

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461649

研究課題名(和文) 新生児虚血脳に対するbFGFおよびEGFによる神経再生治療

研究課題名(英文) Neuronal replacement therapy for neonatal hypoxic ischemic brain injury by exogenous bFGF and EGF administration

研究代表者

岩井 正憲 (Iwai, Masanori)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80467993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：日齢7の仔ラットに作成した新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルを用いて、HI後3日にEGFとbFGFを脳虚血障害部位皮質及び線条体に注入(治療群)、HI後4-6日にBrdUを腹腔内投与し、HI後7、14、28日の脳切片を、BrdU、DCX、NeuNの各抗体を用いて組織学的に解析した。HI後7日の脳虚血傷害側SVZ背側および腹側におけるBrdU陽性細胞数は、生食投与群、無治療群に比べ有意に増加した。これらの細胞の大部分はDCXを発現、HI後14、28日での治療群SVZでDCX陽性細胞数の増加を認めたが、皮質及び線条体でのBrdU + NeuNの2重陽性細胞の増加は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：HI brain injury was induced in 7-days-old rat pups. Naive animals served as controls. EGF and bFGF were injected into the striatum and the cerebral cortex of the ischemic hemisphere at 3 days after HI. BrdU was injected intraperitoneally between 4 and 6 days after HI. Brains were removed and stored for immunohistological study. Cell proliferation was investigated by BrdU staining. Neural progenitor cells and matured neural cells were visualized with anti-DCX and anti-NeuN immunostaining using a microscope or confocal microscope, respectively. In the ischemic hemisphere at 7 days after HI, administration of EGF and bFGF combined significantly increased the number of BrdU positive cells in the SVZ compared to that in vehicle and naive controls, respectively. In the ischemic hemisphere with administration of EGF and bFGF, most BrdU positive cells were double positive for DCX. However, there is no significant change the number of BrdU+NeuN double positive cells among these three groups.

研究分野：新生児医学

キーワード：新生児低酸素性虚血性脳症 内在性神経幹細胞 EGF bFGF 脳虚血障害部位内投与 神経再生治療

### 1. 研究開始当初の背景

新生児低酸素性虚血性脳症は、出生 1,000 人に対し 2~4 人の頻度で発生すると報告されている。同症に対しては 2006 年に新生児低体温療法の効果が報告され、現在では本邦の新生児集中治療室においても広く普及している。新生児低体温療法は新生児低酸素性虚血性脳症の中等症に効果があるとされ、重症例においての効果は限定的あるいは効果なしと報告されている。また、新生児低酸素性虚血性脳症の中で分娩時に発症し、重症新生児仮死の蘇生後に発症するものは 10~20%程度で、分娩前の子宮内で発症するものが多いとされる。

新生児低体温療法は、虚血低酸素侵襲から回復しつつある脳の中で、虚血再灌流による過酸化ストレス、興奮性傷害、炎症、濃音上昇などに起因する遅発性神経細胞死に至る一連の反応を抑制することで効果を発揮する。その作用は脳保護であり、強い虚血低酸素による脳細胞壊死や、遅発性神経細胞死への反応が進んでしまった場合には効果がなし。したがって、脳保護的な低体温療法の効果を補完する、神経再生治療が必要となってくる。

仔ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルにおいて、側脳室壁に位置する脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) に存在する内在性神経幹細胞は、虚血侵襲後一過性に増殖し、産生された新生神経前駆細胞は脳虚血傷害部位に遊走し、組織修復的に働くことが示されている。しかし、この反応は不十分で、成熟神経細胞への分化、生着には至らない。エリスロポエチンの投与により、SVZ における神経幹/前駆細胞の増殖や、新生神経前駆細胞の脳虚血傷害部位への遊走は賦活され、少数ではあるが成熟神経細胞への分化が確認されている。

以上のように新生児低酸素性虚血性脳症に対する神経再生治療には内在性神経幹細胞の増殖賦活が重要と考えられる。前研究において、仔ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルの作成後 3~4 日の虚血傷害側 SVZ、大脳皮質、線条体には、強い増殖力を持った神経幹/前駆細胞が存在していることを示した。これらの神経幹/前駆細胞の増殖を更に賦活する方法を開発することが、神経再生治療に結びつくと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、仔ラット低酸素性虚血性脳症モデルに対し、神経幹細胞の培養増殖に用いられる神経栄養因子である basic fibroblast growth factor (bFGF)、および epidermal growth factor (EGF) を虚血性脳傷害部位に投与することで、subventricular zone (SVZ) 及び虚血性脳障害部位の内在性神経幹細胞を賦活させ、神経組織修復に及ぼす影響について検討し、同療法が新生児低酸素性虚血性脳症の治療に応用できる可能性について検

証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

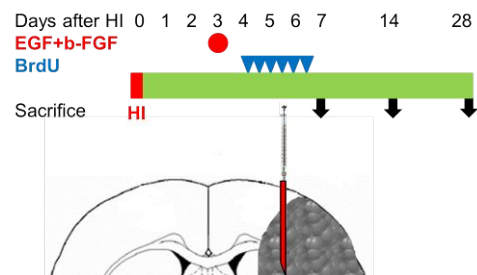
本研究では、仔ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルとして確立し汎用されている Levine 変法モデルを使用した。

日齢 7 の仔ラットに対し、1.5% イソフルランを用いた吸入麻酔導入し左総頸動脈を結紮離断、覚醒後母ラットの元に 1~2 時間戻し休息させた後で、37 °C の環境下で 8% O<sub>2</sub> の低酸素負荷を 2 時間行い、低酸素性虚血性脳症を作成した。

低酸素性虚血性脳症作成後 3 日に、1.5% イソフルランを用いた吸入麻酔導入し、左頭頂部に長さ 5mm の皮膚切開を加え、頭蓋骨を露出させた。日齢 10 の仔ラットの頭蓋骨は薄く、脳表面の色調の変化から、正常な部位と脳虚血傷害部位を区別できるため、定位脳手術で Bregma から 0.5mm 後方で、色調変化部位から 2mm 外側の頭蓋骨に径 1mm の burr hole を開け、30G 針を装着したハミルトンシリンジを用いて、脳表から深さ 5mm の線条体と、3mm の大脳皮質に EGF と bFGF 各 5µg/kg を 5 分間かけて注入した (治療群)。同様の手順でリン酸緩衝液を同容量注入したものを対照群とした。また全く手を加えずに成長させた同日齢のものを naive 群とした。切開、注入を行ったラットについては、注入終了後皮膚を生体接着剤で接着させた。

低酸素性虚血性脳症作成後 4-6 日に、1 日 2 回 12 時間間隔で bromodeoxyuridine (BrdU) 50mg/kg/dose を腹腔内投与した。

低酸素性虚血性脳症作成後 7 日、14 日、28 日にそれぞれジエチルエーテル深麻酔下に生理食塩水、次いで 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定した後で脳を採取した。脱水処理後、ミクロトームにて 20µm 及び 60µm の冠状断切片を作成し、保存液に浸し -30 °C で組織学的解析を行うまで保存した。



新生児低酸素性虚血性脳症作成後 7 日に作成した脳切片を用いて、抗 BrdU 抗体を用いて細胞増殖の評価を行った。フリーフローティング法を用いて、20µm の切片を 2N の HCl で 30 分間、37 °C、その後 0.1N の Boric acid (pH 8.5) で 10 分間処理後、抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学法で可視化した。線条体レベルの切片について、光学顕微鏡を用いて

SVZの単位長さ当り、線条体、大脳皮質については単位面積当たりのBrdU陽性細胞数を計測した。

次に、新生児低酸素虚血性脳症作成後7日に作成した脳切片を用いて、BrdUとDCXの蛍光2重染色を行い、増殖により新生した細胞について、神経前駆細胞の性質を備えるかの確認を行った。60μmの切片についてBrdU染色を行うための前処理を行った後、抗BrdU抗体、抗DCX抗体を用いた蛍光2重染色法を行って可視化した。切片はオリンパス製共焦点レーザー顕微鏡でSVZを撮影して評価した。

続いて、新生児低酸素性虚血性脳症作成後7日、14日、28日の脳切片に対し、抗DCX抗体を用いた免疫組織化学法にて可視化し、SVZ、大脳皮質、線条体における神経前駆細胞の動態について評価した。

更に、新生児低酸素性虚血性脳症作成後28日の脳切片に対し、BrdUとNeuNの蛍光2重染色を行い、増殖により新生した細胞について、成熟神経細胞に分化しているが確認を行った。60μmの切片についてBrdU染色を行うための前処理を行った後、抗BrdU抗体、抗NeuN抗体を用いた蛍光2重染色法を行って可視化した。切片はオリンパス製共焦点レーザー顕微鏡で大脳皮質、線条体を撮影して評価した。

また、低酸素性虚血性脳症作成後14日と28日のラットについて、脳採取直前に1inchのグリッドを用いたfoot fault testを行って、運動機能を評価した。

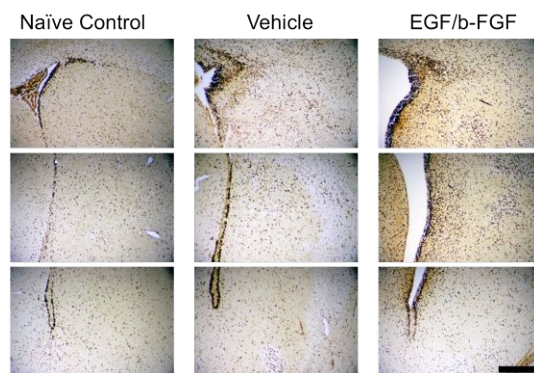
統計学的処理は、ANOVAを用い、post hoc testとしてFisher's probable least-squares difference testを用いた。

#### 4. 研究成果

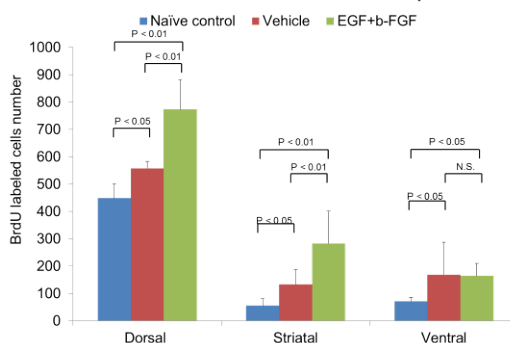
過去の文献を参考に、EGF及びbFGFの投与量を10μg/kgに設定した。新生児低酸素性虚血性脳症作成後3日にEGFとbFGFを虚血脳障害部位に直接注入した治療群と、リン酸緩衝液を投与した対照群の間で、同7日後に得られた脳切片での脳虚血傷害部位の大きさに有意差はなかった。EGF及びbFGFについては低酸素虚血負荷直前あるいは直後に脳室内投与した先行研究では、脳虚血傷害部位の縮小効果が認められたが、低酸素虚血負荷3日後での投与では、その効果は認められなかった。

新生児低酸素性虚血性脳症モデルでは、低酸素虚血負荷後7日の脳虚血傷害側SVZにおけるBrdU陽性細胞数は、同日齢の正常脳に比べて、有意に増加した。EGFとbFGFの脳虚血障害部位への注入を行った治療群における脳虚血傷害側SVZでのBrdU陽性細胞数は、SVZの背側及び線条体側で有意に増加した。治療群、対照群、正常群におけるBrdU陽性細胞数は脳虚血傷害側SVZ背側でそれぞれ774 ± 108、558 ± 8、449 ± 53であり、SVZ線条体側でそれぞれ283 ± 119、133

± 5、56 ± 25であった。



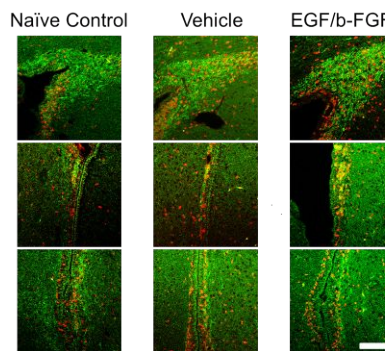
The number of BrdU labeled cells in the SVZ of the ischemic hemisphere



脳虚血傷害側SVZに認められた、EGFとbFGFの細胞増殖促進効果は、低酸素のみの対側SVZや正常脳のSVZには認められなかった。

低酸素虚血性脳症作成後7日の脳虚血傷害側SVZにおけるBrdUとDCXの蛍光2重染色の結果から、正常脳、対照群、治療群ともにSVZにおいてBrdUとDCXの2重陽性細胞を認めたが、正常群 < 対照群 < 治療群の順で、BrdU陽性細胞に対するDCXの2重染色性は強くなっていた。

Immunostaining of BrdU and DCX in the SVZ of ipsilateral hemisphere at 7 DAHI

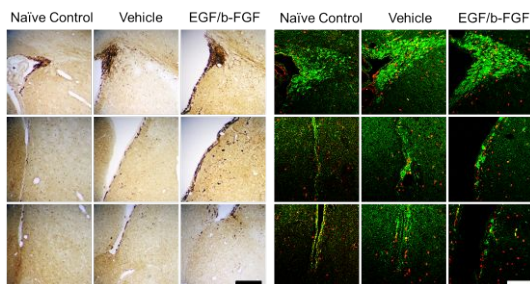


また、新生児低酸素性虚血性脳症作成後14日、28日の脳切片について、抗DCX抗体を用いて行った免疫組織化学法の結果から、新生児低酸素性虚血性脳症作成後14日での、脳虚血傷害側SVZでのDCX染色性は、正常



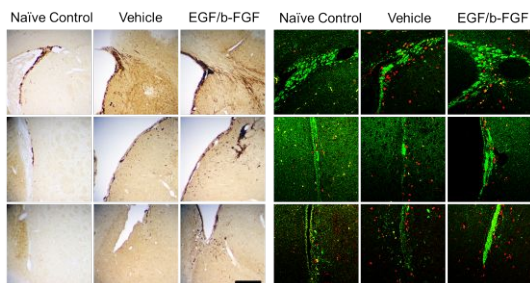
群 < 対照群 < 治療群の順に強かった。また、対照群でも認められた、脳虚血傷害側線条体での DCX 陽性細胞は、治療群においてより多く観察された。しかしながら、大脳皮質では差が認められなかった。

Immunostaining of DCX, DCX and BrdU in the SVZ of ipsilateral hemisphere at 14 DAHI



新生児低酸素性虚血性脳症作成後 14 日で見られた、脳虚血傷害側 SVZ 及び線条体における変化は、新生児低酸素性虚血性脳症作成後 28 日でも認められた。

Immunostaining of DCX, DCX and BrdU in the SVZ of ipsilateral hemisphere at 28 DAHI



新生児低酸素性虚血性脳症作成後 28 日で行った BrdU と NeuN の 2 重染色では、対照群の脳虚血傷害側線条体に極少数の BrdU+NeuN の 2 重陽性細胞を認めたが、治療群と対照群に明らかな有意差は認められなかった。

また、新生児低酸素性虚血性脳症作成後 28 日で行った Foot fault test の結果においても、治療群と対照群では、総歩数及び fault rate に有意な差を認めなかった。

今回の研究により、新生児低酸素性虚血性脳症モデルに対する、低酸素虚血後 3 日に脳虚血傷害部位に直接注入した EGF と bFGF は、脳虚血傷害側の SVZ において、低酸素虚血後 7 日で有意に細胞増殖を促進し、同部の神経前駆細胞増加は、低酸素虚血後 14 日及び 28 日まで認められ、神経前駆細胞の増殖刺激は遷延すると考えられた。一方、BrdU と NeuN の 2 重陽性細胞については増加傾向を示さなかったこと、Foot fault test でも有意差を認めなかったことから、成熟神経細胞への分化促進には働かないと考えられた。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1) Masanori Iwai, Ken Momosaki, Hiroko Mori, Jun Kido, Hidetaka Yoshimatsu, Kenichi Tanaka, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo.

EGF and bFGF combined strongly enhanced neurogenesis in the ischemic subventricular zone of the neonatal hypoxic ischemic brain injury in rat.

〔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:なし。

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 正憲 (IWAI MASANORI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80467993

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: