

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791612

研究課題名（和文） 内在性神経幹細胞の虚血後急性期応答解析

研究課題名（英文） Activities of the neural stem cells after cerebral ischemia

研究代表者

立石 健祐（TATEISHI KENSUKE）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00512055

研究成果の概要（和文）：全脳虚血ラットモデルの作成並びに内在性神経幹細胞の虚血後急性期応答解析を行った。本研究では海馬CA1領域に焦点を絞り解析を行ったが、有意な神経細胞増殖を示すには至らなかった。成長因子投与量、投与期間などの実験手法によるものか、強い虚血負荷侵襲によるものか、更には現実的治療オプションとしての意義に欠けるものなのか、研究期間内での結論づけは困難であった。これらの疑問点解明のための研究継続が必要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： To assess endogenous neural stem cell activation after ischemia, we have focused on hippocampal pyramidal cells using global ischemia model. The delayed neuronal death was highly observed by permanent bilateral vertebral artery occlusion in addition to transient bilateral carotid artery occlusion. This model allows monitoring of regeneration, however, we could not confirm obvious regeneration after treatment. Further study is necessary to confirm whether this negative finding is reproducible phenomenon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：内因性神経幹細胞，虚血後応答，中枢神経

1. 研究開始当初の背景
成体脳においても自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞が存在することが、最近の研究で明らかになった。神経幹細胞はこれまで前脳室下帯 (anterior subventricular zone:aSVZ) と海馬歯状回の顆粒下層 (dentate gyrus subgranular zone:SGZ) に存

在することが分かっておりそれぞれ嗅球神経細胞及び海馬顆粒細胞の神経再生を司っている。これらの内在性神経幹細胞を用いて、変性脱落した神経細胞を再生させて機能再建を行う研究が注目されたが、神経幹細胞の存在が限局していることや、損傷部位への遊走能が不明であること、更には増殖能力の限

界、等を解決する必要があった。

2. 研究の目的

これらの研究動向を踏まえ、内在性神経幹細胞からの神経再生療法が脳の広範な領域でどの程度可能かを検討することを研究全体の構想とし、全脳虚血モデルを用いた海馬 CA1、線条体、視床の3領域に注目した。治療効果判定としては、各種の神経成長因子の投与を行い、これらの研究により、神経細胞再生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

全脳一過性虚血モデルを作成後、BrdU 投与とともに増殖細胞マーカーとの二重染色により虚血後増殖応答プロファイルを解析した。更に神経細胞死領域をターゲットとし EGF, FGF-2, IGF-1 など各種成長因子を投与することで内在性神経幹細胞の増殖応答を賦活し、神経細胞への分化再生に誘導につながるか検証を図った。内在性神経幹細胞の存在する海馬 CA1, 線条体, 視床領域に領域を限定した上での解析を行った。

(1) 実験モデル

雄性 Wistar ラット 8-10 週齢を用いて椎骨動脈の永久閉塞と総頸動脈の一過性閉塞を併用した 4 血管閉塞モデルを作成した。海馬の神経細胞死に関して線状体神経細胞死に関しては、9 分虚血にて背外側線状体において個体差なく 97% 程度の均一な神経細胞死が 48 時間で得られることが判明しており、このモデルを使用した。

(2) 急性期の内在性神経幹細胞の虚血応答
上記全脳虚血後に 48 時間の BrdU 腹腔内投与により増殖細胞の pulse labeling を行い、虚血後 14 日までの増殖応答プロファイルを解析した。また BrdU にて標識された細胞が真に増殖細胞であるか否かの検討のため、

増殖細胞マーカーとの 2 重染色を行った。

(3) 成長因子投与による内在性神経幹細胞の虚血後急性期応答

本実験では EGF, FGF-2, IGF-1 の併用療法から開始した。これらの成長因子は虚血に対して保護効果を有しているとされ、線状体の神経細胞死が完成する 48 時間後から 7 日間の投与を行った。

(4) 慢性期の神経再生の定量的評価

虚血後 6 週目に、パラフィン切片を作成して線状体での神経細胞数を計測した。

4. 研究成果

本研究において全脳一過性虚血モデルの作成に関して、海馬 CA1 領域においては安定したモデル作成が可能となった。一方で線条体・視床細胞死に関して、個体生存の観点から研究遂行は困難と判断された。その為海馬 CA1 を対象に解析を開始した。しかしながら有意な神経細胞増殖は本研究にて示すに至らなかった。成長因子投与量、投与期間などの実験手法によるものか、強い虚血負荷侵襲によるものか、更には現実的治療オプションとしての意義に欠けるものなのか、本研究期間内での結論づけは困難であった。

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 7 件)

- ① Tateishi K., Tateishi U, Nakanowatari S, Ohtake M, Minamimoto R, Suenaga J, Murata H, Kubota K, Inoue T, Kawahara N. ⁶²Cu-diacetyl bis (N4-methylthiosemicarbazone) PET in human gliomas: Comparative study with ¹⁸F-fluorodeoxyglucose and L-methyl-¹¹C-methionine PET. *AJNR Am J*

Neuroradiol, 2013 (Article in press; 査読有).

② Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, Miyakita Y, Ohno M, Collins VP, Kawahara N, Shibui S, Ichimura k. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss: Acta Neuropathol, 2013 (article in press ; 査読有)

③ Tateishi K, Tateishi U, Sato M, Yamanaka S, Kanno H, Murata H, Inoue T, Kawahara N. Application of ⁶²Cu-diacetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone) PET imaging to predict highly malignant tumor grades and hypoxia-inducible factor-1alpha expression in patients with gliomas: AJNR Am J Neuroradiol, 2013, 34, 92-9. (査読有).

④ Tateishi U, Tateishi K, Shizukuishi K, Shishikura A, Murata H, Inoue T, Kawahara N. 18F-Fluoride PET/CT allows detection of hyperostosis and osseous involvement in meningioma: initial experience. Clin Nucl Med, 2013, 38, e125-31. (査読有).

⑤ 立石健祐, 川原信隆. 3D手術顕微鏡を用いた脳神経外科手術教育. 脳神経外科速報, 2012, 22, 664-669. (査読無).

⑥ 立石健祐, 菅野洋, 川原信隆. 高齢者中枢神経系原発悪性リンパ腫の治療成績と課題. Geriatric Neurosurgery 2012, 24, 27-33. (査読無).

⑦ 立石健祐, 川原信隆. 3次元脳神経外科手術の展望. Brain Nursing, 2012, 12, 20-22. (査読無)

[学会発表] (計 19 件)

① 立石健祐, 末永潤, 中野渡智, 大竹誠, 池谷直樹, 村田英俊, 佐藤秀光, 立石宇貴秀, 川原信隆: Multi-tracer PET イメージングに基づく glioma 病態解析. 第 30 回日本脳腫瘍学会, グランドプリンスホテル広島 (広島県), 2012, 11. 26

② 立石健祐, 立石宇貴秀, 大竹誠, 池谷直樹, 中野渡智, 井上登美夫, 川原信隆: 複数の分子イメージングを併用した glioma 治療戦略. 第 71 回日本脳神経外科学会学術総会 (シンポジウム), 大阪国際会議場 (大阪府), 2012, 10. 18

③ 立石健祐, 立石宇貴秀, 中野渡智, 大竹誠, 池谷直樹, 井上登美夫, 川原信隆: 分子イメージングを用いた glioma 治療戦略. 第 17 回日本脳腫瘍の外科学会 (シンポジウム), ホテルニューグランド (神奈川県), 2012. 9. 8

④ 立石健祐, 川原信隆: 脳神経外科領域における 3D 映像システムの検証. 第 17 回日本脳腫瘍の外科学会 (イブニングセミナー), ホテルニューグランド (神奈川県), 2012, 9. 7

⑤ Tateishi K, Tateishi U, Nakanowatari S, Suenaga J, Murata H, Kawahara N: Application of ⁶²Cu-ATSM PET imaging to predict highly malignant grades and hypoxia-inducible factor-1α expression in patients with glioma. The 27th Japan Neurosurgical English Forum, 石川県立音楽堂 (石川県), 2012, 7. 27

⑥ 立石健祐, 日暮雅一, 末永潤, 佐藤充, 高

- 瀬創, 善積哲也, 中野渡智, 村田英俊, 横山高玲, 川原信隆: Posterior transpetrosal approach を用いた頭蓋底腫瘍の手術症例検討. 第24回日本頭蓋底外科学会, 東京ドームホテル (東京都), 2012, 7. 11
- ⑦ 立石健祐, 佐藤充, 大竹誠, 池谷直樹, 善積哲也, 末永潤, 川原信隆: 脳神経外科手術教育を目的とした3次元手術顕微鏡の術中応用. 第12回日本術中画像情報学会 (シンポジウム), つくば国際会議場 (茨城県), 2012, 7. 7
- ⑧ 立石健祐, 佐藤充, 末永潤, 菅野洋, 川原信隆: Grade II glioma に対する MET-PET の意義. 第21回脳神経外科手術と機器学会, ホテル阪急インターナショナル (大阪府), 2012, 3. 30
- ⑨ 立石健祐, 菅野洋, 水本斉志, 坪井康次, 宮武伸一, 川原信隆: 症候性脳放射線壊死に対し第3項先進医療による Bevacizumab 治療を施行した一例. 第23回神奈川脳腫瘍フォーラム, ホテルプラム (神奈川県), 2012, 3. 2
- ⑩ 立石健祐, 佐藤充, 末永潤, 菅野洋, 川原信隆: Grade II glioma に対する MET-PET の意義. 第35回日本脳神経 CI 学会総会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2012, 3. 3
- ⑪ 立石健祐, 中野渡智, 山田幸子, 菅野洋, 立石宇貴秀, 井上登美夫, 川原信隆: ^{62}Cu -ATSM PET を用いた glioma 低酸素イメージング. 第29回日本脳腫瘍学会, 下呂温泉水明館 (岐阜県), 2011, 11. 27
- ⑫ 立石健祐, 川原信隆: ここまで進歩した-最新の脳神経外科手術-. 横浜市立大学市民医療講座, 横浜情報文化センター (神奈川県), 2011, 11, 10
- ⑬ Tateishi K, Yamada S, Kanno H, Yamanaka S, Inayama Y, Kawahara N: Histopathological characteristics of high grade glioma by methionine cut off value. The 15th Internal Symposium of Brain Edema and Cellular Injury, 日本大学会館 (東京都) 2011, 10. 22,
- ⑭ 立石健祐, 中野渡智, 山田幸子, 菅野洋, 立石宇貴秀, 井上登美夫, 川原信隆: ^{62}Cu -ATSM PET を用いた glioma 低酸素イメージング. 第70回日本脳神経外科学会総会 (シンポジウム), パシフィコ横浜 (神奈川県), 2011, 10. 12
- ⑮ 立石健祐, 川原信隆: Glioma 治療の evidence と当施設での試み. Expert Meeting, ロイヤルパークホテル (神奈川県), 2011, 9. 30
- ⑯ 立石健祐, 佐藤充, 川原信隆: 脳腫瘍外科領域における3次元手術顕微鏡システムの活用と課題. 第17回日本脳腫瘍の外科学会, パシフィコ横浜 (神奈川県) 2011, 9. 10
- ⑰ 立石健祐, 山田幸子, 佐藤充, 菅野洋, 山中正二, 稲山嘉明, 川原信隆: カットオフ値に基づくメチオニン PET 情報を活用した悪性グリオーマの治療戦略と病理学的特徴. 第17回日本脳腫瘍の外科学会 (シンポジウム), パシフィコ横浜 (神奈川県), 2011. 9. 10
- ⑱ 立石健祐, 佐藤充, 上野龍, 中村大志, 高瀬創, 川原信隆: Multimodality MRI 誘導ナビゲーションシステムを用いた脳腫瘍生検術の初期経験. 第20回脳神経外科手術と機器学会 CNTT, あわぎんホール (徳島県), 2011, 4. 8
- ⑲ 立石健祐, 佐藤充, 山田幸子, 中村大志, 上野龍, 園田真樹, 善積哲也, 高瀬創, 日暮雅一, 村田英俊, 横山高玲, 菅野洋, 川原信隆: グリオーマ手術における治療成

績向上を目的とした多角的アプローチ.
第 5 回神奈川脳神経外科集談会, 崎陽軒
(神奈川県) , 2011, 2. 19

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石 健祐 (TATEISHI KENSUKE)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号 : 00512055

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :