

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 4 月 1 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 22 年度～平成 23 年度

課題番号：22790830

研究課題名（和文）脳梗塞時の虚血傷害部位に発現する laminin alpha1 の機能的意義の解明

研究課題名（英文）

Identification of the functional role of laminin alpha1 in ischemia.

研究代表者

富川 直樹 (Naoki Tomikawa)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80468587

研究成果の概要（和文）：脳虚血傷害時と再生過程における laminin alpha1 発現の重要性を解明することを目的に、マウス脳虚血モデルを作製し、解析を行った。脳虚血後の laminin alpha1 発現パターンを経時的に観察した結果、傷害後 24 時間より主に新生血管基底膜に発現が認められ、傷害の再生がおこる 7 日後においても持続的に新生した血管基底膜に発現が認められた。また、傷害部位において、ミクログリアの一部が laminin alpha1 を発現していることが明らかとなった。次に、脳虚血時における laminin alpha1 発現の重要性を直接的に検討するために、laminin alpha1 コンディショナルノックアウトマウスを作製した結果、顕著な行動学的異常が認められた。また、認められた行動学的異常は、小脳の形成不全によるものであることを明らかにした。大脳においては、野生型マウスと比較して顕著な差は認められなかった。これらの結果から、laminin alpha1 コンディショナルノックアウトマウスへの脳梗塞モデル作成が可能であることが明らかになった。

以上の結果から、脳梗塞傷害時と再生過程において、laminin alpha1 が血管の新生とミクログリアの集積に関与していることが明らかとなり、再生に向けたリモデリングに重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We hypothesis that the expression of laminin alpha1 is important for mouse brain ischemia and the regeneration. To prove the hypothesis, we made mouse ischemia model and immunostained the brain. Laminin alpha1 did not expression at 6 hour after ischemia and the mainly expression was started at 24 hour after ischemia in the basement membrane of neovessel. Moreover, the expression of laminin alpha1 was observed at 7 days after ischemia which was regeneration stage. Other hand, in the lesion of ischemia, a part of microgila expressed laminin alpha1. These results indicate that laminin alpha1 associates with newly form of brain vessels after brain injury. Next, to examine whether the expression of laminin alpha1 is important for brain injury after ischemia, we generated laminin alpha1 conditional knockout (Lama1 CKO) mouse. We observed the phenotype in Lama1 CKO mice. Lama1 CKO showed markedly behavioral abnormality and we clarified that the abnormality was caused by defect of cerebellum formation using immunohistochemistry, western blot, and slice culture method. On the other hand, the apparent abnormality was not detected in the cerebrum of Lama1 CKO mice compared with wild type mice. These results indicate that it is possible to carry out the operation of ischemia model to Lama1 CKO mice. Finally, as our result, laminin alpha1 associates with the angiogenesis and the accumulation of microglia in encephalopathy and regeneration after ischemia and it is suggested that laminin alpha1 is important for the brain tissue remodeling after ischemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000

平成 23 年度	1, 400, 000	420, 000	1, 820, 000
年度			
年度			
年度			
総 計	3, 000, 000	900, 000	3, 900, 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：神経分子病態学、脳梗塞、脳髄膜

1. 研究開始当初の背景

細胞外マトリックスの主要分子である laminin は、細胞遊走の促進、血管新生の誘導、神経突起伸長の促進等様々な機能を果たしている (Miner et al. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004)。申請者らは、laminin の神経細胞における機能メカニズムの解明を行ってきた (Ichikawa et al. J Cell Sci. 2009)。脳梗塞等による脳神経傷害時に、活性化したミクログリアから laminin を分解する酵素が分泌され、血管新生等の組織のリモデリングが行われているという報告がある (Gregory et al. Stroke. 2007)。また、神経傷害時において、laminin の受容体である integrin の発現が亢進し、再生過程に関与している可能性が示唆されている (Baker et al. Brain Res. 2007)。しかし、神経傷害時における laminin の機能については、よく分かっていない。

laminin のサブユニットである laminin alpha1 は、成体脳において、脳髄膜にのみ発現している分子である。申請者らは、虚血再還流を用いた脳梗塞モデルマウスにおいて、laminin alpha1 が脳梗塞巣の血管周囲に特異的に発現することを観察した。また、傷害野に起こる、これら laminin alpha1 陽性の血管新生の一部は、形態的に脳髄膜血管と連続性が観察された。

脳髄膜は、結合組織によって構成され、脳の保護、脳脊髄液の分泌や循環に機能している。脳梗塞時の虚血傷害において、脳髄膜の側副血行とその動脈新生が傷害野の規模と回復に関与していること (Ringelstein et al. Neurology. 1992)、側副血行の動脈新生には脳髄膜内のマクロファージ/ミクログリアが機能していること (Todo et al. 2008. Stroke) が報告されている。

しかしながら、これら脳梗塞時の傷害と再生過程における脳髄膜機能の分子機序については、よく分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、脳梗塞による神経傷害時と神経再生過程における laminin alpha1 の機能的意義を明らかにすることを目的としている。本研究の成果は、正常脳での神経新生や脳梗塞等の傷害時における神経機能改善に新たな知見を与えるものと考えられる。

3. 研究の方法

成体マウスに脳虚血モデルを作製し、虚血後各時間ごとにマウス脳を採取し、免疫染色法により laminin alpha1 の発現を観察した。laminin alpha1 を発現する細胞群を同定するために、神経、血管内皮、ミクログリア、グリア細胞のマーカー分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。次に、laminin alpha1 CKO マウスを作成し、組織化学染色やウェスタンブロット、切片培養といった解析により、laminin alpha1 CKO マウスの表現型を検討した。

4. 研究成果

免疫染色法により、脳虚血後の laminin alpha1 発現パターンを経時的に観察した結果、虚血傷害後 6 時間では発現が認められず、傷害後 24 時間より主に新生血管基底膜に発現が認められ、傷害の再生がおこる 7 日後においても持続的に新生した血管基底膜に発現が認められた。また、傷害部位において、ミクログリアの一部が laminin alpha1 を発現していることが明らかとなった。これらの結果から、傷害後におこる脳血管の新生に laminin alpha1 が関与していることが強く示唆された。次に、脳虚血時における laminin alpha1 発現の重要性を直接的に検討するために、laminin alpha1 コンディショナルノックアウトマウスを作製した。まず、コンディショナルノックアウトマウスの脳における表現型を検討した結果、顕著な行動学的異常が認められた。組織化学染色法やウェスタンブロット法、切片培養法により、認められた行動学的異常は、小脳の形成不全によるものであることを明らかにした。大脳においては、野生型マウスと比較して顕著な差は認められなかった。

これらの結果から、laminin alpha1 コンディショナルノックアウトマウスへの脳梗塞モデル作成が可能であることが明らかになった。

以上の結果から、脳梗塞傷害時と再生過程において、laminin alpha1が血管の新生とミクログリアの集積に関与していることが明らかとなり、再生に向けたリモデリングに重要であることが示唆された。

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 6 件)

1. Ichikawa-Tomikawa N, Ogawa J, Douet V, Xu Z, Kamikubo Y, Sakurai T, Kohsaka S, Chiba H, Hattori N, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E.
Laminin alpha1 is essential for mouse cerebellar development.
Matrix Biology. 2012. 31. 17-28
2. Ichikawa-Tomikawa N, Sugimoto K, Satohisa S, Nishiura K, Chiba H.
Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation.
Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011. 253048
3. Tabe Y, Jin L, Iwabuchi K, Wang R-Y, Ichikawa N, Miida T, Cortes J, Andreeff M, Konopleva M.
Role of stromal microenvironment in nonpharmacological resistance of CML to imatinib through Lyn/CXCR4 interactions in lipid rafts.
Leukemia. 2011. 291
4. Sakamoto Y, Ishijima M, Kaneko H, Kurebayashi N, Ichikawa N, Futami I, Kurosawa H, Arikawa-Hirasawa E.
Distinct mechanosensitive Ca²⁺ influx mechanisms in human primary synovial fibroblasts.
Journal of Orthopaedic Research. 2010. 7. 859-864.
5. Xu Z, Ichikawa N, Kosaki Y, Yamada Y, Sasaki T, Sakai LY, Kurosawa H, Hattori N, Arikawa-Hirasawa E.
Perlecan deficiency causes muscle hypertrophy, a decrease in myostatin expression, and changes in muscle fiber composition.
Matrix Biology. 2010. June 9.
6. Namba T, Yabe T, Gonda Y, Ichikawa N, Sanagi T, Arikawa-Hirasawa E, Mochizuki H, Kohsaka S, Uchino S.
Pigment epithelium-derived factor up-regulation induced by memantine, an N-methyl-d-aspartate receptor antagonist, is involved in increased proliferation of hippocampal progenitor cells.
Neuroscience. 2010. 167. 372-383.

[学会発表] (計 5 件)

1. Naoki Tomikawa, Tetsuharu Kaneko, Mizuko Tanaka, Hiroshi Hasegawa, Takashi Sugino, Hideki Chiba.
Liver X receptors express in oral cancer tissues and the agonist inhibits cellular growth of oral cancer cell lines.
第70回 日本癌学会学術総会、名古屋、10月5日、2011
2. Naoki Ichikawa-Tomikawa, Zhuo Xu, Yoshihiko Yamada, and Eri Arikawa-Hirasawa
Laminin alpha1 is essential for the formation of the mouse cerebellar meningeal basement membrane and for cerebellar development
第58回マトリックス研究会大会・第43回日本結合組織学会学術大会、大分、6月10日、2011
3. 富川—市川 直樹、杉野隆、田中端子、平澤恵理、千葉英樹
Laminin alpha1 はマウス小脳の発達に重要である
第100回 日本病理学会総会、横浜、4月29日、2011
4. Naoki Tomikawa-Ichikawa, Xu Zhou, Yoshihiko, Eri Arikawa-Hirasawa.
The role of laminin alpha1 in murine cerebellar development
第33回 日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、神戸、12月8日、2010
5. Naoki Ichikawa—Tomikawa, Xu Zhou, Yoshihiko, Eri Arikawa-Hirasawa
Deficiency of Lama1 causes behavioral abnormality and defects in cerebellar development in mice.
第57回マトリックス研究会大会・第42回日本結合組織学会学術大会、秋田、8月19日、2010

[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
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富川直樹（トミカワ ナオキ）
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：80468587

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：