

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791516

研究課題名(和文) 内在性神経幹細胞を利用した脳静脈虚血治療の研究

研究課題名(英文) basic research for cerebral venous ischemia and endogenous neural stem cell

研究代表者

竹島 靖浩 (Yasuhiro, Takeshima)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：60510203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳静脈虚血のラット実験モデルを利用して、脳皮質静脈閉塞における局所の内在性神経幹細胞の発現を調べて神経幹細胞をこの脳静脈虚血分野への応用・展開するための研究基盤を確立する事を目的として研究をおこなった。その結果、脳静脈虚血における局所神経幹細胞の発現が初めて確認され、脳局所血流動態を詳細に把握することができた。

研究成果の概要(英文)：Cerebral venous ischemia is a rare but potentially significant complication of neurosurgical procedures. However it is still unclear how cerebral venous occlusion affects regional endogenous neural stem cell and cerebral blood flow dynamics. To elucidate its pathophysiology in detail, we examined this study. Two cortical veins were occluded photochemically using rose Bengal dye in male Wistar rats. Histopathological examination of the anti-Nestin antibody was performed. In addition, regional cerebral blood flow was measured in real time with a laser speckle contrast imaging before and after venous occlusion. Immunohistochemical examination showed the expression of anti-Nestin antibody positive cells around the ischemic core. Laser speckle contrast imaging revealed a stepwise reduction in cerebral blood flow with significant differences. These results suggest that the endogenous neural stem cells may affect the trend of regional ischemic tissue during cerebral venous occlusions.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳血管障害 脳静脈虚血 神経幹細胞 脳血流動態

1. 研究開始当初の背景

1) 脳虚血と脳静脈虚血

脳虚血は主要な疾患群であり、一般的にその病態により動脈虚血と静脈虚血に分類される。脳静脈虚血は近年の高齢者手術症例の増加や頭蓋底外科技術の発達により注目されてきており、我々のグループではこれまで、この脳静脈環流障害の基礎的研究を進めてきた。

脳虚血治療では虚血性神経細胞死を抑えることのみならず、損傷した神経細胞のネットワークを回復・再構築することが機能的予後を改善させることも大切である。急性期治療の可能性追求と同等にこの慢性期の神経の回復・再生等の研究も望まれている。

2) 脳静脈虚血の特徴

脳静脈虚血は、比較的軽度の虚血が長時間持続することで緩徐に進行することを特徴とする。急速完成する動脈虚血と異なり、緩徐な虚血がゆえに虚血巣や周辺組織にはその際に様々な修飾が加えられている可能性がある。また、臨床では長期の経過で虚血症状に改善が見られることもあり、これらの病態解明に新しい治療開発の可能性があると考えられる。

3) 脳虚血研究における stem cell

近年、各医学研究の分野で神経幹細胞が注目され、神経医学研究の分野でも発展してきている。幹細胞は種々の栄養因子や血管内皮細胞増殖因子などを分泌することで神経の再生や可塑性を促す。幹細胞の移植を中心に基礎研究・臨床研究がすすめられるようになってきたが、基礎研究と臨床研究結果との乖離示唆する報も見受けられ、まだまだ発展途上である。また、神経幹細胞移植以外に、内在性神経幹細胞を用いた脳虚血研究も行われている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳静脈虚血の動物実験モデルを利用して、脳静脈虚血における局所の神経幹細胞の発現を調べ、神経幹細胞をこの脳静脈虚血分野への応用・展開するための研究基盤を確立する事である。

3. 研究の方法

以下に記載する2つの研究を行った。

(1) 脳静脈虚血における局所の内在性神経幹細胞の発現を調べるため以下の実験を施行した。

Wister ラットを脳静脈虚血群・コントロール群の2群に分けた。脳静脈虚血は以下の方法で施行した。抱水クロラル腹腔内投与で麻酔し、静脈・動脈ラインを確保した。腹臥位として頭部をフレームに固定し、左頭頂部を開頭(8x16mm)した。ローズベンガル色素の静脈内投与と緑色光を用いた光凝固法で2本の隣接する脳表静脈を閉塞された。コントロール群では開頭のみを行った。

静脈閉塞の1・3・7日後に還流固定を行って大脳を摘出し、5 μ mの厚さで切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色と神経幹細胞マーカーである抗 Nestin 抗体の免疫染色を行った。

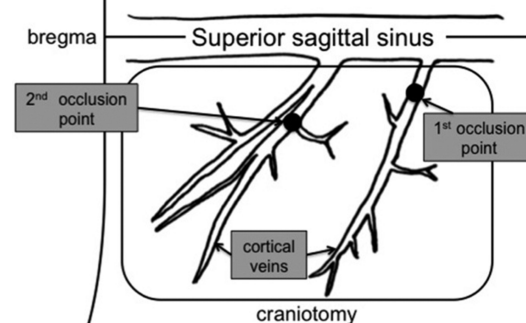


図1. 脳皮質静脈閉塞モデル

(2) 神経幹細胞を脳静脈虚血分野へ応用・展開するための基盤研究として、脳皮質静脈閉塞時における局所の脳血流動態の変化につ

いての研究をおこなった。

雄ウイスターラットの隣接した 2 本の脳皮質静脈を、前述の手法に従い、ローズベンガル色素と緑色光を用いた光凝固法により順に閉塞させた。静脈閉塞の直前から二本目の静脈閉塞 30 分後まで 10 分間隔でレーザースペックル血流画像装置 (full-field laser perfusion imager) を用いて開頭野の局所脳血流を非侵襲的に観察した。

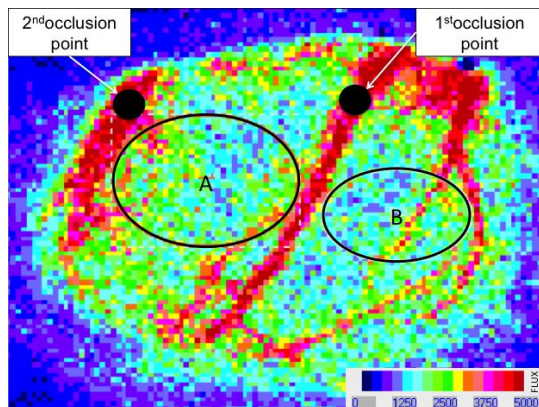


図 2. レーザースペックル血流画像装置を用いた開頭野の観察

得られた画像において、2本の静脈間(A)と1本目の閉塞静脈の近傍(B)の二カ所に関心領域を設定し脳血流の経時的变化を測定した。また、静脈閉塞3日後に灌流固定を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色にて脳梗塞の有無を評価した。

4. 研究成果

(1) 脳静脈虚血における局所内在性神経幹細胞発現の研究

ヘマトキシリン・エオジン染色にて全例で脳皮質に局限した脳静脈梗塞が確認された。抗 Nestin 抗体の免疫染色では、脳静脈虚血群において虚血巣周辺に免疫染色陽性細胞の発現が見られた。頻度は低下するものの閉塞を来した大脳半球全体に及ぶ発現も見られ、脳静脈虚血に特異的な結果と推測された。

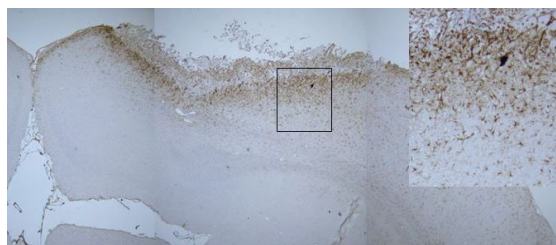


図 3. 抗 Nestin 抗体免疫染色

(2) 脳皮質静脈閉塞における局所脳血流動態変化についての研究

局所脳血流動態の評価では、それぞれの関心領域における脳血流変化(閉塞直前の脳血流を1とし相対変化を調べた)を図4に記した。関心領域A(2本の静脈間)・B(1本目の閉塞静脈の近傍)ともに脳血流が1本目の静脈閉塞により約20%強低下した。2つ目の静脈閉塞によって関心領域A(2本の静脈間)では約50%減少したが、関心領域B(1本目の閉塞静脈の近傍)では更なる低下は認められなかった。2本の皮質静脈間の脳血流は静脈閉塞毎に段階的に血流が低下した。

局所脳血流動態は関心領域A(2本の静脈間)と関心領域B(1本目の閉塞静脈の近傍)間で統計学的有意差を認めた($P < 0.05$)。

すべてのラットで脳皮質領域に広がる静脈梗塞がHE染色により確認された。

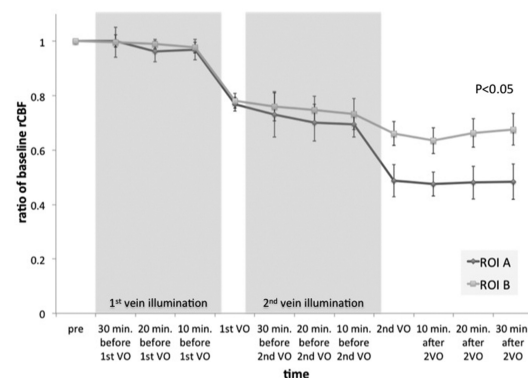


図 4. レーザースペックル血流画像装置で観察した脳皮質静脈閉塞時の局所脳血流の経時的变化

これらの結果から、脳静脈虚血における局所神経幹細胞の発現が初めて確認されたが、そ

の時間的・空間的分布など、まだまだ不明な点も残されている。詳細な脳血流の血行動態の変化もふまえて、脳静脈虚血と内在性神経幹細胞発現誘導との関連性等、更なる検討が望まれる。

研究者番号：60510203

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

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1件)

Miyake H, Nakagawa I, Takehima Y, Nishimura F, Park YS, Nakamura M, Nakase H. Post-ischemic administration of vascular endothelial growth factor inhibitor in a rat model of cerebral venous infarction. Neurol Med Chir (Tokyo) 53(3):135-40, 2013.

〔学会発表〕(計1件)

竹島靖浩、三宅 仁、中川一郎、中瀬裕之：
ラット脳静脈も出るにおける局所脳血流動態の評価。Stroke2015, 2015.3.27, 広島

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹島靖浩 (YASUHIRO TAKESHIMA)

奈良県立医科大学・医学部・助教