

令和元年5月31日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11774

研究課題名(和文) 虚血耐性現象における傷害誘導性神経幹細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of injury-induced neural stem cells and endogenous neuroprotection under ischemic tolerance

研究代表者

百田 義弘 (MOMOTA, Yoshihiro)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60247880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非致死的な虚血負荷に対する神経細胞の適応現象として虚血耐性現象が注目されている。我々は、これまでに非致死的な局所脳虚血負荷を加えた際にも内在性神経幹細胞の発現が見られることを報告してきた。本研究は虚血耐性現象に神経再生機転の亢進とりわけ血管周皮細胞の発現様式について解析することを目的として研究を行った。

その結果、梗塞巣においてnestin陽性神経幹細胞が脳皮質軟膜部、微小血管周囲で観察され、さらに微小血管とは離れた部位においてGFAP陽性アストロサイトの発現がみられた。この細胞はnestin陽性細胞であったことから反応性アストロサイトが神経幹細胞の特性を有する可能性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科領域においても脳血管障害は嚥下機能低下を引き起こす可能性があり、脳虚血障害の神経保護機能、神経再生に伴う機能回復メカニズムを解明することは重要な研究課題である。これまで軽度な虚血負荷をあらかじめ加えることにより、致死的な虚血負荷が加わった際に、脳保護作用が亢進する、いわゆる虚血耐性現象について多くの研究成果が報告されてきた。我々は、虚血耐性現象における脳保護作用に神経再生機転が亢進するか否かを検証することを目的に研究を行い、軽度の虚血負荷によりグリア細胞が神経再生能を有する可能性があることを観察した。

研究成果の概要(英文)：Ischemic tolerance is attracting attention as an adaptation phenomenon of neurons to a non-lethal ischemic injury. We previously showed that non-lethal injury-induced neural stem cells developed within the ischemic areas. This research was studied for the purpose of analyzing about the pattern of endogenous neural stem cells and pericytes under ischemic tolerance. As a result, nestin positive neural stem cell was observed by a cerebral cortex leptomeninx department around the microvessels in an infarct areas, and more expression of GFAP positive astrocytes was observed at a site distant from microvessels. Because this cell was a nestin positive cell, the thing by which a reactivity astrocyte has a possibility with the special qualities of the neural stem cell was suggested.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：虚血耐性現象 一過性脳虚血 再灌流障害 血管周皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脳血管障害、とりわけ脳梗塞が発症すると傷害部のニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの細胞死が引き起こされ、一度傷害を受けた中枢神経回路は再生できないと考えられてきた。我々は、これまで梗塞の大きさや程度の再現性に優れたマウス脳梗塞モデルを用い、脳傷害病態下においても生体内で誘導される自己の内在性神経幹細胞の発現に着目し、脳梗塞巣には、成熟したニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは消失するものの、これらの三系統に分化する能力を持つ傷害誘導性神経幹細胞(iNSPCs)が、非致死性虚血部位においても特異的に産生され、iNSPCsが微小血管壁細胞である血管周皮細胞(Pericyte)を起源とする幹細胞と考えられ、虚血負荷によりPericyteの形態が変化することや内在性の神経幹細胞の活性化により神経再生機構の亢進や神経機能回復がみられることを報告した。脳血管Pericyteは血液脳関門における神経保護的な役割が示されているが、間欠的に非致死性虚血負荷を加えること(ischemic PC)によりPericyte由来のiNSPCsが最終的に致死性虚血脳内でどのような細胞になるかは不明である。虚血耐性現象のメカニズムの一因として神経再生機構を探ることは、臨床的見地からも極めて重要な研究課題であると考えている。

## 2. 研究の目的

虚血耐性現象(ischemic tolerance)は非致死性虚血負荷を前もって加えることにより致死性虚血負荷に対して抵抗性を獲得する現象である。虚血耐性現象の獲得メカニズムについては遺伝子、蛋白質発現を介した適応現象が報告されているが、虚血負荷によって誘導される内在性神経幹細胞の発現による神経再生能の観点から虚血耐性現象を解明することを目的とする。具体的には、致死性虚血負荷再灌流後の梗塞巣、ペナンプラ領域の

非致死性虚血時間と負荷回数、再灌流期間による神経保護効果の差異を明らかにする。

致死性虚血負荷再灌流後の血管・血液脳関門の変化を明らかにする。

致死性虚血負荷再灌流後のPericyteの変化を分子生物学的および微細形態学的に明らかにする。

致死性虚血負荷後に産生されるiNSPCを抽出培養し、その特性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

研究には再現性に優れた脳梗塞モデルであるCB17系統マウスを用い、一過性非致死性虚血負荷(ischemic PC)を与え、致死性虚血負荷再灌流後におけるiNSPCや神経細胞死、神経再生を組織学的、分子生物学的に検討する。致死性虚血負荷部位におけるPericyteに焦点をあて、血管・血液脳関門の形態変化について電子顕微鏡解析を行う。致死性虚血負荷部位の脳組織から抽出した幹細胞の特性解析を行う。

軽度(5分間)および重度(15分間)の非致死性虚血負荷を2-3回間欠的に加え再灌流後に45分間の致死性虚血負荷を加える。再灌流3-5日目のiNSPCの影響、血液・脳関門(血管内皮細胞、血管周皮細胞、アストロサイト、Gap junctionなど)の変化を免疫組織化学染色法により検討する。

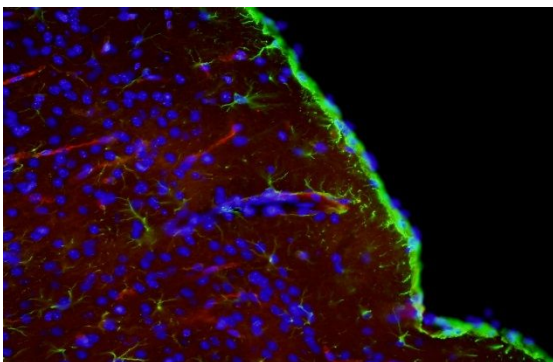
脳組織変化の解析：虚血部の脳軟膜および脳実質内微小血管周囲における神経細胞(MAP2, NeuN)、グリア細胞(GFAP, Iba1)、血管内皮細胞(CD31)、Pericyte(NG2, PDGFR-)の動態を検討する。神経再生評価：虚血負荷領域において、Nestin/Sox2やDoublecortinなどの神経幹/前駆細胞マーカーなどのマーカーにより脳組織再生機転を評価する。電子顕微鏡解析：GFAP、Nestin、PDGFR-抗体を用いた免疫組織化学染色を行い虚血負荷領域の脳軟膜および血管周囲

に発現する細胞を中心に電子顕微鏡を用いて血液・脳関門構成細胞およびiNSPCsの微細形態変化を詳細に検討する。

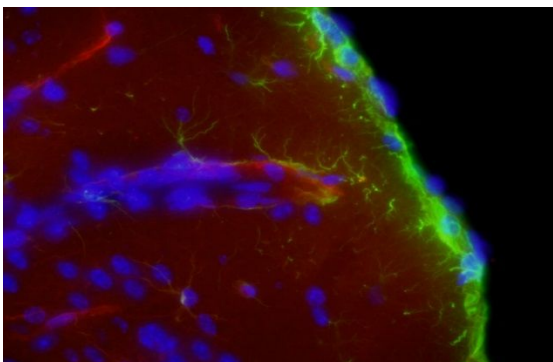
#### 4. 研究成果

5分間の軽度一過性虚血負荷により、MAP2陽性神経細胞、GFAP陽性アストロサイト、Iba1陽性ミクログリアの脱落は観察されなかった。nestin陽性神経幹細胞は虚血負荷領域における皮質内では観察されず軟膜にわずかに発現がみられた。15分間の重度一過性虚血負荷では虚血領域においてMAP2陽性成熟神経細胞の減少がみとめられた。GFAP陽性細胞は15分間の重度虚血負荷により虚血中心領域とペナンプラにおいて反応性が増加した。さらに重度一過性虚血負荷においてnestin陽性神経幹細胞の発現が虚血領域で観察され、反応性アストロサイトの可能性が示唆された。あらかじめ5分間軽度一過性虚血負荷後再灌流10分間を2-3回行った後に45分間の一過性致死的虚血負荷を行い再灌流3日後には梗塞巣内において微小血管周囲にnestin陽性神経幹細胞の発現が確認され、PDGFR-陽性ペリサイトであることが示唆された。しかし、その細胞発現数はあらかじめ軽度虚血負荷を加えなかった場合と比較して明らかな違いは観察されなかった。一方、15分間の重度一過性虚血負荷再灌流10分間を2-3回行った後に致死的虚血負荷を加えるとペナンプラ領域および梗塞巣内にGFAP陽性アストロサイトの発現がみられ、一部はnestin陽性神経幹細胞を示す所見を得た。(図1, 2)

比較的軽度の非致死的虚血負荷をあらかじめ加えた後に致死的虚血負荷が加わった場合、反応性アストロサイトの発現による神経再生機転が亢進する可能性が示唆された。



(図1) nestin(Green)、GFAP(Red) 重度非致死的虚血負荷後、反応性アストロサイト(Red)の一部はnestin陽性細胞(Green)であった。



(図2) nestin陽性反応性アストロサイトの一部は難膜からの微小血管周囲に発現した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

◎ Tomoki Kakudo, Naotaka Kishimoto, Tomohiro Matsuyama, Yoshihiro Momota. Functional recovery by application of human dedifferentiated fat cells on cerebral infarction mice model. Cytotechnology, 査読有 70; 949-959, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0193-9>.

◎ 百田義弘. 一過性脳虚血/再灌流傷害によるペリサイト由来神経幹細胞の誘導. 脳循環代謝, 査読有 28(2), 347-351, 2017.

◎ Masayo Nakata, Takayuki Nakagomi, Mitsuyo Maeda, Akiko Nakano-Doi, Yoshihiro Momota, Tomohiro Matsuyama. Induction of perivascular neural stem Cells and Possible Contribution to Neurogenesis following transient brain ischemia/reperfusion injury. Transl. Stroke Res. 査読有 8: 131-143, 2017. DOI 10.1007/s12975-016-0479-1.

## 6 . 研究組織

（1）研究協力者

研究協力者氏名：中込 隆之

ローマ字氏名：(NAKAGOMI, Takayuki)

研究協力者氏名：松山 知弘

ローマ字氏名：(MATSUYAMA, Tomohiro)

研究協力者氏名：大下 修弘

ローマ字氏名：(OHSHITA, Naohiro)