

平成22年4月27日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591579
 研究課題名（和文） ラット損傷脳に対する内在性自己修復能を応用した再生治療と、効果の年齢依存性の検討
 研究課題名（英文） A comparative study of age-related difference in the treatment effect of exogenous growth factors via endogenous regeneration
 研究代表者
 田中 純一（TANAKA JUNICHI）
 帝京大学・医学部・助教
 研究者番号：00345191

研究成果の概要（和文）：

神経再生の応用として、内在性神経新生を賦活化して失われたニューロンを補う方法を、我々は若年成体ラットの前脳虚血モデルを使用し、海馬の非新生領域に注目、成長因子を投与して治療的効果が得られることを実証し、エポックメイキングな報告となった(Nakatomi et al 2002)。今回我々は、以下の3点を示すことができた。1) 同じモデルでは、内在性神経再生の程度は、生涯を通じほぼ一定。2) 若年成体に、ハンチントン病モデルを導入、同様の治療により、損失ニューロンが数的に補われ、既存回路に取り込まれ、機能的にも改善。加齢成体でも同様に、移植によらない再生治療の臨床応用への可能性が拡大。3) BrdU 脳室内投与法の標識効率は、腹腔内標準法を上回り、高容量投与法に迫りつつ、安全。神経再生の鋭敏な解析方法として有用。

研究成果の概要（英文）：

Our group previously demonstrated that young adult rats with forebrain ischemia showed recruitment of newborn neurons into the injured hippocampus, which is non-neurogenic, by exogenously administered growth factors (Nakatomi et al.,2002). This augmented endogenous regeneration finally ameliorated their lost functions. In the present study, we show three points related to the neurogenesis of Wistar rats. 1) The endogenous neurogenesis occurs after ischemic injury may be maintained constant throughout their lives. 2) The same treatment protocol is also applicable for a young adult rat model of Huntington's disease. The newborn neurons are integrated into the damaged striatum and save the lost functions. Furthermore, aged animals are also responsive for this therapeutic treatment. 3) Intraventricularly administered BrdU provides higher detectability than intraperitoneal administration. In conclusion, exogenously administered growth factors are beneficial for recovery from various neurological disorders by activation of endogenous regeneration. These scant newborn cells will be more effectively recognized by intraventricularly administered BrdU..

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	420,000	3,820,000

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：脳血管障害学

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系では、ニューロンはいったん成長すると、新生も再生もしないという、ラモニ・カハールを祖とする central dogma は、幾人かの先駆的な研究者が、高名な雑誌において優れた発表を重ねたにもかかわらず、1970年代末まで認められようとしなかった。一方、血液学を中心に、幹細胞の研究が進み、中枢神経系にも神経幹細胞や前駆細胞が存在することが証明され、神経学分野の再生研究は一気に開花し、ドグマは覆された (Altman 1962; 1963; Gross 2000; Kaplan et al 1977; Ramony Cajal 1913)。中枢神経系にも、主に二つの neurogenic region があり、恒常的に神経細胞は新生している。新たな世紀早々に、我々のグループを含む二つの大きな問題提起があった (Arvidsson et al 2002; Nakatomi et al 2002)。non-neurogenic region における内在性の神経再生を証明したことである。しかし、両者が示したように、その再生能力はあまりに乏しく、それが機能回復に至る自己修復には遠く及ばないことも示された。我々は、さらにその発見を進め、この内在性神経再生が外因性成長因子による増幅され、成熟し、形態学的にも電気的にも既存回路に取り込まれ、最終的に機能の回復をもたらすことを示した (Nakatomi et al 2002)。

(2) 障害された神経組織の失われたニューロンを再獲得するために、主にパーキンソン病において、胎児神経組織の移植治療の研究が進み、いくつかの臨床治験まで行われている (Bachoud-Levi et al 2000; Hauser et al 2002; Kopyov et al 1998; Rosser et al 2002)。

しかし、倫理的問題、拒絶反応、そして移植組織の供給精製の問題などが障壁となり、代替組織が精力的に模索されてきた。神経幹細胞に大きな関心が寄せられ (Fricker-Gates et al 2004)、特に ES 細胞は魅力的なソースであるが、倫理的問題が残る (Kim et al 2002)。ハンチントン病においても同様の研究が展開されてきた (Vazey et al 2006)。ハンチントン病患者の neurogenic region では有意に neurogenesis が増加しており (Curtis et al 2003)、transgenic mice では neurogenesis が障害されていた (Gil et al 2004)。この疾患の病期と neurogenesis は関係がある。かくして移植によらない方法は、変性疾患の治療分野において注目されることとなった (Emsley et al 2004)。我々はラットのハンチントン病モデルを使用した神経再生の基礎的研究に注目した (Tattersfield et al 2004)。内在性神経再生の基礎実験がさらに報告され、我々が確かめたい治療効果の対象モデルとしての妥当性を裏付けた (Collin et al 2005)。

(3) ところで、この領域の研究に大きく貢献し、広く普及した BrdU 腹腔内投与による新生細胞の解析手法には大きな二つの問題がある。ひとつは間欠的投与により全ての新生細胞を標識していないこと、もうひとつは標準的な 50mg/kg という投与量ではその標識率が飽和していないことに由来し、ともに、神経再生を過小評価する (Cameron et al 2001)。一方で、発達段階の動物に使用された場合は、その毒性が明らかである (Kolb et al 1999; Shah et al 1991)。成体でも、高容量では間

題になる。わずかな神経再生を正しく評価し、治療効果を十分に解析するためには、安全かつ感度の高い解析方法が必要である。

2. 研究の目的

このようにして、次に優先的に解決すべき問題として我々は、以下の点を選択した。

A) 生殖可能となったばかりの若年成体で認められたことが、特にヒトにおいて脳卒中や神経疾患の好発年齢帯に相当する加齢成体にも応用できるのか

B) 海馬において証明されたことが、他の non-neurogenic site においても適用できるのか。

C) 安全で高感度の神経新生解析のためのツールはないか。
これらの問題を解決することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

目的で提起した3つそれぞれ解決するために、以下の3つの方法を実施した。

A) 異なる年齢の雄の同系ラット (Wistar) を用い、4群に分類した。離乳したての幼少ラット (infant: I)、先の報告と同じ若年成体 (young adult: YA)、生殖能力の低下した成熟成体 (mature adult: MA)、およびより高齢の加齢ラット (aged adult: AA) である。それぞれに、海馬 CA1 ニューロンが壊滅的に神経細胞死に陥る条件を検出し、前脳虚血 1、4、および 8 週間後に動物を屠殺し、経心的に灌流固定し、脳を摘出。パラフィン包埋して、海馬を含む一定範囲の薄巣切片を作成、cresyl violet 染色をして、CA1 sector 内の神経細胞の全てを manual count した。

B) ラットのハンチントン病モデルを用い、対象を 3-A) で用いた YA と AA とした。キノリン酸 (QA) 100 nmol/ 1 μ l を右線条体に直接注射し、2 日後にこれを屠殺。一方、生存させた群をつくり、さらにその一部へ、2 日

後に両側の側脳室へ成長因子 (EGF および FGF-2 各 20 nmol) あるいは vehicle solution のみを 7 日間投与し、損傷 7-8 週間後に屠殺した。脳を灌流固定し、線条体を含む冠状断切片を作成した。

3-B)-i 形態学的解析

パラフィン切片を作成し、cresyl violet 染色を加えた。QA 投与経路に沿ったすぐ内側に、外側から lateral: L, intermediate: IM, および medial: M の 3 つの ROI (それぞれ 500 \times 2000 μ m) を定義し、健側の相対する部位と比較した。光学顕微鏡にてニューロンの特徴を備えた細胞 (明瞭な辺縁と内に単一ないし数個の大型の核小体を容れ、比較的狭小な細胞体を有する) を manual count し、患側を健側で除した。ただし、長径が 5 μ m に満たない小型の細胞も含めた。同じ切片を用い、線条体の全体をトレースし、その面積を StereoInvestigator v. 8 を使用して計測し、患側を健側で除した。

3-B)-ii 免疫組織化学的・行動学的解析

最初に rotometer test を行った (Ungerstedt et al 1970)。アポモルフィン 1.0 mg/kg を皮下注射、60 分間の完全な回転を自動的に計数し、右向きから左向きを減じた総回転数を求めた。多動な個体と、左右差の大きな個体を除外した。以降 3-B)-i と同じプロトコルで、成長因子投与期間の最終 3 日間、一日 2 回、合計 6 回、100mg/kg の BrdU を腹腔内投与、さらに 2 ブロックの rotometer test と、YA にはそれと相互して、staircase test を追加した (Montoya et al 1990)。YA のさらに一部に、最後に fluoro-gold を両側の外側淡蒼球に注射し、逆行性にこれが接続された線条体の細胞が新生細胞かどうかを、既存回路への新生細胞の取り込みを証明するために試験した。全ての過程が終了した段階で (損傷後 7-8 週)、屠殺、灌流固定し、冠状断の

凍結切片を作成した。NeuN および BrdU の二重染色を行い、新生ニューロンを、3つの ROI において random sampling し、

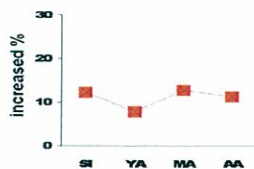
Stereoinvestigator v. 8 でその領域の細胞数を概算した。さらに TOTO-3 で核染色し、共焦点顕微鏡で追認した。DARPP-32、ChAT、NPY および Parv の各抗体を用い、治療群では BrdU と、対象群では NeuN との共染色を施し、共焦点顕微鏡で、再生ニューロンの表現型を正常のそれと定量比較した。

C) non-neurogenic site の再生の解析手法に BrdU の脳室内投与を使用した Pencea らの報告に注目した (Pencea et al 2001)。同系のラットを用い、YA に対し高用量 (300 mg/kg)、中等量 (150 mg/kg) の腹腔内投与、あるいは 25mg/ml, 100 μ l を 3 日間で両側の側脳室に投与した。AA に対し、同じ量を脳室内投与。最終投与から 2 時間後、屠殺、灌流固定し、脳の冠状断パラフィン切片を作成し、抗 BrdU 抗体で染色し、ASVZ および SGL における陽性細胞を光学顕微鏡で manual count した。

4. 研究成果

A) 年齢別の前脳虚血後の海馬 CA1 領域のニューロン数の 1 週間後と、4 ないし 8 週後の比較：ラットの神経新生は、経年的に低下すると言われているが (Cameron et al 1999; Kempermann et al 1998; Kuhn et al 1996)、前脳虚血による海馬のニューロンの損傷に反応しての内在性の再生は、ラットの生涯を通じてほぼ一定 (Fig. 1)。

Fig. 1 1 週間後に対する慢性期の海馬 CA1 内ニューロンの平均増加率



B) -i ハンチントン病ラットの線条体におけるニューロンの数と萎縮の影響：YA でも

AA でも、6 週間後にニューロンの数は各 ROI において上昇し、脳室側の内側にいくほど、生存したニューロンが含まれ、萎縮効果によりさらに見かけの増加がある。一方、損傷に近い外側側では、小型ニューロンが多数見られる (Fig. 2)。萎縮による見かけのニューロンの増殖については、GF 治療群の方が vehicle 投与群より少ないことが判明、GF 投与は神経毒による萎縮を改善する (Fig. 3)。

Fig. 2 各 ROI におけるニューロンの増加

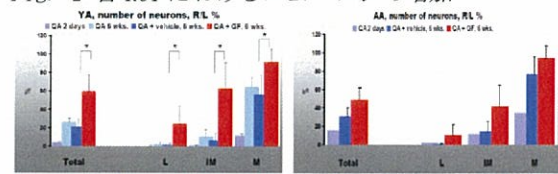
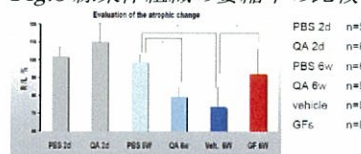


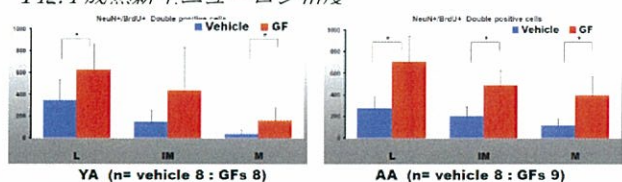
Fig. 3 線条体組織の萎縮率の比較



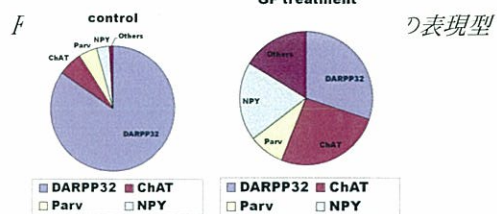
B) -ii 免疫組織化学的解析

成熟新生ニューロン (NeuN+/BrdU+) は、YA と AA ともに有意に増加し、その増加は損傷に近い外側ほど優勢で、損傷が新生を刺激したことを示す (Fig. 4)。

Fig. 4 成熟新生ニューロン密度

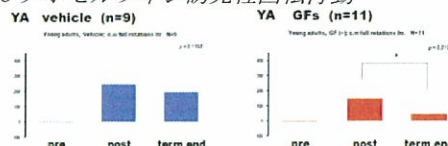


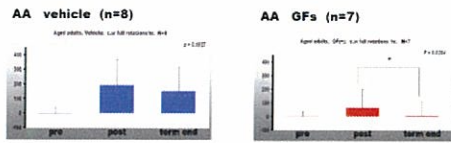
表現型は、naïve animal で圧倒的に DARPP-32 陽性の投射ニューロンが多いことと異なり、再生線条体では特に NPY 陽性のインターニューロンが相対的に多い (Fig. 5)。



アポモルフィン誘発性の常同運動は YA、AA とも GF 治療により有意に改善した (Fig. 6)。

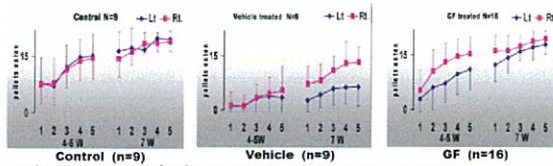
Fig. 6 アポモルフィン誘発性回転行動





staircase testにおいても、YA GF群では有意に損なわれた患肢の機能が改善し、ほぼ元に復している (Fig. 7)。

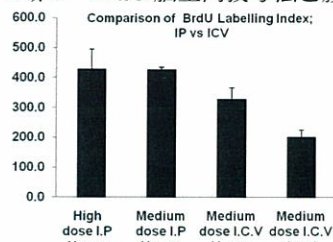
Fig. 7 YAの患肢に対するGFsの治療的効果



C) BrdU脳室内投与法の有用性の解析

YAにおいては、腹腔内投与の高用量と中等用量に差はなく、脳室内投与はそれに近い。さらにAAにおいては脳室内投与はYAに比べると標識率が低下しているが、加齢により neurogenic regionの神経新生が低下することを定量的によく示す (Fig. 8)。安全性(体重など)においても問題はない。

Fig. 8 BrdU脳室内投与法と腹腔内投与法の比較



移植によらない再生治療の研究がさかんになる一方で、世紀の研究であるiPS細胞が誕生した (Farin et al 2009; Takahashi et al 2007; Takahashi et al 2006)。しかし我々の研究はこの研究と競合するものではない。iPS細胞を導くには時間がかかるが、我々の治療は急性期のこの時期に行う。さらに望みの細胞を成体内で適切に誘導するために、我々の行っている基礎実験の成果が役立つ。この2点から、移植に依存しない治療の研究と、iPS細胞に代表される移植治療の研究は、再生という共通の土俵のなかで今後、相互に発展すると期待できる。

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 5 件)

1. Yoshikawa G, Momiyama T, Oya S, Takai K, Tanaka JI, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N: Induction of striatal neurogenesis and generation of region-specific functional mature neurons after ischemia by growth factors. Journal of neurosurgery in press.
2. Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka JI, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N: Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury. Neuroscience 158:683-692, 2009.
3. Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka J, Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N: Region-specific proliferative response of neural progenitors to exogenous stimulation by growth factors following ischemia. Neuroreport 19:805-809, 2008.
4. Matsuno A, Itoh J, Mizutani A, Takekoshi S, Osamura RY, Okinaga H, Ide F, Miyawaki S, Uno T, Asano S, Tanaka J, Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M: Co-transfection of EYFP-GH and ECFP-rab3B in an experimental pituitary GH3 cell: a role of rab3B in secretion of GH through porosome. Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society 46:419-421, 2008.
5. Matsuno A, Ide F, Tanaka H, Asano S, Miyawaki S, Uno T, Tanaka J, Nakaguchi H, Sasaki M, Murakami M, Fuke N: Oral administration of cilnidipine to patients with hypertensive intracerebral hemorr-

hage in the acute stage: significance and role of an N-type calcium channel blocker.

Irish journal of medical science, 2008.

[学会発表] (計 9 件)

1. Jun-ichi Tanaka, Gakushi Yoshikawa, Soichi Oya, Nobuhito Saito, Takaaki Kirino, Nobutaka Kawahara: Exogenous growth factors ameliorate behavioral deficits through activation of endogenous neuronal regeneration in young and aged rat Huntington models. Brain'07 and BrainPET'07, Osaka, Japan, 2007, 5, 20-24.
2. Gakushi Yoshikawa, Toshihiko Momiyama, Soichi Oya, Keisuke Takai, Jun-ichi Tanaka, Nobuhito Saito, Takaaki Kirino, Nobutaka Kawahara, Neuronal replacement and electrophysiological changes of the newly generated neurons in the adult striatum after ischemic brain injury. Brain'07 and BrainPET'07, Osaka, Japan, 2007, 5, 20-24.
3. Soichi Oya, Gakushi Yoshikawa, Keisuke Takai, Jun-ichi Tanaka, Nobuhito Saito, Takaaki Kirino, Nobutaka Kawahara, Notch signaling is activated in adult hippocampal neuronal regeneration after the transient global ischemia. Brain'07 and BrainPET'07, Osaka, Japan, 2007, 5, 20-24.
4. Nobutaka Kawahara, Cardiac arrest models and global ischemia in mice, Brain'07 and BrainPET'07, Osaka, Japan, 2007, 5, 20-24.
5. 松野彰、石田康生、田中純一、中口博、上峰子、水谷晃子、井上大輔、岡崎亮：頸部頸動脈アテロームにおける石灰化病変と骨代謝関連蛋白の発現；第82回日本内分泌学会学術総会、2009. 4. 23、前橋.

6. 飯島明、田中純一、松野彰、齊藤延人：椎骨動脈解離性動脈瘤に対する Stent Jack Coil Embolization；第37回日本神経放射線学会、2008. 2. 14-15、横浜.

7. 大宅 宗一、吉河学史、田中純一、川原信隆：Notch signaling と成体海馬における一過性全脳虚血後の神経再生について；第66回日本脳神経外科学会総会、2007. 10. 3-5、東京.

8. 吉河学史、大宅宗一、田中純一、川原信隆、一過性前脳虚血後のラット線条体における神経細胞の再生と成熟過程；第66回日本脳神経外科学会総会、2007. 10. 3-5、東京.

9. 吉河学史、大宅宗一、高井 敬介、田中純一、齊藤延人、桐野高明、川原信隆：一過性前脳虚血モデルを用いたラット線条体における神経再生について；第7回日本分子脳神経外科学会、2006. 9. 2-3、東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 純一 (TANAKA JUNICHI)
帝京大学・医学部・助教
研究者番号：00345191

(2) 研究分担者

川原 信隆 (KAWAHARA NOBUTAKA)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：60214673
(H19→H20：連携研究者)

中富 浩文 (NAKATOMI HIROFUMI)
東京大学・医学部附属病院・助手
研究者番号：10420209
(H18→H19：連携研究者)

高井 敬介 (TAKAI KEISUKE)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70376421
(H19→H20：連携研究者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：