

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 5 月 10 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591834

研究課題名（和文）脳虚血後神経新生における FABP と制御因子の解析

研究課題名（英文）Roles of FABP and its regulating factors on neurogenesis after ischemia

研究代表者

杉田 正夫（SUGITA MASAO）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：70235886

研究成果の概要（和文）：

虚血後神経新生の機序解明は脳梗塞の再生治療の開発に必須である。脳型脂肪酸結合蛋白（B-FABP）は神経細胞の保護や新生に関与すると考えられているが、虚血性神経傷害および虚血後神経新生における役割は十分検討されていない。そこで本研究では、マウス一過性前脳虚血モデルを用い、これらを検討した。その結果、虚血性神経傷害への関与は明らかではなかったが、B-FABP は、神経幹細胞に発現し、非虚血および虚血後の両者において、これらの細胞の増殖に関与することが解明された。

研究成果の概要（英文）：

Elucidating the mechanisms of neurogenesis after ischemia is crucial for the development of regenerative therapy for stroke. Brain-type fatty acid binding protein (B-FABP) is supposed to regulate neurogenesis during development and to have a cytoprotective role; however, the roles on neurogenesis and neuronal injury after ischemia have not been studied well. In this study, we used a mouse forebrain ischemia model, and examined expression change of B-FABP after ischemia. In addition, we evaluated the effects of B-FABP gene knockout on neurogenesis and neuronal injury after ischemia. The current study revealed that B-FABP is expressed in neuronal stem cells, and regulates proliferation of neuronal stem cells under physiological and ischemic conditions, though the role of B-FABP on ischemic neuronal injury is not evident.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：脳虚血、脂肪酸結合蛋白、神経新生、神経細胞保護

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の成体脳においても、側脳室周囲の脳室下帯 subventricular zone (SVZ) および海馬歯状回顆粒下層 subgranular zone (SGZ) で神経新生が活発に起こっており、脳虚血などの様々な刺激により賦活化されることが知られている。虚血後神経新生が果たす生理的意義の十分な解明はなされていないが、将来の脳梗塞治療への応用という観点からも注目されている。

脂肪酸結合蛋白質 (free fatty acid binding protein: FABP) は 14-15kD の低分子量細胞内蛋白質群である。10 種類におよぶ FABP 分子ファミリーが生体組織に広く多様に分布しており、これらは、細胞内への脂肪酸の取り込み、細胞内での脂肪酸の貯蔵、細胞内シグナル伝達の調節、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) をはじめとする核内受容体への脂肪酸の運搬などを行っていると考えられている。

脳には、FABP 分子ファミリーのうち、心臓型、上皮型、脳型 (B-FABP) が存在する。B-FABP の発現は神経幹細胞/前駆細胞の働きを持つ radial glia で強いこと、また神経幹細胞/前駆細胞での神経新生に必須である Pax-6 および Notch シグナル経路の直接の標的蛋白質が B-FABP であることより、この FABP は胎生期の神経新生に深く関与していると考えられている。B-FABP は、胎生期のみならず、成体においても SGZ の神経幹細胞/前駆細胞で発現し、新生神経細胞の増殖制御に関わることが報告されており、成体脳での虚血後神経新生にも関与している可能性が考えられるが、詳細についてはほとんど検討されていない。

一方、脳虚血後に発生する遊離脂肪酸やその代謝産物のエイコサノイドは、虚血性神経細胞障害を増悪させることが知られている。心筋虚血においては、FABP はこのような細胞内脂肪酸蓄積を抑制し、細胞保護的に働くことが報告されている。また、FABP はフリーラジカル捕捉作用を有すること、更には、細胞保護作用を有する PPAR γ の転写を促進することなどより、B-FABP が脳虚血において細胞保護的に働く可能性があるが、現在まで検討されていない。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、(1) B-FABP は虚血後神経新生において新生神経細胞の増殖を促す、(2) B-FABP が虚血性神経細胞障害に対して保護的に働くと仮説を立てた。これらを検証すべく、マウス前脳虚血後海馬における B-FABP の発現変化を解析し、B-FABP ノックアウトが海馬での虚血後神経新生および虚

血性神経細胞傷害に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 前脳虚血モデルの作成

生後 8-12 週齢 (20-25g) の雄性 C57BL/6 野生型マウス (WT マウス) と、野生型と背景を同一とする雄性 B-FABP ノックアウトマウス (BKO マウス) を用いた。吸入麻酔下にて、微小血管クリップを用いて両側総頸動脈を 20 分間閉塞し、前脳虚血を作成した。Laser-Doppler flowmetry で測定した脳皮質血流が、虚血後 1 分以内に前値の 13% 未満に低下したマウスのみを使用した。Sham 群では、同環境下で両側総頸動脈の露出のみを行った。

(2) 虚血性神経細胞傷害の検討

虚血後 10 日目のマウスを 4% paraformaldehyde を用いて灌流固定し、断頭した。脳薄切切片を cresyl violet 染色し、海馬 CA1、CA2、CA3、hilus、歯状回神経細胞の形態学的変化を検討した。

(3) 新生神経細胞の同定

新生細胞は、bromodeoxyuridine (BrdU) により標識した。虚血後 7-9 日目に BrdU を 50 mg/kg、1 日 3 回腹腔内投与した。虚血後 10、16、23、30 日目にマウスを灌流固定し、脳切片を作成した。脳切片を、塩酸処置した後、BrdU 免疫染色を行い、SGZ の BrdU 陽性細胞をカウントした。

(4) 新生細胞分化の解析

上記 (3) のサンプルを使用し、BrdU と各種細胞マーカー {Nestin (神経幹細胞)、Double cortin (DCX) (遊走能を持つ幼弱神経細胞)、NeuN (成熟神経細胞)} の多重蛍光免疫染色を行った。共焦点顕微鏡 (FV1000; Olympus 社) を使用し、海馬歯状回 SGZ および顆粒細胞層の BrdU 陽性細胞と細胞マーカーとの共局在を観察した。

(5) B-FABP 発現の western blot 解析

虚血後 3、7、11 日に両側の海馬を摘出し、蛋白質サンプルを抽出した。30 μ g のサンプルを 10% NuPAGE Bis-Tris gel を用いて電気泳動し、polyvinylidene difluoride 膜へ転写した。膜はブロッキング後、一次抗体 (ウサギ抗 B-FABP 抗体) および二次抗体と反応させ、結合抗体を chemiluminescence 法で発光した。Fuji LAS 4000 Lumino Image Analyzer (Fuji Film 社) で検出した。

(6) B-FABP 発現細胞の同定

虚血後 6 日目に BrdU を 50 mg/kg、1 日 2 回腹腔内投与し、虚血後 7 日目に灌流固定した。B-FABP と BrdU および各種細胞マーカーの多重蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡で観察した。

(7) 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。二群間の検定には Student の t 検定を行った。多群間の検定では、ANOVA 解析を行った後、Scheffe の多重比較検定を行った。P<0.05 を統計学的有意差有り と判定した。

4. 研究成果

(1) 虚血性神経細胞障害の検討

虚血 10 日後の WT マウスでは、主に hilus に神経細胞脱落を認めた。BKO マウスでも主に hilus に神経細胞脱落を認め、傷害の程度は WT マウスと差を認めなかった。

(2) Western blot 法による B-FABP 発現解析

WT マウスにおいては、B-FABP の発現は、虚血後に著明に誘導され、虚血後 7-10 日の時点で、sham 群に比較し有意に発現が亢進していた (n = 4, P<0.05) (図 1)。

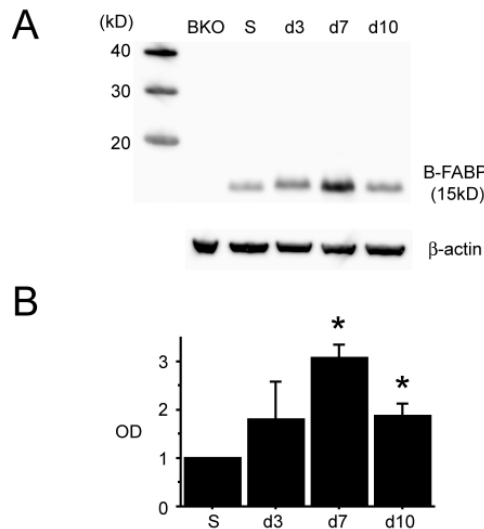


図 1 : 脳虚血後の B-FABP 発現変化

(3) 免疫染色による B-FABP 発現細胞の同定

WT マウス sham 群では、海馬 SGZ を中心に B-FABP の軽度の発現を認めたが、この発現は虚血 7 日後の WT マウスでは著明に亢進していた。同時点で、WT マウス SGZ の BrdU 陽性細胞は著明に増加し、また SGZ および歯状回顆粒層での nestin、GFAP、DCX の発現亢進も認められた。B-FABP は nestin および GFAP と

共陽性を示し、大部分の BrdU 陽性細胞は B-FABP 陽性であった。一部の B-FABP 陽性細胞は DCX と共陽性を示したが、NeuN とは共陽性を示さなかった (図 2)。

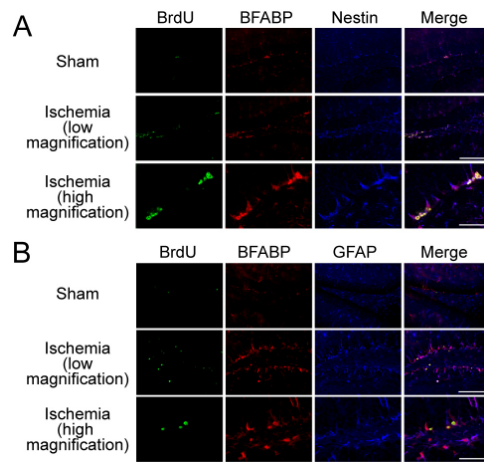


図 2 : B-FABP および細胞マーカーの多重蛍光免疫染色

(4) 虚血後 SGZ での神経新生の解析

WT マウス SGZ での BrdU 陽性細胞数は、虚血後に有意に増加し、虚血 10 日後の時点では sham 群の 2.95 倍に増加した。虚血 10 日後以降、BrdU 陽性細胞数は徐々に減少したが、虚血 39 日後までの全てのタイムポイントで、WT マウス虚血群では WT マウス sham 群に比べ BrdU 陽性細胞数が有意に増加していた。BKO マウスでは、sham 群および虚血群ともに、BrdU 陽性細胞数が、WT マウスに比し有意に低下していた (図 3)。

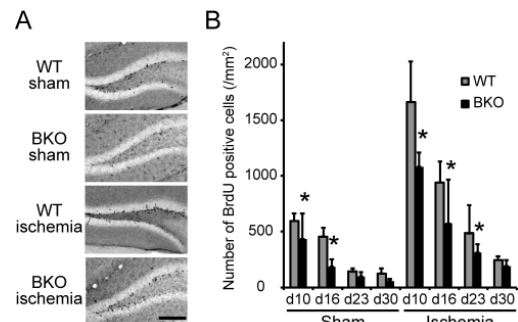


図 3 : WT マウスと BKO マウスの神経新生

(5) 新生細胞分化の解析

WT マウス sham 群では、BrdU 陽性細胞は、術後 10 日の時点で、nestin と 40.5%、DCX と 30.6% に共陽性を示した。その後 nestin の発現率は徐々に低下し、術後 23 日ではこの発現を認めなくなった。DCX の発現率は徐々に上昇し、術後 23 日の時点で発現のピ

ークを示し、その発現率は 80.8% だった。術後 39 日では BrdU 陽性細胞の多くは NeuN を発現するようになり、BrdU 陽性細胞の 68.0% が NeuN を発現した。この新生細胞の分化の傾向は、WT マウスの虚血群でも同様であった。一方、BKO マウスの新生細胞の分化は WT マウスのそれと差を認めた。すなわち、BKO マウスの sham 群では、術後 10 日の時点での BrdU 陽性細胞の DCX 発現率が WT マウス sham 群に比し、有意に高値であった ($n = 7, P < 0.05$)。虚血群でも同様の傾向を認め、BKO マウス虚血群での BrdU 陽性細胞の DCX 発現率は、WT マウス虚血群に比し、虚血後 10、16、23 日の時点で有意に高値であった ($n = 7, P < 0.05$)。NeuN の発現率は sham 群、虚血群とも、WT マウスと BKO マウスで差を認めなかった (図 4)。

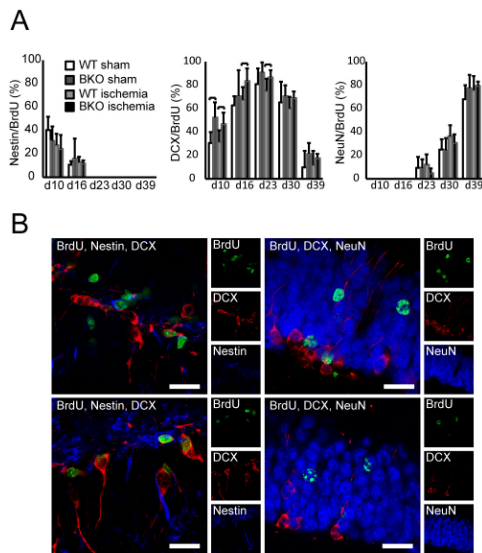


図 4 : WT マウスと BKO マウスにおける新生細胞の分化

考察

(1) 虚血後神経細胞傷害における B-FABP の役割について

虚血により放出された遊離脂肪酸が生体膜損傷を引き起こすこと、またアラキドン酸の代謝産物である eicosanoid には様々な生理活性物質が含まれるが、多くの eicosanoid は虚血後に神経傷害的に働くことより、これら遊離脂肪酸および代謝産物は総じて虚血性神経傷害の増悪因子である可能性が高い。これらの代謝に B-FABP が関わっているものと考えられるが、本検討では虚血性神経細胞障害における B-FABP の役割は明らかではなかった。脳虚血病態においては、神経細胞傷害のみならず、白質傷害も非常に大きな比重を占める。ミエリン鞘は神経細胞に比し脂質

を豊富に含有することが知られており、脂質酸化が虚血性傷害で重要な役割を果たす。本研究では B-FABP の虚血性神経細胞傷害への関与は明らかではなかったものの、今後、白質傷害を伴う脳虚血モデルを用いて解析を進める必要がある。

(2) 神経新生における B-FABP の役割について

神経新生の検討に関しては、以下のような結果を得た。①虚血後海馬での B-FABP の発現は、神経新生がピークを迎える虚血後 7-10 日の時点で亢進し、この発現亢進は、主に増殖中の神経幹細胞/前駆細胞で見られる。②非虚血後および虚血後の両者において海馬 SGZ での神経細胞新生は、BKO マウスで抑制される。③神経幹細胞/前駆細胞から幼弱神経細胞への新生細胞の分化は BKO マウスで促進されるが、幼弱神経細胞および成熟神経細胞に分化した細胞数自体は BKO マウスと WT マウスで差を認めない。

神経新生の賦活程度は虚血強度に依存する可能性が指摘されているが、本検討では WT マウスと BKO マウス間の虚血侵襲に差を認めず、両マウス間の虚血後神経新生の違いを虚血強度からは説明できない。神経細胞の新生は虚血後のみならず非虚血下の sham 群においても BKO マウスで抑制されていたこと、更には、B-FABP が虚血後神経再生のピークに一致して発現が亢進し、この発現が賦活化された神経幹細胞/前駆細胞で観察された点を合わせて考えると、B-FABP は神経幹細胞/前駆細胞において非虚血および虚血後の両環境下で、新生神経細胞増殖を推進する役割を有するものとみなすことができる。

BKO マウスにおいては、新生細胞の DCX 発現率は亢進していたが、最終的な NeuN 発現率は BKO マウスと WT マウスで差を認めなかった。BKO マウスでは神経幹細胞の増殖が抑制されるが、個々の新生細胞の DCX 陽性細胞への分化が促進されることにより、最終的な NeuN 陽性率は WT マウスと BKO マウスで差を生じなかったものと考えられた。これらの結果は、B-FABP 遺伝子発現の阻害が胎生ラット培養神経上皮細胞新生細胞の増殖を抑制し、神経細胞の性質を有する Tuj1 陽性細胞への分化が促進されたとの報告や、生後 4 週の BKO マウスでは SGZ の神経新生が抑制されると共に、radial glia が減少したとの報告とも一致する。以上より、B-FABP は非虚血ならびに虚血後の両者の環境下において、神経幹細胞/前駆細胞の増殖と未分化性の維持に関与していることが示唆された。

脳内に存在する三種類の FABP はその機能を互いに補完し合う可能性が指摘されており、本検討で使用した BKO マウスでも、他の FABP の機能が亢進している可能性もある。上

記の結果が、これに影響を受けている可能性も否定はできない。今後、他の上皮型や心臓型の虚血後神経細胞傷害や虚血後神経新生における役割についても研究する必要がある。

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)

[学会発表] (計1件)

①Tatsuya Kato, Hideyuki Yoshioka, Yuji Owada, Masao Sugita, Takashi Yagi, Takuma Wakai, and Hiroyuki Kinouchi: Role of Brain Type Fatty Acid Binding Protein in the Transient Brain Ischemia. XXIVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & IXth International Conference on Quantification of Brain Function with PET. (2012. 7. 2, Chicago)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 正夫 (SUGITA MASAO)

山梨大学・医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：70235886

(2) 研究分担者

木内 博之 (KINOUCHI HIROYUKI)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30241623

(3) 連携研究者

なし