

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860730

研究課題名(和文)リンパ球Sema4D分子標的による神経再生療法の検討

研究課題名(英文)Possibility of anti-Semaphorin 4D antibody for the neuro regenerative therapy in experimental cerebral infarction

研究代表者

田片 将士(TAKATA, MASASHI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60617984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：虚血性脳血管障害後の炎症反応は神経細胞障害を増強させるとともに神経再生機転を亢進させる。本研究では梗塞面積が一定であるマウス脳梗塞モデルを作成するとともにSema4D抗体を用いたリンパ球上のSema4Dを抑制することで脳梗塞後神経障害や内因性神経再生にどのような影響を及ぼすか検討した。マウス脳梗塞モデルへ抗Sema4D抗体を投与すると、脳梗塞面積縮小化、梗塞巣の神経幹細胞増加、神経幹細胞マーカー発現の増加、行動学テストの改善がみられた。そのためSema4D抗体は脳梗塞の内因性神経再生療法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The inflammation induced by cerebral ischemia exacerbates neuronal damage, and enhances neuro reparative mechanisms. In this study, by using a highly reproducible murine model of experimental stroke, we examined the effect of endogeneous neurogenesis and neuronal damage after cerebral infarction by suppressing Semaphorin4D on the lymphocyte using anti-Semaphorin4D antibody. Administration of anti-Semaphorin4D antibody into poststroke mice reduced the size of infarcted area, increased the number of neural stem cells and the expression of neural stem cell marker, and improved their behavior. Our findings demonstrated anti-Semaphorin4D antibody may be useful as a novel endogenous regenerative therapy in stroke treatment.

研究分野：神経再生

キーワード：抗Sema4D抗体 神経幹細胞 脳梗塞 内因性神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

日本社会の急激な高齢化に伴い脳梗塞は年々増加しており、その後遺症による QOL の低下が社会問題となっている。しかし、脳梗塞の治療法は未だに確立されていないのが現状である。近年、脳梗塞の病態に免疫、炎症機構が関与しているという多くの報告が散見される。虚血性脳血管障害後に生じる脳の炎症反応 (post-stroke inflammation) は神経細胞障害の増強と神経再生機転の亢進という二面性をもっており、特に我々は脳梗塞後に誘導される傷害誘導性神経幹細胞 (induced-Neural Stem/Progenitor cell: iNSPC) に着目し免疫機構との関連についての研究を行ってきた。脳梗塞後の神経再生には CD4 陽性 T 細胞が負に関与し、さらに GITR 刺激による活性化 T 細胞による Fas-FasL を介した細胞死が内因性神経再生機構を抑制するというを以前報告している。Sema4D は class4 の膜型セマフォリン分子で、主に T 細胞に高発現し、その受容体である B 細胞や樹状細胞上の CD72 あるいは CNS のミクログリアに存在する plexin-B1 を介して Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) などの炎症性神経疾患発症に関与すると報告されているものの、中枢神経における内因性神経再生との関係に関しては検討されていない。本研究ではリンパ球上に発現している Sema4D を標的として Sema4D のコントロールによる神経再生機構の制御が虚血性脳障害の治療に有用かどうかを判定することを目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では中大脳動脈を凝固焼灼することで脳梗塞の大きさや程度が一定で再現性に優れたマウス脳梗塞モデルと、その虚血脳梗塞部位より抽出した傷害誘導性神経幹細胞の培養システムを用い、リンパ球上に発現している Sema4D の抑制が脳梗塞と内因性神経再生に及ぼす影響を及ぼすか検討することで Sema4D を標的とした虚血性脳傷害に対する内因性神経再生療法の開発につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

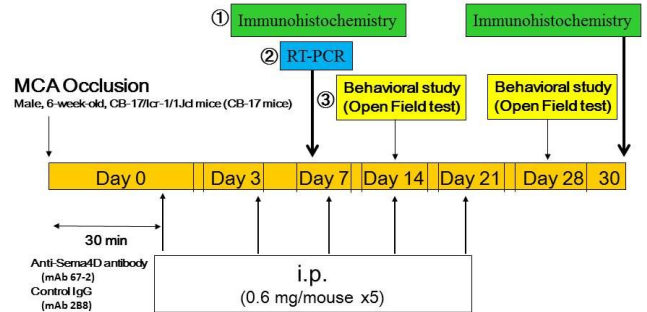
6 週齢、雄 C.B-17/1Cr-1/1Jcl (CB マウス) を用いて中大脳動脈永久閉塞を作成し、中大脳動脈領域に局限した脳梗塞を作成した。脳梗塞 3 時間後、3 日後、7 日後、14 日後、21 日後に Sema4D 抗体、control IgG 各々 0.6mg を腹腔内投与した。梗塞 7 日後に梗塞脳を摘出し、Nestin、Sox2、Caspase-3 に関して免疫染色を行った。また、梗塞巣より RNA を抽出した。得られた RNA より Nestin、PLP (オリ

ゴデンドロサイトのマーカー) Sox2 に関して PCR を施行することで発現量に関して検討を行った。

さらに、脳梗塞作成後 14 日後と 28 日後にオープンフィールドテストにて行動学的変化を検討し、梗塞後 28 日のこれらの動物から梗塞脳を摘出し、脳切片において MAP2 と NeuN の免疫染色を行うことで脳梗塞体積を算出した。

一方、梗塞巣より摘出した傷害誘導性神経幹細胞は FGF (fibroblast growth factor)、LIF (leukemia inhibitory factor) 添加培地で培養し、細胞数をカウントし、細胞数を統一した後に PLL coating dish に播種し、これに Fas antibody、Sema4D antibody を投与して培養神経幹細胞への傷害性の有無を検討した。

## Protocol



## 4. 研究成果

梗塞脳の免疫組織化学的検討の結果、梗塞 7 日後では Sema4D 抗体投与群では IgG を投与したコントロール群と比較して Nestin/Sox2 陽性の神経幹細胞数の増加がみられた。(Figure1)

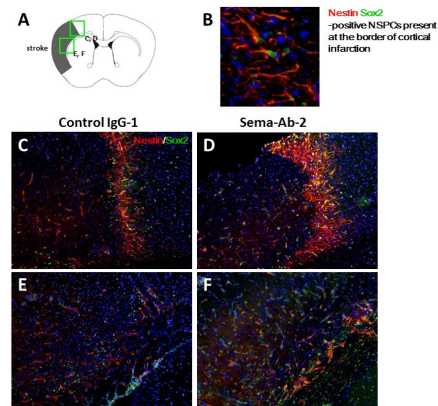


Figure1

一方、Sema4D 抗体投与群で神経幹細胞死を示す Nestin/Caspase3 陽性細胞数はコントロール群と比較して減少していた。また、PCR にて Sema4D 抗体投与群で Nestin、Sox2、PLP はコントロール群と比較して発現量の亢進がみられた。これらのことから Sema4D を抑制することで梗塞巣にみられる神経幹細胞死は抑制され、結果として神経幹細胞は増加することが明らかとなった。(Figure2)

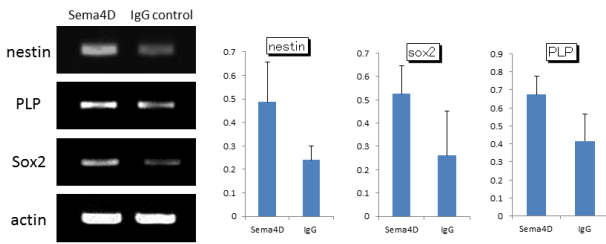


Figure2

さらに行動テストでは、脳梗塞マウスでは Open field test における活動量の亢進が見られることがわかっているが、Sema4D 抗体投与群ではコントロール群と比較して、梗塞 14 日目、28 日目ともにこの活動量が抑制されていることから、行動学的な改善がみられることが示唆された。これらの結果より Sema4D 抗体は機能的にも脳梗塞後障害を抑制することができることが示唆された。(Figure3)

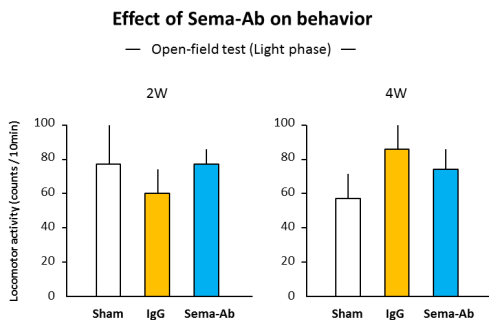


Figure3

梗塞作成後 28 日目の梗塞脳を MAP2、NeuN にて免疫染色し脳梗塞体積を検討したところ、

梗塞側と非梗塞側の Striatum の比は Sema4D 抗体投与群ではコントロール群と比較して増加しており、Sema4D の抑制が脳組織修復に関与することが示唆された。(Figure4)

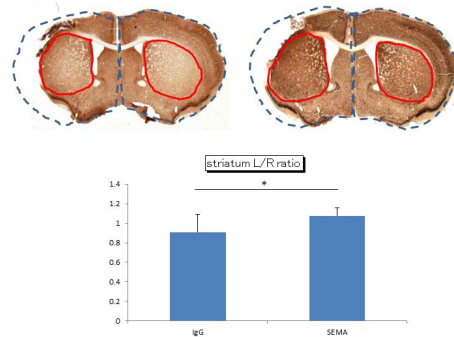


Figure4

これらの結果より Sema4D 制御による治療は中枢神経系における傷害誘導性神経幹細胞を増加させる。これは Sema4D 分子標的による内因性神経再生が脳梗塞治療として有用である可能性がある。

#### 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 0 件)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

田片 将士 (TAKATA MASASHI)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60617984