

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19953

研究課題名(和文) 脳梗塞における神経新生の課題克服～成長因子による内在性幹細胞増幅療法を基盤として

研究課題名(英文) Temporal changes in the response of SVZ neural stem cells to intraventricular administration of growth factors.

研究代表者

越智 崇(Ochi, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60643723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：成長因子脳室内投与による内在性神経幹細胞活性化療法は、有望な神経再生療法の手段の一つであるが、成長因子が神経幹細胞とその系譜群の動態をどのように修飾しているかは明らかでなかった。今回、正常/脳虚血マウス双方の脳内に成長因子を様々な期間投与し以下のことを明らかとした。まず、成長因子投与により可逆的な神経幹細胞/一過性前駆細胞の増殖促進が起こり、投与終了後にはじめて神経細胞の産生亢進が起こること。また、投与期間の違いが神経幹細胞/前駆細胞の増幅、神経細胞の新生の度合いに大きな影響を及ぼすことである。将来の疾患治療に応用する研究を続ける上で、これらの知見が重要な基盤になると思われる。

研究成果の概要(英文)：In vivo growth factor (GF) treatment is a promising approach to enhance the regenerative capacity of neural stem cells (NSCs) for brain repair. However, how exogenous GFs affect endogenous NSCs is not well understood. This study investigated the impact of intraventricular administration of GFs on NSCs of adult mice. GFs were administered in the adult mice for various periods, and the proliferation and neuronal production of NSCs were assessed. We found that the proliferation of NSCs and the subsequent neurogenesis markedly vary in response to the duration of GFs therapy. Interestingly, not long-term but short-term therapy seems to be effective. Moreover, we found the same difference to the different-duration of GF therapy in the ischemic mice. These results show spatiotemporal changes in the response of NSCs to exogenous GFs and demonstrate that precise control of the duration of GF treatment is important for brain repair.

研究分野：neurogenesis

キーワード：神経幹細胞 神経再生 成長因子 脳虚血

### 1. 研究開始当初の背景

まず、脳梗塞後遺症に対する根本的な治療アプローチは現在存在せず、幹細胞治療をはじめとする神経再生療法の研究は急務である。現在脳梗塞に対する治療としては大きく「予防」「発症後のダメージ軽減」「残存機能のモジュレーション」が存在するが、残念ながら脳梗塞にて重篤な後遺症を残す患者は年々増加し、患者の幸福は大きく損なわれ、社会的な損失は大きい。

よって、神経新生による後遺症克服が強く望まれ、研究の重要性が高まっている。その点において、神経再生研究は、新規神経細胞と、損傷後脳の再生抑制メカニズム双方の解析が必要であるが、現在主流である、幹細胞移植研究ではその解析は困難である。

細胞移植療法は、iPS 細胞にて免疫応答の問題の克服の可能性が示され、盛んに研究されているが、神経再生の研究を進めるにあたり、以下の最も重要な二点において現在も問題が残されている。まず、動物実験レベルでも臨床治験レベルでも、「生着する細胞がほとんど存在」しない。また損傷後脳の再生を抑制すると思われる防御メカニズムも存在する。損傷後脳は antineurogenic な因子が豊富に存在することが証明されており、我々の虚血後脳に対する実験系では防御反応と思われる、異常なグリオシスがほぼ全例で観察された。つまり、中枢神経系への細胞移植療法の臨床応用には、投与した細胞が生着する条件と、宿主側の反応を回避する条件の解明が必要である。しかし、幹細胞の動態解析と、炎症を含めた宿主の防御反応の関連を「細胞移植」というアプローチで検討するのは難しい。解析すべき生着した細胞がほとんどないためである。

一方で、内在性神経幹細胞を用いた神経再生研究は、細胞移植に比較して、メリットが大きい。まず、内在性神経幹細胞は生体の特定部位に恒常的に存在し、神経再生を続けている。加えて本群の細胞は損傷に応じて再生に関わることが多くのモデルで示唆されている。そして、成長因子投与による、神経新生の増強効果も多くの研究で証明されている。我々は内在性神経幹細胞に着目した実験系は「新規細胞の動態解析」には、「細胞が既に存在している」ため「その後の動態が追跡できる」という点で有利と考えた。

加えて、研究を進めるためには以下の大きな知見と手法を我々はすでに手にしていた。内在性神経幹細胞が脳虚血後再生に関与することの証明と、内在性神経幹細胞の薬剤投与による修飾法の確立は当教室でなされたことである。成長因子投与後の内在性幹細胞動員による、脳虚血後の神経新生と機能回復は、所属する東京大学医学部脳神経外科にて、世界に先駆けて証明された(Nakatomi, et al. Cell 2002)。

### 2. 研究の目的

成長因子投与後の内在性神経幹細胞の動員による神経再生治療は非常に有望である。実際、内在性幹細胞は虚血損傷脳の神経再生に関わることが当教室で初めて証明されている。自身の研究で、成長因子投与による内在性幹細胞の時空間的応答を解析し効率的な成長因子投与の方法を確認し証明つつあった。一方で、新生された神経が、損傷脳で生着する仕組みの解析が今後必要であった。それらを組み合わせ、損傷後脳において新規神経細胞の生存解析をすることで、内在性神経細胞の利用のみならず移植細胞も含めた神経再生療法の基礎になる知見が得られると期待された。

### 3. 研究の方法

新規新生細胞と損傷脳の反応を観察することが、神経再生の研究には重要であり、それにより移植も含めた神経再生療法の基礎が築かれる。

我々は、適切な成長因子投与と観察タイミングで、新規神経細胞を増幅し解析することができるようになった。解析に手法においては、免疫学的手法により、様々な抗体を用いて、幹細胞、そしてその系譜の細胞群の段階的な分化細胞を同定できるようになり、その部位特異的な細胞の割算出できるようになった。

よって、まず正常マウスに種々の期間成長因子を脳室内投与し、その後の経過を追うことで、幹細胞とその系譜群の反応動態、そして幹細胞の分化の度合いを推し測ることができた。

次なる、解析対象は、新規神経細胞と損傷脳との兼ね合いである。我々は、損傷脳の代表として、技術的には難しいが、再現性の高いマウス中大脳動脈永久閉塞モデルを用いて、同様の解析を行った。

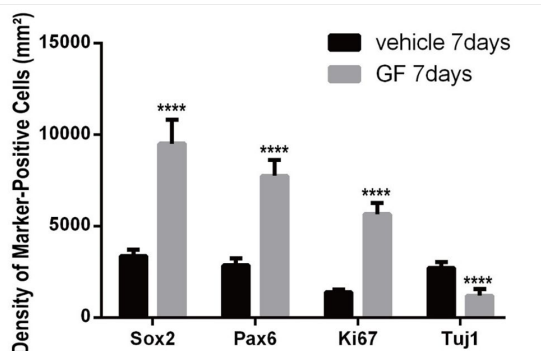
### 4. 研究成果

成長因子投与による、神経新生増幅の過程について新たな知見を証明した。

成長因子による神経新生増幅は、結果は多くで証明されているが、臨床応用に向け研究を進めるには、その神経新生のプロセスに対する知識は十分でなかった。

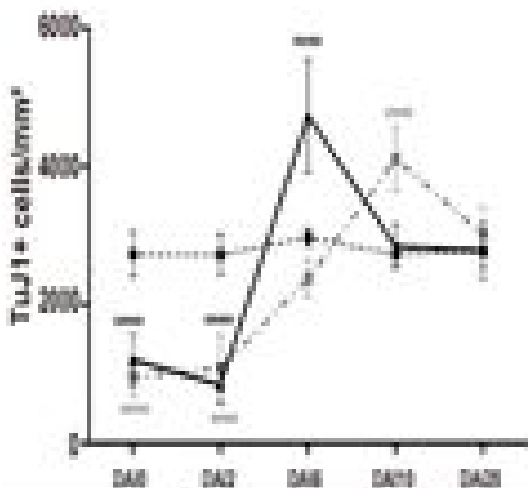
我々はこの問題を解決すべく研究を行い、成長因子は単純に神経新生を増強するのではなく、以下の興味深いを経て行われることがわかった。

成長因子投与中は前駆細胞が増加するが一旦神経芽細胞は減少する。



(上図)成長因子投与後の、神経幹細胞が恒常的に存在し、増殖と神経芽細胞へ分化する脳室下帯における、神経幹細胞とその系譜細胞群の細胞密度  
成長因子を投与すると、Sox2, Pax6 陽性の幹細胞と前駆細胞は増加するが、神経細胞のもととなる TuJ1 陽性の神経芽細胞が著減した。

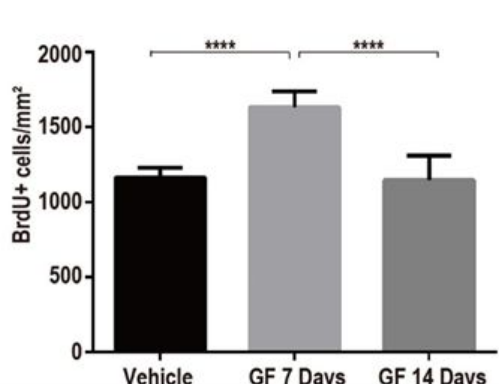
成長因子投与を中止し(一定期間後)はじめて神経芽細胞へ分化し遊走を始める。



(上図)成長因子投与後の脳室下帯における神経芽細胞の細胞密度  
成長因子投与終了後、時間(0-28日)を追って、脳室下帯における神経芽細胞の細胞密度を比較すると、成長因子短期投与(実線)群、成長因子長期投与(一点鎖線)ともに、投与終了後は対照群(点線)より、有意に低いが、経過を追うと、有意に高い密度の神経芽細胞がみられる時期があった。

上記より、  
成長因子投与を中止し(一定期間後)はじめて神経芽細胞へ分化し遊走を始めることを証明した。

また、長期投与よりも、短期投与のほうが、より効果的な神経新生が得られることがわかった。



(上図)成長因子投与後の嗅球におけるBrdU陽性新生神経の細胞密度  
成長因子投与中増幅細胞をBrdU標識し、終了後一定期間後に嗅球に生着した新生神経数を比較すると、驚くべきことに、短期投与群(7日)のほうが、長期投与(14日群)よりも有意な新生神経を得た。  
このことにより、漫然と成長因子投与を続けても、効果が得られず、適切な投与期間の設定と投与終了が必要だということがわかった。

上記報告を結果の厳密性と再現性をもって、論理的な結論が得られたため、学術論文として国際誌に投稿、発表できた。

引き続き、脳虚血モデルにおいても、  
このことが証明された。このことは、脳病変において、成長因子投与の治療可能性と、治療において、薬剤投与の手法が極めて重要であること、双方を示すものである。

この知見は将来において、非常に重要な基盤になりえるはずである。

## 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 3件)

[Ochi T, Nakatomi H, Ito A, Imai H, Okabe S, Saito N. Temporal changes in the response of SVZ neural stem cells to intraventricular administration of growth factors. \*Brain Reserch.\* 2016 Apr 1;1636:118-29](#)

[Miyawaki S Imai H, Hayasaka T, Masaki N, Ono H, Ochi T, Ito A, Nakatomi H, Setou M, Saito N. Imaging mass spectrometry detects dynamic changes of phosphatidylcholine in rat hippocampal CA1 after transient global ischemia. \*Neuroscience.\* 2016 May 13;322:66-77.](#)

[Miyawaki S Imai H, Hayasaka T, Masaki N, Ono H, Ochi T, Ito A, Nakatomi H, Setou M, Saito N. Imaging mass spectrometry detects dynamic changes of phosphatidylcholine in rat hippocampal CA1 after transient global ischemia. \*Neuroscience.\* 2016 May 13;322:66-77.](#)

13;322:66-77.

中富浩文、越智崇、齊藤 延人 成体内在性  
神経前駆細胞の活性化による再生誘導療法  
脳卒中 2016 Jan doi: 10.3995/jstroke.  
10400

越智 崇、齊藤 延人 「神経内科 Clinical  
questions and pearls : 脳血管障害 Book  
Chapter 「未破裂脳動脈瘤」2016 May, 中外  
医学社

中富浩文、越智崇、齊藤 延人 内在性神経  
前駆細胞活性化 日本臨床 74(4) 655-660  
2016 Apr

[学会発表](計 1件)

Takashi Ochi, Spatiotemporal response of  
neural progenitors in the adult  
subventricular zone to exogenous growth  
factor stimuli. Brain. 2015/6/30,  
Vancouver (Canada)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

越智 崇 (Ochi, Takashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 60643723