

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560273

研究課題名(和文) 中枢神経障害および神経細胞移植におけるアストロサイト活性化の抑制効果

研究課題名(英文) Inhibition of astrocytic activation in brain disorders and neuronal cell transplantation

研究代表者

中川 敬夫 (NAKAGAWA, Takao)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：40217675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：アストロサイトは種々の脳病変において活性化し、様々な神経栄養因子を産生・分泌し、神経細胞保護・再生を促す一方、種々のサイトカインを産生・分泌し、炎症反応、脳浮腫を惹起する。また最終的にグリオシスからグリア癆痕を形成し、再生神経線維の伸長や移植神経細胞による神経回路再生を阻害する。本事業では、培養細胞モデルと実験動物モデルを用い、神経細胞障害および神経細胞移植におけるアストロサイトの活性化抑制による神経細胞保護効果を検討した。実験動物モデルでは、アストロサイトの活性化抑制による神経細胞保護効果を確認できなかったが、培養細胞モデルにおいては、同効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Astrocytes activate under various brain disorders followed by secretion of neurotrophic factors inducing neuronal cell protection and regeneration. On the other hand, they secrete cytokines aggravating brain edema and inflammation, and form gliotic scar inhibiting neuronal regeneration. Using cell culture and animal experiments we investigated neuronal cell protection by inhibition of astrocytic activation. We demonstrated protective effects of neuronal cells by inhibition of astrocytic activation in vitro, but not in vivo.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：アストロサイト 神経細胞障害 神経細胞移植 神経再生

## 1. 研究開始当初の背景

アストロサイトは、従来、脳構造の維持とともに、脳内の代謝や神経細胞外環境を維持する支持細胞と考えられてきた。アストロサイトは通常、いわゆる resting の状態にあるが、種々の刺激により活性化し、反応性アストロサイト(reactive astrocyte)となる。反応性アストロサイトは種々の神経栄養因子を産生・分泌し、神経細胞保護・再生を促す一方、種々のサイトカインを産生・分泌し、炎症反応、脳浮腫を惹起する。また最終的にグリオシスからグリア瘢痕を形成し、再生神経線維の伸長や移植神経細胞による神経回路再生を阻害する。我々はこれまで、新生児ラット・成体ラット正常アストロサイト、成体ラット反応性アストロサイトの遺伝子発現プロフィールを明らかにし、成体ラット反応性アストロサイトでは新生児ラットアストロサイトと同様、神経発達期に機能すると考えられる遺伝子群の一部の発現が亢進しているものの、神経組織障害を招く脳浮腫や炎症を増長するサイトカインなどの発現が著明に亢進していた。これらの結果より、反応性アストロサイトの活性化をより制御できれば、神経組織障害の軽減および細胞移植・ニューロリハによる神経再生がより促進できるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

神経細胞障害および神経細胞移植におけるアストロサイト活性化抑制の効果を検討する。

## 3. 研究の方法

- 1) ラット脳より培養したアストロサイトを用い、虚血・再灌流モデルを作成し、本モデルにおける遺伝子発現変化を解析した。
- 2) 1) の虚血・再灌流モデルにおけるアストロサイトの VEGF 産生に対する種々薬剤(aspirin, cilostazol, dexamethasone, edaravone)の抑制効果について検討した。
- 3) ラット小脳顆粒神経細胞とアストロサイトを用いた共培養モデルを作成し、虚血負荷におけるアストロサイトの遺伝子発現変化を解析した。また、この共培養系にメンブレン上で培養した神経細胞を重層する神経細胞移植モデルを作成し、edaravone 添加による移植神経細胞に対する保護効果を検討した。
- 4) 6-OHDA の黒質注入によるパーキンソン病モデルラットでの神経細胞移植におけるedaravone の効果を、行動学的および組織学的観察より検討した。

## 4. 研究成果

- 1) ブドウ糖の存在下では、24 時間の低酸素下でも、新生児ラット脳からのアストロサイトは 60%弱、成体ラット脳からのアストロ

サイトは 70%ほどの生存率を示し、アストロサイトは低酸素に耐性があることが示された。しかし、低酸素に加え、ブドウ糖を培養液から除くと(Oxygen glucose deprivation model, OGD model), 細胞の生存率は 10%以下となった。以下、OGD モデルを虚血モデルとした。また、各負荷を与えて、6 時間後に通常の培養液と置換し、24 時間まで培養すると、新生児ラット脳からのアストロサイトは 70%程度、成体ラット脳からのアストロサイトはほぼ 100%の生存率を示し、これを再灌流モデルとした(図 1) 検索した VEGF, NGF, BDNF, IL-1, TNF のうち、虚血・再灌流刺激により、VEGF 発現の増加を認めた。また、再灌流刺激により GFAP 発現の増加を認めた(図 2, 3)。本モデルは、虚血・再灌流刺激により、反応性アストロサイトを誘導できる有用な実験モデルと考えられる。

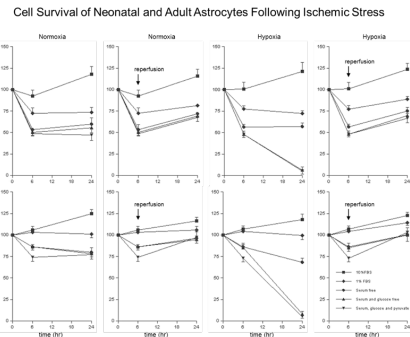


図 1. in vitro 虚血・再灌流モデルでのアストロサイトの生存率

upper, neonate astrocyte; lower, adult astrocyte

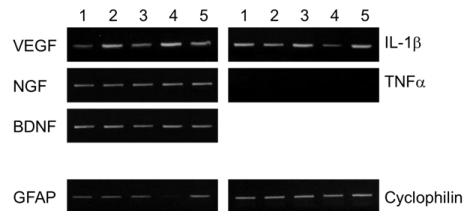


図 2. in vitro 虚血・再灌流モデルでの各遺伝子発現(RT-PCR)

1. control(6h); 2. ischemia(6h); 3. control(24h); 4. ischemia(24h); 5. reperfusion(24h)

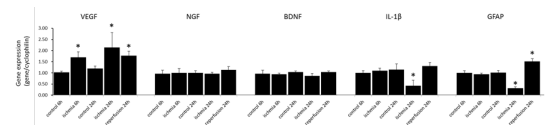


図 3. in vitro 虚血・再灌流モデルでの遺伝子発現変化(定量的 RT-PCR)

TNF は検出されなかった。\*, p<0.05 (control(6h) との比較)

- 2) 検討した薬剤(aspirin, cilostazol, dexamethasone, edaravone)の添加は、虚血負荷による培養アストロサイトの生存率に影響を及ぼさなかった。VEGF の産生は、虚血

負荷前の dexamethasone と edaravone の添加により、容量依存的に抑制された。aspirin および cilostazol は VEGF の発現に影響を及ぼさなかった (図 4)。虚血負荷中・後においてはいずれの薬剤も VEGF の産生に影響を及ぼさなかった。

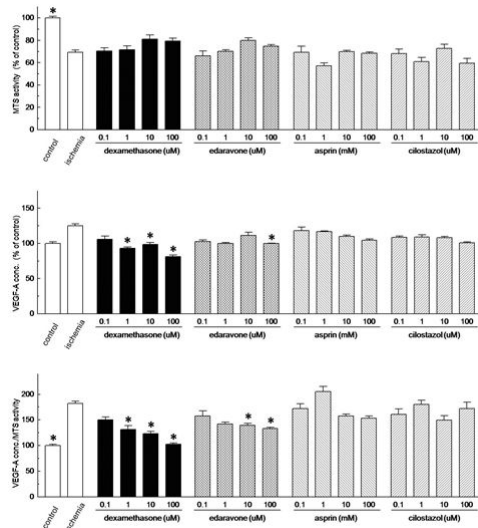


図 4. 虚血負荷前における薬剤添加によるアストロサイトの VEGF 産生に対する影響  
\*,  $p < 0.05$  (ischemia 群との比較)

3) *in vitro* での神経細胞移植モデルを作成した (図 5)。小脳顆粒神経細胞・アストロサイト共培養における虚血負荷にて、アストロサイトの VEGF, NGF, IL-1 $\beta$ , NFkB p50, GFAP の発現増加を認めた (図 6)。移植神経細胞のニューロフィラメントの発現は、虚血負荷後の移植により減少したが、edaravone の虚血負荷前の添加により、その減少度は低下した (図 7)。この効果は、NFkB 阻害剤により抑制されたが、VEGF 阻害剤によっては抑制されなかった (図 8)。edaravone の移植神経細胞保護作用は、VEGF 系ではなく、NFkB 経路によることが推察される。

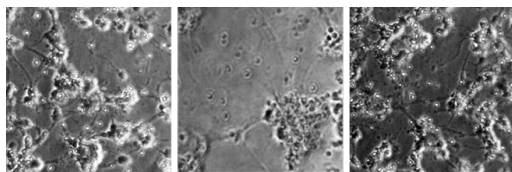


図 5. *in vitro* 神経細胞移植モデルにおける神経細胞像 (x400)

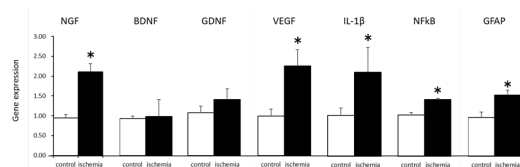


図 6. *in vitro* 虚血・再灌流共培養系モデルにおける遺伝子発現変化 (定量的 RT-PCR)

\*,  $p < 0.05$

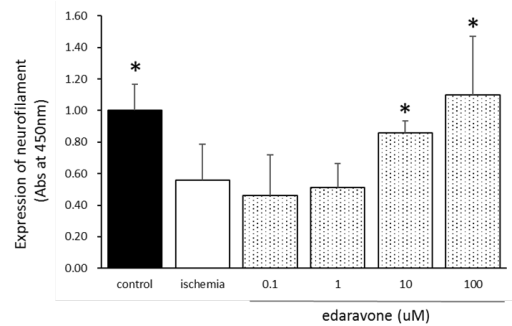


図 7. 移植神経細胞の Neurofilament 発現に対する edaravone の効果 (Neurofilament ELISA) \*,  $p < 0.05$  (ischemia 群との比較)

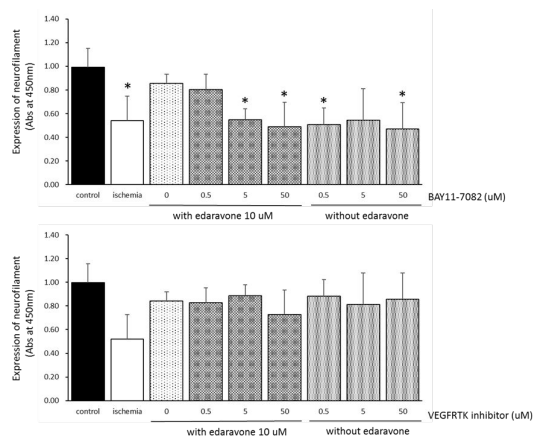


図 8. edaravone の移植神経細胞保護作用に対する NFkB 阻害剤 (BAY 11-7082) と VEGF 阻害剤 (VEGFR TK inhibitor) の効果  
\*,  $p < 0.05$  (edaravone のみとの比較)

4) パーキンソン病モデルラットのアポモルフィン負荷行動試験での著名な左回旋運動と黒質線条体系での TH 染色陰性化を確認した (図 9)。神経細胞移植後 2 週間後のアポモルフィン負荷行動試験において、神経細胞移植群は、非移植群と比べ、40%程度左回転数が減少したが、edaravone の投与による有意な影響は認められなかった (図 10)。TH 免疫染色でも、明らかな TH 陽性細胞・線維の増加は認められなかった。これらの結果より、パーキンソン病モデルラットでの移植神経細胞に対し、edaravone は保護効果を示さなかった。

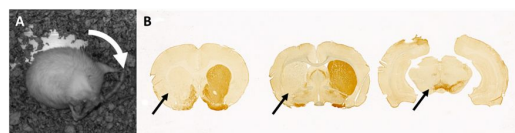


図 9. パーキンソン病モデルラット  
A, アポモルフィン負荷行動試験にて左回旋運動を呈するパーキンソン病発症ラット  
B, TH 染色; 術側の黒質・線条体の TH 染色性が陰性化し

ている。

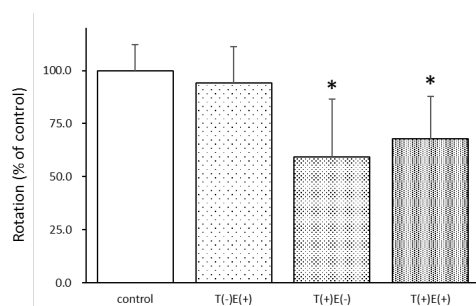


図 10. パーキンソン病モデルラットに対する神経細胞移植および edaravone の効果 (アポモルフィン負荷行動試験)

移植あり・edaravone なし群と移植あり・edaravone あり群との間には有意差なし。

\* ,  $p < 0.05$  (control 群との比較)

## 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3件)

1. Tanaka S, Kawahara E, Nakagawa T. Expression of hepatocyte growth factor is synchronized with expansion of myogenesis in regenerating skeletal muscle. J Tsuruma Health Sci Soc 39:85-94, 2015 (査読有)

2. Tanaka S, Obatake T, Koshino K, Nakagawa T. Influence of exercise intensity on atrophied quadriceps muscle in the rat. J Phys Ther Sci 27:3445-50, 2015 (査読有)

3. Tanaka S, Kawahara E, Nakagawa T. Myogenic cell response to muscle contraction by short electrical stimulation. J Phys Ther Sci 27: 2349-52, 2015 (査読有)

[学会発表](計2件)

1. Hashimoto N, Yokogawa M, Kamiya Y, Miaki H, Nakagawa T: Effects of moderate aerobic exercise on cognitive function and cerebral blood flow. INS 2015 Mid-Year Meeting (Sydney, Australia) 2015.6.2.

2. Yokogawa M, Miki T, Miaki H, Nakagawa T: Effects of deep breathing methods on ventilation efficiency and autonomic nerve activity. 17th WCPT (Singapore) 2015.5.4.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 敬夫 (NAKAGAWA, TAKAO)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号: 40217675

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし