

機関番号：22701

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791373

研究課題名 (和文)

大脳基底核、視床における虚血性脳障害後の神経再生誘導

研究課題名 (英文)

Neurogenesis after ischemic brain injury in basal ganglia and thalamus

研究代表者

立石 健祐 (TATEISHI KENSUKE)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00512055

研究成果の概要 (和文)：海馬 CA1 領域における神経再生誘導を踏まえ、他領域にも同様の誘導が可能か検討を行った。今回線条体、視床をターゲットとし虚血モデル作成を行った。線条体、視床領域の安定的神経細胞死を観察するため海馬 CA1 と同様の方法で虚血モデル作成を開始した。しかしながら6分間全脳虚血ならびに低血圧負荷での遅発性神経細胞死は安定的な評価に至らなかった。このことから更なる虚血時間の延長および血圧コントロールを再設定し観察を行った。同領域は海馬神経細胞死よりも神経細胞死のための負荷が必要であり、選択的細胞死と個体生存の観点から課題が残った。

研究成果の概要 (英文)： We assessed whether the similar neurogenesis was possible in another area of the hippocampal CA1 after the global ischemia. In this research, the striatum and thalamic were made in the target. Because the load for the neuronal death was more severe than the hippocampal cell death, we could not completely analyze the neurogenesis of these targets. The problem remained of the viewpoint of the selective cell death and individual living in this research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 7304 脳神経外科学

キーワード：全脳虚血モデル、遅発性神経細胞死、神経再生誘導、視床、線条体

## 1. 研究開始当初の背景

成体脳においても自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞が存在することが、最近の研究で明らかになった。神経幹細胞はこれまで前脳室下帯及び海馬歯状回の顆粒下層に

存在することが分かっておりそれぞれ嗅球神経細胞及び海馬顆粒細胞の神経再生を司っている。研究協力者らは一過性全脳虚血後の海馬 CA1 領域の神経細胞死モデルを用いて、成体神経幹細胞は CA1 領域の脳室下

帯にも存在するとともに成長因子の投与によって増殖能を賦活化すると40%の神経の再生が可能であることを世界に先がけて報告した。

一方で神経幹細胞に基づく内在性神経細胞再生が多部位にても再現可能であるか特に虚血に対し脆弱な領域かつ神経幹細胞の存在する視床及び線条体領域にて解析を図ることで本治療が応用可能であるか検討する必要がある。

内在性神経幹細胞からの神経再生療法は特に局所脳虚血モデルにおいて脳梗塞を来すことから線条体領域での研究が早期より行われている。一方で局所脳虚血モデル（中大脳動脈閉塞モデル）では虚血領域が側副血行路や閉塞部位に起因して安定しないことが挙げられ、また組織壊死が急速に進行する為神経膠組織が欠損することからも定量的解析が困難である。実際本研究の一環として中大脳動脈閉塞モデルを用いて線条体領域の組織検討を行ったが、線条体領域の梗塞領域の安定化のみならず皮質梗塞に限定する脳梗塞モデルに留まる例も多く認められた。

一方で全脳虚血後の選択的神経細胞死は神経細胞の足場という意味で最適な病態であり海馬と同様な再生誘導を得られる可能性を保持していると考えられる。特に第三、第四脳室の脳室壁近傍に神経幹細胞が存在するとされていることもあり、全脳虚血モデルは第三脳室近傍の視床に置いても選択的神経細胞死が生じることが示されていることから評価に適したモデルと思われる。

内在性神経細胞誘導に関して全脳虚血モデルは最適な条件を有していると考えられ、本モデルを用いた細胞新生の挙動を解析することで今後の脳虚血治療への応用につなげることを研究の全体構想とした。

## 2. 研究の目的

内在性神経幹細胞からの神経再生療法が脳の広範な領域でどの程度可能かを検討することを目的とし全脳虚血モデルを安定的に作成することを研究の第一目標とした。

海馬 CA1 領域の虚血モデルは過去の研究でも再現性、生存率の両面から安定した梗塞巣の再現が証明されていることから、まず CA1 領域の梗塞モデル作成を開始した。ついで線条体、視床領域の梗塞モデル作成のために虚血侵襲を更に追加し再現性、生存率の両面における安定化を目標とした。

海馬以外の領域における虚血細胞死に注目し、特に線条体及び視床には虚血に脆弱な領域が存在することから特にこの2領域を中心に解析を行った。神経細胞死定量のため脳虚血モデルを作成した。これらの領域における内在性神経幹細胞の脳虚血侵襲後の挙動とともに各種成長因子投与後の応答性を解析することでどの程度の神経細胞が誘導、置換されるか検討することを全体目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1 全脳虚血モデル作成

雄性 Wistar ラット 8-9 週齢を用いた。個体差を低減するため 280-320 g のラットを基準とし飼育後実験を行った。

椎骨動脈の永久閉塞と総頸動脈の一過性閉塞を併用した4血管閉塞モデルであり、海馬の神経細胞死に関しては6分虚血で非常に安定した結果が得られている。今回の線状体神経細胞死に関しては10分間の一過性両側総頸動脈閉塞に低血圧負荷を加えたモデル作成を行った。

また各種パラメーターとして呼吸循環、体温を一定安定化するため人工呼吸器、頸動脈的

血圧モニタリング、直腸温並びに脳温モニタリングを全例で行い個体差を極力低減するよう努めた。

2 急性期の内在性神経幹細胞の虚血応答  
全脳虚血後に48時間のBrdU腹腔内投与により増殖細胞のラベリングを行い、虚血後14日までの増殖応答プロファイルを解析した。標識された細胞が真の神経細胞であるか検討するためNestin, DCX, Neu Nの二重染色を行い前駆細胞、成熟神経細胞発現の評価を行った。

3 成長因子投与による内在性神経幹細胞の虚血後急性期応答

神経幹細胞はEGF、FGF-2などの成長因子に応答して増殖することが知られており、海馬の再生実験において研究協力者らの検討で有効な再生が示された。これらの成長因子は虚血に対し保護効果を有していることから神経細胞死が完成する48時間後より投与を開始した。急性期増殖細胞の標識となるBrdU腹腔内投与によるラベリングに加え上記と同様に標識された細胞が真の神経細胞であるか検討するためNestin, DCX, Neu Nの二重染色を行い前駆細胞、成熟神経細胞発現の評価を行った。

過去の研究者らの研究で海馬CA1領域の神経細胞死モデルを用いて成体神経幹細胞は脳室下帯に存在するとともに各種成長因子投与による増殖能賦活作用によってCA1領域の神経細胞再生を報告した。これらの結果を踏まえ線条体及び大脳基底核領域にも同様の現象が再現可能か検討を行った。今回特に海馬CA1領域、線条体、視床領域における神経再生誘導応答を解析する為、一過性前脳虚血モデルの作成を継続した。両側椎骨動脈完全閉塞後一過性両側総頸動脈閉塞に低血圧負

荷を加えた4血管閉塞部分再灌流モデルを使用した。低血圧負荷侵襲および全脳虚血時間の設定により海馬CA1領域の遅発性神経細胞死に変動が生じた。本研究は次年度以降引き続き検討を行い実験モデルの安定化を前提に再生誘導可能か更なる検討を図る予定である。

#### 4. 研究成果

##### 1 実験モデル

本研究ではラット一過性全脳虚血モデルを用いた。本モデルは海馬CA1領域の遅発性神経細胞死が高率に再現可能であることが示されていることから本モデルの作成を開始した。両側椎骨動脈完全閉塞後6分間の両側総頸動脈一過性閉塞に低血圧(60mmHg)を負荷したモデルであり海馬CA1領域における細胞死は95%相当に認められる安定化が果たされた。

一方で大脳基底核及び視床領域の神経細胞死を得るため更なる虚血負荷(低血圧40mmHg及び10分の両側総頸動脈閉塞)を加えたところ生存率が著しく低下した。

そのため虚血時間を短縮したところ線条体領域の細胞死は観察されたものの、一方で生存率の課題が残った。これらの結果を踏まえ虚血時平均血圧を60mmHgに再設定後、非常に安定した虚血モデルが形成された。このモデルを用いて各種成長因子を投与後細胞応答を各種手法を用いて解析した。

##### 2 急性期内在性神経幹細胞の虚血応答

上記モデルを用いて線条体、視床領域の虚血後の細胞定量を行った。上記のごとく高い生存率の維持が困難であったことから不十分な検討となった。

なお線条体、及び視床のいずれも無治療では

有意な細胞再生は二重染色の結果認められなかった。

### 3 成長因子投与による内在性神経幹細胞の虚血後急性期応答

急性期内在性神経幹細胞の虚血後成長因子投与を行ったが本課題期間における有意な神経細胞新生は証明されなかった。原因として遅発性神経細胞死に至る閾値設定と個体生存のための閾値設定のバランスが挙げられる。本モデル作成に多くの時間を費やしたことが最大の問題と考えられる。一方で虚血時間、虚血時血圧コントロールを再設定したことで漸く安定化が得られるに至った。

今後引き続き研究を継続し再現性の高い、定量性に富む神経幹細胞応答の解析が可能になったものとする。

また遅発性神経細胞死におけるアポトーシスの関与が示されることからアポトーシス誘導蛋白を導入することで負荷侵襲が低減可能か検討を行った

### 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)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

立石 健祐 (TATEISHI KENSUKE)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00512055

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：