

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20249063

研究課題名（和文） 脳虚血後の神経再生・炎症・遺伝子治療に関する総合的研究

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of neuronal regeneration, inflammation and gene therapy for post-ischemic insult by using experimental stroke models

研究代表者 齊藤 延人（SAITO NOBUHITO）
東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60262002

研究成果の概要（和文）：各種脳梗塞実験モデルを応用して、総合的な基礎研究を行った。神経幹細胞移植による軸索再生、炎症反応の病態解明、低酸素負荷による虚血耐性メカニズムの解明を行った。移植では、軸索再生は確認できなかったが、移植細胞がホーミングする状態までは確認できた。炎症に関しては、サイクロフィリン C 関連タンパク（CyCAP）がマクロファージの活性化に、重要な役割を果たすことが分かった。虚血耐性に関しては、低酸素応答による微小血管網の発達が一因子であることを示した。

研究成果の概要（英文）：By applying variety of experimental stroke models for the basic research, we have exerted the comprehensive analysis of neuronal regeneration, inflammation and ischemic tolerance after ischemic insult. For the possibility of axonal regeneration treated by the cell transplantation, the small number of the transplanted cells remain in the lesion, appearing just homing, neither proliferation nor rewiring. In terms of the immunoreactions to ischemic insult of the brain, Cyclophilin C-associated protein (CyCAP), via stimulating calcineurin phosphatase activity, plays a pivotal role for activation of macrophage. The phenomenon of ischemic tolerance may link hypoxic preconditioning with vascular remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2009 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2010 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2011 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
総計	37,000,000	11,100,000	48,100,000

研究分野：脳神経外科学

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：脳虚血、神経再生、炎症、プロテオミクス、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

当教室から報告された、遅発性神経細胞死後において成長因子投与による神経再生現象の発見が、国際的にも注目されている（Nakatomi H et al. *Cell* 110: 429-41, 2002）。そのノウハウを応用した、次世代型の脳神経外科治療法の開発の基礎研究として、脳虚血後の神経再生現象はこの分野の研究の主流となっている。

神経障害の回復・機能再建のための有力な治療法として、内因性幹細胞の誘導とともに、移植細胞治療の開発研究も重要である。神経由来多能性幹細胞、胚性幹細胞、骨髄由来の多能性幹細胞が報告され、中枢神経への移植実験において神経系細胞への分化を認めているが、細胞採取の困難さや免疫抑制剤の使用など、倫理的・臨床的に大きな問題をかかえている。

これまでの脳虚血研究では神経細胞の細胞死メカニズムや再生研究が精力的に行われてきたが、全脳梗塞の1/3をしめるラクナ梗塞においては、軸索とそれに付随したミエリン、オリゴデンドロサイトが選択的に障害される病態であり、脳梗塞のなかでも病態を異にする。原理的には軸索の再生伸展とミエリン形成がなされれば機能的な回復が期待できる点が、これまでとは全く異なる新しいアプローチ開発の可能性を秘めている。我々は最近ミニブタラクナ梗塞モデルを開発し、この問題にアプローチする手段を獲得している (Tanaka et al., *Stroke* 2008 39:205-212)。

移植再生医療に限らず最近の brain-machine interface の開発や遺伝子治療の開発が注目を浴びているが、これらの治療に共通する問題は異物の挿入による炎症反応であり、microglia の遊走や様々なサイトカインの放出やプロテアーゼの活性化がおこることが知られている。このような炎症反応は、脳虚血後の神経再生では炎症細胞の誘導と細胞応答システムを共有していることが考えられており、また虚血耐性現象と強く関連していることが疑われる。研究代表者の齊藤は、cyclosporin などの免疫抑制剤の ligand である CyCAP が脳虚血後に activate されることを見だし、脳虚血後の炎症反応について分子レベルでの独自の切り口を見いだしている (Shimizu T et al. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:325-337, 2005)。また、CyCAP が分泌タンパク質であり、microglia などの炎症細胞で発現していることがわかっている。

我々の用いるヘルペスウイルスベクターは脳腫瘍に対するヘルペスウイルス療法の開発の過程で作成されたものである。ヘルペスは神経系のウイルスであり、神経系への感染効率の良さが期待される。

2. 研究の目的

(1) ミニブタラクナ脳梗塞モデルにおける細胞移植療法の開発。

幹細胞を、損傷した脳に移植した場合、生着するかどうか、また、生着した場合、神経系の細胞に分化するかどうかという課題に対して、ミニブタラクナ梗塞モデルを用いて検証する。大型動物に移行する前にラットの白質損傷モデルを用いて予備実験を行っておく。

(2) 脳虚血後海馬 CA1 細胞の遅発性神経細胞死モデルでプロテオミクス解析を行い、脳虚血後および虚血耐性獲得後の炎症関連タンパクの動態を網羅的に解析し、神経幹細胞や炎症細胞の誘導を促進する分子メカニズムの切り口を探索する。また、低酸素状態の細胞における重要な転写調節因子である HIF1 のトランスジェニックラットを入手している。この HIF-1 トランスジェニックラットをもちいて、梗塞縮小効果や神経再生効果、虚血耐性増強効果を確認し、プロテオミクス解析を行って HIF-1 の役割について解

析する。

(3) 新型ヘルペスウイルスベクターが神経系への遺伝子導入方法として優れていることを明らかにし、治療目的ベクターとして使用可能か検討する。さらに、ヘルペスウイルスを用いた EGF/FGF 遺伝子導入により、遅発性神経細胞死後の神経再生を促進することができるか検討する。

3. 研究の方法

(1) ミニブタラクナ脳梗塞モデルを用いた幹細胞移植療法の開発

(a) 選択的白質梗塞(ミニブタ前脈絡叢動脈閉塞)モデル作成

【方法】specific pathogen free のミニブタ(体重14~24kg)を使用する。右前頭側頭開頭を行い、顕微鏡直視下に内頸動脈より分岐する穿通枝(前脈絡叢動脈)を同定し、ミニクリップにて血流を遮断する。

(b) 移植細胞の調整

【方法】ミニブタ側脳室壁(脳室下層・上衣層細胞)より細胞を採取し、神経栄養因子を加えた無血清培地で浮遊培養し、増殖する細胞が塊を確認する。

(c) 標識した神経細胞塊の移植

【方法】神経細胞塊は鉄剤にて標識した。移植細胞の経時的&空間的に追跡するための工夫:培養した移植細胞を超磁性酸化鉄粒子造影剤(フェルモキシデス)にて標識し、脳内に移植する。この鉄剤による標識法の利点としては、細胞障害性が少ないことほかに MRI にて経時的に移植細胞の動態を確認する(同一個体において空間的・時間的移植細胞の追跡が可能)と共に、組織標本にても Prussian Blue を用いて移植細胞が検出可能なことがあげられる。

《この研究結果を踏まえて最適条件検索のための、いわゆる試行錯誤(trial&error)研究の必要性迫られた。多くの個体を要するため、ミニブタラクナ梗塞を用いることは実験動物倫理上また物理的にも現実性が乏しいためラット内包モデルを開発し代用した。》

(d) ラット内包障害モデルの作成:ラット大脳白質(内包)へ定位的にエンドセリンを注入し(血管収縮により)再現性のよい白質梗塞を作成する。

(e) ラット脳からの移植細胞調整(神経幹細胞と血管内皮細胞)

ホスト脳細胞と移植細胞とを厳密に区別するために、GFP(green fluorescence protein)のラットから移植細胞の調整を行った。

神経幹細胞:GFP ラット側脳室壁から細胞を採取し、神経栄養因子を加えた無血清培地で浮遊培養し、増殖する細胞が塊を確認する。

脳血管内皮細胞:脳血管内皮細胞の初代培養を構築し、移植治療に用いる

(f)内包梗塞部位への定位的細胞移植

血管内皮細胞の細胞移植により、障害部位での生着が確認された(GFPにより宿主脳細胞と移植細胞が厳密に区別できた)。

(2)

(a)脳虚血後海馬神経細胞におけるプロテオミクス解析(リポドミクス解析)

遅発性神経細胞死は5分程度の一時的な全脳虚血により海馬CA1領域の神経細胞が選択的に数日間かけて緩やかに死滅に至る現象である。新たなアプローチとして質量顕微鏡法を用いた分子imagingにて、一過性全脳虚血後のラット海馬における分子動態変化の解析を行った。

【方法】SDラット(300-360g male)を用いて全脳虚血モデルを作成した(6分間の全脳虚血)。凍結切片を作成し、病理組織学的評価と質量顕微鏡法による解析を行った。

(b)炎症関連タンパクCyCAPの機能の解明
CyclophilinCに結合する内在性ligandのCyclophilinC associated protein(CyCAP)に注目した。

【方法】CyCAPに対するポリクローナル抗体を作成する。ラット中大脳閉塞モデルによるin vivo研究とマクロファージであるRaw264.7細胞を用いたin vitro研究で、食食能とCyCAPの発現について検討した。

(c)HIF-1関連トランスジェニックラット
HRE:Hypoxia response elementトランスジェニックラットを用いた虚血耐性に関する研究

本研究では、低酸素によって誘導される脳虚血耐性現象について、HRE過剰発現(transgenic)ラットを用いることで、HREの果たす役割と脳血管構築の変化(血管新生)に着目して検討することを目的とした。

【方法】実験にはHRE過剰発現ラットおよびそのwild typeであるwistarラット(雄, 300-330g)を用いた。動物実験用高圧タンク(P-5100S)を使用して1気圧のまま、7%酸素濃度で2時間の負荷を加えて低酸素負荷(hypoxic preconditioning; HP)とした。また、局所脳虚血として、開頭し顕微鏡下に電気凝固によるラットの中大脳動脈閉塞モデル(MCAO)を作成した。次の4群に分けた。A:対照のwistarラット群(W), B:低酸素負荷を加えたwistarラット群(W+HP), C:対照のHRE transgenicラット群(HRE), D:低酸素負荷を加えたHRE transgenicラット群(HRE+HP)。B及びD群では、HPはMCAO作成の14日前に加えた。MCAOの24時間後に梗塞巣を評価した。また、微小血管の染色及び計測のため、fluorescein-isothiocyanate(FITC)-conjugated lycopodium esculentum

agglutinin(LEA)を静脈注射し、脳組織を評価した。B及びD群ではHP後の24時間での脳組織を取り出し、proliferating cell nuclear antigen(PTCA)およびCD68(ED1)抗体にて染色し、A及びC群のそれと比較検討した。さらに、in vivoでの検討として、各群の血管内皮細胞を初代培養し(BとDではHP後1時間で採取)、その増殖速度やwestern blot analysisによるVEGF等の低酸素応答因子の発現を調べた。

(3) ヘルペスウイルスベクターによる神経再生誘導研究

虚血後の神経再生を促進するために、遺伝子導入による増殖因子の発現の効果の検討を行なう。発現遺伝子としては、組換えタンパクの持続投与による効果が報告されているEGFとIGFを候補とする。遺伝子導入による治療分子の発現の場合は、目的分子が局所で持続的に長期に産生され効果を示すため、組換えタンパクの投与に比し、常に活性のある分子の供給が可能であるという利点がある。ベクターとしては、単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)を使用する。当研究室で開発されたBacterial Artificial Chromosome(BAC)を用いた遺伝子組み換えHSV-1作製システムは、治療遺伝子を発現する組換えウイルスをプラズミド操作と同様の簡便な遺伝子組み換え操作によって作出することが可能で、比較的短期間の作業で意図するベクターを作製することが可能である。また、目的の発現遺伝子のほかにマーカーとしてLacZ遺伝子が組み込まれており、ベクターの導入された細胞をX-gal染色により簡便かつ高感度に検出することが可能である

4. 研究成果

(1) ミニブタラクナ脳梗塞モデルにおける細胞移植療法の開発。

【結果1】前脈絡叢動脈を永久閉塞した場合には大脳皮質や大脳基底核障害を起こすことなく内包に選択的な梗塞巣が作成された。病理組織学&MRI(DWI・FLAIR)で内包後脚に局限した梗塞が確認された。91.4%(32/35)の再現率でラクナ梗塞が確認された。(Tanaka et al., Stroke 2008 39:205-212)。

【結果2】脳内に移植した細胞はMRIにて低信号として同定することができたが、ダイナミックなふるまいをすることは確認できなかった。病理組織学には鉄染色にて移植細胞が同定できた。しかし、確認された移植細胞の数はわずかであった。本研究から、神経幹細胞移植のみでは、ホーミングがcausingて認められる状態(MRI, 組織像)であり生着、遊走、分化、神経ネットワークの

形成にはいたっていないことが判明した。
⇒大型動物(ミニブタ)における移植研究は時期早尚と判断し、小動物(ラット等げっし類)による移植研究の最適化条件の検証の必要を痛感し、ラット内包障害モデルを開発し同様な移植研究を行った。

【結果3】ラット大脳白質(内包)へ定位的にエンドセリンを注入し(血管収縮により)再現性のよい白質梗塞を作成することができた。このモデルを用いて、血管内皮細胞の細胞移植により、障害部位での生着が確認された(GFPにより宿主脳細胞と移植細胞が厳密に区別できた)。神経所見も麻痺症状の軽減を認め治療効果を示した。病理組織学的には、移植細胞により、梗塞部位に新たな血管構築をみとめ、宿主脳血管とのinteractionが示唆された。ミエリンの再生も惹起されていることとマイクログリアの浸潤が抑制された。

(論文:投稿中)

(2) (a)脳虚血後海馬神経細胞におけるプロテオミクス解析(リポドミクス解析)

【結果】虚血後のCA1領域の神経細胞死、グリオシス、炎症等の病理組織学的変化を時系列で評価・解析を行った。それに対比する方法として質量顕微鏡法による分子imagingにて時系列でのリン脂質の分子動態変化を解析した。Phosphatidylcholine(PC)およびSphingomyelin(SM)が分子種の違いにより異なる解剖学的分布・時系列的変化を示すことが明らかになった。全脳虚血後で組織学的変化が起きる前の変化に着目したところ、アラキドン酸(20:4)やドコサヘキサエン酸(22:6)などの多価不飽和脂肪酸を含有するPCがday1において海馬および歯状核の神経細胞体層で増加していた。

細胞死の過程で細胞膜の主要構成成分であるリン脂質の生理活性がアポトーシスや炎症反応等に関与することが示唆された。その中でも不飽和脂肪酸を含有するリン脂質の動態は神経細胞の虚血ストレスに対する反応やアポトーシスの初期的変化を反映すると考えられた。

質量顕微鏡法により神経細胞死における分子動態解析が可能となる。(論文:投稿準備中)。

(b)炎症関連タンパクCyCAPの機能の解明

【結果】ポリクローナル抗体は77kDaを示しCyCAP蛋白を特異的に認識し、Cyclophilin Cと細胞内で結合している事が示された。In vivoではラット中大脳動脈閉塞モデルを用いた。CyCAPの発現は梗塞中心部ではマイクログリアに、梗塞周辺部から遠位部にかけては神経細胞に発現を認めた。Western blottingでは患側で7日以降の発現量の増加を認め、ED1陽性細胞の分布拡大からマクロファージ

の浸潤を反映していると考えられた。In vitroでは、マクロファージ由来の培養細胞である、RAW264.7細胞を用いた。Raw細胞が活性化されるとCyCAPの発現量は上昇した。CsAの存在下では食食能の亢進が見られ、CyCAP、NFATc1、IL-2の発現上昇が見られ、apoptosisも抑制された。RAW細胞にラテックスピーズを食食させるとCyCAPの発現量が増加し、下流の転写因子であるNFATc1の発現量も増加した。サイクロフィリンのターゲットであるカルシニューリンは、NFATc1を脱リン酸化させ、核へ移行させる。最終的にはIL-2を発現させ、細胞に保護的に働かせる役割をもつ。そこで、RAW細胞にCyCAPを過剰発現させ、細胞をNFATで染色させると核での発現が増加し、脱リン酸化NFATc1が増加していることが示された。さらに、カルシニューリンとIL-2の発現は食食の時間経過とともに増加し、細胞の生存率も改善された。つまり、CyCAPはNFATと、結果として生じるIL-2産生を増加させることでマクロファージの食食と生存を制御していると考えられる。また、CyCAPマクロファージ由来のRAW細胞でCyCAP-GFPとサイクロフィリンC-FLAGの免疫沈降実験を行うと、CyCAPとCyPCはカルシニューリンとNFATc1により複合体を作ることがわかった。

CyCAP過剰発現状態でホスファターゼ阻害薬を投与すると、NFATはRAW細胞で細胞質に留まり、そして、ラテックス・スピーズの食食作用は著しく減少した。CyCAPの過剰発現は食食時に細胞保護的に働き、食食そのものを亢進させると考えられる。CyCAPはカルシニューリンに対して働き、カルシニューリンが阻害されると生物学的な効果は発揮されない。

CyCAPはCsAと競合的な立場にあると考えられていたが、CsAのシグナルを受けてCyCAP、またはその下流にあるタンパクの発現が増加した。脳虚血慢性期ではCyCAPの発現によりマクロファージの活性化が起こり、組織再建の一端を担っていると考えられた。CyCAPはCyPCの内在性リガンドであるが、CsAとは異なり、むしろ、カルシニューリンに対しては促進的に働くことと考えられる(Yamaguchi et al., *Brain Res.* 2011 23:55-65.)。

(c) HIF-1関連トランスジェニックラット

HRE:Hypoxia response element トランスジェニックラットを用いた虚血耐性に関する研究

【結果】低酸素負荷群(B及びD)では、対照群(A,C)に比べて有意に脳梗塞巣の縮小を認めた。更に、HPを加えた群同士を比較するとHRE+HP(D)群はW+HP(B)群に比べ、有意に脳梗塞巣の縮小を認めた(P<0.05)。これらの傾向は

白質でも皮質と同様に認められた。また、単位面積あたりの微小血管数の比較検討では、D群のみ有意に増加していることが認められた。免疫組織学的評価では、PCNA及びED1ともにD群が他の群に比較し有意に増加していた。血管内皮細胞の初代培養による増殖速度は、HP群(B及びD)では、対照群(A,C)に比べておよそ2倍の増殖速度を認めた。また、western blot analysisでもHP群でVEGFやHIFの増加がみられ、特にHRE過剰発現ラットの方がより増加していた。今回実験結果では、低酸素負荷群では脳梗塞の縮小を認め、さらにこの現象がHRE過剰発現群でより強力に進められることを確認した。これまでも、虚血あるいは低酸素負荷に対する耐性現象にHIF-1の発現が関与していることを示唆する報告はいくつかなされていたが¹⁾、HRE過剰発現ラットにて検討したものは我々の狩猟し得た範囲では本研究が唯一のものである。なおHIF-1 α 遺伝子破壊マウスは血管構築の異常をはじめ多くの形態異常を呈し、胎生致死である。さらに本研究では、HRE過剰発現ラットに低酸素負荷を加えた群において、脳毛細血管数の増加が確認された。脳虚血耐性現象はこれまで、ラット、マウスの局所脳虚血モデル、培養神経細胞の低酸素負荷モデルでも同様の現象の存在が確認されている。また、その分子機構の関与についても様々な研究が発展し、当初注目されたストレス蛋白質発現との関連だけでなく、プロトンコジーン遺伝子、抗酸化酵素、アポトーシス、サイトカイン、タンパク質リン酸化など種々のメカニズムが提唱されてきた。ただし、虚血耐性現象の獲得において脳血管構築の変化(血管新生)が関与しているかどうかは不明な点が多い。その点で、本研究はHRE過剰発現ラットという特殊な被検体を用いているが、実際に虚血耐性がより強力に得られた群で有意に毛細血管数が増殖していたという得られた結果は、虚血耐性現象の獲得において血管新生が果たした一定の役割を示唆させるものである。また、血管内皮細胞の培養増殖速度の増加や、血管内皮細胞の増殖を示すPCNAの増加は、その仮説を補強するものであろう。In vivoでのVEGFやPCNAの発現増加も認めることから明らかである。したがって、本研究においては、低酸素に暴露されたHRE過剰発現ラットの脳組織は、その強力なHRE発現とVEGFの作用を介してダイナミックなvascular remodelingを生じて、毛細血管網を発達させることにより虚血耐性を獲得したものと考えられた。虚血耐性がすべてこの作用機序で説明しうるわけではないが、虚血耐性獲得の一つのメカニズムを示している可能性はある。

(Kagoshima et al., *Kitakanto Med J*)

(3) ヘルペスウイルスベクターによる神経

再生誘導研究 ウイルス療法用として開発された異伝子組換えHSV-1は、正常神経細胞には感染するのみで細胞障害性は示さず、しかも導入遺伝子を持続的に発現することが可能であると予想される。このことを確認するため、まず、LacZ遺伝子をマーカー遺伝子として使用した。Blab/c nu/nuマウス的大脑基底殻部にウイルス(約 5×10^5 pfu)を注入し、2日後に脳を摘出して抗beta-galactosidase抗体にて免疫組織染色を行い、LacZ遺伝子の発現を確認した。次に、ルシフェラーゼ発現型HSV-1を作成し、*in vivo* imagingを行ってマーカー遺伝子の発現の時間的推移を観察した。同じく、マウス脳内にベクターを投与し、ルシフェリン代謝による発光を経時的に観察したところ、この方法で検出されるマーカー遺伝子の発現は1~2日後に比較的すみやかに減衰した。外来遺伝子の導入効率は良好と考えられたが、持続的発現のためには使用するプロモータの選択に工夫が必要を考察された。

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14件)

(1) 堀川弘吏, 今井英明, 陳毅力, 宮脇哲, 越智崇, 伊藤明博, 中富浩文, 斉藤延人. 局所脳虚血モデルにおけるMKP-1 mRNAの特異的かつ急峻な発現誘導 脳循環代謝 23:147, 2011 査読有

(2) 宮脇哲, 早坂孝宏, 今井英明, 堀川弘吏, 越智崇, 伊藤明博, 中富浩文, 瀬藤光利, 斉藤延人. Sprague-Dawley(SD)ラット全脳虚血モデルの確立と応用(質量顕微鏡法による遅発性神経細胞死の網羅的解析) 脳循環代謝 23: 169, 2011 査読有

(3) Kaie Kagoshima, Hideaki Imai, Chisato Kubota, Sandra Puentes, Masashi Kurachi, Yasuki Ishizaki, Yuhei Yoshimoto and Nobuhito Saito. Does hypoxic preconditioning induces angiogenesis and protects against focal cerebral ischemic damage in rats.

Kitakanto Med J 61:1-8 2011 査読有

(4) Saito N, Imai H. Insights on the revascularization mechanism for treatment of Moyamoya disease based on the histopathologic concept of angiogenesis and arteriogenesis.

World Neurosurg 75:204-5. 2011. 査読有
DOI:10.1016/j.wneu.2010.10.004

(5) Yamaguchi R, Hosaka M, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T. Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in

macrophages. **Brain Res**23:55-65. 2011 査読有 DOI:10.1016/j.brainres.2011.03.036

(6) 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. **J Neurosurg**. 113(4):835-850, 2010 査読有 DOI: 10.3171/2010.2.JNS09989

(7) Kubota C, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H, Takeuchi T. Constitutive reactive oxygen species generation from autophagosome/lysosome in neuronal oxidative toxicity. **J Biol Chem**. 285: 667-674, 2010 査読有 DOI:10.1074/jbc.M109.053058

(8) H. Imai, M. Nakamura, C. Kubota, S. Puentes, A. Faried, Y. Yoshimoto, N. Saito. The insight of revascularization mechanism based on angiogenesis and arteriogenesis from the experimental and clinical works in moyamoya disease. **J Cereb Blood Flow & Metab** 29, S377-S378 2009 査読有 DOI:10.1038/jcbfm.2009.151

(9) Y. Chen, A. Ito and N. Saito. A novel modified method and its confirmation of injection into CSF via the cerebellomedullary cistern in mice. **J Cereb Blood Flow & Metab** 29, S226 2009 査読有 DOI: 10.1038/jcbfm.2009.141

(10) 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. **Neurosci**. 158:683-692, 2009 査読有 DOI:10.1016/j.neuroscience.2008.10.043

(11) Nakamura M, Imai H, konno K, Kubota C, Seki K, Puentes S, Faired A, Yokoo H, Hata H, Yoshimoto Y, Saito N. Experimental investigation of encephalo-myosynangiosis using gyrencephalic brain of the miniature pig: histopathological evaluation of dynamic reconstruction of vessels for functional anastomosis. **J Neurosurg Pediatr** 3(6): 488-495, 2009 査読有 DOI: 10.3171/2008.6.PEDS0834

(12) Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka JI, 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(8):805-809, 2008 査読有

(13) Chen Y, Ito A, Takai K, Saito N. Blocking pterygopalatine arterial blood flow

decreases infarct volume variability in a mouse model of intraluminal suture middle cerebral artery occlusion. **J Neurosci Methods**.

174(1):18-24, 2008 査読有 DOI:10.1016/j.jneumeth.2008.06.021

(14) Tanaka Y, Imai H, Konno K, Miyagishima T, Kubota C, Puentes S, Aoki T, Hata H, Takata K, Yoshimoto Y, Saito N. Experimental Model of Lacunar Infarction in the Gyrencephalic Brain of the Miniature Pig: Neurological Assessment and Histological, Immunohistochemical, and Physiological Evaluation of Dynamic Corticospinal Tract Deformation. **Stroke** 39: 205-212, 2008 査読有 DOI:10.1161/STROKEAHA.107.489906

[学会発表](計4件)

(1) 堀川弘吏, 今井英明, 陳毅力, 越智崇, 伊藤明博, 中富浩文, 齊藤延人 ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける MKP-1 mRNA の虚血側大脳半球での特異的かつ鋭敏な発現上昇 第12回日本分子脳神経外科学会 横浜 2011.10.14

(2) H Horikawa, H Imai, Y Chen, T Ochi, A Ito, H Kanemitsu, H Nakatomi, N Saito. MKP-1 mRNA and protein expressions are induced in neuron at acute phase after focal cerebral ischemia. **Brain 2011** (ポスター)バルセロナ(スペイン) 2011.5.27

(3) H. Imai, N. Saito. Focal cerebral ischemia models of both lissencephalic and gyrencephalic species. **Brain 2011** (教育コース) バルセロナ(スペイン) 2011.5.25

(4) 今井英明, 久保田知里, 富沢真一郎, 越智崇, 伊藤明博, 中富浩文, 齊藤延人 神経細胞におけるフリーラジカルの産生機序と虚血細胞障害の解明(シンポジウム) 第11回日本分子脳神経外科学会 仙台 2010.8.27.

6. 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 延人 (SAITO NOBUHITO)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号:60262002

(2)研究分担者

今井 英明 (IMAI HIDEAKI)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号:70359587

(3)研究協力者

宮脇 哲 (MIYAWAKI SATORU)
東京大学・大学院生
小野 秀明 (ONO HIDEAKI)
東京大学・大学院生