

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09377

研究課題名(和文) マイクロミニピッグの脳室下帯におけるneurogenesisの検討

研究課題名(英文) The study of neurogenesis of subventricular zone in micromini pig

研究代表者

安達 一英 (Adachi, Kazuhide)

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10338056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂S期のマーカーである5-bromodeoxyuridine (BrdU: 5mg/ml)を母体腹腔内に投与し、投与後2時間後に固定した個体では、脳室下帯におけるBrdU陽性細胞はその背側側に最も優位に認められる。またBrdU-Dcx並びにBrdU-GFAP二重陽性細胞も背側に多い傾向にあるが、吻側においてはBrdU-Dcx二重陽性細胞数は背側、内側、外側で大きな差は認めなかった。BrdU母体腹腔内投与2か月後に固定した個体も同様の検討を行い、その動態を比較検討予定であったが、類似論文が発表されたため、現在は上記知見を基に違った検討方法を追加して行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系再生研究におけるモデル動物には、マウスやラットが長年使用されてきた。しかし、よりヒトに近い脳構造を有するモデル動物が好ましい。新世界ザルはモデル動物として適しているが、その脳は、脳回や脳皮質の発達が乏しく、ヒトにおける中枢神経系再生機構を解明するためには不十分と考えられる。本研究で用いた、マイクロミニピッグはヒトと同様の皮質や脳溝脳回を有し、またその個体サイズから実験動物として使用しやすく、そのNeurogenesisの機構を解明することは、今後の中枢神経系再生研究に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bromodeoxyuridine (BrdU: 5 mg/mL) was injected into the peritoneal cavity of a pregnant micro minipig. In the fetus brain fixed 2 h after BrdU injection, the number of BrdU-positive cells was detected predominantly in the dorsal-rostral side of the subventricular zone (SVZ). Although the number of double positive cells, BrdU-Doublecortin (DCX) and BrdU-Glia fibrillary acid protein (GFAP), were detected mostly in the dorsal side of SVZ, the number of BrdU-Dcx double positive cells in the rostral side was almost similar between the dorsal, medial, and lateral sides of SVZ. We were planning to do the same study in the fetus model fixed 2 months after BrdU injection and compare with the above fetus model fixed 2 h after BrdU injection, but now we do the other examination based on the current result of our study, because a similar paper was already published.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：neurogenesis subventricular zone micro mini pig

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞を用いた再生医療が臨床応用段階にある現在において、中枢神経再生も再生組織の自家もしくは他家移植を行い、機能回復を得ることが当面の目標であると考えられる。しかし移植医療は拒絶反応や、悪性転化、侵襲性などがある事を考えると、将来的には自己再生能力を賦活化することで、再生可能となることがより望ましいと考えられる。

脳においては、脳室下帯や海馬歯状回に神経幹細胞が存在し、増殖誘導され神経へと分化する (neurogenesis) だけでなく、齧歯類においては脳損傷により、neurogenesis が活性化され、損傷部位に誘導されることも明らかになっている。しかしヒトを含めた高等哺乳類ではいまだ検討が十分でなく不明な点も多い。その理由として汎用性が高く、ヒトに類似したモデル動物の使用が困難であることがあげられる。霊長類であるサルはヒトに近いモデル動物として候補にあり、ニホンザルなど旧世界ザルは、脳構造はヒトに非常に近く、良い実験動物となりえると考えられる。しかしその反面その個体サイズから飼育が困難で、規格統一された条件下で個体を得ることが困難で汎用性がない。そこでコモンマーモセットなど新世界ザルが現在使用されているが、その脳は脳回脳溝や皮質形成が乏しくヒトとは大きく異なる点が問題である。

2. 研究の目的

そこで我々は、マイクロミニピッグが、ヒトにおける疾患モデルとして使用可能と考え脳室下帯における neurogenesis の検討を行っている。理由として 偶蹄類であるが齧歯類より高等哺乳類である。 個体サイズも小さく現在汎用されるマウスやラットの実験器具を使用する事が可能である。 モデル動物として規格統一されている。 脳溝脳回並びに皮質がヒトに類似し発達している。といった4点があげられる。特に においては現在使用されているコモンマーモセットに比して優位性がある。

近年、生後のブタを用いた neurogenesis の研究が報告され (Porter et al., Stem Cell Reports, 2022, Morton et al., Sci Transl Med, 2017 など) ヒトの類似した脳を有する非霊長類モデル動物として注目されつつある。しかし、通常のブタは個体サイズが大きく、神経科学に用いるモデル動物としては不利な点が多い。また、脳溝脳回を有するモデル動物として、フェレットを用いた論文が発表されているが、生後脳のニューロン新生については研究が進んでいない。本研究は、日本発のユニークなモデル動物であるマイクロミニピッグを用いて、初めて生後脳の neurogenesis を検討しようとするものである。本研究の実験の結果、マイクロミニピッグとヒトの共通点・相違点が明らかになれば、脳疾患の再生医療の研究に使用することが可能になる。

3. 研究の方法

脳室下帯においては神経幹細胞である Type B cell (stem cell) はゆっくりと増殖しているが、Type C cell (transit amplifying precursor cell) へと分化し、嗅球への経路である Rostral migratory stream (RMS) を Type A cell (migrating neuroblast cell) となり移動して、嗅球で Neuron へと分化する。そこで免疫染色法並びに電子顕微鏡を用い、上記細胞の動態並びに形態を検討する。

方法は、細胞分裂 S 期のマーカーである 5-bromodeoxyuridine (BrdU: 5mg/ml) を母体腹腔内に投

与する(1ml/100g)。投与後2時間後と60日後に、麻酔下に経心臓的にPhosphate Buffered Saline (PBS)を用いて還流洗浄後、4%PFAを用いて還流固定し脳を摘出する。BrdU投与にて分裂細胞を標識し、投与後2時間後と60日後に分けて評価することで、標識された細胞の動態を明らかにすることが可能となる。評価部位としてマイクロミニピッグの脳は大きいため、側脳室を吻側、尾側、中間の3部位に分け(右図)、各断面における脳室下帯と周辺脳を背側、内側、外側に分類し、免疫染色を用いて脳室下帯及び周辺組織におけるneurogenesis関連細胞の動態を明らかにする。

4. 研究成果

当初はこれらのラベリングされた細胞をカウントしてその動態を明らかにすることを目的に行ってきた。投与後2時間後に固定した個体では、脳室下帯におけるBrdU陽性細胞はその背吻側に最も優位に認められる。またBrdU-Dcx並びにBrdU-GFAP二重陽性細胞も背側に多い傾向にあるが、吻側においてはBrdU-Dcx二重陽性細胞数は背側、内側、外側で大きな差は認めなかった。BrdU母体腹腔内投与2か月後に固定した個体も同様の検討を行い、その動態を比較検討予定であったが、類似論文が発表されたため、現在は上記に追加して脳室下帯3層(Tire1-3)におけるneuroblastの3次元的な観察を行うことでその動態を明らかにしようと試みているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金子 奈穂子 (Kaneko Naoko) (20464571)	同志社大学・病態脳科学分野(神経再生機構部門)・教授 (34310)	
研究分担者	廣瀬 雄一 (Hirose Yuichi) (60218849)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	澤本 和延 (Sawamoto Kazunobu) (90282350)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関