入し選択的な白質梗塞モデルを作成した。梗塞部位はMRI 画像と病理組織学にて病態を評価した。質量顕微鏡により分子レベル（リン脂質）での変化を網羅的に可視化し、新たな知見をえた。

細胞移植による治療法の開発研究においては、脳血管内皮細胞の初代培養系を確立した後、内包梗塞部位に定位的に移植しところ、神経症状の改善を認めた。細胞移植による新たな（白質）脳梗塞治療法の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Sprague-Dawley rats were used. Under general anesthesia endothelin-1 (ET-1: 0.5 μ g/ μ l) was stereotactically injected into unilateral internal capsule to induce selective white matter damage. Selective white matter injury was evaluated by MRI, and particularly axonal injury was confirmed by specific APP immunoreactivity. The increased immunoreactivity for ED1 was observed in the lesion from 3 days to 2 weeks after injection showing the activated microglia migrated and occupied the lesion of white matter injury. Imaging mass spectrometry (IMS) revealed the dynamic change of phosphatidylcholines comprehensively IMS has tremendous potentials to provide the new insight in terms of the dynamic molecular changes invisible under conventional modality.

The microvascular endothelial cells (MVECs) were prepared from rat cerebra for the cell transplantation. MVECs were transplanted into the ischemic lesion of internal capsule. MVEC transplantation improved the behavioral outcome and induced remyelination. Also the inflammatory response was repressed by MVEC transplantation. Elucidation of the mechanisms by which MVECs ameliorate ischemic damage of the white matter may provide important information for the development of effective therapies for white matter ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：脳梗塞、白質障害、病態解析、質量顕微鏡、軸索再生、細胞移植治療

1. 研究開始当初の背景

近年 iPS 細胞（人工多能性幹細胞）の樹立により幹細胞による再生研究が注目を集めている。しかし、実際の臨床への応用には動物モデルによる有効性と安全性の実証が不可欠である。中枢神経系の再生においてはその実験モデルによる治療効果の実証が極めて重要であるといえる。今回、選択的白質障害モデルを用いて細胞生物学と生体細胞工学を応用して移植による軸索再生のための基盤研究を行う。応募者は、これまでに大型動物であるミニブタを用いて、選択的白質梗塞モデルを提唱し、神経軸索再生研究に取り組んできた。現実的には、試行錯誤研究であるため相当数の実験動物が必要とされ、汎用性があるラットによる選択的白質梗塞モデルでの研究を今回は選択した。大脳白質障害は脳梗塞をはじめとして、脳腫瘍、外傷など脳外科的疾患と密接な関係がある。さらに近年、アルツハイマー病、多発性硬化症、老人性痴呆症などの変性疾患との関連も指摘され、ますますその重要性が認識されてきている。

脳虚血研究において、我々は、大脳白質の重要性に早くから注目した。嚙歯類脳梗塞モデルにおける白質の評価法の開発(H Imai et al., *Stroke* 2001 32:2149-2156, H Imai et al., *J Cereb Blood Flow and Metab* 2002 22:1080-1089.)と、それを利用しての脳梗塞治療薬の評価を行ってきた(H Imai et al., *Free Radical Biology and Medicine* (2003) 34:56-63, H Imai et al., *European Journal of Neuroscience* (2002) 15:1929-1936)。さらによりヒト脳に近い形での白質障害の病態解明をおこなうべく、大型動物ミニブタ脳梗塞モデルを開発した(H Imai et al., *J Neurosurg* 2006 104: 123-132)。それを発展させた選択的白質障害モデルによりラクナ梗塞の病態解明を行った(Y Tanaka et al., *Stroke* 2008 39:205-212)。

これらの研究結果から、白質障害の根本的な治療は、軸索の再生によるところが大きいと実感している。中枢神経と末梢神経との違いは末梢神経においては軸索再生がなされる一方で、中枢神経に関しては通常は軸索再生がなされることはない。一つの仮説として、中枢神経は再生機能をあえて抑制する機能があるのではないかと考えられている。他の仮説として、軸索再生を促すのに必要な神経栄養因子が枯渇しており軸索の再生が進まないのではないかと考えられている。

これまで、我々の基礎研究で、白質脳梗塞部位にbFGFを吸着したゼラチンマイクロスフェア（生体吸収性材料）を注入して、bFGF持続的投与を行った後、軸索再生に及ぼす効果について検証した。免疫組織標本では、同

部位にマイクロスフェアが確認できた。その周囲はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンに満たされたグリア瘢痕を認めた。一部の軸索再生は確認することができたが、グリア瘢痕の境界を越えて軸索が伸長する所見はなかった。一方、脳梗塞巣に関してはbFGFの副作用のためか対照群に比較して脳浮腫のため大きくなる傾向を示した。栄養因子の種類や組み合わせさらに至適濃度は今後詳細に検討する必要性を実感した。中枢神経系においては現在の人工的投与方法では、至適濃度よりはるかに高濃度のbFGFを投与してしまう可能性がある。そこで環境に応じて、相応に神経栄養因子を分泌する可能性が知られている血管内皮細胞に注目した。神経幹細胞のみでなく血管内皮細胞などと組み合わせた、神経細胞、グリア細胞と血管内皮細胞の相互作用(nuero-glio-vascular signaling)を考慮した治療法が期待される。

2. 研究の目的

虚血白質障害に関する多角的病態解析と軸索再生のための基礎的研究を目的とする。

- (1) 実験動物モデルを用いて虚血による選択的白質障害を多角的に検証して大脳白質障害の機序を明らかにする。
- (2) 細胞生物学および生体細胞工学を応用して神経軸索再生のために必要は微小環境の整備と神経栄養因子投与による軸索再生のための基礎的研究を行う。
- (3) 軸索再生に関与する分子機構を網羅的に解析して同定する。

3. 研究の方法

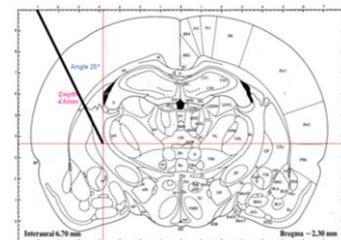
- (1) ラット白質選択的（内包）梗塞モデルを作成する。
- (2) 脳白質梗塞巣を経時的に多角的評価をおこなう（神経脱落症状、神経放射線学、形態組織学、生化学・電気生理学的評価をおこなう。さらに質量顕微鏡によりリン脂質の動的な変化を網羅的に解析し同定する。）。
- (3) 移植再生研究：細胞生物学的治療による軸索再生の効果を評価する。

4. 研究成果

- (1) 白質梗塞（ラット白質脳梗塞）モデル作成と多角的病態評価

成獣ラット（12週齢）の内包にエンドセリン 1 μ g/ μ l を定位的に注入して、選択的白質梗塞モデルを作成した。ター

図 1



ゲットポイントの検証を行い最適条件をみつけた (図 1)。

内包選択的に白質虚血ラットモデルが作成できたことをMR(T2)にて確認した(図 2)。

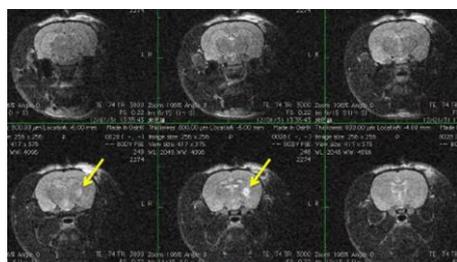


図 2

組織学的に、軸索・ミエリンの障害を確認した。APP 抗体により急性期の軸索障害を確認した (図 3)。



図 3

慢性期においては、同部には ED-1 抗体で陽性を示すミクログリアが集簇しており炎症所見を確認した (図 4)。

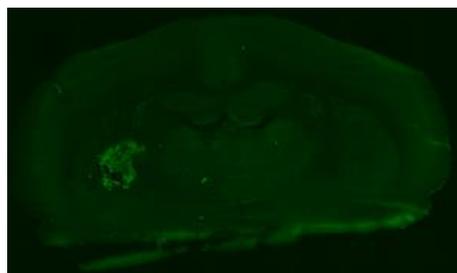


図 4

さらに、病態解析を目的に、質量顕微鏡法により、リン脂質の分子動態を網羅的解析し可視化できた (図 5)。

白質梗塞の炎症期のミクログリア集簇部位ではフォスファチジルコリン PC (16:0/20:4) 等のアラキドン酸 (AA) を含む PCs (AA-PCs) とリゾフォスファチジルコリン (LPCs) の上昇を認めた。虚血白質障害に関する多角的病態解析により新たな知見を得た。

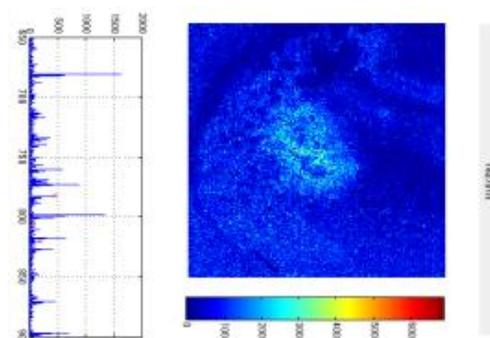
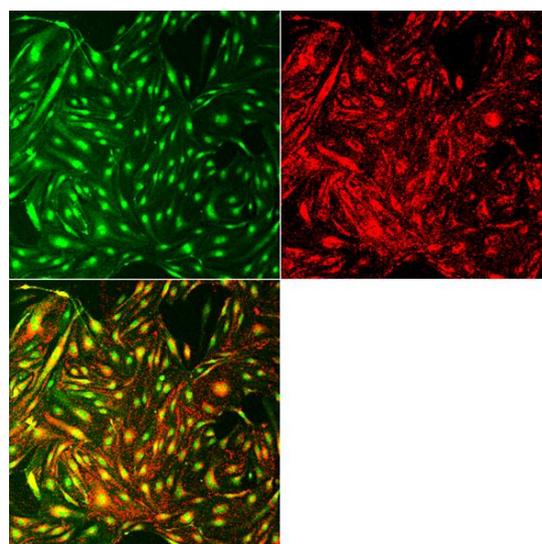


図 5

白質梗塞モデルにおいては、行動解析では明らかな運動麻痺等の症状は認めなかったが軽微は左右差が示唆された。

(2) 大脳白質障害に対する細胞移植による治療法の開発研究においては、まず移植細胞を選定した。血管内皮細胞を内包障害部位に移植することとした。GFP (green fluorescence protein) ラット大脳から微小血管およびその内皮細胞の分離をし、培養することに成功した (脳血管内皮細胞の初代培養系を確立した)。

GFP ラットからの移植細胞調整脳血管内皮細胞 : GFP ラット大脳から Percoll 密度勾配法によって微小血管およびその内皮細胞を分離し、得られたフラクションを Fetal bovine serum、Epidermal growth factor 存在下で培養すると形態組織学的に血管内皮細胞であることを確認した。(図 6)



(図 6)

これらの細胞を内包梗塞部位に定位的に移植して、経時的に白質障害を評価した。GFP

(緑) 標識血管内皮細胞が、内包障害部位に移植されていることが確認できた(移植細胞が生着していることを確認した)。(図7)

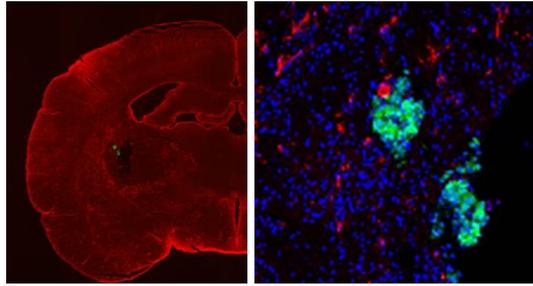


図7

白質障害治療効果の検証する再生の評価をおこない細胞移植治療による効果を確認した。移植細胞治療により白質(軸索)再生および脳機能障害の改善を評価した。神経所見では、麻痺症状の軽減を認め治療効果を示した。病理組織学的には、血管内皮細胞の細胞移植により、障害部位での生着が確認された(GFPにより宿主脳細胞と移植細胞が厳密に区別できた)。移植細胞により、梗塞部位に新たな血管構築をみとめ、宿主脳血管とのinteractionが示唆された。(図8)

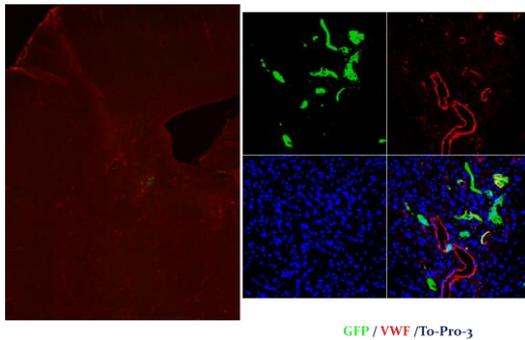


図8

ミエリンの再生も惹起されていることとマイクログリアの浸潤が抑制されていることが判明した(図9)。

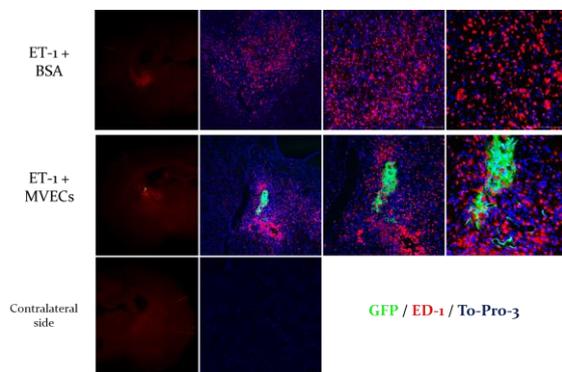


図9

以上のように病理組織学的な所見と神経所見と、麻痺症状の軽減を認め治療効果を示したことから、血管内皮細胞移植による(白質)新たな脳梗塞治療法の可能性を示した。

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20件)

①S Miyawaki, H Imai, S Takayanagi, A Mukasa, N Hirofumi, N Saito. Identification of a Genetic Variant Common to Moyamoya Disease and Intracranial Major Artery Stenosis/Occlusion. **Stroke** 2012 43(12):3371-4. 査読有 DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.663864

②H Ono, H Nakatomi, K Tsutsumi, T Inoue, A Teraoka, Y Yoshimoto, T Ide, C Kitanaka, K Ueki, H Imai, N Saito. Symptomatic recurrence of intracranial arterial dissections: follow-up study of 143 consecutive cases and pathological investigation. **Stroke**. 2013 44(1):126-31. 査読有 DOI: 10.1161/STROKEAHA.112.670745

③M Shimizu, H Imai, K Kagoshima, E Umezawa, T Shimizu, Y Yoshimoto. Detection of compression vessels in trigeminal neuralgia by surface rendering 3D reconstruction of 1.5-T and 3.0-T MR imaging. **World Neurosurg.** (in press) 査読有

④Y Fukushima, H Imai, M Yoshino, T Kin, M Takasago, K Saito, H Nakatomi, N Saito. Ptosis as Partial Oculomotor Nerve Palsy Due to Compression by Infundibular Dilatation of Posterior Communicating Artery, Visualized With Three-dimensional Computer Graphics. **Neurol Med Chir (Tokyo)** (in press) 査読有

⑤Y Chen, H Imai, A Ito, N Saito. Novel modified method for injection into the cerebrospinal fluid via the cerebellomedullary cistern in mice. **Acta Neurobiologiae Experimentalis** (in press) 査読有

⑥Puentes S, Kurachi M, Shibasaki K, Naruse M, Yoshimoto Y, Mikuni M, Imai H, Ishizaki Y. Brain microvascular endothelial cell transplantation ameliorates ischemic

white matter damage. **Brain Res.** 2012 21:1469:43-53. 査読有 DOI: 10.1016/j.brainres.2012.06.042

⑦Morito H, Nishimura T, Ando M, Kinoshita O, Hisagi M, Imai H, Iijima A, Motomura N, Kyo S, Ono Successful treatment of cerebral hemorrhage using computed tomography angiography in a patient with left-ventricular-assist device. **M. J Artif Organs.** 2012 15(1):90-3.

⑧Yamaguchi R, Hosaka M, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T. Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages. **Brain Res.** 2011 23:55-65. 査読有 DOI: 10.1016/j.brainres.2011.03.036

⑨Saito N, Imai H. Insights on the revascularization mechanism for treatment of Moyamoya disease based on the histopathologic concept of angiogenesis and arteriogenesis. **World Neurosurg.** 2011 75:204-5. 査読有 DOI:10.1016/j.wneu.2010.10.004

⑩K Kagoshima, H Imai, C Kubota, S Puentes, M Kurachi, Y Ishizaki, Y Yoshimoto, N Saito. Does hypoxic preconditioning induce angiogenesis and protect against focal cerebral ischemic damage in Rats? **Kitakanto Med J** 2011 ; 61 : 1 - 8 . 査読有

⑪Kubota C, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T. Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. **J Biol Chem.** 2010 285 :667-74. 査読有 DOI:10.1074/jbc.M109.053058

⑫宮脇 哲, 早坂 孝宏, 今井 英明, 小野 秀明, 堀川 弘史, 越智 崇, 伊藤 明博, 中富 浩文, 瀬藤 光利, 斉藤 延人. 一過性虚血ストレスに伴う海馬神経細胞の分子動態解析 質量顕微鏡法を用いた分子動態解析 (会議録) **脳循環代謝**(0915-9401)24 巻 1 号 Page219(2012.11) 査読有

⑬堀川 弘史, 今井 英明, 村田 知里, 小野 秀明, 宮脇 哲, 越智 崇, 伊藤 明博, 鳥居 征司, 斉藤 延人 虚血ストレス下における MKP-1 の発現上昇及び ERK の発現調節を介したその役割(会議録)**脳循環代謝**

(0915-9401)24 巻 1 号 Page217(2012.11) 査読有

⑭小野 秀明, 今井 英明, 宮脇 哲, 堀川 弘史, 越智 崇, 伊藤 明博, 宮田 茂雄, 倉知 正, 石崎 泰樹, 山形 弘隆, 三國 雅彦, 斉藤 延人. ラット選択的白質障害モデルにおけるストレス脆弱性の検討(会議録). **脳循環代謝**(0915-9401)24 巻 1 号 Page208(2012.11) 査読有

⑮金 太一, 吉野 正紀, 庄島 正明, 今井 英明, 中富 浩文, 小山 博史, 斉藤 延人 【イメージテクノロジーの進歩と脳卒中治療】 手術支援としてのニューロイメージング 高精細融合 3 次元画像を用いた脳血管障害手術 シミュレーションの構築手法の工夫と手術戦略上の利点(原著論文/特集). **The Mt. Fuji Workshop on CVD** (0289-8438)30 巻 Page104-108(2012.07) 査読有

⑯池村 雅子, 篠崎 綾, 今井 英明, 石井 一彦, 齊藤 邦昭, 武笠 晃丈, 斉藤 延人, 柴原 純二, 深山 正久. 脊髄に発生した glioneuronal tumor with neuropil-like islands の一例(会議録/症例報告) **Brain Tumor Pathology**(1433-7398)29 巻 Suppl. Page217(2012.05) 査読有

⑰宮脇 哲, 早坂 孝宏, 今井 英明, 堀川 弘史, 越智 崇, 伊藤 明博, 中富 浩文, 瀬藤 光利, 斉藤 延人 Sprague-Dawley (SD) ラット全脳虚血モデルの確立と応用(質量顕微鏡法による遅発性神経細胞死の網羅的解析)(会議録) **脳循環代謝**(0915-9401)23 巻 1 号 Page169(2011.11) 査読有

⑱堀川 弘史, 今井 英明, 陳 毅力, 宮脇 哲, 越智 崇, 伊藤 明博, 中富 浩文, 斉藤 延人 局所脳虚血モデルにおける MKP-1 mRNA の特異的かつ急峻な発現誘導(会議録) **脳循環代謝**(0915-9401)23 巻 1 号 Page147(2011.11) 査読有

⑲阿部 浩幸, 池村 雅子, 花北 俊也, 今井 英明, 五ノ井 渉, 萩原 良哉, 高澤 豊, 村山 繁雄, 深山 正久 死後画像が病態の理解に有用であった、脳室内出血により成人発症したもやもや病の 1 剖検例(会議録/症例報告) **日本病理学会会誌**(0300-9181)100 巻 2 号 Page40(2011.09) 査読有

⑳鳥居 征司, 久保田 知里, 今井 英明, 竹内 利行 細胞分化・細胞死 オートファゴソーム/リソソーム由来の恒常的 ROS 産生が酸化ストレス性神経細胞死に關与する(Cell

differentiation and death Implication of constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative cell death(英語)(会議録)

日本細胞生物学会大会講演要旨集 62回
Page127(2010.05) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

①S. Miyawaki, T. Hayasaka, H. Imai, H. Ono, H. Horikawa, T. Ochi A. Ito, H. Nakatomi, M. Setou, N. Saito
Molecular imaging of rat hippocampus after transit global ischemia using imaging mass spectrometry
NEUROSCIENCE 2012 2012.10 ニューオリン (アメリカ)

②H. Horikawa, H. Imai, C. Murata, H. Ono, S. Miyawaki, T. Ochi, A. Ito, H. Nakatomi, S. Torii, N. Saito
Revealing mechanisms of mitogen activated protein kinase phosphatase (MKP-1) under ischemic stress
NEUROSCIENCE 2012 2012.10 ニューオリンズ (アメリカ)

③H. Ono, H. Imai, T. Hayasaka, S. Miyawaki,
H. Horikawa, T. Ochi, A. Ito, M. Setou, N. Saito
Imaging mass spectrometry provides the comprehensive analysis of the dynamic change of phospholipids in selective white matter injury of the rat model
NEUROSCIENCE 2012 2012.10 ニューオリンズ (アメリカ)

④H. Imai, N. Saito. Focal cerebral ischemia models of both lissencephalic and gyrencephalic species
Brain 2011 (教育コース) 2011.5.25 バルセロナ(スペイン)

⑤H. Horikawa, H. Imai, Y. Chen, T. Ochi, A. Ito, H. Kanemitsu, H. Nakatomi, N. Saito.
MKP-1 mRNA and protein expression are induced after focal cerebral ischemia.
Brain 2011 2011.5.27 バルセロナ(スペイン)

⑥今井英明、久保田知里、富沢真一郎、越智崇、伊藤明博、中富浩文、斎藤延人
神経細胞におけるフリーラジカルの産生機序と虚血細胞障害の解明 (シンポジウム)

第 11 回日本分子脳神経外科学会 仙台
2010.8.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○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
今井英明 (IMAI HIDEAKI)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号 : 70359587

(2) 研究分担者
斎藤延人 (SAITO NOBUHITO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号 : 60262002

石崎泰樹 (ISHIZAKI YASUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 90183003

(3) 連携研究者
瀬藤 光利 (SETOU MITSUTOSHI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20302664

研究協力者
堀川弘吏 (東京大学・大学院生)
宮脇哲 (東京大学・大学院生)
小野秀明 (東京大学・大学院生)