

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591687

研究課題名（和文） 浸潤細胞を使って脳梗塞を救う

研究課題名（英文） New treatment for cerebral infarction using infiltrating cells

研究代表者

久門 良明（KUMON YOSHIAKI）

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80127894

研究成果の概要（和文）：ラット虚血脳中心部にマクロファージ様細胞が浸潤、集簇し、その多くは anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1（Iba1）（マクロファージ／マイクログリアのマーカー）ならびに NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（オリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーで幹細胞に出現するとされる）が陽性であることから、我々は Brain Iba1+/NG2+ Cells（BINCs）と名付けた。この細胞は、虚血後3日目より出現し7日目をピークとしており、増殖能が高かった。NG2の多様な作用から、神経保護的に働いている可能性を示した。次に、同じモデルへの虚血後2日目の5FU注入により、これらの細胞浸潤を抑制すると、生食注入群より虚血性壊死巣が拡大するが、Iba1+/NG2+細胞を虚血脳に5日目に直接注入することで、壊死範囲の縮小が得られることを示した。さらに、その機序として神経栄養因子の分泌による可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found that macrophage-like cells accumulate in the ischemic core of a rat brain whose right middle cerebral artery was transiently occluded for 90 minutes. Many of these cells expressed Iba1, a marker of macrophages/microglia, as well as NG2 chondroitin sulfate proteoglycan (NG2), which has been recognized as a marker of oligodendrocyte progenitor cells. Such macrophage-like cells were termed BINCs (brain Iba1+/NG2+ cells). BINCs were highly proliferative and their number peaked at 7 days post-reperfusion. Taken the various function of NG2, BINCs may be involved in not only phagocytosis of degenerated cells but also the healing and regeneration of lesion cores. 5-Fluorouracil (5FU) injection at 2 days post reperfusion markedly reduced the number of BINCs at 7 days post reperfusion, causing enlargement of necrotic volumes and frequent death of the rats. When isolated BINCs were transplanted into 5FU-aggravated ischemic lesion, the volume of the lesion was much reduced. Bone marrow-derived BINCs play a beneficial role in ischemic brain lesions, at least in part, through secretion of neuroprotective factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳梗塞、浸潤細胞、神経栄養因子、治療

1. 研究開始当初の背景

(1)我々は、*in vitro*の実験で、マクロファージ様細胞がニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトになるポテンシャルを有することを確認した。また、ラット局所脳虚血モデルを用いた *in vivo* 実験でも、虚血中心部に虚血後 7 日目に抗 anti-ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba1) 陽性細胞および NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (NG2) 陽性細胞が多数出現することを観察し、これらの細胞のなかには、両者が陽性の細胞が多数含まれることを明らかにした。さらに、Iba1 陽性細胞の一部は nestin ないし glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性であることを見だし、虚血中心部に出現してくるマクロファージ様細胞には *in vitro* 実験と同様に、多能性前駆細胞の役割を有する可能性を示した。

(2) 虚血脳中心部より採取したマクロファージ様細胞を、虚血負荷後の別の個体の虚血脳中心部に直接注入することにより、組織損傷が軽減される可能性を見いだした。

2. 研究の目的

(1)虚血脳中心部に浸潤するマクロファージ様細胞が、神経細胞やグリア細胞に分化しうる多能性前駆細胞としての役割の変化をとらえる。

(2)虚血脳中心部に浸潤するマクロファージ様細胞を虚血脳中心部に注入することの治療効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ラット中大脳動脈 90 分一過性脳虚血モデルを用いて脳梗塞を作成する。虚血負荷後、経時的に脳を摘出し、出現するマクロファージ様細胞の Iba1 および NG2 陽性の有無を観察する。また同様にイムノブロットで、半定量的に経時変化を観察する。

(2)上記脳虚血モデルで、虚血負荷 2 日後に 5-FU を腹腔内投与 (100mg/kg) すると、マクロファージ様細胞の浸潤が激減し、生食注入群に比して梗塞範囲が拡大する。本モデルに、別個体の虚血脳より採取した BINCs を虚血負荷 5 日目に、虚血脳中心部に直接注入し、その効果をみる。

4. 研究成果

(1)虚血脳中心部に浸潤するマクロファージ様細胞の多くは、Iba1 と NG2 を発現した。このマクロファージ様細胞を、梗塞周辺や対側脳に存在する Iba1+/NG2- 細胞や Iba1-/NG2+ 細胞と区別するため、BINCs (brain Iba1+/NG2+ Cells) と名付けた (図 1)。

経時的な免疫組織学およびイムノブロットの検討より、浸潤する BINCs は、虚血負荷後 3 日目より増加し、虚血負荷後 7 日目をピークとしていた (図 2A,C)。また NG2 のイムノブロットによる検討から、2 つの NG2 があることが判明した。ひとつは BINCs により発現される分子量 300kDa のもの、もう一つは対側脳にみられる分子量 290kDa のものである (図 2B,C)。NG2 の多様な作用を考えると、BINCs は単に、変性細胞の吞食作用のみならず、虚血中心部の治癒過程や再生過程にも関与していることが示唆された。

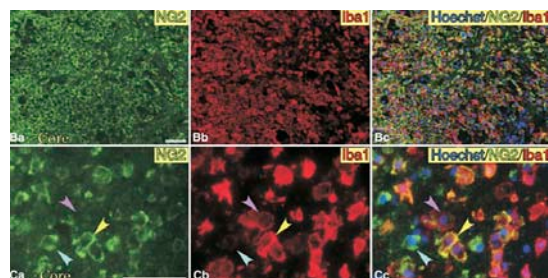


図 1) 虚血中心部に浸潤したマクロファージ様細胞のうち Iba1+/NG2+細胞 (矢頭) を示す (上段：弱拡大、下段：強拡大)。

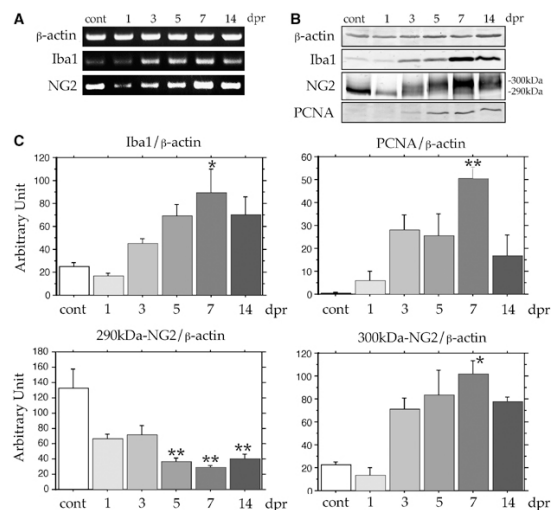


図 2) イムノブロットにて Iba1, 300kDa-NG2 発現が虚血負荷後 7 日目をピークにしている。

(2)green-fluorescent protein-transgenic rats を用いた骨髓移植実験で、BINCs が骨髓由来であることを明らかにした。

虚血負荷 2 日目に 5FU 腹腔内投与により、生食注入群に比して 7 日目に浸潤する BINCs が激減し、14 日目の摘出脳では梗塞による壊死領域が拡大し、高頻度にラットが死亡した。そのモデルの虚血脳に BINCs を虚血負荷 5 日目に注入することにより、14

日後に摘出した脳では、壊死領域は縮小した(図3)。各断面毎に容積を算出すると、5FU腹腔内投与群は、他の2群に比して有意に脳容積の減少量は多かった。

定量的RT-PCRの結果、BINCsはbFGF, BMP2, BMP4, BMP7, GDNF, HGF, IGF-1, PDGF-A, VEGF関連のmRNAを発現していた。ことに、IGF-1mRNAを高いレベルで発現していた(図5)。

これらの結果より、骨髄由来のBINCsが、虚血脳に保護的作用を有しており、神経保護因子の分泌によるものが示唆された。

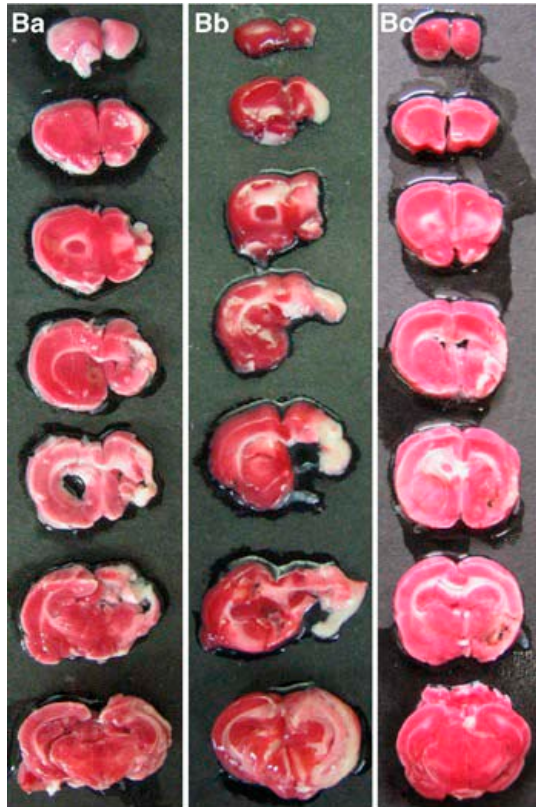


図3) 虚血負荷+生食投与群(Ba)、虚血負荷+5FU投与群(Bb)、虚血負荷+5FU投与+BINCs注入群(Bc)の14日目の摘出脳を示す。

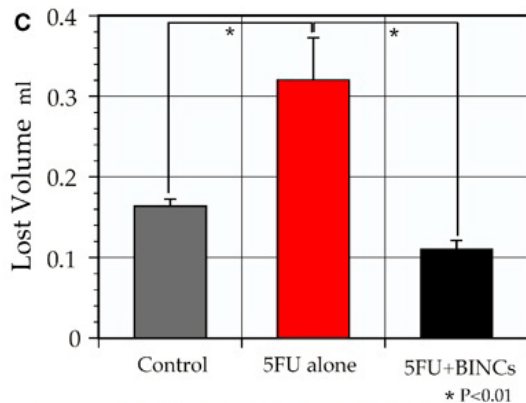


図4) 脳容積の減少量は虚血負荷+5FU群で、他の2群に比して有意に多かった。

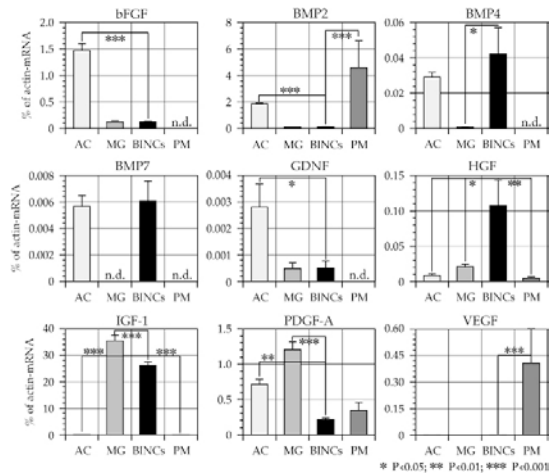


図5) 定量的RT-PCRの結果、BINCsはbFGF, BMP2, BMP4, BMP7, GDNF, HGF, IGF-1, PDGF-A, VEGF関連のmRNAを発現していた。ことに、IGF-1mRNAを高いレベルで発現していた

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4件)

(1) Smirkin A, Matsumoto H, Takahashi H, Inoue A, Tagawa M, Ohue S, Watanabe H, Yano H, Kumon Y, Ohnishi T, Tanaka J: Iba+/NG2+ macrophage-like cells expressing a variety of neuroprotective factors ameliorate ischemic damage of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2010, 30:603-615 (査読あり)

(2) Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Nakagawa K, Kumon Y, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation assay for platelet response to cilostazol. *Platelets*, Epub 2010 Dec 15 (査読あり)

(3) Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Chuai M, Imai Y, Takahashi H, Tanaka J: Accumulation of macrophage-like cells expressing NG2 proteoglycan and Iba1 in ischemic core of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2008, 28:149-163 (査読あり)

(4) Ohue S, Kumon Y, Kohno K, Watanabe H, Iwata S, Ohnishi T: Postoperative temporary neurological deficits in adults with moyamoya disease. *Surgical Neurology*, 2008, 69:281-287 (査読あり)

〔学会発表〕 (計 2 件)

(1) 鄭菜里、渡邊英昭、久門良明、大西丘倫、田中潤也：BINCs (Brain Iba1+/NG2+ Cells) の脳梗塞巣への侵入機序の検討。第 36 回日本脳卒中学会 (2011/3/26、東京)

(2) 鄭菜里、渡邊英昭、久門良明、大西丘倫、田中潤也：ラット虚血脳におけるケモカイン；フラクタルカインと MCP-1。第 33 回日本神経科学大会 (2010/9/2、神戸)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久門 良明 (KUMON YOSHIAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80127894

(2) 研究分担者

渡邊 英昭 (WATANABE HIDEAKI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：30322275